

**Messa a punto di Metodi Ecotossicologici sui  
Rifiuti:**

***VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ DI  
PRODOTTI DISPERDENTI DEL PETROLIO***

**Dott. Fabio Cadoni**

**Tutor:  
Dott.ssa Stefania Balzamo**

# 1. Cenni di ecotossicologia

## 1.1 Introduzione

L'Ecotossicologia è la scienza che studia gli effetti di sostanze tossiche sugli ecosistemi utilizzando fattori fisici (calore, radiazioni), chimici e biologici. Il termine Ecotossicologia è composto da due parole: "ECOLOGIA" (studio scientifico delle interazioni che determinano la distribuzione e l'abbondanza degli organismi) e "TOSSICOLOGIA" (la scienza dei veleni) (Ramade,1977).

Il veleno è quella sostanza chimica che, tramite interazioni fisico-chimiche con un organismo vivente, può causare danni o addirittura portare alla morte dell'organismo stesso. Tuttavia è risaputo che qualsiasi sostanza è un potenziale veleno a quantità eccessive. Ad esempio 1-2 cucchiaini di arsenico possono essere letali per un uomo, ma anche 300 g di comune sale da cucina ingeriti in una sola volta lo sono. Quindi, oltre la sostanza è importante conoscere l'"esposizione" della sostanza sull'organismo, ovvero la quantità o concentrazione della sostanza che in un determinato periodo interagisce con l'organismo. Un'esposizione tollerabile non è nociva, mentre una esposizione eccessiva è nociva.

Gli organismi non solo sono soggetti a esposizione di inquinanti "naturali", ma sono anche esposti ad inquinanti detti *xenobiotici*, cioè composti chimici, come i pesticidi sintetici, che prima non esistevano in natura, ma ora sono abbondanti a causa dello svilupparsi di industrie e di nuove tecnologie in agricoltura. Gli organismi quindi, vengono a contatto con sostanze chimiche prodotte dall'inquinamento antropico e subiscono grandi danni anche da piccole quantità, poiché non hanno avuto il tempo necessario per sviluppare una risposta efficace.

L'inquinamento antropico si può sintetizzare in tre differenti fenomeni:

- 1- Il rilascio non intenzionale di inquinanti a seguito di attività umane (ad esempio le attività minerarie, gli incidenti a veicoli e navi, gli incendi, ecc.);
- 2- L'immissione diretta di rifiuti in forma gassosa, liquida o solida (emissioni in atmosfera, reflui urbani ed industriali, discariche, ecc.).
- 3- La deliberata applicazione di biocidi (ad esempio per il controllo di agenti infestanti o dei vettori di malattie).

## **Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio**

Come detto prima, un inquinante diventa tossico quando la sua concentrazione supera il livello di tollerabilità in un “comparto” ambientale, sia esso l'intero pianeta o un singolo ecosistema, oppure un solo organismo, o un piccolo organello cellulare.

Fino a poco tempo fa, ma spesso anche oggi, per non superare il livello di tollerabilità di inquinanti, si applica una politica per nulla ecocompatibile con l'ambiente: gli inquinanti vengono diluiti in una porzione ambientale più grande possibile. Ecco allora che il mare diventa la discarica generale di tutti i possibili rifiuti. Difatti i mari e gli oceani ricevono sostanze inquinanti dai fiumi, dall'atmosfera (deposizioni umide o secche) e dallo scarico diretto di fogne, che vi immettono rifiuti urbani e industriali, spesso senza alcun tipo di trattamento. Considerando che oltre la metà della popolazione umana vive entro 100 Km dalle coste, la maggiore concentrazione di inquinanti riversati nei mari si ha nelle aree costiere (città, industrie costiere, porti, estuari, ecc.).

Di notevole rilievo è l'inquinamento causato dal petrolio, che viene riversato per circa il 30% in mare nel corso di operazioni di estrazione e trasporto (esplosioni durante le trivellazioni al largo, incidenti delle petroliere, lavaggio di serbatoi, perdite dalle tubazioni e dai serbatoi); oltre la metà del petrolio che raggiunge mari e oceani deriva tuttavia da scarichi urbani o industriali nel terreno o nelle fognature; solo il 10% deriva dall'atmosfera, mentre il rimanente 10% ha origini diverse, anche naturali (Clark, 1992).

### 1.1.1 Inquinanti inorganici

Tra le varie sostanze che inquinano ci sono gli inquinanti inorganici, ed in particolare i metalli, che non sono biodegradabili e tendono ad essere ritenuti nell'ambiente. Tuttavia alcuni componenti inorganici reagendo e legandosi a composti organici, come ad esempio il mercurio, che per metilazione diventa metilmercurio, cambiano le proprie caratteristiche chimiche e tossicologiche.

Nel 1987 la produzione di mercurio nel pianeta ammontava a circa 6000 tonnellate, di cui il 20% raggiungeva il mare. Dagli anni 60, dopo i casi di morte da avvelenamento da mercurio verificatosi a Minamata in Giappone, l'immissione di mercurio nell'ambiente è stata drasticamente ridotta.

Gli inquinanti inorganici, una volta immessi nell'ambiente, si associano a particelle solide (suolo o sedimenti), aumentando il loro tempo di residenza. Invece, per gli isotopi

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

radioattivi bisogna fare un discorso a parte: questi, a causa del loro spontaneo decadimento a isotopi stabili, hanno una persistenza nell'ambiente determinata dalle rispettive semivite, che variano da pochi secondi o giorni a migliaia o milioni di anni (Baudo,...).

### 1.1.2 Inquinanti organici

Con il termine di “composti organici” si indicano tutti quei composti che contengono carbonio (con l'eccezione del monossido e del biossido di carbonio). Esistono milioni di combinazioni di composti con il carbonio vista la capacità di formare legami stabili con se stesso, nonché con gli atomi di idrogeno, ossigeno e azoto.

I composti con solo carbonio e idrogeno hanno una bassissima polarità. Con l'introduzione nella molecola di gruppi funzionali –OH, –CH=O o –NO<sub>2</sub>, invece tali composti tendono ad acquistare una carica elettrica e diventano tanto più reattivi quanto più aumenta la loro polarità. Aumentando la polarità aumenta anche la loro capacità di interagire con l'acqua; e con la presenza di particolari gruppi funzionali, i composti organici aumentano la capacità di interagire con il metabolismo degli esseri viventi ed eventualmente di produrre effetti tossici (Baudo,.....).

Nel corso dell'evoluzione gli organismi hanno sviluppato una difesa contro gli effetti tossici dei composti organici naturali, come quelli prodotti da incendi di foreste e eruzioni vulcaniche o composti prodotti dalle piante per difendersi dai loro consumatori.

Le piante, per sopravvivere, hanno selezionato nel corso della loro evoluzione meccanismi di difesa come spine, uncini, ecc., e sostanze chimiche come morfina, caffeina, tannini, fenoli, lattici, ecc. (dei veri e propri veleni). A loro volta gli erbivori hanno sviluppato difese biochimiche e comportamenti che permettono loro di nutrirsi anche di questi vegetali. I meccanismi coevolutivi di piante e animali sono basati “su una silenziosa lotta di adattamento e controadattamento che nessuno dei due contendenti può permettersi di perdere”(Howe e Westley,1996).

In questi ultimi decenni ,la lotta contro i composti organici è diventata ancora più dura a causa dell'introduzione di nuovi composti mai esistiti in natura, ma sintetizzati dall'uomo (composti xenobiotici).

Sostanzialmente, i prodotti organici inquinanti che interessano l'ecotossicologia rientrano nelle seguenti categorie:

- idrocarburi

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

- policlorodifenili (PCB)
- dibenzodiossine policlorurate (PCDD)
- dibenzofurani policlorurati (PCDF)
- polibromodifenili
- pesticidi
- composti metallorganici
- detergenti
- clorofenoli.

### 1.2 Biomonitoraggio

Più grave e diffusa diventa la concentrazione ambientale delle sostanze inquinanti, più necessaria e urgente diviene la necessità di conoscere gli effetti che tali inquinanti hanno sull'ambiente e sulle specie viventi. E' proprio questo il ruolo del biomonitoraggio, che ci indica la "salute" degli ecosistemi, in modo particolare di quelli in cui è stata rilasciata una concentrazione biologicamente significativa di un inquinante. In ecotossicologia, il biomonitoraggio si applica attraverso un saggio ecotossicologico, che dev'essere ripetuto nel tempo attraverso un protocollo ben definito, in cui l'attività di una sostanza chimica è misurata come un effetto avverso su alcune specie test (Hopkin, 1993).

Inoltre, il biomonitoraggio si avvale delle variazioni ecologiche indotte dalle alterazioni dell'ambiente; queste ultime si manifestano a tre diversi livelli:

- accumulo di sostanze inquinanti negli organismi;
- modificazioni morfologiche e strutturali degli organismi;
- modificazioni nella composizione delle comunità animali e vegetali

La tossicologia ambientale moderna basa il biomonitoraggio, oltre che sulla misurazione delle concentrazioni di inquinanti presenti negli organismi, anche sulla risposta evolutiva che organismi, popolazioni o comunità naturali hanno dopo il contatto con una o più sostanze inquinanti. Tali organismi sono chiamati bioindicatori, piante o animali sensibili, che reagiscono rapidamente a concentrazioni anche basse di vari inquinanti, mostrando sia danni visibili che accumulo di inquinanti nei loro tessuti e organi che effetti sui loro processi metabolici.

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

I bioindicatori consentono di individuare fenomeni di inquinamento già nella loro fase iniziale, permettendo quindi di intervenire con la necessaria tempestività (Bullini...).

Già dalla presenza o assenza del bioindicatore in un determinato ecosistema è possibile capire e comprendere le specifiche caratteristiche dell'ecosistema stesso (ad esempio la trota è indicatore di acque ossigenate, le eriche mediterranee sono indicatori di suoli acidi).

I bioindicatori vengono spesso utilizzati per calcolare la *bioconcentrazione* degli inquinanti. Per bioconcentrazione (BCF) si intende il rapporto tra la concentrazione di un inquinante in un organismo e quella dello stesso inquinante nel suo ambiente. Se il rapporto è un numero maggiore di uno, si ha un bioaccumulo dell'inquinante nell'organismo, cioè per un composto chimico i processi biochimici favoriscono l'assunzione e la ritenzione del composto.

Già in passato si è osservato che i vegetali hanno la capacità di immagazzinare nei loro tessuti sostanze inquinanti. Attraverso radici e foglie, assumono inquinanti dal suolo e dall'atmosfera, raggiungendo in alcuni casi concentrazioni 4-5 volte superiori a quelle dell'ambiente in cui vivono.

Gli animali terrestri invece, assumono gli inquinanti dal cibo, dall'acqua, oppure direttamente dall'aria o dalle superfici solide con le quali vengono a contatto tramite l'epidermide.

Alcune sostanze, piuttosto che disperdersi lungo i passaggi da un livello trofico al successivo, aumentano la loro concentrazione. Questo processo prende il nome di *magnificazione biologica* ed è un fenomeno drammaticamente illustrato dal comportamento di certi pesticidi e radionuclidi persistenti. La particolare tendenza a concentrarsi attraverso i passaggi nelle catene alimentari da parte di alcuni radionuclidi prodotti dalla fissione ed attivazione atomica, fu scoperta fin dagli anni '50, dalla commissione per l'energia atomica dell'impianto di Hanford presso Washington.

Fu infatti osservato che piccole quantità radioattive di iodio, fosforo, cesio e stronzio rilasciati nel fiume Columbia, tendevano a concentrarsi nei tessuti di pesci e uccelli. Si poté quindi determinare per un singolo elemento, il fattore di concentrazione, inteso come il rapporto tra la quantità dell'elemento radioattivo nei tessuti e la quantità dello stesso nell'acqua. Se ne dedusse che gli scarichi considerati "sicuri" per l'acqua potevano diventare altamente tossici per tutti i componenti delle catene alimentari dipendenti dal fiume.

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Un altro esempio di tale comportamento è dato dall'uso dell'insetticida DDT. Per combattere le zanzare a Long Island, gli acquitrini furono trattati per molti anni con DDT. Gli specialisti nel controllo degli insetti utilizzarono concentrazioni non letali per i pesci e per le altre forme di vita, ma non presero in considerazione i processi ecologici ed il fatto che i residui del DDT sono tossici per lungo tempo. Questi infatti, invece di riversarsi nel mare e di disperdersi come avevano previsto, vennero assorbiti dalle particelle di detrito. A questo punto i residui tossici si concentrarono in maniera esponenziale nei tessuti dei detritivori, poi nei tessuti dei loro predatori, fino all'ultimo anello della catena alimentare (W.E. Odum, Woodwell e Wurstel 1969). Tutto ciò vale anche per i PCB e le diossine che, oltre ad avere un'alta tossicità, si concentrano in alcuni anelli della catena alimentare fino ad arrivare all'uomo.

Lo studio del modello della catena del detrito indica che ogni sostanza adsorbita dalle particelle di detrito e di terreno e poi ingerita dagli organismi viene concentrata dal processo di ingestione-reingestione che si verifica lungo la catena del detrito.

In generale, un inquinante tende ad essere assimilato non in maniera proporzionale alla sua quantità, ma alla frazione del totale presente che è effettivamente disponibile per l'organismo. Tale *biodisponibilità* varia per i diversi inquinanti e, se si tratta dello stesso inquinante, per le varie forme in cui si presenta nell'ambiente. Anche fattori ambientali come temperatura, pH, concentrazione dell'ossigeno concorrono nel modificare la biodisponibilità degli inquinanti. Inoltre la biodisponibilità di un inquinante può variare nello stesso ambiente, nel suolo, nell'acqua e nell'atmosfera.

La *bioindicazione*, definita come “un cambiamento della struttura o della funzione dei processi biochimici o cellulari, indotto da un contaminante”, fornisce informazioni sia qualitative sia semiquantitative sulla natura del danno chimico arrecato e sul rapporto tra effetti e danni arrecati all'ambiente (Colborn *et al.*, 1993, NRC, 1989 ).

Nella tabella 1 sono indicati, a titolo di esempio, alcune bioindicazioni per metalli pesanti e per altri agenti inquinanti organici, usati nella ricerca ecotossicologica. Queste forniscono differenti tipi di informazione: avvertono della presenza di un potenziale problema di una specifica categoria di contaminanti e danno un'indicazione sugli effetti ecologici possibili che si possono avere su una popolazione e comunità, per una esposizione a lungo termine.

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

**Tabella 1-Bioindicazioni per metalli pesanti e per altri agenti inquinanti organici, usati nella ricerca ecotossicologica**

<b>Contaminante</b>	<b>Bioindicazione</b>	<b>Avvertenza</b>
<b>Metalli pesanti</b>		
<b>Cu, Hg, Ag, Zn, Cd, Pb</b>	<b>Variazione del DNA</b>	<b>S</b>
	<b>Metallotionine</b>	<b>S D</b>
	<b>Porfirine</b>	<b>S D P</b>
	<b>Risposta immunitaria</b>	<b>S</b>
	<b>Reazioni multienzimatiche</b>	<b>S</b>
<b>Composti organici</b>		
<b>1) PAHs</b>	<b>Variazione del DNA</b>	<b>S D P</b>
	<b>Reazioni multienzimatiche</b>	<b>S D</b>
	<b>Risposta immunitaria</b>	<b>S</b>
<b>2) PCbs, DDT, HCB, TCDD</b>	<b>Reazioni multienzimatiche</b>	<b>S</b>
	<b>Porfirine</b>	<b>S</b>
	<b>Risposta immunitaria</b>	<b>S</b>
	<b>Variazione del DNA</b>	<b>S D</b>
<b>3) Organofosfati Carbammati</b>	<b>Attività esterasica del sangue</b>	<b>S D</b>
	<b>Attività esterasica del cervello</b>	<b>S D P</b>

**S** = segnale di un potenziale problema

**D** = indicatore definitivo o tipo o classe di inquinante

**P** = indicatore preventivo di un effetto nocivo per una lunga esposizione

## **2. I disperdenti**

I sistemi di recupero degli sversamenti di petrolio mirano a minimizzare il danno che potrebbe causare il petrolio fuoriuscito in mare. I disperdenti vengono utilizzati come sistema di recupero e costituiscono un rimedio pratico in grado di contrastare efficacemente gli sversamenti di petrolio.

A seguito della fuoriuscita del petrolio in mare, una piccola quantità viene dispersa dal naturale moto ondoso. Questo processo di dispersione, nella maggior parte delle volte, può essere lento e limitato a piccole porzioni. L'utilizzo dei disperdenti, accelera il processo naturale di dispersione del petrolio, diminuendo la sua concentrazione e rendendolo più facilmente biodegradabile dai microrganismi naturali. Il petrolio disperso ha un minore impatto sull'ambiente rispetto al petrolio che persiste sulla superficie del mare, poiché quest'ultimo può essere trasportato fino a terra contaminando le coste.

I primi disperdenti usati erano molto tossici per la vita marina in quanto contenevano nei solventi composti aromatici come benzene, xilene e toluene. Essi erano concepiti specialmente per rispondere a una primaria esigenza: rimuovere il petrolio, il grasso e lo sporco da superfici come motori e pavimenti di garage. Nessuno di questi componenti è oggi usato nei moderni disperdenti, anche se alcuni petroli, in particolar modo carburanti distillati leggeri, possono contenere una equilibrata proporzione di composti aromatici. Di questi, la maggior parte evapora mentre altri si concentrano nel mare dove possono avere conseguenze molto tossiche.

Invece i moderni disperdenti iniziarono ad affermarsi solo dopo il 1967 a causa dello sversamento di petrolio del "Torrey Canyon" in Gran Bretagna. Dopo questo disastro ambientale furono applicate nuove tecniche e usati nuovi disperdenti. Nel 1996, con lo sversamento del "Sea Empress" l'utilizzo dei disperdenti ha portato a buoni risultati dimostrando così la propria efficacia prevenendo un grande danno ambientale (London, 1998-DC 1997).

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

### 2.1 La chimica dei disperdenti

I disperdenti sono una miscela liquida di surfattanti (agenti attivi di superficie) e solventi, che accelerano il processo di dissolvimento delle grandi chiazze di petrolio e le trasformano in piccole gocce che vengono in seguito disperse in modo naturale. I surfattanti hanno una struttura “sapone-simile” costituita da una testa idrofila e una coda idrofobica. Essi vengono comunemente usati nelle industrie di cosmetica e di alimentari.

Le molecole di surfattante, a causa della loro duplice natura, quando vengono a contatto con il petrolio presente nel mare raggiungono un livello energetico più basso e si posizionano in un'interfaccia acqua-petrolio. Si verifica inoltre una diminuzione della tensione interfacciale acqua-petrolio e di conseguenza una diminuzione dell'energia richiesta per formare le gocce di petrolio in acqua. Le goccioline generate dal disperdente sono tipicamente molto più piccole di quelle generate dalla naturale energia del mare, facilitandone così la dispersione avendo così un minor impatto ambientale.

Le prime generazioni di disperdenti accettabili erano formate sia da sistemi di surfattanti a base acqua che da sistemi di idrocarburi non aromatici a base solventi. L'uso di questi disperdenti richiedeva un rapporto di circa 1 a 3 disperdente/petrolio con in più l'aggiunta di una agitazione meccanica, come per esempio l'elica di una nave.

I disperdenti moderni sono composti da solventi che contengono una maggior quantità di surfattante, circa il 65%. Tali disperdenti con una concentrazione così alta di surfattanti possono essere utilizzati in un rapporto disperdente/petrolio più basso, circa 1:20. In alcuni casi il rapporto scende 1 a 100 come nelle condizioni di mare mosso (Mackay,1995).

Le attuali composizioni dei disperdenti possono cambiare considerevolmente. Tuttavia i surfattanti usati nei moderni disperdenti sono generalmente miscele di composti anionici e non ionici. I composti non ionici includono esteri del sorbitolo di acidi grassi, esteri del sorbitolo polialcossilato di acidi grassi, alcoli grassi di polialcanolati, esteri di glicol polietilenico di acidi oleici e esteri di petroli pesanti. I surfattanti di tipo anionico includono sali di dialchil sulfosuccinato e di acido benzo alchil solforico. Esempi di surfattanti usati sono: sorbitan monolaurato, sodio laurilsolfato, isopropilammmina dodecil benzene sulfonato, etc...

Il solvente di un disperdente ha molte funzioni importanti. Per prima cosa il solvente deve solubilizzare la miscela dei composti di surfattanti e produrre un liquido viscoso che sia

## **Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio**

idoneo per i vari casi di applicazione del disperdente. Come seconda cosa, una volta applicato, deve penetrare nel petrolio e aiutare la diffusione dei surfattanti dalla superficie del petrolio all'interfaccia acqua-petrolio. I solventi dei moderni disperdenti hanno una tossicità più bassa rispetto ai solventi più antichi, infatti includono nella loro miscela composti ossigenati come glicoli ed eteri glicolati, e idrocarburi non aromatici derivati dal petrolio. Esempi di solventi sono etilene glicol monobutil etere, di propilene glicol monometil etere, cherosene de-aromatizzato e solventi isoparaffinici.

Componenti come alcool e acqua sono usati in alcuni casi come cosolventi o cosurfattanti per migliorare la solubilizzazione di surfattanti e modificare la viscosità.

### **2.2 Le azioni fisiche del disperdente**

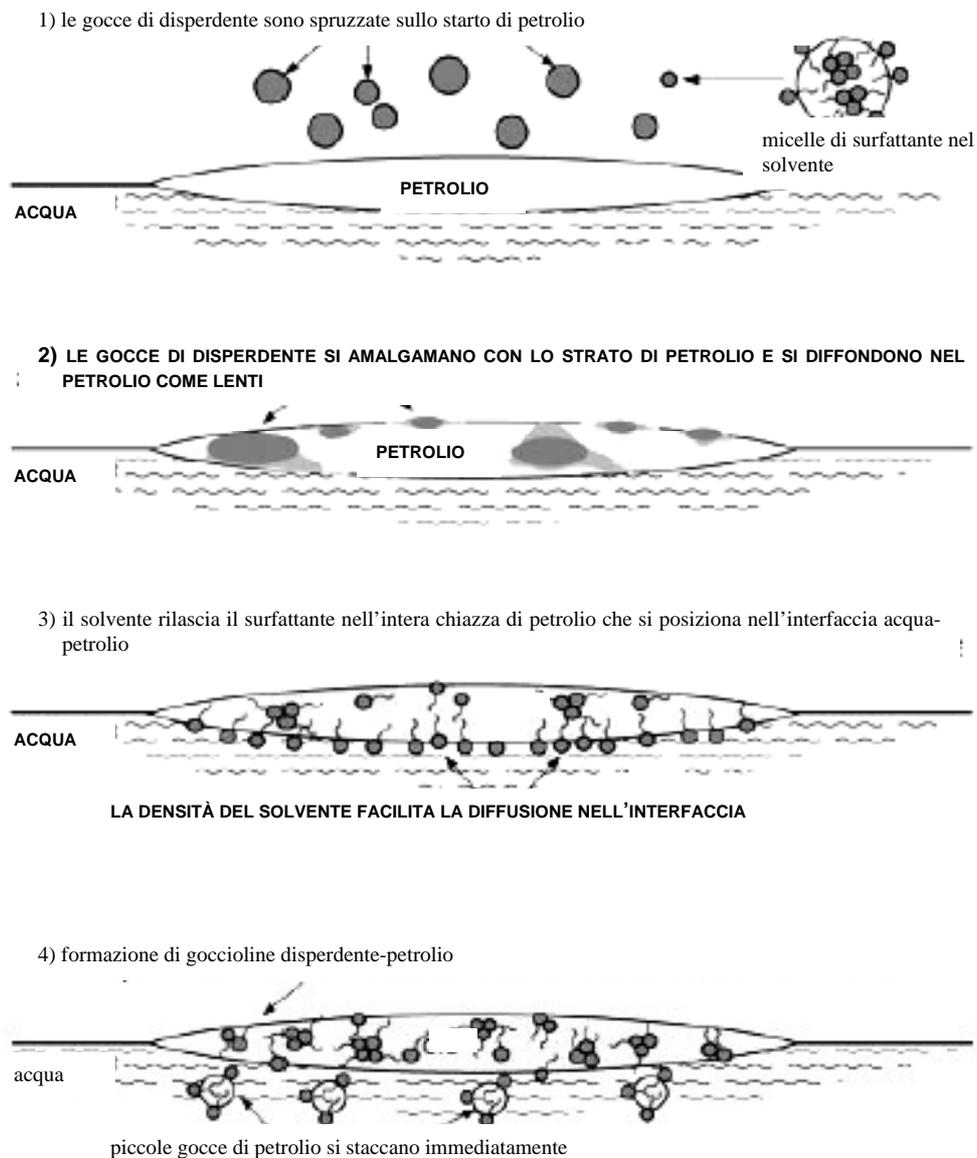
Per contrastare lo sversamento del petrolio il disperdente viene vaporizzato in piccolissime gocce sulla superficie del petrolio stesso. Preferibilmente, il disperdente deve essere usato puro, non diluito, per avere risultati migliori. Le gocce di disperdente penetrano all'interno dello strato di petrolio e si mescolano ad esso aiutate dall'azione del solvente e dal getto vaporizzato. Mentre il disperdente raggiunge la parte più bassa dello strato di petrolio, le molecole di surfattante si diffondono lungo l'interfaccia acqua-petrolio, abbassandone la tensione interfacciale. Piccole gocce di petrolio si staccano immediatamente e si disperdono nella zona sottostante della colonna d'acqua. In questo modo lo strato di petrolio tende ad assottigliarsi per il graduale distacco di gocce dalla massa iniziale, inoltre più surfattante raggiunge l'interfaccia acqua-petrolio. Il surfattante previene l'aggregazione delle gocce di petrolio ponendosi intorno ad esse e di conseguenza le stabilizza.

I disperdenti che possiedono caratteristiche più oleofile hanno una maggiore capacità di mescolarsi con lo strato di petrolio, in maniera tale da aumentare la loro efficacia sugli sversamenti di petrolio.

I composti a base acqua tendono ad essere meno efficaci degli altri. Ciò è dovuto alla loro minore affinità con il petrolio, con conseguenti danni all'acqua di mare. Tuttavia risultano essere più efficaci su sversamenti appena avvenuti e su petroli a bassa viscosità.

Nella figura 1 è illustrata la descrizione dettagliata di come i disperdenti agiscono sullo strato di petrolio in acqua.

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio



**Fig. 1** Meccanismo di dispersione chimica del petrolio

### 2.3 Cosa influisce sull'efficacia/efficienza dei disperdenti?

Sicuramente la composizione dei disperdenti ed i sistemi di applicazione sono fattori determinanti per l'efficacia del dispersante. Ma anche altri fattori intervengono sull'efficacia del dispersante, come per esempio la composizione del petrolio, il rapporto dispersante/petrolio, e la quantità di energia necessaria affinché si ottenga la completa solubilizzazione del sistema acqua-petrolio.

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

La composizione dei petroli può variare considerevolmente; esistono petroli grezzi leggeri che hanno un'alta percentuale di evaporazione, petroli grezzi medi con una differente quantità di composti aromatici, saturi, resine e polari, petroli grezzi pesanti e prodotti combustibili con una più bassa volatilità e più alta viscosità. Inoltre il petrolio può essere diluito con l'acqua e ciò causa un significativo aumento di volume e viscosità.

In generale con l'aumentare del rapporto disperdente/petrolio aumenta anche la velocità di dispersione del petrolio. L'attuale quantità di disperdente utilizzata in uno sversamento di petrolio, dipende principalmente da due fattori: dallo spessore dello strato di petrolio, e dalla quantità di disperdente necessaria per unità di superficie di petrolio (mL/m<sup>2</sup>).

### 2.4 Dibattito sull'uso di disperdenti

Il dibattito su l'uso o non uso di disperdenti verte sull'impatto ambientale che questi composti chimici possono avere. L'utilizzo dei disperdenti aiuta la sopravvivenza degli uccelli di mare e la salvaguardia delle coste mentre danneggia la vita dei pesci. In realtà questa frase è una semplificazione di un discorso molto più complesso.

Molte persone infatti si oppongono all'utilizzo dei disperdenti rifacendosi alle seguenti motivazioni:

- è meglio rimuovere il petrolio dalla superficie del mare piuttosto che scioglierlo nell'acqua;
- l'uso del disperdente nasconde il problema piuttosto che risolverlo;
- l'aggiunta di sostanze chimiche da parte dell'uomo nell'ambiente comporta delle conseguenze negative;
- i disperdenti sono tossici, e il loro uso insieme al petrolio è più tossico del solo petrolio;
- il petrolio si disperde naturalmente in un tempo soddisfacente;
- l'uso dei disperdenti è insoddisfacente, poichè essi non sempre danno il risultato sperato;
- i disperdenti sono usati per evitare lo studio di opzioni migliori come risposta al problema.

I promotori dell'utilizzo del disperdente invece dichiarano:

- Il danno ambientale è causato dal permanere dello sversamento di petrolio in mare. Una volta avvenuto, il danno non può essere recuperato del tutto, ma con una

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

azione tempestiva il danno si può ridurre. Una rapida e totale rimozione del petrolio sversato con mezzi meccanici è realmente fattibile.

- I disperdenti accelerano il naturale processo di dispersione e possono provvedere ad un beneficio ambientale minimizzando la quantità di petrolio che può arrivare nelle coste
- Il petrolio è una sostanza che può avere effetti tossici. I moderni disperdenti possiedono una bassa tossicità e aggiunti al petrolio non hanno peggiori conseguenze del solo petrolio.
- La dispersione naturale rallenta o addirittura si blocca del tutto quando il petrolio si emulsiona
- L'esperienza pratica ha dimostrato che i disperdenti sono una delle poche metodologie disponibili in grado di dare una risposta efficace.

La funzione del disperdente è quella di rimuovere il petrolio sversato dalla superficie del mare. Il disperdente disgrega il petrolio in piccolissime gocce e queste si disperdono nella sottostante colonna d'acqua in maniera tale da poter essere biodegradate più facilmente. Gli effetti sull'ambiente dell'uso di questo metodo devono essere messi a confronto con gli effetti che si hanno se lo strato di petrolio rimanesse sulla superficie del mare per un lungo periodo.

I moderni disperdenti, a bassa tossicità, causano un temporaneo aumento di concentrazione di petrolio nella colonna d'acqua. Quindi alcuni organismi marini possono essere esposti localmente ad alte concentrazioni di petrolio (London, 1995-DC,1989).

Già in passato è risultato che le maggiori concentrazioni di petrolio si presentano in organismi che vivono in zone con acque poco profonde e con poco ricircolo. Per esempio, a seguito dello sversamento di petrolio del North Cape(Dc, 1997) si è verificata la morte di molti organismi marini. Il tipo di petrolio fuoriuscito aveva un'alta concentrazione di composti aromatici, si trattava infatti di petrolio utilizzato per il riscaldamento domestico. A causa del mare agitato il petrolio si è disperso naturalmente nelle acque basse e ha causato la morte soprattutto di lombrichi e granchi. In casi come questi l'uso del disperdente è inutile.

Tuttora vengono effettuati studi e analisi per raggiungere una maggiore conoscenza e comprensione del problema, e si cercano anche strade alternative all'uso di disperdenti.

### **3. Parte sperimentale**

Il lavoro affrontato in questo periodo di stage si è basato sullo sviluppo di metodi ecotossicologici e genotossici per la valutazione della tossicità dei prodotti disperdenti utilizzati sugli sversamenti di petrolio. Il test è suggerito dal D.M. 23/12/2002 “Definizione delle procedure per il riconoscimento di idoneità dei prodotti disperdenti ed assorbenti da impiegare in mare per la bonifica dalla contaminazione da idrocarburi petroliferi”, basata sul protocollo OECD 203 “Fish, Acute Toxicity Test”, che definisce la procedura del test statico, e sul protocollo OECD 204 “Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study”, che definisce la metodica per il test semi-statico.

Il D.M. suggerisce come “specie mediterranea sulla quale effettuare il test la spigola (*Dicentrarchus labrax*), in quanto rispondente alle indicazioni generali nella suddetta linea guida OECD. La taglia degli esemplari da sottoporre a test deve essere di  $6\pm 2$  cm.”

#### **3.1 Cenni biologici sulla specie ittica *Dicentrarchus labrax* (Spigola)**

Specie di Pesci Osteiti Perciformi della famiglia dei Serranidi conosciuta anche con i nomi di branzino, pesce lupo o pesce ragno. Lungo complessivamente sino a 1 metro con un peso che in media si aggira sui 10 Kg ed anche più, ha il corpo molto slanciato, leggermente compresso e ricoperto di squame di tipo ctenoide. Il capo è robusto e subsonico, con mascella inferiore che sporge oltre quella superiore; la bocca è ampia e armata di denti disposti a formare una sorta di rozzo vello. L’opercolo porta posteriormente due spine, mentre il preopercolo ha il margine posteriore dentellato. Dorsalmente si impiantano due pinne contigue, la prima delle quali è sostenuta da robuste spine; le pinne pettorali sono brevi e si inseriscono sopra le ventrali anch’esse modestamente sviluppate. La pinna anale è contrapposta alla seconda dorsale e la caudale è concava nel bordo posteriore. La colorazione del corpo è generalmente grigia scura sul dorso; le parti laterali sono più chiare con piccole macchie scure, mentre quelle inferiori sono bianco-argentate. Vorace predatore, si nutre anche di alghe e di rifiuti. Diffusa nell’Atlantico orientale e nel Mediterraneo, la S. vive riunita in piccoli banchi lungo le zone costiere; nel periodo della

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

riproduzione è solita portarsi nella foce dei fiumi. Ha carni molto gustose ed è oggetto di pesca in ogni stagione, in particolare durante l'inverno.

### 3.2 Test di tossicità

Nel test condotto congiuntamente a quattro laboratori italiani è stato utilizzato come tossico di riferimento il Sodio dodecil solfato (SDS) alle concentrazioni di 10, 5, 2.5 e 1.25 mg/L. Il principio del test è quello di determinare la concentrazione di un tossico che causa la morte del 50% di una popolazione (LC 50), dopo un tempo di esposizione variabile da 24 a 96 h. Nello studio collaborativo condotto è stato scelto un tempo di esposizione pari a 48 h.

Si è trattato di un saggio statico di tossicità acuta, in cui gli organismi vengono introdotti nel campione naturale da testare, o nelle soluzioni appositamente preparate del tossico, e in tale mezzo vengono mantenuti per tutto il tempo del test.

L'attività ha previsto inoltre un test preliminare *acuto statico*, con il disperdente *Safety Sea Cleaner 2* usato come tossico, della durata di 48 h, affrontato dai laboratori ARPA FE e ICRAM, per stabilire il campo di concentrazioni tossiche da utilizzare nel *test cronico semistatico* della durata di 14 giorni. Le concentrazioni stabilite sono state di 25 – 12.5 – 6.25 – 3.12 – 1.56 – mg/L. Dalla soluzione madre SM1 di concentrazione 1,25 g/L, ottenuta sciogliendo 1,582 g di SSC2 in 1 L di acqua marina, sono stati prelevati rispettivamente 40ml, 20 ml, 10 ml, 5 ml e 2,5 ml portati in seguito a un volume di 2 L: il volume di acqua marina utilizzata per ogni becker.

Nel test cronico semistatico il mezzo nel quale vengono esposti gli organismi viene rinnovato a periodi di tempo prefissati, utilizzando ogni volta un mezzo con le stesse caratteristiche.

Il seguente protocollo, concordato con i Laboratori dell'ICRAM e dell'ARPA Ferrara, è stato utilizzato per le varie prove.

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

### 3.3 Interconfronto, con la specie ittica *Dicentrarchus Labrax*, per i saggi ecotossicologici, acuto (96 h) e cronico (14gg) con il prodotto disperdente Safety Sea Cleaner II (SSC 2)

Al fine della riproducibilità interlaboratorio di risultati statisticamente confrontabili, operatori diversi effettuano saggi in differenti laboratori, impiegando come organismi pesci di uno stesso lotto di deposizione e provenienza.

#### 3.3.1 Programma operativo e metodologie da impiegare

I saggi ecotossicologici da effettuare con i pesci prevedono l'utilizzo di protocolli standardizzati: linea guida OECD n° 203 e 204, con le modifiche previste dal Decreto Direttoriale del 23/12/2002 per la specie ittica *Dicentrarchus labrax*.

Ogni laboratorio di ciascuna Unità operativa coinvolta predisporrà, contemporaneamente, saggi ecotossicologici attraverso un percorso che comprende l'esecuzione di un numero prestabilito di prove, esponendo lo stesso lotto di organismi ad un tossico di riferimento (sodio dodecilsolfato: *SDS*), ed ad un prodotto disperdente (*Safety Sea Cleaner 2*) prescelto e precedentemente testato nella fase II del programma.

Nello specifico la valutazione della riproducibilità interlaboratorio, si articolerà in 6 punti:

1. trasporto e stabulazione degli organismi dello stesso lotto in ciascun laboratorio operante;
2. valutazione della sensibilità del lotto attraverso un test acuto (48h) con il tossico di riferimento SDS (TUTTI I LABORATORI - 1 test per laboratorio );
3. identificazione delle concentrazioni di disperdente da testare attraverso un test preliminare acuto (48 h), (1 SOLO LABORATORIO - 1 test);
4. verifica della conformità dei risultati ottenuti dalle U.O. nelle fasi 2 e 3;
5. prove di ripetibilità: test acuto (96h) e cronico (14 gg) (TUTTI I LABORATORI - 3 test per laboratorio);
6. elaborazione dei dati ottenuti : $LC_{50}^{96h}$  ( Probit, Tsk), NOEC (Dunnett's test), e confronto dei risultati ottenuti da ciascun laboratorio;
7. stesura di una breve relazione sulla sperimentazione condotta contenente i risultati relativi ai singoli test, il valore medio e la deviazione standard .

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Dettagli sui punti: 2-3-5.

Presso ciascun laboratorio partecipante saranno eseguiti: 3 saggi di tossicità acuta a 96 h e 3 saggi semistatici di tossicità cronica a 14 giorni esponendo 5 organismi a 5 differenti concentrazioni (da concordare – vedi punto 3) e ad un controllo, utilizzando sempre 3 repliche per ciascuna concentrazione e per il controllo.

Per corrispondere a quanto esposto, i presupposti di base per la realizzazione di questa fase del progetto sono l'acquisizione, per tutti i laboratori coinvolti, di:

- Fornitura di pesci provenienti dallo stesso impianto di piscicoltura e lotto di deposizione;
- Stesso tipo di alimento per gli organismi impiegati.
- Stesse sostanze da testare: tox di riferimento-*SDS*, disperdente- *Safety Sea Cleaner2*
- Stesse modalità operative.

L' esercizio di interconfronto è stato portato a termine entro la fine di dicembre 2004.

### 3.3.2 Modalità operative

#### 3.3.2.1 TRASPORTO DEI PESCI IN LABORATORIO

Possono essere utilizzati sacchi di polietilene contenenti acqua per 1/3 e ossigeno per 2/3. I sacchi vanno inseriti in contenitori termici per limitare le variazioni di temperatura.

#### 3.3.2.2 MANTENIMENTO DEI PESCI IN LABORATORIO PRIMA DELL'ESECUZIONE DEI TEST

I pesci devono essere mantenuti in laboratorio in acquari del volume unitario di 120 L operanti in ciclo chiuso in grado di garantire un ricambio idrico completo ogni ora, provvisti di un dispositivo per la termoregolazione delle acque e di un sistema di filtrazione meccanica e biologica. La densità massima di organismi è pari a 1g/L.

L'acqua in cui sono mantenuti gli organismi deve essere di qualità uguale a quella che sarà utilizzata nel test.

Gli organismi vanno quindi mantenuti negli acquari di laboratorio per almeno 7 gg prima dell'inizio del test (paragrafo 10 modificato delle linee guida OECD 203) alle seguenti condizioni:

fotoperiodo	12L 12 B
Illuminazione	500-1000 lux

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Temperatura	20±1 °C
Ossigeno	almeno 80% del valore di saturazione dell'aria

Età degli organismi    Giovanili (3±0,5 cm)

Alimentazione        2 volte/die fino a 24 h prima dell'inizio del test (2% in peso secco relativamente all'iniziale peso dell'animale)

Procedere alla registrazione della mortalità ogni 48 h

Al termine dei 7 giorni verificare:

mortalità > 10%	il lotto di organismi va eliminato
mortalità compresa tra 5 e 10% altri 7 gg	l'acclimatazione in laboratorio deve proseguire per altri 7 gg
mortalità < 5%	il lotto di organismi può essere utilizzato per i test

Se il lotto di organismi può essere utilizzato per l'esecuzione dei test, procedere alla **pesatura e alla misurazione del 10% del totale dei pesci (campione rappresentativo)** che si intendono utilizzare (nel nostro caso, circa 50 pesci) nel seguente modo (pag. 8 OECD n° 204):

Modalità di determinazione del peso: preso un pesce alla volta con un retino dal becker e in seguito asciugato con della carta assorbente per eliminare l'acqua in eccesso, i pesci sono stati pesati con una bilancia con precisione di due cifre decimali dopo i grammi.

Modalità di misurazione della lunghezza: il pesce è stato posto sopra un foglio di carta millimetrata plastificata.

### TUTTI I LABORATORI

#### TEST ACUTO (48 h) PRELIMINARE CON SDS

#### Materiali

Camere di saggio	2-5 L Becker o vasche in plexiglass (sarebbe preferibile che usassimo tutti lo stesso tipo di contenitore)
Acqua	Deionizzata o Milli Q+ Miscela di sali Instant Ocean
Tossico di riferimento	Sodio dodecil solfato (SDS)
Alimentazione	Assente

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Le condizioni di fotoperiodo e temperatura sono le stesse del mantenimento degli organismi in laboratorio

Data inizio del test: 13/12/04

1. Preparazione delle soluzioni di SDS alle seguenti concentrazioni come segue (Ricordare di misurare il pH della soluzione madre, e fare in modo che questo risulti uguale a quello dell'acqua di allevamento senza la sostanza test. Utilizzare NaOH o HCl per gli eventuali aggiustamenti (come da paragrafo 14 della OECD 203):

Le concentrazioni delle soluzioni sono 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg/L.

Soluzione madre (SM): pesare 500mg di SDS e scioglierli in 0,5 L di acqua d'allevamento

10 mg/L	20 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento
5 mg/L	10 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento
2.5 mg/L	5 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento
1.25 mg/L	2.5 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento

2. Preparazione e siglatura dei contenitori come da schema:

<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	Bianco
<b>SDS</b> 1000	<b>SDS</b> 1000	<b>SDS</b> 1000	Nome del tossico + valore della concentrazione (le concentrazioni indicate sono solo esemplificative)
<b>SDS</b> 100	<b>SDS</b> 100	<b>SDS</b> 100	
<b>SDS</b> 10	<b>SDS</b> 10	<b>SDS</b> 10	
<b>SDS</b> 1	<b>SDS</b> 1	<b>SDS</b> 1	
<b>SDS</b> 0,1	<b>SDS</b> 0,1	<b>SDS</b> 0,1	

3. Immissione delle soluzioni nelle camere di saggio

4. Aereazione delle soluzioni

5. Misura dell'ossigeno disciolto: deve essere > 70%

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Controllo della Temperatura: deve essere  $20 \pm 1$  °C

6. Introduzione degli organismi nelle camere di saggio: **5 organismi/camera**  
La distribuzione deve avvenire in modo casuale

7. Con copertura delle camere di saggio

8. Il test viene condotto in assenza di alimentazione, evitando qualsiasi disturbo esterno per gli animali

9. Registrare allo scadere delle 24 e 48 h i seguenti parametri: pH  
O<sub>2</sub> disciolto  
T  
N° pesci morti

Utilizzare per la registrazione il foglio allegato (allegato 1)

I pesci sono considerati morti secondo quanto riportato al paragrafo 19 delle linee guida OECD 203.

10. Elaborazione dati: TSK (Trimmed Spearman-Kaber) e Metodo di Interpolazione Grafica

11. Report finale del test (secondo modalità da stabilire)

### **1 SOLO LABORATORIO**

#### **TEST ACUTO (48 h) PRELIMINARE CON SSC 2**

#### Materiali

Camere di saggio                    2-5 L Becker o vasche in plexiglass (sarebbe preferibile che usassimo tutti lo stesso tipo di contenitore)

Acqua                                    Deionizzata o Milli Q+ Miscela di sali Instant Ocean

Tossico                                 Disperdente Safety Sea Cleaner 2 (SSC 2)

Alimentazione                        Assente

Le condizioni di fotoperiodo e temperatura sono le stesse del mantenimento degli organismi in laboratorio

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Data inizio del test: non è stato eseguito dal laboratorio del Servizio di Metrologia ambientale

1. Preparazione delle soluzioni di SSC 2 alle seguenti concentrazioni come segue (Ricordare di misurare il pH della soluzione madre, e fare in modo che questo risulti uguale a quello dell'acqua di allevamento senza la sostanza test. Utilizzare NaOH o HCl per gli eventuali aggiustamenti, come da paragrafo 14 della OECD 203).

2. Preparazione e siglatura dei contenitori come da schema:

<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>
<b>SSC</b> 1000	<b>SSC</b> 1000	<b>SSC</b> 1000
<b>SSC</b> 100	<b>SSC</b> 100	<b>SSC</b> 100
<b>SSC</b> 10	<b>SSC</b> 10	<b>SSC</b> 10
<b>SSC</b> 1	<b>SSC</b> 1	<b>SSC</b> 1
<b>SDS</b> 0,1	<b>SDS</b> 0,1	<b>SDS</b> 0,1

Nome del tossico + valore della concentrazione  
(le concentrazioni indicate sono solo esemplificative)

In totale 18 contenitori

3. Immissione delle soluzioni nelle camere di saggio

4. Aereazione delle soluzioni

5. Misura dell'ossigeno disciolto: deve essere > 70%  
Controllo della Temperatura: deve essere  $20 \pm 1$  °C

6. Introduzione degli organismi nelle camere di saggio: **5 organismi/camera**  
La distribuzione deve avvenire in modo casuale

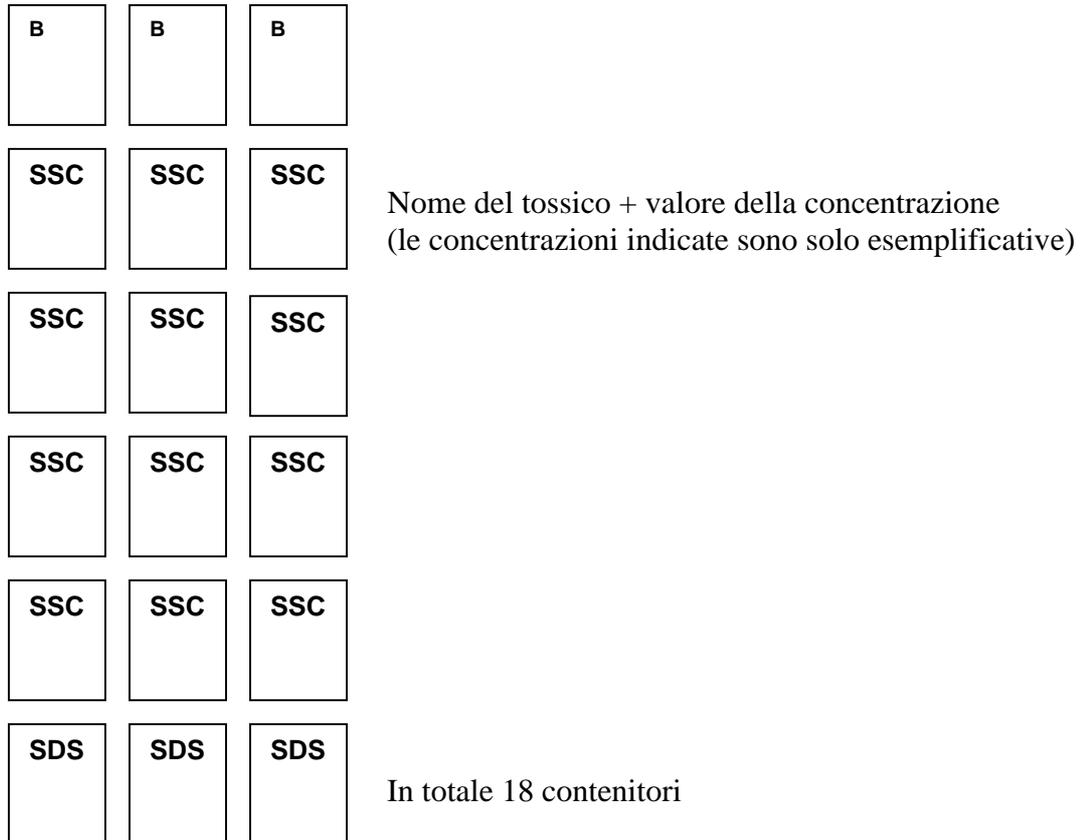
7. Con copertura delle camere di saggio



## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

1. Preparazione delle soluzioni di SSC alle seguenti concentrazioni come segue (Ricordare di misurare il pH della soluzione madre, e fare in modo che questo risulti uguale a quello dell'acqua di allevamento senza la sostanza test. Utilizzare NaOH o HCl per gli eventuali aggiustamenti, come da paragrafo 14 della OECD 203):

2. Preparazione e siglatura dei contenitori come da schema:



POICHÈ I 3 TEST PREVISTI VENGONO CONDOTTI CONTEMPORANEAMENTE, I CONTENITORI DA PREVEDERE SONO 54

3. Immissione delle soluzioni nelle camere di saggio

4. Aereazione delle soluzioni

5. Misura dell'ossigeno disciolto: deve essere > 70%  
Controllo della Temperatura: deve essere  $20 \pm 1$  °C

6. Introduzione degli organismi nelle camere di saggio: **5 organismi/camera**  
La distribuzione deve avvenire in modo casuale

7. Con copertura delle camere di saggio

8. Il test viene condotto in assenza di alimentazione, evitando qualsiasi disturbo esterno per gli animali

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

9. Registrare dopo 2, 4, 6 8 h dall'inizio del test: n° di pesci morti

10. Registrare allo scadere di 24, 48, 72 e 96 h i seguenti parametri in tutte le camere di saggio:

pH

O<sub>2</sub> disciolto

nitrati

T

N° pesci morti

N°/tipo anomalie comportamentali o fisiologiche

Utilizzare per la registrazione il foglio allegato 3

I pesci sono considerati morti secondo quanto riportato al paragrafo 19 delle linee guida OECD 203.

10. Elaborazione dati:

.....  
.....  
.....  
.....

11. Report finale del test (secondo modalità da stabilire)

### **TUTTI I LABORATORI**

#### **TEST CRONICO SEMISTATICO 14 GG**

(Come da OECD n° 204)

#### Materiali

Camere di saggio 2-5 L Becker o vasche in plexiglass (sarebbe preferibile che usassimo tutti lo stesso tipo di contenitore)

Acqua Deionizzata o Milli Q + Miscela di sali Instant Ocean  
Quantità acqua prevista (per 3 test) Circa 650 L  
(2 L/camera)

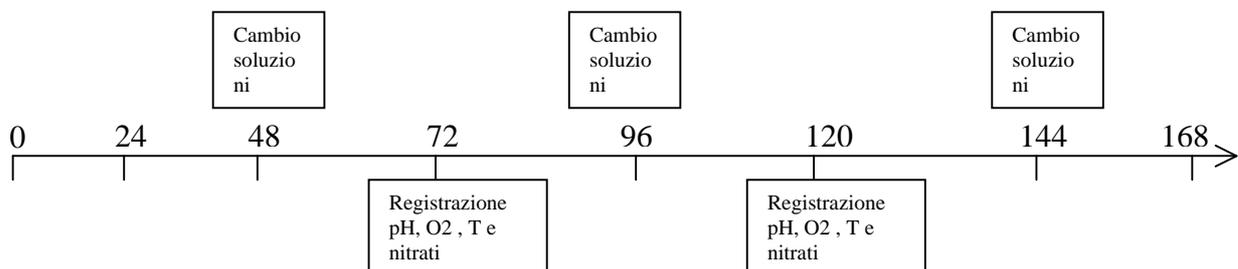
Tossico Safety Sea Cleaner 2  
Organismi previsti per 3 test 270

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Alimentazione presente

Data inizio del test: 16/12/04

1. Preparazione delle soluzioni di SSC alle seguenti concentrazioni come da punto 1 del test acuto a 96 h
2. Preparazione e siglatura dei contenitori seguendo lo schema di punto 2 del test acuto a 96 h: 18 contenitori/test → **Se i 3 test previsti vengono condotti contemporaneamente, i contenitori da prevedere sono 54**
3. Immissione delle soluzioni nelle camere di saggio
4. Introduzione del flusso d'aria nelle camere di saggio (utilizzare pietre porose e non superare 100 bolle/minuto)
5. Misura dell'ossigeno disciolto: non meno del 60% del valore massimo di saturazione dell'aria  
Controllo della Temperatura: deve essere  $20 \pm 1$  °C
6. Introduzione degli organismi nelle camere di saggio: **5 organismi/camera**  
La distribuzione deve avvenire in modo casuale
7. Con copertura delle camere di saggio
8. Registrare dopo 2, 4, 6 8 h dall'inizio del test: n° di pesci morti  
n°/tipo anomalie di comportamento o fisiologiche  
Successivamente effettuare questo controllo ogni 24 h
9. Sulla base del capoverso 2 di pagina 8 delle linee guida OECD 204: "Misure di pH, O disciolto e T devono essere effettuate almeno due volte la settimana" e che i cambi delle soluzioni vanno eseguiti ogni 48 h seguire lo schema seguente (per tutta la durata dell'esperimento):



## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Le registrazioni di pH, O<sub>2</sub>, nitrati e T vanno annotate sul foglio allegato (allegato 2)

10. Registrare tutti i giorni il n° di pesci morti e il n°/tipo di anomalie di comportamento o fisiologiche (come da pag. 7 OECD n° 204).

Utilizzare per la registrazione il foglio allegato (allegato 3)

11. Procedura del cambio delle soluzioni (ogni 48 h dall'inizio del test)

- a) alimentare gli animali in un'unica somministrazione
- b) preparare le nuove camere di saggio con le soluzioni di SSC 2 (come il primo giorno di test)
- c) Introdurre il flusso d'aria nelle camere di saggio
- d) Controllo della T e dell'O<sub>2</sub> disciolto
- e) Trasferire gli animali (con piccoli retini, avendo cura di non danneggiarli) nelle nuove camere di saggio cominciando da quelle a concentrazione di SSC 2 più bassa

12. Al termine del test dopo aver annotato per l'ultima volta il numero di organismi morti e le anomalie, pesare e misurare tutti i sopravvissuti (pagina 8 OECD n° 204) con le stesse modalità del campione rappresentativo

13. Elaborazione dei dati (LC 50, NOEC): Probit , Dunnet's test, Steel's many-one Rank test

14. Stesura del report finale

## **Cap. 4 Risultati**

### **4.1 Acclimatazione degli organismi**

Per l'acclimatazione degli organismi è stata seguita la procedura esposta precedentemente. I valori dell'acqua di allevamento misurati sono riportati in tabella 2.

Tab. 2 – Valori dei parametri dell'acqua di allevamento

<b>Parametri degli stabulatori</b>	<b>Vasca A</b>	<b>Vasca B</b>
pH	7,59	7,33
Salinità (per mille)	21	20,5
Temperatura (°C)	21	20,3
Ossigeno (%)	75,5	74
Nitriti	0,2	0,1
Nitrati	40	40
Ammoniaca		

### **4.2 Parametri test acuto con tossico di riferimento (SDS)**

Le tabelle 3, 4, 5 riportano i valori dei parametri misurati nelle tre repliche del test statico acuto con l'SDS.

Le tabelle 6,7,8 riportano il numero di morti degli organismi alle diverse concentrazioni nelle tre repliche.

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Tabella 3

**TEST ACUTO 48 h - SDS  
U.O.**

I REPLICA

RILEVAMENTO DEI PARAMETRI		<i>giorni</i>						
		13-dic				14-dic		
		<i>inizio</i>	<i>2 h</i>	<i>4h</i>	<i>6 h</i>	<i>8 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>
<b>concentrazione (mg/l)</b>								
controllo		<b>pH</b>	7.87	7.85			8.04	7.96
		<b>S°/°°</b>	22	21			21	22
		<b>T (°C)</b>	20.6	21			21.1	20.8
		<b>O2 (%)</b>	79	86.5			88.6	87
1,25 (mg/l)		<b>pH</b>	7.8	7.79			7.93	7.88
		<b>S°/°°</b>	21.5	22			21	22
		<b>T (°C)</b>	20.4	20.7			20.6	20.6
		<b>O2 (%)</b>	81.5	77			82	84
2,5 (mg/l)		<b>pH</b>	7.8	7.82			7.97	7.98
		<b>S°/°°</b>	21.5	21			21	22
		<b>T (°C)</b>	20.4	20.7			20.4	20.6
		<b>O2 (%)</b>	80	83			85	76
5 (mg/l)		<b>pH</b>	7.82	7.85			7.79	7.86
		<b>S°/°°</b>	21.5	21.5			21	22
		<b>T (°C)</b>	20.7	20.9			21	20.9
		<b>O2 (%)</b>	73.1	86			84	79
10 (mg/l)		<b>pH</b>	7.8	7.86				
		<b>S°/°°</b>	21.5	21.5				
		<b>T (°C)</b>	20.5	20.8				
		<b>O2 (%)</b>	83	80				

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Tabella 4

TEST ACUTO 48 h - SDS  
U.O.

II REPLICA

RILEVAMENTO DEI PARAMETRI		giorni						
		13-dic				14-dic		
		inizio	2 h	4h	6 h	8 h	24 h	48 h
<b>concentrazione (mg/l)</b>								
controllo		<b>pH</b>	7.88	7.88			8.06	7.97
		<b>S<sup>o</sup>/°o</b>	21.5	21.5			21	22
		<b>T (°C)</b>	20.7	21			21	20.8
		<b>O2 (%)</b>	75	86.9			89.2	87
1,25 (mg/l)		<b>pH</b>	7.81	7.8			7.95	7.93
		<b>S<sup>o</sup>/°o</b>	21.5	21.5			21	23
		<b>T (°C)</b>	20.4	20.6			20.2	20.4
		<b>O2 (%)</b>	68	81			83.5	84
2,5 (mg/l)		<b>pH</b>	7.88	7.85			7.99	8.03
		<b>S<sup>o</sup>/°o</b>	21.5	20.9			21	22
		<b>T (°C)</b>	20.5	20.5			20.9	20.1
		<b>O2 (%)</b>	76	89			88	89
5 (mg/l)		<b>pH</b>	7.84	7.84			7.81	8.01
		<b>S<sup>o</sup>/°o</b>	21.5	21.5			21	22
		<b>T (°C)</b>	20.6	20.9			21.1	20.8
		<b>O2 (%)</b>	73	87.3			81	86
10 (mg/l)		<b>pH</b>	7.82	7.8				
		<b>S<sup>o</sup>/°o</b>	21.5	21.5				
		<b>T (°C)</b>	20.2	20.5				
		<b>O2 (%)</b>	70.1	82				

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Tabella 5

TEST ACUTO 48 h - SDS  
U.O.

III REPLICA

RILEVAMENTO DEI PARAMETRI		giorni						
		13-dic			14-dic			
concentrazione (mg/l)		inizio	2 h	4h	6 h	8 h	24 h	48 h
controllo	pH		7.86	7.84			7.96	7.96
	S <sup>o</sup> /°°		21.5	21.5			21	22
	T (°C)		20.8	21			21	20.8
	O2 (%)		76.5	82			89	87
1,25 (mg/l)	pH		7.81	7.8			7.96	7.96
	S <sup>o</sup> /°°		21.5	22			21	23
	T (°C)		20.2	20.4			20.7	20.3
	O2 (%)		73	78			79.6	81
2,5 (mg/l)	pH		7.9	7.86			8.02	8.01
	S <sup>o</sup> /°°		21.5	21.5			21	22
	T (°C)		20.4	20.7			20.6	20.4
	O2 (%)		79.5	82			88	83
5 (mg/l)	pH		7.81	7.77			7.77	7.95
	S <sup>o</sup> /°°		21.5	21			21	22
	T (°C)		20.7	20.1			21.2	20.9
	O2 (%)		67.8	75			72	85
10 (mg/l)	pH		7.8	7.79				
	S <sup>o</sup> /°°		21	22				
	T (°C)		20.3	20.5				
	O2 (%)		71	90				

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Tabelle 6-7-8

<b>LETTURA TEST ACUTO-SDS</b>								
<b>I REPLICA</b>								
	13-dic						14-dic	
<i>conc.</i>	<i>org. Morti</i>	<i>n° tot</i>						
<i>(mg/l)</i>	<i>0 h</i>	<i>2h</i>	<i>4h</i>	<i>6h</i>	<i>8h</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	
controllo								
1.25								
2.5								
5								
10			1	3	1			5

<b>LETTURA TEST ACUTO-SDS</b>								
<b>II REPLICA</b>								
	13-dic						14-dic	
<i>conc.</i>	<i>org. Morti</i>	<i>n° tot</i>						
<i>(mg/l)</i>	<i>0 h</i>	<i>2h</i>	<i>4h</i>	<i>6h</i>	<i>8h</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	
controllo								
1.25								
2.5								
5								
10			1	4				5

<b>LETTURA TEST ACUTO-SDS</b>								
<b>III REPLICA</b>								
	13-dic						14-dic	
<i>conc.</i>	<i>org. Morti</i>	<i>n° tot</i>						
<i>(mg/l)</i>	<i>0 h</i>	<i>2h</i>	<i>4h</i>	<i>6h</i>	<i>8h</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	
controllo								
1.25								
2.5								
5								
10			5					5

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

I valori di mortalità osservati nelle tre repliche sono risultati pari a 100% alla concentrazione di 10 mg/L e 0% in tutte le altre.

Sulla base dei risultati di mortalità ottenuti nella prova l'LC50 è stata calcolata con i metodi riportati nella tabella 9.

**Tabella 9 – Risultati di LC50 calcolati per il saggio acuto con SDS**

METODO UTILIZZATO	LC50 48h (SDS)
<b>TSK (Trimmed Spearman-Kärber)</b>	7.07 mg/L
<b>Metodo di Interpolazione Grafica</b>	7 mg/L

### 4.3 Parametri test cronico semistatico SSC 2

Nelle tabelle 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, sono riportati i valori dei parametri delle tre repliche del test semistatico cronico con l'SSC2.

Nelle tabelle 19, 20, 21 sono riportati il numero di organismi morti nelle tre repliche alle diverse concentrazioni.

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Tabella 10

U.O.

I-1 REPLICA

Rinnovo soluzioni parametri																
		giorni		sabato	domenica	4°	5°	6°	7°	8°	sabato	domenica	11°	12°	13°	14°
		16-dic	17-dic	18-dic	19-dic	20-dic	21-dic	22-dic	23-dic	24-dic	25-dic	26-dic	27-dic	28-dic	29-dic	30-dic
		inizio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h									
mg/L	controllo	pH	7.96			7.93			7.81				7.61			7.85
		S <sup>o/po</sup>	20			20			20				19.5			20
		T (°C)	21.5			20.5			20.5				20.3			20.6
		O2 (%)	86			85			86				52			64
1,56 (mg/l)		pH	8.14			7.94			7.99				7.66			7.47
		S <sup>o/po</sup>	20.5			20.5			20				20			20
		T (°C)	21.8			20.7			20.5				20			20.7
		O2 (%)	81			75			68				55			41.8
3,12 (mg/l)		pH	8.19			8.06			7.94				7.67			7.94
		S <sup>o/po</sup>	20			19.5			20				20			20
		T (°C)	21.3			20.5			20.6				20			20.7
		O2 (%)	87			85			76				64			59.5
6,25 (mg/l)		pH	7.74			7.95			7.96				7.66			7.98
		S <sup>o/po</sup>	20			20			19.5				20			20
		T (°C)	20.6			20.8			20.2				20			20.8
		O2 (%)	64			79.6			86				55			64
12,5 (mg/l)		pH	7.6			8.04			7.88				7.68			7.67
		S <sup>o/po</sup>	20			20			20.5				20			20
		T (°C)	21.7			20.6			21.1				20.4			20.8
		O2 (%)	67			73			65.1				61			58
25 (mg/l)		pH														
		S <sup>o/po</sup>														
		T (°C)														
		O2 (%)														

## Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti del petrolio

Tabella 11

**U.O.**

I-2 REPLICA

Rinnovo soluzioni																	
PARAMETRI																	
		giorni		1°	sabato	domenica	4°	5°	6°	7°	8°	sabato	domenica	11°	12°	13°	14°
		16-dic	17-dic	18-dic	19-dic	20-dic	21-dic	22-dic	23-dic	24-dic	25-dic	26-dic	27-dic	28-dic	29-dic	30-dic	
		inizio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h										
[mg/l]																	
controllo	pH	7.94				7.82			7.8				7.6			7.93	
	S <sup>o/oo</sup>	20				20			20				19.5			20	
	T (°C)	21.4				20.2			20.5				20.4			20.7	
	O <sub>2</sub> (%)	82				88.5			89				58			69	
1,56 (mg/l)	pH	8.01				7.75			7.99				7.66			7.77	
	S <sup>o/oo</sup>	20				20			20				19.5			20	
	T (°C)	21.4				20.8			20.6				20.4			20.6	
	O <sub>2</sub> (%)	81				68			76				58.3			65	
3,12 (mg/l)	pH	8.14				8			7.97				7.65			7.82	
	S <sup>o/oo</sup>	19.5				20			19.5				20			20	
	T (°C)	21				20.5			20.5				19.9			20.8	
	O <sub>2</sub> (%)	85				82			91				63.4			75	
6,25 (mg/l)	pH	7.72				7.76			7.93				7.64			7.63	
	S <sup>o/oo</sup>	19.5				19.5			20				20			20	
	T (°C)	21.1				20.9			20.3				20.8			20.8	
	O <sub>2</sub> (%)	73.2				55			73				59			59	
12,5 (mg/l)	pH	8.03				8.02			7.97				7.68			7.6	
	S <sup>o/oo</sup>	20				20			19.5				20			20	
	T (°C)	21.5				20.8			20.8				20.5			20.9	
	O <sub>2</sub> (%)	70				71.4			77				57			55.4	
25 (mg/l)	pH																
	S <sup>o/oo</sup>																
	T (°C)																
	O <sub>2</sub> (%)																

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Tabella 12

U.O.

I-3 REPLICA

Rinnovo soluzioni																
PARAMETRI																
giorni		1°	sabato	domenica	4°	5°	6°	7°	8°	sabato	domenica	11°	12°	13°	14°	
		16-dic	17-dic	18-dic	19-dic	20-dic	21-dic	22-dic	23-dic	24-dic	25-dic	26-dic	27-dic	28-dic	29-dic	30-dic
		inizio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h									
[mg/l]																
controllo	pH	7.44				8.08			7.9				7.49			7.91
	S <sup>o</sup> /°°	20				20			19.5				20			20
	T (°C)	21				20.7			20.6				20.5			20.7
	O <sub>2</sub> (%)	63				87			91				52.6			80
1,56 (mg/l)	pH	7.92				7.85			7.96				7.64			7.76
	S <sup>o</sup> /°°	19.5				20			20				20			20
	T (°C)	21.2				20.9			20.5				20			20.8
	O <sub>2</sub> (%)	84				74			76				50.8			56
3,12 (mg/l)	pH	7.93				7.97			7.98				7.6			7.88
	S <sup>o</sup> /°°	20				19.5			20				19.5			20
	T (°C)	21				20.8			20.4				20.3			20.8
	O <sub>2</sub> (%)	82				82			89				61			51.5
6,25 (mg/l)	pH	7.95				7.84			7.75				7.58			7.65
	S <sup>o</sup> /°°	19.5				20			19.5				20			20
	T (°C)	21.2				21			20.7				20.2			20.9
	O <sub>2</sub> (%)	76				47			83				57			66
12,5 (mg/l)	pH															
	S <sup>o</sup> /°°															
	T (°C)															
	O <sub>2</sub> (%)															
25 (mg/l)	pH	7.83														
	S <sup>o</sup> /°°	20														
	T (°C)	21.6														
	O <sub>2</sub> (%)	64														

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Tabella 13

U.O.

II-1 REPLICA

Rinnovo soluzioni																
PARAMETRI																
		giorni		sabato	domenica	4°	5°	6°	7°	8°	sabato	domenica	11°	12°	13°	14°
		16-dic	17-dic	18-dic	19-dic	20-dic	21-dic	22-dic	23-dic	24-dic	25-dic	26-dic	27-dic	28-dic	29-dic	30-dic
		inizio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h									
[mg/l]																
controllo	pH	7.91				7.95			8				7.62			7.93
	S <sup>o</sup> /°o	20				20			19.5				20			20
	T (°C)	21.1				20.8			20.4				20.5			20.7
	O <sub>2</sub> (%)	74.8				65			82				51			69
1,56 (mg/l)	pH	7.46				8.11			8				7.66			7.83
	S <sup>o</sup> /°o	20				19.5			20				19.5			20
	T (°C)	21				20.6			20.5				19.9			20.6
	O <sub>2</sub> (%)	80				72			88.6				55			82.7
3,12 (mg/l)	pH	7.94				7.88			7.98				7.65			7.67
	S <sup>o</sup> /°o	20				20			20				20			20
	T (°C)	20.2				20.1			20.4				20			20.6
	O <sub>2</sub> (%)	85				72			84				59			67
6,25 (mg/l)	pH	8.16				8.08			8				7.67			7.67
	S <sup>o</sup> /°o	20				20			20				19.5			20
	T (°C)	19.7				20.1			20.5				20.2			20.6
	O <sub>2</sub> (%)	89.6				81			78				59.7			73
12,5 (mg/l)	pH	7.9				7.86			7.98				7.67			7.57
	S <sup>o</sup> /°o	20				20			19.5				20			20
	T (°C)	20.8				20.2			20.8				20.6			20.9
	O <sub>2</sub> (%)	96				70			80				58			56
25 (mg/l)	pH	7.5														
	S <sup>o</sup> /°o	20														
	T (°C)	20.6														
	O <sub>2</sub> (%)	72.4														

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Tabella 14

U.O.

II-2 REPLICA

Rinnovo soluzioni																
PARAMETRI																
		giorni		Sabato	domenica	4°	5°	6°	7°	8°	Sabato	domenica	11°	12°	13°	14°
		16-dic	17-dic	18-dic	19-dic	20-dic	21-dic	22-dic	23-dic	24-dic	25-dic	26-dic	27-dic	28-dic	29-dic	30-dic
		inizio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h									
[mg/l]																
controllo	pH	7.93				7.85			7.99				7.61			7.8
	S <sup>o</sup> /°	20				20			20				20			20
	T (°C)	21.5				21			20.8				20.4			20.8
	O <sub>2</sub> (%)	82				78.5			77				54			78.5
1,56 (mg/l)	pH	7.75				8.09			7.99				7.64			7.71
	S <sup>o</sup> /°	20				20			20				20			20
	T (°C)	21.2				20.6			20.5				20			20.8
	O <sub>2</sub> (%)	76.5				72			83				62			52
3,12 (mg/l)	pH	7.91				7.96			7.96				7.63			7.73
	S <sup>o</sup> /°	19.5				20			20				20			20
	T (°C)	20.1				20.4			20.6				19.9			20.7
	O <sub>2</sub> (%)	88				71			82.5				57			65
6,25 (mg/l)	pH	7.72				8.05			8.03				7.66			7.97
	S <sup>o</sup> /°	20				20			20.5				20			20
	T (°C)	20.2				20.5			20				20			20.7
	O <sub>2</sub> (%)	95.5				79			81				63			73
12,5 (mg/l)	pH	7.93				7.98			7.97				7.67			7.63
	S <sup>o</sup> /°	20				20			20				20			20
	T (°C)	21				20.7			20.7				20.4			20.9
	O <sub>2</sub> (%)	88.3				76			84				62			36.2
25 (mg/l)	pH	7.34														
	S <sup>o</sup> /°	20														
	T (°C)	20.8														
	O <sub>2</sub> (%)	62.6														

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Tabella 15

**U.O.**

II-3 REPLICA

Rinnovo soluzioni		PARAMETRI														
		giorni		Sabato	domenica	4°	5°	6°	7°	8°	Sabato	domenica	11°	12°	13°	14°
		16-dic	17-dic	18-dic	19-dic	20-dic	21-dic	22-dic	23-dic	24-dic	25-dic	26-dic	27-dic	28-dic	29-dic	30-dic
		inizio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h									
[mg/l]																
controllo	pH	7.91				8.04			8.06				7.6			8.03
	S <sup>o/po</sup>	20				20			20				19.5			20
	T (°C)	21				20.7			20.6				20.4			20.4
	O2 (%)	81				71.5			76				51			81.5
1,56 (mg/l)	pH	7.77				8.11			7.99				7.64			68
	S <sup>o/po</sup>	20				20			20.5				20			20
	T (°C)	21				20.5			20				20.3			20.8
	O2 (%)	86.6				70			85				52			50.1
3,12 (mg/l)	pH	7.61				7.78			7.92				7.58			7.68
	S <sup>o/po</sup>	19.5				19.5			20				19.5			20
	T (°C)	20.7				20.7			20.6				19.9			20.7
	O2 (%)	80				60			87.5				60			52
6,25 (mg/l)	pH	7.86				7.97			7.99				7.66			7.74
	S <sup>o/po</sup>	20				20			19.5				20			20
	T (°C)	20.5				20.7			20.6				20			20.8
	O2 (%)	96.1				76			72				62			62
12,5 (mg/l)	pH	7.87				8.05			7.97				7.68			8.13
	S <sup>o/po</sup>	20				19.5			19.5				20			20
	T (°C)	20.1				20.8			20.7				20.5			20.9
	O2 (%)	87				78			80				61			63
25 (mg/l)	pH	7.75														
	S <sup>o/po</sup>	20														
	T (°C)	20.8														
	O2 (%)	83.8														

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Tabella 16

**U.O.**

III-1 REPLICA

Rinnovo soluzioni																
PARAMETRI																
		giorni		sabato	domenica	4°	5°	6°	7°	8°	sabato	domenica	11°	12°	13°	14°
		16-dic	17-dic	18-dic	19-dic	20-dic	21-dic	22-dic	23-dic	24-dic	25-dic	26-dic	27-dic	28-dic	29-dic	30-dic
		inizio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h									
[mg/l]																
controllo	pH	8.18				7.82			8.01				7.59			7.87
	S <sup>o/oo</sup>	20				20			20				20			20
	T (°C)	21.7				20.3			19.8				19.5			20.1
	O <sub>2</sub> (%)	85				70			86				52			80.6
1,56 (mg/l)	pH	8.17				7.8			7.84				7.67			7.94
	S <sup>o/oo</sup>	20				20			20				20			20
	T (°C)	21.6				20.5			19.7				19.7			20.7
	O <sub>2</sub> (%)	79				65			63				61			74
3,12 (mg/l)	pH	8.25				7.95			8.08				7.66			7.86
	S <sup>o/oo</sup>	19.5				20			20				20			20
	T (°C)	21.3				20.8			19.8				19.6			20.7
	O <sub>2</sub> (%)	90				80			80				62			71
6,25 (mg/l)	pH	8.16				7.51			7.88				7.67			7.69
	S <sup>o/oo</sup>	20				20			20				20			20
	T (°C)	21.5				21.1			20.3				20			20.7
	O <sub>2</sub> (%)	86				55			82				61			66
12,5 (mg/l)	pH	7.71				8.03			7.95				7.68			7.78
	S <sup>o/oo</sup>	19.5				20			20				20			20
	T (°C)	21.5				20.6			20.9				20.2			20.9
	O <sub>2</sub> (%)	64.5				86			72				60			63.6
25 (mg/l)	pH															
	S <sup>o/oo</sup>															
	T (°C)															
	O <sub>2</sub> (%)															



## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Tabella 18

**U.O.**

III-3 REPLICA

**Rinnovo soluzioni**  
**PARAMETRI**

		giorni		Sabato	domenica	4°	5°	6°	7°	8°	Sabato	domenica	11°	12°	13°	14°
		16-dic	17-dic	18-dic	19-dic	20-dic	21-dic	22-dic	23-dic	24-dic	25-dic	26-dic	27-dic	28-dic	29-dic	30-dic
		inizio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h									
<b>[mg/l]</b>	<b>pH</b>															
	<b>S<sup>o/oo</sup></b>															
	<b>T (°C)</b>															
	<b>O2 (%)</b>															
controllo	<b>pH</b>	7.64				7.96			7.99				7.65			8
	<b>S<sup>o/oo</sup></b>	20				20			19.5				20.5			20
	<b>T (°C)</b>	21.8				21			20.4				19.9			20.6
	<b>O2 (%)</b>	70				77			82.7				52			65
1,56 (mg/l)	<b>pH</b>	7.96				7.99			8.04				7.65			7.95
	<b>S<sup>o/oo</sup></b>	20				20			20				20			20
	<b>T (°C)</b>	21.6				21			20.5				19.7			20.8
	<b>O2 (%)</b>	68				75.7			90				55			80
3,12 (mg/l)	<b>pH</b>	7.79				8.02			8.02				7.58			8
	<b>S<sup>o/oo</sup></b>	19.5				19.5			21				20			20
	<b>T (°C)</b>	21.9				20.08			20				19.9			20.7
	<b>O2 (%)</b>	61.1				80			92				61			66
6,25 (mg/l)	<b>pH</b>	8.11				8.01			7.94				7.62			7.76
	<b>S<sup>o/oo</sup></b>	20				20			20				19.5			20
	<b>T (°C)</b>	21.8				20.7			20.4				20.1			20.9
	<b>O2 (%)</b>	77.9				78			85				61.5			67.5
12,5 (mg/l)	<b>pH</b>	7.95				8.03			7.92				7.69			8.03
	<b>S<sup>o/oo</sup></b>	20				20			20				19.5			20
	<b>T (°C)</b>	21.4				20.6			20.9				20.4			21
	<b>O2 (%)</b>	84				79			74				61			55.4
25 (mg/l)	<b>pH</b>															
	<b>S<sup>o/oo</sup></b>															
	<b>T (°C)</b>															
	<b>O2 (%)</b>															

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Tabella 19

### LETTURA 1° TEST CRONICO

I REPLICA						org. Morti / n° org totale repliche	
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h	24 h	96 h
controllo							
1.56							
3.12							
6.25							
12.5						5	
25		5				10	15

I REPLICA									org. Morti / n° org totale repliche
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g	14g
controllo									
1.56									
3.12									
6.25									
12.5									5
25									15

II REPLICA					
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h
controllo					
1.56					
3.12					
6.25					
12.5					
25		5			

II REPLICA								
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g
controllo								
1.56								
3.12								
6.25								
12.5								
25								

III REPLICA					
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h
controllo					
1.56					
3.12					
6.25					
12.5		5			
25			5		

III REPLICA								
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g
controllo								
1.56								
3.12								
6.25								
12.5								
25								

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Tabella 20

### LETTURA 2° TEST CRONICO

I REPLICA						org. Morti / n° org totale repliche	
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h	24 h	96 h
controllo							
1,56							
3,12							
6,25							
12,5							
25		1	4			2	15

I REPLICA									org. Morti / n° org totale repliche
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g	14g
controllo									
1,56									
3,12									
6,25									
12,5								1	5
25									15

II REPLICA					
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h
controllo					
1,56					
3,12					
6,25					
12,5					
25			5		

II REPLICA								
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g
controllo								
1,56								
3,12								
6,25								
12,5						1		
25								

III REPLICA					
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h
controllo					
1,56					
3,12					
6,25					
12,5					
25		1	4		

III REPLICA								
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g
controllo								
1,56								
3,12								
6,25								
12,5						3		
25								

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Tabella 21

### LETTURA 3° TEST CRONICO

I REPLICA						org. Morti / n° org totale repliche	
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h	24 h	96 h
controllo							
1.56							
3.12							
6.25							
12.5		1				1	2
25		5				15	

I REPLICA									org. Morti / n° org totale repliche
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g	14g
controllo									1
1.56									
3.12									1
6.25							1		1
12.5						1			5
25									15

II REPLICA					
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h
controllo					
1.56					
3.12					
6.25					
12.5					
25		5			

II REPLICA								
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g
controllo								
1.56								
3.12								
6.25								
12.5					2			
25								

III REPLICA					
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h
controllo	5				
1.56					
3.12					
6.25					
12.5					1
25		5			

III REPLICA								
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g
controllo					1			
1.56								
3.12				1				
6.25								
12.5								
25								

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Alla concentrazione maggiore utilizzata nel test (25 mg/L) si è ottenuta una mortalità del 100% dopo 48 h dall'inizio del test, alla concentrazione di 12,5 mg/L la mortalità è stata del 33%, mentre alle restanti concentrazioni la mortalità è risultata pari allo 0%. I valori di LC50 e di NOEC calcolati con diversi metodi, sono riportati in tabella 22.

**Tabella 22 – Valori di LC50 e di NOEC calcolati per il saggio cronico con SSC2**

	PROBIT	Dunnet's test	Steel's many-one Rank test
<b>LC50</b>	<b>13.533 mg/L</b> (lim. fid. 95%: 12.203-15.041)		
<b>NOEC</b>		<b>6.25 mg/L</b>	<b>12.5 mg/L</b>

Per il valore di NOEC, riteniamo attendibile il risultato ottenuto con il test non parametrico di Steel, in quanto il test di Dunnet nella fase di verifica della omogeneità della varianza tra i gruppi riporta che non è possibile effettuare tale verifica poiché uno o più gruppi hanno varianza pari a zero.

### 4.4 Stabilità del disperdente – Dati spettrofotometrici

Nell'esperimento di tossicità acuta effettuato presso l'APAT sono stati osservati solo 2 valori per il tasso di mortalità (100% alla concentrazione di 10,5 mg/L di sodiododecilsolfato e 0% alle altre concentrazioni). Questo risultato può portare ad una stima errata della concentrazione letale al 50% (LC50) nel saggio statico.

L'effetto dell'areazione sulla stabilità delle sostanze utilizzate nei saggi di tossicità va testata preliminarmente alle esecuzioni delle prove, poiché le condizioni di areazione possono influenzare i risultati dei test.

Durante la conduzione, presso APAT, del saggio semistatico di tossicità cronica, i branzini esposti alle concentrazioni più elevate presentavano difficoltà respiratorie solo nelle prime ore (1 o 2 ore) dopo il ricambio delle soluzioni, mentre successivamente, mostravano netti segni di ripresa. Il comportamento degli organismi sembra indicare una diminuzione della concentrazione di disperdente nel corso del tempo. Questa diminuzione potrebbe essere

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

dovuta alla volatilità della sostanza, ad un adsorbimento sulle pareti della camera di saggio o ad una modificazione subita dalla sostanza nel tempo. Per questi motivi sono state effettuate alcune analisi spettrofotometriche su campioni di disperdente SSC2 in condizioni di areazione e di non areazione.

Dalla soluzione madre SM1 ottenuta sciogliendo 1,582 g di SSC2 in 1 L di acqua marina, è stata preparata una soluzione di SSC2 alla concentrazione di 25 mg/L (20 mL di SM1 in 1000 mL di acqua marina), suddivisa in 2 becker da 500 ml, di cui uno è stato sottoposto ad areazione.

I campioni analizzati allo spettrofotometro sono i seguenti:

- Acqua marina
- SSC2 25 mg/L areata
- SSC2 25 mg/L non areata

Le letture delle soluzioni sono state eseguite dopo 10, 20, 30, e 40 minuti dalla loro preparazione, utilizzando cuvette con percorso ottico di 10 cm e contro un bianco di acqua distillata.

I risultati mostrati in figura 2 evidenziano che già dopo 30 minuti di aerazione lo spettro del campione con disperdente (B 30') è simile allo spettro dell'acqua marina di controllo (A). Al contrario, in assenza di areazione (figura 3) la soluzione contenente il disperdente conserva lo stesso spettro anche nel campione analizzato 40 minuti dopo la preparazione.

Questi risultati evidenziano che l'apporto di ossigeno influenza direttamente la stabilità del prodotto disperdente studiato e suggeriscono che, nelle condizioni sperimentali utilizzate da APAT per l'esecuzione del saggio cronico, la presenza di areazione potrebbe aver provocato una sottostima dei valori di LC<sub>50</sub> e di NOEC.

Considerando quindi la sensibilità del metodo al processo di aerazione, sembra necessario definire, almeno per questa tipologia di prodotti (volatili), un protocollo sperimentale che non preveda l'areazione o una migliore definizione del flusso d'aria da utilizzare durante i saggi che non influenzi la stabilità della sostanza in studio.

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

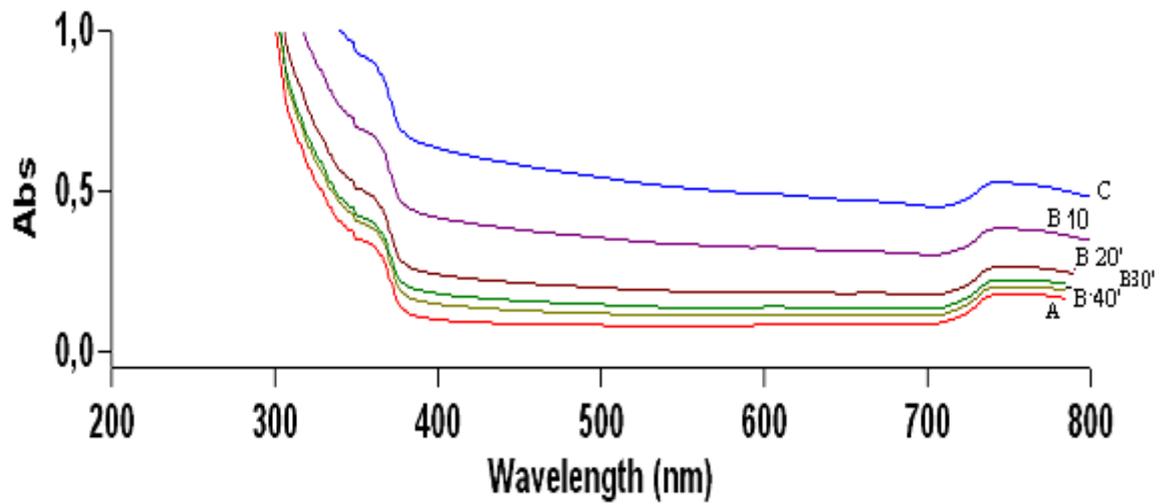


Fig. 2 – Misure spettrofotometriche sui campioni A, B e C. La soluzione B è stata misurata dopo 10, 20, 30 e 40' di areazione

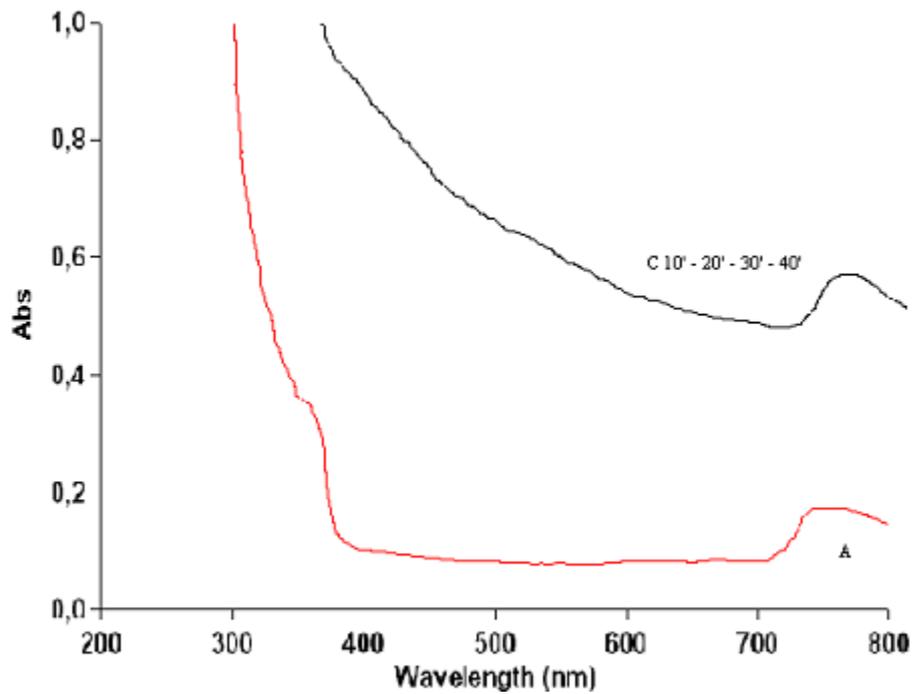


Fig. 3 – Misure spettrofotometriche dei campioni A e C. La soluzione C è stata misurata dopo 10, 20, 30, 40' dalla sua preparazione

## Cap. 5 Conclusioni

### 5.1 Verifica delle anomalie

Al termine del saggio cronico i branzini sopravvissuti alle diverse concentrazioni di SSC2 e del controllo sono stati pesati e misurati. Sono stati misurati almeno 3 pesci per ogni camera di saggio per un totale di 20 branzini. I valori di peso e lunghezza degli organismi alla fine del test sono quindi stati messi a confronto con gli stessi valori misurati prima dell'inizio del test.

Nei grafici delle figure 4 e 5 sono riportate in funzione delle concentrazioni i pesi e le lunghezze degli animali. C (controllo) indica il peso e la lunghezza all'inizio dell'esperimento, mentre B (Bianco) indica il peso e la lunghezza degli animali di controllo alla fine dell'esperimento.

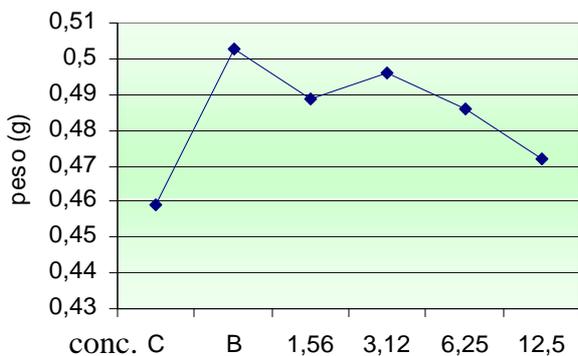


Fig. 4 – Grafico del peso medio dei branzini alle diverse concentrazioni di SSC2

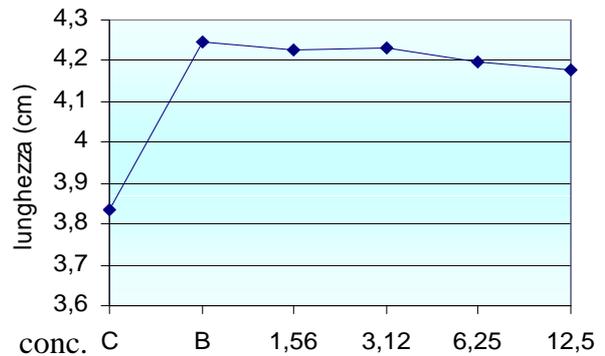


Fig. 5 – Grafico della lunghezza media dei branzini alle diverse concentrazioni di SSC2

Relativamente ai dati del peso, il confronto tramite t-test fra ciascun gruppo a diverse concentrazioni (compreso il gruppo indicato con B) e il gruppo di controllo (C) riporta risultati non significativi. Al contrario, lo stesso tipo di confronto utilizzando i dati di lunghezza riporta risultati significativi.

### 5.2 Considerazioni conclusive

Alcuni studi hanno mostrato che l'efficacia della dispersione del petrolio da parte del disperdente è influenzata anche dalla salinità (dall'Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente Svedese, 2001). La variazione della capacità di dispersione del petrolio da parte del disperdente in funzione della salinità potrebbe influenzare in generale anche la tossicità del prodotto stesso. Per questo potrebbe essere utile approfondire la dipendenza della tossicità di alcuni disperdenti in funzione della salinità, in quanto la salinità nel Mediterraneo è superiore al valore di 20 per mille utilizzato nei saggi oggetto dello studio collaborativo condotto.

Infine, la letteratura evidenzia che la sostanza derivata dalla miscela disperdente + petrolio (Yamada et al., 2003) può risultare più tossica del disperdente da solo. La sperimentazione della miscela disperdente+ petrolio va comunque associata allo studio degli effetti del solo disperdente e del solo petrolio in modo da discriminare l'effetto della miscela rispetto a quella dei singoli componenti.

# Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

allegato 1

TEST ACUTO 48 h - SDS  
U.O.

REPLICA

RILEVAMENTO DEI PARAMETRI		giorni		13-dic			14-dic	
concentrazione (mg/l)		inizio	2 h	4h	6 h	8 h	24 h	48 h
controllo	pH							
	S <sup>o/po</sup>							
	T (°C)							
	O2 (%)							
1,25 (mg/l)	pH							
	S <sup>o/po</sup>							
	T (°C)							
	O2 (%)							
2,5 (mg/l)	pH							
	S <sup>o/po</sup>							
	T (°C)							
	O2 (%)							
5 (mg/l)	pH							
	S <sup>o/po</sup>							
	T (°C)							
	O2 (%)							
10 (mg/l)	pH							
	S <sup>o/po</sup>							
	T (°C)							
	O2 (%)							
(mg/l)	pH							
	S <sup>o/po</sup>							
	T (°C)							
	O2 (%)							

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

allegato 2

TAXA-04 SSC2 Monitoraggio dei parametri durante il test cronico 14gg  
U.O.

REPLICA

Rinnovo soluzioni		PARAMETRI															
		giorni		1°	Sabato	domenica	4°	5°	6°	7°	8°	Sabato	domenica	11°	12°	13°	14°
		16-dic	17-dic	18-dic	19-dic	20-dic	21-dic	22-dic	23-dic	24-dic	25-dic	26-dic	27-dic	28-dic	29-dic	30-dic	
		inizio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h										
[mg/l]																	
controllo	pH																
	S <sup>o/oo</sup>																
	T (°C)																
	O2 (%)																
1,56 (mg/l)	pH																
	S <sup>o/oo</sup>																
	T (°C)																
	O2 (%)																
3,12 (mg/l)	pH																
	S <sup>o/oo</sup>																
	T (°C)																
	O2 (%)																
6,25 (mg/l)	pH																
	S <sup>o/oo</sup>																
	T (°C)																
	O2 (%)																
12,5 (mg/l)	pH																
	S <sup>o/oo</sup>																
	T (°C)																
	O2 (%)																
25 (mg/l)	pH																
	S <sup>o/oo</sup>																
	T (°C)																
	O2 (%)																

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

### Allegato 3

#### LETTURA TEST CRONICO

I REPLICA						org. Morti / n° org totale repliche	
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h	24 h	96 h
controllo							
1,56							
3,12							
6,25							
12,5							
25							

I REPLICA									org. Morti / n° org totale repliche
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g	14g
controllo									
1,56									
3,12									
6,25									
12,5									
25									

II REPLICA					
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h
controllo					
1,56					
3,12					
6,25					
12,5					
25					

III REPLICA								
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g
controllo								
1,56								
3,12								
6,25								
12,5								
25								

III REPLICA					
concentrazioni (mg/l)	org. Morti 0 h	org. Morti 24 h	org. Morti 48 h	org. Morti 72 h	org. Morti 96 h
controllo					
1,56					
3,12					
6,25					
12,5					
25					

III REPLICA								
conc. (mg/l)	org. Morti 5°g	org. Morti 6°g	org. Morti 7°g	org. Morti 8°g	org. Morti 11°g	org. Morti 12°g	org. Morti 13°g	org. Morti 14°g
controllo								
1,56								
3,12								
6,25								
12,5								
25								

## Bibliografia

Baudo R., 2003, Principi di ecotossicologia, CNR-Istituto per lo studio degli ecosistemi, Università di Sassari.

Bullini L., Pignatti S., Virzo De Santo A., 1998, Ecologia generale, UTET.

Clark R. B., 1992, Marine pollution, 3rd ed., Clarendon Press, Oxford.

Colborn T., Vom Saal F. e Soto A. M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ. Health Perspec., 101(5): 378-384.

Hopkin S.P., 1993. In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. In: P. Calow (Ed.), Handbook of Ecotoxicology, Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 397-427.

Howe, H. F. e L. C. Westley, 1996, Piante e animali. Rapporti ecologici ed evolutivi, Franco Muzzio Editore: Pp. 287.

HSMO, 1998, The Environmental Impact of the Sea Empress Oil Spill, Final report of The Sea Empress Environmental Evaluation Committee, ISBN 0117021563, London

IMO/UNEP, 1995, Guidelines on Spill Dispersant Application, International Maritime Organization, London.

Lindgren C., Lager H., Fejes J., 2001, Oil spill dispersants, Risk assessment for Swedish waters, IVL Report Swedish Environmental Research Institute.

Lunel T., Rusin J., Bailey N., Halliwell C., Davies L., 1997, The net environmental benefit of a successful dispersant operation at the sea empress incident, In 1997 International Oil

## **Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti**

Spill Conference Proceedings, American Petroleum Institute Publication No. 4651, Washington, DC.

Mackay D., 1995, Effectiveness of chemical dispersants under breaking wave conditions, In the Use of Chemicals in Oil Spill Response, ASTM STP 1252, American Society for testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Michel J., French D., Csulak F., Sperduto M., 1997, Natural resource impacts from the North Cape oil spill, In 1997 International Oil Spill Conference Proceedings, American Petroleum Institute Publication No. 4651, Washington, DC.

National Research Council, 1989, Using Oil Spill Dispersants on the sea, National Academy Press, Washington, DC.

OECD, 1992, Fish acute toxicity test, Linee guida n° 203

OECD, 1984, Fish, prolonged toxicity test: 14-day study, Linee guida n° 204

Ramade F., 1997, Ecotoxicologie, Masson Pp. 205

Yamada M., Takada H., Toyoda K., Yoshida A., et al., 2003, Study on the fate of petroleum-derived polycyclic aromatic Hydrocarbons (PAHs) and the effect of chemical dispersant using on enclosed ecosystem, mesocosm, Marine Pollution Bulletin 47:105-113

### INDICE

Capitolo 1	Cenni di ecotossicologia	pag. 1
1.1	Introduzione	“ 1
1.1.1	Inquinanti inorganici	“ 2
1.1.2	Inquinanti organici	“ 3
1.2	Biomonitoraggio	“ 4
Capitolo 2	I disperdenti	pag. 8
2.1	La chimica dei disperdenti	“ 9
2.2	Le azioni fisiche del dispersente	“ 10
2.3	Cosa influisce sull'efficacia/efficienza dei disperdenti?	“ 11
2.4	Dibattito sull'uso dei disperdenti	“ 12
Capitolo 3	Parte sperimentale	pag. 14
3.1	Cenni biologici sulla specie ittica <i>Dicentrarcus Labrax</i> (Spigola)	“ 14
3.2	Test di tossicità	“ 15
3.3	Interconfronto, con la specie ittica <i>Dicentrarcus Labrax</i> , per i saggi ecotossicologici, acuto (96h) e cronico (14 gg) con il prodotto dispersente Safety Sea Cleaner II (SSC 2)	“ 16
3.3.1	Programma operativo e metodologie da impiegare	“ 16
3.3.2	Modalità operative	“ 17
3.3.2.1	Trasporto dei pesci in laboratorio	“ 17
3.3.2.2	Mantenimento dei pesci in laboratorio prima dell'esecuzione dei test	“ 17
Capitolo 4	Risultati	pag. 27
4.1	Acclimatazione degli organismi	“ 27
4.2	Parametri test acuto con tossico di riferimento (SDS)	“ 27
4.3	Parametri test cronico semistatico SSC 2	“ 32
4.4	Stabilità del dispersente - dati spettrofotometrici	“ 45

## Messa a punto di metodi ecotossicologici sui rifiuti

Capitolo 5	Conclusioni	pag. 48
5.1	Verifica delle anomalie	“ 48
5.2	Considerazioni conclusive	“ 49
allegato 1		pag. 50
allegato 2		pag. 51
allegato 3		pag. 52
Bibliografia		pag. 53