



Università Ca' Foscari Venezia

**Corso di Laurea Magistrale
In Scienze Ambientali**

LM-75 (Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio)
Curriculum Valutazione e gestione dei sistemi ambientali

Tesi di Laurea

Effetti dei lisciviati da materiali per palificazioni in ambienti salini

Relatore:

Prof.ssa Annamaria Volpi Ghirardini

Correlatore:

Prof. Giovanni Libralato

Laureando:

Marco Zattera

Matricola 854315

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

Premessa.....	1
1. Razionale e obiettivi della tesi.....	3
2. Introduzione.....	4
2.1 L'utilizzo del legno per palificazioni.....	4
3. Procedura valutativa.....	7
3.1 Approccio metodologico generale.....	7
3.2 Linee guida generali test di tossicità.....	12
3.3 Linee guida generali produzione lisciviato.....	12
4. Quadro delle normative: possibili riferimenti.....	15
4.1 Normative nazionali.....	15
4.2 Normative comunitarie.....	29
5. Materiali e metodi.....	35
5.1 Acquisizione dei materiali per palificazioni e relative informazioni preliminari.....	35
5.1.1 Materiale A.....	35
5.1.2 Materiale B.....	38
5.1.3 Materiale C.....	40
5.2 Fasi sperimentali della valutazione ecotossicologica.....	47
5.2.1 Procedura di lisciviazione.....	47
5.2.2 Test di tossicità.....	52
5.2.2.1 Test d'inibizione della bioluminescenza (<i>V. fischeri</i>).....	53
5.2.2.1.1 Principio del metodo.....	53
5.2.2.1.2 Materiali e soluzioni.....	53
5.2.2.1.3 Apparecchiature.....	53
5.2.2.1.4 Procedimento.....	54
5.2.2.2 Test inibizione della crescita algale (<i>P. tricornutum</i>).....	55
5.2.2.2.1 Principio del metodo.....	55
5.2.2.2.2 Materiali e soluzioni.....	55
5.2.2.2.3 Apparecchiature.....	56
5.2.2.2.4 Procedimento.....	57
5.2.2.3 Test di embriotossicità con i molluschi bivalvi (<i>C. gigas</i>) (<i>M. galloprovincialis</i>).....	58
5.2.2.3.1 Principio del metodo.....	58

5.2.2.3.2	Materiali e soluzioni.....	59
5.2.2.3.3	Apparecchiature.....	60
5.2.2.3.4	Procedimento.....	60
5.2.2.4	Test di immobilizzazione con i crostacei (<i>A. franciscana</i>).....	62
5.2.2.4.1	Principio del metodo.....	62
5.2.2.4.2	Materiali e soluzioni.....	62
5.2.2.4.3	Apparecchiature.....	63
5.2.2.4.4	Procedimento.....	63
5.2.2.5	Test di tossicità con <i>T. fulvus</i>	64
5.2.2.5.1	Principio del metodo.....	64
5.2.2.5.2	Materiali e soluzioni.....	64
5.2.2.5.3	Apparecchiature.....	65
5.2.2.5.4	Procedimento.....	65
6.	Risultati.....	67
6.1	Test con <i>Vibrio fischeri</i>	67
6.2	Test con <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	70
6.3	Test con <i>Crassostrea gigas</i>	74
6.4	Test con <i>Mytilus galloprovincialis</i>	78
6.5	Test con <i>Artemia franciscana</i>	81
6.6	Test con <i>Tigriopus fulvus</i>	87
6.7	Valutazione della tossicità.....	88
6.7.1	Bianco procedurale.....	88
6.7.2	Campione A.....	89
6.7.3	Campione B.....	90
6.7.4	Campione C.....	91
7.	Conclusioni.....	93
	Bibliografia.....	95
	Allegato I.....	98
	Lista acronimi.....	106

Premessa

L'insorgere di alcune specifiche problematiche legate alla biodegradazione dei materiali lignei sommersi nella Laguna di Venezia, e del relativo aumento dei costi per quanto riguarda le attività di manutenzione e gestione, ha portato da alcuni anni il Provveditorato Interregionale alle Opere Pubbliche per il Veneto, Trentino Alto Adige e Friuli Venezia Giulia (Ex Magistrato alle Acque di Venezia), la Soprintendenza per i Beni Architettonici e per il Paesaggio di Venezia e il Comune di Venezia ad avviare una commissione tecnico-scientifica per affrontare in maniera unitaria la problematica del degrado dei pali in legno in laguna. In data 20 Giugno 2005 si è costituita presso il Magistrato delle Acque la "Commissione Tecnica per l'Utilizzo di Materiali Alternativi in Laguna di Venezia"; con la formazione della suddetta commissione è stato possibile sviluppare un percorso di ricerca che ha coinvolto come Enti di Ricerca L'Università Cà Foscari (DAIS) e il CNR-ISMAR per apprendere le conoscenze necessarie allo sviluppo del processo decisionale.

A seguito della sperimentazione, in data 13 Luglio 2011, il protocollo di Intesa "Modalità di utilizzo di legno o materiali alternativi per pali o strutture marittime in Laguna di Venezia" è stato siglato dai seguenti Enti Magistrato alle Acque di Venezia, Soprintendenza per i Beni Architettonici e per il Paesaggio di Venezia e Comune di Venezia. Tale protocollo sancisce i materiali approvati, tra quelli sperimentati, per l'utilizzo in laguna e riporta in sintesi i relativi risultati.

In base al sopra citato protocollo è stato previsto che per la valutazione di ulteriori materiali alternativi, non considerati nella precedente sperimentazione, sia predisposto, a cura del Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica dell'Università Ca' Foscari di Venezia, un Manuale Operativo (MAV, 2013) ove venissero riportate le linee guida per le valutazioni chimiche ed ecotossicologiche che dovranno essere eseguite.

Il suddetto Manuale Operativo basa la classificazione dei materiali contemplati nel Protocollo di Intesa (2011), classificandoli quindi in base alla loro origine (naturali, compositi e sintetici) e all'utilizzo di trattamenti protettivi.

Le linee guida riportate nel manuale si suddividono in tre fasi così riassumibili: 1) la prima fase prevede una valutazione preliminare dei materiali in base alle sostanze chimiche presenti nel prodotto o nei trattamenti su di esso effettuati (e.g.

verniciatura, coloranti, pesticidi,...); 2) il materiale, superata con successo la prima fase, viene sottoposto a una valutazione integrata di tipo ecotossicologico per verificarne la compatibilità ambientale; 3) valutazione delle finalità d'uso a cui dovrà seguire la verifica della durabilità del materiale (ad esempio con prove di invecchiamento e di resistenza alla degradazione biologica).

La valutazione finale dell'ammissibilità in Laguna di Venezia sarà effettuata dal Provveditorato Interregionale alle Opere Pubbliche per il Veneto, Trentino Alto Adige e Friuli Venezia Giulia (Ex Magistrato alle Acque di Venezia), dalla Soprintendenza per i Beni Architettonici e per il Paesaggio di Venezia e il Comune di Venezia che considera i risultati ottenuti per il materiale in tutte le fasi della valutazione, e saranno anche individuati gli usi specifici in relazione all'aspetto paesaggistico.

1. Razionale e obiettivi della tesi

La tesi ha come obiettivo principale lo studio della compatibilità ambientale di alcuni materiali alternativi per la realizzazione di palificazioni in acque marine e di transizione. Recentemente, sono state infatti proposte altre tipologie di materiali da utilizzare per le palificazioni degli ambienti marino-costieri a causa di una aumentata degradazione dei legni tradizionali a causa degli xilofagi marini come ampiamente documentato per la Laguna di Venezia (Tagliapietra D., *et al.*, 2011) (Tagliapietra D., *et al.*, 2012). I materiali utilizzati e/o proposti potrebbero rilasciare, però, a contatto con l'acqua, sostanze tossiche per gli organismi acquatici. Queste sostanze possono manifestare effetti tossici immediati o effetti a lungo termine, se persistenti e/o bioaccumulabili nei tessuti degli organismi. In questa tesi di laurea, l'attenzione sarà focalizzata sul ruolo dell'ecotossicologia a supporto delle attività di caratterizzazione dei materiali oggetto dell'indagine sulla base dell'expertise maturata dal gruppo di ricerca in Ecotossicologia dell'Università Ca' Foscari Venezia nel settore.

Le ricerche condotte e la stesura, prima del Protocollo d'Intesa e, successivamente, del Manuale Operativo hanno posto le basi per questo lavoro di tesi. L'acquisizione delle competenze a livello teorico è stato il primo passo, con una seguente fase di applicazione delle metodologie acquisite per l'esecuzione dei test di tossicità. I risultati, una volta elaborati, sono stati utilizzati al fine di avere una valutazione della tossicità dei vari materiali proposti al fine della loro compatibilità ambientale. In questa tesi sarà solo espressa una valutazione prettamente legata alle implicazioni ecotossicologiche.

La valutazione della tossicità è di grande importanza; determinare infatti se un materiale a contatto con una matrice acquosa rilasci delle sostanze potenzialmente tossiche è la base per evitare inquinamenti dell'ambiente.

Un prodotto contenente sostanze tossiche potrebbe avere ripercussioni in primo luogo sulla salute umana (e.g. uptake e trasferimento lungo la catena trofica) e sull'ambiente.

2. Introduzione

2.1 L'utilizzo del legno per palificazioni

La protezione delle palificazioni lignee e di qualunque altro si voglia genere di struttura lignea, soprattutto in acqua marina, è sempre stata oggetto di grande interesse, cercando il metodo migliore per prevenire l'attacco da parte di organismi xilofagi, come ad esempio le teredini.

L'attacco del materiale ligneo da parte di organismi xilofagi, teredini e crostacei marini è il processo primario che porta alla degradazione del materiale stesso.

Il legno in ambiente marino, oltre che un'immissione antropica quale quella dovuta all'utilizzo da parte dell'uomo per palificazioni, può avere origini naturali attraverso l'arrivo in ambiente marino di detriti di legno grezzo (*coarse wood debris*, CWD) trasportati dai fiumi. I detriti stessi possono formarsi dalle palificazioni che si degradano (Charles et al, 2015).

I CWD incrementano la complessità strutturale dell'habitat oltre che a contribuire alla dispersione degli organismi sessili. Provvedono inoltre a fungere da punto di nucleazione per la deposizione di minerali in condizioni anaerobiche e costituiscono una fonte di energia (Charles et al., 2015).

Il decadimento dei CWD in ambiente marino è un processo complesso e non dipende solo da fattori ambientali quali concentrazione dell'ossigeno, temperatura dell'acqua e salinità, ma anche a dalle proprietà del legno stesso (Fojutowski et al., 2004; Björdal e Nilsson, 2008). Inoltre, è essenziale ai fini della degradazione l'attacco da parte di organismi decompositori del legno (Biehhold et al., 2013).

Per dare una valutazione della degradazione di un materiale ligneo in ambiente marino è quindi necessaria una valutazione del grado di attacco da parte degli organismi xilofagi.

Un materiale ligneo o un CWD immerso in ambiente marino riceve l'attacco da parte di organismi xilofagi poco meno di due mesi dopo la sua immersione. La colonizzazione del legno è stata descritta avvenire con una ratio di 7/8 individui al giorno (Charles et al., 2015).

Le dinamiche di degradazione presentano una prima fase di latenza seguita da una fase di forte calo della massa del materiale che termina con una terza fase durante la quale la perdita di materiale è fortemente rallentata (Charles et al, 2015).

Questa terza fase di rallentamento nella perdita di massa suggerisce che la degradazione non dipende più solamente dagli organismi xilofagi ma dai processi biologici e fisici (Björddal e Nilsson, 2008; Nishimoto et al., 2015).

In generale la perdita di massa lignea in ambiente marino è un effetto cumulativo della biodegradazione con i fattori ambientali quali contenuto di ossigeno, temperatura e salinità dell'acqua marina (Biehhhold et al., 2013; Fors et al., 2014) (Björddal e Nilsson, 2008; Fjutowski et al., 2014; Nishimoto et al., 2015).

Considerando una colonizzazione di 7/8 individui di xilofagi al giorno e con una perdita giornaliera del 0,38% della massa totale in poco più di 400 giorni avremmo un dimezzamento della massa lignea iniziale (François Charles, 2015).

Un dimezzamento della massa porta, nel caso di materiali lignei per palificazioni, a non essere più utili per la finalità d'uso; questo aspetto ha portato allo sviluppo di tecniche per la protezione dell'integrità del materiale stesso con trattamenti chimici o strutturali.

Riguardo all'aspetto della vita media di un palo trattato, la causa è da ricercarsi in una serie di fattori come quelli valutati per altre tipologie di materiali nello studio quali (MAV-CVN, 2011).

- Nella cura posta al momento dell'applicazione del trattamento;
- La scrupolosità usata durante il trasporto, la gestione e la messa in opera del materiale;
- L'impeto dall'attacco da parte di organismi xilofagi (i.e. per i materiali prettamente lignei).

Riguardo l'ultimo punto elencato è stato osservato come l'intensità dell'attacco possa essere influenzato da alcuni parametri ambientali quali temperatura dell'acqua, livello di salinità e di ossigeno disciolto, l'altezza della colonna d'acqua e la presenza-assenza di correnti marine (FPL, 1999).

L'utilizzo di armature metalliche, protezioni cementizie o in materiale plastico ha portato a diversi gradi di successo nella prevenzione dell'integrità delle palificazioni lignee marine (FLP, 1999; MAV-CVN, 2011).

L'impiego di armature metalliche ha riscontrato solo una parziale efficacia, evidenziando una difficoltà a mantenere una protezione del materiale ligneo nel tempo; difatti le condizioni meteo-marine, i driftwood (intesi come pezzi di materiale legnoso che vengono portati alla deriva dall'azione del vento, maree o

onde per poi essere depositati sulle spiagge) e la corrosione portano ben presto ad una mancata integrità della struttura protettiva che porta nel tempo all'ingresso degli organismi xilofagi. (FPL,1999).

L'utilizzo di protezioni cementizie, ad oggi, ha denotato una maggiore efficacia nella prevenzione dell'integrità delle palificazioni. Esse sono, tuttavia, più facilmente danneggiabili nel momento dell'approdo d'imbarcazioni; risultando quindi più adatte per la realizzazione di sottofondazioni (FPL,1999).

L'applicazione, in tempi recenti, di una guaina polivinilica sui pali ha denotato un'aumentata mortalità degli xilofagi già presenti nel palo a causa di una diminuzione dell'ossigeno disponibile; allo stesso tempo prevenendo l'ingresso di altri organismi (FPL, 1999).

3. Procedura valutativa

La stesura del Protocollo d'intesa (2011), a seguito dell'analisi e valutazione:

- della vigente normativa in campo ambientale;
- dei risultati ottenuti dalla sperimentazione condotta;
- della letteratura scientifica;
- del *modus operandi* riferito all'OECD (2009);

ha portato alla messa a punto di un procedimento operativo per valutare l'ammissibilità all'utilizzo di un specifico materiale per la realizzazione di palificazioni in Laguna di Venezia.

3.1 Approccio metodologico generale

L'approccio metodologico usato per valutare l'ammissibilità di un materiale è schematizzato nella figura 1 sottostante, che rappresenta tutti i passaggi che un materiale deve superare per essere definito idoneo all'uso per la finalità definita (MAV, 2013).

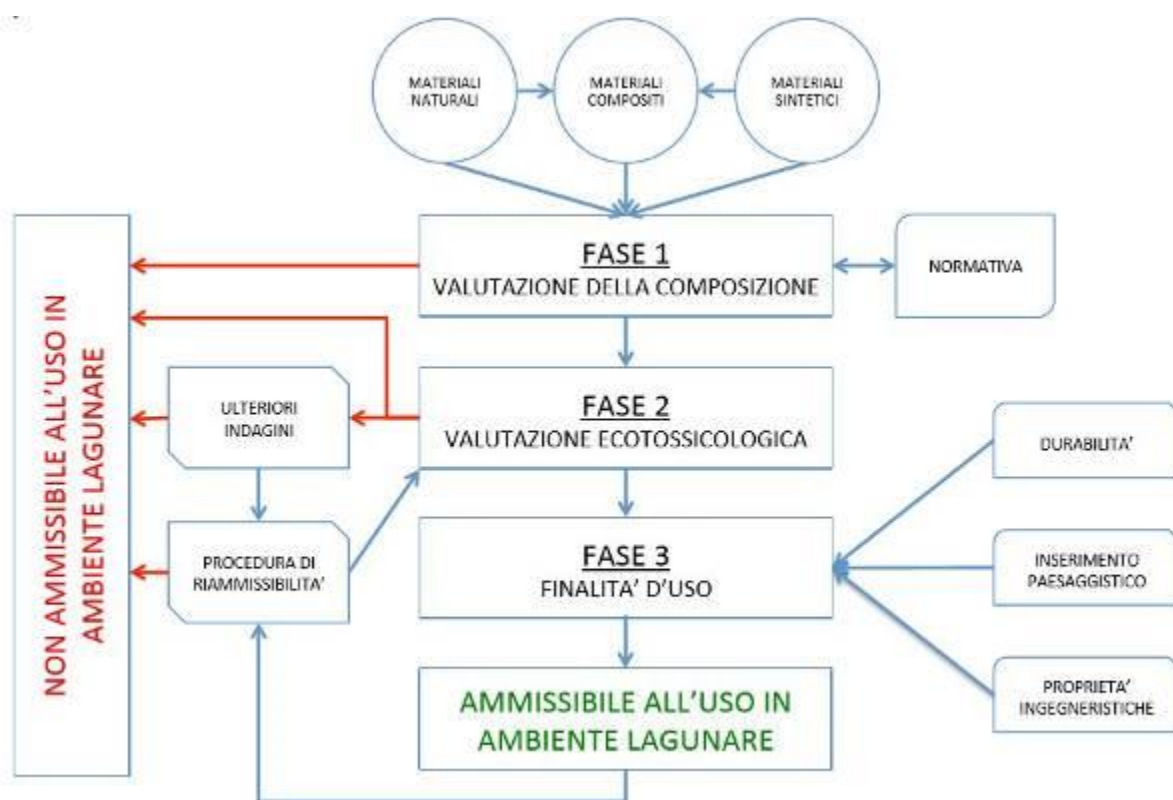


Figura 1 Procedura valutativa generale per l'ammissibilità di un materiale per la realizzazione di palificazioni (MAV, 2013).

Il processo valutativo viene è suddiviso in tre fasi, ognuna delle quali è propedeutica per la successiva.

La prima fase, FASE 1, della procedura di ammissibilità di un materiale per uso specifico prevede la valutazione della composizione (Figura 2).

In questa fase preliminare s'identifica la composizione del materiale come naturale, composito o sintetico. A seconda della loro composizione i materiali subiscono un processo valutativo diretto per la valutazione della composizione, questo è il caso dei materiali compositi e materiali sintetici, o indiretto per i materiali naturali specificando eventuali protezioni (vengono considerate protezioni tutti i trattamenti chimico e fisico-meccanici operati sulla matrice legnosa). I materiali di matrice legnosa devono subire un processo di descrizione dettagliata del materiale di cui sono composti, di eventuali trattamenti che potrebbero aver subito durante il taglio, delle modalità di trasporto fino allo stoccaggio e stagionatura prima dell'uso per le finalità proposte. Tutte queste informazioni sono obbligatoriamente fornite dal produttore in base al Regolamento (UE) n. 995/2010 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 20/10/2010.

La descrizione della composizione prevede le seguenti informazioni:

- Elenco dei componenti chimici e loro percentuale in peso;
- Numero di registrazione attribuiti ai sensi del Regolamento "REACH";
- Assenza o presenza in tracce di sostanze di cui tabella 1/A dell'Allegato 1 del Decreto 14 Aprile 2009 n 56, sostituito in seguito dal Decreto 8/11/2010 n. 260;
- Classificazione di pericolosità come riportato nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento Europeo del Consiglio del 16 Dicembre 2008;

Oltre che alle informazioni non prettamente correlate alla composizione quali:

- Nome e forma con i quali il materiale sarà commercializzato;
- Identificazione del produttore responsabile dell'immissione sul mercato;
- Modalità di manipolazione per la sicurezza dell'operatore;
- Modalità di impiego, recupero ed eventuale riutilizzo;

- Condizioni meteo ideali per l'impiego (in questo caso specifico riferimento alle condizioni meteo-marine);
- Possibili restrizioni all'uso.

Tutte queste informazioni servono per compilare la scheda tecnica del materiale che dovrà essere in accompagnamento allo stesso.

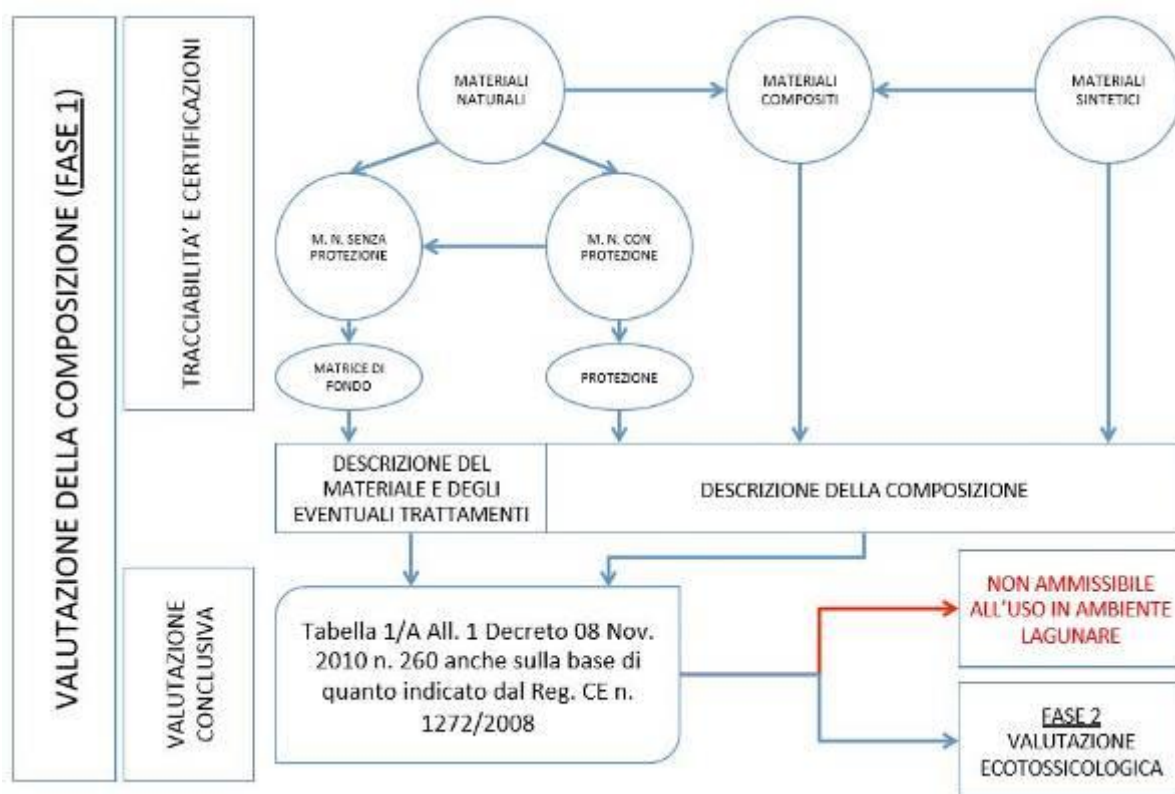


Figura 2 Specificazione delle modalità di valutazione della composizione - FASE 1 (MAV, 2013).

Alla fine della fase di valutazione della composizione sono previsti due possibili giudizi:

- Ammissibilità all'uso in ambiente negata. I limiti riscontrati superano i valori della Tabella 1/A del Decreto 8/10/2010 n. 260;
- Valutazione ecotossicologica, nel caso non si presenti il caso del punto precedente.

Al superamento della fase di valutazione della composizione prende avvio la fase di valutazione ecotossicologica (figura 3). La suddetta fase ha la finalità di accertare la presenza o assenza di eventuali effetti di tossicità legati ai materiali proposti per definirne l'idoneità d'uso per l'ambiente acquatico.

Il processo valutativo si svolge con una prima fase di lisciviazione (cap. 5.1), nella quale si ottiene una matrice test da adottare nei successivi test di ecotossicità. Il lisciviato prodotto viene sottoposto alla fase sperimentale con una batteria di test di tossicità comprendenti almeno tre livelli trofici, con almeno un endpoint cronico e un test di embriotossicità (Vedi cap. 3.2).

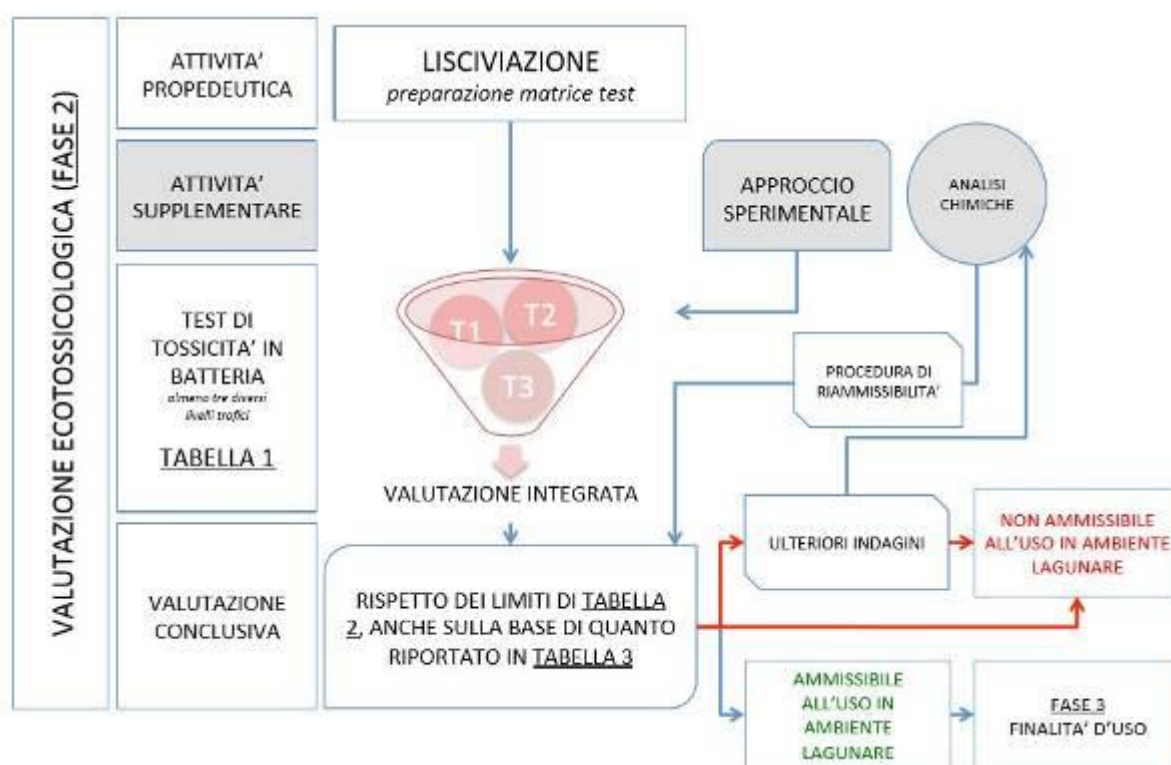


Figura 3 Specificazione delle modalità di valutazione degli aspetti ecotossicologici a valle dell'analisi della composizione del materiale per la realizzazione di palificazioni - FASE 2 (MAV, 2013).

Le possibilità di giudizio terminata la fase sperimentale e quindi per porre fine al processo di valutazione ecotossicologica sono:

- Non ammissibilità all'uso in ambiente lagunare, nel caso in cui i risultati dei test superino i valori riportati nella tabella 1;

Tabella 1 Limiti delle analisi ecotossicologiche sulla base dell'endpoint scelto come da indicazioni del D.Lgs 260/2010. TU= Toxic Unit.

Endpoint	EC50	EC20	Effetto massimo
Acuto o sub-acuto	>> 100%	≥ 90%	≤ 15% o 0,30 TU
Cronico o sub-cronico	>100%	≥ 90%	≤ 30% o 0,60 TU

- Necessità di ulteriori indagini, nel caso in cui i valori superino quelli riportati in tabella 1 ma si abbia comunque la volontà di preservare l'iter di ammissibilità ambientale. Il produttore del materiale ha la facoltà di indagare la caratterizzazione del materiale dal punto di vista chimico per individuare quali sostanze diano questi effetti di tossicità. Difatti, ai sensi del D.Lgs 152/2006 e s.m.i “ *il risultato positivo della prova di tossicità non determina l'applicazione diretta della sanzioni di cui titolo V, determina altresì l'obbligo di approfondimento delle indagini analitiche, la ricerca delle cause di tossicità e la loro rimozione*”.
- Ammissibilità all'uso in ambiente lagunare, con l'obbligo del superamento della fase 3 (finalità d'uso).

In seguito ad un giudizio positivo nella fase 2 si procederà alla parte finale della valutazione, la fase 3. La verifica delle finalità d'uso all'ammissibilità di un nuovo materiale alternativo sarà effettuata dal Magistrato delle Acque di Venezia, dalla Soprintendenza per i Beni Architettonici e per il Paesaggio di Venezia e Laguna e dal Comune di Venezia. I parametri di cui si terrà conto nella valutazione sono i risultati delle fasi 1 e 2, la durabilità e le proprietà ingegneristiche; inoltre saranno individuati gli usi specifici per il materiale posto in esame in relazione all'inserimento nel paesaggio.

Gli usi specifici ammessi secondo il Protocollo d'Intesa sono:

- Pali da ormeggio singoli;
- Pali da ormeggio per imbarcaderi;
- Dame, bricole e pali da illuminazione di aree urbane o industriali;
- Pontili – piani calpestio;
- Pontili - -sottofondazioni;
- Pali palazzo;
- Cabine mareografiche e di polizia locale;

- Parati frangiflutti;
- Segnalamenti di sottoservizi;
- Segnalamenti per traffico acqueo;
- Strutture di protezione barene o di dissipazione del moto ondoso.

3.2 Linee guida generali per test di tossicità

Secondo quanto riportato dal Protocollo d'Intesa e a quanto è descritto nel Manuale Operativo, la batteria di test di tossicità dovrà contenere almeno un test con organismi vegetali (produttori primari), un test con bivalvi/echinodermi (filtratori/grazer) e un test con crostacei (consumatori). Con questo tipo di schema è possibile determinare il potenziale pericolo immediato per gli organismi acquatici, grazie ai test acuti; per gli effetti a medio termine sono più rappresentativi i test che contemplano l'esposizione delle fasi sensibili del ciclo vitale, ovvero i test sub-cronici; infine, i test cronici sono in grado di stabilire gli effetti previsti a lungo termine.

Questa procedura è specificata nel D.Lgs 260/2010, dove il legislatore ricorda che *“i saggi biologici devono essere eseguiti utilizzando protocolli metodologici normati o in corso di standardizzazione secondo le indicazioni UNI e con specie di organismi appartenenti ad almeno tre differenti livelli trofici (da scegliere tra decompositori/saprotiti, detritivori/filtratori, produttori primari e consumatori)”*.

I test ecotossicologici devono essere eseguiti in triplicato per ogni concentrazione, compreso il lisciviato tal quale. I parametri da tenere in considerazione per la valutazione dei test di tossicità sono i valori di EC20 (Effective Concentration 20%) ed EC50 (Effective Concentration 50%), determinabili dalla elaborazione dei dati diluizione-risposta dei rispettivi protocolli metodologici.

3.3 Linee guida generali per la produzione di lisciviato

Nei materiali, a contatto con una matrice acquosa, può verificarsi un fenomeno noto come lisciviazione; in questo processo sostanze solubili possono dissociarsi dal materiale ed entrare nella matrice acquosa. Le caratteristiche della matrice del lisciviato dipendono dal materiale di partenza e dalle specifiche condizioni (fisico-chimiche e biologiche) cui esso è sottoposto.

Si necessita di una procedura di laboratorio standardizzata per ottenere campioni di lisciviato considerando una matrice acquosa tale da essere rappresentativa dei vari ambienti. Si deve quindi tener conto di:

- Intervalli di tempo crescenti dopo l'esposizione;
- La relazione esistente tra la superficie del provino di materiale da cui è prodotto il lisciviato e la durata dell'esposizione al liscivante;
- La necessità di esprimere il flusso di sostanza come $\text{mg m}^{-2} \text{day}^{-1}$.

I materiali, sia di natura lignea o sintetica, utilizzati nel processo di lisciviazione devono rappresentare il corrispettivo prodotto che verrà commercializzato. Se sono previsti trattamenti posti in essere sul materiale (e.g. verniciatura, graffettatura, ...), questi dovranno essere opportunamente e estensivamente dichiarati e applicati prima dell'inizio del processo stesso.

Nelle valutazioni ecotossicologiche il mezzo liscivante deve essere in linea con i protocolli identificati. Nel caso, ad esempio di un test con i mitili, la matrice di liscivante dovrà essere acqua marina ricostruita o acqua marina filtrata prelevata da un sito non impattato.

Nella procedura di lisciviazione si dovrà produrre anche un controllo negativo, dove si procede alla valutazione della stessa soluzione liscivante per cercare eventuali rumori di fondo. Allo stesso modo, dovrebbe essere operato un controllo (controllo o bianco procedurale) sulle componenti utilizzate nella lisciviazione (e.g. supporti, fascette) al fine di escludere ulteriori rumori di fondo.

Secondo OECD (2009) la condizioni standard ambientali da adottare sono:

- Temperatura dell'acqua di $20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$;
- Umidità relativa dell'aria del $65\% \pm 5\%$;
- PH dell'acqua nel range di 5-7.

Tutta la procedura di lisciviazione dovrà essere condotta al buio per evitare fenomeni di fotolisi (i.e. ad esempio per evitare l'esposizione ai raggi UV poiché come la letteratura scientifica ha ampiamente dimostrato sono in grado di influenzare la quantità di sostanze chimiche potenzialmente rilasciate dai provini).

Le due principali matrici di provini test sono:

- Provini test in legno; il legno medesimo può essere l'obiettivo della valutazione ed essere la matrice impiegata per la produzione di lisciviati o il legno può

essere il supporto per uno specifico trattamento preservante fisico (e.g. guaina, chiodatura, etc) o chimico (e.g. biocidi, resina, verniciatura, etc)

- Provini test in materiali sintetici; divisi in compositi (in parte legno e resine o collanti vari con o senza anima metallica o in altro materiale) o artificiali (plastici).

I provini dovrebbero essere prodotti in un set di 5 esemplari, con dimensioni che faranno riferimento al protocollo utilizzato. In qualunque caso è di assoluta importanza il mantenimento di un rapporto costante tra la superficie dei provini e il volume della soluzione liscivante.

È necessario riportare di volta in volta le dimensioni dei provini test.

OECD (2007) ribadisce l'importanza di considerare un predeterminato rapporto tra l'area superficiale del campione da lisciviare e il volume della soluzione liscivante pari a $0,6 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$. In altre parole il rapporto corrisponde all'immersione di un provino test di $0.1 \times 0.1 \times 0.1 \text{ m}$ in 1 L di liscivante. È stato dimostrato che la variazione di questo rapporto provoca una considerevole variazione nella quantità di rilascio di una potenziale sostanza presente nel campione (Schoknecht *et al.* 2001).

4. Quadro delle normative: possibili riferimenti

4.1 Normative nazionali

Di seguito sono riportate in maniera riassuntiva le normative nazionali nelle quali sono specificati i riferimenti a valutazioni ecotossicologiche e fisico-chimiche utilizzate nella stesura delle linee guida del protocollo d'intesa.

3.1.1 Decreto Ministeriale 30 Luglio 1999

Limiti agli scarichi industriali e civili che recapitano nella Laguna di Venezia e nei corpi idrici del suo bacino scolante, ai sensi del punto 5 del decreto interministeriale 23 Aprile 1998 recante requisiti di qualità delle acque e caratteristiche degli impianti di depurazione per la tutela della Laguna di Venezia (Gazzetta Ufficiale n. 194 del 19/08/1999).

Il decreto riporta diverse informazioni tra le quali troviamo:

- I valori limite di accettabilità degli scarichi industriali e civili nella Laguna di Venezia;
- I metodi di analisi per il controllo di suddetti limiti;
- I criteri generali per il controllo degli obiettivi di qualità e dei carichi massimi ammissibili.

Per dare un riferimento numerico viene riportata qui di seguito la tabella 2 recante i parametri dei limiti di scarico nella Laguna di Venezia, divisa in 4 sezioni.

Tabella 2 Limiti allo scarico nella Laguna di Venezia e nei corpi idrici del suo bacino scolante (D.M. 30 Luglio 1999).

Sezione 1-Obiettivi di qualità e carichi massimi ammissibili fissati

Parametri	Unità di misura	limite
alluminio	µg/L	500
antimonio	µg/L	50
argento	µg/L	5
berilio	µg/L	5
cobalto	µg/L	30
cromo totale	µg/L	100
ferro	µg/L	500
manganese	µg/L	500
nichel	µg/L	100
rame	µg/L	50
selenio	µg/L	10
vanadio	µg/L	50
zinco	µg/L	250
tensioattivi anionici	µg/L	500
tensioattivi non ionici	µg/L	500
fenoli totali	µg/L	50
diclorofenoli	µg/L	50
pentaclorofenolo	µg/L	50
Σ solventi organici alogenati	µg/L	400
pentaclorobenzene	µg/L	20
Σ solventi organici aromatici	µg/L	100
benzene	µg/L	100
toluene	µg/L	100
xilene	µg/L	100
Σ pesticidi organofosforici	µg/L	10
Σ erbicidi ed assimilabili	µg/L	10
BOD	mg/L	25
azoto totale	mg/L	10
fosforo totale	mg/L	1
cloro residuo	mg/L	0.02

Sezione 2-Obiettivi di qualità e carichi massimi ammissibili non fissati

Parametri	Unità di misura	limite
pH		6,0 - 9,0
colore		non percettibile su spessore di 10 cm dopo diluizione 1:10
odore		non deve essere causa di molestia
materiali grossolani		assenti
solidi sedimentabili	mL/L	eliminato
solidi sospesi totali	mg/L	35
COD	mg/L O ₂	120
azoto ammoniacale	mg/L N	2
azoto nitroso	mg/L N	0.3
azoto nitrico		eliminato
fosfati	mg/L P	0.5
fluoruri	mg/L	6
cloruri	mg/L	300 (per bacino scolante)
zolfuri	mg/L S	0.5
solfiti	mg/L SO ₂	1
solfati	mg/L SO ₃	500 (per bacino scolante)
bario	mg/L	10
boro	mg/L	2
cromo trivalente		eliminato
cromo esavalente	mg/L Cr	0.1
somma elementi tossici		eliminato
grassi e oli animali e vegetali	mg/L	10
idrocarburi totali	mg/L	2
aldeidi	mg/L	1
mercaptani	mg/L S	0.05
composti organici azotati	mg/L	0.1
composti organici clorurati	mg/L	0.05
saggio di tossicità		si
Escherichia coli	UFC/100 mL	5,000
clorito	mg/L ClO ₂	*
bromato	mg/L BrO ₂	*

*= da fissarsi da parte dell'Amministrazione che autorizza allo scarico

Sezione 3-Limiti conseguibili con l'adozione delle migliori tecnologie di processo e depurazione per gli impianti industriali

Parametri	Unità di misura	limite
IPA	µg/L	10
diossine	pg/L	50
cianuri	µg/L	5
arsenico	µg/L	10
piombo	µg/L	50
cadmio	µg/L	5
mercurio	µg/L	3
poli-clorobifenili		assenti
pesticidi organoclorurati		assenti
tributilstagno		assente

Sezione 4-Limiti conseguibili con l'adozione di misure tecniche supplementari di depurazione dei reflui liquidi industriali quali misure previste dall'art. 10 della Direttiva 96/61/CE

Parametri	Unità di misura	limite
IPA	µg/L	1
diossine	pg/L	0.5
cianuri	µg/L	5
arsenico	µg/L	1
piombo	µg/L	10
cadmio	µg/L	1
mercurio	µg/L	0.5
poli-clorobifenili		assenti
pesticidi organoclorurati		assenti
tributilstagno		assente

3.1.2 Decreto Legislativo 3 Aprile 2006 n. 152 e s.m.i.

Norma in materia ambientale (Gazzetta ufficiale n. 88 del 14/04/2006)

Il decreto, conosciuto anche come Testo Unico dell'Ambiente, è composto di sei parti ognuno delle quali si occupa di un determinato comparto ambientale. Le norme riguardanti la tutela delle acque sono contenute nella parte terza, dove il decreto richiede obbligatoriamente la valutazione degli aspetti biologici, idromorfologici e chimico-fisici per la definizione dello stato qualitativo del corpo idrico.

Gli unici accenni per quanto riguarda i saggi tossicità sono presenti nell'Allegato 5; per quanto riguarda i limiti di emissione degli scarichi idrici, sono elencati i parametri da monitorare; tra questi troviamo alla voce n. 51 "saggio di tossicità acuta" (Tabella 3). Stessa dicitura troviamo, sempre nell'Allegato 5, al parametro n. 35 dei limiti di emissione per le acque reflue urbane ed industriali nel suolo (Tabella 4).

Tabella 3 D.Lgs 152/2006, Allegato 5, parte terza - descrizione del parametro "saggio di tossicità" nella tabella 3 del Decreto.

Parametro n.		Unità di misura	Scarico in acque superficiali	Scarico in rete fognaria
51	Saggio di tossicità acuta		Il campione non è accettabile quando dopo 24h il numero degli organismi è uguale o maggiore del 50% del totale	Il campione non è accettabile quando dopo 24h il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 80% del totale

Tabella 4 D.Lgs 152/2006, Allegato 5, parte terza - descrizione del parametro "saggio di tossicità" nella tabella 4 del Decreto.

Parametro n.		Unità di misura	(il valore della concentrazione deve essere minore o uguale di quello indicativo)
35	Saggio di tossicità su <i>Daphnia magna</i>	LC50 a 24 h	Il campione non è accettabile quando dopo 24h il numero di organismi immobili è uguale o maggiore del 50% del totale

3.1.3 Decreto 7 Novembre 2008

A completamento della **“Disciplina delle operazioni di dragaggio nei siti di bonifica di interesse nazionale, -Articolo 1, comma 996, Legge 27 Dicembre 2006, n. 296” (Gazzetta Ufficiale n. 284 del 04/12/2008)**

Nei siti di bonifica di interesse nazionale l' idoneità del materiale dragato deve essere verificata sulla base di apposite analisi da effettuare precedentemente all'inizio del dragaggio secondo i principi e metodi sanciti nell' Allegato “A” del presente decreto. I procedimenti si applicano ai sedimenti marini da sottoporre a dragaggio.

Per caratterizzare il sedimento, oltre a tutta la serie di analisi chimico-fisiche richieste (punto 10), sono previste anche delle analisi ecotossicologiche *“ai fini di cui all'Art. 5, comma 11-ter sui sedimenti portuali da sottoporre a dragaggio all'interno dei siti di bonifica di interesse nazionale”*. Il sub-campione da utilizzare, nei saggi di tossicità *“deve essere raccolto in contenitori di polietilene o vetro decontaminato ed essere immediatamente posto a temperature comprese tra i +4 °C e +6 °C. Le analisi dovranno essere eseguite entro 10 gg dal prelievo salvo diversa indicazione del metodo di riferimento utilizzato”*. In aggiunta i saggi di tossicità *“devono essere applicati su un numero significativo di campioni, almeno pari al 30% del totale, ad almeno due matrici ambientali: fase solida del sedimento (sedimento tal quale e/o centrifugato) e fase liquida del sedimento (acqua interstiziale e/o elutriato) mediante l'impiego di una batteria di saggi biologici costituita da tre specie test appartenenti a gruppi tassonomici e filogenetici differenti”*.

Nel suddetto decreto la tabella A, presente al punto 10, elenca tutte le caratteristiche riguardanti i saggi di tossicità (gli organismi test, le matrici correlate, lo stadio vitale sensibile, la durata dell'esposizione e l'endpoint, seguiti dalle modalità in cui il dato deve essere espresso) (tabella 5).

Tabella 5 D.M. 07/11/2008, Allegato A. Descrizione come da normativa delle possibili analisi ecotossicologiche (saggi biologici di tossicità) da eseguire sui sedimenti portuali da sottoporre a dragaggio dei siti di bonifica di interesse nazionale.

Specie	Matrice	Stadio Vitale	Esposizione	Endpoint	Espressione dato
ALGHE					
<i>Skeletonema costatum</i>	Elutriato	Coltura cellulare	96 h	Inibizione della crescita	EC20 e EC50
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Elutriato	Coltura cellulare	96 h	Inibizione della crescita	EC20 e EC50
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Elutriato	Coltura cellulare	96 h	Inibizione della crescita	EC20 e EC50
<i>Minutocellus polymorphus</i>	Elutriato	Coltura cellulare	96 h	Inibizione della crescita	EC20 e EC50
BATTERI					
<i>Vibrio fischeri</i>	Elutriato	Cellule	30 minuti	Inibizione della bioluminescenza	EC20 e EC50
	Sedimento centrifugato	Cellule	30 minuti	Inibizione della bioluminescenza	Sediment Toxicity index
ROTIFERI					
<i>Brachionus plicatilis</i>	Elutriato	Individui	48 h	Schiusa delle cisti	EC20 e EC50
CROSTACEI					
<i>Ampelisca diadema</i>	Sedimento tal quale	Individui giovani-adulti	10 giorni	Mortalità	Mortalità (corretto con Abbott)
<i>Corophium orientale</i>	Sedimento tal quale	Individui giovani-adulti	10 giorni	Mortalità	Mortalità (corretto con Abbott)
<i>Corophium insidiosum</i>	Sedimento tal quale	Individui giovani-adulti	10 giorni	Mortalità	EC20 e EC50 (corretto con Abbott)
<i>Acartia tonsa</i>	Sedimento tal quale	Nauplii	96 h	Mortalità	EC20 e EC50
<i>Acartia clausi</i>	Elutriato	Nauplii	96 h	Mortalità	EC20 e EC50
<i>Tisbe battagliai</i>	Elutriato	Nauplii	96 h	Mortalità	EC20 e EC50
<i>Tigriopus fulvus</i>	Elutriato	Nauplii	96 h	Mortalità	EC20 e EC50
MOLLUSCHI					
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Elutriato	Gamete maschile	1 h	Fecondazione uova	EC20 e EC50
<i>Tapes philippinarum</i>					EC20 e EC50
<i>Crassostrea gigas</i>	Elutriato	Gamete maschile	1 h	Fecondazione uova	EC20 e EC50
ECHINODERMI					
<i>Sphaerechinus granularis</i>	Elutriato	Gamete maschile	1 h	Fecondazione uova	EC20 e EC50
<i>Paracentrotus lividus</i>	Elutriato	Gamete maschile	1 h	Fecondazione uova	EC20 e EC50

Regolamento recante i “Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 Aprile 2006, n.152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell’articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo” (Gazzetta ufficiale n. 30 del 07/02/2011)

Il presente decreto sostituisce e integra in parte il D.lgs 152/2006. L'allegato 1 della parte terza del decreto legislativo 3 Aprile 2006 n. 152 è sostituito con l'allegato 1 del presente decreto che descrive le modalità con le quali eseguire i monitoraggi dei corpi idrici, i parametri da considerare, gli indicatori da utilizzare e gli standard di qualità della colonna d'acqua per le sostanze. Elenca, in aggiunta, le tabelle per la classificazione delle acque sulla base dei parametri descrittivi.

Riguardo le prove ecotossicologiche dei sedimenti marino-costieri e di transizione, al punto A.2.6.1 si enuncia che *“Nel caso in cui gli esiti del monitoraggio evidenzino un superamento per una o più sostanze nel sedimento e la classificazione sia eseguita sulla base dei dati di monitoraggio effettuato nella colonna d'acqua, le Regioni hanno comunque l'obbligo di effettuare un monitoraggio dei sedimenti che includa per almeno i primi 2 anni batterie di saggi biologici costituite da almeno 3 specie-test, finalizzati ad evidenziare eventuali effetti ecotossicologici a breve e a lungo termine”*. Il legislatore specifica che *“i saggi biologici devono essere eseguiti utilizzando protocolli metodologici normati o in corso di standardizzazione secondo le indicazioni UNI e con specie di organismi appartenenti ad almeno tre differenti livelli trofici (da scegliere tra decompositori/saprofiti, detritivori/ filtratori, produttori primari, consumatori”* indicando anche quali sono le matrici e le loro priorità nell'esecuzione dei test, e precisamente *“sedimento tal quale, acqua interstiziale, elutriato”*.

Sono stati definiti inoltre i limiti di tossicità a cui fare riferimento nella Colonna A della tabella 2.4 del *“Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini”* ICRAM-APAT (2007) (tabella 6). Nel medesimo manuale è stata evidenziata l'importanza di eseguire la valutazione ecotossicologica del campione in batteria scegliendo tre specie-test appartenenti a gruppi tassonomici diversi (tabella 7).

Tabella 6 Requisiti ecotossicologici (tossicità acuta del sedimento) e relativi organismi test (ICRAM-APAT, 2007).

Specie-test	Colonna A	Colonna B	Colonna C	Colonna D
<i>Skeletonema costatum</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Vibrio fischeri</i> (elutriato)	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Vibrio fischeri</i> (sedimento)	S.T.I. ≤ 3	3 < S.T.I. ≤ 6	6 < S.T.I. ≤ 12	S.T.I. > 12
<i>Brachionus plicatilis</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Ampelisca diadema</i>	Δ mortalità ≤ 15%	15% < Δ mortalità ≤ 30%	30% < Δ mortalità ≤ 60%	Δ mortalità > 60%
<i>Corophium orientale</i>	Δ mortalità ≤ 15%	15% < Δ mortalità ≤ 30%	30% < Δ mortalità ≤ 60%	Δ mortalità > 60%
<i>Corophium insidiosum</i>	Δ mortalità ≤ 15%	15% < Δ mortalità ≤ 30%	30% < Δ mortalità ≤ 60%	Δ mortalità > 60%
<i>Acartia tonsa</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Acartia clausi</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Tisbe battagliai</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Tigriopus fulvus</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Paracentrotus lividus</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Sphaerechinus granularis</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Dicentrarchus labrax</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%
<i>Sparus aurata</i>	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90% e EC50 > 100%	40% ≤ EC50 < 100%	EC50 < 40%

Tabella 7 Modalità di preparazione dei saggi di tossicità (ICRAM-APAT, 2007).

Specie	Matrice	Stadio Vitale	Esposizione	Endpoint	Espressione dato
ALGHE					
<i>Skeletonema costatum</i>	Elutriato	Coltura cellulare	96 h	Inibizione della crescita	EC20 e EC50
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Elutriato	Coltura cellulare	96 h	Inibizione della crescita	EC20 e EC50
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Elutriato	Coltura cellulare	96 h	Inibizione della crescita	EC20 e EC50
BATTERI					
<i>Vibrio fischeri</i>	Elutriato	Cellule	30 minuti	Inibizione della bioluminescenza	EC20 e EC50
	Sedimento centrifugato	Cellule	30 minuti	Inibizione della bioluminescenza	Sediment Toxicity index
ROTIFERI					
<i>Brachionus plicatilis</i>	Elutriato	Individui	48 h	Schiusa delle cisti	EC20 e EC50
CROSTACEI					
<i>Ampelisca diadema</i>	Sedimento tal quale	Individui giovani-adulti	10 giorni	Mortalità	Mortalità (corretto con Abbott)
<i>Corophium orientale</i>	Sedimento tal quale	Individui giovani-adulti	10 giorni	Mortalità	Mortalità (corretto con Abbott)
<i>Corophium insidiosum</i>	Sedimento tal quale	Individui giovani-adulti	10 giorni	Mortalità	EC20 e EC50 (corretto con Abbott)
<i>Acartia tonsa</i>	Sedimento tal quale	Nauplii	96 h	Mortalità	EC20 e EC50
<i>Acartia clausi</i>	Elutriato	Nauplii	96 h	Mortalità	EC20 e EC50
<i>Tisbe battagliai</i>	Elutriato	Nauplii	96 h	Mortalità	EC20 e EC50
<i>Tigriopus fulvus</i>	Elutriato	Nauplii	96 h	Mortalità	EC20 e EC50
ECHINODERMI					
<i>Sphaerechinus granularis</i>	Elutriato	Gamete maschile	1 h	Fecondazione uova	EC20 e EC50
<i>Paracentrotus lividus</i>	Elutriato	Gamete maschile	1 h	Fecondazione uova	EC20 e EC50
PESCI					
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Elutriato	Giovanili	96 h	Mortalità	EC20 e EC50
<i>Sparus aurata</i>	Elutriato	Giovanili	96 h	Mortalità	EC20 e EC50

È rilevante notare come il decreto accerti l'obbligatorietà delle prove ecotossicologiche per le quali fornisce diverse indicazioni quali la matrice a cui far ricorso, il riferimento alla batteria di test o i limiti da considerare per i test acuti o cronici.

3.1.5 Deliberazione della Giunta Regionale (Regione Veneto) 23 Marzo 2010 n. 1019

Direttive tecniche per la caratterizzazione e valutazione di compatibilità delle sabbie destinate al ripascimento dei litorali nella Regione del Veneto (23 Marzo 2010) – Legge Finanziaria 31 Luglio 2002, n. 179

In attuazione delle competenze trasferite alle regioni, sono state assegnate le indicazioni di carattere procedurale per la valutazione circa l'idoneità delle sabbie per opere di ripascimento.

In data 30 Dicembre 2005 n. 4170 la Giunta Regionale sulle indicazioni del Gruppo di lavoro interdisciplinare regionale (Segreteria Ambiente e Territorio e ARPAV) ha redatto un testo aggiornato delle *“Direttive tecniche per la caratterizzazione e valutazione di compatibilità delle sabbie destinate al ripascimento dei litorali della regione del Veneto”* con la finalità di *“il razionale utilizzo della risorsa sabbia per il ripascimento dei litorali veneti”* e *“le direttive tecniche relative alla caratterizzazione e valutazione di compatibilità delle sabbie destinate allo scopo”*.

Al punto B, tra i vari documenti richiesti si enuncia *“piano di caratterizzazione dell'area di dragaggio”*; nel sopraccitato piano tra le diverse informazioni richieste sono citate anche *“le risultanze analitiche relative alla caratterizzazione fisica, chimica e biologica (microbiologica ed ecotossicologica) dei sedimenti”*.

Al punto 3A è menzionata una lista di specie utilizzabili per l'esecuzione dei saggi di tossicità acuta (tabella 8).

Tabella 8 D.G.R.V. n. 4170, Allegato 2 – specie utilizzabili nei test di tossicità acuta.

Alghe	<i>Dunaliella tertiolecta</i>
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Batteri	<i>Vibrio fischeri</i>
Rotiferi	<i>Brachionus plicatilis</i>
Crostacei	<i>Corophium orientale</i>
	<i>Corophium insidiosum</i>
	<i>Ampelisca diadema</i>
	<i>Tigriopus fulvus</i>
	<i>Acartia clausi</i>
	<i>Tisbe battagliai</i>
Echinodermi	<i>Paracentrotus lividus</i>
	<i>Sphaerechinus granularis</i>
Pesci	<i>Dicentrarchus labrax</i>

Per l'aspetto riguardante lo schema di esecuzione "i saggi biologici devono essere eseguiti su tutti i campioni, distribuiti in maniera rappresentativa in tutto il volume di materiale da caratterizzare. Devono essere scelte almeno tre specie-test appartenenti a gruppi tassonomici diversi, di cui almeno una da applicare alla fase solida del sedimento e almeno una da applicare alla fase liquida". Per quanto riguarda l'aspetto delle risposte ecotossicologiche, il testo dei rapporti di prova precisa "le risposte ecotossicologiche [devono risultare] come da tabella 5 e comunque non superiori a tabella 6" vedi tabella 9 e 10 rispettivamente.

Tabella 9 D.G.R.V. n. 4170, Allegato 2, tabella 5 – livelli delle risposte ecotossicologiche.

Specie test	Risultato
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	EC20 ≥ 100%
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EC20 ≥ 100%
<i>Vibrio fischeri</i> (elutriato)	EC20 ≥ 90%
<i>Vibrio fischeri</i> (sedimento)	S.T.I. ≤ 3
<i>Brachionus plicatilis</i>	EC20 ≥ 100%
<i>Ampelisca diadema</i>	Δ mortalità ≤ 20%
<i>Corophium orientale</i>	Δ mortalità ≤ 20%
<i>Corophium insidiosum</i>	Δ mortalità ≤ 20%
<i>Acartia tonsa</i>	EC20 ≥ 100%
<i>Acartia clausi</i>	EC20 ≥ 100%
<i>Tisbe battagliai</i>	EC20 ≥ 100%
<i>Paracentrotus lividus</i>	EC20 ≥ 100%
<i>Sphaerechinus granularis</i>	EC20 ≥ 100%

Tabella 10 D.G.R.V. n. 4170, Allegato 2, tabella 6 – limiti da non superare.

Specie test	Risultato
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	10% ≤ EC50 < 100%
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	10% ≤ EC50 < 100%
<i>Vibrio fischeri</i> (elutriato)	10% ≤ EC50 < 90%
<i>Vibrio fischeri</i> (sedimento)	6 < S.T.I. ≤ 12
<i>Brachionus plicatilis</i>	10% ≤ EC50 < 100%
<i>Ampelisca diadema</i>	40% < Δ mortalità ≤ 80%
<i>Corophium orientale</i>	40% < Δ mortalità ≤ 80%
<i>Corophium insidiosum</i>	40% < Δ mortalità ≤ 80%
<i>Acartia tonsa</i>	10% ≤ EC50 < 100%
<i>Acartia clausi</i>	10% ≤ EC50 < 100%
<i>Tisbe battagliai</i>	10% ≤ EC50 < 100%
<i>Paracentrotus lividus</i>	10% ≤ EC50 < 100%
<i>Sphaerechinus granularis</i>	10% ≤ EC50 < 100%
<i>Dicentriscus labrax</i>	10% ≤ EC50 < 100%

3.1.6 Decreto Legislativo 3 Dicembre 2010 n. 205 e s.m.i.

Disposizioni di attuazione della direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 19 Novembre 2008 relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive.

In base alla normativa in questione, l'ecotossicità di un rifiuto viene valutata tramite un metodo convenzionale, basato sulla determinazione analitica, o sperimentale, di una serie di saggi ecotossicologici predeterminati. La mancanza di uniformità nell'interpretazione a livello nazionale rischiava di avere un approccio più cautelativo alla etichettatura di un rifiuto come ecotossico anche in assenza di un vero e proprio rischio per l'ambiente.

La classificazione delle sostanze pericolose, in base alla normativa ADR, basa i metodi sulle linee guida dell'OCSE e indicati dalle seguenti proprietà ecotossicologiche:

- Tossicità acuta per l'ambiente acquatico (categoria "Acuta 1");
- Tossicità cronica per l'ambiente acquatico (distinta in categoria "Cronica 1" e "Cronica 2");
- Bioaccumulazione potenziale ed effettiva;
- Degradazione (biotica e non biotica) dei composti organici.

In base al D.Lgs 205/2010 le prove ecotossicologiche devono essere eseguite, sul campione di lisciviato preparato secondo la norma UNI EN 14735/2005, secondo quanto riportato nella Tabella D del “Parere ISPRA/ISS sulla classificazione – preparazione dei rifiuti fini dell’attribuzione della caratteristica di pericolo H14 – Ecotossico”; ricorrendo ai seguenti test di tossicità:

- Test di inibizione della bioluminescenza in fase liquida con *Vibrio fischeri* (UNI EN ISO 11348:2009);
- Test di inibizione della crescita algale con *Pseudokirchneriella subcapitata* (UNI EN ISO 8692:2005);
- Test di immobilizzazione con *Daphnia magna* (UNI EN ISO 6341:1999).

I test devono essere composti da due controlli negativi, in triplicato e con una distribuzione delle diluizioni preferendo il profilo 2,5 – 5 – 10 – 20 – 40%. I risultati ottenuti devono essere confrontati con i limiti presenti nella Tabella E del “Parere ISPRA/ISS sulla classificazione dei rifiuti ai fini dell’attribuzione della caratteristica di pericolo H14 – Ecotossico” (tabella 11).

Tabella 11 Valori limite di tossicità dell’eluato ai fini della classificazione del rifiuto come pericoloso per la caratteristica H14.

Test di ecotossicità	Valore limite
Saggio di tossicità con <i>Vibrio fischeri</i>	EC50 < 10%
Test con <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC20 < 20%
Test con <i>Daphnia magna</i>	EC50 < 10%

3.1.7 Decreto 25 Febbraio 2011 n. 56

“Definizioni delle procedure per il riconoscimento d’idoneità dei prodotti assorbenti e disperdenti in mare per la bonifica dalla contaminazione da idrocarburi”

In base a questo decreto le società produttrici che intendano commercializzare un prodotto (prodotto appartenente alle tipologie di cui art. 1) devono presentare istanza di riconoscimento di idoneità dello stesso al Ministero dell’ambiente e della tutela del territorio e del mare. Tali istanze devono essere accompagnate da documentazione di cui Allegato 1,2,3,4 o 5.

Ai fini della stesura del Protocollo d'intesa e quindi della redazione di un Manuale Operativo particolare rilevanza hanno i punti:

- **Allegato 2 “Indicazioni per l’elaborazione della scheda tecnica di prodotti assorbenti di origine sintetica o naturale non inerti”:**
 - a) Nome e forma con i quali il prodotto sarà commercializzato;
 - f) Classificazione di pericolosità ai sensi del Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento Europeo del Consiglio del 16 Dicembre 2008 relativo alla classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le Direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al Regolamento (CE) n. 1907/2006 (“Regolamento REACH”);
 - m) Modalità di manipolazione in sicurezza da parte dell’operatore;
 - n) Modalità di impiego, recupero ed eventuale utilizzo;
 - p) Indicazioni di possibili restrizioni nell’impiego.

- **Allegato 3 “Indicazioni per l’elaborazione della scheda tecnica di prodotti disperdenti di origine sintetica o naturale”:**
 - a) Nome con i quale il prodotto sarà commercializzato;
 - g) Classificazione di pericolosità ai sensi del Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento Europeo del Consiglio del 16 Dicembre 2008 relativo alla classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le Direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al Regolamento (CE) n. 1907/2006 (“Regolamento REACH”);
 - u) Modalità di impiego, recupero ed eventuale riutilizzo;
 - w) Indicazioni di possibili restrizioni all’impiego.

- **Allegato 4 “Metodologie analitiche e criteri di accettabilità delle risultanze dei test necessari per il riconoscimento di idoneità dei prodotti assorbenti di origine sintetica o naturale non inerti”:**

4) Il decreto stabilisce l'importanza della valutazione ecotossicologica. Il saggio di tossicità deve essere seguito sul lisciviato del prodotto utilizzando almeno una delle specie di crostacei nella tabella 12.

Tabella 12 Specie test previste dal Decreto 25 Febbraio 2011 per la valutazione di agenti assorbenti e disperdenti.

Specie	Metodo	Periodo di esposizione
<i>Acartia tonsa</i>	UNICHIM pr MU 2365 (2010)	48 h
<i>Artemia franciscana</i>	APAT-IRSACNR 8060 (2003)	96 h
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	UNICHIM pr MU 2245 (2010)	48 h
<i>Corophium orientale</i>	UNICHIM pr MU 2246 (2010)	96 h
<i>Tigriopus fulvus</i>	UNICHIM pr MU 2396 (2010)	96 h

- Allegato 5 **“Metodologie analitiche e criteri di accettabilità delle risultanze dei test necessari per il riconoscimento di idoneità dei prodotti disperdenti di origine sintetica o naturale”**:

c) Valutazione del potenziale di bioaccumulo da eseguirsi quanto indicato al punto 3 dell'Allegato 5;

d) Saggi di tossicità da eseguirsi secondo quanto indicato al punto 5 dell'Allegato 5.

In ultima analisi, dal Decreto 25 Febbraio 2011 è possibile inquadrare una serie di fattori fisico-chimici ed ecotossicologici utili per valutare i materiali proposti per la sostituzioni delle palificazioni lignee in laguna. Sotto l'aspetto dei fattori chimico-fisici si terrà conto di:

- Nome e forma con i quali il prodotto sarà commercializzato;
- Identificazione del produttore e del responsabile della sua immissione su mercato;
- Elenco dei componenti chimici e loro percentuale in peso;
- Numeri di registrazione attribuiti ai sensi dell' Art. 20, paragrafo 3 del Regolamento (CE) n. 1907/2006, alle sostanze chimiche presenti nel prodotto;
- Assenza o presenza in tracce delle sostanze di cui tabella 1/A dell'Allegato 1 del Decreto 8 Novembre 2010, n. 260;
- Classificazione di pericolosità ai sensi del Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento Europeo del Consiglio del 16 Dicembre 2008 relativo alla

classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le Direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al Regolamento (CE) n. 1907/2006 ("Regolamento REACH").

Sotto il profilo ecotossicologico sono da tenere in considerazione i seguenti approcci:

- Valutazione del potenziale di bioaccumulo;
- Saggi di tossicità da eseguirsi secondo quanto indicato al punto 5 dell' Allegato 5.

Precisamente i saggi di tossicità devono prevedere l'utilizzo di una batteria minima (alga, crostaceo e pesce) composta da vari livelli trofici (produttore, consumatore primario, consumatore secondario), eseguiti secondo protocolli standard internazionali.

4.2 Normative comunitarie

Sono state prese in considerazione le maggiori norme europee in fatto di studio della qualità delle acque e sulla compatibilità dei materiali che vi entrano a contatto sotto il profilo ambientale, così da completare l'analisi relativa al ruolo che l'ecotossicologia svolge nella normativa ambientale.

3.2.1 Direttiva 98/08/CE e s.m.i

Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 16 Febbraio 1998, relativa all'immissione sul mercato dei biocidi (Gazzetta Ufficiale Europea L. 123 del 24/04/1998).

La Direttiva 98/08/CE riguarda l'immissione nel mercato della vastissima categoria dei biocidi. Lo scopo primario è che prima di autorizzare un prodotto in uno dei paesi dell'Unione Europea è d'obbligo valutare l'efficacia del principio attivo sulle specie target e l'assenza di rischio per l'uomo.

L'autorizzazione viene rilasciata in seguito a una domanda di registrazione ove i dati risultino conformi alla direttiva, disposti nell'Allegati IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVA, IVB.

Le richieste delle informazioni ecotossicologiche sono riportate nella seguente tabella 13 suddivise per allegato II, III, IV e per sottosezioni A e B.

Tabella 13 Quadro riassuntivo delle informazioni ecotossicologiche richiesta in base alla sostanza.

	Allegati A – PRINCIPI ATTIVI	Allegati B - BIOCIDI
II – informazioni di base	<p>7.1. Tossicità acuta per i pesci;</p> <p>7.2. Tossicità acuta per la D. magna;</p> <p>7.3. Prova di inibizione della crescita nelle alghe;</p> <p>7.4. Inibizione dell'attività microbiologica;</p> <p>7.5. Bioconcentrazione, durata e comportamento nell'ambiente;</p> <p>7.6. Degradazione:</p> <p>7.6.1. Biotica;</p> <p>7.6.1.1. Biodegradabilità immediata;</p> <p>7.6.1.2. Biodegradabilità intrinseca;</p> <p>7.6.2. Abiotica;</p> <p>7.6.2.1. Idrolisi in funzione del pH e identificazione dei prodotti di decomposizione;</p> <p>7.6.2.2. Fotolisi in acqua, compresa l'identità dei prodotti di trasformazione;</p> <p>7.7. Test di screening di adsorbimento e desorbimento</p>	<p>7.1. Prevedibili vie di immissione nell'ambiente in funzione dell'uso previsto</p> <p>7.2. Informazioni sull'ecotossicologia del principio attivo contenuto nel preparato</p> <p>7.3. Informazioni ecotossicologiche disponibili sui principi non attivi rilevanti da un punto di vista tossicologico (cioè sostanze potenzialmente pericolose), quali le informazioni contenute nelle schede informative in materia di sicurezza</p>
III – informazioni supplementari	<p>1. Effetti sugli uccelli</p> <p>1.1 Tossicità orale acuta;</p> <p>1.2 Tossicità a breve termine — studio sulla dieta per otto giorni su almeno una specie (diversa dai polli);</p> <p>1.3 Effetti sulla riproduzione.</p> <p>2. Effetti sugli organismi acquatici:</p> <p>2.1. Tossicità prolungata per una specie adeguata di pesci;</p> <p>2.2. Effetti sulla riproduzione e sul tasso di crescita di una specie adeguata di pesci;</p> <p>2.3. Bioaccumulo in una specie adeguata di pesci;</p> <p>2.4. Riproduzione e tasso di crescita della D. magna.</p> <p>3. Effetti su altri organismi non bersaglio:</p> <p>3.1. Tossicità acuta per le api da miele ed altri artropodi utili, ad esempio predatori;</p> <p>3.2. Tossicità per lombrichi ed altri macroorganismi non bersaglio del suolo;</p> <p>3.3. Effetti su microrganismi non bersaglio del suolo;</p> <p>3.4. Effetti su altri organismi non bersaglio specifici (flora e fauna) ritenuti a rischio;</p> <p>4. Altri effetti</p> <p>4.1. Test di inibizione della respirazione tramite fanghi attivati.</p>	<p>1. Effetti sugli uccelli:</p> <p>1.1 Tossicità orale acuta;</p> <p>2. Effetti sugli organismi acquatici:</p> <p>2.1. In caso di applicazione sulle, nelle o in prossimità delle acque superficiali</p> <p>2.1.1. Studi particolari su pesci ed altri organismi acquatici</p> <p>2.1.2. Dati sui residui nei pesci per quanto attiene al principio attivo, compresi i metaboliti di rilievo tossicologico</p> <p>2.2. Se il biocida deve essere irrorato in prossimità di acque superficiali, può essere richiesto uno studio dell'irroramento per stabilire i rischi per gli organismi acquatici in condizioni reali di uso</p> <p>3. Effetti su altri organismi non destinatari</p> <p>3.1. Tossicità per vertebrati terrestri diversi dagli uccelli;</p> <p>3.2. Tossicità acuta per le api da miele;</p> <p>3.3. Effetti su artropodi utili diversi dalle api;</p> <p>3.4. Effetti su lombrichi e altri macroorganismi non bersaglio del suolo ritenuti a rischio;</p> <p>3.5. Effetti su microrganismi non bersaglio del suolo;</p> <p>3.6. Effetti su altri organismi specifici non bersaglio (flora e fauna) ritenuti a rischi.</p>

L'allegato VI, riguardo il comparto acquatico, indica che *“Lo stato membro non autorizza un biocida quando esiste una possibilità ragionevolmente prevedibile che organismi acquatici, compresi gli organismi marini e di estuario, siano esposti al biocida, se per qualsiasi principio attivo o sostanza potenzialmente pericolosa in esso contenuta:*

- *Il rapporto PEC/PNEC è superiore a 1, [...] o*

- *Il fattore di bioconcentrazione (BCF) è superiore a 1000 per le sostanze rapidamente biodegradabili o superiore a 100 per quello che non lo sono, [..].”*

La Direttiva attribuisce una grande importanza ai test ecotossicologici, dando un gran valore ai loro risultati anche se presenta nel complesso diverse carenze.

3.2.2 Direttiva 2000/06/CE

“Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 23 Ottobre 2000, che istituisce un quadro per l’azione comunitaria in materia di acque (Gazzetta ufficiale Europea L 237 del 22/12/2000)”

La Direttiva Quadro è il più importante decreto in materia di qualità ambientale. Gli scopi sintetizzati sono:

- Proteggere e migliorare la qualità degli ecosistemi acquatici;
- Promuovere un uso sostenibile dell’acqua basato su una gestione dell’acqua a lungo termine;
- Garantire la disponibilità di una giusta quantità d’acqua quando e dove essa è necessaria.

La Direttiva stessa viene inquadrata in un più ampio disegno di sostenibilità, salvaguardia, tutela e miglioramento della qualità ambientale a livello europeo.

I saggi di tossicità vengono definiti come strumenti utili per valutare la pericolosità per l’ambiente delle sostanze chimiche e dei principali inquinanti ambientali. Difatti i saggi di tossicità sono utilizzati per fissare la concentrazione massima annuale, quindi per definire gli standard di qualità ambientale, delle sostanze nei corpi idrici; gli stati membri poi definiscono dei fattori di sicurezza adeguati in base alla natura e qualità dei dati disponibili, come riportato nella seguente tabella 14:

Tabella 14 Direttiva 2000/60/CE, Allegato V. Descrizione dei fattori di sicurezza utili per la fissazione degli standard di qualità ambientale.

Descrizione	Fattore di sicurezza
Almeno una L(E)C50 acuta per ognuno dei tre livelli trofici dell'insieme di base	100
Una NOEC cronica (per pesci o dafnia o un organismo rappresentativo delle acque saline)	100
Due NOEC croniche per specie appartenenti a due livelli trofici (pesci e/o dafnia o un organismo rappresentativo delle acque saline e/o alghe)	50
NOEC croniche per almeno tre specie (di norma pesci, dafnie o un organismo rappresentativo delle acque saline e alghe) appartenenti a tre livelli trofici	10
Altri casi, compresi dati sul campo o ecosistemi modello, che permettono di calcolare e applicare fattori di sicurezza più precisi	Valutazione caso per caso

3.2.3 Regolamento (CE) n. 1907/2006 e Regolamento (CE) n. 440/2008

Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 Novembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) (Gazzetta ufficiale Europea L. 396 del 30/12/2006) completato dal Regolamento (CE) n. 440/2008 della Commissione del 30 Maggio 2008 che istituisce dei metodi di prova ai sensi del Regolamento (CE) n. 1907/2006 (Gazzetta ufficiale Europea L. 142 del 31/05/2008)

Il regolamento CE n. 1907/2006 definito con l'acronimo REACH (Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals) è mirato a racchiudere tutte le informazioni sulle proprietà chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche delle sostanze chimiche, come pure quelle relative ai diversi utilizzi tali da comportare l'esposizione alle sostanze dei lavoratori, dei consumatori e dell'ambiente. Introduce un principio di precauzione, secondo il quale l'onere di provare che la sostanza chimica è innocua spetta all'industria e non più alle autorità pubbliche.

Nell'Allegato II presente nel REACH, che fa riferimento alla guida per la compilazione della scheda di sicurezza, al punto 12.1 si specifica come *“Fornire i dati pertinenti disponibili sulla tossicità acquatica acuta e cronica per i pesci, i crostacei, le alghe e altre piante acquatiche. Indicare anche, se disponibili, dati sulla tossicità per i microrganismi ed i macroorganismi del suolo e altri organismi di rilevanza ambientale, quali uccelli, le api e la flora. Se la sostanza o il preparato*

hanno effetti inibitori sull'attività dei microrganismi, menzionare l'eventuale impatto sugli impianti di trattamenti delle acque reflue”.

Nella tabella 15 si mostra un quadro riassuntivo delle informazioni ecologiche di base richieste in base al quantitativo di sostanza che verrà commercializzato. Si nota come all'aumento del quantitativo di sostanza ci sia un passaggio da saggi di tossicità acuti a quelli cronici, quindi da breve a lungo termine; ma non solo, nei saggi a lungo termine verranno effettuati test non solo su organismi acquatici ma anche su quelli terrestri.

Tabella 15 Quadro riassuntivo delle informazioni ecotossicologiche richieste in base al quantitativo commercializzato (Regolamento REACH).

Informazioni ecotossicologiche	Allegato VII	Allegato VIII	Allegato IX	Allegato X
Test richiesti	Sostanze ≥ 1t	Sostanze ≥ 10t	Sostanze ≥100t	Sostanze ≥1000t
Tossicità acquatica	Tossicità a breve termine su invertebrati (<i>Daphnia</i>)	Tossicità a breve termine su pesci	Tossicità a lungo termine su invertebrati (<i>Daphnia</i>)	
	Inibizione crescita algale	Studio inibizione respiratoria su fanghi	Tossicità a lungo termine su pesci	
Degradazione	Biodegradabilità	Degradazione abiotica	Simulazione degradazione nelle acque superficiali, nel suolo, nei sedimenti e identificazione dei prodotti di degradazione	Degradazione biotica
Destino e comportamento ambientale		Studio di screening adsorbimento/desorbimento	Informazioni supplementari adsorbimento/desorbimento	Informazioni supplementari adsorbimento/desorbimento
			Bioaccumulo specie acquatiche	
Effetto sugli organismi del suolo			Tossicità a breve termine invertebrati	Tossicità a lungo termine invertebrati
			Effetti su microrganismi	Tossicità a lungo termine sugli organismi che vivono nel sedimento
			Tossicità a breve termine piante	Tossicità a lungo termine sulle piante o sulla riproduzione uccelli

3.2.4 Direttiva 2008/56/CE

Direttiva 2008/56/CE Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 Giugno 2008 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino (Direttiva quadro sulla strategia per l'ambiente marino) (Gazzetta Ufficiale Europea L 164 del 25/06/2008)

Tra gli scopi di questa direttiva, enunciati nei primi articoli troviamo *“istituire un quadro all'interno del quale gli stati membri adottano le misure necessarie per conseguire o mantenere un buono stato ecologico dell'ambiente marino entro il 2020”, “proteggere e preservare l'ambiente marino” e “prevenire e ridurre gli apporti nell'ambiente marino, nell'ottica di eliminare progressivamente l'inquinamento”.*

Gli Stati, secondo l'Art. 9, devono raggiungere il “buono stato ecologico” delle acque, che viene individuato in base a riferimenti qualitativi descritti nell' Allegato I (i.e. gli elementi per valutare la buona qualità ecologica sono da individuare in fitoplancton, macrofite, bentos, macroinvertebrati bentonici e fauna ittica).

Tra di essi non compaiono in modo diretto i saggi di tossicità, ma viene per lo meno, nell'Art.9, citato un riferimento a prove di bioaccumulo.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Acquisizione dei materiali per palificazioni e relative informazioni preliminari

Si è proceduto all'acquisizione dei campioni/provini mediante apposita richiesta scritta con le specifiche del caso, previo opportuno contatto telefonico.

5.1.1 Materiale A

Il campione è stato fornito come da figura 4. Si tratta di un materiale termoplastico a conformazione multistrato a fasce di colore arancione e verde alternate. Si è proceduto alla produzione dei provini delle dimensioni ottimali per la preparazione delle matrici test liscivato propedeutiche all'esecuzione delle prove di tossicità come indicato nelle sezioni successive.

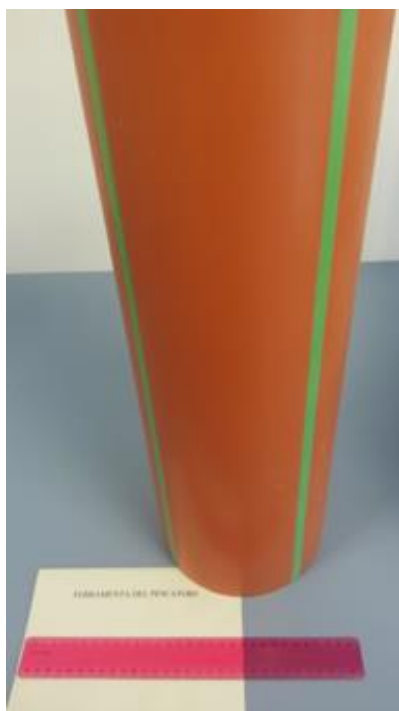


Figura 4 Campione del materiale A.

È stata fornita una scheda aggiuntiva recante alcune caratteristiche base del materiale proposto come da figura 5. È possibile notare come in sezione trasversale (figura 5) il materiale sia composto da più strati concentrici:

- i) uno strato interno, a detta del produttore: “altamente resistente al contatto prolungato sia con l'acqua dolce sia salina; eccellente resistenza

all'abrasione; resistente all'attacco microbico; notevole resistenza meccanica; completamente atossico ed ecocompatibile;

ii) uno strato intermedio, a detta del produttore: "a funzione portante e caratterizzato da elevata resistenza all'impatto ed alla deformazione (anche a bassa temperatura); notevole tenacia e rigidità anche a sollecitazioni estreme;

iii) uno strato esterno, a detta del produttore: "altamente resistente al contatto prolungato sia con acqua dolce sia salina; eccellente resistenza all'abrasione, resistente all'attacco microbico; elevata protezione all'irraggiamento solare; completamente atossico ed ecocompatibile".

Del materiale non sono state fornite né la composizione chimica né altre caratteristiche se non quelle riportate nella presente relazione.

Circa il materiale, è stato fornito il rapporto di prova n. 16E07162-It-0 prodotto da Neutron spa (Modena) di cui alla **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** per il campione di materiale RENO 100 160301VE6 costituito dalla materia prima DN25 SDR11 VESTOLEN A 6060R 10000. La determinazione della migrazione globale in acqua distillata a 40 °C dopo 24 h ha riportato valori inferiori al limite pari a 60 mg/kg (D.M. 06/04/2004 n. 174), anche se non sono disponibili i dati relativi ai singoli parametri valutati. Le informazioni fornite non corrispondono alla stessa tipologia di materiale fornito all'Università per le valutazioni ecotossicologiche.

Stante la situazione sin qui descritta, si ritiene che le caratteristiche e le implicazioni chimiche del materiale in questione rimangano ancora da chiarire. In particolare, rimane da acquisire l'eventuale certificazione ex D.M. 06/04/2004 n. 174 per il materiale oggetto della presente valutazione, qualora disponibile.

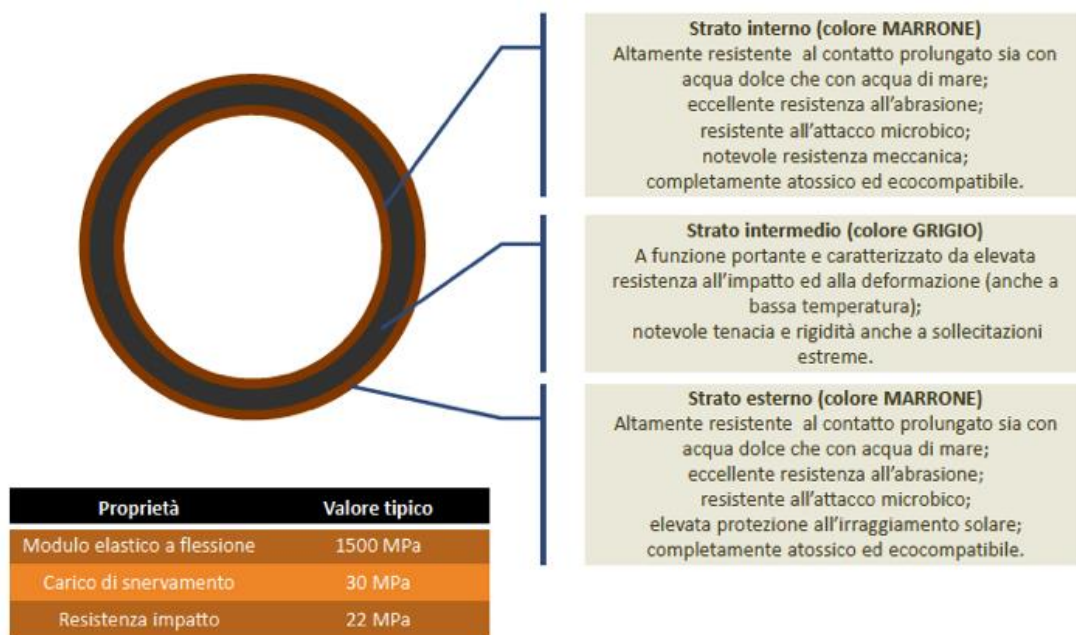


Figura 5 Caratteristiche del materiale A.

Tabella 16 Rapporto di prova 16E07162-It-0 su un campione del materiale RENO 100 160301VE6 (31/05/2016).

DESCRIZIONE ANALISI	RISULTATO	U	REC. %	UNITA' DI MISURA	LQ	LD	METODO	DATA FINE ANALISI
- Condizioni di contatto	Immersione 40°C - 24 ore 0,7 < LQ			cm ² /cm ³ mg/kg	6,0		* -	26/05/2016
- Condizioni di prova							* -	26/05/2016
- Rapporto Superficie/Volume Test							* -	26/05/2016
Determinazione della migrazione globale in acqua distillata a 40°C - 24h (C.M.102-78 e D.M. 06-04-2004, n.174) - LIMITE DI LEGGE 60							Circ Min San n° 102 02/12/1978 All III; DM n° 174 06/04/2004 GU n° 166 17/07/2004	26/05/2016

5.1.2 Materiale B

Il materiale B è costituito da vetroresina come riportato in figura 6 e figura 7.



Figura 6 Campione del materiale B.



Figura 7 Campione del materiale B.

Il materiale proposto per le paline si caratterizza per una struttura cilindrica cava realizzata in resina poliestere rinforzata in fibra di vetro "pultrusa" (da 60 a 169 mm di diametro esterno). Per aumentare la loro resistenza all'azione degli agenti atmosferici - in particolare agli UV - e per avere un elevato livello di finitura superficiale, le paline hanno un rivestimento superficiale ottenuto con un "tessuto non tessuto" di resina poliestere. Le paline a loro dire "si rivelano economiche ed indispensabili quando è necessario abbinare un alto isolamento elettrico ad elevate resistenze sia meccaniche che agli agenti chimici ed ambientali" a causa

delle “elevate prestazioni meccaniche, elevata resistenza alla corrosione ed un ottimo impatto ambientale”.

In tabella 17, sono riportate le caratteristiche del prodotto come da scheda tecnica fornita. Dalla **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.17**, non è possibile desumere come il materiale proposto presenti un “ottimo impatto ambientale”. Altre caratteristiche del materiale così come dichiarato sono: “economicità, leggerezza, elevate caratteristiche meccaniche, facilità di trasporto e di installazione, elevate caratteristiche di isolamento elettrico, assenza di messa a terra, resistenza agli agenti chimici ed atmosferici, assenza di manutenzione, disegno moderno e funzionale, superfici lisce e uniformi e colori standard nero o grigio”.

In sintesi, nessuna caratterizzazione chimica è stata fornita ne riguardo ai costituenti del materiale proposto né in relazione ad eventuali test di cessione. Stante la situazione sin qui descritta si ritiene che le caratteristiche e le implicazioni chimiche del materiale in questione rimangano ancora da chiarire.

Tabella 17 Caratteristiche disponibili del Materiale B.

<i>Dati tecnici del materiale</i>		
caratteristica	valore	norma di riferimento
Composizione - Q.tà fibra di vetro	> 50 %	---
Massa volumica	> 1,7 g/cm ³	UNI 7092
Carico unitario di rottura a trazione	> 2000 kg/cm ²	UNI EN 61
Carico unitario di rottura a flessione	> 1600 kg/cm ²	UNI EN 63
Carico unitario di rottura a compressione	> 1500 kg/cm ²	UNI 4279
Modulo di elasticità a flessione	> 160000 kg/cm ²	UNI EN 63
Durezza superficiale	> 50 °Barcol	UNI EN 59
Assorbimento igroscopico	< 0,5 %	UNI ISO 62
Rigidità dielettrica	> 5 KV/mm	UNI 4291
Resistività superficiale	> 10 ¹² Ohm	UNI 4288
Resistività volumica	> 10 ¹³ Ohm cm	UNI 4288
Autoestinguenza	< 120 sec	ASTM D 635
Finitura superficiale	> Level I	ASTM D 2563

5.1.3 Materiale C

Il materiale C è stato fornito come da figura 8, tale da essere rappresentativo di uno specifico lotto produttivo ottenibile su richiesta.

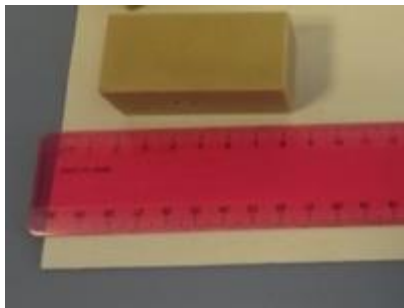


Figura 8 Provini del materiale C.

Assieme al materiale C, è stata fornita una scheda tecnica dello stesso: “FUT 302 PW Membrana elastomerica certificata per acqua potabile”. Si tratta di un materiale bicomponente applicabile con air-less tipo bi-mixer ad alta pressione dotata di pistola autopulente. I dati tecnici dichiarati del materiale applicato a spruzzo sono stati riportati in tabella 19 assieme alle caratteristiche di resistenza chimica (tabella 18).

Sono anche disponibili delle analisi condotte dall’Istituto Giordano S.p.A. (Ravenna) con rapporto di prova del 15/11/2012 in relazione alle prescrizioni del Decreto Ministeriale 6 Aprile 2004, n. 174 “Regolamento concernente i materiali e gli oggetti che possono essere utilizzati negli impianti fissi di captazione, trattamento, adduzione e distribuzione delle acque destinate al consumo umano” considerando prove di migrazione globale, migrazione del colore mediante misure di trasmittanza tra 400 e 750 nm e migrazione specifica in acqua distillata a 40 °C per 10 giorni. I risultati delle valutazioni sono stati riportati in tabella 20, 21, 22, 23, 24.

Si segnala che la maggior parte dei parametri indagati presenta un limite di rilevabilità strumentale superiore al limite previsto per le sostanze nella colonna d’acqua, sia quelle appartenenti all’elenco di priorità (Tab. 1/A DLgs 260/2010) sia quelle non appartenenti all’elenco di priorità (Tab 1/B DLgs 260/2010). Dette analisi, quindi, forniscono solo un’indicazione di massima circa la composizione del campione, ma non lo qualificano come rispondente agli standard di qualità previsti per le acque marino-costiere e le acque transizione come da DLgs 260/2010 (per i riferimenti normativi vedasi paragrafo 2.3).

Tabella 18 Dati tecnici del materiale C.

Colore	Neutro o colori a richiesta
Viscosità	700±200 mPa.s
Peso specifico	1,1±0,05 g/cm ³
Cream time a 25°C.	4-7 secondi
Residuo secco	100%
Indurimento completo	2 ore
Resistenza a trazione DIN 53504	>19,0 Mpa
Allungamento a rottura DIN 53504	>440%
Resistenza alla lacerazione ISO 34/1	70.13
Durezza shore A/D	98/56
Adesione su calcestruzzo UNI 8772/6*	>1,6 Mpa
Adesione su metallo	>7,0 Mpa
Adesione su fibrocemento	>1,4 Mpa
Modulo 100% 7 gg. 23°C. + 14 gg. 40°C. DIN 53504	9,39
Sforzo massimo a -20°C.	14,25
Deformazione massima -20°C.	114%
Resistenza alla lacerazione a -20°C. ISO 34/1	112
Magazzinaggio	Componente B: 6 mesi / Componente A: 1 anno Confezioni originali in luogo asciutto e riparato

Tabella 19 Resistenza chimica del materiale C.

Acetone	Resiste
Olio idraulico	Resiste
Benzina verde	Resiste
Esano	Resiste
Metanolo	Resiste
Benzina + 5% metanolo	Resiste
Gasolio	Resiste
Idrossido di sodio al 5%	Resiste
Idrossido di sodio al 10%	Resiste
Idrossido di sodio al 25%	Resiste
Idrossido di sodio al 50%	Resiste limitatamente
Acido solforico al 5%	Resiste
Acido solforico al 10%	Resiste limitatamente
Acido cloridrico al 5%	Resiste
Acido cloridrico al 10%	Resiste
Acido acetico al 10%	Resiste
Acido fosforico al 10%	Resiste
Acqua	Resiste
Acqua 80°C.	Resiste (testato per 15 gg.)
Acqua saccarosio al 10%	Resiste

Resiste : il prodotto resiste ma possono esserci variazioni di colore anche forti.

Resiste limitatamente: il prodotto contaminante va rimosso al più presto.

Tabella 20 Determinazione della migrazione globale.

Liquido simulante	mg/dm ²	Limite massimo ammissibile
Acqua distillata o acqua di qualità equivalente	3,4	10,0 mg/dm ²

Tabella 21. Determinazione della migrazione del colore mediante prove di trasmittanza.

Liquido simulante	Trasmittanza tra 400 e 750 nm	Limite minimo ammissibile
Acqua distillata o acqua di qualità equivalente	> 99 %	95 %

Tabella 22 Determinazione della migrazione specifica per solventi aromatici, alifatici e alogenati.

Sostanza determinata	Valore ottenuto su mix del campione [mg/kg]	Metodo di prova
SOLVENTI AROMATICI		
Benzene	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
Toluene	0,45	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
Etilbenzene	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
Stirene	< 1	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
SOLVENTI ALIFATICI		
Cicloesano	< 1	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
SOLVENTI ALOGENATI		
Cloruro di vinile	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
Diclorometano	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
Triclorometano	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
Tetracloruro di carbonio	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
1,1,2-Tricloroetano	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
1,1,1,2-Tetracloroetano	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006

Dalle analisi si segnalano valori rilevabili di toluene (0,45 mg/kg) (tabella 22) e dello ftalato bis-(2-etilesil) ftalato (147 mg/kg) (tabella 23). Particolare attenzione è da porre sia sul toluene sia sugli ftalati.

Il valore di toluene appare superiore ai limiti previsti dal DLgs 260/2010 per le acque superficiali (1/b, 1 µg/L), salvo considerare eventuali fenomeni di diluizione ulteriori rispetto all'ambiente di destino del materiale. A tal proposito è necessario condurre un'analisi del rischio tenendo in debita considerazione la numerosità di pali da impiegarsi nell'area in relazione alla potenziale superficie di scambio disponibile tra materiale ed acqua.

La European Food and Safety Agency (EFSA) tramite lo *Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food* ha prodotto nel 2005 un opinion paper riguardo a "*Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials*" (EFSA, 2005). Recenti studi sui ratti (utilizzati per simulare potenziali effetti sull'uomo) hanno evidenziato problematiche che si riferiscono alla performance riproduttiva e alla fertilità dei genitori (F0) e della prima generazione filiale (F1) con effetti sullo sviluppo a 340 mg/kg BW/day (BW = body weight = peso corporeo) (EFSA, 2005). EFSA (2005) ha stabilito una Total Daily Intake (TDI, assunzione totale giornaliera) di 0.05 mg/kg BW, basata su un livello a cui non è possibile osservare alcun effetto avverso (NOAEL) pari a 5 mg/kg BW/day, utilizzando un fattore di incertezza di 100.

Un ulteriore documento del Joint Research Centre (JRC) - Institute of Health and Consumer Protection (IHCP) ha posto l'attenzione proprio sul DEHP fornendo un quadro completo al 2008 circa la valutazione del rischio di questa sostanza (JRC, 2008). Il DEHP non si idrolizza in acqua e con un $\log K_{ow}$ pari a 7.5 è attesa per questo composto una forte affinità per la sostanza organica. Il DEHP è in grado di accumularsi negli organismi acquatici, presentando i più alti valori del fattore di bioconcentrazione per gli invertebrati, e.g. BCF = 2700 per *Gammarus* spp. e BCF = 840 per i pesci. Quindi, l'assunzione tramite la fase alimentare rappresenta una via di esposizione particolarmente rilevante. La valutazione su più livelli trofici segnala, però, che il DEHP non biomagnifica (JRC, 2008). Generalmente, i livelli riscontrati nelle acque dei fiumi arrivano sino a 0,021 mg/L specialmente per le aree industriali e a maggiore urbanizzazione (JRC, 2008). I valori di DEHP registrati nel caso specifico sono, quindi, 7000 volte superiori ai livelli massimi riscontrati in ambito dulciacquicolo.

Brown e Thompson (1982) hanno esposto *Mytilus edulis* al DEHP per 28 giorni a 0,005 e 0,050 mg/L. Il BCF misurato tramite l'analisi del ^{14}C ha stimato valori pari a circa 2500. I mitili mantenuti in acqua pulita per altri 14 giorni e rimisurati tramite ^{14}C per la quantificazione del DEHP hanno mostrato un tempo di emi-vita di depurazione della sostanza pari a 3,5 giorni. Nell'arco dei 42 giorni di osservazione degli organismi non sono stati evidenziati effetti avversi (deposizione delle pseudofeci, adesione al substrato mediante bisso, aspetto generale e attività comprese eventuali anomalie nell'apertura valvare).

Il JRC (2008) segnala che per il consumatore vi è la necessità di *limitare i rischi* in relazione alla:

- Preoccupazione per i bambini circa effetti testicolari, sulla fertilità, nefrotossicità in seguito ad esposizioni ripetute come conseguenza dell'uso di giocattoli, articoli per bambini e vie multiple di esposizione (ndr come la via alimentare);
- Preoccupazione per bambini ed adulti sottoposti a trattamenti trasfusionali a lungo termine a causa del materiale medico contenente DEHP.

Inoltre, anche l'esposizione ambientale desta alcune criticità per le quali il rischio è da limitare, tra cui:

- Preoccupazione per i bambini circa effetti testicolari, sulla fertilità, nefrotossicità in seguito ad esposizioni ripetute per via alimentare nei pressi di siti che processano polimeri contenenti DEHP, o di siti produttivi di adesivi o sigillanti, pitture, vernici o inchiostri per la stampa. Gli scenari sono generici e basati su dati di emissione di default;
- Preoccupazione per i bambini circa la tossicità testicolare per via alimentare come conseguenza di cibo prodotto nei pressi di siti per il riciclo della carta o di depuratori. Gli scenari sono generici e basati su dati di emissione di default.

Stante la situazione si qui descritta, si ritiene che le caratteristiche e le implicazioni chimiche del materiale in questione rimangano ancora da chiarire.

Tabella 23 Determinazione della migrazione specifica per solventi alogenati, composti clorurati, fenoli, ftalati, ammine aromatiche, e idrocarburi policiclici aromatici.

Sostanza determinata	Valore ottenuto su mix del campione [mg/kg]	Metodo di prova
1,1-Dicloroetilene	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
1,1,1-Tricloroetano	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
COMPOSTI CLORURATI		
Pentacloroetano	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
Esacloroetano	< 0,01	EPA 5021A 2003 + EPA 8260C 2006
Pentaclorofenolo	< 0,01	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
FENOLI		
Fenolo	< 0,01	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
2-Metilfenolo	< 0,01	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
3-Metilfenolo	< 0,01	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
4-Metilfenolo	< 0,01	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
2-Clorofenolo	< 0,01	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
2-4-Diclorofenolo	< 0,01	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
2-4-6-Triclorofenolo	< 0,01	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
FTALATI		
Bis-(2-etilesil)ftalato	147	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Butilbenzilftalato	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Di-(n-butil)ftalato	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Di-(n-octil)ftalato	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Dietilftalato	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Dimetilftalato	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Di-isononilftalato	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Di-isodecilftalato	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Di-isobutilftalato	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
AMMINE AROMATICHE		
Benzidina	< 0,1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
2-Naftilammina	< 0,1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
4-Aminobifenile	< 0,1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Policlorotrifenili	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI		
Naftalene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Acenaftilene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Acenaftene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007

Tabella 24 Determinazione della migrazione specifica per idrocarburi policiclici aromatici ed eteri

Sostanza determinata	Valore ottenuto su mix del campione [mg/kg]	Metodo di prova
Fluorene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Fenantrene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Antracene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Fluorantene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Pirene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Benzo(a)antracene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Crisene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Benzo(b)fluorantene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Benzo(k)fluorantene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Benzo(a)pirene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Benzo(e)pirene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Indeno(1,2,3-cd)pirene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Dibenzo(a,h)antracene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Benzo(ghi)perilene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Dibenzo(a,e)pirene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Dibenzo(a,h)pirene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Dibenzo(a,i)pirene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
Dibenzo(a,l)pirene	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
ETERI		
2-(2-metossietossi)etanolo	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007
2-(2-butossietossi)etanolo	< 1	EPA 3550C 2007 + EPA 8270D 2007

5.2 Fasi sperimentali della valutazione ecotossicologica

La valutazione ecotossicologica sarà effettuata attraverso in primis la produzione di lisciviato da usare come matrice di test, successivamente attraverso l'esecuzione dei test previsti dal protocollo. Nel nostro caso saranno eseguiti i test su: *Vibrio fischeri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*, *Artemia franciscana*.

Saranno poi utilizzati anche i dati ottenuti da un ulteriore saggio ecotossicologico su *Tigriopus fulvus*.

5.2.1 Procedura di lisciviazione

La lisciviazione definisce il processo tramite il quale una o più sostanze solubili si dissociano da una matrice solida finendo in un solvente. Applicato alla nostra casistica, si vuole andare a indurre un eventuale rilascio di sostanze dal materiale sottoposto alla valutazione così da ottenere una matrice per l'esecuzione dei test ecotossicologici.

Innanzitutto i provini da utilizzare devono essere ricavati direttamente dal palo che verrà poi inserito nell'ambiente. Sono stati ricavati un totale di 10 provini per materiale. La lisciviazione ha avuto luogo a due temperature diverse, 20 °C e 30 °C, per 24 h, essendo queste le temperature e la durata prevista dal protocollo (MAV, 2013).

Come matrice liscivante sarà utilizzata acqua marina naturale, prelevata in un luogo non contaminato, filtrata sotto vuoto a 0.45 micron per eliminare tutte le impurità.

Il primo passo per l'esecuzione del processo è stato il calcolo della superficie dei provini (tabella 25 e 26), in quanto come indicato nel protocollo il rapporto tra la superficie totale dei provini e il volume di liscivante deve essere pari a 0,6 cm²/cm³.

Tabella 25 Misure di lunghezza, larghezza e profondità per ogni provino di ogni campione, con calcolo della superficie totale da utilizzare per determinare il volume di lisciviante (20 °C).

24 h a 20 °C				
CAMPIONE	LUNGHEZZA (x)	LARGHEZZA (y)	PROFONDITA' (z)	SUPERFICIE TOTALE
	mm			mm ²
A				
1	66,5	30,8	13,1	6645,66
2	63	30,7	13,3	6360,62
3	63	31,3	13,5	6489,9
4	62	30	13,1	6130,4
5	63,1	32	14	6701,2
B				
1	63	31,6	5	4927,6
2	64,5	30	5	4815
3	64,7	31,6	4,8	5013,52
4	65	31,3	4,6	4954,96
5	63	31	4,7	4789,6
C				
1	63,4	29,3	29,3	9147,46
2	63	28,6	29	8916,4
3	63	30	29	9174
4	63,1	29,5	29	9093,7
5	63,3	30	29	9209,4

Tabella 2616 Misure di lunghezza, larghezza e profondità per ogni provino di ogni campione, con calcolo della superficie totale da utilizzare per determinare il volume di lisciviante (30 °C).

24 h a 30 °C				
CAMPIONE	LUNGHEZZA (x)	LARGHEZZA (y)	PROFONDITA' (z)	SUPERFICIE TOTALE
	mm			mm ²
A				
1	65	30,6	12,8	6425,36
2	62,2	30,5	12,6	6130,24
3	62	30,6	12,8	6164,96
4	61,8	31,3	13	6289,28
5	62,3	31,2	13	6318,52
B				
1	63,3	30	4,6	4656,36
2	64,6	30,1	4,4	4722,28
3	64,4	32	4,6	5008,48
4	64	29,2	5,2	4706,88
5	67,2	32	4,6	5213,44
C				
1	63,2	29,2	29	9050,08
2	62,7	30	29	9138,6
3	63	30	29	9174
4	62,8	29,7	28	8910,32
5	63,3	29,8	29,2	9209,72

Per ogni campione sono stati selezionati un determinato numero di provini per rispettare il rapporto tra la superficie totale dei provini e il volume di lisciviante (tabella 27).

Tabella 2717 Provini utilizzati per la procedura di lisciviazione.

Campione	Provini utilizzati per lisciviazione									
	20 °C					30 °C				
A	X	X	X	X		X	X	X	X	
B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C	X	X	X	X		X	X	X		
Numero provini	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5

Dopo aver determinato il numero di provini si passa al calcolo del volume di lisciviante (tabella 28).

Tabella 28 Volume di acqua marina filtrata a 0.45 micron utilizzata per la lisciviazione.

Campione	Volume lisciviante (ml)	
	24 h a 20 °C	24 h a 30 °C
A	427	417
B	408	405
C	606	456

Successivamente si passa al fissaggio dei provini ad un'asta di teflon tramite delle fascette atossiche (figura 9 e 10). Quest'ultime, insieme all'asta di teflon, andranno a costituire il Bianco procedurale per sottrarre in fase di elaborazione dei risultati un loro possibile contributo alla tossicità totale (figura 10).

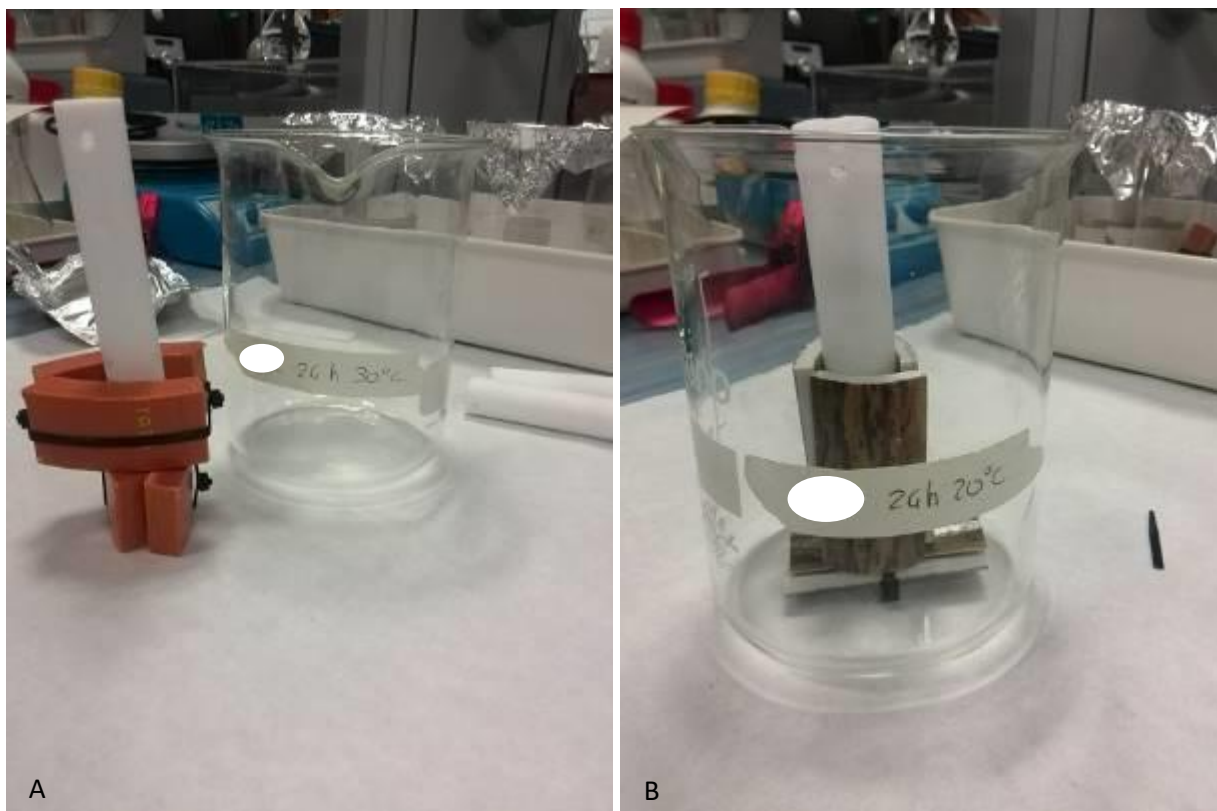


Figura 9 Campioni A e B fissati all'asta di teflon tramite fascette atossiche.

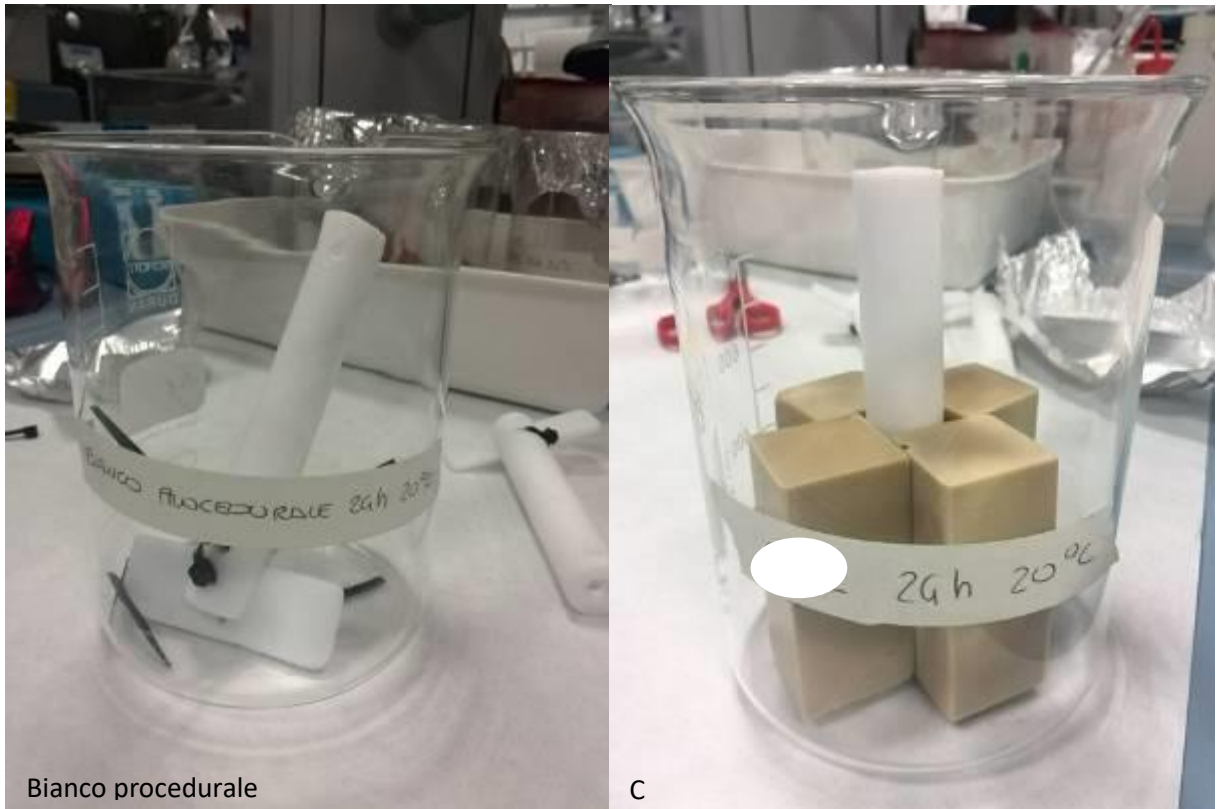


Figura 10 Campioni (Bianco procedurale e campione C) fissati all'asta di teflon tramite fascette atossiche.

La lisciviazione deve avvenire senza il rinnovo della soluzione, al buio per evitare fenomeni di fotolisi e in condizioni dinamiche tramite l'impiego di un jar test (60 rpm). (figura 11).

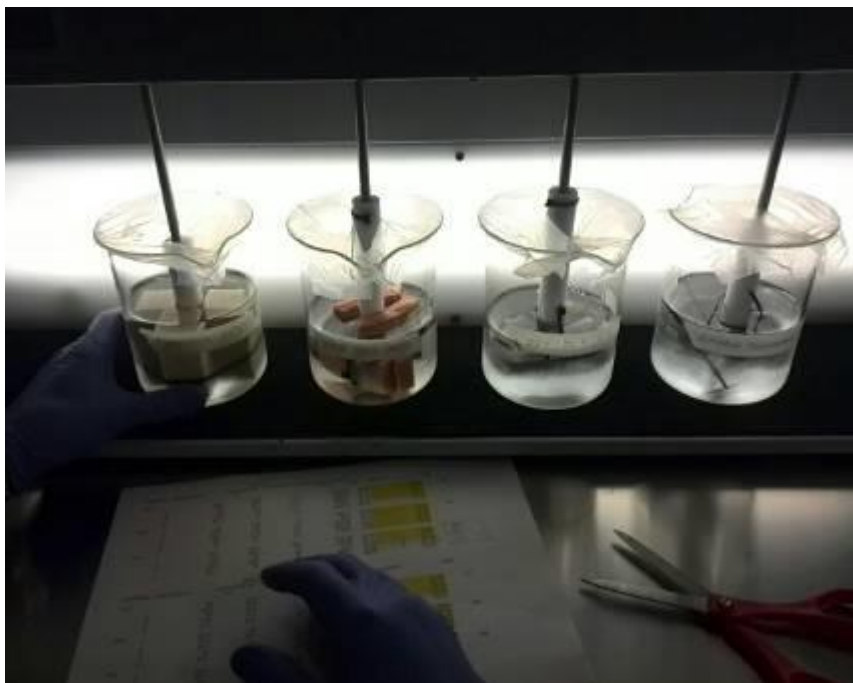


Figura 11 Campioni posizionati sul jar test per l'esecuzione della lisciviazione.

Al termine delle 24 h alcuni sub-campioni vengono etichettati e stoccati. Nel caso dell'esecuzione del test ecotossicologici nei sette giorni successivi essi saranno conservati ad una temperatura di 4 °C, se in tempi maggiori a temperature inferiori allo zero; in entrambi i casi al buio.

Nei campioni di lisciviato vengono valutati alcuni parametri, quali Ph, Eh, salinità e temperatura (tabella 29). Qualora vi sia la necessità il ph può essere aggiustato, dandone indicazione nella relazione, mediante l'aggiunta di soluzioni con concentrazione nota di HCl e NaOH.

Tabella 29 Valori della matrice lisciviata dai vari campioni di ph, Eh, salinità e temperatura.

Campione	pH	Eh (mv)	Salinità (‰)	T (°C)
24 h a 20 °C				
A	8,07	-67,2	33	12,9
B	8,07	-67,2	33	12,2
C	8	-63,1	33	11,3
BP	8,08	-68	33	13,4
24 h a 30 °C				
A	8,07	-68,2	36	16,9
B	8,07	-67,7	36	16
C	8,04	-66,1	34	14,8
BP	8,09	-68,8	34	15,7

5.2.2 Test di tossicità

I test eseguiti saranno quelli enunciati in precedenza, andando a valutare endpoint cronici, sub-cronici e acuti.

Nella tabella 30 sono illustrate le specie, gli endpoint valutati e i protocolli seguiti per l'esecuzione del test ecotossicologico.

Tabella 3018 Specie, endpoint e protocolli dei saggi utilizzati nell'analisi ecotossicologica.

SPECIE	ENDPOINT	PROTOCOLLO
<i>Vibrio fischeri</i>	Inibizione bioluminescenza	BS EN ISO 11348-3:2008
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Inibizione della crescita algale	UNI EN ISO 10253
<i>Crassostrea gigas</i>	Embriotossicità	ASTM E 724-98 (2004)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Embriotossicità	ASTM E 724-98 (2004)
<i>Artemia franciscana</i>	Immobilità	APAT-IRSA-CNR 8060 (2003)
<i>Tigriopus fulvus</i>	Mortalità	ISO 14669, 1991

5.2.2.1 Test d'inibizione della bioluminescenza (*V. fischeri*)

5.2.2.1.1 Principio del metodo

Il metodo permette di valutare la tossicità acuta dei campioni utilizzando l'inibizione della naturale bioluminescenza emessa da batteri marini della specie *Vibrio fischeri* (BS EN ISO 11348-3:2008).

La lettura della bioluminescenza, misurata a 5-15-30 minuti, viene utilizzata per la determinazione dell'EC50 e dell'EC20.

5.2.2.1.2 Materiali e soluzioni

Organismo test

Per il saggio viene utilizzato il ceppo NRRL-B-11177 della specie marina *V. fischeri*. La sospensione batterica è acquistabile in forma liofilizzata da conservare tra -18 °C e -20 °C. I batteri cominciano a crescere immediatamente dopo la ricostituzione e sono subito pronti all'uso. Ogni stock di batteri è venduto con una scheda che ne garantisce la qualità.

Soluzione diluente

Sciogliere 20 g di sodio cloruro in 1 L di acqua distillata. È possibile acquistare soluzioni già pronte per il saggio con batteri bioluminescenti.

Soluzione ricostituente

-20g di NaCl;

-2,035g di MgCl₂*6H₂O;

-0,30g KCl;

Dissolvere in 1 litro di acqua. La soluzione deve essere conservata tra -18 °C e -20 °C.

5.2.2.1.3 Apparecchiature

- Congelatore per la conservazione delle colture batteriche -20 °C;

- Bagno termostatico per la riattivazione dei batteri;

- Luminometro in grado di leggere a 490 nm di lunghezza d'onda;

- pH-metro
- Micropipette a volume variabile da 10 a 200 μL e da 200 a 5000 μL ;
- Microtox®;
- Provette costituite da un materiale inerte, adeguate per il luminometro.

5.2.2.1.4 Procedimento

Prima dell'esecuzione del test portare i campioni a temperatura ambiente. Misurare successivamente il ph, che se rientra in un valore compreso tra 6 e 9 unità non necessita di alcuna modifica. Nel caso non rientrasse nel suddetto intervallo si procederà alla sua correzione tramite l'aggiunta di NaOH e HCl 1 M. La soluzione sarà utilizzabile dopo un tempo di 30 minuti dalla riattivazione.

Le sospensioni congelate di batteri devono essere riattivate prime dell'utilizzo, unendo i batteri liofilizzati alla soluzione ricostituente. La determinazione della quantità che dovrà essere aggiunta in ogni cuvetta parte dal presupposto che non deve esserci una concentrazione finale di batteri inferiore a 10^6 cellule per cuvetta. Nel nostro caso essendo le cuvette contenenti 1 mL di soluzione la quantità aggiunta è stata di 10 μL .

La conduzione del saggio procede preparando per ogni campione le cuvette in triplicato, sia per il lisciviato a 30 °C e a 20 °C. Si prepara altre tre cuvette di controllo contenenti acqua marina filtrata 0.45 micron. Preparare inoltre le cuvette per l'esecuzione del test con il tossico di riferimento, nel nostro caso ZnSO_4 . Le diluzioni per il tossico di riferimento saranno 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 12, 24, 49, 98 ($\mu\text{g/L}$). Dopo aver impostato il software MicrotoxOmni il protocollo test (Whole Effluent Toxicity, WET) si passa alla misurazione della bioluminescenza di ogni campione. (figura 12).

Il programma in automatico ci indicherà quali campioni sottoporre alla misurazione tramite un timer, che verrà impostato a 5 minuti, poi 15 e infine 30 minuti, così da ripetere la misura nel tempo e determinare l'eventuale inibizione della bioluminescenza.

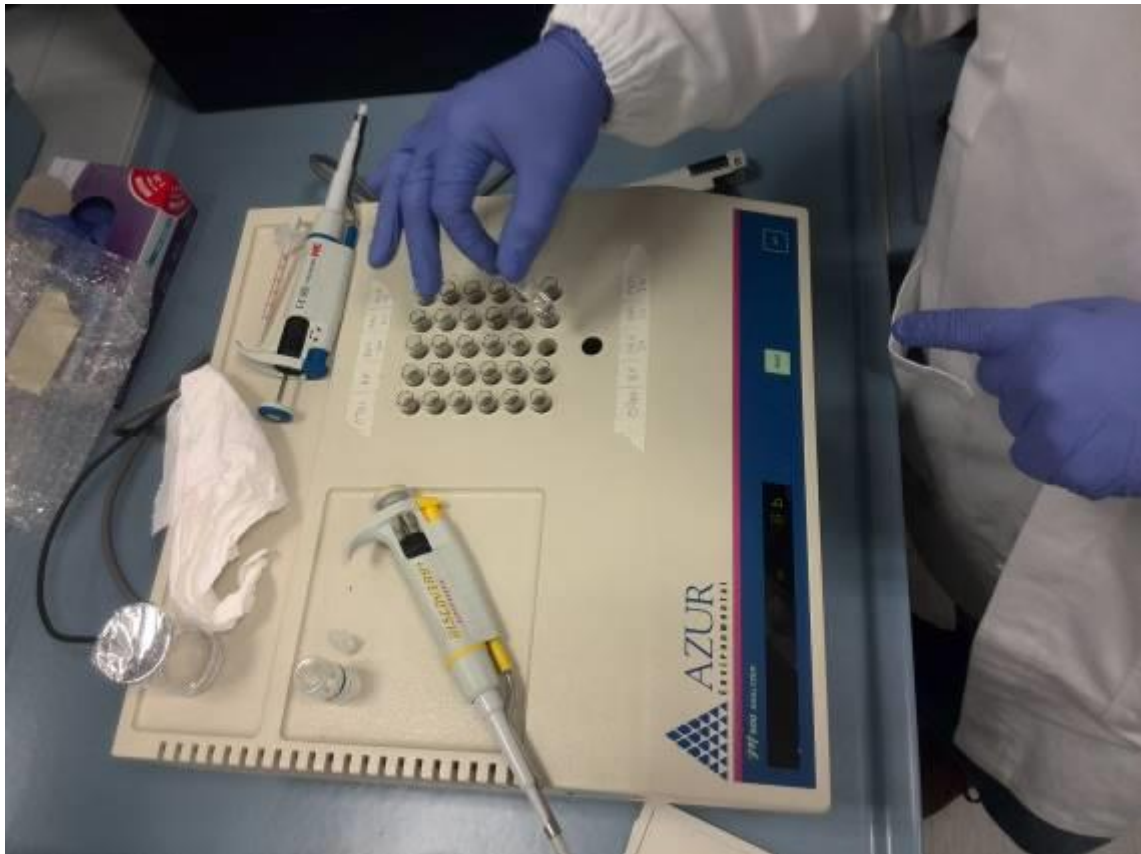


Figura 12 Misurazione della bioluminescenza durante il Microtox test.

5.2.2.2 Test inibizione della crescita algale (*P. tricornutum*)

5.2.2.2.1 Principio del metodo

Il metodo standardizzato a livello internazionale (UNI EN ISO 10253) si basa sulla determinazione dell'inibizione della crescita algale della specie di alga unicellulare marina *Phaeodactylum tricornutum*. L'incubazione dura 72 h al termine delle quali si valuta l'andamento della crescita algale.

5.2.2.2.2 Materiali e soluzioni

Organismo test

L'organismo utilizzato per il saggio è la microalga unicellulare marina *P. tricornutum*. La coltura va rinnovata periodicamente ogni 2/3 settimane, trasferendo 1 mL di coltura algale in una nuova beuta con l'aggiunta di 100 mL di growth medium e acqua marina, mantenendo successivamente la beuta sotto costante agitazione e illuminazione.

Acqua marina sintetica

Questa soluzione sarà la base per la preparazione delle nutrient stock solution.

SALI	CONCENTRAZIONE (g/L)
NaCl	22
MgCl ₂ *6H ₂ O	9,7
Na ₂ SO ₄	3,7
CaCl ₂	1,0
KCl	0,65
NaHCO ₃	0,20
H ₃ BO ₃	0,023

Nutrient stock solution

Le soluzioni vanno conservate al buio a 4 °C.

NUTRIENTE	CONCENTRAZIONE
STOCK SOLUTION 1	mg/L
FeCl ₆ *6H ₂ O	48
MnCl ₂ *4H ₂ O	144
ZnSO ₄ *7H ₂ O	45
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,157
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,404
H ₃ BO ₃	1140
Na ₂ EDTA	1000
STOCK SOLUTION 2	
Tiamina Cloridrato	50
Biotina	0,01
Vitamina B ₁₂	0,10
STOCK SOLUTION 3	g/L
K ₃ PO ₄	3,0
NaNO ₃	50,0
Na ₂ SiO ₃ *9H ₂ O	19,96

5.2.2.2.3 Apparecchiature

Usare le normali apparecchiature da laboratorio oltre a:

- stanza a condizionamento climatico;
- Spettrofotometro;
- Camera di conta;
- Piastre per incubazione
- ph-metro.

5.2.2.2.4 Procedimento

La prima fase consiste, dopo aver precedentemente preparato l'acqua marina ricostruita e le soluzioni stock 1-2-3, nella preparazione del mezzo di crescita; aggiungendo 15 mL di soluzione 1, 0,5 mL di soluzione 2 e 1 mL di soluzione 3 a 900 mL di acqua marina ricostruita o naturale (filtrata a 0,45 micron) per poi portare a volume (1L). Viene poi aggiustato, se necessario, il pH.

Misurare l'assorbanza, tramite un spettrofotometro, dei campioni tal quali ad una lunghezza d'onda di 270 nm.

La concentrazione di cellule delle colture deve essere calcolata con una camera di conta al microscopio; questo serve per poter determinare la quantità di cellule in un mL così da effettuare un inoculo con una concentrazione superiore alle 10^4 cellule.

La misura dell'assorbanza dopo l'esposizione di 72 h determinerà una stima della concentrazione algale all'interno dei pozzetti.

L'endpoint si ottiene confrontando il tasso di crescita specifico del campione con quello relativo al controllo negativo.

I campioni vanno preparati in triplicato con le seguenti quantità (mL) in piastre monouso:

LINEA GUIDA GENERALE= 10 mL TOTALI = CAMPIONE 9 + INOCULO 0,5 + 0,5
GROWTH MEDIUM

CAMPIONI = 3 mL TOTALI = CAMPIONE 2,7 + INOCULO 0,15 + 0,15
GROWTH MEDIUM

CONTROLLO= 3 mL TOTALI = INOCULO 0,15 + 0,2,85
GROWTH MEDIUM

ACQUA MARINA= 3 mL TOTALI = ACQUA MARINA 2,75 + INOCULO 0,15 + 0,15
GROWTH MEDIUM

I campioni così preparati vanno coperti con del parafilm per evitare la contaminazione e per limitare l'evaporazione dell'acqua e incubati alla

temperatura di 20 °C sotto luce bianca continua (con una lunga lunghezza d'onda effettiva da 400nm a 700nm) e costante agitazione.

Passate le 72h si misura l'assorbanza allo spettrofotometro per determinare la crescita algale (figura 13).



Figura 13 Campioni di lisciviato pronti per la preparazione delle piastre e spettrofotometro tramite il quale si andrà a misurare l'assorbanza.

5.2.2.3 Test di embriotossicità con i molluschi bivalvi (*C. gigas* e *M. galloprovincialis*)

5.2.2.3.1 Principio del metodo

Il metodo (ASTM E 724-98, 2004) si basa sulla valutazione della quantità di larve ed embrioni che non si sviluppano in modo corretto a larve-D. Embrioni e larve sono considerati come lo stadio di sviluppo più sensibile dei molluschi bivalvi. Essendo questi organismi commercialmente importanti si può affermare che i test condotti mediante queste fasi abbiano una grande rilevanza ai fini della valutazione ecotossicologica. Il saggio ha una durata di 24 h per *Crassostrea gigas* e di 48 h per *Mytilus galloprovincialis*, passate le quali si andrà a valutare su 100

larve quante sono normo formate, quante larve siano rimaste allo stadio di trocofora e quante siano le larve malformate (figura 14).



Figura 14 A-larva trocofora, B-larva normo formata (D-shape), C-larva malformata (protrusione del mantello).

5.2.2.3.2 Materiali e soluzioni

Organismo test

C. gigas, comunemente detta “ostrica”, è l’organismo utilizzato nel test. Gli esemplari, 4 maschili e 6 femminili, sono stati acquistati presso una struttura specializzata alla coltivazione di organismi marini per l’esecuzione di test ecotossicologici, la “Guersney Sea Farm Limited” situata sull’isola di Guersney (Gran Bretagna); mantenute in acqua marina dalle 4 alle 6 settimane alla temperatura da 20 °C a 25 °C e nutrite con culture algali. Le ostriche sono state spedite poi in Italia in contenitori ermetici nelle 48 ore successive al loro invio.

Il periodo di massima maturazione gonadica in natura si riscontra nei mesi di Maggio, Giugno e Luglio.

M. galloprovincialis ha una grande rilevanza ecologica per gli ambienti di transizione. Periodo di massima maturazione gonadica nei mesi da Ottobre a Marzo.

Gli esemplari utilizzati nel saggio sono stati campionati nel mese di Aprile in un sito di riferimento della Laguna di Venezia, nei pressi dell’isola delle Vignole.

Gli organismi sono stati utilizzati nel test nelle 24 ore successive al campionamento.

5.2.2.3.3 Apparecchiature

Utilizzo delle normali dotazioni di un laboratorio di ecotossicologia e in aggiunta:

- 2 Bagni termostatici;
- Microscopio a inversione;
- Piastre per incubazione.

5.2.2.3.4 Procedimento

Il primo passaggio per l'esecuzione del test è la stimolazione del rilascio delle cellule uovo e degli spermatozoi. Per far ciò si predispongono due bagni termostatici a temperature differenti, 18 °C e 28 °C; per indurre il rilascio di gameti, infatti, è necessario utilizzare uno shock termico. Si andrà a immergere gli organismi per una prima mezz'ora nel bagno a 18 °C e successivamente in quello a 28 °C per un'altra mezz'ora (figura 15); il procedimento va ripetuto fino a quando non si nota un iniziale rilascio di gameti, a quel punto va prelevato un campione per determinare se l'organismo sia maschile o femminile.



Figura 15 Bagni termostatici (a sinistra a 18 °C e a destra a 28 °C) utilizzati per favorire il rilascio dei gameti tramite lo shock termico.

A riconoscimento avvenuto si suddivideranno in becher gli organismi in base al sesso di appartenenza, lasciandoli in un ulteriore bagno termostatico impostato alla temperatura di 24 °C.

Si procederà quindi alla determinazione del numero medio di uova per 0,1 mL tra i vari organismi, così da estrapolare la quantità di inoculo da trasferire in ogni pozzetto della piastra.

Uova medie in 0,1 mL (X_M)

Uova in 1 mL (X_{ML}) = $X_M * 10$

Uova al mL presenti nel cilindro da 500 mL (X_{500ML}) = $(X_{ML} * 250) / 10$

μ L di inoculo per ogni pozzetto di 3 mL = $(200 * 1000) / X_{500ML}$

Successivamente si andranno a filtrare le cellule uovo a 32 μ m e gli spermatozoi a 100 μ m all'interno di un cilindro da 500 mL da porre poi a 24 °C per la fecondazione per *C.gigas* e a 18 °C per *M. galloprovincialis* (figura 16).



Figura 46 Fase della filtrazione delle cellule uovo in un cilindro da 500 mL.

La preparazione delle piastre avverrà come schematizzato in tabella 31, in triplicato per ogni diluizione, con un inoculo di 20 µL di larve. Il tossico di riferimento usato sarà il Cu²⁺ con le concentrazioni (mg/L) di 3, 6, 12, 24, 48.

Tabella 31 Modalità di preparazione delle diluizioni dei campioni.

MODALITA' DI PREPARAZIONE DELLE PIASTRE (ml)								
% Diluizione	0,78	1,56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
Campione	0,023	0,047	0,094	0,188	0,375	0,75	1,5	3
Acqua marina	2,977	2,953	2,906	2,813	2,625	2,25	1,5	0

L'incubazione avrà una durata complessiva di 48h alla temperatura di 20 °C.

Passate le 48h si andrà a contare per ogni pozzetto un totale di 100 larve, segnando il numero di larve normo formate, di trocofore e di larve malformate.

5.2.2.4 Test di immobilizzazione con i crostacei (*A. franciscana*)

5.2.2.4.1 Principio del metodo

Il saggio, protocollo APAT-IRSA-CNR 8060 (2003), consente di valutare la tossicità acuta dei campioni tramite la valutazione della immobilità del crostaceo *Artemia franciscana*. La durata complessiva è di 96 ore, con misure ripetute ogni 24 ore.

5.2.2.4.2 Materiali e soluzioni

Organismo test

Il test andrà svolto con cisti di *A. franciscana*, un piccolo crostaceo anostraco in grado di sopportare ampi range di salinità (5 -250 g/L⁻¹) e temperatura (6 – 40 °C), con un ciclo di vita breve ed alta fecondità (USEPA,2002; Nunes et al,2006).

Soluzione salina

Per la riattivazione delle cisti si utilizza una soluzione Instant Ocean ®, in alternativa si utilizza una soluzione preparata diluendo i seguenti composti in 1L di acqua deionizzata sotto agitazione:

NaCl	26,4 g
KCl	0,84 g

CaCl ₂ *H ₂ O	1,67 g
MgCl* H ₂ O	4,6 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	5,58 g
NaHCO ₃	0,17 g
H ₃ BO ₃	0,03 g

La soluzione così preparata è utilizzabile entro 1-2 mesi, mantenuta al buio alla temperatura di 4 °C. Prima dell'utilizzo la soluzione deve essere portata a temperatura ambiente.

5.2.2.4.3 Apparecchiature

Si impiegano tutte le normali apparecchiature da laboratorio e in aggiunta:

- Microscopio stereoscopico;
- Incubatore alla temperatura di 25 °C;
- Sistema di illuminazione da 3000-4000 lux;

5.2.2.4.4 Procedimento

Il primo passaggio per l'esecuzione del saggio è la riattivazione delle cisti. Quest'ultima deve avvenire 48 h prima dell'inizio del test. A tal fine si versa in una piastra petri una quantità di cisti pari a 100 mg, si aggiungono 12 mL di soluzione salina. Una volta chiusa la piastra si pone per almeno il tempo di un'ora a 25 °C con una intensità luminosa di 3000-4000 lux. L'incubazione successiva avverrà alla stessa temperatura per una durata di 24 h al buio.

Il giorno successivo si porta il campione a temperatura ambiente, misurando sempre pH e salinità al fine di correggerne eventuali anomalie, e si procede alla preparazione delle diluzioni, in triplicato, dei campioni come riportato in tabella 32.

Tabella 32 Modalità preparazione diluizioni dei campioni.

Diluizioni	Acqua marina	Campione
	ml	
12,5	1,75	0,25
25	1,5	0,5
50	1	1
100	0	2

A questo punto si procede al trasferimento delle artemie dalla piastra petri all'interno dei pozzetti della piastra con i campioni. L'operazione si effettua al binoculare con una pipetta in plastica, avendo cura di cambiare pipetta al cambio di diluizione; per facilitare l'operazione utilizzare una fonte luminosa in posizione laterale per favorire l'aggregazione delle artemie.

Il numero totale di artemie in ogni pozzetto deve essere di 10.

La piastra a questo punto va coperta e posta in incubatore alla temperatura di 25 °C per 24-48 h; terminate le quali si collocherà la piastra allo stereomicroscopio al fine di distinguere e contare gli organismi mobili sul totale di larve presenti. Le larve sono considerate immobili se non presentano alcun tipo di movimento in 10 secondi di osservazione continua. La misurazione si ripete a 24-48-96 h.

5.2.2.5 Test di tossicità con *T. fulvus*

5.2.2.5.1 Principio del metodo

Il metodo (ISO 14669, 1991) si basa sulla valutazione della mortalità dei nauplii di *Tigriopus fulvus* nel corso della durata dell'esposizione compresa tra le 24 e le 96 h. L'endpoint valutato è la "median lethal concentration" LC50 definita a 24, 48 e 96 h.

5.2.2.5.2 Materiali e soluzioni

Organismo test

T. fulvus è un copepode arpacticoide dalla vasta distribuzione nell'ambiente mediterraneo; si riproduce in modo continuo durante tutto l'arco dell'anno. È di piccole dimensioni e presenta dimorfismo sessuale (figura 17).

Lo sviluppo passa attraverso sei stadi naupliari.

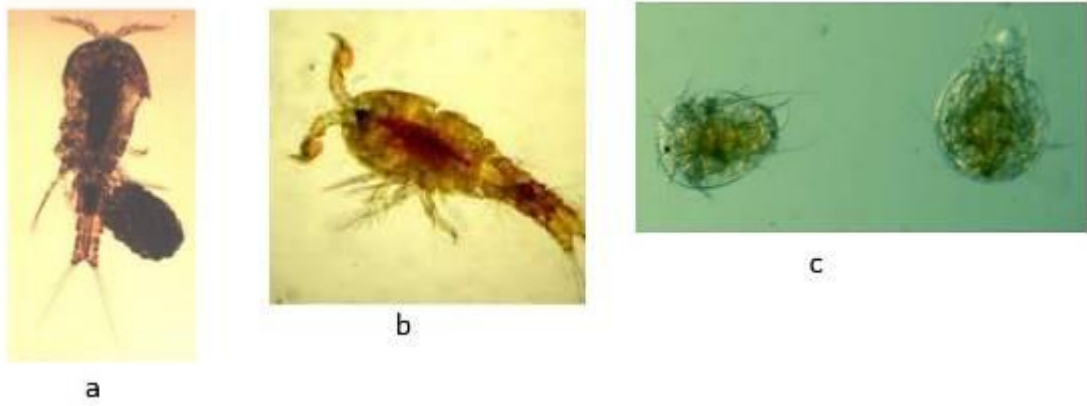


Figura 57 *T. fulvus*. a-femmina, b-maschio, c-nauplio.

Soluzioni

- Acqua marina sintetica Instant Ocean®;
- Soluzione di Cu⁺⁺ in HCl;
- Colorante Cristal-violetto.

5.2.2.5.3 Apparecchiature

Oltre alle normali apparecchiature da laboratorio è necessario l'impiego di:

- Ambiente termostato (incubatore, stanza o cella termostatica);
- pH-metro;
- Luxmetro;
- Salinometro;
- Ossimetro.

5.2.2.5.4 Procedimento

Test preliminare

Il saggio serve per determinare in modo approssimativo l' LC50, così da stimare il range di concentrazioni da impiegare per il test definitivo. Per far ciò il range di diluizioni che sarà utilizzato avrà un fattore di diluizione 10, con l'uso di almeno 5 organismi per diluizione. Devono essere utilizzate almeno 7 diluizioni.

Test definitivo

Lo scopo di questo test è determinare l'LC50 ai differenti periodi di esposizione. Il range di contrazioni è determinato sulla base dei risultati del test preliminare, utilizzando un fattore di diluizione minore con almeno 5 concentrazioni in triplicato e con 10 nauplii cadauna.

Entrambi i test precedenti vengono eseguiti seguendo questa procedura:

- Allestire le piastre con le varie concentrazioni dei campioni e del tossico di riferimento nei pozzetti da 3ml;
- Sotto il microscopio stereoscopico trasferire 10 nauplii in ogni pozzetto verificando il numero totale al termine dell'operazione;
- Al termine dell'allestimento del test misurare ph e ossigeno disciolto.
- I copepodì vanno posti alla temperatura di 20 °C e non devono essere alimentati durante il saggio;
- Effettuare la conta ogni 24-48-96 ore di nauplii sopravvissuti. Se sottoposti a stimolazione con la punta della pipetta non si riscontra alcun movimento per almeno 10 secondi l'organismo viene considerato morto;
- Per la stima dell'endpoint sub-letale (rilascio delle mute) si necessita di fissare ogni replica con il cristal-violetto (concentrazione 35-50 g/L) aggiungendone una goccia; le piastre vengono quindi coperte con carta argentata e lasciate per 24h nel frigo prima del conteggio.

6 RISULTATI

Per ogni saggio eseguito con le specie test *V. fischeri*, *P. tricornutum*, *C. gigas*, *M. galloprovincialis* e *A. franciscana* saranno evidenziati i risultati ottenuti per le matrici liscivate del singolo materiale; passando poi successivamente alla valutazione della tossicità, espressa in Toxic Unit (TU), per ogni campione preso singolarmente e diviso per temperatura di lisciviazione 20 °C per 24 h e 30 °C per 24 h.

6.1 Test con *Vibrio fischeri*

I risultati del saggio su *V. fischeri* sono divisi per le due temperature a cui è stato prodotto il lisciviato, 20 °C e 30 °C.

Nei grafici (Figure 18, 20) è stata confrontata la bioluminescenza dei campioni (A, B, C) con quella del controllo e del bianco procedurale ai vari intervalli di misurazione (5 - 10 - 30 minuti). In ulteriori grafici (Figure 19, 21) è stata confrontata la percentuale di effetto dei lisciviati sui campioni (A, B, C) e sul bianco procedurale ai vari intervalli di misurazione (5 - 10 - 30 minuti).

Stessi grafici sono stati eseguiti anche per il tossico di riferimento dove è evidenziata la bioluminescenza per le varie concentrazioni (Figura 22) e la percentuale di effetto a 5 e 10 minuti alle singole concentrazioni (Figura 23).

- 20 °C 24 h;

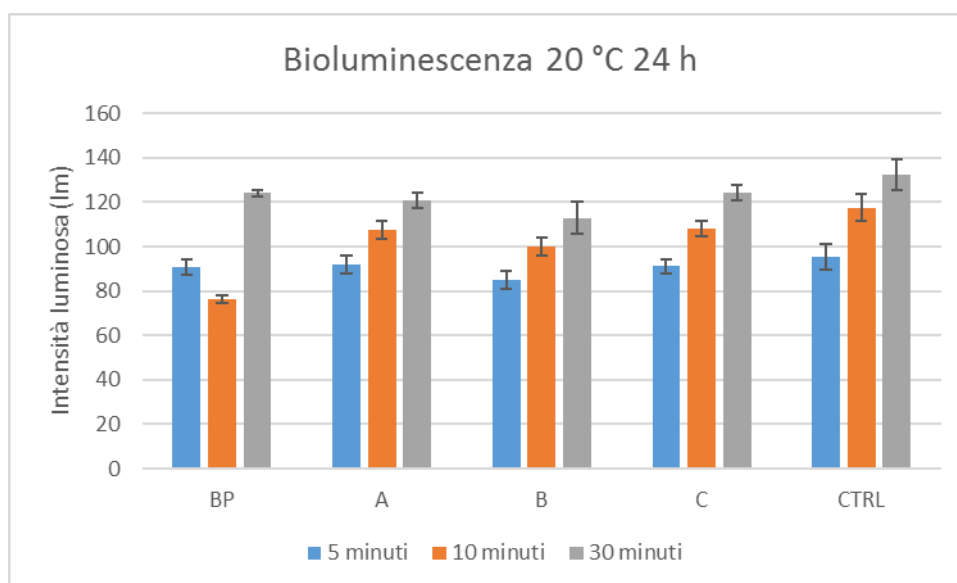


Figura 18 Bioluminescenza dei lisciviati a 20 °C per 24 h. Col colore blu si indicano le misurazioni a 5 minuti, col rosso a 10 minuti e con il grigio a 30 minuti.

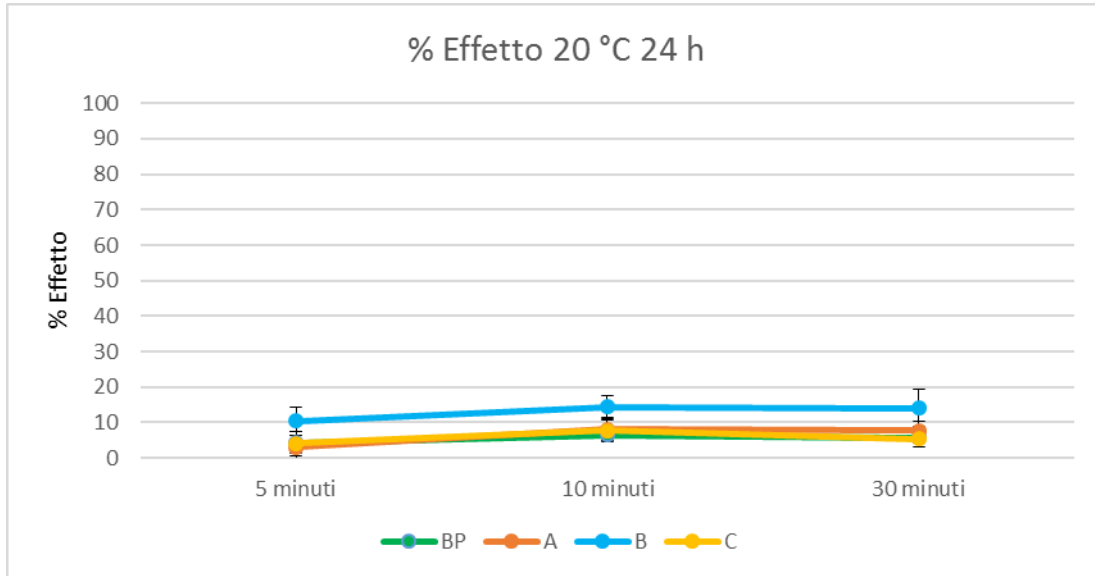


Figura 19 Percentuale di effetto dei lisciviati a 20 °C per 24 h. Il color verde indica il bianco procedurale, il rosso il campione A, l'azzurro il campione B e il giallo il campione C.

- 30 °C 24 h;

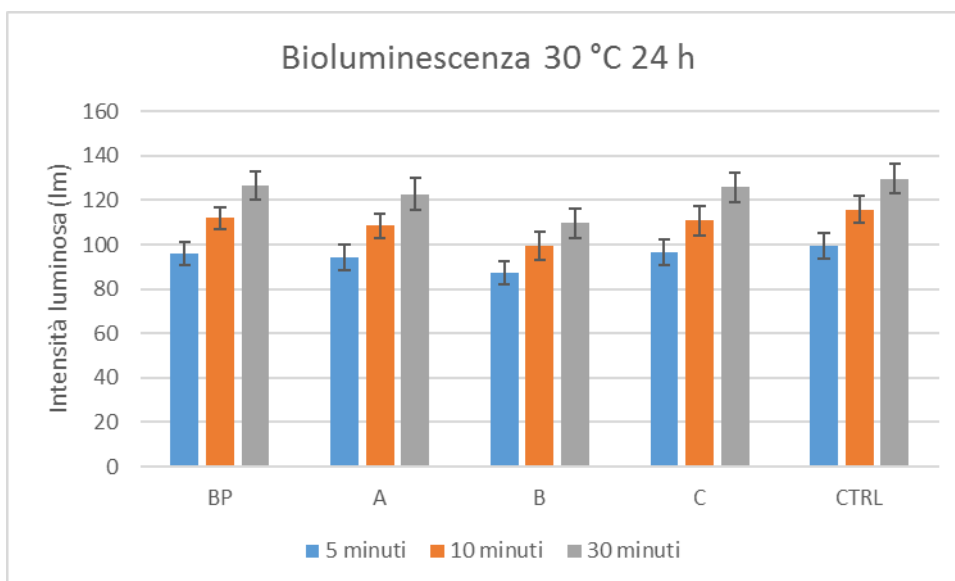


Figura 20 Bioluminescenza dei lisciviati a 30 °C per 24 h. Col colore blu si indicano le misurazioni a 5 minuti, col rosso a 10 minuti e con il grigio a 30 minuti.

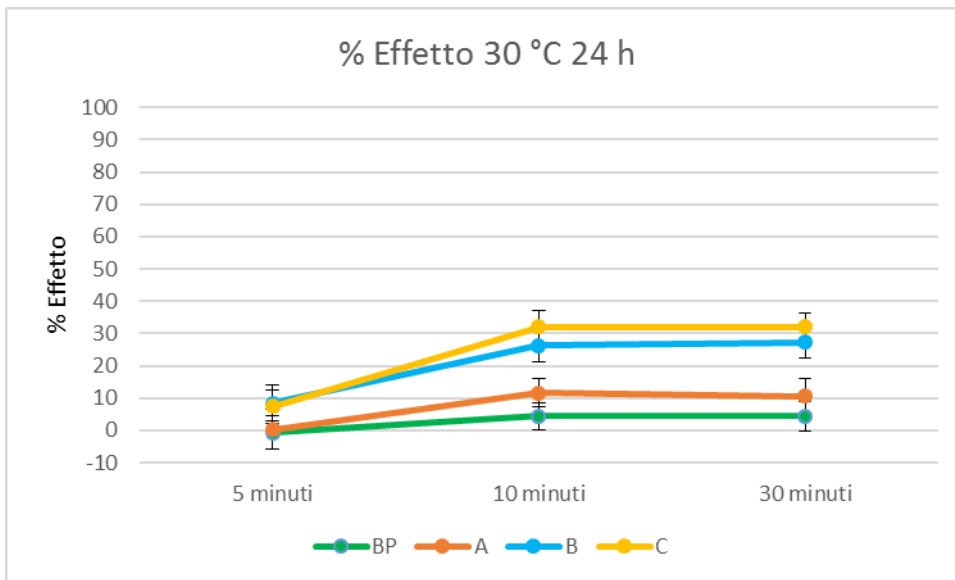


Figura 21 Percentuale di effetto dei lisciviati a 30 °C per 24 h. Il color verde indica il bianco procedurale, il rosso il campione A, l'azzurro il campione B e il giallo il campione C.

- ZnSO₄

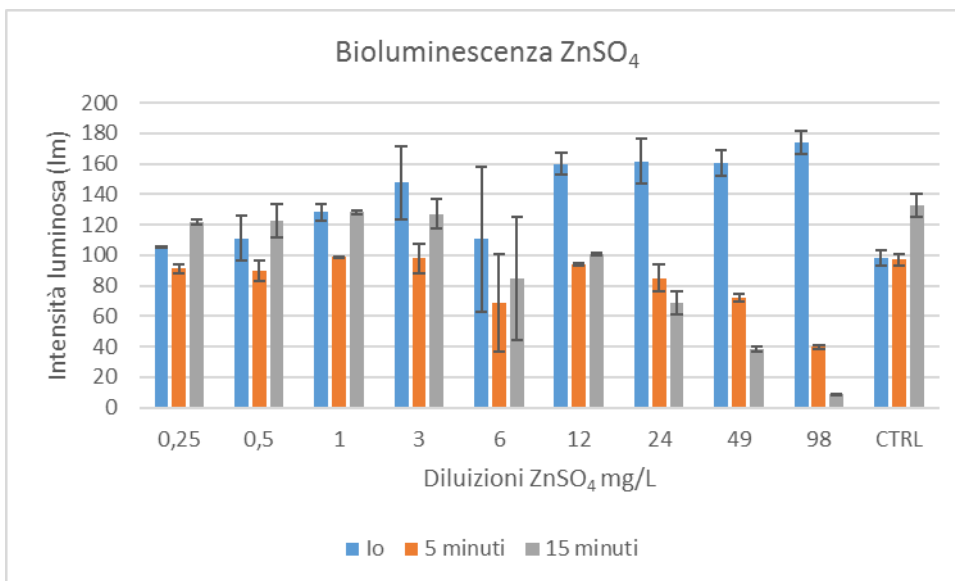


Figura 22 Bioluminescenza di ZnSO₄ (tossico di riferimento). Col colore blu si indica la misurazione al momento Io, col colore rosso a 5 minuti e col colore grigio a 15 minuti.

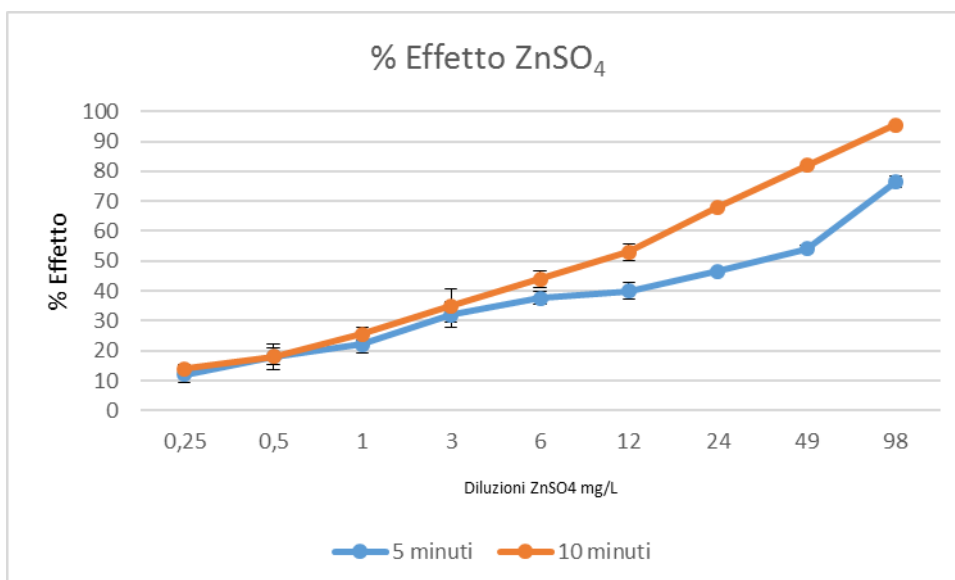


Figura 23 Percentuale di effetto di ZnSO₄. Col colore blu si indicano le misurazioni a 5 minuti, col colore rosso quelle a 10 minuti.

6.2 Test con *Phaeodactylum tricornutum*

Il grafico (Figura 24) eseguito per il test su *P. tricornutum* rappresenta l'assorbanza dei campioni (A, B, C) e del bianco procedurale alle due temperature di lisciviazione 20 °C e 30 °C.

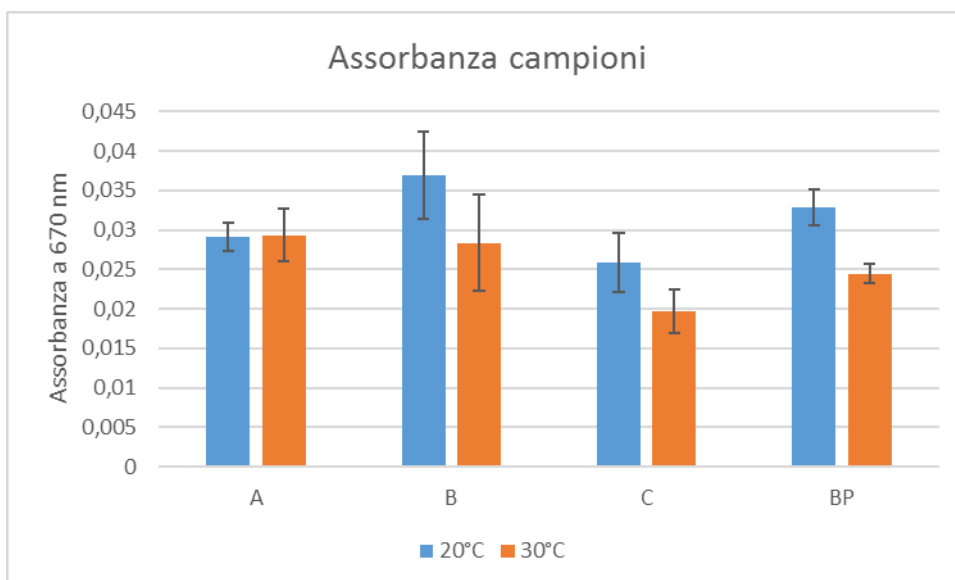


Figura 24 Assorbanza dei campioni alle due temperature di lisciviazione. Col colore blu si indicano i campioni a 20 °C e col colore rosso a 30 °C.

Dall'assorbanza è stata stimata la concentrazione delle cellule algali (Figura 25).

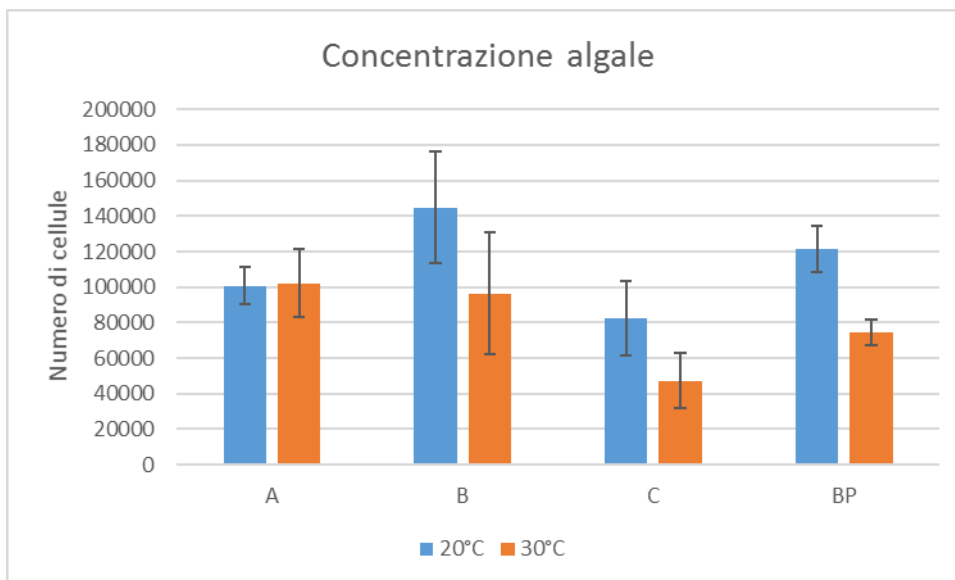


Figura 25 Concentrazione delle cellule algali nei campioni alle due temperature di lisciviazione. Col colore blu si indicano i campioni a 20 °C e col colore rosso quelli a 30 °C.

Dalla concertazione algale è stato possibile, attraverso l'equazione 1:

$$m = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

Equazione 1

t_0	Tempo di inizio test
t_L	Tempo di fine test
x_0	Densità delle cellule iniziale
x_L	Denistà di cellule al tempo t_L

ottenere il tasso di crescita (1/day), che è stato poi normalizzato con il controllo negativo (I_{mi}) (Figure 26, 27) con l'equazione 2:

$$I_{mi} = \frac{m_c - m_i}{m_c} \cdot 100$$

Equazione 2

μ_c	Media del tasso di crescita del controllo negativo
---------	---

μ_i | Tasso di crescita di quella particolare replica

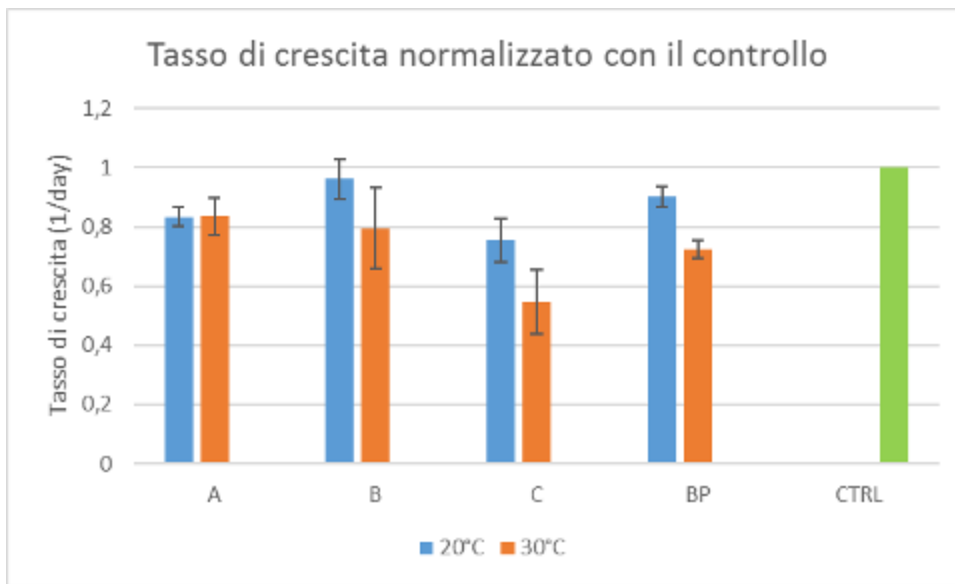


Figura 26 Tasso di crescita 1/day normalizzato con il controllo. Col colore blu si indicano i campioni a 20 °C, col colore rosso quelli a 30 °C e col verde il controllo.

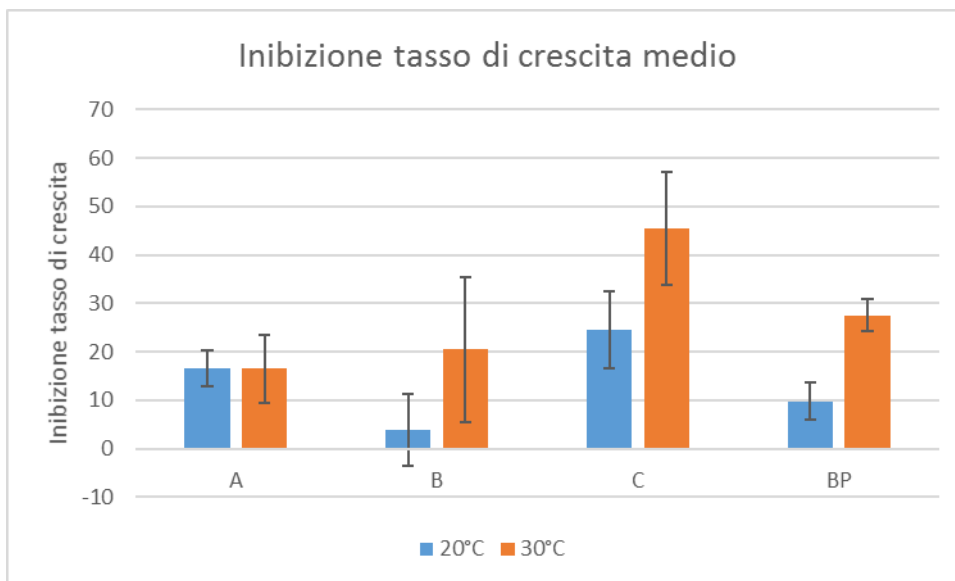


Figura 27 Tasso di inibizione di crescita medio. Col colore blu si indicano i campioni a 20 °C e col colore rosso quelli a 30 °C.

Il tasso di crescita medio così ottenuto è stato corretto con il bianco procedurale. (Figura 28)

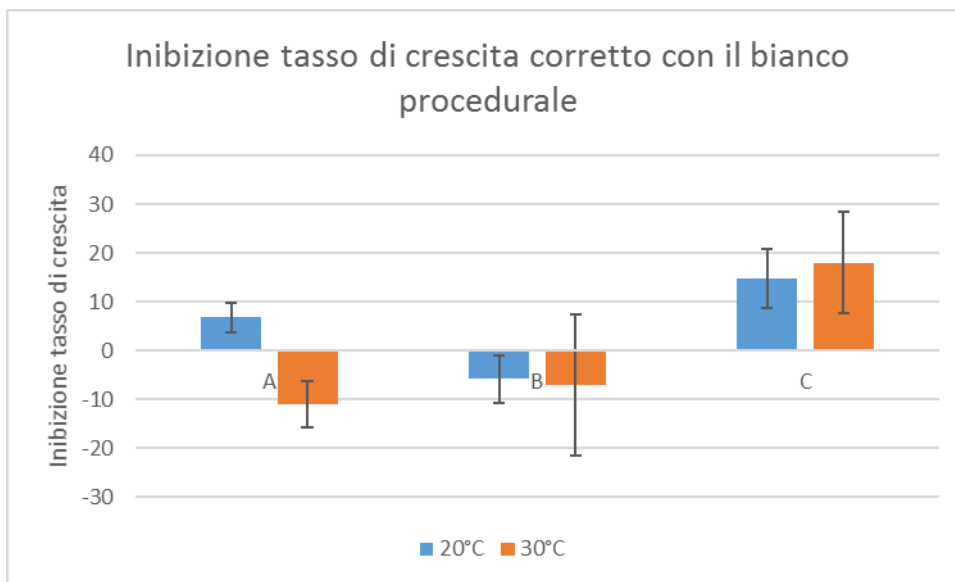


Figura 28 Tasso di inibizione della crescita corretto con il bianco procedurale. Col colore blu si indicano i campioni a 20 °C e col colore rosso a 30 °C.

6.3 Test con *Crassostrea gigas*

Nel saggio su *C. gigas* si andava a valutare l'embriotossicità dei lisciviati considerando 100 organismi testati. I grafici rappresentano, per i vari campioni (A, B, C) la percentuale di larve normo formate, precoci e malformate sul totale. Inoltre è stata messa in relazione la percentuale di effetto, considerata come larve precoci e malformate sulle 100 contate, con la concentrazione del campione, così da avere una curva concentrazione-risposta.

I grafici sono divisi per le due temperature di lisciviazione 20 °C e 3 °C.

- 20 °C 24 h;

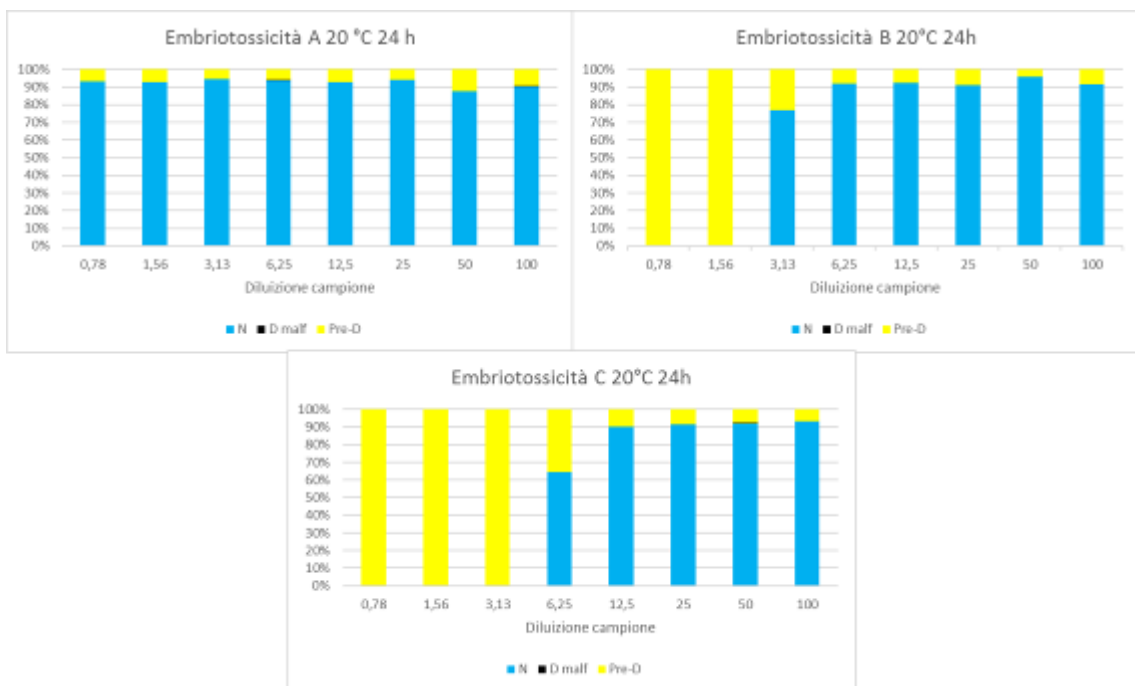


Figura 29 Embriotossicità di A, B, C (20 °C 24 h). Col colore azzurro sono indicate le larve normo formate, col nero le malformate e col giallo le larve trocofore.

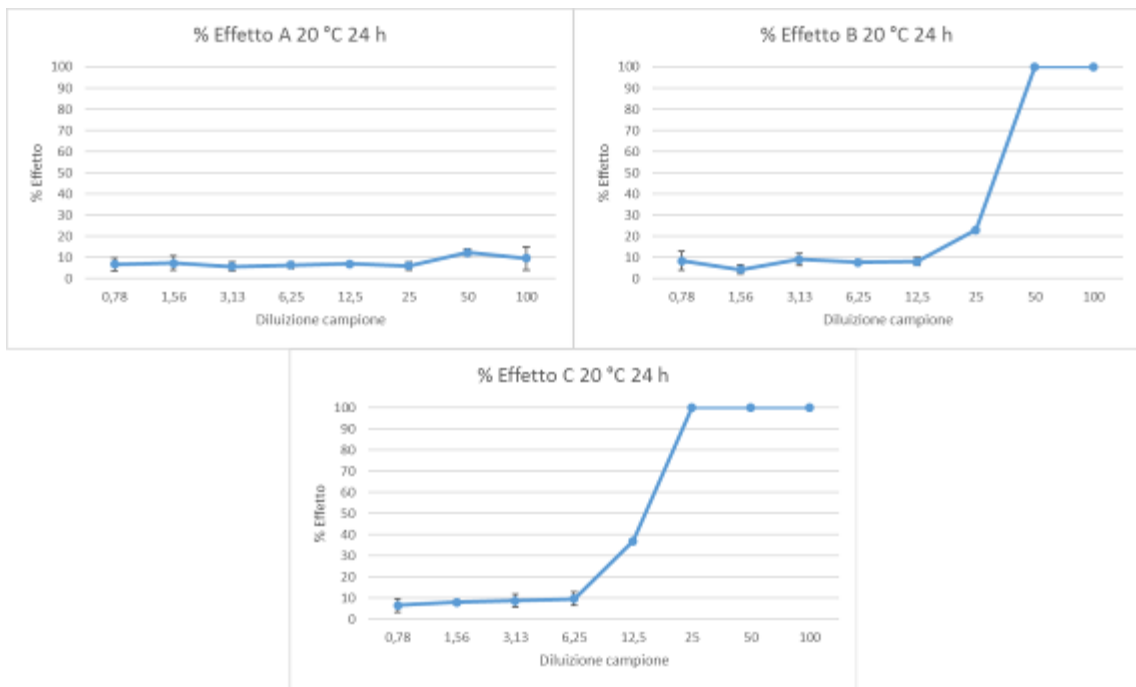


Figura 30 Percentuale di effetto di A, B, C (20 °C 24 h).

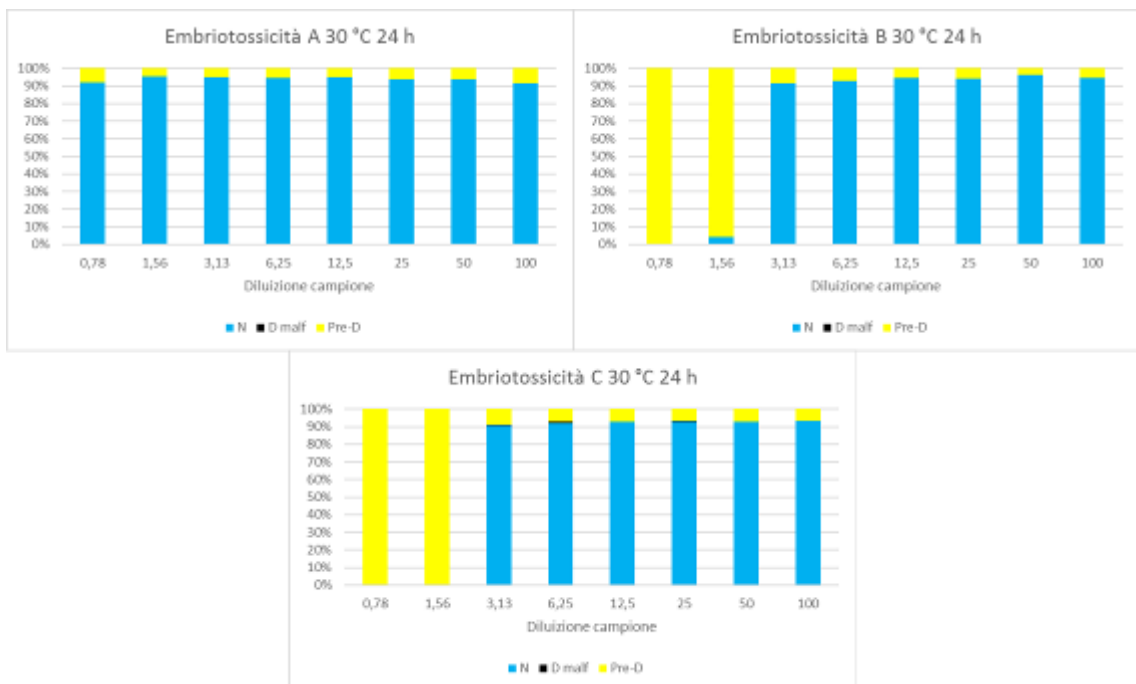


Figura 31 Embriotossicità di A, B, C (20 °C 24 h). Col colore azzurro sono indicate le larve normo formate, col nero le malformate e col giallo le larve trocofore.

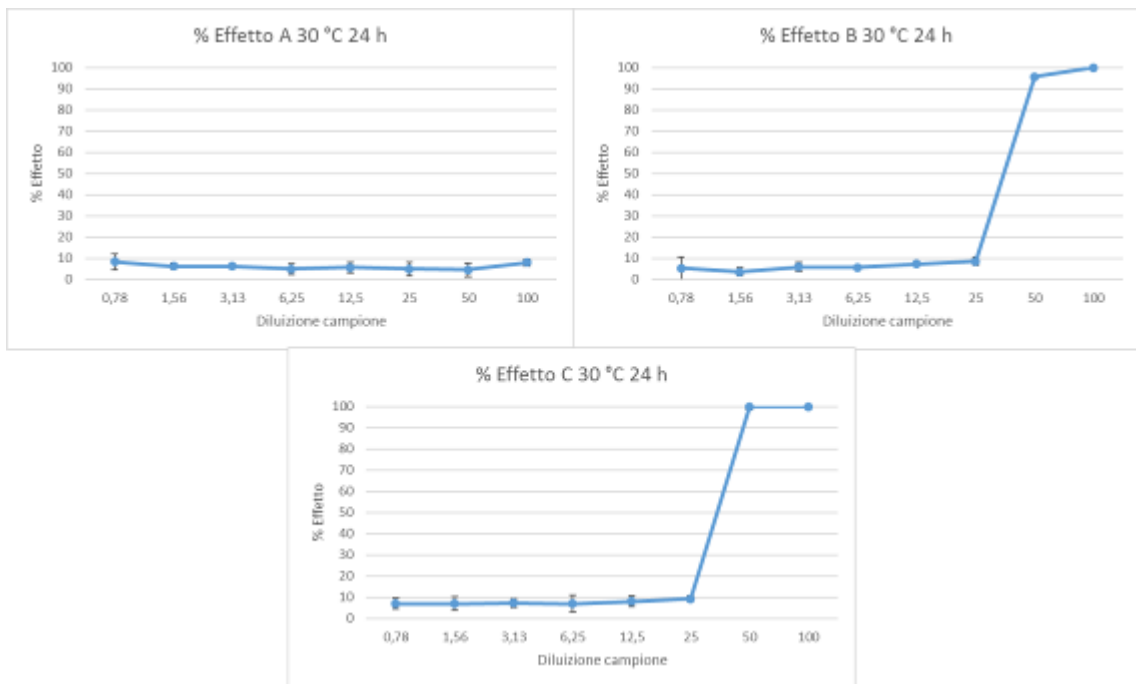


Figura 32 Percentuale di effetto di A, B, C (30 °C 24 h).

Gli stessi grafici sono stati fatti con i dati ottenuti dal tossico di riferimento Cu^{2+} .
(Figura 33, 34)

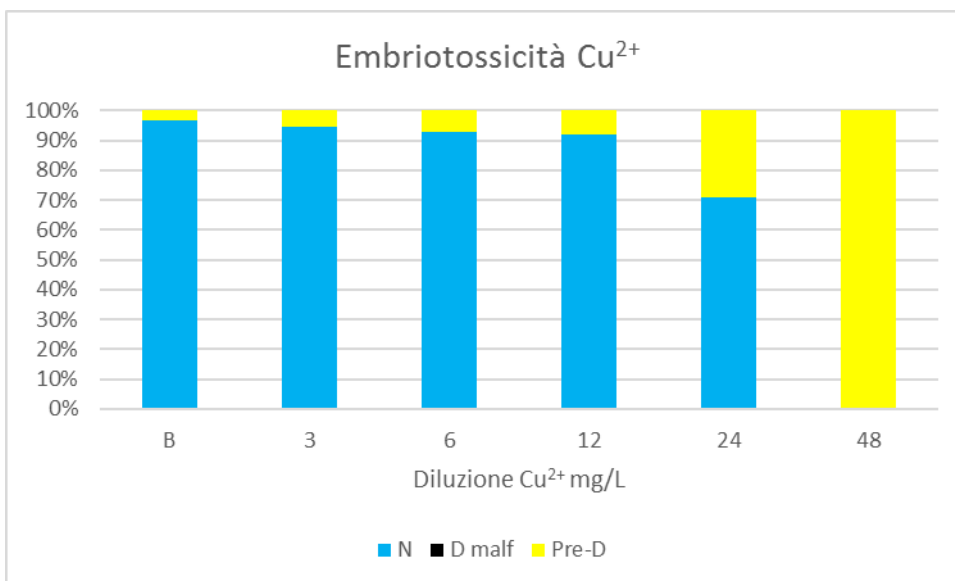


Figura 33 Embriotossicità di Cu^{2+} . Col colore azzurro sono indicate le larve normo formate, col nero le malformate e col giallo le larve trocofore.

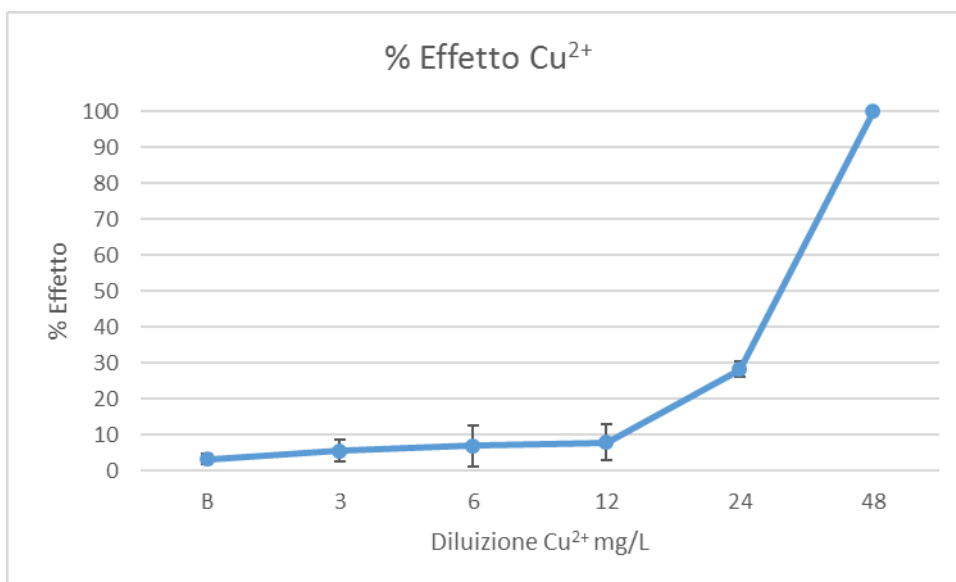


Figura 34 Percentuale di effetto di Cu^{2+} .

6.4 Test con *Mytilus galloprovincialis*

Il test su *M. galloprovincialis* valuta, come nel test con *C. gigas*, l'embriotossicità del lisciviato dei campioni. Essendo due test in cui l'endpoint è lo stesso sono stati fatti grafici dello stesso tipo. Quindi uno dove si valuta la composizione in percentuale di larve normo formate, precoci e malformate sul totale, un secondo nel quale si valuta la percentuale di effetto, considerato come larve precoci e malformate sulle 100 contate, dei lisciviati così da ottenere una curva concentrazione-risposta. I grafici sono divisi per le due temperature di lisciviazione, 20 °C e 30 °C.

- 20 °C 24 h;



Figura 35 Embriotossicità di A, B, C (20 °C 24 h). Col colore azzurro sono indicate le larve normo formate, col nero le malformate e col giallo le larve trocofore.

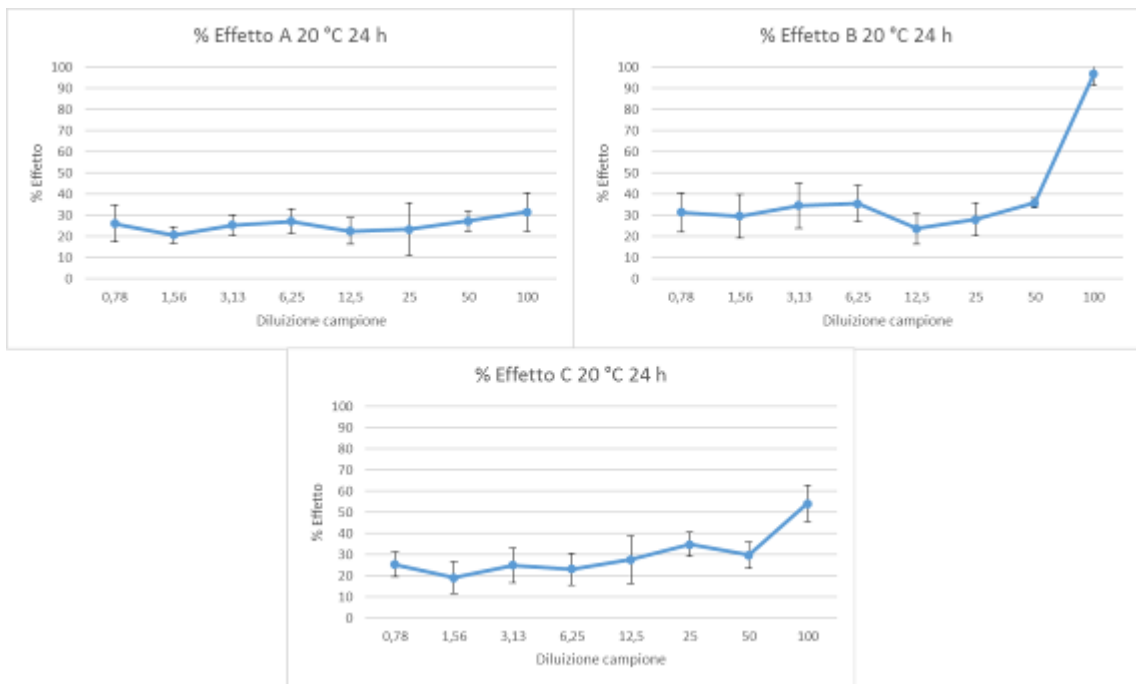


Figura 36 Percentuale di effetto di A, B, C (20 °C 24 h).

- 30 °C 24 h;

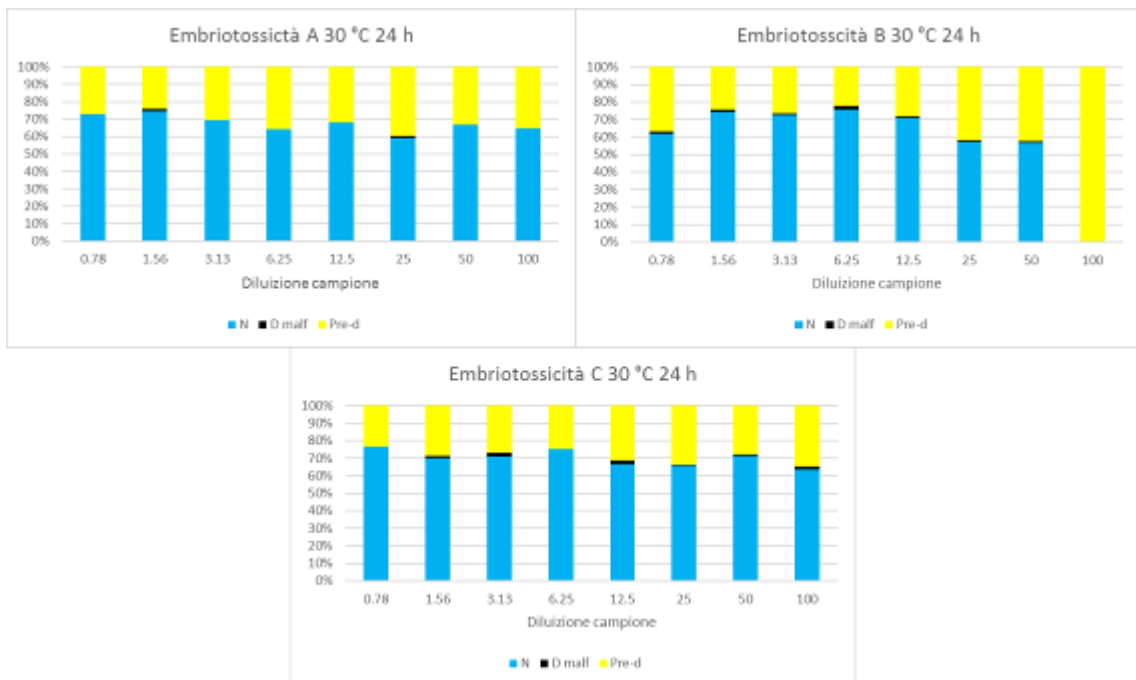


Figura 37 Embriotossicità di A, B, C (20 °C 24 h). Col colore azzurro sono indicate le larve normo formate, col nero le malformate e col giallo le larve trocofore.

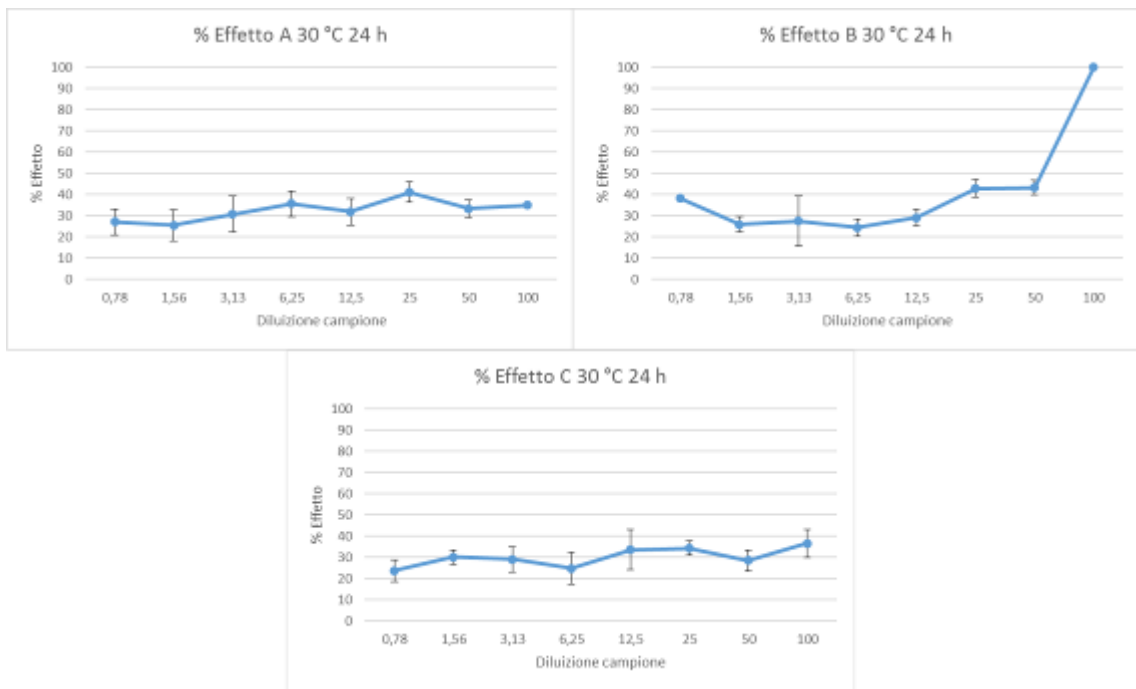


Figura 38 Percentuale di effetto di A, B, C (30 °C 24 h).

Gli stessi grafici sono stati fatti con i dati ottenuti dal tossico di riferimento Cu^{2+} .
(Figura 39, 40)

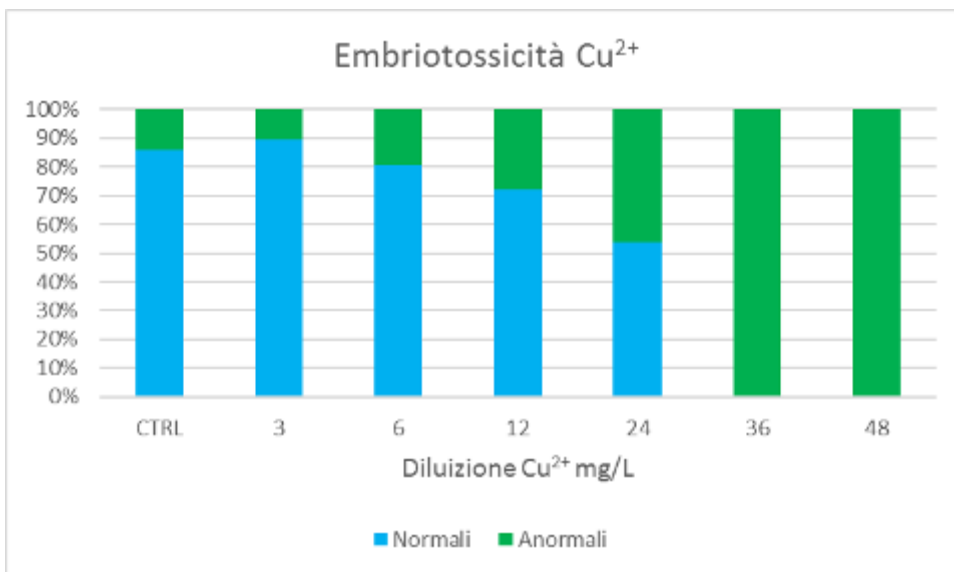


Figura 39 Embriotossicità di Cu^{2+} . Col colore azzurro sono indicare le larve normoformate, con il colore verde le larve anomale (Pre-d e malformate).

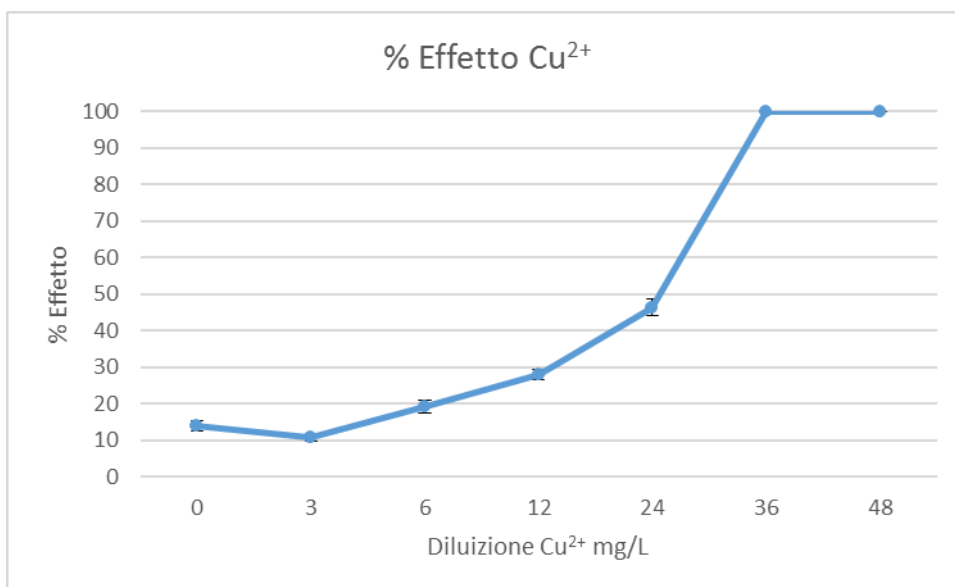


Figura 40 Percentuale di effetto di Cu²⁺.

6.5 Test con *Artemia franciscana*

Nel saggio su *A. franciscana* l'endpoint valutato è l'immobilità degli organismi. I grafici rappresentano, per le varie diluizioni dei campioni, la percentuale di organismi immobili e mobili per le tre letture effettuate a 24 - 48 - 96 ore.

I grafici sono divisi per le due temperature di lisciviazione 20 °C e 30 °C.

- 20 °C 24 h;

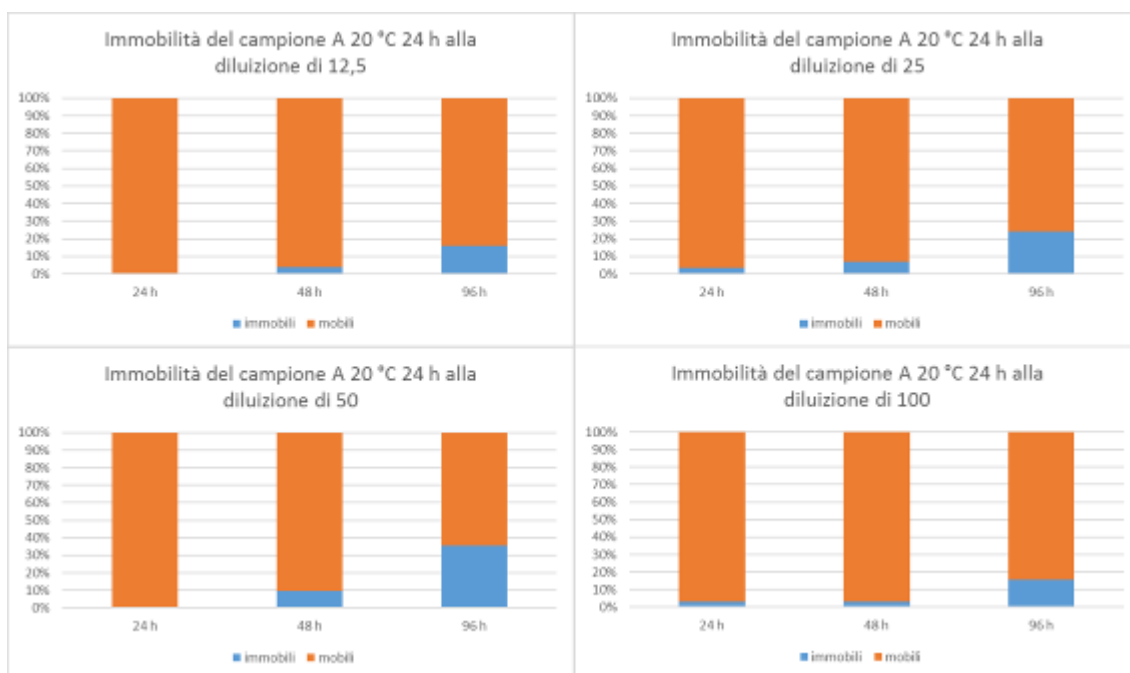


Figura 41 Immobilità (%) per il campione A 20 °C 24 h. Col colore blu sono evidenziati gli organismi immobili, con il colore rosso quelli mobili.

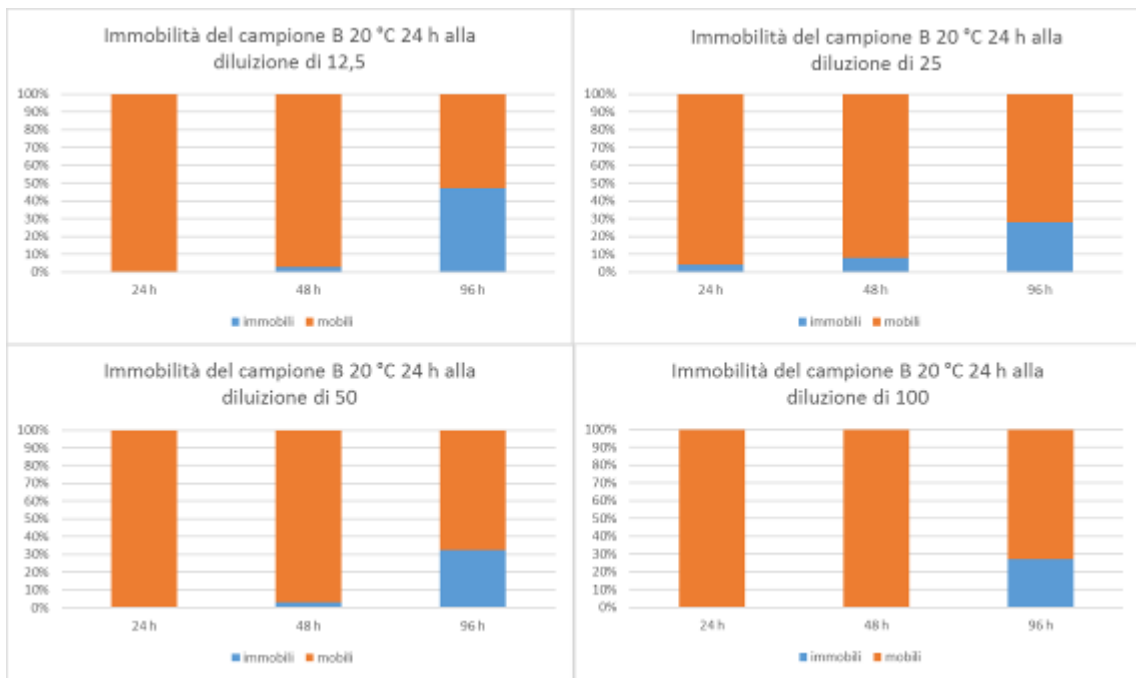


Figura 42 Immobilità (%) per il campione B 20 °C 24 h. Col colore blu sono evidenziati gli organismi immobili, con il colore rosso quelli mobili.

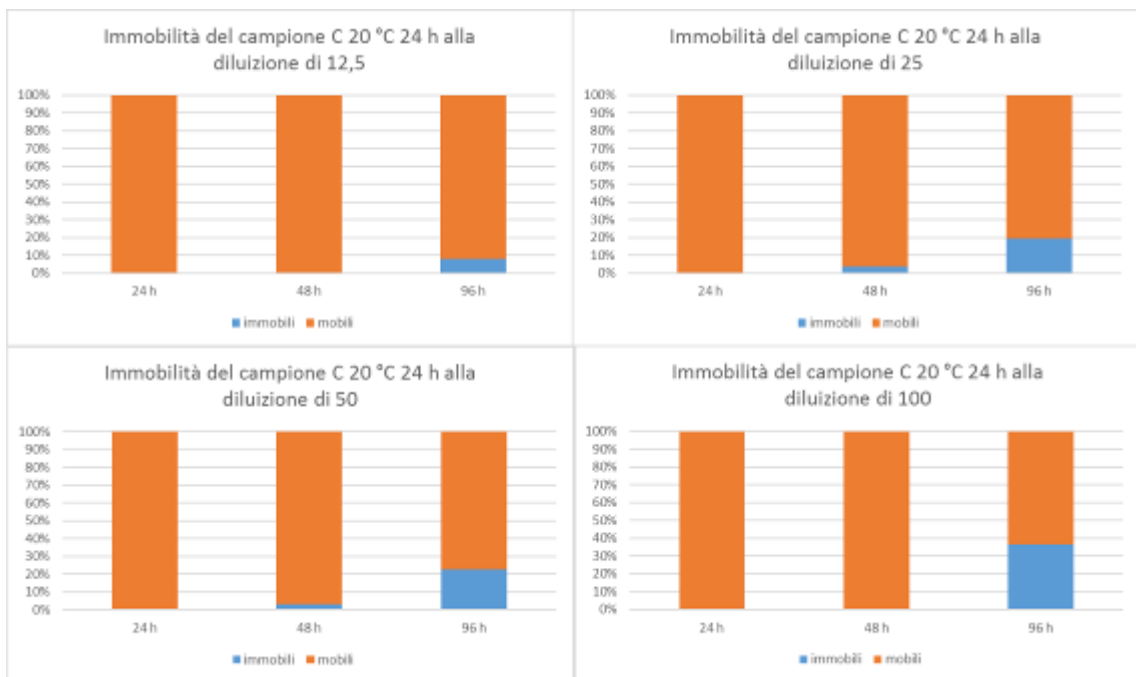


Figura 43 Immobilità (%) per il campione C 20 °C 24 h. Col colore blu sono evidenziati gli organismi immobili, con il colore rosso quelli mobili.

Un ulteriore grafico riassuntivo del numero di organismi illustra la situazione generale e permette di confrontare tra loro i vari campioni. (Figura 44)

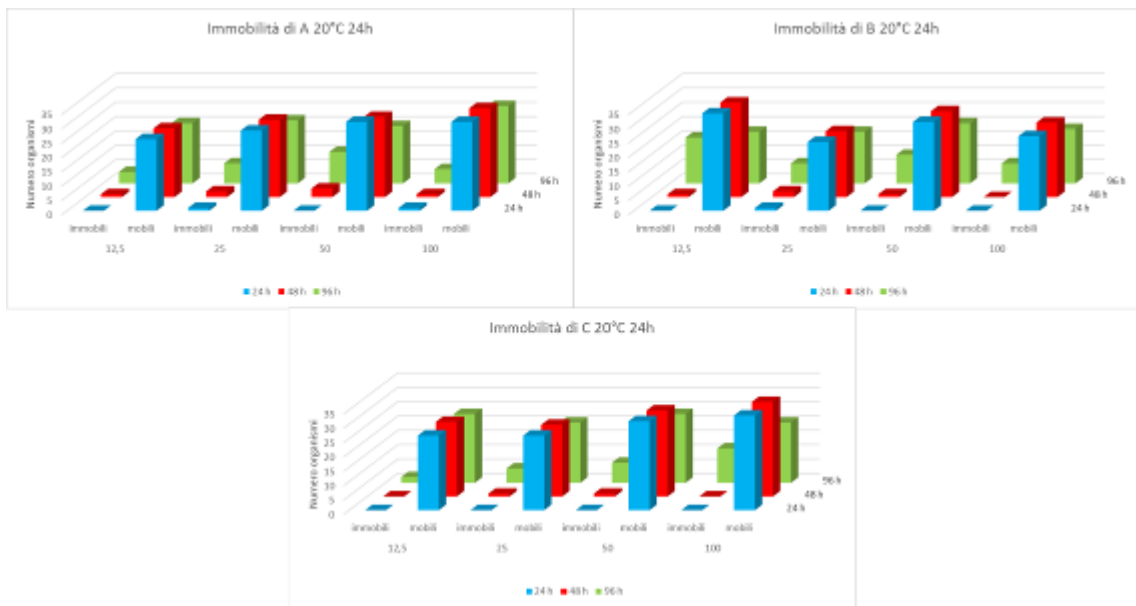


Figura 6 Immobilità (%) per i campioni A, B, C (20 °C 24 h). Col colore azzurro sono indicati i valori a 24 ore, con il rosso a 48 ore e con il verde a 96 ore.

- 30 °C 24 h;

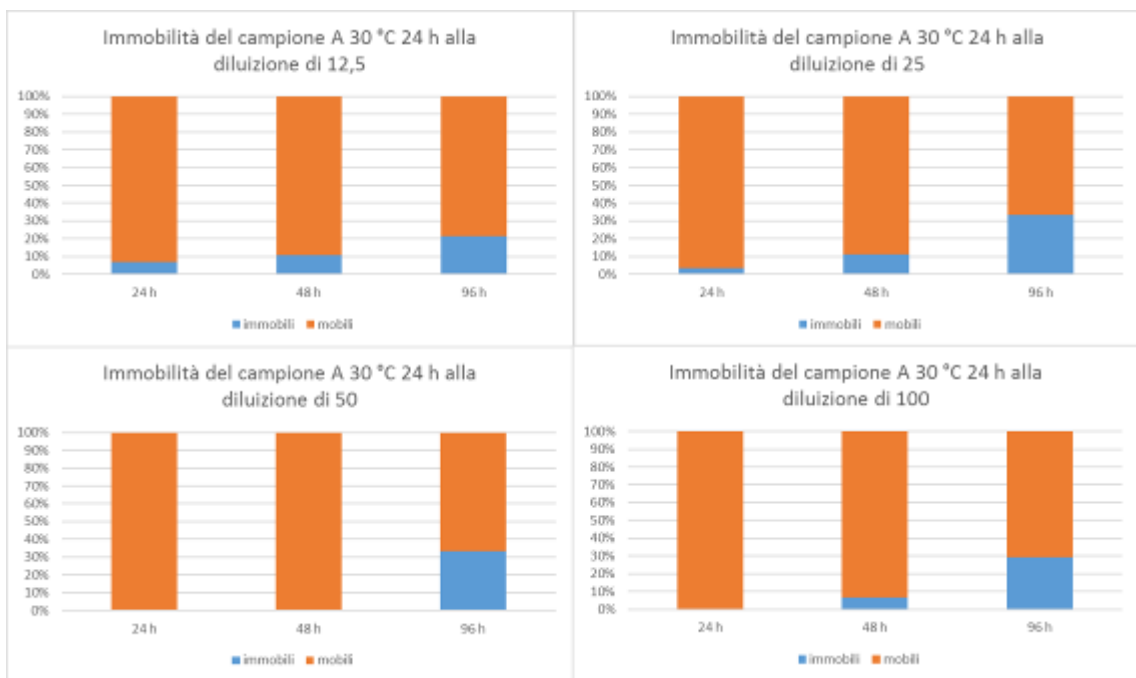


Figura 45 Immobilità (%) per il campione A 30 °C 24 h. Col colore blu sono evidenziati gli organismi immobili, con il colore rosso quelli mobili.

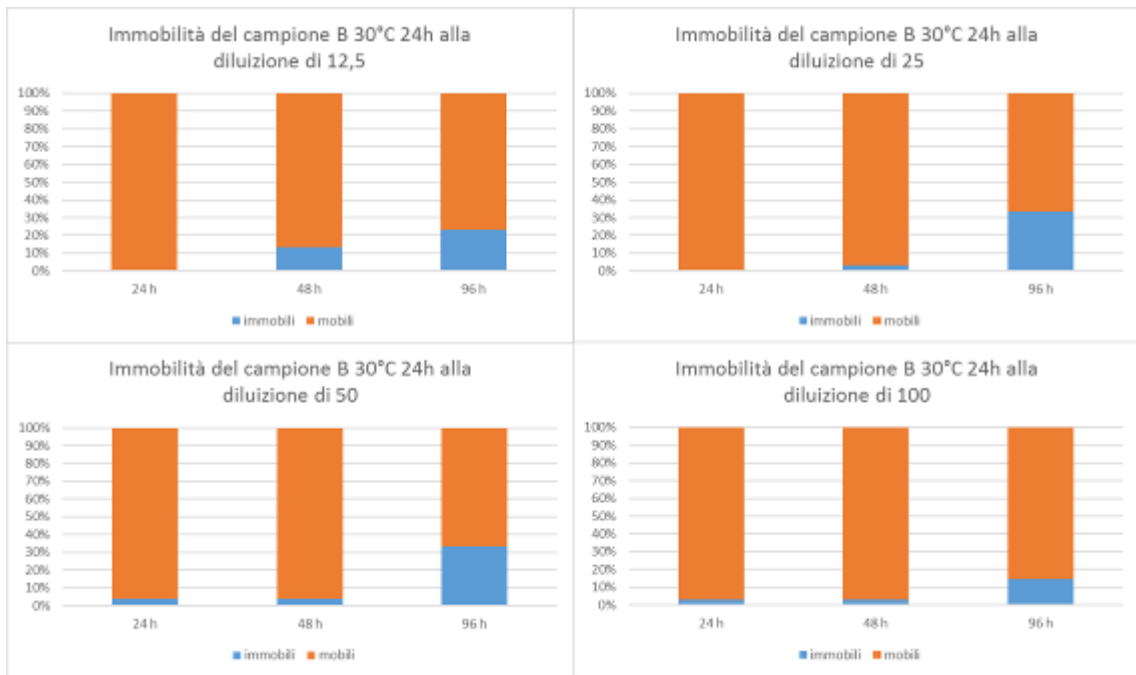


Figura 46 Immobilità (%) per il campione B 30 °C 24 h. Col colore blu sono evidenziati gli organismi immobili, con il colore rosso quelli mobili.

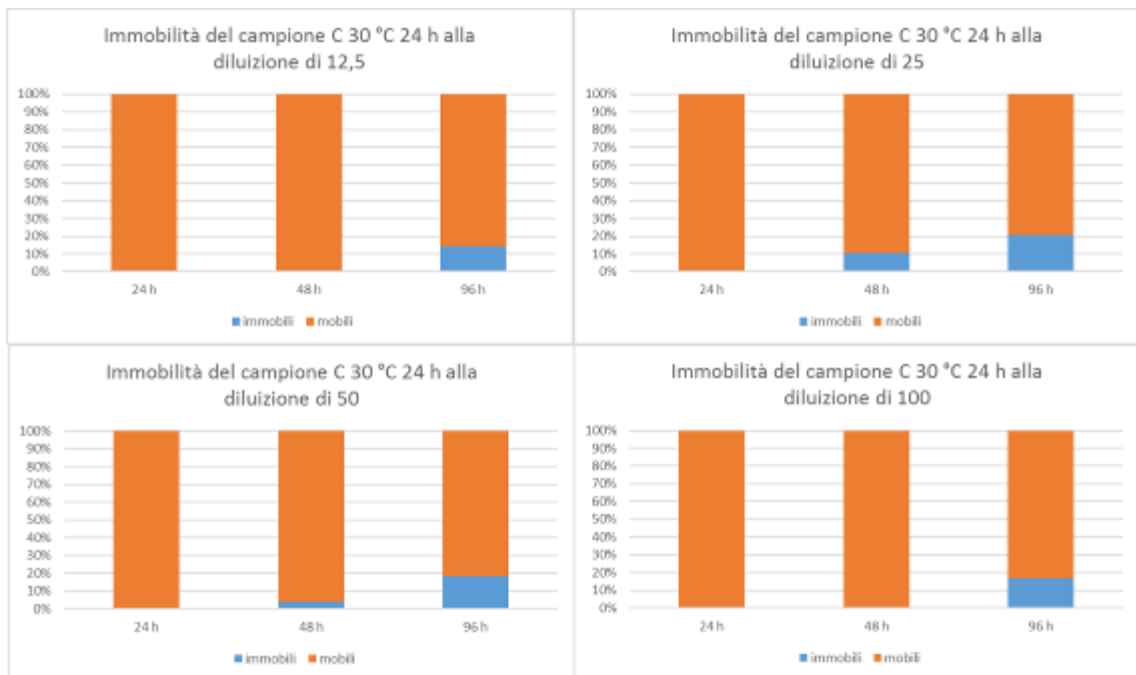


Figura 47 Immobilità (%) per il campione C 30 °C 24 h. Col colore blu sono evidenziati gli organismi immobili, con il colore rosso quelli mobili.

Un ulteriore grafico riassuntivo del numero di organismi illustra la situazione generale e permette di confrontare tra loro i vari campioni. (Figura 48)

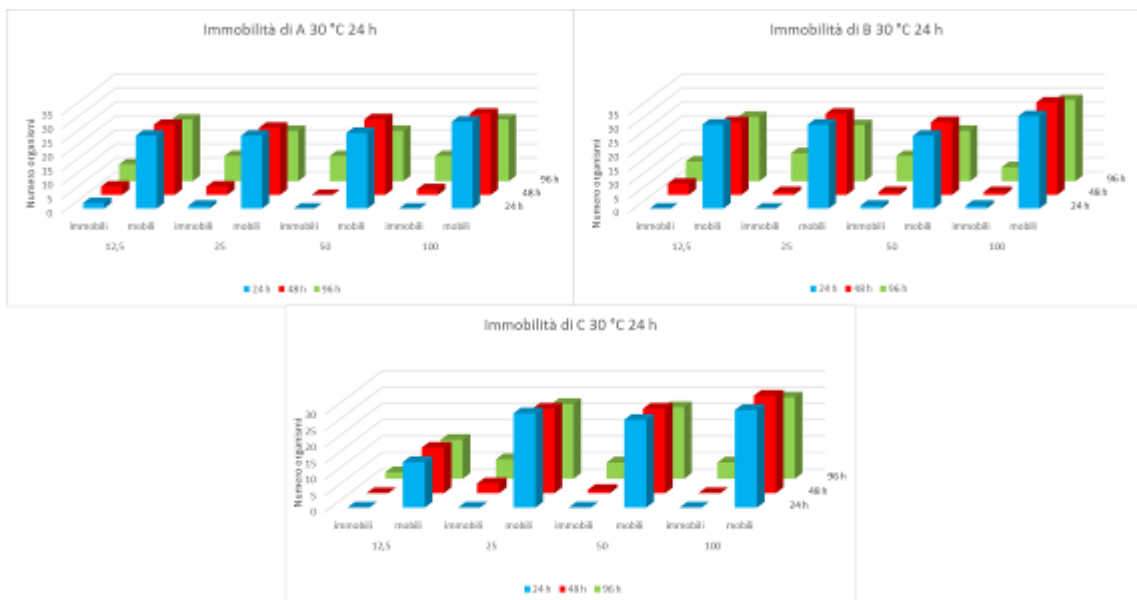


Figura 48 Immobilità (%) per i campioni A, B, C (30 °C 24 h). Col colore azzurro sono indicati i valori a 24 ore, con il rosso a 48 ore e con il verde a 96 ore.

I grafici seguenti (Figura 49) evidenziano la percentuale di effetto, considerata come organismi immobili, per i campioni A, B, C alle due temperature di lisciviazione 20 °C e 30 °C.

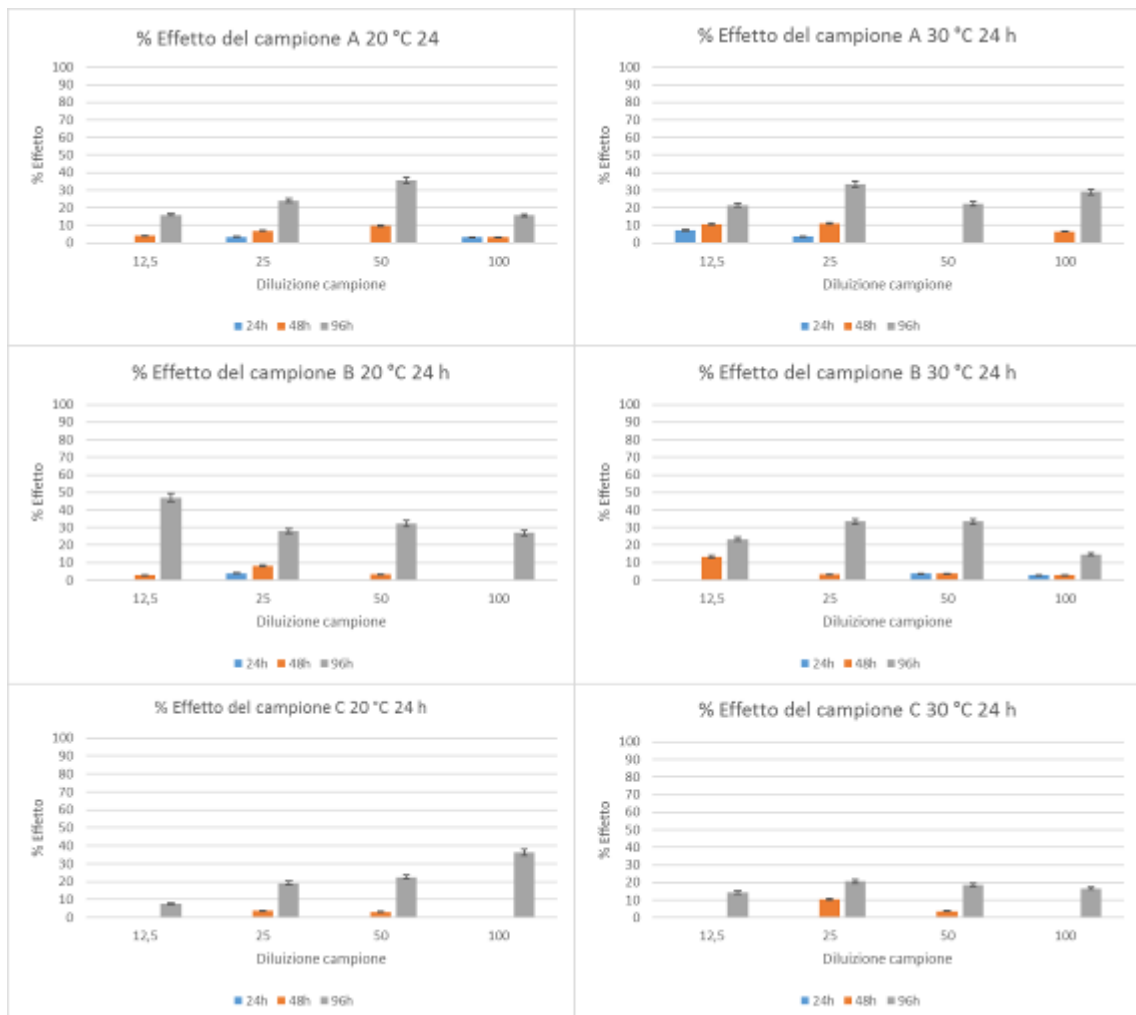


Figura 49 Percentuale di effetto per i campioni A, B, C a 20 °C 24 h e 30 °C 24 h. Con il colore azzurro è indicata la misurazione a 24 ore, con l'arancione è indicata la misurazione a 48 ore, con il grigio la misurazione a 96 ore.

6.6 Test con *Tigriopus fulvus*

Nel saggio con *T. fulvus* si va a valutare la mortalità. Nel grafico (Figura 50) viene evidenziata la mortalità percentuale dei tre campioni A, B, C agli intervalli di misurazione di 24 - 48 - 72 ore.

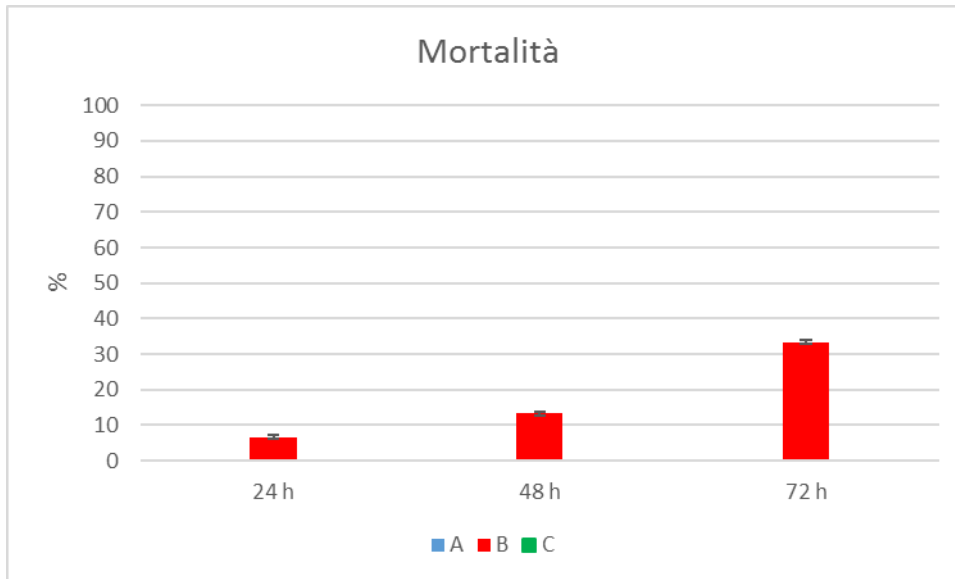


Figura 50 Mortalità (%) per i campioni A, B, C. Test *T. fulvus*. Con il colore azzurro è indicato il campione A, con il rosso il campione B e con il verde il campione C.

6.7 Valutazione della tossicità

I dati dei test di tossicità sono forniti in Unità di Tossicità o Toxic Unit (TU). I risultati sono elencati per materiale e suddivisi per temperatura e tempo di lisciviazione (20 °C e 24 h e 30 °C e 24 h).

6.7.1 Bianco procedurale

I saggi eseguiti sui bianchi procedurali (BP) a 20 °C (Figura 51) e 30 °C (Figura 52) denotano, in entrambi i casi, nessun superamento dei livelli soglia (Tabella 1).

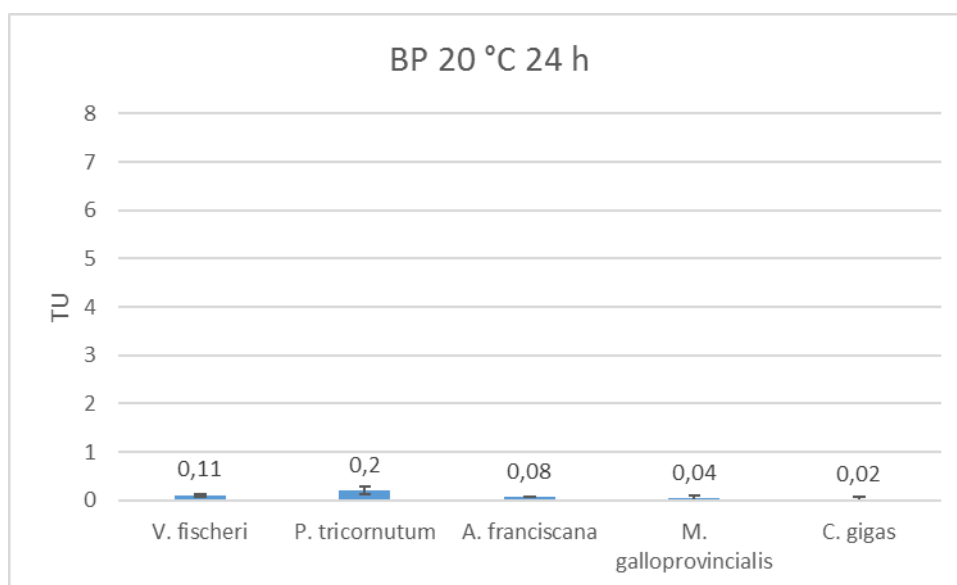


Figura 51 Tossicità del lisciviato BP a 20 °C e 24 h espressa in toxic unit (TU).

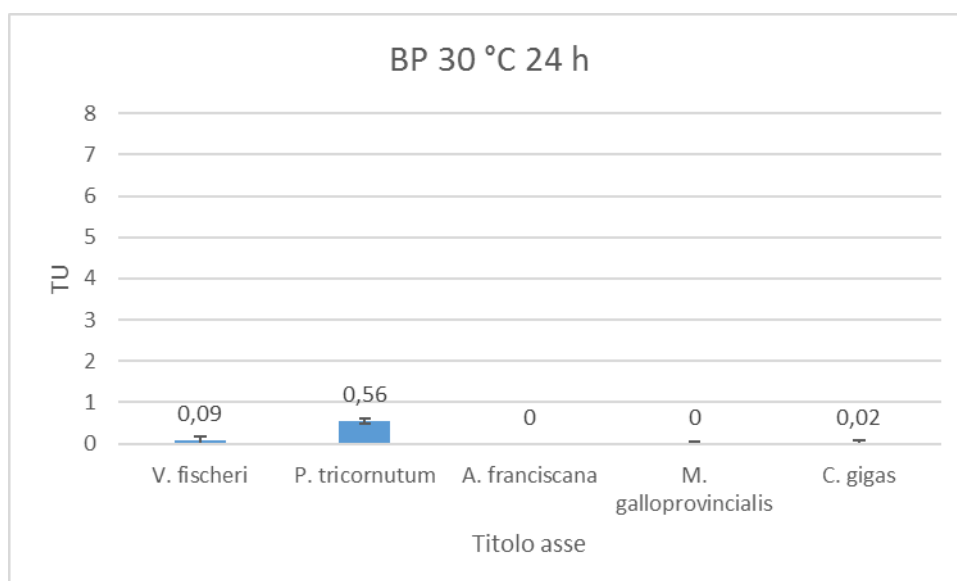


Figura 52 Tossicità del lisciviato BP a 30 °C e 24 h espressa in toxic unit (TU)..

6.7.2 Campione A

I test eseguiti sul lisciviato del campione A non denotano il superamento dei livelli soglia (Tabella 1) sia a 20 °C e 24 h di esposizione (Figura 53) sia a 30 °C e 24 h di (Figura 54).

Il test su *T. fulvus* ha evidenziato una tossicità pari a 0 TU.

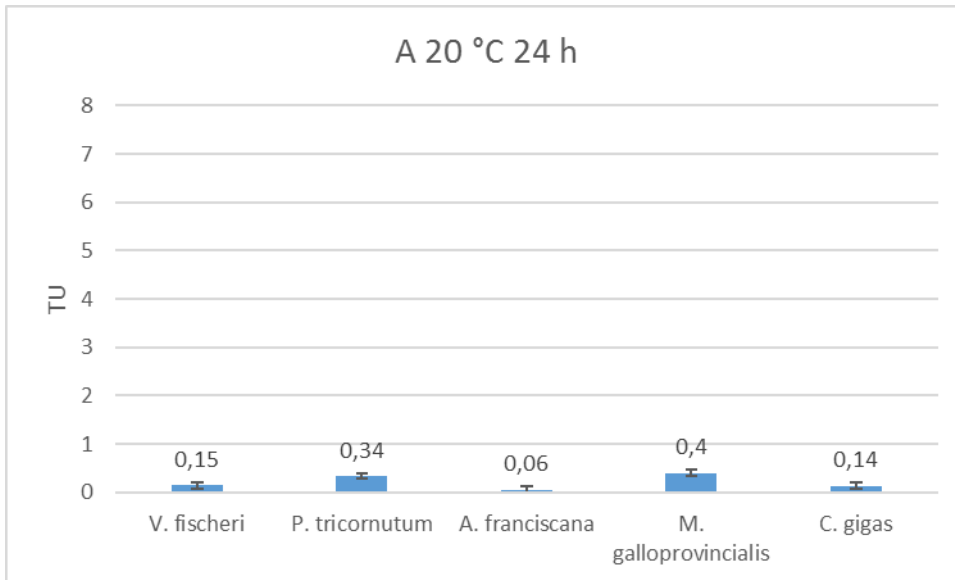


Figura 53 Tossicità lisciviato campione A a 20 °C e 24 h espressa in TU.

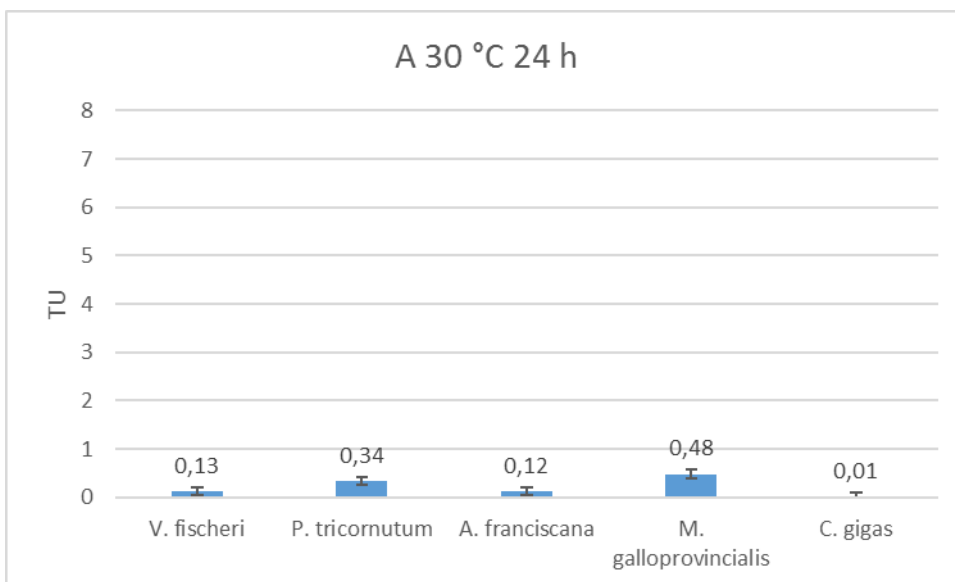


Figura 54 Tossicità lisciviato campione A a 30 °C e 24 h espressa in TU.

6.7.3 Campione B

I risultati dei saggi sul lisciviato del campione B prodotti a 20 °C per 24 h (Figura 55) e 30 °C per 24 h (Figura 56) evidenziano il superamento di alcuni livelli soglia come da tabella 1.

Specie test	Risultato (TU)	Limite soglia (TU)
20 °C 24 h		0,60
<i>M. galloprovincialis</i>	1,72	
<i>C. gigas</i>	3,33	
30 °C 24 h		
<i>M. galloprovincialis</i>	2,22	
<i>C. gigas</i>	3,13	

I test con i bivalvi, anche se normalizzati con il bianco procedurale, risultano oltre il limite soglia denotando una criticità per gli stadi precoci di sviluppo per *M. galloprovincialis* e *C. gigas*.

La variazione della tossicità non varia in modo sensibile tra le due temperature di lisciviazione; le sostanze rilasciate che sono causa della tossicità quindi non presentano un'alta volatilità.

Il test su *T. fulvus* ha evidenziato una tossicità pari a 0,36 TU.

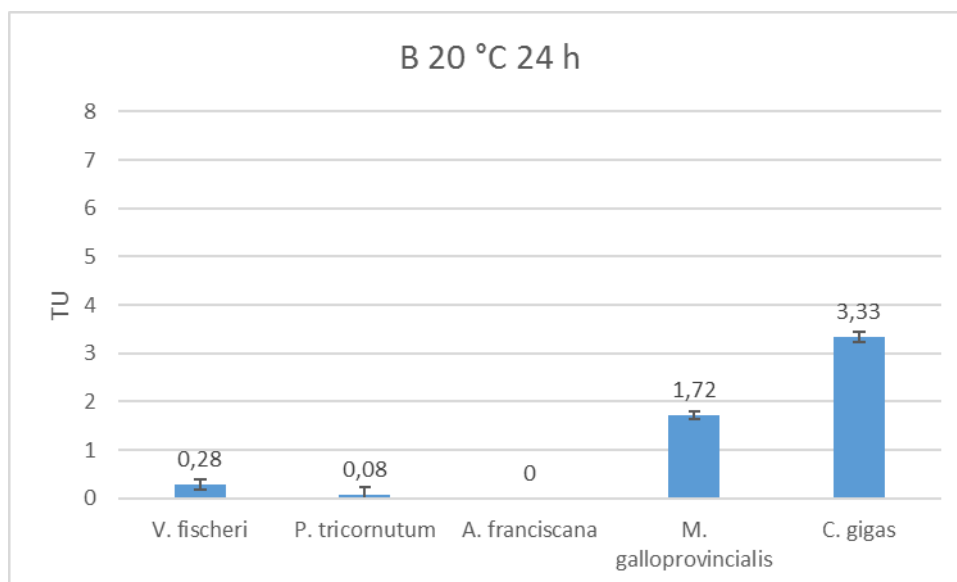


Figura 55 Tossicità lisciviato campione B a 20 °C e 24 h espressa in TU.

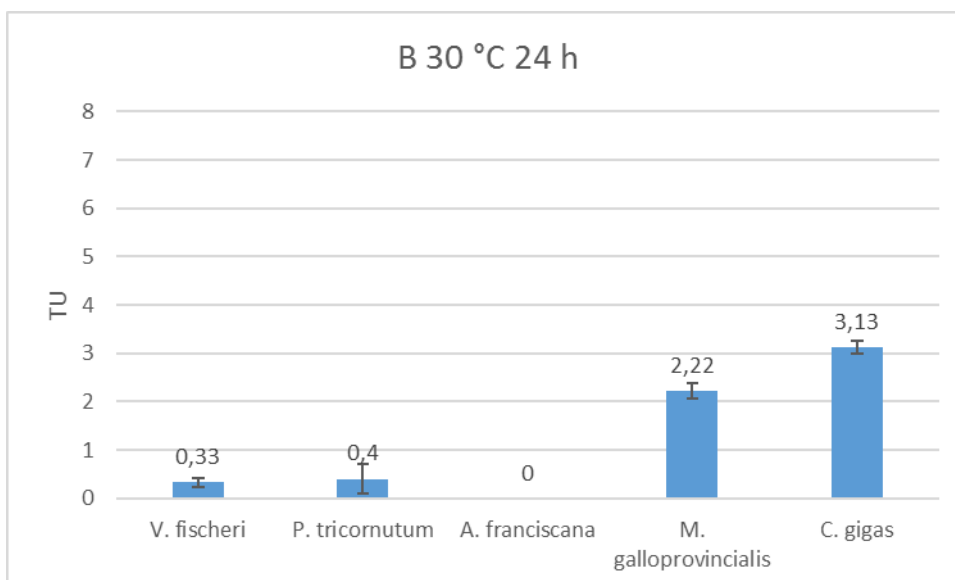


Figura 76 Tossicità lisciviato campione B a 30 °C e 24 h espressa in TU.

6.7.4 Campione C

I risultati dei saggi sul lisciviato del campione B prodotti a 20 °C 24 h e 30 °C 24 h evidenziano il superamento di alcuni livelli soglia come da tabella 1.

Specie test	Risultato (TU)	Limite soglia (TU)
20 °C 24 h		0,60
<i>M. galloprovincialis</i>	0,94	
<i>C. gigas</i>	7,14	
30 °C 24 h		
<i>M. galloprovincialis</i>	0,52	
<i>C. gigas</i>	2,94	

I test con i bivalvi, anche se normalizzati con il bianco procedurale, risultano oltre il limite soglia denotando una criticità per gli stadi precoci di sviluppo per *M. galloprovincialis* e *C. gigas*.

Per i lisciviati prodotti a 30 °C e 24 h il test di tossicità con *P. tricornutum* grazie alla normalizzazione con il bianco procedurale risulta di 0,34 TU, valore al sotto del limite soglia previsto di 0,60 TU (Tabella 1).

Il decremento degli effetti tossici dei lisciviati a 30 °C rispetto a quelli a 20 °C per i test su *M. galloprovincialis* e *C. gigas* denotano una maggiore affinità delle sostanze responsabili della tossicità per il comparto atmosferico, rendendosi meno disponibili nella fase liquida all'aumento della temperatura.

Il test su *T. fulvus* ha evidenziato una tossicità pari a 0 TU.

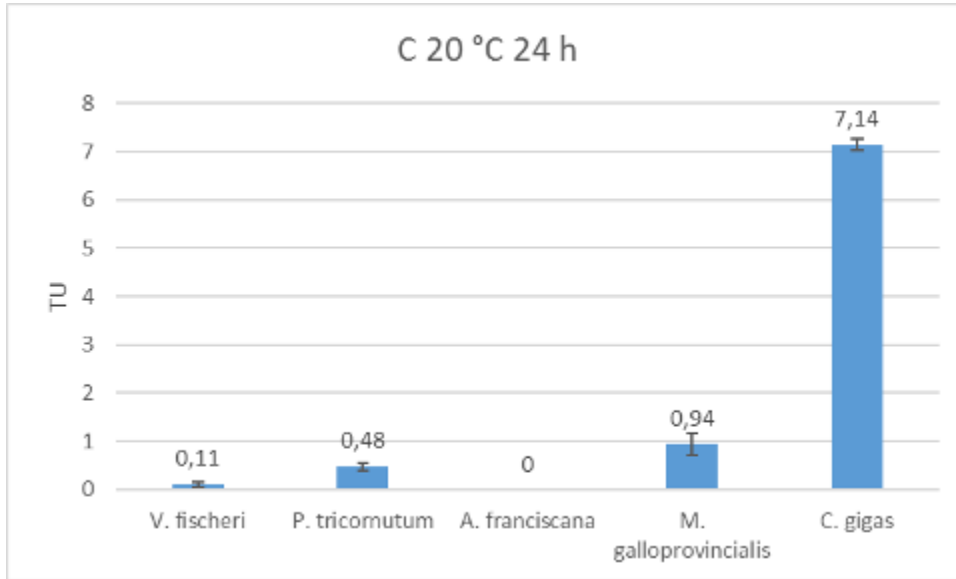


Figura 87 Tossicità lisciviato campione C a 20 °C e 24 h espressa in toxic unit.

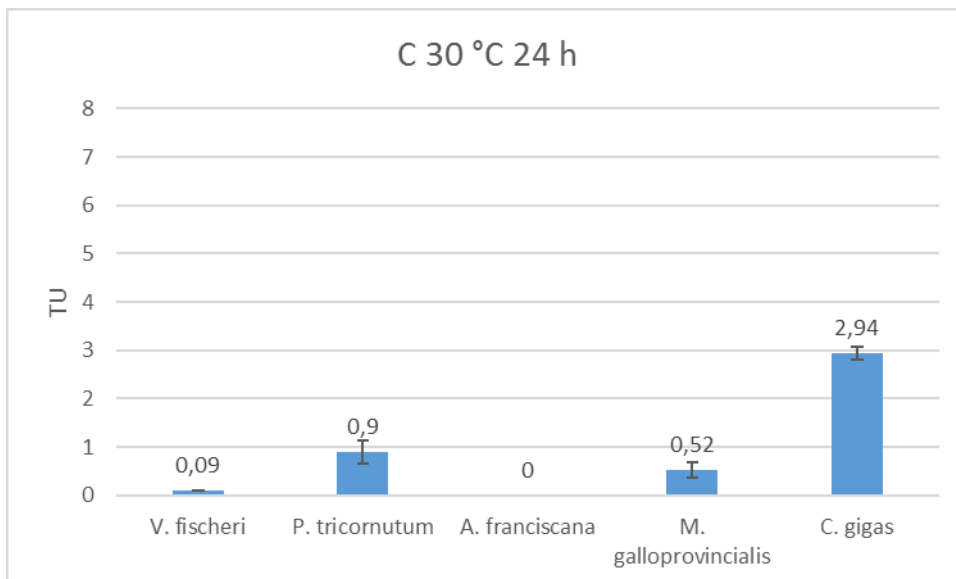


Figura 58 Tossicità lisciviato campione C a 30 °C e 24 h espressa in toxic unit.

7 Conclusioni

La degradazione dei pali in materiale ligneo in ambiente marino-costiero e di transizione ha promosso la definizione di un processo di valutazione per nuovi materiali alternativi principalmente di natura sintetica (i.e. plastiche ed affini).

Dopo aver sviluppato una conoscenza necessaria alla valutazione sperimentale dei materiali volta alla loro classificazione di compatibilità ambientale, è disponibile un protocollo in ragione delle normative comunitarie (cap.4.2) e nazionali (cap. 4.1).

Il presente lavoro di tesi ha riguardato la valutazione ecotossicologica di tre materiali di natura sintetica A, B, C, considerando la procedura valutativa indicata nel Manuale Operativo (MAV, 2013). La conduzione dei saggi di tossicità con diverse specie test ed end-point (acuti, sub-cronici e cronici) è servita a determinare se il lisciviato, ottenuto a due diverse temperature 20 °C e 30 °C, presentasse tossicità rilevanti ai fini di un possibile rischio per l'ambiente al momento della messa in opera del materiale.

I campioni sono stati valutati tramite una batteria di saggi ecotossicologici comprendenti le seguenti specie test *V. fischeri*, *P. tricornutum*, *C. gigas*, *M. galloprovincialis*, *A. franciscana* e *T. fulvus*.

Dai dati di tossicità ottenuti (cap. 6) è possibile concludere che:

- Il campione A presenta effetti tossici assenti o trascurabili (Figure 53, 54). Tutti i valori sono al di sotto di 1 TU, il che implica un non-effetto evidente.
- Il campione B presenta effetti tossici non trascurabili. I test che evidenziano queste criticità sono i test su *M. galloprovincialis* e *C. gigas*. (Figure 55, 56). La tossicità interessa gli embrioni, causando anomalie e/o ritardi nello sviluppo degli stessi con un effetto sul tal quale > di 100% su entrambi i saggi alle due temperature di lisciviazione 20 °C e 30 °C.
- Il campione C presenta effetti tossici non trascurabili. Come nel caso del campione B i test che presentano queste criticità sono quelli su *M. galloprovincialis* e *C. gigas*. (Figure 57, 58). La tossicità interessa gli embrioni, causando anomalie e/o ritardi nello sviluppo degli stessi con un effetto sul tal quale > di 100% su saggio con *C. gigas* alle due temperature di lisciviazione 20

°C e 30 °C, e nel saggio su *M. galloprovincialis* con un effetto sul tal quale > 37% per il lisciviato a 30 °C e >54% per illisciviato a 20 °C.

Ad oggi, in base a questi risultati, il materiale A sarebbe l'unico ad aver superato la valutazione del parametro tossicità (fase 2 del processo valutativo) e a poter procedere alla fase 3 "Valutazione delle finalità d'uso".

I materiali B e C necessitano di ulteriori indagini. Ad esempio, sarebbe necessario procedere all'esecuzione di analisi chimiche per determinare quali sostanze liscivate possano provocare gli effetti tossici individuati al fine di poterle eliminare dal materiale. Successivamente, i materiali "migliorati" potranno essere sottoposti a rivalutazione in accordo con la suddetta procedura valutativa (MAV, 2013)

Necessita di nota la limitata, se non assente, documentazione fornita dalle ditte riguardo l'esatta composizione chimico-fisica dei materiali proposti.

Bibliografia

APAT – ICRAM, 2007. Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini. Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. 2007.

APAT - IRSA, 2003. Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Artemia franciscana*. Metodi Ecotossicologici. APAT-IRSA-CNR 8060 (2003).

ARPA Veneto – Servizio Osservatorio Acque Marine e Lagunari, 2014. Qualità delle acque di transizione del Veneto nel triennio 2010-2012 e classificazione. Padova, Novembre 2014.

ASTM, 2004. Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Test Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. ASTM E 724 – 98 (2004).

Brown D., Thompson R.S., 1982. Phthalates and the aquatic environment: Part II The bioconcentration and depuration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-isodecyl phthalate (DIDP) in mussels (*Mytilus edulis*). Chemosphere, 11(4), 427-435, ISSN 0045-6535, [http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535\(82\)90046-7](http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(82)90046-7).

BSI, 2008. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). BS EN ISO 11348-3:2008.

Bienhold C., Pop Ristova P., Wenzhöfer F., Dittmar T., Boetius A., 2013. How deep-sea wood falls sustain chemosynthetic life. PLoS One 8, e53590.

Björkdal C. G., Nilsson T., 2008. Reburial og shipwrecks in marine sediments: as long-term study on wood degradation. J.Archeol. Sci. 35, 862-872.

Charles F., Coston-Guarini J., Guarini J. M., Fanfard S., 2015. Wood decay at sea. Journal of Sea Research 114 (2016) 22-25.

EFSA, 2005. Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. The EFSA Journal (2005) 243, 1-20.

FLP (Forest Product Laboratory), 1999. Wood Handbook – Wood as an Engineering Materials. Gen. Tech. Rep. FLP-GRT-113. Madison, WI: U.S. Department of Agriculture, Forest service, Forest Products Laboratory.

Fojutowski A., Wròblewska H., Komorowicz M., Kropacz A., Noskowiak A., Iwona Pomian I., 2014. Changes in the properties of English oak woos (*Quercus robur* L.) as a result of remaining submerged in Baltic Sea waters for two years. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 86, 122-128.

Fors Y., Grudd H., Rindby A., Jalilehvand F., Sanström M., Cato I., Bornmalm L., 2014. Sulfur and iron accumulation in three marine-archaeological shipwrecks in the Baltic Sea: the ghost, the crown and the sword. *Sci. Rep.* 4, 4222.

His E., Seaman L. N. M., Beiras R., 1995. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Wat. Res.* Vol. 31, No. 2, pp 351-355. 1997.

ISO 14669, 1991. Test di tossicità e saggi biologici acuti con *Tigriopus fulvus* (Fischer, 1860).

ISPRA, 2011. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre – I manuali di ecotossicologia 67/2011 ISPRA, Manuali e Linee Guida a cura di Baudo R., Faimali M., Onorati F. e Pellegrini D.

JRC, 2008. Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). Summary risk assessment report. EUR 23384 EN/2.

Libralato G., Avezzù F., Volpi Ghirardini A., 2011. Lignin and tannin toxicity to *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin). *Journal of Harzadous Materials* 194, 435-439.

Libralato G., 2015. Slide lezione corso di Ecotossicologia Marina (CM0449). Università Ca' Foscari di Venezia.

MAC-CVN, 2011. Valutazione della compatibilità ambientale di materiali da impiegarsi in ambiente marino-costiero e lagunare (Laguna di Venezia) mediante test di tossicità e analisi di bioaccumulo. Rapporto Finale di Progetto, 2011.

MAV, 2013. Modalità di utilizzo di legno o materiali alternativi per pali o strutture marittime in laguna di Venezia - protocollo di intesa del 13.07.2011 tra Magistrato alle Acque di Venezia, la Soprintendenza per i Beni Architettonici e per il Paesaggio di Venezia e laguna e il Comune di Venezia - Manuale operativo contenente la procedura di ammissibilità in laguna di Venezia di materiali alternativi – Linee guida per le valutazioni chimiche ed ecotossicologiche. Dicembre 2013.

Moreno-Garrido I., Lubián M. L., Soarest M. V. M. A., 1999. Influence of Cellular Density on Determination of EC₅₀ in Microalgal Growth Inhibition Tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, 112-116 (200).

Nishimoto A., Haga T., Asakura A., Shirayama Y., 2015. An experimental approach for understanding the process of wood fragmentation by marine wood borers in shallow temperate waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 538, 53-65.

OECD, Organisation de Cooperation et de Development Economiques (1999). Emission Scenario document for wood preservatives.

OECD, 2007. Estimation of Emission from Preservative - Treated Wood to the Environment: Laboratory Method for Wooden Commodities that are not Covered and are in Contact with Fresh Water or Sea Water.

OECD, 2009. Preservative-Treated wood to the environment: for wood held in storage after treatment and for wooden commodities that are not covered and are in contact with ground. Series on Testing and assessment Number 107. ENV/JM/MONO(2009)12, 23 Luglio 2009.

Peters G. B., Dawson H. J., Hrutfiord B. F., Whitney R. R., 1976. Aqueous leachate from western red cedar: effects on some aquatic organism, *J. Fish Res. Board Can.* 33: 2703-2709.

Protocollo d'Intesa "Modalità di utilizzo di legno o materiali alternativi per le strutture marittime in Laguna di Venezia". Magistrato alle Acque, Sovrintendenza per i Beni Architettonici e Paesaggistici di Venezia e Laguna e Comune di Venezia. 13/07/2011.

Schoknecht U., Wegner R., Jann O., Horn W., 2001. Investigation on the emission of biocides from treated materials. UBA Project 299 67 410.

Tagliapietra D., Sigovini M., Keppel E., 2011. La degradazione del legno ad opera delle teredini in laguna di Venezia. CNR-ISMAR. 136 pp Rapporto Finale.

Tagliapietra D., Sigovini M., Keppel E., 2012. La degradazione del legno ad opera delle teredini in Valle Millecampi, lunette sperimentali: analisi dopo 3 anni. CNR- ISMAR. 34 pp.

Taylor B. R., Goudey J. S., Carmichael N. B., 1996. Toxicity of aspenwood leachate to aquatic life: laboratory studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 150-159

USEPA, 1999. Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants. EPA/833B-99/002.

UNI, 2006. Water quality, Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. UNI EN ISO 10253.

Allegato I

- I dati di tossicità utilizzati nei grafici (Figure 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58) sono riportati in dettaglio nella tabella sottostante.

		Dati di tossicità (unità di tossicità - TU)				
	Campione	<i>V. fischeri</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>A. franciscana</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>C. gigas</i>
Lisciviato 20 °C 24 h	BP	0.11 ± 0.03	0.20 ± 0.08	0.08 ± 0.00	0.04 ± 0.06	0.02 ± 0.06
	FER	0.15 ± 0.05	0.34 ± 0.08	0.06 ± 0.00	0.40 ± 0.22	0.14 ± 0.12
	PAL	0.11 ± 0.05	0.48 ± 0.16	0.00 ± 0.00	0.94 ± 0.20	7.14 ± 0.28
	REV	0.28 ± 0.11	0.08 ± 0.14	0.00 ± 0.00	1.72 ± 0.09	3.33 ± 0.11
Lisciviato 20 °C 24 h	BP	0.09 ± 0.09	0.56 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.06	0.02 ± 0.06
	FER	0.13 ± 0.11	0.34 ± 0.14	0.12 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.01 ± 0.04
	PAL	0.09 ± 0.00	0.90 ± 0.24	0.00 ± 0.00	0.52 ± 0.16	2.94 ± 0.13
	REV	0.33 ± 0.10	0.40 ± 0.30	0.00 ± 0.00	2.22 ± 0.15	3.13 ± 0.13

- I dati utilizzati per la realizzazione dei grafici del test su *V. fischeri* sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Figure 18, 20, 22.

Assorbanza (Im)							
Campione	5 minuti	10 minuti	30 minuti	ZnSO4			
20 °C 24 h				Concentrazione mg/L	Io	5 minuti	15 minuti
BP	90,68	76,27	124,13	0,25	105,34	91,28	121,96
A	92,13	107,41	120,89	0,5	111,25	89,76	122,36
B	84,99	99,94	112,85	1	128,41	98,83	128,51
C	91,25	107,91	124,46	3	147,57	97,89	127,12
CTRL	95,46	117,58	132,45	6	110,57	68,85	84,56
30 °C 24 h				12	160,10	93,82	100,85
BP	96,14	111,96	126,49	24	161,83	85,00	68,81
A	94,36	108,47	122,77	49	160,50	72,09	38,40
B	87,45	99,56	109,60	98	174,23	39,93	8,92
C	96,45	110,92	125,76	CTRL	98,08	97,19	132,80
CTRL	99,54	115,80	129,71				

Figure 19, 21, 23.

% Effetto						
Campione	5 minuti	10 minuti	30 minuti	ZnSO4		
20 °C 24 h				Concentrazione mg/L	5 minuti	10 minuti
BP	4,33	6,33	5,67	0,25	12	14
A	3,00	8,00	7,67	0,5	18	18
B	10,33	14,33	14,00	1	22	25,5
C	4,00	7,67	5,33	3	32	35
30 °C 24 h				6	37,5	44
BP	-0,67	4,33	4,33	12	40	53
A	1,00	7,33	6,33	24	46,5	68
B	8,00	14,67	16,67	49	54	82
C	-1,00	5,67	4,67	98	76,5	95,5

- I dati utilizzati per la realizzazione dei grafici del test su *P. tricornutum* sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Figure 24, 25, 26, 27, 28.

Assorbanza 670 nm		
	20 °C 24 h	30 °C 24 h
A	0,029	0,029
B	0,037	0,028
C	0,026	0,020
BP	0,033	0,024
Concentrazione Algale		
A	100812	102072
B	144909	96402
C	82543	47266
BP	121600	74354
Tasso di crescita 1/day		
A	0,83	0,83
B	0,96	0,80
C	0,76	0,55
BP	0,90	0,72
Inibizione tasso di crescita medio		
A	16,54	16,52
B	3,95	20,48
C	24,46	45,48
BP	9,77	27,53
Inibizione tasso di crescita medio corretto con il bianco procedurale		
A	6,78	-11,01
B	-5,82	-7,05
C	14,70	17,96

- I dati utilizzati per la realizzazione dei grafici del test su *C. gigas* sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Figure 29, 31, 32.

Embriotossicità									
Diluizione	N	D malf	Pre-D	N	D malf	Pre-D	N	D malf	Pre-D
	A			B			C		
0,78	93	0	7	0	0	100	0	0	100
1,56	92	0	7	0	0	100	0	0	100
3,13	94	0	6	77	0	23	0	0	100
6,25	94	0	6	92	0	8	66	0	37
12,5	93	0	7	92	0	8	90	0	10
25	94	0	6	91	0	9	91	0	9
50	88	0	12	96	0	4	92	0	8
100	90	0	9	92	0	8	93	0	7
0,78	92	0	8	0	0	100	0	0	100
1,56	95	0	5	4	0	96	0	0	100
3,13	95	0	5	92	0	8	91	0	9
6,25	94	0	6	93	0	7	93	1	7
12,5	95	0	5	94	0	6	93	0	7
25	94	0	6	94	0	6	93	0	7
50	94	0	6	96	0	4	93	0	7
100	92	0	8	95	0	5	93	0	7
Cu ²⁺									
Concentrazione (mg/L)	N	D malf	Pre-D						
B	97	0	3						
3	94	0	6						
6	93	0	7						
12	92	0	8						
24	68	0	28						
48	0	0	100						

Figure 30, 32, 34.

% Effetto				20 °C 24 h
Diluizione	A	B	C	
0,78	6,67	8,33	6,67	
1,56	7,33	4,33	8	
3,13	5,67	9	8,67	
6,25	6,33	7,67	9,67	
12,5	7	8	37	
25	6	23	100	
50	12,33	100	100	
100	9,67	100	100	
% Effetto				30 °C 24 h
0,78	8,33	5,33	7	
1,56	6,33	3,67	7,	
3,13	6,33	6	7,33	
6,25	5	5,67	7	
12,5	5,67	7,33	8	
25	5,00	8,67	9,33	
50	4,67	95,67	100	
100	8	100	100	
Cu ²⁺				
Concentrazione mg/L	% Effetto			
B	3,33			
3	5,67			
6	7			
12	8			
24	28,33			
48	100			

- I dati utilizzati per la realizzazione dei grafici del test su *M. galloprovincialis* sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Figure 35, 37, 39.

Embriotossicità										
Diluizione	N	D malf	Pre-D	N	D malf	Pre-D	N	D malf	Pre-D	
	A			B			C			
0,78	74	0	26	69	2	29	75	3	23	20 °C 24 h
1,56	79	1	20	70	0	30	81	3	16	
3,13	75	2	24	65	2	33	75	3	22	
6,25	73	2	25	64	0	36	77	1	23	
12,5	77	0	23	76	1	23	72	1	26	
25	76	0	24	72	1	27	65	0	35	
50	73	1	27	64	1	35	70	0	30	
100	68	1	30	3	0	97	46	1	53	
0,78	73	0	27	62	1	37	76	0	24	30 °C 24 h
1,56	75	1	24	74	1	24	70	1	29	
3,13	69	0	31	73	1	27	71	2	27	
6,25	64	0	36	75	2	22	75	0	25	
12,5	68	0	32	71	1	28	66	2	31	
25	59	1	40	57	1	42	66	1	34	
50	67	0	33	57	1	43	71	1	28	
100	65	0	35	0	0	100	63	2	35	
Cu ²⁺										
	N	Pre-D e D malf								
CTRL	86	14								
3	89	11								
6	81	19								
12	72	28								
24	54	46								
36	0	100								
48	0	100								

Figure 34, 38, 40.

% Effetto			
Diluizione	A	B	C
0,78	26,17	31,41	25,43
1,56	20,78	29,67	19,21
3,13	25,38	34,61	25,05
6,25	27,26	35,53	23,28
12,5	22,58	23,85	27,76
25	23,52	28,11	34,83
50	27,31	35,87	29,80
100	31,61	96,83	54,06
0,78	27,11	38,12	23,70
1,56	25,44	25,84	30,17
3,13	30,65	27,47	29,18
6,25	35,72	24,53	24,88
12,5	31,91	29,12	33,58
25	41,10	42,87	34,34
50	33,34	43,26	28,50
100	35	100	36,59
20 °C 24 h			
30 °C 24 h			
Cu ²⁺			
Concentrazione mg/L	% Effetto		
0	13,95		
3	10,68		
6	19,27		
12	27,94		
24	46,42		
36	100		
48	100		

- I dati utilizzati per la realizzazione dei grafici del test su *A. franciscana* sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Figure 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48.

		Immobilità									
		12,5		25		50		100			
		immobili	mobili	immobili	mobili	immobili	mobili	immobili	mobili		
A											
24 h		0	25	1	28	0	31	1	31	20 °C 24 h	
48 h		1	24	2	27	3	28	1	31		
96 h		4	21	7	22	11	20	5	27		
24 h		2	26	1	26	0	27	0	31	30 °C 24 h	
48 h		3	25	3	24	0	27	2	29		
96 h		6	22	9	18	9	18	9	22		
B											
24 h		0	34	1	24	0	31	0	26	20 °C 24 h	
48 h		1	33	2	23	1	30	0	26		
96 h		16	18	7	18	10	21	7	19		
24 h		0	30	0	30	1	26	1	33	30 °C 24 h	
48 h		4	26	1	29	1	26	1	33		
96 h		7	23	10	20	9	18	5	29		
C											
24 h		0	26	0	26	0	31	0	33	20 °C 24 h	
48 h		0	26	1	25	1	30	0	33		
96 h		2	24	5	21	7	24	12	21		
24 h		0	14	0	29	0	27	0	30	30 °C 24 h	
48 h		0	14	3	26	1	26	0	30		
96 h		2	12	6	23	5	22	5	25		

Figura 49.

		% Effetto				
		12,5	25	50	100	
		A				
24 h		0,00	3,45	0,00	3,13	20 °C 24 h
48 h		4,00	6,90	9,68	3,13	
96 h		16,00	24,14	35,48	15,63	
24 h		7,14	3,70	0,00	0,00	30 °C 24 h
48 h		10,71	11,11	0,00	6,45	
96 h		21,43	33,33	22,22	29,03	
		B				
24 h		0,00	4,00	0,00	0,00	20 °C 24 h
48 h		2,94	8,00	3,23	0,00	
96 h		47,06	28,00	32,26	26,92	
24 h		0,00	0,00	3,70	2,94	30 °C 24 h
48 h		13,33	3,33	3,70	2,94	
96 h		23,33	33,33	33,33	14,71	
		C				
24 h		0,00	0,00	0,00	0,00	20 °C 24 h
48 h		0,00	3,85	3,23	0,00	
96 h		7,69	19,23	22,58	36,36	
24 h		0,00	0,00	0,00	0,00	30 °C 24 h
48 h		0,00	10,34	3,70	0,00	
96 h		14,29	20,69	18,52	16,67	

- I dati utilizzati per la realizzazione dei grafici del test su *T. fulvus* sono riportati nella tabella sottostante.

Figura 50.

		Mortalità		
		24 h	48 h	72 h
A		0	0	0
B		6,66	13,33	33,33
C		0	0	0

Lista acronimi

- EC50: la concentrazione che causa una risposta sul 50% degli organismi testati.
- EC20: la concentrazione che causa una risposta sul 20% degli organismi testati.
- S.T.I.: Sediment toxicity index è il rapporto tra la tossicità osservata e la tossicità naturale stimata, espresse entrambe in Toxic unit.
- LC50: la concentrazione che ha causato la morte nel 50% degli organismi testati.
- TU: Toxic unit = $100/EC_{xx} = c_i/EC_{(xx)_i}$