

VALUTAZIONE ECOTOSSICOLOGICA DEI SEDIMENTI DEL TORRENTE LURA

Premessa

La presente relazione sintetizza i risultati delle indagini ecotossicologiche effettuate in relazione alla necessità di valutare gli impatti a carico dei sedimenti del torrente Lura, e attribuibili alla presenza sul territorio di diverse fonti di inquinamento antropico.

Al fine di valutare nel complesso l'effetto tossico dei contaminanti depositati a livello dei sedimenti è stato adottato un approccio multiplo, basato sull'utilizzo di una batteria di saggi ecotossicologici e test sia acuti che cronici. La scelta degli organismi da utilizzare per l'allestimento della batteria ha tenuto conto della valenza ambientale della matrice sedimento tal quale, dell'importanza degli elutriati per la verifica della quota idrosolubile dei microinquinanti aventi affinità per il sedimento, dell'utilizzo di organismi appartenenti a diversi livelli della catena trofica, della buona applicabilità, della relativa facilità di esecuzione dei test in laboratorio e delle esperienze pregresse.

Sono state sottoposti ad analisi campioni di sedimenti prelevati da due aree fluviali, a monte e a valle dell'area di intervento prevista dal progetto di laminazione. I due campioni analizzati verranno indicati, nel corso della relazione riassuntiva, con i seguenti codici:

Figura 1. Lura Monte (Lura_B)



Figura 2. Lura Valle (Lura_C)



Introduzione

L'ecotossicologia è stata definita nel 1969 da Truhaut, come una branca della tossicologia che mette insieme l'ecologia e la tossicologia classica, comprendendo sia lo studio delle interazioni biotiche e abiotiche che determinano la distribuzione degli organismi viventi che lo studio degli effetti dannosi delle sostanze sull'uomo. L'integrazione delle due discipline consente di valutare gli impatti delle sostanze chimiche e degli inquinanti, non solo al livello del singolo organismo ma anche sulle popolazioni ed interi ecosistemi.

Attraverso l'approccio ecotossicologico si ottengono dati per valutare il comportamento di sostanze chimiche ed inquinanti nell'ambiente e per definire il rischio attribuibile all'immissione stessa (Forbes & Forbes, 1994). Al fine di raggiungere questi obiettivi l'indagine ecotossicologica focalizza l'attenzione sulla distribuzione degli inquinanti nell'ambiente, con particolare riguardo al loro ingresso, alla circolazione, allo stoccaggio e alla trasformazione e sugli effetti degli stessi inquinanti sugli organismi viventi.

Il solo approccio chimico-analitico non riesce a fornire gli strumenti sufficienti per dare una definizione di rischio ambientale, né riesce a definire i possibili effetti tossici di una miscela di sostanze, e le relazioni esistenti tra di loro (di tipo additivo, sinergico o antagonista). Infatti le analisi chimiche-fisiche rilevano la presenza istantanea di specie chimiche, identificando lo specifico agente causativo, senza però rilevare gli effetti ed ignorando le sinergie. I test di tossicità sono invece in grado di individuare non solo gli effetti, su singoli individui o piccoli gruppi, ma anche l'effetto complessivo di tutte le sostanze presenti benché non ricercate a priori mostrando l'effetto sulle conseguenze sulla varietà e sulla numerosità della popolazione.

La stima della tossicità di un agente chimico, di una miscela di composti o di una matrice ambientale viene effettuata tramite l'allestimento di saggi di tossicità. Essi prevedono di sottoporre alcuni organismi alla sostanza in esame e/o a dosi crescenti della stessa, al fine rilevare una specifica risposta biologica (o danno). Si parla infatti di endpoint, ovvero di parametri che esprimono l'intensità dell'effetto. Si va da quelli più immediati (mortalità), ad altri quali la diminuzione della crescita corporea (biomassa o lunghezza del corpo), il malfunzionamento di alcuni processi fisiologici (respirazione o sintesi di enzimi), le variazioni nella struttura della comunità, modificazioni morfologiche, variazioni della vitalità (es. modificazioni fisiologiche) e danni al patrimonio genico. In linea generale i saggi ecotossicologici, sulla base del confronto statistico tra esposti e controlli, consentono di stabilire la relazione causa-effetto in funzione della concentrazione dell'esposizione. In particolare è possibile identificare una "soglia" (threshold) minima, al di sotto della quale non si osserva una mortalità statisticamente significativa, alla quale corrisponde una concentrazione NOEL (il più alto livello al quale non si è manifestato alcun effetto). La concentrazione LOEL è invece il livello minimo per il quale viene osservato un effetto statisticamente significativo.

Gli altri parametri più comunemente utilizzati per quantificare la risposta di saggi ecotossicologici, sono i seguenti:

- LD50 (dose letale mediana) e LC50 (concentrazione letale mediana): rappresenta la dose o la concentrazione di una sostanza chimica che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per somministrazione diretta;
- EC50 (concentrazione efficace mediana) e ED50 (dose efficace mediana) : rappresenta la concentrazione o la dose che produce nel 50% degli individui un effetto diverso dalla

morte (immobilizzazione, arresto della crescita in saggi sia acuti che cronici). Deve essere riferita al tempo di esposizione;

- LT50 (tempo letale mediano): rappresenta il tempo necessario a determinare la morte del 50% degli individui esposti;

Un bioindicatore è un organismo vivente o una specifica comunità vegetale o animale che, in presenza di un inquinante o miscele di inquinanti, subisce variazioni rilevabili dello stato naturale. Tali variazioni possono portare alla modifica della struttura della comunità nonché alla morte dell'organismo. Un organismo può quindi essere considerato un buon bioindicatore qualora manifesti reazioni identificabili a differenti concentrazioni di dati inquinanti. Inoltre un buon indicatore dovrebbe possedere sensibilità agli inquinanti, relazione e ampia distribuzione nell'area di indagine, scarsa mobilità, lungo ciclo vitale o comunque assimilabile alla durata del test, uniformità genetica. La scelta delle specie da utilizzare nei test di tossicità dipende dall'obiettivo che si vuole conseguire e dalla matrice che si vuol analizzare. Così si potranno scegliere organismi di diversi livelli trofici tali da dare risposte differenti in seguito ad esposizione ad una data matrice.

I saggi ecotossicologici, sulla base del tipo di tossicità stimata sono suddivisibili in acuti, subcronici e cronici. Nel primo caso viene misurato l'effetto che si manifesta in un breve tempo dopo la somministrazione di una singola dose di una sostanza o miscela. Generalmente il tempo di esposizione non deve essere superiore ad un terzo del tempo medio tra nascita e raggiungimento della maturità. Essi durano tra i 15 minuti e le 96 ore consentendo di valutare gli effetti tossici dovuti a fenomeni di contaminazione temporanei. I test acuti si basano, inoltre, sulla misura di una risposta individuale, come ad esempio mortalità, metabolismo, germinazione, produzione primaria, produzione secondaria, uptake ed escrezione. I saggi di tossicità subcronica evidenziano effetti dovuti all'esposizione ad una sostanza per un periodo inferiore o uguale ad un decimo della vita dell'organismo. Gli endpoint misurati sono la risposta dell'intero organismo come crescita, comportamento, patologia, oppure una risposta interna ad esempio biochimica, istologica e fisiologica. I saggi di tossicità cronica valutano delle risposte a lungo termine e consentono di calcolare un livello soglia di tossicità, ovvero quel livello di esposizione massimo che traccia il confine tra livelli efficaci e livelli non efficaci a tempo indeterminato. Quest'ultimi consentono di analizzare gli effetti che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo maggiore del 50% della vita dell'organismo e prende in considerazione la risposta di popolazioni (parametri demografici), di comunità (interazioni tra specie), o dell'intero ecosistema (interazioni totali).

Materiale e metodi

Per determinare i possibili effetti di sostanze chimiche (solide o liquide) incorporate nei sedimenti fluviali oggetto di indagine, le analisi sono state effettuate su campione fresco, sia sulla fase solida del sedimento che sulla fase estraibile acquosa (elutriato acquoso). Nel primo caso è stata stimata la tossicità della matrice attribuibile a sostanze e composti associati alle particelle del sedimento stesso e a quelle presenti nell'acqua interstiziale del sedimento. Le indagini sugli elutriati hanno fornito una valutazione della tossicità delle sostanze solubili in acqua e che possono essere rilasciate dal sedimento stesso.

La tossicità della matrice in analisi è stata valutata mediante una batteria di bioindicatori, al fine di analizzare il più ampio spettro di effetti su organismi con risposte differenti ai vari composti presenti. In tabella, sono riassunti i saggi, le metodiche utilizzate e le matrici testate.

SAGGIO	ENDPOINT	MATRICE	METODO
Test di fitotossicità	Germinazione e l'accrescimento radicale (72 h)	Sedimento	UNI 11357:2010
Saggio di tossicità cronica con <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	% Inibizione della crescita algale (72 h)	Elutriato	EN ISO 8692:2012
Saggio di tossicità acuta con <i>Daphnia magna</i>	% Immobilizzazione (24 h)	Elutriato	UNI EN ISO 6341:2013
Saggio di tossicità cronica con <i>Daphnia magna</i>	% Sopravvivenza (21 giorni) N° medio di neonati	Elutriato	ISO 10706:2000
Saggio di tossicità con <i>Vibrio fischeri</i> in fase solida	Bioluminescenza	Sedimento	SOLID PHASE TEST, SPT – Protocollo Microtox

Campionamento

In data 5-11-2015 sono stati prelevati due campioni di sedimento superficiale (compreso tra 0 e 10 cm) mediante Benna Van-Veen. Questa è costruita in acciaio inox e dispone di portellini d'ispezione (semicilindri) che dopo esser penetrati nel sedimento si chiudono mediante rotazione. Il campione prelevato viene definito "disturbato", in quanto non viene preservata l'integrità verticale ed orizzontale oltre che la stratificazione in livelli dello stesso.

Il materiale raccolto (circa 1,5 Kg) è stato riversato in un apposito contenitore in vetro (immagine 3), etichettato e conservato in condizioni refrigerate fino al trasferimento in laboratorio.



Figura 3. Contenitore per campione di sedimenti

Analisi di laboratorio

Le analisi ecotossicologiche sono state eseguite presso il Laboratorio di Igiene: Acque, alimenti, ambiente dell' Università Federico II di Napoli. Nell'arco delle 24 ore dall'arrivo del campione si è proceduto all'omogeneizzazione dello stesso, all' eliminazione del materiale grossolano (foglie, sassi, rametti, ecc) ed al recupero della porzione di sedimento di diametro < 2mm. È stato inoltre calcolata la percentuale di umidità e il peso secco, ottenuto con l'utilizzo di una termobilancia con temperatura di essiccazione di 80°C.

La preparazione degli elutriati ha seguito la norma "American Society of Testing and Materials ASTM, 1998 - Standard guide for conducting sediment toxicity test with freshwater invertebrates", che prevede la diluizione 1:4 peso secco/volume del sedimento con acqua bidistillata. La miscela è stata agitata per 30 minuti e lasciata sedimentare overnight. Il tempo di contatto tra matrice solida e solvente deve essere di circa 24 ore. L'elutriato è stato prelevato, filtrato e sottoposto a prove di tossicità.

Saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna* (UNI EN ISO 6341:2013)

Il saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna* permette di calcolare la concentrazione di sostanza (o matrice), o la diluizione di una soluzione, che provoca, in un tempo dato (24- 48 ore), l'immobilizzazione del 50% degli organismi usati per il saggio. I neonati di *Daphnia magna*, di età non superiore alle 48 ore, sono esposti a diverse concentrazioni della sostanza da analizzare o a diverse diluizioni di essa. A tempi prestabiliti si rileva il numero di daphnidi immobili o che presentano una modifica nel loro modo abituale di nuotare.

Al fine di valutare eventuali effetti tossici dei campioni da analizzare, è stata condotta una prova di confronto con l'elutriato tal quale, senza diluizioni dello stesso. Per il test sono stati utilizzati 20 neonati di *Daphnia magna*, divisi in 4 repliche con 5 animali ciascuna, e da 2 a 10 mL di campione per ogni animale (per un totale di 10-50 mL di campione con 5 daphnidi per replica). I contenitori sono stati esposti per 24 ore al buio e alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante questo periodo agli animali non è stata somministrata alcuna alimentazione. È stato preparato un controllo negativo costituito da acqua di allevamento, di volume pari al volume del campione da saggiare e comprendente lo stesso numero di daphnidi. Al termine delle 24 ore sono stati contati gli organismi immobili, ossia incapaci, dopo lieve agitazione, di nuotare per 15 secondi. I risultati ottenuti sono espressi tenendo conto del rapporto tra numero di organismi immobilizzati e numero totale di organismi utilizzati per il test (% immobilizzazione). Tale parametro corrisponde alla percentuale di tossicità del campione. Il saggio è ritenuto valido qualora al termine dell'esposizione la percentuale di neonati immobili nel controllo non sia superiore al 10 %.

Saggio di tossicità cronica con *Daphnia magna* (ISO 10706:2000)

Il saggio ha una durata di 21 giorni e deve essere eseguito in condizioni controllate di temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e illuminazione (fotoperiodo 16/8 ore - luce/buio). A differenza del test acuto durante i test gli organismi vengono alimentati per somministrazione di cibo (sospensione di alghe verdi unicellulari e lievito) e sottoposti al ricambio di acqua d'allevamento, con cadenza bisettimanale. Tutti i giorni si monitora la sopravvivenza e la riproduzione (in termini di nuovi nati). Alla fine del test viene calcolata la sopravvivenza media percentuale, che deve essere superiore ad un valore di 80% per l'accettabilità del test, e la riproduzione media espressa come numero totale di neonati/individuo.

Saggio di tossicità algale con *Pseudokirchneriella subcapitata* (ISO 8692:2012)

I saggi tossicologici con le alghe verdi costituiscono un valido strumento di indagine per le attività di monitoraggio ambientale e per fornire risposte utili sugli effetti di eventuali inquinanti sulle acque. Lo scopo del saggio è valutare gli effetti tossici degli inquinanti, presenti nella matrice acquosa, sulla crescita di *Pseudokirchneriella subcapitata*. Colture selezionate di tale alga, nella fase esponenziale di crescita, sono esposte a determinate concentrazioni della sostanza o del campione in esame per un periodo di tempo corrispondente a varie generazioni ed in condizioni ben definite. Si determina quindi l'inibizione della crescita rispetto ad una coltura di controllo durante il periodo stabilito. Il saggio può essere utilizzato con tutti i composti chimici solubili in acqua e con tutte quelle sostanze che non interferiscono direttamente con il metodo di misura scelto per la valutazione della crescita algale.

Il saggio algale è stato allestito inoculando nei campioni di elutriato da esaminare, una quantità standardizzata di sospensione algale a concentrazione nota e costante (10^4 cellule/mL). L'inoculo da utilizzare per il saggio è stato preparato a partire dalla coltura di mantenimento con alghe in fase di crescita esponenziale. Al fine di rispettare i requisiti analitici, un'aliquota di sospensione algale è stata sottoposta a conteggio cellulare mediante camera di Burker, e diluita opportunamente per raggiungere la densità necessaria per l'inoculo per ciascun inoculo. I campioni di elutriato sono stati saggiati tal quale, senza diluizione iniziale, al fine di valutarne la tossicità in via preliminare. I campioni inoculati sono stati incubati in frigotermostato a $20-25^\circ\text{C}$, sottoposti ad illuminazione continua con intensità luminosa non inferiore a 7000 Lux e ad agitazione continua. Dopo 72 ore di incubazione, per ciascun campione è stata misurata la crescita algale ed il tasso di crescita specifico. Così come

da metodica di riferimento si considerano tossici quei campioni che mostrano una percentuale di effetto superiore al 20%.

Saggio di tossicità acuta con *Vibrio fischeri* su sedimento (SOLID PHASE TEST - Protocollo Microtox - ISO 11348-3, 1998)

Questa procedura permette agli organismi di entrare in contatto diretto con il campione solido previa sospensione dello stesso in un mezzo acquoso. Questa prova fornisce, in genere, risultati con tossicità uguali o più alte rispetto alle prove sugli elutriati, probabilmente a causa di una maggiore biodisponibilità dovuta al contatto diretto delle particelle con gli organismi batterici. Il Protocollo Microtox prevede l'esposizione dei batteri, appartenenti alla specie *Vibrio fischeri*, al sedimento a concentrazioni scalari per 10 minuti, al fine di calcolare il valore di EC₅₀, espresso in grammi di peso secco/L.

Test di germinazione ed allungamento radicale (UNI 11357:2010)

Il test di germinazione ed allungamento radicale permette di valutare l'eventuale tossicità di un campione misurando l'inibizione della germinazione e/o dell'allungamento radicale di semi posti a contatto con la soluzione di prova, confrontandola con appositi controlli (in assenza dell'agente interferente). Per il test sono stati utilizzati i semi di *Lepidium sativum*, *Sorghum saccharatum*, *Cucumis sativus* e *Lactuca sativa*, al fine di valutare le risposte di indicatori a differente livello di sensibilità.

Il test, è stato effettuato su tre dicotiledoni (*Lepidium sativum*, *Cucumis sativus*, *Lactuca sativa*) e una monocotiledome (*Sorghum saccharatum*) e, come da metodica, consente di rilevare due diversi endpoints, germinazione ed allungamento radicale, che insieme forniscono l'Indice di Germinazione % (IG%).

A tal fine in capsule Petri dal diametro di 100 mm, è stato distribuito l'equivalente di 10 grammi di peso secco di ogni campione di sedimento (porzione < 2mm) e, previa aggiunta di acqua fino al raggiungimento del 100% di ritenzione idrica, si sono introdotti 10 semi di ciascuna specie, effettuando quattro repliche per ciascun campione. Il test con il controllo negativo, anch'esso in quattro repliche, è stato preparato con matrice solida di riferimento e rispettando le stesse modalità dei campioni oggetto di indagine (USEPA, 1994). I campioni sono incubati al buio ed alla temperatura di 25 ± 2°C per 72 ore. Al termine della prova per ciascuna replica e per ciascun campione è stato contato il numero di semi germinati e misurata la lunghezza radicale di ciascun seme. Sono stati calcolati gli indici di germinazione percentuale, riferiti al controllo negativo, il numero di semi germinati e la lunghezza media dell'allungamento radicale dei semi germinati.

Risultati

L'analisi ecotossicologica è stata eseguita su due campioni di sedimento fluviale, indicati come Lura_B e Lura_C.

In tabella sono schematizzati i risultati, suddivisi per saggio e per campione.

CAMPIONE	METODO	RISULTATO	U.M.
Lura_B	ISO 8692:2012	3,8 ± 0,9	% Inibizione della crescita algale (72 ore)
	UNI EN ISO 6341:2013	0	% immobilizzazione (24 ore)
	ISO 10706:2000	100	% sopravvivenza (21 giorni)
		40	N° medio di neonati per daphnia (21 giorni)
	UNI 11357:2010	103,2 ± 0,6	IG% <i>Lepidium sativum</i> (72 ore)
		116,3 ± 0,4	IG% <i>Cucumis sativus</i> (72 ore)
		101,4 ± 0,2	IG% <i>Lactuca sativa</i> (72 ore)
		100,3 ± 0,8	IG% <i>Sorghum saccharatum</i> (72 ore)
SOLID PHASE TEST, SPT - Protocollo Microtox	> 20%	% effetto	
Lura_C	ISO 8692:2012	2,8 ± 0,5	% Inibizione della crescita algale (72 ore)
	UNI EN ISO 6341:2013	0	% immobilizzazione (24 ore)
	ISO 10706:2000	100	% sopravvivenza (21 giorni)
		35	N° medio di neonati per daphnia (21 giorni)
	UNI 11357:2010	107,5 ± 0,4	IG% <i>Lepidium sativum</i> (72 ore)
		119,2 ± 0,7	IG% <i>Cucumis sativus</i>

		(72 ore)
	103,6 ± 0,2	IG% <i>Lactuca sativa</i> (72 ore)
	101,8 ± 0,8	IG% <i>Sorghum saccharatum</i> (72 ore)
SOLID PHASE TEST, SPT – Protocollo Microtox	< 20%	% effetto

Per quanto riguarda il Test acuto con *D. magna* la risposta dei neonati dopo 24 ore è stata valutata come inibizione della mobilitazione e misurata come percentuale di organismi immobili nel campione di prova (percentuale di effetto) al termine di ogni singolo periodo di esposizione. Per i valori limite di tossicità si è fatto riferimento ai dati presenti in bibliografia (OECD, 2004).

% Immobilizzazione	Giudizio di tossicità
<20	non tossico
≥ 20 < 50	poco tossico
≥ 50	tossico
> 50	molto tossico
> 80	estremamente tossico

Per entrambi i campioni una % di immobilizzazione pari a 0 indica un'assenza di tossicità, escludendo la presenza di sostanze a potenziale tossico.

Per quanto riguarda il test cronico con *D. magna* la percentuale di sopravvivenza a 21 giorni esprime la capacità degli organismi testati di soddisfare le proprie esigenze fisiologiche. In tabella i valori di riferimento per il giudizio di tossicità (OECD, 2012).

% Sopravvivenza	Giudizio di tossicità
> 80	non tossico
≤ 80 > 50	poco tossico
≤ 50	tossico
< 20	estremamente tossico

Per entrambi i campioni la % di sopravvivenza è pari al 100% quindi la massima riscontrabile in assenza di tossicità. Tenendo conto dei valori di validità del test della ISO, il parametro relativo al numero medio di nati indica, anche in questo caso, un'assenza di tossicità per entrambi i campioni.

Per il test di inibizione della crescita algale la risposta dell'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* è stata valutata come inibizione della crescita (Ir %) e misurata come riduzione del tasso di crescita rispetto al controllo. In tabella si riassumono i valori limite presi in riferimento per la valutazione della tossicità dei campioni (OECD, 2006).

Inibizione crescita %	Giudizio di tossicità
0 - 50	Da nessun effetto a debolmente tossico
51 - 100	Da tossico a molto tossico

I valori delle percentuali di inibizione della crescita, rispettivamente $3,8 \pm 0,9$ e $2,8 \pm 0,5$ per i campioni Lura_B e Lura_C escludono tossicità evidenziando un effetto prossimo a quello rilevabile nel controllo.

Per quanto riguarda il test Vibrio in fase solida, in base a quanto definito dalle metodiche di riferimento, i valori che si discostano dal controllo più del 20 % sono considerati differenti da quest' ultimo, ovvero si considerano tossici i campioni per i quali viene registrata una inibizione ≥ 20 %, mentre si considerano non tossici i campioni che hanno causato una percentuale di effetto ≤ 20 %. L'analisi del sedimento tal quale con i batteri bioluminescenti ha evidenziato una percentuale di effetto inferiore al 20% e quindi assenza di tossicità, valore non esprimibile con il parametro EC₅₀. Al contrario è stato riscontrato un valore di EC₅₀ pari a 119 mg/L per il Campione Lura_B.

Per il saggio di fitotossicità, la valutazione d'effetto tiene conto di due differenti *endpoint*: numero medio di semi germinati e lunghezza media dell'allungamento radicale dei semi germinati, combinati tra loro per fornire un indice di germinazione percentuale. Se tale valore nei campioni è maggiore dello stesso calcolato per il controllo ci troviamo di fronte ad una condizione di biostimolazione; se il valore calcolato per i campioni è inferiore a quello del controllo si parla di inibizione.

IG %	Giudizio di tossicità
IG controllo > IG campione	Inibizione della crescita
IG controllo < IG campione	Stimolazione della crescita

Nel caso dei campioni oggetto di indagine i valori degli indici di germinazione calcolati escludono tossicità. Per il campione Lura_B i valori percentuali sono, nel caso di Sorgo,

Lattuga e *Lepidium* assimilabili ai valori del controllo e rispettivamente pari a $100,3 \pm 0,8$, $101,4 \pm 0,2$ e $103,2 \pm 0,6$. Il centriolo, con un valore di germinazione percentuale pari a $116,3 \pm 0,4$ mostra una leggera biostimolazione. Per il campione Lura_C gli organismi hanno evidenziato una stessa scala di sensibilità; i valori di Inibizione percentuale riscontrati per il test con *Cucumis* mostra una biostimolazione maggiore, se confrontata con quella del campione di monte.

Discussioni

La presente relazione sintetizza i risultati delle indagini ecotossicologiche effettuate in relazione alla necessità di valutare gli impatti a carico dei sedimenti del torrente Lura, e attribuibili alla presenza sul territorio di diverse fonti di inquinamento antropico.

I saggi ecotossicologici applicati hanno evidenziato assenza di tossicità, per i due campioni di sedimenti, per la quasi totalità degli organismi utilizzati. I saggi di fitotossicità hanno mostrato fenomeni di biostimolazione (nel caso del cetriolo), che potrebbe essere attribuita alla presenza di nutrienti favorevoli la germinazione e la crescita degli organismi test. La maggior biostimolazione riscontrata nei campioni a valle si spiegherebbe considerando la deposizione graduale di sostanze lungo il corso del fiume e quindi ad una loro maggiore concentrazione.

Per quanto concerne il saggio di *Vibrio* in Fase solida è emersa una tossicità del campione Lura_B e un valore di EC_{50} pari a 119 mg/L. Questo significa che una concentrazione pari a 119 mg/L ha un effetto tossico sul 50% degli individui. Tale risultato potrebbe essere dovuto alla maggior sensibilità dell' organismo nei confronti di sostanze tossiche, rispetto a quella valutata per gli altri bioindicatori.

Tenendo conto di uno studio pregresso, condotto nel 2006 e riportato nella "Relazione di inquadramento ecologico ambientale del torrente Lura" documento B.10.00 del Progetto esecutivo delle opere di laminazione, utilizzando il test in fase solida su *Vibrio fischeri*, il dato di tossicità rinvenuto nel campione Lura_B rispecchia la situazione passata di tossicità.

Tuttavia, così come ampiamente riportato in bibliografia (Ghirardini, 2009, Onorati, 2001), il risultato del test in fase solida potrebbe essere influenzato da parametri intrinseci alla matrice ambientale analizzata, tra cui: la presenza di composti chimici a base di ammoniaca o zolfo, le interferenze fisiche con la bioluminescenza a causa della presenza di particelle non eliminate per filtrazione e variazioni di pH dovute agli *step* di diluizione.

In ultima analisi, per un'attenta valutazione di insieme della tossicità di un campione, è risultato estremamente fondamentale l'allestimento di una batteria di saggi. Quest'ultima, basandosi su organismi appartenenti a differenti livelli trofici e, a differente sensibilità, ha consentito di monitorare nella sua interezza la matrice ambientale che per sua natura, possiede un'elevata complessità strutturale e di composizione.

Emerge, inoltre, la necessità di seguire l'andamento dei livelli di tossicità per rivelare la presenza futura di contaminazioni.

Bibliografia

Truhaut, R. (1977), Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1: 151-173.

American Society of Testing and Materials (ASTM). Standard guide for conducting sediment toxicity test with freshwater invertebrates (1998).

ISO 10706:2000 Water quality -- Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).

OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test (2012).

UNI 11357-2010 water quality - determination of the inhibition of the seed germination and root elongation of *cucumis sativus* l. cucumber , *lepidium sativum* l. water cress , *sorghum saccharatum* moench sorghum - short-chronic toxicity test.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (2006).

OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Test No.202: *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test (2004).

UNI EN ISO 6341:2013 - Qualità dell'acqua - Determinazione dell' inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicità acuta.

UNI EN ISO 8692:2012 - Qualità dell'acqua - Prova di inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi.

ISO 11348-3 (1998). Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test).

Annamaria Volpi Ghirardini, Marco Girardini, Davide Marchetto, Claudio Pantani, 2009. Microtox® solid phase test: Effect of diluent used in toxicity test.

Onorati F., Volpi Ghirardini A., 2001. Informazioni fornite dalle diverse matrici da testare con i saggi biologici: applicabilità di *Vibrio fischeri*.