

**L'ESPERIENZA DELL'ARPA MARCHE NELLA
VALUTAZIONE ECOTOSSICOLOGICA
DEI SEDIMENTI MARINI**

Dr. Tristano Leoni

ARPAM – Dipartimento di Macerata

D.M. 24/Gennaio 1996
Caratterizzazione materiali
Fisica, chimica, microbiologica

Manuale APAT - ICRAM
DGR Marche 255/2009
Caratterizzazione
Chimico - Ecotossicologica

Regolamento ex Art. 109
DL 152/2006
DGR Marche
Perfezionamento Caratterizzazione
Chimico Ecotossicologica

1996



2016

Da dove proveniamo

Laboratorio multizonale di sanità pubblica

Obiettivo

si cercava di affiancare a una valutazione ecologica come l'IBE, una valutazione ecotossicologica basata sugli effetti di matrici contaminate sugli organismi

PRIMI SAGGI

Vibrio fischeri – 1990
Daphnia magna – 1994
Saggio algale - 1996

Principali Criticità:

- mercato impreparato a soddisfare richiesta di pochi laboratori,
- assenza totale di una normativa di settore,
- personale in difficoltà per carenza di adeguate attività formative

Prime Soluzioni:

- SPERIMENTAZIONE "VOLONTARIA" SULLA BASE DI ESPERIENZE NAZIONALI ED ESTERE
- RUOLO DIFFUSIVO /FORMATIVO SVOLTO IN PREVALENZA DA ICRAM
- ESPERIENZE FORMATIVE ARPA /APPA FINANZIATE (L.93/2001- linea progettuale 3aBio)

Le origini

Per i materiali di dragaggio l'unica norma nazionale di riferimento è stata il DM 24/01/1996 che non prevedeva l'uso di saggi biologici.

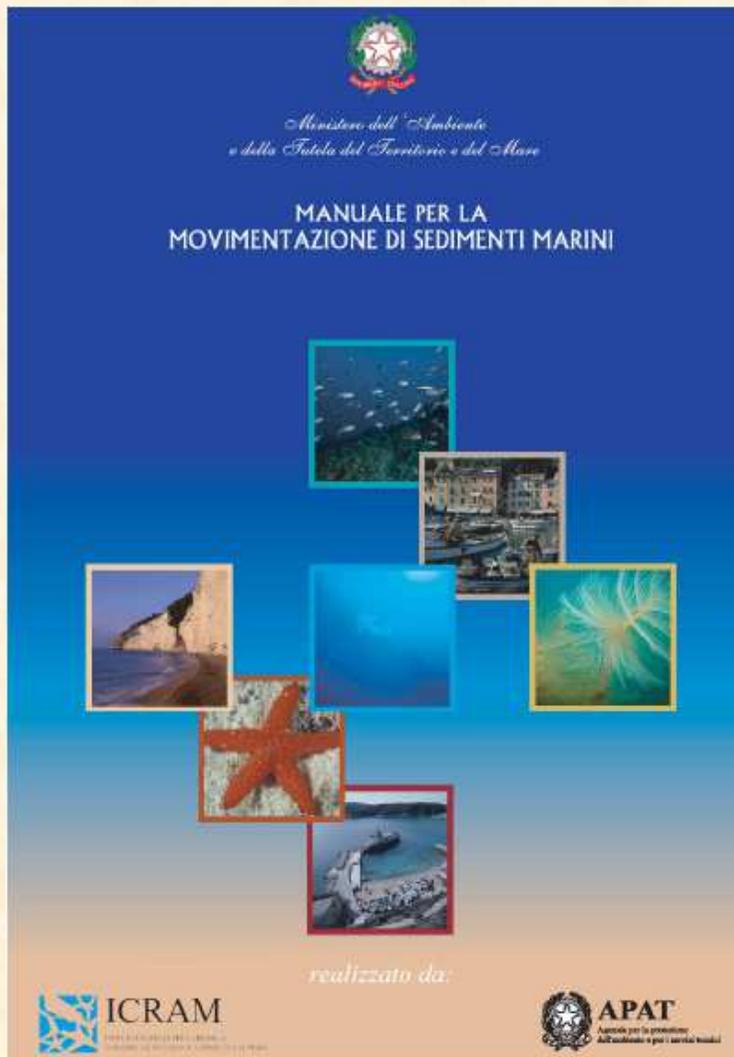
Il progetto

Costruire una batteria di saggi utilizzando organismi appartenenti a livelli trofici differenti che evidenziassero effetti acuti cronici, genotossici, teratogeni utilizzando le strutture e i pochi mezzi esistenti.

I primi problemi

A tutto ciò si aggiunge la comprensibile generale diffidenza verso uno strumento ancora mal definito che doveva integrarsi con i consolidati e univoci e «rassicuranti» dati chimici.

Qui il grande sforzo di ICRAM legato alla redazione del primo manuale per la movimentazione dei sedimenti che la Regione Marche adottò poco dopo la sua emanazione.



I primi documenti di riferimento

 REGIONE MARCHE GIUNTA REGIONALE	seduta del	pag. 1
	23/02/2009	
DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE	delibera	
ADUNANZA N. <u>209</u> LEGISLATURA N. <u>VIII</u>	255	
<p>DE/CA/S09 Oggetto: Approvazione "Linee guida per la gestione dei materiali derivanti dalle attività di dragaggio in area portuale, in area marina fluviale o litoranea". O NC</p> <p>Prot. Segr. 132 Revoca propria delibera n. 796 del 16/07/2007.</p>		

ALCUNE NOVITA' INTRODOTTE DAL MANUALE

- definizione dei livelli LCB e LCL
- definizione dei saggi biologici utilizzabili
- integrazione dei dati chimici ed ecotossicologici con valutazione dell'operatore
- definizione delle opzioni di gestione dei materiali

LE BATTERIE DI SAGGI

- la scelta ampia comprendente organismi dotati di uno spettro di sensibilità molto vario
- possibilità di formare le batterie con relativamente pochi vincoli (compromesso per fare partire una attività sperimentale di difficile avviamento)

La lista di specie utilizzabili sulla base della DGR Marche 255/2009:

ALGHE

Dunaliella tertiolecta;

Pheodactylum tricornutum;

Skeletonema costatum;

BATTERI

Vibrio fischeri;

ROTIFERI

Brachionus plicatilis;

MOLLUSCHI

Crassostrea gigas;

Mytilus galloprovincialis;

CROSTACEI

Corophium orientale;

Corophium insidiosum;

Ampelisca diadema;

Acartia tonsa;

Acartia clausi;

Tisbe battagliai;

Tigriopus fulvus

ECHINODERMI

Paracentrotus lividus;

Sphaerechinus granularis;

PESCI

Dicentrarchus labrax;

Sparus auratus;

Criteri di scelta della batteria:

- almeno tre specie-test
- appartenenti a gruppi tassonomici diversi
- almeno una da applicare alla fase solida del sedimento
- almeno una da applicare alla fase liquida (elutriato)

EVOLUZIONE DELLE BATTERIE DI SAGGI IN ARPAM - 1

EVOLUZIONE DELLE BATTERIE

- Vibrio SPT – vibrio APT
- Vibrio SPT – rotifero – crostaceo (artemia salina)
- Vibrio – rotifero – alga
- Vibrio – alga – cordato
- Vibrio – alga- mollusco
- **Vibrio – alga – crostaceo (Acartia Tonsa)**
- Vibrio – alga – crostaceo – cordato
- Vibrio – alga – crostaceo - mollusco

CROSTACEI e ALGHE UTILIZZATI

- **Artemia salina**
- **Tigriopus fulvus**
- **Balanus amphitrite**
- **Acartia tonsa**
- Corophium orientale
abbandonato per irreperibilità locale
- **Dunaliella tertiolecta**
- **Phaeodactylum tricornutum**

**Studio per l'Individuazione di
Livelli Chimici di Base (LCB) a Scala
Regionale come
Strumento Gestionale Finalizzato
alla Movimentazione dei Fondali
Marini**

...un lavoro importante
che ci ha permesso di
verificare la idoneità
delle specie

Tale lavoro è interamente finanziato dall'ISPRA tramite uno specifico contratto di ricerca affidato ad ARPAM.

E' stata sperimentata una metodologia per la definizione dei livelli chimici di base locali (LCB) misurando la contaminazione dei sedimenti marini in aree con basso impatto antropico, analizzando solo i campioni aventi un grado di tossicità pressoché assente nei confronti di cinque organismi appartenenti a tre diversi livelli trofici.

ACCREDITAMENTO PROVE ECOTOSSICOLOGICHE in ARPAM – 1

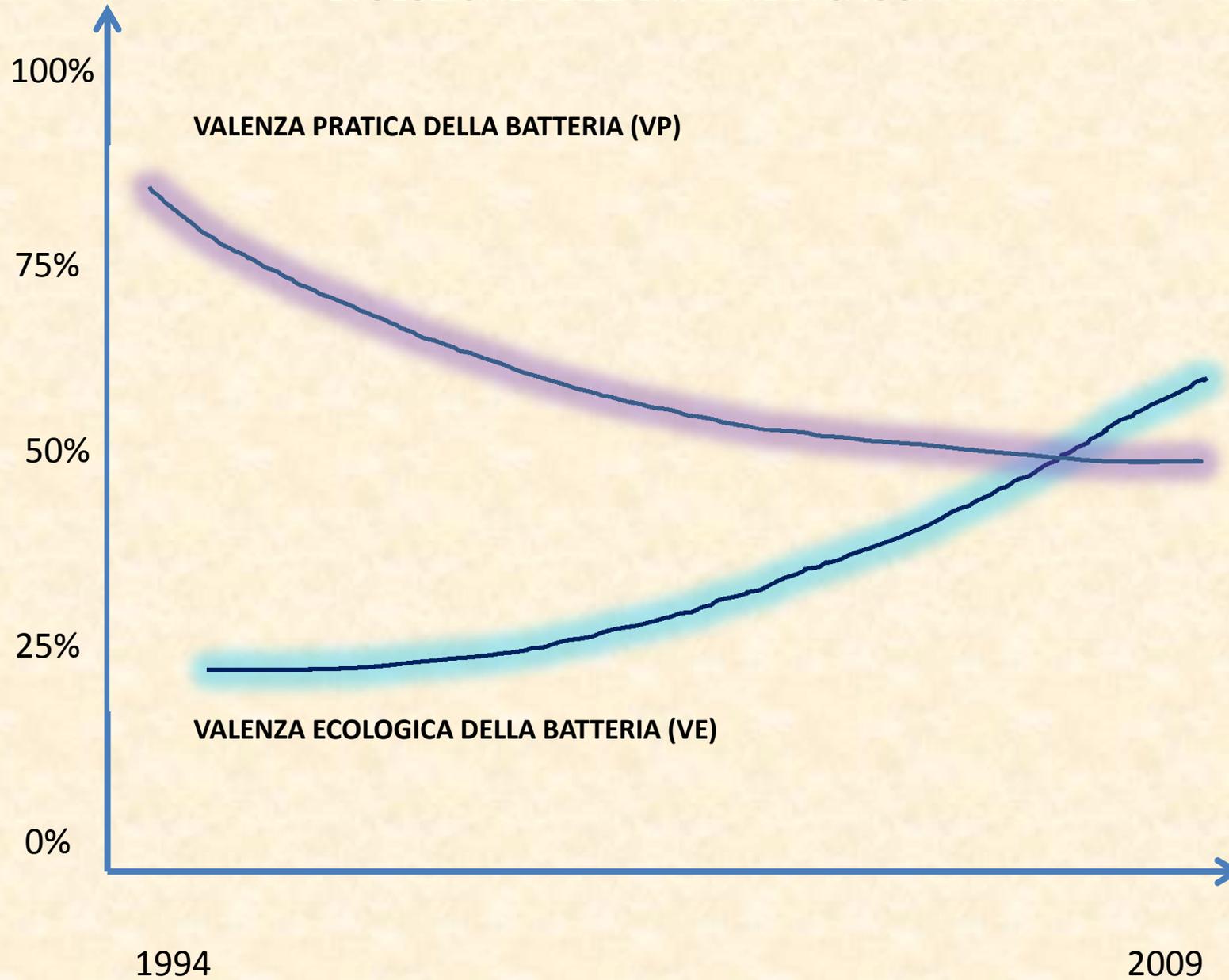
SAGGI ACCREDITATI

MATRICE	DENOMINAZIONE DELLA PROVA	METODO DI PROVA	ANNI ACCREDITAMENTO
Acque di scarico	Tossicità con Artemia salina	CNR IRSA Notiziario metodi analitici 09/1996	1999 - 2005
Acque	Valutazione della tossicità con Daphnia magna	APAT CNR IRSA 8020 Man 29 2003	1999 - 2016
Acque destinate al consumo umano, superficiali	Mutagenesi	APHA Standard Methods for the examination of Water and Wastewater ed 22nd 2012 8030	1999 - 2016
Sostanze o miscele contenute in acque o acque di scarico	Inibizione della crescita algale con Selenastrum capricornutum	UNI EN ISO 8692:2012	2002 - 2016
Sostanze o miscele contenute in acque di mare	Inibizione della crescita di alghe marine con Phaeodactylum tricornutum	UNI EN ISO 10253:2006	2011 - 2016
Sostanze o miscele contenute in acque di mare	Tossicità acuta con copepodi marini: Acartia tonsa	ISO 14669:1999	2015 - 2016

ACCREDITAMENTO PROVE ECOTOSSICOLOGICHE in ARPAM – 2 METODI ASSICURAZIONE QUALITA'

- PARTECIPAZIONE A CIRCUITI INTERLABORATORIO
- UTILIZZO CARTE DI CONTROLLO
- CONTROLLO DELLE CONDIZIONI AMBIENTALI CON CAMPIONI DI RIFERIMENTO CERTIFICATI (LAT)
- QUALIFICAZIONI DEL PERSONALE E MANTENIMENTO DELLA QUALIFICA PER I METODI DI PROVA
- **RIESAME ANNUALE DEI METODI DI PROVA ACCREDITATI**
- DEFINIZIONE E CALCOLO DELLA INCERTEZZA DI MISURA
- VERIFICHE ISPETTIVE INTERNE (ANCHE INTERAGENZIALI)
- REGISTRAZIONE DEI RILIEVI (OSSERVAZIONI/NON CONFORMITA') E ATTUAZIONI DELLE EVENTUALI AZIONI CORRETTIVE.
- AVVIO DI AZIONI PREVENTIVE

EVOLUZIONE DELLE BATTERIE DI SAGGI IN ARPAM - 2



PRESTAZIONI BATTERIA DI BASE:
RISPOSTE GENERALI ALLE CONCENTRAZIONI
COMPRESSE TRA LCB E LCL

relativamente
molto sensibile



relativamente
poco sensibile



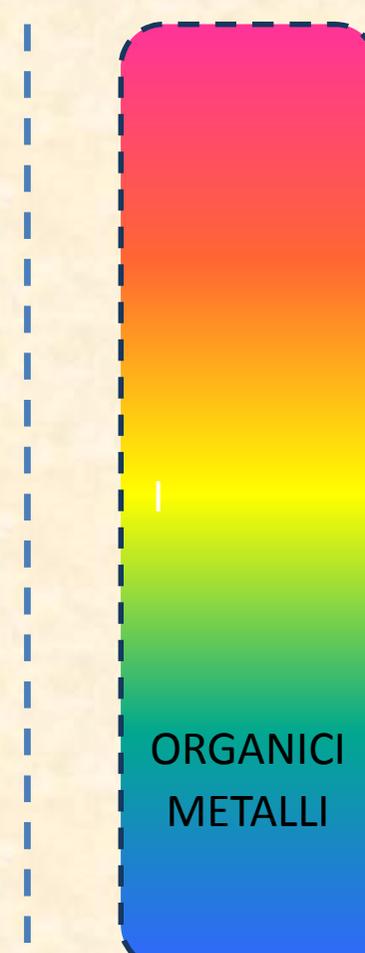
Vibrio SPT



**Saggio algale
elutriato**



**Acartia tonsa
48 h elutriato**



**Artemia salina
24/96 h elutriato**

Valutazione batteria di base secondo il nuovo regolamento

Proposta ISPRA-ISS-CNR – Allegati Tecnici art 109, D.Lgs 152/06

Tabella 2.3 – Saggi biologici utili per l'allestimento della batteria. Con la "x" vengono indicati i possibili saggi alternativi per ciascuna tipologia

Gruppo	Batteri		Algae	Crostei					Molluschi Bivalvi		Echinodermi		
Specie	<i>Vibrio fischeri</i> (Bacteria)		<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Pheodactylum tricorutum</i> <i>Skeletonema costatum</i> (Algae)	<i>Amphibalanus amphitrite</i> (Crustacea)	<i>Corophium spp</i> (Crustacea)	<i>Acartia tonsa</i> (Crustacea)		<i>Tigriopus fulvus</i> (Crustacea)	<i>Crassostrea gigas</i> (Bivalvia)	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Bivalvia)	<i>Paracentrotus lividus</i> (Echinodermata)		
Matrice	fase liquida	fase solida	fase liquida	fase liquida	Sed. intero	fase liquida	Sed. intero	fase liquida	fase liquida	fase liquida	fase liquida		
Endpoint	Bioluminescenza		Crescita algale	Mortalità	Mortalità	Mort. (48 h)	Mort. (7 gg)	Sviluppo larvale	Mortalità	Sviluppo larvale	Sviluppo larvale	Fecondazione	Sviluppo larvale
1ª tipologia		XA			XA			XC					
2ª tipologia	XA		XC	XA		XA			XA			XA	
3ª tipologia										XC	XC		XC

A = saggio acuto

C = saggio cronico/a lungo termine/subcronico/risp. subletale

Criteria Batteria: almeno un saggio per ogni tipologia



BATTERIA NON CONFORME

La non conformità va considerata esclusivamente sulla base dei requisiti richiesti dal nuovo regolamento sulla base della differente valenza assunta dai saggi biologici nel processo di caratterizzazione

Organismi e relativi saggi utilizzabili in ARPAM

Proposta ISPRA-ISS-CNR – Allegati Tecnici art 109, D.Lgs 152/06

Tabella 2.3 – Saggi biologici utili per l’allestimento della batteria. Con la “x” vengono indicati i possibili saggi alternativi per ciascuna tipologia

Gruppo	Batteri		Algae	Crostei					Molluschi Bivalvi		Echinodermi	
	Specie	Matrice	Endpoint	1ª tipologia	2ª tipologia	3ª tipologia						
	<i>Vibrio fischeri</i> (Bacteria)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Pheodactylum tricornutum</i> <i>Skeletonema costatum</i> (Algae)	<i>Amphibalanus amphitrite</i> (Crustacea)	<i>Corophium spp</i> (Crustacea)	<i>Acartia tonsa</i> (Crustacea)	<i>Tigriopus fulvus</i> (Crustacea)	<i>Crassostrea gigas</i> (Bivalvia)	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Bivalvia)	<i>Paracentrotus lividus</i> (Echinodermata)			
	fase liquida / fase solida	fase liquida	fase liquida	Sed. intero	fase liquida / Sed. intero	fase liquida	fase liquida	fase liquida	fase liquida			
	Bioluminescenza	Crescita algale	Mortalità	Mortalità	Mort. (48 h) / Mort. (7 gg) / Sviluppo larvale	Mortalità	Sviluppo larvale	Sviluppo larvale	Fecundazione / Sviluppo larvale			
		XA		XA			XC					
	XA		XC	XA		XA		XA				
						XC		XC				

A = saggio acuto

C = saggio cronico/a lungo termine/subcronico/risp. subletale

Possibili soluzioni per nuove batterie di saggi in ARPAM - 1

Proposta ISPRA-ISS-CNR – Allegati Tecnici art 109, D.Lgs 152/06

○ Saggi principali
 ○ Saggi alternativi

Tabella 2.3 – Saggi biologici utili per l’allestimento della batteria. Con la “x” vengono indicati i possibili saggi alternativi per ciascuna tipologia

Gruppo	Batteri		Algae	Crostei					Molluschi Bivalvi		Echinodermi		
Specie	<i>Vibrio fischeri</i> (Bacteria)		<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Pheodactylum tricornutum</i> <i>Skeletonema costatum</i> (Algae)	<i>Amphibalanus amphitrite</i> (Crustacea)	<i>Corophium</i> spp (Crustacea)	<i>Acartia tonsa</i> (Crustacea)		<i>Tigriopus fulvus</i> (Crustacea)	<i>Crassostrea gigas</i> (Bivalvia)	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Bivalvia)	<i>Paracentrotus lividus</i> (Echinodermata)		
Matrice	fase liquida	fase solida	fase liquida	fase liquida	Sed. intero	fase liquida	Sed. intero	fase liquida	fase liquida	fase liquida	fase liquida		
Endpoint	Bioluminescenza		Crescita algale	Mortalità	Mortalità	Mort. (48 h)	Mort. (7 gg)	Sviluppo larvale	Mortalità	Sviluppo larvale	Sviluppo larvale	Fecon-dazione	Sviluppo larvale
1ª tipologia		XA			XA			XC					
2ª tipologia	XA		XC	XA		XA			XA			XA	
3ª tipologia						XC				XC	XC		XC

A = saggio acuto

C = saggio cronico/a lungo termine/subcronico/risp. subletale

criterio Batteria: 3 saggi 3 diversi end point

Possibili soluzioni per nuove batterie di saggi in ARPAM - 2

Proposta ISPRA-ISS-CNR – Allegati Tecnici art 109, D.Lgs 152/06

○ Saggi principali
 ○ Saggi alternativi

Tabella 2.3 – Saggi biologici utili per l’allestimento della batteria. Con la “x” vengono indicati i possibili saggi alternativi per ciascuna tipologia

Gruppo	Batteri		Algae	Crostei					Molluschi Bivalvi		Echinodermi		
Specie	<i>Vibrio fischeri</i> (Bacteria)		<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Pheodactylum tricornutum</i> <i>Skeletonema costatum</i> (Algae)	<i>Amphibalanus amphitrite</i> (Crustacea)	<i>Corophium</i> spp (Crustacea)	<i>Acartia tonsa</i> (Crustacea)		<i>Tigriopus fulvus</i> (Crustacea)	<i>Crassostrea gigas</i> (Bivalvia)	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Bivalvia)	<i>Paracentrotus lividus</i> (Echinodermata)		
Matrice	fase liquida	fase solida	fase liquida	fase liquida	Sed. intero	fase liquida	Sed. intero	fase liquida	fase liquida	fase liquida	fase liquida		
Endpoint	Bioluminescenza		Crescita algale	Mortalità	Mortalità	Mort. (48 h)	Mort. (7 gg)	Sviluppo larvale	Mortalità	Sviluppo larvale	Sviluppo larvale	Fecon-dazione	Sviluppo larvale
1ª tipologia		XA			XA			XC					
2ª tipologia	XA		XC	XA		XA			XA			XA	
3ª tipologia							XC			XC	XC		XC

A = saggio acuto

C = saggio cronico/a lungo termine/subcronico/risp. subletale

Criteria Batteria: 4 saggi con 4 diversi end point

Il Dipartimento di Macerata



Il Laboratorio di Ecotossicologia





Stanze termostate a
diverse temperature
controllate

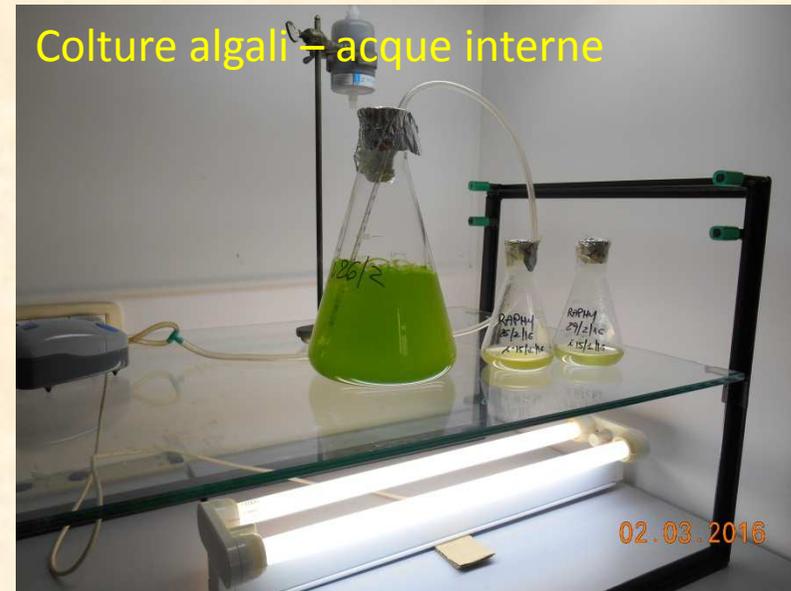
Centrifuga refrigerata e
Ultracentrifuga preparativa



Colture algali - mare



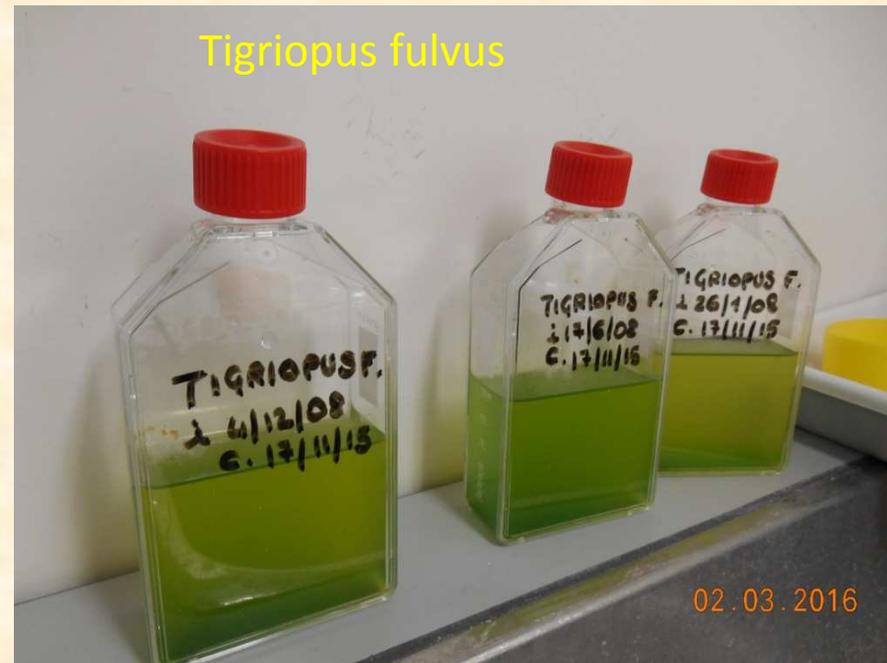
Colture algali - acque interne



Acartia tonsa e alghe



Tigriopus fulvus

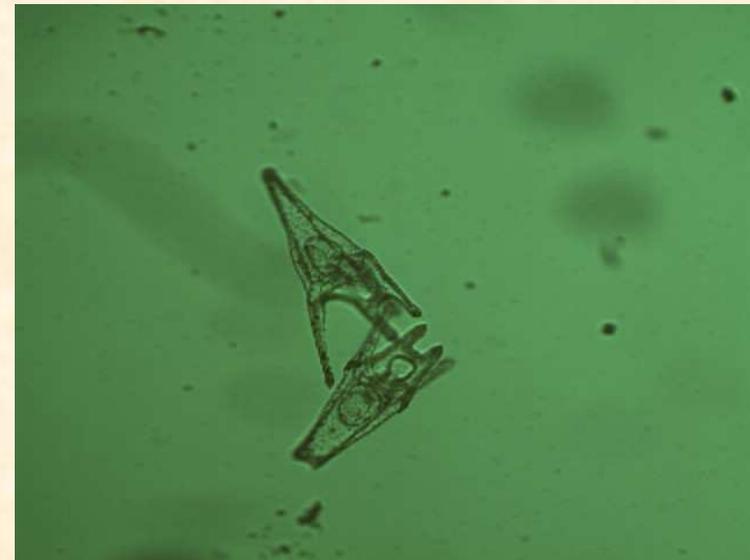
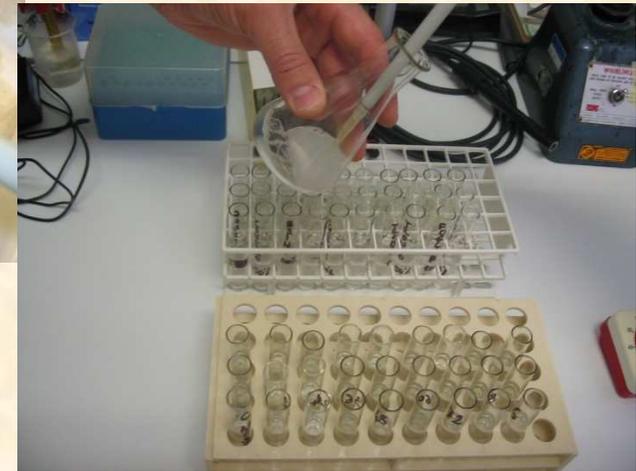
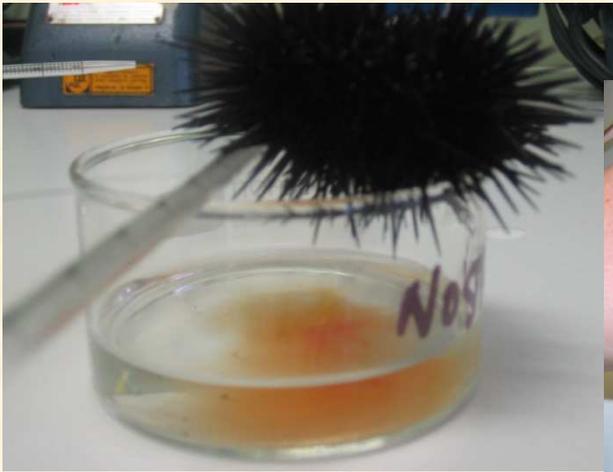




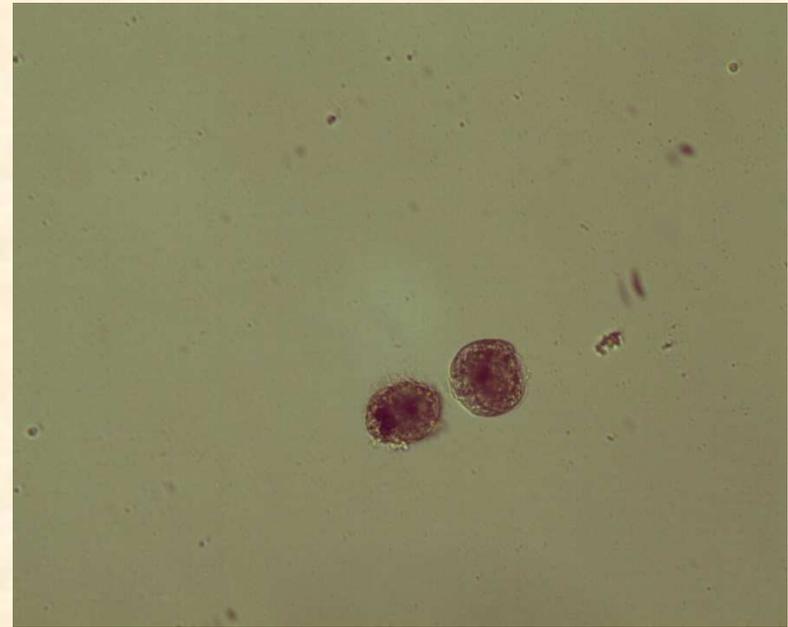
**Acquari per
Paracentrotus
e Mytilus**



Paracentrotus lividus – sviluppo embrionale



Mytilus galloprovincialis – sviluppo embrionale



Contaparticelle per saggio algale



Luminometri M 500 per saggio con Vibrio f.





Preparazione sedimento per
Saggio con Vibrio - SPT

Esecuzione
Saggio con Vibrio





Cappa a flusso laminare
per colture cellulari

Incubatore a CO2



ATTIVITA' FUTURE INERENTI L'ECOTOSSICOLOGIA IN ARPAM

- ATTIVITA' DI CUI AL REGOLAMENTO EX ART. 109 D.L. 152/2006
- ECOTOSSICITA' DEI RIFIUTI (HP14)
- ATTIVITA' CORRELATE AL REACH
- EFFETTI DEI CONTAMINANTI SUGLI ORGANISMI (MARINE STRATEGY)
- TOSSICITA' ACQUE REFLUE E LORO CONFORMITA' AL D.L. 152/2006
- ATTIVITA' DI APPROFONDIMENTO E SUPPORTO IN INDAGINI RELATIVE A GRAVE INQUINAMENTO AMBIENTALE

GRAZIE PER
L'ATTENZIONE

