

SESSIONE 2

L'ECOTOSSICOLOGIA COME STRUMENTO DI GESTIONE



Utilizzo dei biomarkers per monitorare le attività di dragaggio nel porto di Livorno e lo sversamento dei sedimenti nella vasca di colmata: 10 anni di attività

R. Bocchetti¹, D. Pellegrini², A. Gaion², F. Regoli¹

¹Università Politecnica delle Marche, Dipartimento di Biochimica, Biologia e Genetica, Ancona, ²ISPRA, Livorno,

Abstract - Negli ultimi dieci anni il Porto di Livorno è stato sottoposto ad intense attività di dragaggio e di confinamento dei materiali derivanti da tali operazioni in vasca di colmata. Durante questo periodo è stato utilizzato un approccio ecotossicologico, integrando i risultati di un'ampia batteria di biomarkers in mitili, *Mytilus galloprovincialis*, traslocati in alcune aree del porto di Livorno durante le diverse fasi delle attività di dragaggio, sversamento di materiali in vasca e periodi di inattività. I risultati hanno evidenziato significative alterazioni di parametri biochimici e cellulari durante i periodi di maggior movimentazione di sedimenti confermando l'utilità dei biomarkers nel rilevare la comparsa di un disturbo biologico. I dati ottenuti dalle analisi biologiche, integrati e opportunamente pesati attraverso un modello di analisi di rischio (Sediqualeft), hanno permesso di elaborare degli indici di pericolo relativi alla sequenza delle operazioni di dragaggio e di sversamento dei sedimenti.

Keywords *Mytilus galloprovincialis*, dredging activity, biomarkers, sediments, risk assessment

incrementata da numerose classi di contaminanti, tra cui metalli e xenobiotici organici (Livingstone 2001); questo fenomeno determina il rischio di insorgenza di una condizione di stress ossidativo, ovvero uno squilibrio tra molecole ad azione proossidante e sistema antiossidante, con potenziale comparsa di danni cellulari a carico di lipidi di membrana, proteine e DNA (Frenzilli et al., 2001; Regoli et al., 2004). Tra i biomarkers di insorgenza di danni cellulari, l'analisi della destabilizzazione lisosomiale negli emociti dà indicazioni molto sensibili sull'avvenuta esposizione a condizioni ambientali non favorevoli (Moore 1988, Lowe et al., 1995). Le alterazioni lisosomiali analizzate in questo studio si riferiscono alla stabilità della membrana e all'accumulo di prodotti di perossidazione lipidica tra cui la malondialdeide. Poiché un aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) o una diminuita efficienza antiossidante possono causare l'insorgenza di alterazioni al DNA, queste sono state analizzate attraverso il test della Cometa che permette di valutare il grado di integrità strutturale del DNA in termini di rotture nella doppia elica. Infine sono stati analizzati i livelli di metallotioneine e l'attività dell'Acyl CoA ossidasi (AOX) rispettivamente biomarkers di esposizione a contaminanti metallici ed organici.

INTRODUZIONE

Negli ultimi dieci anni il porto di Livorno è stato interessato da numerose attività di dragaggio, e dal confinamento dei sedimenti in vasca di colmata. La gestione di queste operazioni ha previsto un ampio programma di monitoraggio attraverso indagini chimiche, analisi delle comunità bentoniche e test di tossicità, sia nei siti di movimentazione dei sedimenti che nell'area di deposizione. Scopo di questo lavoro è stato quello di integrare alle indagini suggerite dalle attuali linee guida per la movimentazione dei sedimenti, uno studio di tipo ecotossicologico, che ha previsto la traslocazione di organismi bioindicatori, *Mytilus galloprovincialis*, e l'utilizzo di un'ampia batteria di biomarkers biochimici e cellulari. Se da un lato l'analisi chimica rappresenta un aspetto fondamentale per la caratterizzazione dei contaminanti presenti nell'area di studio, dall'altro le indagini di tipo biologico forniscono informazioni importanti per definire la biodisponibilità dei contaminanti, la loro trasferibilità al comparto biotico e soprattutto per evidenziare gli effetti biologici causati da tali sostanze. Questo approccio integrato fornisce risultati di grande interesse poiché permette una visione più ampia dei problemi e dei rischi determinati dalle attività di dragaggio. Tra i biomarkers analizzati, particolare attenzione è stata data all'analisi delle difese antiossidanti, comprendente specifici enzimi e composti a basso peso molecolare che hanno la funzione di contrastare la tossicità delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). La produzione di ROS può essere infatti

MATERIALI E METODI

I mitili, *M. galloprovincialis*, sono stati posizionati in quattro aree del porto di Livorno nei pressi dell'ingresso portuale tra il sito di dragaggio e la vasca di colmata (Ingresso), un'area interna principalmente interessata dalle operazioni di escavo (Interno), una zona prospiciente la vasca di colmata (Vasca), che costituisce il bacino di destinazione finale dei sedimenti; i risultati ottenuti nei mitili trapiantati in queste aree sono stati confrontati con quelli di un sito di riferimento portuale (Imboccatura Sud) lontano dalle operazioni di dragaggio e sversamento. Inoltre, per valutare il background di disturbo ambientale nell'area del Porto di Livorno, gli organismi sono stati trapiantati anche in un sito di controllo. Gli esperimenti di traslocazione, ciascuno della durata di circa 4 settimane, sono stati realizzati nell'arco temporale di oltre dieci anni, durante periodi di inattività, dragaggio e/o sversamento di sedimenti (provenienti anche da altri bacini portuali) nella vasca di colmata (Tab. 1, Fig.1). Tra i principali biomarkers analizzati negli organismi, l'attività dei principali enzimi antiossidanti (catalasi, glutatione S-transferasi, glutatione reduttasi, glutatione perossidasi e livelli di glutatione totale) è stata misurata mediante specifici saggi spettrofotometrici. La destabilizzazione delle membrane lisosomiali è stata valutata attraverso il test di ritenzione del rosso neutro mentre i livelli di malondialdeide e di metallotioneine sono stati misurati mediante specifici saggi spettrofotometrici. La capacità antiossidante totale nei confronti dei radicali idrossilici (TOSC-HO•) e perossilici (TOSC-ROO•) è stata analizzata attraverso una

metodica gascromatografica mentre la misura dell'attività dell'AOX è stata fatta spettrofotometricamente. DNATutti i metodi sono stati precedentemente descritti (Bocchetti et al., 2008). I risultati complessivi sono stati elaborati anche attraverso uno specifico modello di analisi di rischio (Sediqualsoft) in fase di sviluppo e validazione presso il Dipartimento di Biochimica, Biologia e Genetica di UNIVPM ed ISPRA. La valutazione del quoziente di pericolo (Hazard Quotient) è basata sull'attribuzione ad ogni singolo biomarker di un peso e di una soglia per variazioni biologicamente rilevanti; in funzione dell'entità delle variazioni misurate e dell'importanza dei biomarkers, la stima dell' HQ è stata riferita a cinque livelli di pericolo, assente, lieve, moderato, alto e severo.

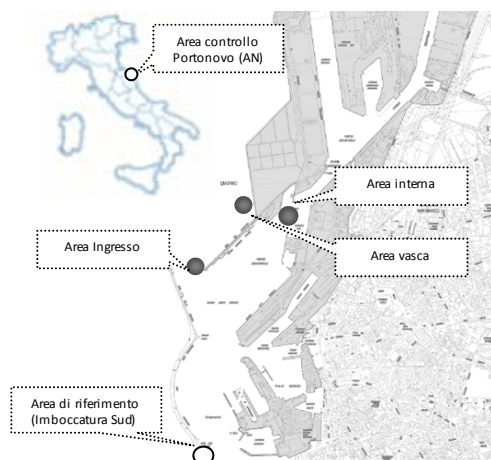


FIGURA 1. SITI DI TRASLOCAZIONE NEL PORTO DI LIVORNO.

TABELLA 1. PERIODI DI CAMPIONAMENTO E DI ATTIVITÀ DI DRAGAGGIO E CONFINAMENTO IN VASCA DI COLMATA

campionamento	attività		
	inattività	dragaggio	sversamento
Luglio 2001	inattività		
Marzo 2002		dragaggio	
Agosto 2002		dragaggio	sversamento
Dicembre 2002	inattività		
Marzo 2003		dragaggio	sversamento
Dicembre 2004	inattività		
Luglio 2006	inattività		
Maggio 2007		dragaggio	sversamento
Ottobre 2007		dragaggio	sversamento
Gennaio 2008	dragaggio		
Settembre 2008			sversamento
Luglio 2009			sversamento

RISULTATI

Il confronto tra l'area di controllo (Portonovo) e l'area di riferimento al porto (Imboccatura Sud) ha evidenziato la

presenza delle normali attività portuali. Prima dell'inizio delle operazioni di dragaggio non state evidenziate particolari differenze tra le diverse aree portuali, mentre all'inizio del primo dragaggio si osservano delle alterazioni *moderate* dei sistemi antiossidanti nei mitili traslocati nell'area interna, quella direttamente interessata dalle attività. Dopo il dragaggio e lo sversamento di 100.000 m³ di sedimento, il disturbo biologico coinvolge anche i mitili traslocati nell'area ingresso e in quella prospiciente la vasca di colmata. Durante il periodo di inattività, gli organismi traslocati nelle aree di ingresso e vasca ritornano a condizioni di "pre-dragaggio", mentre gli organismi traslocati nell'area interna continuano a presentare una significativa alterazione di molti biomarkers

Tale situazione di disturbo biologico continua ad essere evidente negli organismi traslocati nell'area interna all'inizio del secondo periodo di dragaggio, quando tuttavia si evidenzia una più marcata alterazione delle risposte biologiche nei mitili traslocati nell'area esterna e quella prospiciente la vasca di colmata, risultato forse correlato alle operazioni di sversamento di sedimenti provenienti dal porto di Piombino (pericolo *elevato*). A conferma di questa ipotesi, durante le fasi successive del dragaggio il disturbo rimane *moderato* nell'area interna, e soltanto *lieve* nell'area prospiciente la vasca e in quella di ingresso. Durante il periodo di inattività che va dal Dicembre 2004 al Luglio 2006 le variazioni rispetto agli organismi traslocati nel sito di riferimento portuale sono generalmente basse, sempre più elevati nell'area interna dove gli organismi evidenziano un certo disturbo delle risposte biologiche. Durante il terzo dragaggio, in cui si sono movimentati complessivamente 120.000 m³ di sedimento, si osserva qualche variazione dei biomarkers nelle prime fasi, ed un disturbo biologico maggiore con il proseguire delle attività di dragaggio, in particolare nell'area interna. Nel Settembre 2008 e nel Luglio 2009 non sono stati effettuati dragaggi, ma sono stati confinati in vasca di colmata sedimenti provenienti rispettivamente dal porto di Marina di Carrara e La Spezia. Anche durante queste attività, i mitili traslocati nell'area prospiciente alla vasca di colmata hanno evidenziato alterazioni significative con un alto grado di compromissione delle difese antiossidanti e dei parametri di integrità cellulare.

CONCLUSIONI

In conclusione, questo lavoro ha confermato la validità dell'utilizzo dei mitili attraverso tecniche di traslocazione attiva come un importante strumento per migliorare e completare la valutazione del rischio ambientale associato alle operazioni di movimentazione dei sedimenti marini in ambito portuale. Le risposte biologiche dei mitili traslocati hanno evidenziato alterazioni significative soprattutto nell'area interna, con un livello di disturbo biologico sempre più elevato rispetto alle altre aree. I risultati sugli organismi traslocati presso la vasca di colmata suggeriscono tuttavia che anche lo sversamento di sedimenti provenienti da altri porti induce un impatto significativo in questa area.

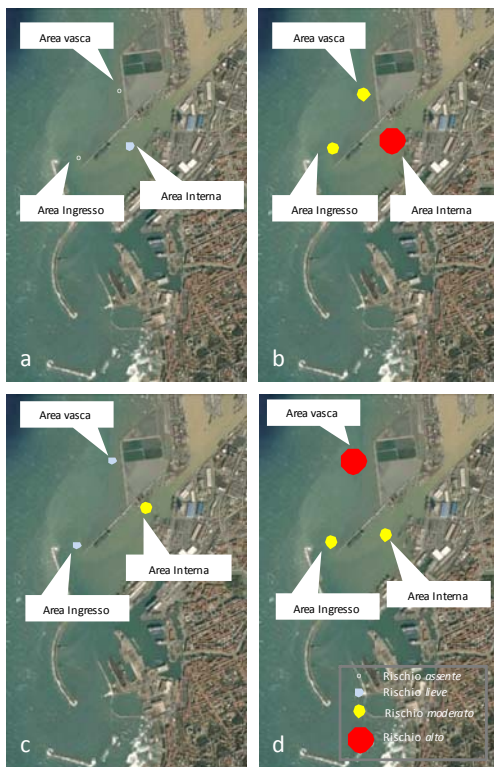


FIGURA. 2 RISULTATI DELL'ANALISI DEI LIVELLI DI RISCHIO DURANTE IL PERIODO PRE-DRAGAGGIO (A), DRAGAGGIO (B), FASE DI INATTIVITÀ (C) E ATTIVITÀ DI CONFINAMENTO DI SEDIMENTI (D).

BIBLIOGRAFIA

Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., and Regoli, F. (2008). "Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas". *Aquatic Toxicology*, 89, 257-266.

Frenzilli, G., Nigro, M., Scancelli, V., Gorbi, S., and Regoli F. (2001). "DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon". *Aquat Toxicol*, 53, 19-32.

Lowe, D.M., Fossato, V.U. and Depledge, M.H. (1995). "Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from Venice Lagoon: an in vitro study". *Mar Ecol Prog Ser*, 129, 189-196.

Moore MN. (1988). "Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics". *Mar Ecol Prog Ser*, 46, 81-89.

Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scancelli, V., Fattorini, D. and Nigro, M. (2004). "Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment". *Aquat Toxicol*, 68, 167-178.

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

T. Leoni*, R. Brascugli, L. Liuti, G. Mariotti, S. Sarcina, A. Valenti

Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche, Dipartimento Provinciale di Macerata, Italia – tristano.leoni@ambiente.marche.it

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

E' stata sperimentata una metodologia per la definizione dei livelli chimici di base locali (LCB) misurando la contaminazione dei sedimenti marini in aree con basso impatto antropico, analizzando solo i campioni aventi un grado di tossicità pressoché assente nei confronti di cinque organismi appartenenti a tre diversi livelli trofici marini. Mentre per i contaminanti organici le analisi sono ancora in corso, per i metalli è stato possibile esprimere in prima approssimazione una relazione tra la concentrazione di ciascun metallo e la percentuale pelitica.

Keywords: sedimenti marini, saggi biologici, metalli.

1. INTRODUZIONE

Il Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini (ICRAM – APAT, 2007) prevede dei valori limite di contaminazione definiti come LCB e LCL al fine di gestire correttamente i materiali derivanti dal dragaggio di sedimenti sulla base del loro grado di contaminazione. I valori limite di cui sopra danno una indicazione del tutto generalizzata sul grado di contaminazione dei sedimenti ritenuto accettabile prevedendo limiti che si riferiscono ad altre normative nazionali e non (DM 367/2003, DM 471/1999, CCME 2001, ecc.). Per contro i materiali da escavazione dei fondali, vengono gestiti di norma a livello locale per cui è corretto confrontare il loro grado di contaminazione con il livello di fondo degli inquinanti considerati nelle varie aree indagate.

Per tale ragione, così come previsto dal manuale sopra citato, è utile individuare a livello locale i valori di LCB ovvero i valori di concentrazione che risultano da considerazioni sui valori di fondo per ciascun contaminante. Tale obiettivo risulta di notevole interesse in quanto può permettere una classificazione, e quindi una destinazione finale dei materiali dragati, conforme al reale profilo chimico, chimico-fisico ed ecotossicologico dei fondali considerati.

I risultati attesi sono quindi relativi alla definizione dell'LCB per ciascuno dei parametri previsti dalla tab. 2.3A e 2.3C del Manuale ICRAM – APAT, 2007.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Definizione dell'area geochimicamente omogenea

Per la definizione dell'area sono stati utilizzati rilievi ed informazioni raccolti dalla Regione Marche in ambito

costiero (sondaggi, stratigrafie, ecc.), considerando anche l'eventuale presenza di zone contraddistinte da anomalie geochimiche. Inoltre le aree designate sono risultate prive di opere antropiche che interessano diffusamente la costa marchigiana, in quanto esse possono contribuire alla modificazione sia delle correnti che degli apporti influenzando anche pesantemente la naturalità delle aree costiere.

Tali criteri hanno permesso di definire la zona geochimicamente omogenea dove sono stati effettuati i successivi campionamenti.

Dato che i campioni utili, ovvero privi di tossicità secondo i criteri stabiliti dalla tab. 2.4 del Manuale ICRAM – APAT da avviare ad analisi chimica devono essere almeno 20, sono stati identificati 30 punti di prelievo in due diverse aree di indagine distribuiti da nord verso sud su 10 transetti in area omogenea a 500 – 1.500 – 3.000 m dalla costa al fine di disporre di un range di pelite sufficientemente ampio. In tali punti sono stati prelevati altrettanti campioni avviati ai saggi biologici.

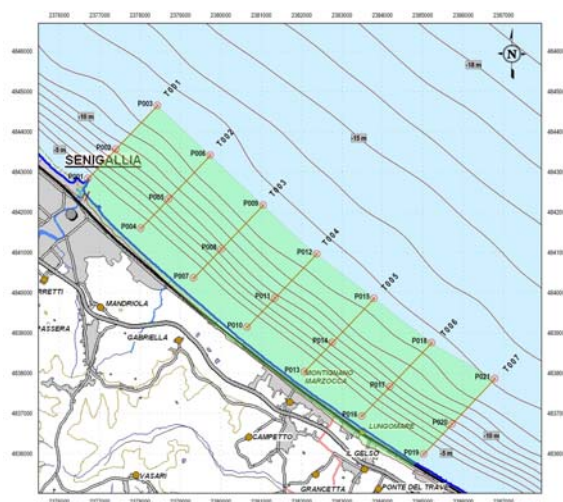


Figura 1. Area di indagine 01

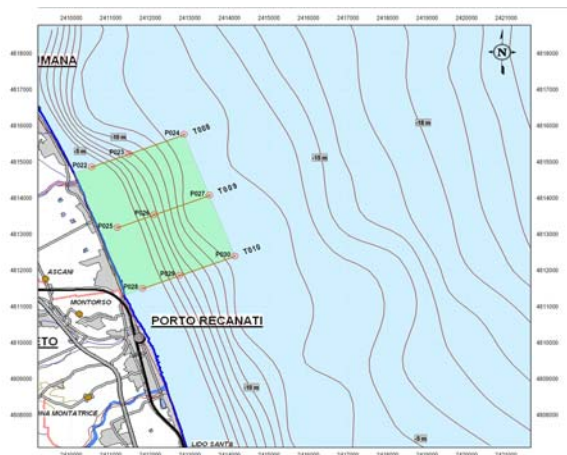


Figura 2. Area di indagine 02

2.2 Definizione dei metodi analitici

I metodi chimici individuati sono relativi a protocolli ufficialmente riconosciuti, conformi ai limiti di quantificazione della tab. 3.2 del Manuale ICRAM - APAT e comprensivi della percentuale di recupero rispetto a materiali standard certificati. I metodi relativi alla determinazione dei metalli sono riportati nella tabella A.

Tabella A. Metodi chimici

Parametro	Metodo di prova
As	EPA 3051A / ISS.DAA.003.Rev00
Cd	EPA 3051A / APAT CNR IRSA Met 3020 Man 29 2003
Cr	EPA 3051A / APAT CNR IRSA Met 3020 Man 29 2003
Cu	EPA 3051A / APAT CNR IRSA Met 3020 Man 29 2003
Hg	EPA 3051A / APAT CNR IRSA Met 3200 Man 29 2003
Ni	EPA 3051A / APAT CNR IRSA Met 3020 Man 29 2003
Pb	EPA 3051A / APAT CNR IRSA Met 3020 Man 29 2003
Zn	EPA 3051A / APAT CNR IRSA Met 3020 Man 29 2003

I metodi ecotossicologici sono riferiti a protocolli standardizzati e prevedono l'utilizzo di cinque specie (due alghe, due crostacei, un batterio) di cui una applicata alla fase solida e le altre all'elutriato. Le specie sono state scelte tra quelle riportate al paragrafo 2.2.2 del Manuale ICRAM - APAT. Tali metodi sono riportati nella tabella B.

Tabella B. Metodi ecotossicologici

Specie	Metodo di prova
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	ISO 10253:2005 modificato gruppo intercalibrazione UNICHIM 2006
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	ISO 10253:2006
<i>Vibrio fischeri</i>	UNI EN ISO 11308-3:2007 / AZUR ENVIRONMENTAL 1994
<i>Acartia tonsa</i>	ISO 14669:1999
<i>Tigriopus fulvus</i>	Protocollo Progetto Disperdenti 2009

I metodi chimico-fisici sono relativi a protocolli ufficialmente riconosciuti.

2.3 Caratterizzazione dei sedimenti

Nel corso di questa fase sono stati effettuati i campionamenti nei punti di prelievo individuati secondo i criteri esposti in 2.1.

Ai campioni prelevati è stata applicata la batteria di saggi biologici di cui al punto 2.2. Questo approccio, rispetto a quello di minima normalmente utilizzato (alga, batterio, crostaceo), ha permesso una migliore valutazione di congruenza sia dei risultati ottenuti con i test algali nel caso di notevole biostimolazione che di quelli relativi ai saggi che prevedono l'utilizzo dei crostacei nel caso di risposte inibitorie importanti.

Si ritiene che questo approccio offra buone garanzie di corrispondenza dei dati sperimentali alla realtà, anche in considerazione del fatto che i valori dei LCB estrapolati potranno essere utilizzati per definire il destino di notevoli quantità di materiali anche ad elevato grado di contaminazione.

Per le successive analisi chimiche, sono stati utilizzati esclusivamente i campioni che hanno evidenziato una conformità alla colonna A della tab. 2.4 del Manuale ICRAM - APAT per tutte le prove eseguite. Allo stato attuale sono disponibili i risultati dei metalli mentre le restanti attività analitiche sono ancora in corso.

2.4 Definizione dei LCB_{loc}

Nel corso di questa fase, sulla base dei risultati analitici, sono stati definiti in via preliminare i valori di LCB_{loc} per alcuni metalli restituendo per ciascuno di essi, più che un valore limite secco, una relazione che tiene conto della concentrazione pelitica descrivendo così un limite "mobile" funzione di tale concentrazione.

3. RISULTATI

3.1 Risultati dei saggi biologici

Sulla base dei risultati dei saggi biologici è stata effettuata la selezione dei campioni da sottoporre ad analisi chimica secondo i criteri stabiliti dal manuale ICRAM. Relativamente ai singoli saggi sono stati esclusi 6 campioni per *Acartia* (di cui 1 anche per *Vibrio*), 2 per *Phaeodactylum*, 1 per *Dunaliella*, 1 per *Vibrio*, per un totale di 10 campioni. Per quanto riguarda il *Vibrio* sono stati considerati come positivi anche STI >1.

Per i livelli trofici rappresentati da due organismi, relativamente alle specie algali, si nota come *Dunaliella* abbia fornito risposte meno importanti, ed una discreta tendenza alla biostimolazione, rispetto a *Phaeodactylum*. Per i crostacei spicca una risposta inibitoria di *Acartia*, con valori di EC50 conformi alle colonne B e C del manuale ICRAM, mentre con *Tigriopus* non sono stati evidenziati segnali significativi di tossicità in nessun campione.

3.2 Concentrazione dei metalli rilevata

I risultati ottenuti mostrano concentrazioni dei vari metalli abbastanza basse, permettendo di definire i sedimenti analizzati a basso gradi di contaminazione, avvalorando così, oltre che la metodologia di selezione ecotossicologica dei campioni, anche la scelta delle aree campionate.

I valori medi dei singoli metalli sono risultati sempre inferiori ai LCB tabulati nel Manuale ICRAM. Utilizzando inoltre le varie equazioni derivanti dalle correlazioni tra concentrazione dei singoli metalli e la concentrazione pelitica, ponendo questa ultima ai livelli più alti di norma riscontrabili (circa 85), risultano LCB locali pari a circa la metà dei valori tabulati.

Appare interessante poter disporre di LCB mobili e correlati alla frazione pelitica.

3.3 Relazione tra pelite e concentrazione dei metalli

E' stata ricercata una prima relazione lineare tra i dati di % di pelite e le concentrazioni dei metalli, utilizzando tutti i risultati disponibili non trattati statisticamente. Tale relazione risulta verificata con buona approssimazione ($R^2 > 0,5$) per cinque degli otto metalli indagati.

I risultati sono illustrati nei seguenti grafici:

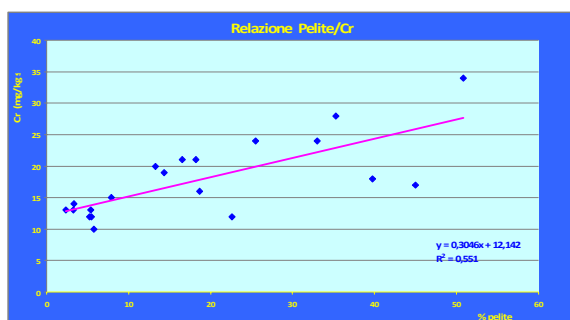


Grafico 1 – Relazione Pelite/Cromo

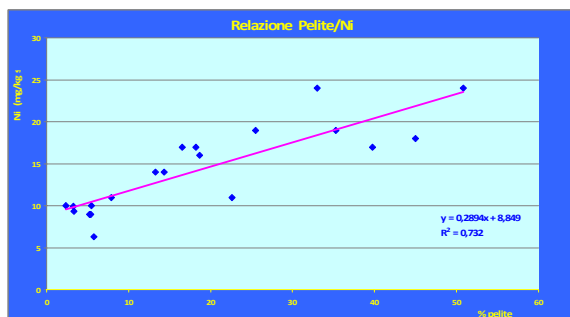


Grafico 2 – Relazione Pelite/Nichel

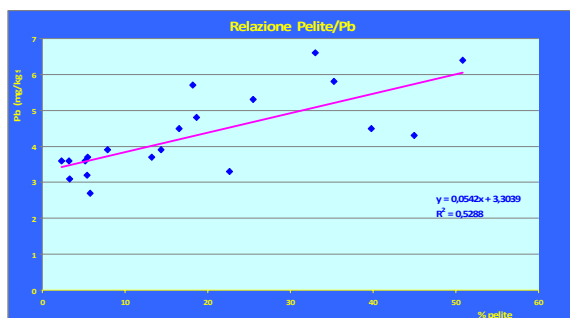


Grafico 3 – Relazione Pelite/Piombo

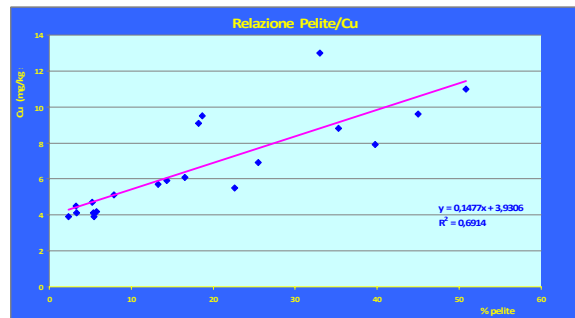


Grafico 4 – Relazione Pelite/Rame

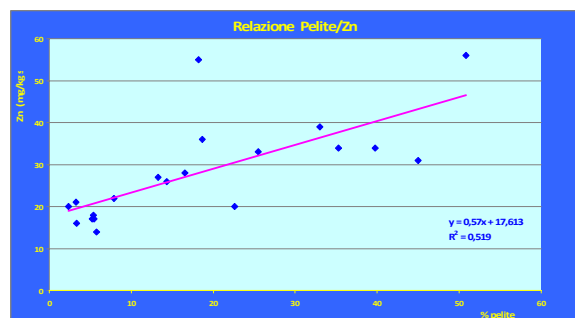


Grafico 5 – Relazione Pelite/Zinco

Per quanto riguarda i tre metalli per cui non è stato possibile evidenziare una chiara relazione lineare si fa presente che il Mercurio è risultato sempre al di sotto del limite di quantificazione e l'Arsenico ha sempre fornito valori vicini a 4 mg/kg ss indipendentemente dalla concentrazione pelitica. Per il Cadmio invece si ritiene che la relazione lineare rilevata sia inconsistente ($R^2 = 0,3$) e comunque da riverificare previo trattamento statistico dei dati.

4. CONCLUSIONI

Questo primo approccio volto alla definizione dei LCB locali dimostra fondamentalmente come i valori dei LCB tabulati nel manuale ICRAM – APAT non sono poi così lontani dai valori ottenuti in questo studio, per ora relativo solo alle specie metalliche. Ciò permette di asserire con una certa tranquillità che la gestione dei materiali di dragaggio finora effettuata è da considerare corretta dal punto di vista ambientale. D'altra parte il fatto di aver rilevato LCB locali più bassi, unitamente alla possibilità di disporre per ciascun metallo di un limite mobile funzione della concentrazione pelitica, porterà ad una gestione locale dei materiali movimentati ancor più conforme alle caratteristiche ambientali specifiche delle varie aree geografiche considerate.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia l'ISPRA per aver fornito l'opportunità di realizzare questa prima rilevazione a livello nazionale dei LCB locali e la Regione Marche per i dati gentilmente messi a disposizione relativamente alla scelta delle aree di indagine.

BIBLIOGRAFIA

A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F.(1989) - *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 17th Ed., A.P.H.A., Washington.

ASTM (1994) - *Standard guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediment for Toxicological Testing*. E 1391-94: 1-21.

AZUR ENVIRONMENTAL (1994) – Microtox[®] Acute Toxicity Basic Test procedures: 63pp.

CCME, 2001. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. Canadian Council of Ministers of the Environment. CCME EPC-98E.

Ex D.M. n 367 (2003) . Regolamento concernente la fissazione di standard di qualità nell'ambiente acquatico per le sostanze pericolose, ai sensi dell'articolo 3, comma 4, del D.Lgs. 11 maggio 1999, n. 152.

FARAPONOVA O. (2009) – Test di tossicità e saggi biologici acuti con *Tigriopus fulvus* Fischer.

INTERNATIONAL STANDARD (1999) – Water quality- Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). ISO 14669.

ONORATI F., PELLEGRINI D., BIGONGIARI N. (2001) – Applicazione di saggi biologici su sedimenti marini. In: *Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003)*. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, ICRAM: scheda 11.

UNI EN ISO 10253 (2006) – Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*..

UNI EN ISO 11348-3 (2009) – Water quality – Determination of the inhibitory effect of waters samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze – dried bacteria.

Short term toxicity screening tests on river sediments coming from a Montegiordano (CS) area and finalized to coastal nourishment

E. Pellegrini ^{a*}, D. Iraci Sareri ^a, F. Pedullà ^a, A.M. Diano ^a

^a Laboratorio bionaturalistico, A.R.P.A. Cal, Dipartimento di Reggio Calabria, Italy – e.pellegrini@arpacal.it, d.iracisareri@arpacal.it, f.pedulla@arpacal.it, a.diano@arpacal.it

Abstract – To value the contaminant bioavailability in a river sediment supposed to be useful for a coastal nourishment, a set of organisms belonging to different taxa and trophic levels was used (*Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Avena sativa*, *Cucumis sativus* and *Lactuca sativa*). The germination and root elongation test was the most sensible test. All samples revealed toxicity by one or more test organisms, showing stimulation or inhibition effects.

Keywords: river sediments, nourishment, acute toxicity test

1. INTRODUCTION

This case study proposed to investigate about contaminant bioavailability in river sediments coming from a Montegiordano (CS) area and designed for a coastal nourishment in Montegiordano Marina.

Nourishment of coastal areas by river sediments is not at present a common procedure nor specific guide lines are available in recent literature. People dealing with this kind of referential bugs often have to adjust standard protocols interpreting results with right caution.

To value bioavailability of toxic contaminants in marine sediments usually a set of marine organisms belonging to different taxa and trophic levels is used to investigate and identify their different transmission patterns (APAT-ICRAM, 2007). In this case a new suitable taxa set was chosen to perform short term toxicity screening tests both on solid and watery phase, based on common multispecies assays protocols, in order to validate it as a cute tool to be able to furnish useful data in similar cases of environmental management.

2. MATERIALS AND METHODS

Samples of sediments were collected at four different depths along the Torrente Castello river's bed crossing the Montegiordano area.

To perform the multispecies assay on sediments and on its derived watery phase, three different biological groups belonging to different phyla, trophic levels and habitats were chosen. The utilized set of organisms was composed by the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck 1889), the cladoceran *Daphnia magna* Müller 1785 and three Magnoliophyta: *Avena sativa* Linnaeus, *Cucumis sativus* Linnaeus and *Lactuca sativa* Linnaeus. Watery phase and sediment rates were prepared following standard protocols (APAT, 2004).

The 30 minutes test with *V. fischeri* (2 replicates) and the 24 hours test with *D. magna* (4 replicates each with 5 juveniles) were both performed on the watery phase obtained by each

sample, according to manufacturer's instruction and to common assay protocols (APAT-IRSA-CNR, 2003). Since *V. fischeri* is a bacterium living in seawater an opportune adjustment of the watery osmotic gradient was necessary to carry out the screening test. End points of *V. fischeri* and *D. magna* acute toxicity assays are represented respectively by the percentage of divergence of bioluminescence inhibition/stimulation and by the percentage of dead/unmoving individuals between tested samples and a standard control. The reference toxicants for *V. fischeri* and *D. magna* assays were respectively phenol and potassium dichromate.

The solid phases were tested with a modified 'Seed germination and root elongation test' (APAT, 2004; Baudo and Beltrami, 2004) introducing *A. sativa* and *L. sativa* as test organisms instead of *Sorghum saccharatum* and *Lepidium sativum*. This 72 hours assay assume a multiple endpoint (number of germinated seeds and their root length) combined to furnish an *Index of sample germination* (IG%) in comparison of a standard control.

3. RESULTS

As seen in Table 1 results of the ecotoxicity tests outcrop different values (A.s.: *Avena sativa*, C.s: *Cucumis sativus*; L.s: *Lactuca sativa*).

Table 1. Results of the toxicity screening tests

Sample	<i>Vibrio</i> test	<i>Daphnia</i> test	Germination test		
	% effect	% of dead organisms	IG %		
			A.S.	C.S.	L.S.
1	2,5	0	71,29	278,94	46,28
2	-5,76	0	84,35	219,23	44,28
3	-1,69	0	81,16	291,25	45,85
4	-0,4	0	81,66	268,91	45,65

Vibrio fischeri and *Daphnia magna* tests did not give acute toxicity scores; trivial effects of stimulation on *Vibrio* were observed in three samples. In the germination test the species *Cucumis sativus* showed in all samples an increased growth that gave an IG% index superior than 120% with an evident stimulating effect. The IG% calculated for the *Lactuca sativa* replicates gave lower values than the control, remarking an inhibitory effect. No evident effects were traceable in data furnished by *A. sativa* replicates.

4. CONCLUSIONS

Results for all samples were uniform in each single test. No one showed acute toxicity by *Vibrio fischeri* and *Daphnia*

* Elisabetta Pellegrini; Via Troncovito snc - 89135 Gallico Superiore (RC), tel. e fax: 0965 372618

magna and one by one they gave similar IG% values in the germination test. Reaction discrepancy was observed instead between the test organisms stressing different sensibilities: *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and *Avena sativa* didn't recorded any toxicity, while *Cucumis sativus* and *Lactuca sativa* showed respectively a stimulating and an inhibitory effect.

As stressed by Wang e Freemark (1995) it doesn't exist an universally sensible species since toxic effects are variable among different organisms due to the different spreading patterns of potential biocontaminants and the different ways of organisms to use environmental resources.

In our case the germination test was therefore the most significant test, with different answers according to different seeds due to the complex interactions developing in sediments and their natural propriety to concentrate water dissolved contaminants.

The weak stimulating effect observed in *Vibrio fischeri* appears more obvious in the cucumber replicates; since presence of nutrients does not influence in plants these growth phases (Baudo, 1985) it is possible to interpret these data as an answer to low concentrations of environmental pollution (Wang e Freemark, 1995).

These no homogenous results in adopted different screening tests highlight the sample complexity and the necessity to perform multiple assays based on an opportune selected set of species as well the response variability (Pasini, 2001) confirms the reliability of the adopted methodology, useful for applying in cases of environmental management. The results of the ecotoxicological assays were therefore integrated with chemical, microbiological and physical analyses to provide a response about possibility and modality of nourishment.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very thankful for the helpful support of the "Centro Funzionale Strategico di Geologia e Ultrastrutture" of Cosenza in furnishing data about sample methods and environmental traits on the Montegiordano area.

REFERENCES

- AA.VV. (2003). "Metodi analitici per le acque". APAT-IRSA-CNR.
- AA.VV. (2007). "Manuale per la Movimentazione di Sedimenti Marini." Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, ICRAM-APAT.
- APAT (2004). "Proposta di Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati. Utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici." Report RTI CTN_TES, 1/2004. Eds. Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT), Roma, pp. 72-81.
- Baudo, R. and M. Beltrami (2004). "Test di germinazione e allungamento radicale". Biologi Italiani, no. 11, pp. 55-62.
- Baudo, R. and H. Mountau (1985). "Riflessioni sulle aree problematiche in ecotossicologia." Acqua - Aria 4: 331-339.
- Pasini, M.A., Marangoni, E., Secondi, A. and M. Villa (2001). "Impiego di saggi multispecie nella caratterizzazione ecotossicologica di diverse matrici acquose." 14° Congresso Int.le dei biologi "Salute,

sicurezza e qualità: obiettivi di una professione". Altavilla Milicia (PA), 11-14 ottobre 2001.

Wang, W. and K. Freemark (1995). "The use of plants for environmental monitoring and assessment." Ecotoxicology and environmental safety. 30: 289-301.

Ecotoxicological approach in the management of dredging harbour sediments: an introductory study in Palermo Harbour basin

T. Cillari ^{a,*}, A. Ausili ^a, M.G. Finoia ^a, F. Onorati ^a, M. Pulcini ^a, G. Sunseri ^a

^a Institute for Environmental Protection and Research, Ispra, Italy – tiziana.cillari@isprambiente.it

- **Abstract –Dredging activities in the harbour environments, can have serious impacts on aquatic ecosystems, when the sediments to be dredged are contaminated. The goal of present work is to report some of the results obtained from a research project carried out in Palermo harbour basin in 1999, which introduced the ecotoxicological approach, together with classical chemicals and physical approaches, as tool of additional search. This study has given the idea for the realization of handbook about harbour dredging (APAT-ICRAM (**), 2007) which defines the sampling and analysis methods and the criteria of qualitative classification of material, indispensable tool for management of harbour dredging.**

Keywords: sediments, ecotoxicology, dredging, harbour

1. INTRODUCTION

In the context of the maintenance of harbour systems, dredging of sediments operations are to be often performed so as to allow safe internal navigation. These activities can have serious environmental impact on aquatic ecosystems, above all when the sediments to be dredged are contaminated (Choueri *et al.*, 2009). Since sediments contamination strictly requires the management of dredged material (Salomons and Brils, 2004), adequate assessment of the quality of sediments is necessary in the areas where dredging operations are being carried out.

Chemical analyses alone carried out on sediments are not sufficient to predict environmental risk, since just the simple measurement of the level of contaminants do not provide information about the bioavailability of compounds and the effects of their interactions (Stronkhorst *et al.*, 2003).

Among the effects of dredging works, the resuspension of the bottom sediments may recirculate the settled contaminants (DeValls *et al.*, 2004) and chemicals, at high concentrations, in dredged material can be toxic to biota in the areas in which they had been deposited (Stronkhorst *et al.*, 2003, Sousa *et al.*, 2007).

International law system in the years has pointed out the need for a thorough knowledge of the nature, origin and chemical, physical and biological properties of sediments in order to obtain a suitable assessment of possible impacts resulting from dredging and to a ecosustainable dredged material management. Moreover the application of different bioassays, in the testing of dredged material quality, with different target-organisms and exposure routes is now

settled (Macken *et al.*, 2008, Onorati *et al.*, 1999a, Pane *et al.*, 2008).

The document APAT – ICRAM (2007), which has provided ideas to put down guidelines on harbour dredging following reference work of technical and scientific publications, legislation and research experience, must be seen in this context.

For this document the realization of the research project "Study on the quality of sediments of Palermo harbour basin and identification of a marine site of compatible sewage" (Ausili *et al.*, 2003) carried out by ICRAM (***) from 1999 to 2003, on commission of the Harbour Authority of Palermo following requirement to sink the bottom, was fundamental. At the time, the poor scientific knowledge about the general environmental situation, the lack of preceding information about the quality of sediment and the sources of contamination regarding the Palermo harbour basin, together with the wide surface and the abundant quantity of sedimentary material to be removed, have created the necessity to organize environmental investigations so that could provide qualitative, quantitative and management information more accurate than those obtained from just the actual legislation observance (M.D. 24.01.1996). This study has represented an important moment to test some technical-scientific criteria at work which were new for that moment. The ecotoxicological researches, together with current chemical and physical approach, among the experimentation techniques used, were fundamental.

The goal of present work is to report some of the results obtained at the time, which made it evaluate the quality of the sediments of Palermo harbour, assess the ecotoxicological responses and connect the level of chemical contamination with these responses. In conclusion thanks to this project it may demonstrate that, without ecotoxicological analyses, those harbour sediments could be classify as tolerables, for the only levels of chemical contaminations, while these sediment resulted highly toxic.

2. MATERIALS AND METHODS

The 26 sampling sites were located in the harbour areas between the piers S. Lucia, Piave e Vittorio Veneto and at their extremity. In these areas 5 of the 18 industrial and domestic sewerages officially registered in the harbour basin, were present. The sediments were collected in each sampling station from April to May 1999 by means of pontoon and corer, for a total of 26 cores, representative of dredged sedimentary material. Each core was labelled with letters in alphabetical order (Fig. 1).

* Corresponding author. tiziana.cillari@isprambiente.it, telephone +390916114044, fax +390916114060

** Now is ISPRA

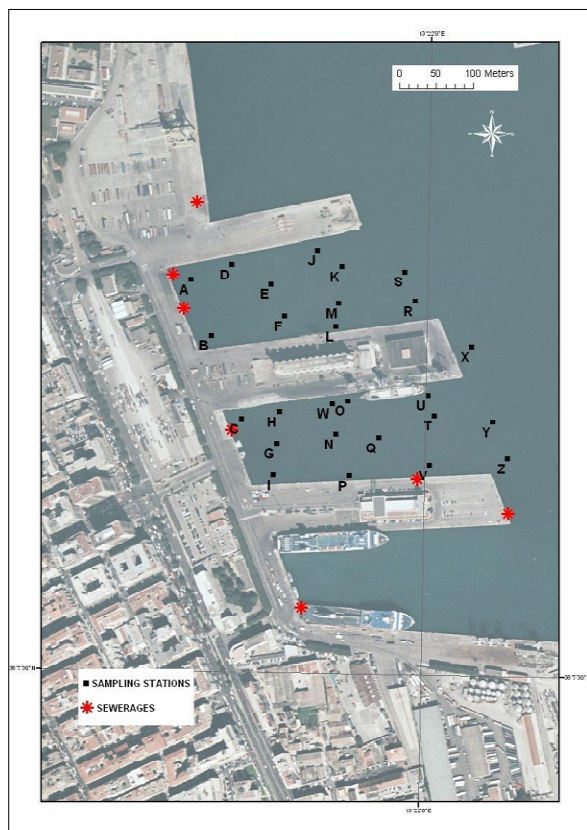


Figure 1. Study area of Palermo harbour basin.

Two 20-cm long sections, at the upper and lower levels, were collected from each core up to 1.5-m long. Three 20-cm long sections, at the upper, intermediate and lower levels, were collected from each core up to 2-m long. Sections representative of lower stratum were collected from cores longer than 2-m, in addition to the three sections mentioned above. Each collected stratum was labelled with numbers 1, 2, 3, 4 in order of depth.

Granulometric analysis was used to determine the main fractions (gravel, sand and pelite) through the following phases: groundwork in which each sample is treated with hydrogen peroxide solution for 48 h at ambient temperature and then it was washed with distilled water; separation of the sandy fraction from the pelitic one in which the samples are subject to mechanical humid sieve-shaker 63- μ m mesh; the coarse graded (> 63 μ m) and the fine (< 63 μ m) fractions are subsequently exsiccated in a stove at T = 105 °C e then weighed. The analytic phase of obtained coarse graded fractions was carried out by standard mechanical dry sieve-shaker (ASTM) 2-mm mesh to separate the gravel from the sand. After the sediment kept in the sieve was weighed, the weight of total coarse graded fraction was calculated. Eventually the proportionality (%) among three fractions (gravel, sand, pelite) was calculated.

Concentrations (for dry weight) of trace metals (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb) and some congeners of polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and organic chlorinated pesticides (OCPs) were determined (IRSA-CNR, 1984).

The assessment of sediment riskiness, in terms of chemical concentrations, was determined through the criterion of Mc Donald (1993) based on the Probable Effect Level (PEL); this value represents lower concentration of

considered substance beyond which there is a concrete probability of toxic effect resulting from bioassays performed on real samples.

Two types of ecotoxicological tests were carried out on some sediment samples: one with the use of amphipod *Corophium orientale* and another, named Microtox®, with the use of marine bacterium *Vibrio fischeri*. The first bioassay, carried out on OSPAR (1995) protocol, assesses organisms mortality as difference between the mortality in sample to be tested and in the control sample (Δm); the evaluation of results was carried out by criteria of the assessment of ecotoxicological responses are reported in Table 1 and they consider long-term toxicity (calculated after incubation for 28 days) and the statistical significance.

Table 1. Criteria of assessment of toxicity related to *C. orientale* mortality

Δm	TOXICITY
$\Delta m < 15$ ($p \geq 0.05$)	Absent
$\Delta m \leq 15$ ($p < 0.05$)	Low
$15 < \Delta m \leq 30$ ($p < 0.05$)	Mean
$30 < \Delta m \leq 60$ ($p < 0.05$)	High
$\Delta m < 60$ ($p < 0.05$)	Very high

Microtox® is a bioassay of acute toxicity which uses marine bacteria *Vibrio fischeri* having natural bioluminescence that can be modulate in presence of pollutants. Therefore the measure of bioluminescence inhibition or, sometimes, stimulation (*ormési*, a positive reaction of luciferin enzymatic system metabolic expression of a change in metabolism of bacteria) allows to assess sediment toxicity. Microtox® was carried out using Onorati *et al.* (1999b) e Azur Environmental (1994) protocols and was applied to two phases of sediment: solid and liquid (elutriate). The former gives information about those contaminants that are bound to the sediment particles, for their chemical nature, hydrophobia, adsorption and complexing degree with organic substance (Onorati and Volpi Ghirardini, 2001), while elutriate gives information about the hydro-soluble contaminants that may recirculate by mechanical agitation; this component is most representative of the toxic potentialities of marine sediments when they are to be dredged (EPA/USACE, 1991).

The results of Microtox® on solid phase were expressed as S.T.I. (Sediment Toxicity Index) that represents real acute toxicity of analyzed sample as to the natural toxicity of a sample with the same granulometric characteristics (Onorati *et al.*, 1999); those of elutriate were expressed as percentage difference (ΔB) between observed bioluminescence as to control one (in Artificial sea water, ASW) . The toxicity scales and related qualitative judgment of samples, were expressed by criteria reported in Table 2.

Table 2. Criteria of assessment of toxicity related to Microtox® on elutriate (E) and on solid phase (S)

E	S	TOXICITY
ΔB (%)	S.T.I.	
< -5		<i>Ormesi</i>
-5 - +5	0 — 1.00	Absent
5 - 20	1.01 — 3.00	Low
20 - 40	3.01 — 6.00	Mean
40 - 80	6.01 — 12.00	High
> 80	> 12.00	Very high

3. RESULTS

46 samples were collected, at various depths, from 26 extracted cores: 26 belonging to superficial stratum or level 1 (0-20 cm), 9 of level 2 (90-110 cm), 9 of level 3 (180-200 cm) e 2 samples of level 4 (220-250 cm).

The sediments are mainly sandy, except for some deposits of silt-clay material next to official sewerages. Moreover the granulometric analyses carried out show that the areas neighbouring to piers and quays are characterized by fast decreasing granulometry, with a certain presence of pelite.

The concentrations of analyzed trace metals and organic compounds generally result higher than their average value in superficial sediments of western Mediterranean known in literature (Sunseri *et al.*, 1995, Sunseri *et al.*, 2000), and than Probable Effect Level (PEL). In particular, most significant values refer to Cr, Hg, Pb and Σ PCBs e Σ OCPs.

4. DISCUSSION

In this study were estimated the results deduced from an immediate ecotoxicological approach, placing target marine organisms in contact with sediment or with its derived matrices, carried out together with classical chemical and physical approaches.

The areas neighbouring to piers and quays, characterized by a good percentage presence of pelite; have a higher contamination, since fine fraction catches a greater amount of contaminants.

The concentrations of analyzed trace metals and organic compounds generally result high. This trend is mainly observed in some superficial samples which also show mean and high toxicity in performed biological assays. It has been observed that the higher overall toxicity of these samples depends on their closeness to sewerages, on the granulometric composition of sediments, to which contaminants are clung, and on hydrodynamic processes inside of harbour basin.

The contamination shows a negative vertical gradient, that decreases from superficial to deeper strata, due to the sedimentation rate and the penetration of chemical substances.

5 CONCLUSIONS

The fact that the domestic and industrial sewerages, official or not, flow in the studied marine environment, harbour basin of Palermo, without purification actions, is at the basis of this work, aimed at the assessment of chemical, physical and biological properties of dredged sediments.

Trace metals (Kendrick *et al.*, 1992), polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and organic chlorinated pesticides (OCPs), more toxic and diffuse are determined and investigated on sediments; besides granulometric analysis and ecotoxicological tests, with two marine organisms targets (*V. fischeri* and *C. orientale*), have been carried out.

The obtained results show an elevated level of some trace metals, that it is often higher than the mean value present in superficial sediments of western Mediterranean, and a remarkable amount of OCPs and PHAs; the distribution of these substances are connected with hydrodynamic circulation and the property of sediments to catch them.

However, from the comparisons carried out, since direct correlations between ecotoxicological responses and single contaminants are not present, none of selected and analyzed substances is alone sufficient, with her concentration, to be

toxic for all studied marine environment. Instead all anthropogenic chemical substances, including the ones not analyzed, all together and in synergy, produced a wide environmental acute toxicity, as pointed out from distinct responses of both used marine organism targets in bioassays, and this allows us to classify this sedimentary marine environment as highly toxic.

Since the conditions of characterized sediments resulted damaged and not compatible with the sea dipping, the proposed managerial option was their containment in fill tank, in according to M.D. 471/99.

Also thanks to this research experience, the handbook APAT - ICRAM (2007) was realized, in which the criteria to assess quality of sediments, both in chemical terms and, particularly, with regard to ecotoxicological responses, were improved. By the integration of these criteria, we have reached the individuation of more quality classes compatible with a specific uses, expanding and diversifying the managerial options of dredged material (between sea dipping and nourishment of sandy shore, or, eventually, containment in conterminous and waterproofed tanks).

Therefore the introduction of an ecotoxicological approach, together with chemical and physical characterizations, allowed us to classify the quality of sediments very neatly and to have a wide range of management options, so that the dredging is more safe to the environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Prof. Dr. Francesca Brewerton for her priceless help in the translation into English.

REFERENCES

- Azur Environmental (1994) Microtox® Acute Toxicity Basic Test procedures, pp. 63.
- Ausili, A., M. Gabellini, G. Sunseri (2003) Studio sulla qualità dei sedimenti del bacino portuale di Palermo ed individuazione di un sito marino di discarica compatibile. Final report ICRAM – Autorità portuale di Palermo, vol. 1, pp. 192.
- Choueri, R.B., A. Cesar, R.J. Torres, D.M.S. Abessa, R.D. Morais, C.D.S. Pereira, M.R.L. Nascimento, A.A. Mozeto, I. Riba and T.A. DelValls (2009) Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72: 1824–1831.
- DelValls, T.A., A. Andres, M.J. Belzunce, J.L. Buceta, M.C. Casado-Martinez, R. Castro, I. Riba, J.R. Viguri and J. Blasco (2004) Chemical and ecotoxicological guidelines for managing disposal of dredged material. *TrAC—Trends Analytical Chemistry*, vol. 23: 10–11.
- APAT-ICRAM (2007) Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini. Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, pp. 72.
- IRSA-CNR (1984) Metodi di analisi per acque di mare. Quaderni 59, Roma.
- Kendrick, M.J., M.T. May, M.J. Plishka and K.D. Robinson (1992) Metals in biological systems. EllisHorwood, pp.183.

- EPA/USACE (1991) Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal (Testing manual). Report n° EPA-503/8-91/001, Washington, D.C.
- Macken, A., M. Giltrap, B. Foley, E. McGovern, B. McHugh and M. Davoren (2008) An integrated approach to the toxicity assessment of Irish marine sediments: validation of established marine bioassays for the monitoring of Irish marine sediments. *Environmental International*, vol. 34: 1023-1032.
- McDonald, D.D., S.L. Smith, M.P. Wong and P. Mudroch (2003) The development of Canadian marine environmental quality guidelines. Report prepared for the Interdepartmental Working group on Marine Environmental Quality Guidelines and the Canadian Council of Ministers of the Environment, Environment Canada, Ottawa, Ontario, pp 50 (+ app).
- Onorati, F., N. Bigongiari, D. Pellegrini and S. Giuliani (1999a) The suitability of *Corophium orientale* (Crustacea, Amphipoda) in harbour sediment toxicity bioassessment. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, vol. 2(4): 465 – 473.
- Onorati, F., D. Pellegrini and A. Ausili (1999b) Valutazione della tossicità naturale nel saggio Microtox® in fase solida: la normalizzazione pelitica, *Acqua & Aria* vol. 6: 83-91.
- Onorati, F. and A. Volpi Ghirardini (2001) Informazioni fornite dalle diverse matrici da testare con i saggi biologici: applicabilità di *Vibrio fischeri*. *Biologia Marina Mediterranea*, vol. 8(2): 31-40.
- OSPAR (1995) Protocols on methods for the testing of chemicals used in the offshore oil industry. OSPARCOM.
- Pane, L., E. Giacco, C. Corrà, G. Greco, G.L. Mariottini, F. Varisco and M. Faimali (2008) Ecotoxicological evaluation of Harbour sediments using marine organisms from different trophic levels. *Journal of Soils and Sediments*, vol. 8(2): 74-79.
- Salomons, W., Brils J. (eds) 2004. Contaminated sediments in European river basins. European Sediment Research Networks SedNet. EC Contract No. EVKI-CT-2001-2002. Key Action 1.4.1, Abatement of water pollution from contaminated land, landfills and sediments, pp. 80.
- Sousa, E.C.P.M., D.M.S. Abessa, B.R.F. Rachid, M.R. Gasparro and Zaroni L.P. (2007) Ecotoxicological assessment of sediments from the Port Santos and the disposal sites of dredged material. *Brazilian Journal of Oceanography*, vol. 55(2): 75–81.
- Stronkhorst, J., F. Ariese, B. Van Hattum, J.F. Postma, M. De Kluijver, P.J. Den Besten, M.J.N. Bergman, R. Daan, A.J. Murk and A.D. Vethaak (2003) Environmental impact and recovery at two dumping sites for dredged material in the North Sea. *Environmental Pollution*, vol. 124: 17–31.
- Sunseri, G., E. Amato, M. Gabellini, M. Giani, D. Pellegrini and E. Romano (2000) Metalli in traccia in sedimenti superficiali dei fondali circostanti l'isola di Ustica (Tirreno Meridionale). *Biologia Marina Mediterranea*, vol. 7(1): 947-952.
- Sunseri, G. (1995) Studio sulle caratteristiche granulometriche, la distribuzione di metalli in traccia e l'attività batterica nei sedimenti dei fondali della riserva naturale marina "isola di Ustica". Final report ICRAM-RNM Isola di Ustica - Ministero dell'ambiente, pp. 49.

Attività di monitoraggio eco-tossicologico nel Piano di Controllo per EMAS in siti di produzione itticoltrurale.

M. Francese ^{a,*}, P. Frisenda ^a, A. Intini ^b, R. Radente ^a

^a Shoreline Società Cooperativa c/o Area Science Park, Trieste, Italy - shoreline@shoreline.it

^b Sferica di A.I., via Boccaccio 11, Trieste, Italy – antointini@yahoo.it

Abstract – Lo scopo della presente pubblicazione è quello di dimostrare che in impianti di itticoltrura è possibile applicare analisi di tipo eco-tossicologico quale attività ricognitiva in un Piano di Controllo per certificazioni di sistema, sia quelle ambientali sia quelle per la sicurezza alimentare. Il caso studio presentato riguarda appunto una certificazione EMAS in una valle da pesca lagunare. In particolare, nell'azione di monitoraggio sono stati applicati i saggi biologici con *V. fischeri*, *B. plicatilis* e *P. tricorntutum* sulle acque, valutandone l'eutrofizzazione o l'eventuale presenza di contaminanti; allo stesso scopo, sui sedimenti è stato applicato il protocollo SPT con *V. fischeri*. I saggi biologici risultano dunque essere una buona pratica per il controllo ambientale in procedure di certificazione.

Keywords: acquacoltura, Piano di Controllo, saggi, EMAS.

1. INTRODUZIONE

Le valli da pesca nelle lagune del Friuli Venezia Giulia conducono attività di allevamento ittico, con un ciclo produttivo che si articola in processi di svezamento ed ingrasso di specie ittiche in bacini in terra. La valle considerata come caso studio occupa una superficie di circa 26 ha di cui circa 17 sono destinati all'allevamento e 3 sono occupati da canali per il ricircolo e lagunaggio. L'azienda conduce attività di allevamento ittico. Nell'ambito della valle si svolgono i cicli produttivi del branzino, dell'orata, dell'anguilla e di cefalo, dalla semina degli avannotti e preingrasso fino all'ingrasso a taglia commerciale, raggiunta in un periodo variabile per specie da 1 a 3 anni.



Figura 1. Specie allevate.

In particolare la fase di ingrasso avviene nelle tradizionali vasche in terra e l'antica pratica di apertura e chiusura delle porte di ingresso dell'acqua lagunare consente la regolazione delle condizioni di allevamento. Un sistema di pompe consente il ricircolo delle acque di allevamento anche quando l'opera di presa dalla laguna resta chiusa. Tale gestione permette la distribuzione uniforme dei principali parametri ambientali in tutto il bacino idrico di processo. L'ossigenazione ottimale viene raggiunta con la somministrazione di ossigeno in forma gassosa proveniente dall'impianto criogenico ad ossigeno liquido. Gli argini delle vasche in terra vengono periodicamente pressati e consolidati mediante infissione di pali in legno onde evitare il loro crollo. Condizioni di anomalia possono verificarsi in seguito al prelievo dalla laguna di acque i cui parametri chimico-fisici sono già alterati. Egualmente esiste il rischio di sversamenti in laguna di acque di processo contaminate a seguito dei trattamenti farmacologici per emergenze

sanitarie o a causa di perdite accidentali di sostanze inquinanti.

In virtù della certificazione EMAS, in particolare dopo l'emanazione del nuovo regolamento, l'azienda effettua periodicamente una analisi ambientale dei propri aspetti, processi e prestazioni, aggiornandola periodicamente. L'organizzazione segue dal 2008 un Piano dei Controlli per tenere sotto osservazione la qualità delle acque con frequenza sufficiente a rilevarne l'andamento, anche se non sempre con periodicità regolare. Tiene sotto controllo anche la qualità dei sedimenti degli argini immersi, con frequenza semestrale, per valutare l'eventuale accumulo nei fondali o la temporanea risospensione di particolato fine a causa dei lavori ordinari o straordinari, o ancora lo sfortunato apporto proveniente dall'esterno, ambiente lagunare ricco di attività antropiche. Le analisi vengono affidate a laboratori esterni (ShoreLAB di Shoreline e laboratori collegati); a queste si affianca il monitoraggio continuo dei parametri più strettamente legati al processo di produzione (T°C, Sal, DO, pH), effettuate dal personale in impianto, le cui registrazioni vengono conservate negli archivi dell'azienda.

2. MATERIALI E METODI

2.1 stazioni di campionamento

Seguendo il ciclo delle acque in impianto, i campionamenti sono stati programmati all'esterno dell'argine a mare, in ingresso dopo le opere di captazione, nelle diverse aree d'allevamento, nei canali di lagunaggio ed allo scarico, come rappresentato nella figura a seguire (circolazione del corpo idrico riassunta dai vettori color azzurro).



Figura 2. Stazioni di campionamento.

2.2 Saggi biologici

Sono stati utilizzati i seguenti saggi biologici: *Vibrio fischeri* (EN ISO 11348-3:1998), *Brachionus plicatilis* ASTM E1440:1998) e *Phaeodactylum tricorntutum* (ISO 10253:2006). Tutti i saggi sono stati condotti in condizioni controllate di luce e temperatura (Ecotox Ecotherm 80) e gli effetti sulle specie test sono stati controllati in microscopia (Zeiss stereo 2000; Leica ATC2000 con camera di Bürker); per i batteri bioluminescenti sono stati utilizzati lotti della SDI inc. con lettura mediante Microtox™ Analyser 500.

* Shoreline Soc. Coop., c/o Area Science Park, Padriciano n.99, Trieste 34149, tel +39 040 3755700 fax +39 040 3755701.

2.3 Applicazione dei saggi biologici

I saggi biologici sono stati applicati con diverse finalità: *V. fischeri* e *P. tricorutum* hanno valutato lo stato di eutrofizzazione delle acque, osservando quindi solo l'eventuale effetto stimolatore dei nutrienti sulle popolazioni di batteri ed alghe unicellulari (Francese, 2006). Altre analisi con *V. fischeri* e quelle con *B. plicatilis* hanno valutato invece l'eventuale presenza di contaminanti nelle acque. Infine *V. fischeri* (sul Tal Quale con protocollo SPT) e *B. plicatilis* (sull'elutriato) sono stati applicati per rilevare l'eventuale potenziale pericolosità della matrice di fondo.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Interpretazione dei grafici

Nei grafici relativi ai paragrafi seguenti i risultati analitici non sono espressi secondo cronologia di esecuzione, ma cercando di rappresentare il controllo nelle diverse fasi del ciclo delle acque, raggruppando dunque assieme i risultati analitici ottenuti nel corso dei due anni (2008-10) per ognuna di queste fasi. In legenda sono riportate le descrizioni dei punti di prelievo, che vengono anche differenziati in 5 colori distinti: blu per le acque in ingresso, rosa per quelle di allevamento, marrone per i canali di lagunaggio e il bacino di raccolta allo scarico, verde per le acque del bacino ricevente e rosso per i limiti di norma. Questo al fine di dimostrare la validità dei saggi come screening di controllo sul lungo periodo e consentire dunque di operare scelte gestionali.

3.2 Presenza di nutrienti e segnali di tossicità

I saggi con *V. fischeri* Microtox® hanno evidenziato una generale biostimolazione in tutti i campioni di acque delle valli da pesca, mantenendosi però sempre al di sotto del carico eutrofico delle acque del bacino ricevente ed al di sotto dei valori considerati rappresentativi di ormesi (>50%). Questo effetto non è stato però similmente rilevato dai test con *P. tricorutum*, forse più sensibili alla presenza casuale di detergenti nelle acque in ingresso o della presenza puntuale di qualche metallo in soluzione (probabile prodotti in uscita dai siti industriali della zona).

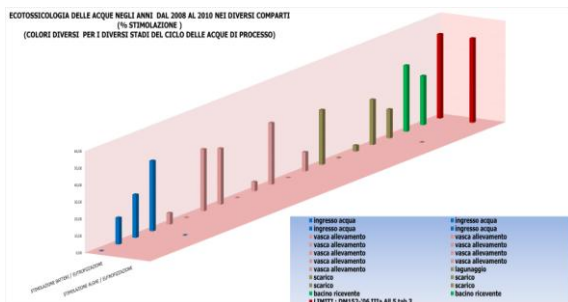


Figura 3. Grafico riassuntivo dei risultati di saggi biologici per la rilevazione di eutrofizzazione delle acque in impianto.

La ricerca di segnali di tossicità (inibizione dei saggi) ha rilevato che tutti i saggi eseguiti (*V. fischeri*, *B. plicatilis*, *P. tricorutum*) non hanno evidenziato effetti tossici (sempre inferiori al 10% di effetto tranne allo scarico con percentuali tra il 10 ed il 20 %). In modo complementare i risultati dei saggi con *P. tricorutum* hanno rilevato segnali di tossicità tra il 10 ed il 20 % in ingresso ed allo scarico.

Nei campioni di sedimento sono stati rilevati segnali di tossicità dal saggio con *V. fischeri* in fase solida (SPT) e da quello con *B. plicatilis* su elutriato, solo in finale del ciclo,

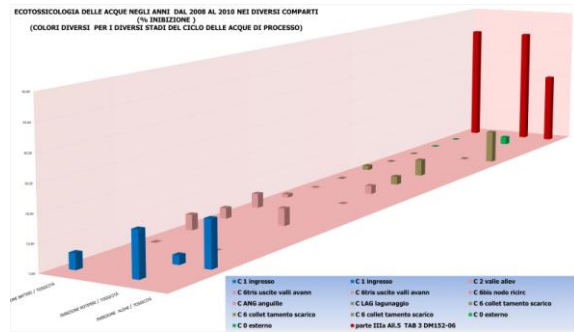


Figura 4. Grafico riassuntivo dei risultati di saggi biologici per la rilevazione di tossicità nelle acque in impianto

nei canali lagunaggio ed allo scarico; gli altri campioni non hanno invece evidenziato alcun effetto tossico. Analisi chimiche approfondite hanno rilevato l'assenza di contaminanti organici, ma la presenza di alcuni metalli pesanti nella matrice di fondo, probabilmente a causa di reflussi e risospensioni generati dai movimenti di marea e dall'operatività della chiusa.

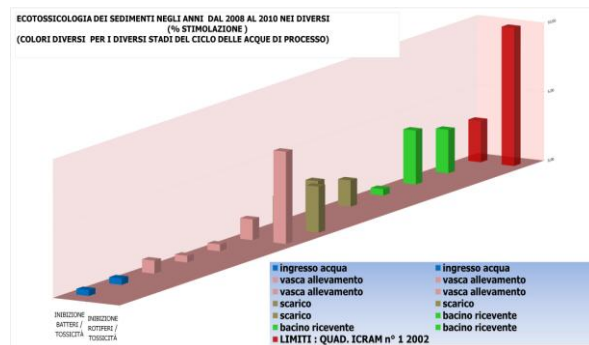


Figura 5. Grafico riassuntivo dei risultati di saggi biologici per la rilevazione di tossicità nei sedimenti di fondo.

4. CONCLUSIONI

Quello che si evidenzia nell'itticoltura semiestensiva, è che si riscontri una generale buona qualità delle acque e dei sedimenti nel lungo periodo e che lo screening effettuato mediante l'applicazione di saggi biologici sia un approccio metodologico efficace. La scelta dei saggi ha dimostrato inoltre una nuova possibile interpretazione metodologica, considerando la biostimolazione quale elemento di monitoraggio correlato al fenomeno dell'eutrofizzazione. La scelta delle specie, dopo 2 anni, ha verificato infine che esiste la capacità di replica dei test da parte degli allevatori stessi. E' stata dimostrata quindi la validità ricognitiva dei saggi biologici nei Piani di Controllo per EMAS in impianti di acquacoltura, poiché consente l'approfondimento analitico chimico solo nelle situazioni dubbie e comunque di per sé consente di avere una visione olistica dell'impianto, essenziale per la pianificazione di misure correttive o di miglioramento.

BIBLIOGRAFIA

Francese M., Traldi D., Sabadini M. (2006): *Applicazione di una batteria di saggi biologici a siti di produzione acquacolturale in ambito lagunare (valli da pesca). Use of bioassays for the evaluation of aquaculture sites in lagoon area.* Atti convegno SIBM UNICHIM 2006.

Applicazione di saggi ecotossicologici per la valutazione dell'ecocompatibilità di prodotti e materiali nei settori turistico e nautico

P. Frisenda ^{a,*}, M. Francese ^a, E. Martelli ^b, L. Panizza ^b, A. Hochkoeppler ^c, A. Stefan ^c

^a Shoreline Soc. Coop., Area Science Park, Padriciano 99 – 34012 Trieste, Italia – shoreline@shoreline.it

^b Archimede R&D S.r.l., Bologna, Italia – ricerca@archimede-rd.it

^c CSGI U.O. di Bologna c/o dipartimento di Chimica Industriale e dei Materiali - hochko@ms.fci.unibo.it, alessandra.stefan@unibo.it

Abstract – La diffusione di materiali e prodotti con spiccate caratteristiche di ecocompatibilità richiede la messa a punto di protocolli specifici per valutare l'effettiva non tossicità del prodotto finito a seconda della sua destinazione d'uso. In questo lavoro preliminare è stata verificata, dal punto di vista ecotossicologico, una tecnologia innovativa *biocide-free* da utilizzare come vernice antivegetativa nel campo della nautica. I test di stabilità ed attività nel tempo hanno confermato la potenzialità del principio attivo di nuova formulazione, mentre i saggi con *Artemia franciscana* e *Phaeodactylum tricornerutum* non hanno indicato alcuna tossicità rispettivamente acuta e sub-chronica. La ricerca si propone di proseguire le indagini, applicando saggi su specie *target* e *non-target* introducendo test a contatto o su lisciviato.

Keywords: ecocompatibilità; saggio biologico; antifouling.

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni i settori turistico e nautico si sono adeguati al crescente interesse verso le problematiche ambientali sviluppando prodotti e tecnologie ecocompatibili. Tuttavia, solo per alcuni materiali, come legno (Libralato *et al.*, 2005) e cementi da costruzione urbana (van der Sloot e Dijkstra, 2004) e stradale (Nelson *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001; Herrington *et al.*, 2006), sono stati verificati più nel dettaglio i possibili effetti diretti sull'ambiente derivanti dal loro uso specifico. Per quanto concerne le vernici antivegetative "biocide-free", diversamente da quelle convenzionali, sulle quali si saggia l'ecotossicità del biocida rilasciato, deve ancora essere messa a punto una procedura specifica che dimostri la loro effettiva non pericolosità per l'ambiente (Löschau e Krätke, 2005). Lo scopo principale del presente lavoro preliminare è valutare, attraverso l'applicazione di saggi biologici standardizzati, sia la potenziale tossicità che l'efficacia di una vernice antivegetativa innovativa, che, in base alle definizioni attuali, non rientra nella Direttiva Biocidi (Direttiva 98/8/CE). Tale prodotto sfrutta, infatti, la presenza di sali comunemente presenti in acqua di mare per produrre una micro-effervescenza sulla superficie trattata così da svolgere un'attività antivegetativa di tipo meccanico.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Stabilità ed attività del principio attivo

E' stata verificata la stabilità e l'attività del principio attivo sia in soluzione d'acqua di mare sia dopo immobilizzazione in una resina polimerica a base acquosa, priva di sostanze

contaminanti (Crilat 4816-Vinavil), stesa su provini in vetroresina. Le analisi sono state eseguite mediante tecniche spettrofotometriche (Uvikon 923 UV/VIS) e con l'utilizzo di elettrodi gas-sensibili (CyberScan pH 2100 BenchMeter - Eutech Instruments, con membrana ionoselettiva - Mettler Toledo).

2.2 Saggi biologici

Prima dell'esecuzione dei saggi biologici, è stato misurato il pH (Crison-pH meter Basic 20) in condizioni dinamiche e ad intervalli di tempo prestabiliti nell'arco di 72 h, di campioni costituiti da provini in vetroresina trattati con sola resina polimerica (Bianco) e da provini trattati con principio attivo immobilizzato nella resina (Prova-1), immersi in acqua di mare artificiale, contro un controllo (Ctrl) costituito da acqua di mare artificiale. Per l'esecuzione del saggio con nauplii al II-III stadio di *Artemia franciscana* (Artoxkit), la piastra multipozzetto è stata coattata direttamente con il Bianco e con la Prova-1. Il saggio d'inibizione della crescita con *Phaeodactylum tricornerutum* (ISO 10253:2006) è stato, invece, eseguito in parallelo su lisciviato, Prova-1 e controllo per una durata di 96 h in condizioni controllate di luce e temperatura (Ecotox Ecotherm 80). Il lisciviato è stato ottenuto da provini 5x5cm, trattati su entrambe le facce con il nuovo prodotto, essiccati all'aria per 48 h, e poi sottoposti ad un unico ciclo di lisciviazione in acqua marina artificiale (preparata secondo ISO 10253:2006) per 4 h sotto agitazione in vuoto. Il surnatante prima dell'inizio del test è stato filtrato (filtri Millipore 0,45 µm) e utilizzato tal quale per l'inoculo della popolazione algale. La crescita delle colture algali è stata determinata al microscopio (Leica ATC2000) mediante conteggio diretto con camera di Bürker.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Stabilità ed attività del principio attivo

Dai dati fino ad ora raccolti sull'attività del principio attivo in soluzione in acqua di mare, è stato possibile eseguire una previsione della durata dell'attività nel lungo periodo pari a circa 6 mesi (Fig. 1). Dopo immobilizzazione nella resina, il principio attivo si mantiene ancora attivo rispetto al controllo (Bianco) (Fig. 2), e mostra un decadimento dell'attività nel tempo inferiore rispetto a quello evidenziato allo stato libero in soluzione (dati non riportati).

Tali risultati, anche se preliminari, confermerebbero che le tecniche d'immobilizzazione utilizzate non inficiano né la stabilità né l'attività del prodotto e che la sua durata può essere paragonata a quella delle antivegetative tradizionali, applicate appunto ogni 6-12 mesi.

* paolafrisenda@gmail.com, T: +39 040 3755703 – F +39 0403755701

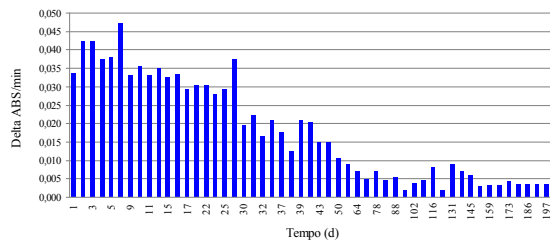


Figura 1. Stima su lungo periodo dei dati relativi all'attività del principio attivo in soluzione in acqua di mare.

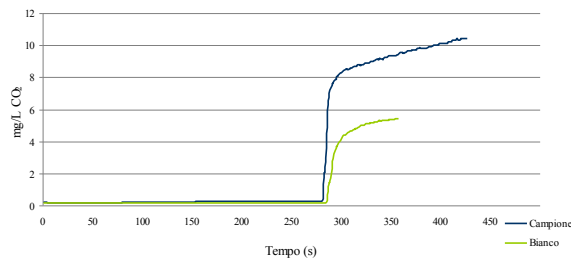


Figura 2. Attività del principio attivo immobilizzato (Campione) e del controllo (Bianco).

3.2 Saggi biologici

In tutte le misure eseguite nelle prime 4 h, il pH nei tre campioni è rimasto stabile ($pH_{ctrl}= 8.39$, $pH_{bianco}= 8.32$, $pH_{Prova-1}= 8.31$), mentre è diminuito leggermente dopo 24 h, raggiungendo i valori minimi dopo 72 h ($pH_{ctrl}= 8.26$, $pH_{bianco}= 8,29$, $pH_{Prova-1}= 8,14$). Tutte le misure sono state ritenute accettabili per l'esecuzione delle prove ecotossicologiche successive.

Nel saggio con *A. franciscana* solo il campione Prova-1 ha causato una mortalità del 3.3% dopo 24 h e del 6.7% dopo 48 h di esposizione, non evidenziando quindi alcun segnale di tossicità. Diversamente, nel saggio con *P. tricornutum* (Fig. 3), è stata osservata un'inibizione della crescita nelle prime 48 h di esposizione. In particolare dopo 24 h i decrementi rispetto i controlli erano del 35% nel campione lisciviato e del 54% nella Prova-1, mentre nelle 48 h in entrambi i casi le diminuzioni erano di circa il 10%. Alle 72 h e 96 h la crescita era vicina o superiore a quella dei controlli circa del 5-10%.

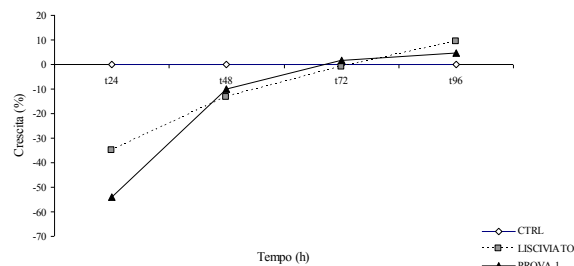


Figura 3. Effetti del lisciviato e del principio attivo immobilizzato (Prova-1) sulla crescita di *P. tricornutum* in 96 h di esposizione.

I risultati di questo saggio indicherebbero, in prima battuta, un'interferenza diretta del principio attivo sulla crescita della popolazione algale sia nel test di contatto (Prova-1) sia nel lisciviato, confermando anche la validità e l'efficacia del protocollo accelerato di estrazione dai provini trattati con il nuovo prodotto.

4. CONCLUSIONI

I risultati di questo primo set sperimentale indicano che il nuovo prodotto, attivo e stabile in un tempo considerevolmente lungo, non induce alcuna tossicità acuta e sub-cronica. Tuttavia, dal momento che il saggio con *A. franciscana*, specie comunemente utilizzata per valutare l'efficacia delle vernici antivegetative (Persoone e Castritsi-Catharios, 1988), è risultato molto meno sensibile rispetto a quello algale con *P. tricornutum*, ci si propone di continuare la sperimentazione applicando altri saggi su specie *target* e *non-target*. Per simulare le condizioni d'uso del prodotto finito si procederà variando anche i modelli e i protocolli di estrazione. Nello specifico sono già state realizzate vasche a sviluppo orizzontale e verticale per verificare l'ecocompatibilità in test di contatto e su lisciviato.

REFERENCES

- Herrington, P., I. Kvatch e K. O'Halloran (2006). "Assessing the environmental effects of new and recycled materials in road construction: proposed guidelines". Transfund New Zealand Research Report, vol. 306, pp. 1-70.
- Libralato, G., Marchetto, D., Losso, C., Arizzi Novelli, A., D. Tagliapitra e A. Volpi Ghirardini (2005). "I lisciviati del legno: valutazione dei potenziali impatti ecotossicologici sulle acque marine costiere", XV Congresso della Società Italiana di Ecologia, Torino, Italia. <http://www.ecologia.it/congressi/XV/articles/Libralato-144.pdf>
- Löschau, M. e R. Krätke (2005). "Efficacy and toxicity of self-polishing biocide-free antifouling paints". Environmental Pollution, vol. 138, pp. 260-267.
- Nelson, P.O., W.C. Huber e N.N. Eldin (2000). "Environmental Impact of Construction and Repair Materials on Surface and Ground Waters. Transportation research board". NCHRP Project 25-9 Report 443, National Research Council. National Academy Press Washington, d.c., pp. 1-18.
- Nelson, P.O., Huber, W.C., Eldin, N.N., K.J. Williamson, J. R. Lundy, M.F. Azizian, P. Thayumanavan, M.M. Quigley, E.T. Hesse, K.M. Frey e R.B. Leahy (2001). "Environmental Impact of Construction and Repair Materials on Surface and Ground Waters Summary of Methodology, Laboratory Results, and Model Development Transportation research board". NCHRP Project 25-9 Report 448, National Research Council. National Academy Press Washington, d.c., pp. 1-129.
- Persoone, G. e J. Castritsi-Catharios (1988). "A simple bioassay with *Artemia* larvae to determine the acute toxicity of antifouling paints". Water research, 23, pp 893-897.
- Van der Sloot, H.A. e J.J. Dijkstra (2004). "Development of horizontally standardized leaching tests for construction materials: a material based or released based approach? Identical leaching mechanisms for different materials". ECN-C-04-060: 1-56.

Ecotoxicological evaluation of a Ballast Water Treatment System according to the International Maritime Organization guidelines

F. Garaventa^{a,*}, V. Piazza^a, C. Corrà^a, G. Pavanello^a, R. Magrassi^a, S. Mattioli^b, T. Turturro^b, C. Doldi, M. Faimali^a

^a Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISMAR-CNR), Genova, Italy

^a Azienda Chimica Genovese (ACG), Genova, Italy

Abstract – Ballast water is used by ships to compensate for differences in cargo load. Through ballast water, non-indigenous organisms are transported worldwide. This introduction of non-native species via ballast water discharge can cause significant economic and ecological damages. The International Maritime Organization (IMO) has set out a mandatory framework for treatment of ballast water on board of ships, in order to minimize the risk of ballast water discharges.

ACG has recently developed a new Ballast Water Management System consisting of an electrolytic cell, producing hypochlorite as biocide for ballast water treatments (Ecolcell BTs^{TN}).

The residual effects of seawater treated with the electrolytic cell was investigated with different bioassays in order to comply with the International Convention.

Keywords: ballast water, treatment; hypochlorite; bioassay.

1. INTRODUCTION

Ballast water discharges have historically been a major source of nonindigenous aquatic species introduction and transfer throughout the world (Carlton, 1985; Olenin et al., 2000; Ruiz et al., 2000).

When such organisms in ballast tanks are transported between waterbodies and discharged, the organisms may have the potential to establish viable new populations of species in waterbodies to which they are not native. This introduction of non-native species via ballast water discharge can cause significant economic and ecological damage documented by numerous studies and reports (Bolch & Salas, 2007, Dobbs et al., 2006, Doblin et al., 2007, Drake & Lodge, 2007, Drake et al., 2007).

To reduce the risk of introducing exotic species, the International Maritime Organization (IMO) has set out a mandatory framework for treatment of ballast water (BWT) on board of ships before discharging their ballast tanks at the port of arrival (IMO, 2004).

Regulation D-3.2 of the International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments stipulates that Ballast Water Treatment Systems (BWTS) that make use of "active substances" (i.e. chemical biocides) to comply with the Convention shall be approved by the IMO.

The procedure for approval of BWTS that makes use of active substances (G9) adopted by resolution MEPC.126(53), defines principle aspects to be documented by data or testing and some basic principles for risk evaluation.

In this contest the Azienda Chimica Genovese (ACG) has developed a new BWTS consisting of an electrolytic cell, producing hypochlorite for killing organisms and relative neutralization system of the discharged effluent (Ecolcell BTs^{TN}).

These technologies must be effective in treating ballast water and they must be environmentally safe in as much as the disposal of treated ballast waters meets environmental regulations at the point of discharge and that there is no impact on receiving waters. Treatment processes should be evaluated by specific bioassays conducted to assess the effects of treated ballast water on the receiving ecosystems before obtaining the approval by IMO.

In order to comply with the International Convention the ACG has commissioned the Institute of Marine Science – National Research Council (ISMAR-CNR), Italy, to perform the prescribed toxicity tests on whole-effluent of the treated ballast water, using a laboratory prototype of the ballast water management system (Ecolcell BTs^{TN}).

The toxic effects of seawater treated with laboratory Ecolcell BTs prototype, before and after neutralization process, were investigated using organisms representing three trophic levels (Algae, Crustacean and Fish), in order to represent species variations and lifestyles with different feeding strategies, which account for differences in sensitivity among different organisms.

The bioassays during ecotoxicological screening were performed using as model organism: an alga (*Dunaliella tertiolecta*), two crustaceans (*Artemia salina* and *Tigriopus fulvius*), and a fish (*Dicentrarchus labrax*).

These toxicity screening have been carried out on water immediately after treatment and after different storage periods of treated water. The Ecolcell BTs laboratory unit was running under nominal operating conditions treating natural sea water sampled near the coast of Mediterranean sea. The treatments and storage time of the water was designed to simulate a relevant real case of ballast water treatment.

The same bioassays have been carried out also during different session of treated water neutralization process. The toxicity tests with Algae, Crustaceans and Fish were performed before and after neutralization with sodium thiosulphate using natural sea water; for each bioassay water was collected at different times.

The toxicity of the neutralizing agent, sodium thiosulphate, was tested on Algae and Crustaceans; organisms were exposed to different concentrations, several order of magnitude much higher than the nominal operating concentration.

* Corresponding author. Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISMAR-CNR), via De Marini 6, 16149 Genova, Italy. Tel: +39 0106475426, Fax: +39 0106475400, Email: francesca.garaventa@ge.ismar.cnr.it

2. MATERIALS AND METHODS

Ecolcell BTs general overview

The disinfection of marine organisms and bio-fouling control using on-site generated chlorine compounds have been widely used in power and desalination plant, swimming pool, Marine Growth Prevention System (MGPS) of ship, etc.

The Ecolcell BTs^{TN} produces Sodium Hypochlorite (NaOCl) to disinfect harmful marine organisms. Ecolcell BTs^{TN} uses in-situ seawater electrolysis to produce modulated concentration NaOCl from brackish water or seawater. To produce disinfectant, part of ballast water is fed to electrolyzer and the disinfectant generated in electrolyzer is directly injected into the ballast pipe during ship's ballasting operation.

During voyage, hypochlorite and its derivatives will disinfect all marine organisms and final concentration of marine organisms in discharged water will meet IMO D-2 standard. The remaining hypochlorite concentration will be significantly lower than initial dose, however, to protect the marine environment, the neutralizing agent (Sodium thiosulphate) will be injected into the de-ballasting pipe to remove any remaining oxidant which might have harmful effect when discharged without neutralization.

Natural sea water

Bioassays were performed using natural sea water collected five nautical miles out of Genoa coast (Mediterranean sea) and treated using the Ecolcell BWTS unit in ISMAR-CNR laboratory. If the oxygen content of the water was too low for the tests, before test start, it has been aerated overnight. Before use, water quality parameters were measured and the salinity was adjusted at 37 ‰. The toxicity screening have been carried out on water immediately after treatment and after different storage periods. Storage was made in closed 1 litre containers for 24-48-72-96 hours at approx. 20°C, at dark.

Marine algal growth inhibition test

Species

Dunaliella tertiolecta is a motile, unicellular rod shaped (9 - 11 µm) green alga (Chlorophyceae) that is common in saline waters. This alga can be easily cultured in the laboratory and is available from suppliers. Its morphology makes it ideal for enumeration with an haemocytometer (Burker Chamber) as *D. tertiolecta* does not clump or form chains. Growth is sufficiently rapid to accurately measure cell numbers after 96 h, and the species is moderately sensitive to toxic substances.

Test method

Traditionally, phytotoxicity has been assessed with standardized algal bottle tests (USEPA, 1987). However, more recently the microplate technique has been used to assess algal toxicity using a variety of marine and freshwater species (ISO 10253, 2000).

Exponentially growing *D. tertiolecta* are exposed in a static, microplate system to a dilution series of a test solution. The growth of the algae exposed to the test solution is compared with the growth of the algae in an appropriate control over a fixed period of time. A test substance is considered toxic when a statistically significant, dose-dependent inhibition of algae growth occurs.

Tests were carried out according to the protocol ISO 10253 (2000), with some modifications deemed necessary for the

use of the microalgal species *D. tertiolecta* instead of *Skeletonema costatum* or *Phaeodactylum tricorutum*.

Dunaliella tertiolecta stock cultures were maintained in artificial seawater with complete F/2 culture medium at 20±0.5°C with a 12–12 h light-dark period and light intensity of 6,000–10,000 lux for several weeks before the test. Algal growth was evaluated determining the number of cells/ml by an haemocytometer (Burker Chamber) using an inverted microscope.

During tests, free-living, exponentially growing *D. tertiolecta* cells were exposed to different treated water dilutions in a static multi-well plate system, according to OECD (1984) and UNI EN ISO (2000).

The microplate technique involves the use of microlitre volumes of test solutions in 96-well microplates. Each well receives 200 µL of test solution, and 20 µL of algal inoculum and nutrient solution.

The inoculum is composed of *D. tertiolecta* cells harvested from a3 to 5 days old and exponentially growing liquid stock algal culture. The initial cell density for the microplate algal growth inhibition was 10,000 cells/ml.

The microplate was incubated at a constant temperature with continuous light (~ 200 µmol m⁻² s⁻¹) for 96 h; then the concentration of algae (number of cells per ml) was measured by an haemocytometer (Burker Chamber) using an inverted microscope. Cell numbers are used as a surrogate for algal biomass. The number of algal cells in the test solution (dilution of treated water) was then compared with the number in the control solutions (untreated water). For the series of treated water after different storage periods was added also a second control solution (untreated water aged for 24-48-72-96 hours in dark, closed 1 litre containers).

For each treated water dilution and controls, 3 replicates test were set up. The plates were kept for 96 h at 20±0.5°C with continuous light (6,000–10,000 lux). After 96 h, algae were counted by an haemocytometer (Burker Chamber) using an inverted microscope. The end-point was the percent variation of algal growth and, in the case of inhibition, the IC₅₀.

The algal growth inhibition tests with *D. tertiolecta* have been carried out also on different sessions of treated water neutralization process, and sodium thiosulphate was used as neutralizing agent.

Artemia salina toxicity test

Species

The brine shrimp (*Artemia salina*) is routinely used as a test organism for screening in ecotoxicological studies. It belongs to the phylum Arthropoda, class Crustacea. The life cycle begins by hatching of dormant cysts where these cysts are inactive but, once in salt water, they become rehydrated and resume their development. These larvae are characterized by common features such as adaptability to wide ranges of salinity and temperature, short life cycle, high adaptability to adverse environmental conditions, high fecundity, bisexual/parthenogenetic reproduction strategy (with nauplii or cysts production), small body size, adaptability to varied nutrient resources as it is a non-selective filter feeder, sensitive to toxic substances and simple equipment used for the measurements. Accordingly, the intrinsic features of this species turn it into a suitable organism for the use in ecotoxicology, guaranteeing reliability, feasibility and cost-effectiveness in routine and/or research ecotoxicity practices.

Test method

The Artoxkit M with the brine shrimp *Artemia salina* was obtained from Microbiotest Inc. A 24-h LC₅₀ bioassay was performed in a multiwell test plate using instar II–III larvae. The test was conducted according to the standard operating procedure (25 ± 1 °C, 35‰ salinity) with three replicates for each treatment and ten animals per replicate under dark conditions (Artoxkit, 1990).

Approximately 100mg of cysts were hatched in 100 mL synthetic sea water (Instant Ocean® at 35±0.5 PSU) at 25 ± 1°C under 4,000 Lux light intensity and slight aeration during 24 h. After 30 h from the start of the incubation, all larvae had moulted to the II – III instar stages.

These instars were used for our experimental bioassay because, in several papers, have been shown to be the most sensitive stages. The hatched nauplii were separated from remaining cysts using a Pasteur pipette and transferred to fresh sea water.

Four replicates were prepared and tested for each sample, and 10 organisms were transferred into each well of a multiwall plate by a Pasteur pipette, containing test sample. The untreated natural water was used as negative control. For the series of treated water after different storage periods was added also a second control solution (untreated water aged for 24-48-72-96 hours in dark, inside 1 litre closed containers).

The plate was then put in the incubator at 25 ± 1°C at dark and the percentage of toxicity (mortality) of brine shrimp was measured after 24 h exposure to the test samples, using a binocular dissection microscope to count the number of immobile species (i.e. not showing any movement for 10 sec). The tests were considered valid only if the immobility percentage in the control wells did not exceed 10%. The calculations of LC₅₀ has been carried out by the Trimmed Spearman Method.

The toxicity tests with *A. salina* have been carried out on fresh treated seawater, on treated water after different ageing times, on neutralized aged waters and on the neutralizing agent sodium thiosulphate.

Tigriopus fulvus toxicity test

Species

The genus *Tigriopus* sp. (Copepoda Harpacticoida) has been recorded in locations all over the world; its general habitat is the tide or rock-pools at or above water level. There are several species, differentiated by relatively minor morphological distinctions; speciation appears to be favoured by restricted gene flow between populations, even over short distances. In particular, *Tigriopus fulvus* (Fischer 1860), an euryaline harpacticoid living in rocky coastal Mediterranean microenvironments, seems to be a promising target-species for ecotoxicological studies (Pane et al. 2008).

Test method

Tigriopus fulvus specimens collected in coastal microenvironments of the Ligurian Sea have been maintained in laboratory acclimatized culture for several generations, in filtered artificial seawater Instant Ocean® at 37±0.5 ‰, 20±0.5°C and fed with a mixture of algae (*Chlorella minutissima*, *Tetraselmis suecica*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

Previous tests with nauplii, carried out at various salinities (20–40 PSU) until 96 h, have shown that differences in the

control parameters (survival, percentage of moults, length of the organisms) were not statistically significant. Therefore, the most common salinity value found in the Western Mediterranean sea (37 ‰) was chosen for the tests. Toxicity tests were carried out on nauplii following standard method ISO 14669 (1999) modified as in Faraponova et al., 2005.

In order to obtain same-aged nauplii, hatching was stimulated by detaching egg sacs from ovigerous females previously immobilized by soft filtration on GF/F Whatman filters (0.45 µm); afterwards, egg sacs were transferred into 12-well plates and maintained in seawater (37 ‰) at 20±0.5°C for 24 h.

Newborn nauplii (I–II stage) were exposed to treated water at different dilutions in multiwell plates. For each dilution, 3 replicates and a control test were prepared. The plates were kept dark at 20±0.5°C. After 24 h, all samples were examined by a stereomicroscope to determine the percent of mortality. The nauplii were considered dead if no movement of the appendages was observed within 10 seconds. The calculations of LC₅₀ has been carried out by the Trimmed Spearman Method.

The toxicity tests with *T. fulvus* have been carried out on fresh treated seawater, on treated water after different ageing times, on neutralized aged waters and on the neutralizing agent sodium thiosulphate.

Dicentrarchus labrax (juveniles) toxicity test

Species

Dicentrarchus labrax, Linnaeus, 1758 (Osteichthyes, Perciformes, Moronidae) is an euryaline (4–40 ‰) and eurythermal (2–30°C) European marine fish species; it is widespread in Mediterranean waters and broadly reared in fish farms for its commercial importance. *D. labrax* is suitable for toxicity testing and is included as a bioassay species in the Italian legislation.

Test method

Dicentrarchus labrax juveniles (30-70 days from hatching) were obtained from the same offspring from a hatchery production plant. The organisms were stabled in laboratory for 14 days before toxicity testing.

The fish stabling was carried out in filtered natural seawater (0.45 µm) at 37‰ in 200 L plastic tank, at a temperature of 20 ± 1 °C. Main environmental parameters (nitrogen, dissolved oxygen, temperature, and pH) were monitored before and during the tests. Test organisms were fed with granulated feed until 24 h before the test.

Ten organisms were exposed in 20 L plastic tanks (1 g weight/L test solution) to different dilutions of treated and neutralized water with three replicates for each dilution and for the control. The untreated natural seawater was used as dilution water and as control. The tanks were incubated at a constant temperature (20 ± 1 °C) with continuous light (~200 µmol m⁻² s⁻¹) for 96 h. The test solution (all dilution of treated and neutralized water and control) was renewed after 48h. After 48 and 96 hours, the percent of mortality was determined. The calculations of LC₅₀ has been carried out by the Trimmed Spearman Method.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of *D. tertiolecta* growth inhibition test exposed to different dilution of treated water (T0) and the series of treated water after different storage periods (T24-T96) suggest an hormesis phenomenon, that is a generally-

favorable biological responses to low exposures to toxins and other stressors (Calabrese & Baldwin, 2001). In fact, at concentrations between 0.12 and 0.25 ppm, it is evident an inverted U-shaped dose response characterized by a low dose stimulation of algal growth.

The values of IC_{50-96h} seem to decrease (enhancement of toxicity) with the increase of storage time but the minimum concentration able to produce the total growth inhibition shows an opposite trend (Tab. 1).

Tab 1: IC_{50-96h} of the algae (*D. tertiolecta*) exposed to different dilution of treated water (T0) and the series of treated water after different storage periods (T24-T96).

Storage time	IC_{50-96h} (ppm)
0 h	0,63 (0,57 - 0,68)
24 h	0,64 (0,58 - 0,69)
48 h	0,59 (0,51 - 0,67)
72 h	0,42 (0,35 - 0,48)
96 h	0,41 (0,34 - 0,48)

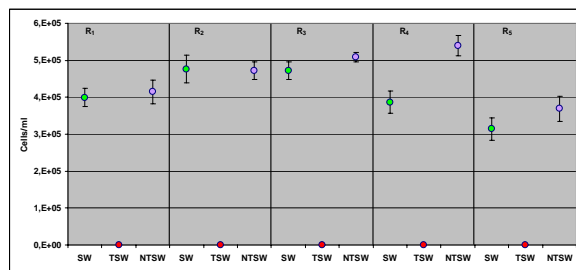


Fig. 1: Growth inhibition results ($m \pm se$) of five repetitions (R_1-R_5) of toxicity test with *D. tertiolecta* exposed to untreated sea water (SW), treated sea water (TSW) and treated sea water neutralised with sodium thiosulphate (NTSW). The range of chlorine concentration after treatment of different natural water samples with Ecolcell BTs during this series of repetitions was between 6.2 and 7.8 ppm.

The results of growth inhibition test (Fig. 1) during the five repetitions of ecotoxicological screening on untreated sea water (SW), treated sea water (TSW) and neutralised treated sea water with sodium thiosulphate (NTSW) highlight the total absence of toxic effect after treated water neutralization process even if in some cases ($R_1-R_2-R_3$) a low stimulation of algal growth is evident.

The results of *A. salina* mortality test (Tab. 2) exposed to different dilution of treated water (T0) and the series of treated water after different storage periods (T24-T96) put in evidence an irregular variation of LC_{50-24h} values during storage period. The values decrease (enhancement of toxicity) after 24 and 48 hours of storage and reverse the trend at 72 hours of ageing.

Tab. 2: LC_{50-24h} of the *A. salina* nauplii exposed to different dilution of treated water (T0) and the series of treated water after different storage periods (T24-T96) treated with Ecolcell BTs laboratory unit running under nominal operating conditions using natural sea water sampled near the coast of Mediterranean sea.

Storage time	LC_{50-24h} (ppm)
--------------	---------------------

0 h	2,14 (1,87-2,44)
24 h	1,31 (1,16-1,48)
48 h	0,83 (0,76-0,91)
72 h	2,71 (2,53-2,90)
96 h	2,43 (2,29-2,57)

The results of *A. salina* mortality test (Fig. 2) during the five repetitions of ecotoxicological screening on untreated sea water (SW), treated sea water (TSW) and treated sea water neutralised with sodium thiosulphate (NTSW) highlight the total absence of toxic effect after treated water neutralization process. Any significant differences are evident between untreated sea water (SW) and neutralised treated sea water (NTSW).

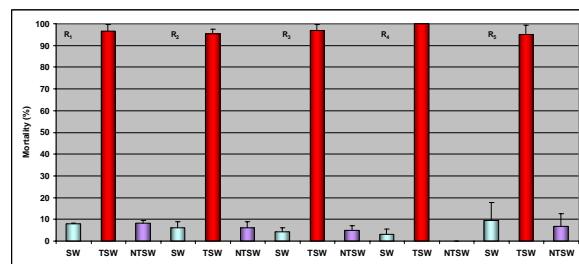


Fig. 2: Percentages of mortality ($m \pm se$) of five repetitions (R_1-R_5) of toxicity test with *A. salina* exposed to untreated sea water (SW), treated sea water (TSW) and treated sea water neutralised with sodium thiosulphate (NTSW). The range of chlorine concentration after treatment with Ecolcell BTs of different natural water samples during this series of repetitions was between 4.5 and 7.8 ppm.

Also the results of ecotoxicological screening on different concentrations of sodium thiosulphate (Fig. 3), used as neutralizing agent, confirm this evidence. Any toxic effect was evident with this model organisms.

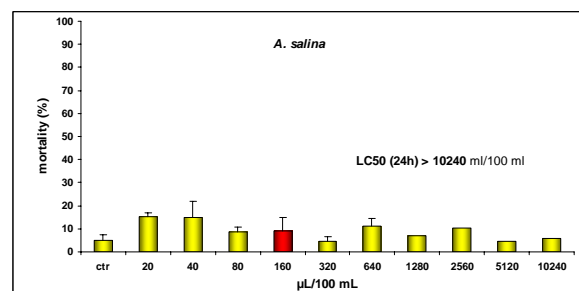


Fig. 3: Mortality percentages ($m \pm se$) and relative LC_{50-24h} of the *A. salina* nauplii exposed to different concentration of sodium thiosulphate used as neutralizing agent. Histogram in red highlight the concentration utilized to neutralize the treated water under nominal operating conditions of Ecolcell BTs laboratory unit.

The data of mortality of *T. fulvus* (Tab. 3) exposed to different dilution of treated water (T0) and the series of treated water after different storage periods (T24-T96) put in evidence, also with this Crustaceans, an irregular variation of LC_{50-48h} values during storage period. The values decrease (enhancement of toxicity) after 24 of storage and reverse the trend at 48h hours of ageing.

Tab. 3: LC_{50-48h} of the *T. fulvus* nauplii exposed to different dilution of treated water (T0) and the series of treated water after different storage periods (T24-T96) of treated water with Ecolcell BTs laboratory unit running under nominal operating conditions.

Storage time	LC _{50-48h} (ppm)
0 h	0,86 (0,80-0,93)
24 h	0,46 (0,42-0,51)
48 h	1,07 (1,02-1,11)
72 h	1,92 (1,78-2,06)
96 h	2,44 (2,38-2,50)

Also the results of *T. fulvus* mortality test (Fig. 4) during the five repetitions of ecotoxicological screening on untreated sea water (SW), treated sea water (TSW) and treated sea water neutralised with sodium thiosulphate (NTSW) highlight the total absence of toxic effect after treated water neutralization process. Any significant differences are evident between untreated sea water (SW) and neutralised treated sea water (NTSW).

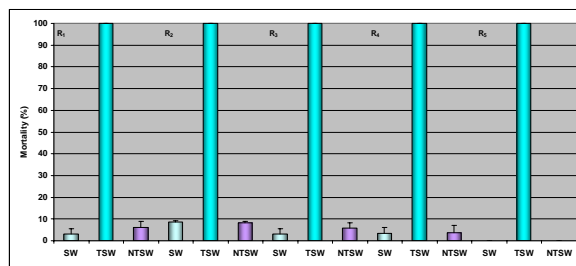


Fig. 4: Percentages of mortality (m±se) of five repetitions (R₁-R₅) of toxicity test with *T. fulvus* exposed to untreated sea water (SW), treated sea water (TSW) and treated sea water neutralised with sodium thiosulphate (NTSW). The range of chlorine concentration after treatment with Ecolcell BTs of different natural water samples during this series of repetitions was between 6 and 8 ppm.

The results of ecotoxicological screening on different concentration of sodium thiosulphate used as neutralizing agent confirm this evidence. The calculable LC_{50-24h} value was one order of magnitude more higher than the concentration utilized for neutralize the treated water under nominal operating conditions of Ecolcell BTs laboratory unit.

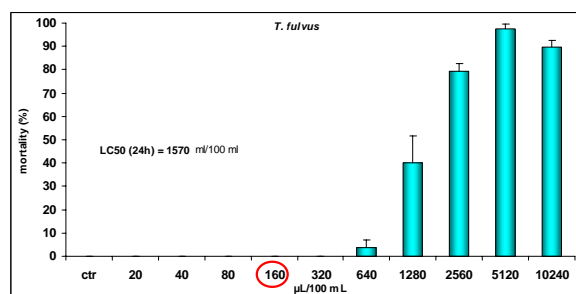


Fig. 5: Mortality percentages (m±se) and relative LC_{50-48h} of the *T. fulvus* nauplii exposed to different concentration of sodium thiosulphate used as neutralizing agent. Red circled concentration highlights the concentration utilized to neutralize the treated water under nominal operating conditions of Ecolcell BTs laboratory unit.

The data of mortality of juveniles of *D. labrax* (Fig. 6) exposed to different dilution of treated water (T0) put in evidence that fishes are the most sensitive organism. The LC_{50-96h} value (0,21 ppm) is the lowest registered during this ecotoxicological screening on treated ballast water simulation.

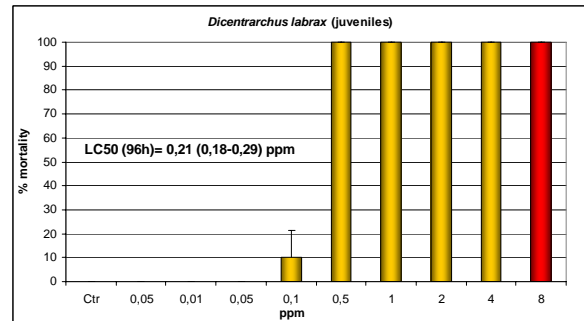


Fig. 6: Mortality percentages (m±se) and relative LC_{50-96h} of the *D. labrax* juveniles exposed to different dilution of treated water (T0). Histogram in red highlight the effect of the water at the discharge of the treated ballast water with Ecolcell BTs laboratory unit running under nominal operating conditions using natural sea water sampled near the coast of Mediterranean sea.

The good performance of Ecolcell BTs neutralization process was confirmed also by results of juveniles of *D. labrax* exposition during the five repetitions of ecotoxicological screening on untreated sea water (SW), treated sea water (TSW) and treated sea water neutralised with sodium thiosulphate (NTSW), highlighting the total absence of toxic effect after treated water neutralization process. The data (Fig. 7) show any significant differences between untreated sea water (SW) and neutralised treated sea water (NTSW).

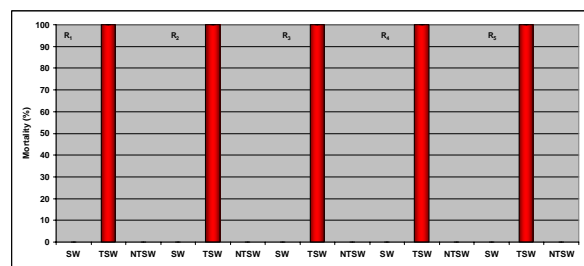


Fig. 7: Percentages of mortality (M±SE) of five repetitions (R₁-R₅) of toxicity test with *D. labrax* juveniles exposed to untreated sea water (SW), treated sea water (TSW) and treated sea water neutralised with sodium thiosulphate (NTSW). The range of chlorine concentration after treatment with Ecolcell BTs of different natural water samples during this series of repetitions was between 6.5 and 8 ppm.

4. CONCLUSIONS

The results obtained in these experiments confirm the disinfection property of Sodium hypochlorite and support the effectiveness of the Ecolcell BWT System.

Even though the specific ecotoxicological and technical results, the multibioassay approach confirms being a fundamental instrument to support the management of

marine technological devices, in that specific case a Ballast Water Treatment System.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors want to thank Azienda Chimica Genovese for funding this research.

REFERENCES

Artoxkit, 1990 M. Artoxkit, Artemia toxicity screening test for estuarine and marine waters, Standard operational procedure, Creasel, Deinze, Belgium (1990).

Carlton, J.T., 1985. Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 23, 313–371.

Olenin, S., Gollasch, S., Jonusas, S., Rimkute, I., 2000. En-route investigation of plankton in ballast water on ship's voyage from the Baltic Sea to the open Atlantic coast of Europe. *Int. Rev. Hydrobiol.* 85, 577–596.

Ruiz, G.M., Rawlings, T.K., Dobbs, F.C., Drake, L.A., Mullady, T., Huq, A., Colwell, R.R., 2000. Global spread of microorganisms by ships. *Nature* 408, 49–50.

Bolch, C.J.S. & Salas, M.F.d. 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the Alexandrium "tamarensis complex" to Australasia. *Ballast Water*, 6, 465-485.

Calabrese E.J. & Baldwin L.A. 2001. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends Pharmacol Sci* 22:285–291

Dobbs, F., Doblin, M., & Drake, L. 2006. Pathogens in ships' ballast tanks. EOS, Transactions, American Geophysical Union, 87.

Doblin, M., Coyne, K., Rinta-Kanto, J., Wilhelm, S., & Dobbs, F. 2007. Dynamics and short-term survival of toxic cyanobacteria species in ballast water from NOBOB vessels transiting the Great Lakes-implications for HAB invasions. *Harmful Algae*, 6, 519-530.

Drake, J.M. & Lodge, D.M. 2007. Rate of species introductions in the Great Lakes via ships' ballast water and sediments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64, 530-538.

Drake, L., Doblin, M., & Dobbs, F. 2007. Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilm. *Marine Pollution Bulletin*, 55, 333-341.

IMO (International Maritime Organization). 2004. Marine Environmental Protection Committee (MEPC), International convention for the control and management of ships' ballast water and sediments, 2004 Edition. Adopted on February 13th, 2004. Available at: <http://www.imo.org/home.asp>.

Guillard RRL, Ryther JH (1962): Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian J Microbiol* 8, 229–239.

Guillard, R.R.L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In "Culture of Marine Invertebrate Animals". Editors Smith, W.L. and Chanley M.H. Plenum Press, New York, USA. pp26-60.

ISO 10253 (2000) Water quality – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornerutum*.

OECD (1984): Alga Growth Inhibition Test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 201. Paris, France.

Faraponova O., De Pascale d., Onorati F., Finioia M.G. (2005) "*Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida) as a

target species in biological assays" *Meiofauna Marina* 14: 91-94.

ISO 14669 (1999) Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea), 16 pp.

OECD (1992) Guideline for testing chemicals n° 203. Fish, Acute Toxicity Test, 1-9.

Pane L., Chelossi E., Corrà C., Giacco E., Greco G., Mariottini G.L., Varisco F., Faimali M. (2008) - Ecotoxicological evaluation of harbour sediments using organisms from different trophic levels. *J Soils & Sediments*, 8 (2) 74–79.

Disinfezione delle acque di scarico dei depuratori comunali della provincia di Latina: predittività degli effetti sui corpi idrici ricettori attraverso la tossicità su *Daphnia magna*.

Monfrinotti Monica, Aguzzi Laura, Corona Roberta, Ravizza Paola e Zaottini Ennio

Agenzia Regionale Protezione Ambientale del Lazio – Arpa Lazio, Sezione Provinciale di Latina, Italia -
monica.monfrinotti@arpalazio.it

Riassunto – Dal 2008 a settembre 2010 sono stati effettuati test di tossicità acuta con *Daphnia magna* Straus su 194 campioni di acque reflue di 34 depuratori comunali della provincia di Latina, che ne conta in totale 52, tutti recapitanti in acque superficiali. Le indagini condotte sugli scarichi hanno lo scopo di valutare gli effetti della disinfezione sulla tossicità degli effluenti depurati, nonché l'effetto degli scarichi sui corpi idrici ricettori. Nonostante sia nota la formazione di composti organici alogenati volatili e non volatili durante la clorazione, che causano danni alla salute umana e all'ecosistema, nei depuratori comunali della provincia di Latina l'uso di ipoclorito di sodio risulta ancora il metodo più diffuso per la disinfezione dei reflui.

Keywords: acque reflue, disinfezione, *Daphnia magna*, saggi ecotossicologici

1. INTRODUZIONE

Il Decreto Legislativo 152/06, riconosce il ruolo dei saggi ecotossicologici nel controllo degli scarichi nei corpi d'acqua superficiali: sia le acque reflue da impianti che trattano fognature miste, sia le acque reflue industriali devono essere conformi ai limiti di emissione indicati nella tabella 3 dell'Allegato 5 per il parametro "saggio di tossicità acuta". L'esecuzione del saggio di tossicità è obbligatoria, anche se il risultato positivo della prova non determina l'applicazione diretta delle sanzioni, bensì l'obbligo d'approfondimento delle indagini analitiche, la ricerca delle cause di tossicità e la loro rimozione.

I campioni di acque di scarico recapitanti in acque superficiali sono giudicati accettabili per il parametro "saggio di tossicità acuta" quando al termine delle 24h la somma degli organismi immobili nel campione da testare è inferiore al 50% del totale degli esposti; se il numero di organismi immobili è uguale o superiore al 50% del totale degli esposti, il campione è giudicato inaccettabile. Il saggio di tossicità viene utilizzato per rilevare i possibili effetti di sostanze inquinanti, compresi gli eventuali effetti sinergici, come complemento alle analisi chimiche in acque reflue industriali; per quanto riguarda le acque reflue urbane, invece, la tossicità potrebbe essere dovuta al processo di sanificazione, generalmente mediante utilizzo di ipoclorito di sodio, a cui il refluo è sottoposto prima di essere immesso in corpi idrici superficiali.

Il valore limite per il parametro "cloro libero", come riportato nella stessa tabella 3 all'allegato 5 del D. Lgs 152/06, è pari a 0,2 mg/L. La formazione di composti organici alogenati volatili e non volatili durante la clorazione, che notoriamente causano danni alla salute umana e all'ecosistema (Tatti & Balsamo, 2002; Amodèi M. *et al.*, 2000; Crebelli *et al.*, 2003), ha orientato la ricerca negli ultimi anni verso l'applicazione di disinfettanti

alternativi, quali acido peracetico, ozono e raggi UV, che ha evidenziato come il loro utilizzo sia risolutivo nell'abbassare la carica microbica al disotto dei limiti richiesti nel D. Lgs 152/06.

Nei depuratori comunali della provincia di Latina l'uso di ipoclorito di sodio risulta ancora il metodo più diffuso per la disinfezione dei reflui. Le indagini condotte sugli scarichi hanno lo scopo di valutare gli effetti della disinfezione sulla tossicità degli effluenti depurati, nonché l'effetto degli scarichi sui corpi idrici ricettori di 34 depuratori comunali, tutti recapitanti in acque superficiali.

2. MATERIALI E METODI

Al fine di verificare la tossicità dell'ipoclorito di sodio su *D. magna* i test sono stati eseguiti su campioni di acque reflue prelevati prima e dopo il trattamento di disinfezione. Inoltre, per determinare la tossicità e la persistenza del cloro libero nelle acque superficiali sono stati effettuati prelievi in un corso d'acqua ricevente lo scarico di un depuratore comunale. I campionamenti sono stati effettuati a monte e a valle dello scarico stesso. Per i prelievi sono state utilizzate bottiglie di vetro riempite fino all'orlo per escludere l'aria e i campioni conservati al buio a circa 4°C, se testati entro le 24h successive al campionamento, o congelati per essere testati entro 2 mesi dal prelievo. I test di tossicità acuta sono stati effettuati su daphnidi di età inferiore alle 24 ore, ottenuti da allevamenti allestiti in laboratorio, secondo la metodica APAT-IRSA-CNR 29/2003 "Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia* (Metodo B)". Il risultato è espresso in %, come somma degli organismi immobili sul totale degli esposti.

I test sui campioni di acqua superficiale sono stati eseguiti secondo quanto previsto dalla UNI EN ISO 6341:1999, corretta il 12/05/2004, per determinare la EC₅₀/24h. Il test è stato eseguito effettuando 5 repliche per ogni diluizione, ottenute considerando un fattore di diluizione non superiore a 2,2; il risultato, espresso in % di diluizione, è stato ricavato mediante la statistica dei probit, che fornisce anche i limiti fiduciali al 95%.

I test sono stati condotti con illuminazione di circa 300 lux e un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Al termine del periodo di esposizione risultano immobili gli organismi che, dopo leggera agitazione del contenitore, sono incapaci di attività natatoria.

Le misure di concentrazione di cloro libero sono state effettuate sia sui campioni prelevati nei depuratori comunali prima e dopo il trattamento di disinfezione sia sui campioni di acque superficiali a monte e a valle dello scarico. Le analisi sono state condotte su aliquote di campione mediante lettura spettrofotometrica al momento del test, previa filtrazione su filtri in fibra di vetro da 0.45 µ per eliminare interferenze dovute alla torbidità dei campioni.

3. RISULTATI

Dal 2008 a settembre del 2010 sono stati effettuati test di tossicità acuta con *Daphnia magna* Straus su 194 campioni di acque reflue di 34 depuratori comunali della provincia di Latina recapitanti in acque superficiali. I test eseguiti con *D. magna* sui campioni di acque di scarico prelevati prima del trattamento di disinfezione non hanno mai rilevato fenomeni di tossicità.

In tabella A è riportato il numero dei campioni conformi e non conformi rispetto al valore del parametro “saggio di tossicità acuta” come richiesto dalla normativa, condotti con *D. magna* su acque reflue prelevate dopo il trattamento di disinfezione. Per entrambe le categorie è riportato anche il numero dei campioni con valori di cloro libero superiori ed inferiori ai limiti di legge.

Tabella A. Numero di campioni conformi e non conformi analizzati nei depuratori comunali di Latina

	Mortalità conforme (< 50%)		Mortalità non conforme (>= 50%)	
	cloro libero <=0,20 (mg/L)	cloro libero >0,20 (mg/L)	cloro libero <=0,20 (mg/L)	cloro libero >0,20 (mg/L)
2008	8	2	14	31
2009	19	4	9	45
2010	46	1	3	12

I campioni sottoposti a trattamento di disinfezione e conformi rispetto al parametro “saggio di tossicità acuta” rappresentano il 18% del totale analizzati nel 2008, il 30% nel 2009 e raggiungono circa il 76% nel 2010.

Dai dati riportati in tabella risulta, inoltre, che il superamento del limite tabellare, relativamente al parametro cloro libero, produce una mortalità di *D. magna* superiore al limite di legge nel 93% dei campioni.

In figura 1 sono riportati i contributi percentuali dei campioni conformi e non conformi rispetto al parametro “cloro libero” nei diversi anni.

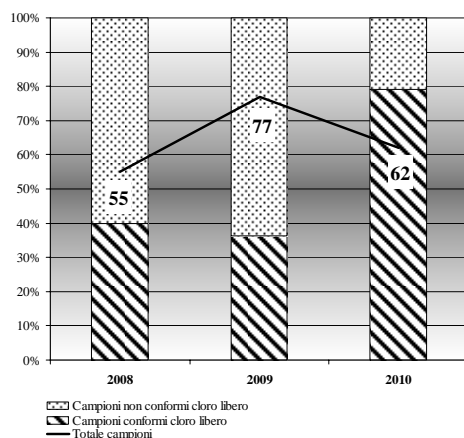


Figura 1. Andamento dei contributi percentuali dei campioni rispetto al parametro “cloro libero”.

Dal 2008 ad oggi si evidenzia l’aumento della percentuale di campioni conformi ai valori di legge rispetto al parametro “cloro libero” che passano dal 40% nel 2008 a circa l’80% nei campioni controllati nel 2010.

I campioni di acqua superficiale per l’analisi ecotossicologica sono stati prelevati lungo il canale denominato Cicerchia, in cui affluisce uno dei depuratori comunali della provincia di Latina. I prelievi sono stati effettuati su 3 stazioni: la prima posizionata circa trecento metri a monte dello scarico (St.1), la seconda a circa cinquanta metri a valle dello scarico (St. 2), la terza a circa tre chilometri a monte dello scarico (St.3). In tabella B sono riportati i risultati dei test di tossicità condotti sulle acque del canale.

Tabella B. Risultati test ecotossicologici con *Daphnia magna*. Canale Cicerchia

	1° controllo		2° controllo	
	EC50/24h (% di dil)	cloro libero (mg/L)	EC50/24h (% di dil)	cloro libero (mg/L)
St. 1	non tossico	< 0,2	non tossico	< 0,2
St. 2	23	0,49	non tossico	< 0,2
St. 3	non tossico	< 0,2	non tossico	< 0,2

Nella maggior parte dei casi i campioni sono risultati non tossici con un valore di cloro libero inferiore a 0,2 mg/L; in un solo caso è stata riscontrata tossicità nel campione di acqua prelevato subito a valle dello scarico, con un valore di EC50 pari al 23 % di diluizione e un valore di cloro libero totale pari a 0,49 mg/L. Le analisi condotte contestualmente sulle acque di scarico del depuratore che immette i reflui nel Cicerchia, hanno confermato elevati valori di cloro libero pari a 0,57 mg/L e una mortalità di *D. magna* del 100% rispetto al totale degli organismi esposti.

4. CONCLUSIONI

Le indagini effettuate in questi anni sull’uso dell’ipoclorito di sodio nei depuratori comunali nella Provincia di Latina evidenziano, ancora una volta, gli effetti di tossicità acuta prodotta da questo disinfettante sia nei reflui dei depuratori sia nei corpi idrici ricettori e confermano la necessità di modificare la tipologia di disinfezione degli scarichi con sistemi alternativi i quali, come noto, sono in grado di abbattere la carica microbica al disotto dei limiti richiesti dalla normativa e al contempo non producono effetti tossici sull’ambiente.

BIBLIOGRAFIA

- Amodei M. & Azzoni R., Pocar M. (2000). “*Daphnia magna* nel monitoraggio ambientale”. *Biologia Ambientale*, vol. 14, no. 2, pp. 13-20.
- Crebelli R, Conti L, Monarca S, Feretti D, Zerbini I, Zani C, Veschetti E, Cutilli D, Ottaviani M. (2005) “Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater”. *Water research*; 39(6):1105-1113.
- Tatti Luca, Marco Balsamo. (2002) “Acido peracetico:l’alternativa ecocompatibile per la disinfezione delle acque”. *Periodico tecnico scientifico L’Ambiente*, no. 4.
- Metodi Ecotossicologici del Manuale e Linee Guida 29/2003 APAT-IRSA-CNR Volume terzo, Metodi analitici per le acque – Sezione 8000 Metodi Ecotossicologici, sottosezione 8020: Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia* (Metodo B).
- UNI EN ISO 6341 corretta il 12/05/2004: Qualità dell’acqua determinazione dell’inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) Prova di tossicità acuta.

Il monitoraggio della crescita del biofilm come strumento di ottimizzazione dei trattamenti di pulizia delle tubazioni industriali

G. Pavanello^{a,*}, R. Magrassi^a, F. Garaventa^a, M. Cappello^b, A. Mollica^c, A. Mollica^c, A. Mollica^a, M. Faimali^a

^a Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISMAR-CNR), Genova, Italia

^b e-magine IT Srl, Genova, Italia

^c Newlab Snc, 16152 Genova, Italia

Abstract – Lo sviluppo del biofilm batterico rappresenta un grave problema in numerosi ambiti, ed i trattamenti chimici per limitarne lo sviluppo hanno spesso ricadute ambientali di un certo rilievo. La possibilità di monitorare lo sviluppo del biofilm per ottimizzare i trattamenti sia dal punto di vista della concentrazione che dei tempi di trattamento consentirebbe una sostanziale diminuzione dell’impatto ambientale di questi biocidi. In questa prospettiva è stato sviluppato un nuovo biosensore (ALVIM) in grado di misurare on-line l’attività elettrochimica del biofilm naturale (marino e d’acqua dolce) proporzionalmente alla frazione di superficie ricoperta dai batteri. In questo modo è possibile monitorare la percentuale di ricoprimento del biofilm adattando la strategia di trattamento.

I risultati presentati in questo lavoro, ottenuti testando il sistema ALVIM in ambito industriale, mostrano che la risposta veloce ed accurata fornita da questo sensore può essere utilizzata per ottimizzare i trattamenti di pulizia all’interno delle pipeline. Ciò ha permesso, nel caso oggetto di studio, di ridurre l’utilizzo del biocida (cloro) di oltre il 90%, con notevoli vantaggi sia dal punto di vista economico che ambientale.

Keywords: biofilm; biosensore; trattamento acqua; cloro.

1. INTRODUZIONE

Lo sviluppo del biofilm su qualunque superficie artificiale immersa in acqua (tubature per il trasporto dei fluidi, acquedotti, sensori, etc.) può essere causa di numerosi problemi tecnologici di ampia portata (corrosione, danneggiamento di attrezzature, consumo energetico, riduzione delle performance, resistenza ai trattamenti antibiotici), causando, di conseguenza, gravi danni economici (Parr e Hanson, 1965; Whitehouse et al., 1991; Borenstein, 1994; Geesey et al., 1994; Gilbert et al., 1997; Flemming e Schaele, 1994; Schulz e Swain, 2000).

Nelle tubature industriali per il trasporto dell’acqua, ad esempio, vengono impiegate grosse quantità di disinfettanti e altre sostanze chimiche per contrastare la crescita del biofilm (Wirtanen et al., 2001; Prince et al., 2002; Maxwell, 2005). Queste sostanze vengono solitamente applicate con una strategia di trattamento “in continuo” che prevede l’immissione costante dei biocidi nei circuiti durante tutto l’anno.

La possibilità di monitorare in tempo reale ed in continuo la crescita batterica è fondamentale per poter ottimizzare questi e altri trattamenti chimici finalizzati a contrastare lo sviluppo del biofilm, rendendo possibile una immissione controllata e proporzionale alla reale presenza e crescita batterica, con un conseguente abbattimento dei relativi costi e dell’impatto ambientale.

In passato diverse tecniche di rilevamento del biofilm sono state proposte: misurazione di (a) light scattering (Flemming et al., 1998), (b) torbidità (Klahre et al. 1998), (c) impedenza elettrochimica (Muñoz-Berbel et al., 2006; Dheilly et al., 2008), (d) risposta vibrazionale della superficie monitorata (Pereira et al., 2008), (e) limitazione della diffusione (Foret et al., 2010). Queste tecniche però presentano grossi limiti, poichè:

- non sono in grado di discriminare tra fouling biologico ed inorganico; questo è un problema fondamentale, poiché questi due diversi tipi di fouling richiedono trattamenti chimici differenziati;

- hanno una bassa sensibilità, non sono cioè in grado di rilevare le fasi iniziali di colonizzazione del biofilm, ma solo strati più spessi; molti problemi connessi al film batterico, invece, come ad es. la *Microbiologically Influenced Corrosion* (MIC), iniziano a manifestarsi non appena i primi *cluster* di microorganismi appaiono su una superficie (Mollica e Trevis, 1976; Dexter e LaFontaine, 1998; Kimio et al., 2002).

Inoltre, alcune delle tecniche menzionate sono rimaste alla fase di screening di laboratorio, e non sono mai state implementate all’interno di un sensore reale.

Allo scopo di superare le suddette limitazioni, è stato sviluppato un nuovo strumento (Pavanello et al., 2009), che sfrutta il fenomeno della depolarizzazione catodica: quando il biofilm cresce su acciaio inossidabile ed altre leghe con comportamento attivo-passivo, la corrente catodica misurata sul metallo aumenta notevolmente. Questo fenomeno è stato ampiamente studiato negli ultimi 20 anni, ed è stato osservato in diverse parti del mondo, sia in acqua marina che dolce (Mollica e Trevis, 1976; Scotto et al., 1985; Dexter e Zhang, 1990; Mattila et al., 1997; Dexter e LaFontaine, 1998; Kimio et al., 2002; Wang et al., 2004; Acuña et al., 2006; Dulon et al., 2007; Little et al., 2008). Come è stato dimostrato, questa attività elettrochimica del biofilm è proporzionale alla superficie ricoperta (Faimali et al., 2008; Faimali et al., 2010), pertanto, misurando il segnale elettrochimico prodotto dai batteri (Biofilm Electrochemical Signal, BES, espresso come densità di corrente o potenziale, vedi Materiali e metodi), è possibile misurare on-line ed in tempo reale l’esatto ricoprimento di biofilm su di una superficie.

Scopo di questo lavoro è stata la valutazione delle performance di questo nuovo sistema, impiegando i dati di crescita del biofilm rilevati in tempo reale dal biosensore, al fine di ottimizzare i trattamenti chimici di pulizia delle pipeline in un impianto pilota di dissalazione ad osmosi inversa.

Il biofilm rappresenta, infatti, un grave problema in questo tipo di ambiente industriale, sia per i moduli di microfiltrazione (MF) che per le membrane ad osmosi inversa (*reverse-osmosis*, RO), accrescendo i costi di gestione (trattamenti chimici, pulizia delle membrane) e

* Corresponding author. Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISMAR-CNR), via De Marini 6, 16149 Genova, Italy. Tel: +39 0106475407, Fax: +39 0106475400, Email: giovanni.pavanello@ge.ismar.cnr.it

contribuendo a causare intasamenti che possono portare anche al fermo impianto (Fritzmann et al., 2007; Vrouwenvelder et al., 2008).

2. MATERIALI E METODI

Il biosensore

Il sensore di biofilm (ALVIM – Fig. 1) è compatto, richiede manutenzione minima e può essere adattato a diversi tipi di presa su pipeline. Il sensore è costituito da un sistema a tre elettrodi, nel quale il contro elettrodo (*Counter Electrode*, C.E.) di zinco funge anche da pseudo-riferimento (*Reference Electrode*, R.E.). Allo zinco e all'elettrodo di lavoro (*Working Electrode*, W.E.) di acciaio inox, sul quale viene misurata la crescita del biofilm, è connesso un sistema di acquisizione, composto di tre parti principali: la prima per il condizionamento del substrato (spiegato di seguito), il secondo per la trasduzione e l'elaborazione del segnale, il terzo per la trasmissione dei dati, su network locale/GSM/GPRS.

Il sistema può essere facilmente scalato e può gestire alcune centinaia di sensori contemporaneamente. Il segnale elettrochimico del biofilm (Biofilm Electrochemical Signal, BES), misurato in tempo reale ad intervalli di tempo prestabiliti, viene inviato ad un database remoto. È possibile visualizzare graficamente i dati ed innescare diversi allarmi in corrispondenza di cambiamenti improvvisi del BES o del raggiungimento di un valore soglia reimpostato, corrispondente ad un dato ricoprimento batterico.

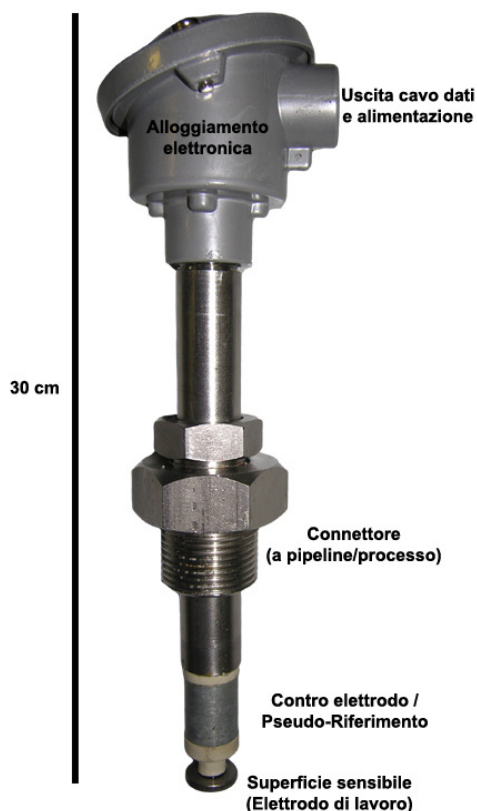


Figura 1. Schema del biosensore ALVIM.

Riguardo il condizionamento del substrato e la misura del BES, il biosensore può essere settato per imporre sul W.E.:

- un potenziale fisso (rispetto al R.E.), misurando la densità di corrente risultante, per monitorare in maniera accurata l'evoluzione del ricoprimento di biofilm, o
- una densità di corrente fissa, misurando il potenziale risultante (rispetto al R.E.), per monitorare un valore soglia di ricoprimento del biofilm; quando questo valore viene raggiunto, il sensore invia un segnale d'allarme. Ogni ulteriore incremento nel ricoprimento batterico non viene segnalato da un aumento di potenziale.

Gli esperimenti presentati in questo lavoro sono stati condotti utilizzando questo secondo metodo, ritenuto il più adatto per l'impiego in ambito industriale, impostando il valore soglia di ricoprimento all'1% del W.E., per testare la sensibilità massima del biosensore. Il principio di funzionamento del sensore e la correlazione tra ricoprimento batterico e potenziale sono basati su un modello descritto e validato in precedenti lavori (Mollica et al., 1997; Faimali et al., 2008, 2010; Pavanello et al., 2009).

Contesto sperimentale

I test sono stati svolti presso un impianto pilota di dissalazione ad osmosi inversa di FISIA – Italimpianti, situato presso la stazione sperimentale ISMAR, nel Porto di Genova. L'impianto utilizzava acqua prelevata direttamente dal mare (1.7 m³/h), prefiltrata a 100 µm e successivamente microfiltrata a 0.1 µm. Dopo la microfiltrazione (MF) si trovavano, in sequenza, un serbatoio per lo stoccaggio dell'acqua ed il sistema RO.

La sonda ALVIM è stata installata, tramite presa staffa, tra il punto di prefiltrazione e quello di microfiltrazione, ed il segnale di crescita del biofilm è stato utilizzato come innesco per attivare una clorazione (1ppm) in corrispondenza del tratto iniziale delle tubazioni, subito dopo la presa mare.

Durante i 20 giorni di prove, all'interno delle pipeline è stata misurata una pressione compresa tra 0.2 e 0.8 bar, ed una temperatura compresa tra gli 11 ed i 15°C.

Valutazione del ricoprimento di biofilm

Dopo lo smontaggio dalla sonda ALVIM, la superficie sensibile è stata sciacquata delicatamente con acqua di mare sterilizzata per filtrazione (Millipore, 0.22 µm), al fine di rimuovere eventuali cellule non adese, quindi fissata con una soluzione di paraformaldeide 2% per 30min ed infine sciacquata con buffer fosfato salino (PBS) filtrato. I campioni sono stati conservati a 4° C in PBS, prima della colorazione e dell'analisi al microscopio. Dopo la colorazione delle cellule batteriche con DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) (Takata e Hirano, 1990), i campioni sono stati osservati ad ingrandimento 400×, utilizzando un microscopio Olympus BX41 ad epifluorescenza abbinato ad un filtro UV per DAPI. Tramite una fotocamera digitale CAMEDIA 5060 (Olympus) sono state acquisite 30 immagini di 67500 µm² ognuna, scelte casualmente sulla superficie di ogni campione. Le immagini sono state convertite in formato tiff (RGB) e la frazione di superficie ricoperta dai batteri è stata misurata, sulle 30 immagini, per mezzo del software "Image J" (Rasband, 1997); sono stati quindi calcolati media ± errore standard (SE).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Dopo due giorni dall'installazione del biosensore il BES è iniziato a crescere (Fig. 2), segnalando che il ricoprimento di biofilm sulla superficie sensibile della sonda aveva raggiunto la soglia preimpostata (1%). Il quarto giorno è

avvenuta la prima clorazione innescata da ALVIM; la durata del trattamento è stata impostata a 30 minuti. Immediatamente dopo questa pulizia chimica il BES è sceso al valore iniziale (circa 700 mV Vs. Zn).

Nell'arco di circa due giorni il segnale elettrochimico del biofilm è tornato nuovamente a crescere, e stavolta la clorazione di 30 minuti è stata innescata in anticipo rispetto alla precedente (il BES era circa 900 mV Vs. Zn, mentre il quarto giorno era circa 1100 mV Vs. Zn). Dopo il trattamento la superficie sensibile della sonda è stata immediatamente campionata e sostituita. Il ricoprimento di biofilm, analizzato in laboratorio, era di circa l'1%, valore perfettamente corrispondente a quello preimpostato. Ciò evidenzia il fatto che, ovviamente, la clorazione eseguita non ha implicato un immediato distacco del biofilm dalla superficie.

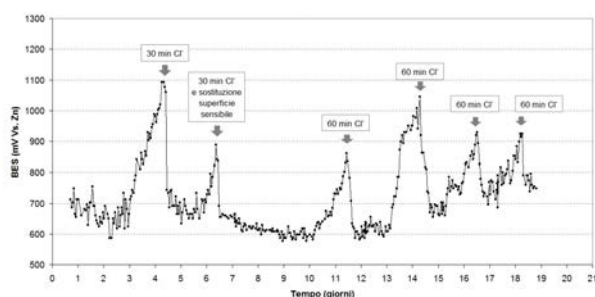


Figura 2. Evoluzione del segnale elettrochimico del biofilm (BES) misurato dal sensore ALVIM e clorazioni effettuate sulla base di questi dati (nei box è indicata la durata dei trattamenti).

Dopo la sostituzione del W.E. sono stati necessari quattro giorni affinché il BES crescesse nuovamente. La durata della clorazione è stata estesa a 60 minuti, al fine di verificare la frequenza richiesta di trattamento con un tempo di clorazione maggiore. La frequenza di trattamento è rimasta di una clorazione ogni due giorni circa, e, inoltre, dopo la pulizia chimica eseguita il quattordicesimo giorno il BES non è ritornato ai valori iniziali, evidenziando una maggiore attività bioelettrochimica post-trattamento. Questo andamento ha evidenziato una non completa inattivazione/eliminazione del biofilm imponendo un aumento della frequenza dei trattamenti.

Informazioni di questo tipo sono essenziali per modulare temporizzazione e dosaggio dei trattamenti chimici, visto che la sopravvivenza di una piccola parte dei batteri insediati accelera fortemente i tempi di ricrescita del biofilm.

Questi dati suggeriscono che in questa simulazione, compatibilmente con le considerazioni inerenti l'impatto ambientale e i limiti di legge per gli scarichi, sarebbero state necessarie concentrazioni di cloro maggiori o trattamenti prolungati per rimuovere completamente il biofilm dalle pipeline dell'impianto.

A prescindere da queste osservazioni il monitoraggio con il biosensore ha consentito di individuare una nuova strategia di ottimizzazione del trattamento di pulizia all'interno delle tubazioni.

Prima dell'installazione del biosensore nell'impianto veniva effettuata una clorazione in continuo completamente svincolata dalla reale presenza e crescita del biofilm nelle

condotte. La possibilità di poter modulare i trattamenti, grazie all'impiego di questa nuova tecnologia ha permesso di ridurre, nel periodo di simulazione, il quantitativo di cloro utilizzato di oltre il 90% con evidenti vantaggi economici diretti (minor consumo di biocida) e vantaggi ecologici indiretti (minor quantitativo di cloro nelle acque di scarico).

4. CONCLUSIONI

I risultati sperimentali hanno dimostrato che il sistema ALVIM lavora in maniera affidabile in un ambiente industriale reale, e che rappresenta una soluzione efficiente per il monitoraggio del biofilm fornendo informazioni tempestive ed accurate riguardo il ricoprimento batterico, anche durante i primi stadi di colonizzazione.

I dati forniti dal biosensore si sono rivelati fondamentali per l'ottimizzazione dei trattamenti di pulizia, permettendo di contrastare la crescita del biofilm mediante una strategia di pulizia chimica modulare estremamente vantaggiosa dal punto di vista economico ed ecologico.

Questa nuova tecnologia è estremamente promettente per qualunque settore interessato da problemi connessi allo sviluppo del biofilm, e si configura come strumento di ottimizzazione delle strategie di trattamento chimico delle tubazioni industriali.

I futuri sviluppi del biosensore riguarderanno ulteriori periodi di test in condizioni controllate, applicazioni dimostrative in condizioni differenti (ad es. in acqua dolce ed in altre tipologie di impianti industriali) e test di nuovi materiali per la componentistica dello strumento.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il personale di FISIA – Italimpianti e dell'Università di Genova – Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale per il contributo fornito ai test di campo.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Acuña, N., Ortega Morales, B.O., Valadez-Gonzalez, A., 2006. Biofilm colonization dynamics and its influence of austenitic UNS S31603 stainless steel exposed to Gulf of Mexico seawater. *Mar. Biotechnol.* 8, 62–70.

Borenstein, S.W., 1994. *Microbiologically influenced corrosion handbook*. Industrial Press Inc., New York, 288 pp.

Cristiani, P., Mollica, A., Ventura, G., 2000. System for monitoring biocide treatments. United States Patent 6,054,030.

Cristiani, P., 2005. Solutions to fouling in power station condensers. *Appl. Therm. Eng.* 25, 2630–2640.

Cristiani, P., Mollica, A., Ventura, G., 1998. On-line monitoring of biofilm and TRO by a new ENEL's system. *Proceedings of OCEANS '98, Nice, France*, 1507–1511.

Dexter, S.C., Zhang, H.J., 1990. Effect of biofilms on corrosion potential of stainless steel alloys in estuarine waters. *Proceedings of the 11th International Corrosion Congress, Florence, Italy*, 333–340.

Dexter, S.C., La Fontaine, J.P., 1998. Effect of natural marine biofilms on galvanic corrosion. *Corrosion* 54, 851–861.

Dheilly, A., Linossier, I., Darchen, A., Hadjiev, D., Corbel, C., Alonso, V., 2008. Monitoring of microbial adhesion and biofilm growth using electrochemical

- impedancemetry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 157–164.
- Dickinson, W.H., Lewandowski, Z., 1996. Manganese biofouling of stainless steel: deposition rates and influence on corrosion processes. *Proceedings of Corrosion/96*, Denver, Colorado, Paper No. 291.
- Dulon, S., Parot, S., Delia, M.L., Bergel, A., 2007. Electroactive biofilms: new means for electrochemistry. *J. Appl. Electrochem.* 37, 173–179.
- Faimali, M., Chelossi, E., Garaventa, F., Corrà, C., Greco, G., Mollica, A., 2008. Evolution of oxygen reduction current and biofilm on stainless steel cathodically polarized in natural aerated seawater. *Electrochim. Acta* 54, 148–153.
- Faimali, M., Chelossi, E., Pavanello, G., Benedetti, A., Vandecandelaere, I., De Vos, P., Vandamme, P., Mollica, A., 2010. Electrochemical activity and bacterial diversity of natural marine biofilm in laboratory closed-systems. *Bioelectrochemistry* 78, 30–38.
- Flemming H.C., and Shaule, G., 1994. Microbial deterioration of materials - biofilm and biofouling: Biofouling (Mikrobielle Werkstoffzerstörung - Biofilm und Biofouling: Biofouling). *Materials And Corrosion* 45, 29–39.
- Flemming, H.C., Tamachkiarowa, A., Klahre, J., Schmitt, J., 1998. Monitoring of fouling and biofouling in technical systems. *Water Sci. Technol.* 38, 291–298.
- Foret, C., Merlet, N., Chaussec, G., Martemianov, S., Tribolet, B., Hater, W., 2010. Measurement of biofilm thickness: An effective Legionella risk assessment tool. BKG Technical Publication, http://www.bkgwater.com/clients/bkgwater/upload/fichiers/2010-02-bkgws_publication-measurement-of-biofilm-thickness.pdf.
- Fritzmann, C., Löwenberg, J., Wintgens, T., Melin, T., 2007. State-of-the-art of reverse osmosis desalination. *Desalination* 216, 1–76.
- Geesey, G.G., Lewandowski, Z., Flemming, H.C., 1994. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. CRC Press, Boca Raton, 297 pp.
- Gilbert, P., Das, J., Foley, I., 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160–167.
- Kimio, I., Matsubashi, R., Toshiaki, K., Miki, O., Kihira, H., Watanabe, K., Baker, P., 2002. Potential Ennoblement of Stainless Steel by Marine Biofilm and Microbial Consortia Analysis. *Proceedings of Corrosion/2002*, Denver, Colorado, Paper No. 403.
- Klahre, J., Lustenberger, M., Flemming, H.C., 1998. Microbial problems in paper manufacturing. Part III: Monitoring (Mikrobielle Probleme bei der Papierfabrikation. Teil III: Monitoring). *Das Papier* 52, 590–596.
- Licina, G.J., Nekoska, G., 1993. An Electrochemical Method for On-Line Monitoring of Biofilm Activity. *Proceedings of CORROSION/93*, Houston, Texas, Paper No. 403.
- Little, B.J., Lee, J.S., Ray, I.R., 2008. The influence of marine biofilms on corrosion: a concise review. *Electrochim. Acta* 54, 2–7.
- Mattila, K., Carpen, L., Hakkarainen, T., Salkinoja-Salonen, M.S., 1997. Biofilm development during ennoblement of stainless steel in Baltic sea water: a microscopic study. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 40, 1–10.
- Maxwell, S., 2005. Controlling Corrosive Biofilms by the Application of Biocides. *SPE International Symposium on Oilfield Corrosion*, Aberdeen, UK.
- Mollica, A., Trevis, A., 1976. Correlation between the formation of the primary film and the change in the cathodic reaction on stainless steels in seawater at speeds between 0.3 and 5.2m/s (Correlation entre la formation de la pellicule primaire et de la modification de la cathodique sur des aciers inoxydables expérimentés en eau de mer aux vitesses 0.3 à 5.2m/s). *Proceedings of the Fourth Congress on Marine Corrosion and Fouling*, Antibes, France, 351–365.
- Mollica, A., Traverso, E., Thierry, D., 1997. On oxygen reduction depolarisation induced by biofilm growth on Stainless Steels in seawater. In: *European Federation of Corrosion publications N°22*. The Institute of Materials, London, p. 51–65.
- Muñoz-Berbel, X., Muñoz, V., Vigués, N., Mas, J., 2006. On-chip impedance measurements to monitor biofilm formation in the drinking water distribution network. *Sens. Actuators B* 118, 129–134.
- Parr, J.G., Hanson, A., 1965. An introduction to Stainless Steel. ASM International, Metals Park, 147 pp.
- Pavanello, G., Faimali, M., Benedetti, A., Pittore, M., Mollica, A., Mollica, A., Mollica, A., 2009. Development of a new biofilm monitoring electrochemical sensor. *Proceedings of Eurocorr '09*, Nice, France, Paper No. 7911.
- Pereira, A., Mendes, J., Melo, L.F., 2008. Using Nanovibrations to Monitor Biofouling. *Biotechnol. Bioeng* 99, 1407–1415.
- Prince, E.L., Muir, A.V.G., Thomasz, W.M., Stollardx, R.J., Sampsonx, M., Lewis, J.A., 2002. An evaluation of the efficacy of Aqualox for microbiological control of industrial cooling tower systems. *J. Hosp. Infect.* 52, 243–249.
- Pryogle, P.A., Mines, G. L., Sperry, T. L., Allred, R. G., 2002. Investigation of an electrochemical monitor for tracking biofilm development at the Bonnett Geothermal Plant, Cove Fort, Utah. *Proceedings of the 2002 Annual GRC Meeting*, Reno, Nevada.
- Rasband, W.S., 1997. ImageJ. US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Schultz, M.P., Swain, G.W., 2000. The Influence of Biofilms on Skin Friction Drag. *Biofouling* 15, 129–139.
- Scotto, V., Di Cintio, R., Marcenaro, G., 1985. The influence of marine aerobic microbial film on stainless steel corrosion behaviour. *Corros. Sci.* 25, 185–194.
- Takata, K., Hirano, H., 1990. Use of fluorescein-phalloidin and DAPI as a counterstain for immunofluorescence microscopic studies with semithin frozen sections. *Acta Histochem. Cytochem.* 23, 679–683.
- Van den Brink, F., Barendrecht, E., Visscher, W., 1980. The cathodic reduction of oxygen. A review with emphasis on macrocyclic organic metal complexes as electrocatalysts. *J. Royal Netherlands Chem. Soc.* 99, 253–262.
- Vrouwenvelde, J.S., Manolarakis, S.A., van der Hoek, J.P., van Paassen, J.A.M., van der Meer, W.G.J., van Agtmaal, J.M.C., Prummel, H.D.M., Kruihof, J.C., van Loosdrecht, M.C.M., 2008. Quantitative biofouling diagnosis in full scale nanofiltration and reverse osmosis installations. *Water Res.* 42, 4856–4868.
- Wang, W., Wang, J., Li, X., Xu, H., Wu, J., 2004. Influence of biofilm growth on corrosion potential of metals immersed in seawaters. *Mater. Corros.* 55, 30–35.
- Whitehouse, R.L., Peters, E., Lizotte, J., Lilje, C., 1991. Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water. *J. Dent.* 19, 290–295.
- Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I.M., Mattila-Sandholm, T., 2001. Microbiological methods for testing

disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloid. Surface. B* 20, 37–50.

Contamination by POPs (PCBs, PBDEs) of the supralittoral of sandy shores: Talitrid Amphipods as biomonitor

G. Ungherese^{a,*}, A. Cincinelli^b, T. Martellini^b, Lorenza Misuri^b, A. Ugolini^a

^a Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università di Firenze, Italia – giuseppe.ungherese@unifi.it, alberto.ugolini@unifi.it

^b Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, Italia – alessandra.cincinelli@unifi.it, tania.martellini@unifi.it, lorenza.misuri@unifi.it

Abstract – We analyzed PCBs and PBDEs content in tissue of the supralittoral amphipod *Talitrus saltator*, a key species in the energy flow of sandy shores. Samples of animals and sand were collected at Fiume Morto (inside the S.Rossore Regional Park, Pisa) and Calambrone (near the Livorno harbor). Twenty-one PCBs and twenty PBDEs congeners were quantified using a gas chromatograph interfaced with a mass spectrometer. Sandhoppers accumulate PCBs and PBDEs, both at concentrations higher than in the sand. Moreover, significant differences between sampling sites were reported for PCBs and PBDEs (Calambrone was most contaminated). Therefore *T. saltator* seems to represent a promising biomonitor of PCBs and PBDEs contamination of the supralittoral band of sandy beaches.

Keywords: *Talitrus saltator*, PCB, PBDE, sandy beaches.

1. INTRODUCTION

Coastal areas are subjected to a strong anthropogenic influence and to a great input of toxic contaminants both of natural and human origin (Ugolini and Ungherese, in press). Pollutants can reach these areas by a numerous direct (spills from industrial, aquaculture and urban runoff) and indirect (rivers discharge and atmospheric deposition) processes. The contaminants of main concern include persistent organic pollutants (POPs), oils, fertilizers, heavy metals and pathogens (Dachs and Méjanelle, 2010). In recent years, the increasing contamination of waters with trace elements has required much greater knowledge of the diffusion of these substances in the biota. In the last years many species of fish and invertebrates have been proposed as POPs biomonitor in transitional and coastal waters (Dachs and Méjanelle, 2010). Despite the great ecological importance of the supralittoral band of sandy shores (constituting an important transitional area from water and land and representing a functional ecological linkage with adjacent ecosystems), it has received scarce attention about POPs contamination (Ugolini and Ungherese, in press). Talitrid amphipods represent a key species in sandy beach ecosystems, since they constitute one of the major animal components (in terms of biomass) and play an important role in the energy flow among different trophic levels (Griffiths *et al.*, 1983). As detritivores, grazers and scavengers, sandhoppers feed on plant and animal organic matter of marine and terrestrial origin and constitute an important food source for many species of invertebrates and vertebrates (Griffiths *et al.*, 1983). In recent years the most common European species (e.g. *T. saltator*) have been

successfully employed as biomonitor of trace metals contamination of the supralittoral band (e.g. Marsden and Rainbow, 2004; Ugolini and Ungherese, in press). However, no data have been reported on POPs bioaccumulation in these species, except for PAHs (Ugolini and Ungherese, in press).

The main objective of this study is to evaluate PCBs and PBDEs contamination of the supralittoral of sandy shores using the amphipod *T. saltator*.

2. MATERIALS AND METHODS

Samples of sand and adult individuals of *T. saltator* (50-60 individuals) were collected at Fiume Morto (Migliarino, S.Rossore, Massaciuccoli Regional Park, Pisa) and Calambrone (near the Livorno harbor) in May 2009. 21 PCBs (PCB-77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 128, 138, 156, 157, 167, 169, 170, 180, 187, 189, 204, 206, 207 and 209) and 20 PBDEs (BDE-7, 15, 17, 28, 47, 49, 66, 71, 85, 99, 100, 126, 138, 153, 154, 156, 183, 184, 191 and 209) congeners were analyzed. Samples were homogenized with sodium sulphate, spiked with internal standards and extracted in a Soxhlet apparatus for 16 h using a dichloromethane / hexane mixture. The extracts were rotary evaporated and an aliquot was used for the determination of lipid content by gravimetry. Interfering substances were removed by fractionation on a multilayer silica gel column. PCBs and PBDEs were identified and quantified using a gas chromatograph interfaced with a mass spectrometer (EI and NCI mode). PCBs and PBDEs analysis were carried out also on sand samples following the method ISO 22031 with some modifications. Briefly, they were freeze dried and then, about 5 g, were extracted in Soxhlet with a mixture of n-hexane and acetone for 16 h. The extracts were cleaned up on a multilayer acidic silica/silica gel column. The eluted was concentrated and analysed by GCMS. Determination of organic carbon were performed by a CHN analyzer. Concentrations of PCBs and PBDEs in sand and amphipods, were expressed, respectively, on organic carbon and lipid weight (l.w.) basis.

Comparison between PCBs and PBDEs content in sand and amphipods for each sampling sites was carried out using the Sign test. Moreover the same statistical analysis was employed to assess the presence of differences of PCBs and PBDEs content in tissue of sandhoppers collected in different localities.

3. RESULTS

PCBs analysis showed an higher concentration in animals than in the sand for samples collected both at Fiume Morto (n=18, x=1, $p<0.001$, Sign test) and Calambrone (n=18,

* Corresponding author. Via Romana 17, 50125 Firenze, Italy, Tel 055 2288206, Fax 055 2288565.

$x=2$, $p=0.001$, Sign test). The most abundant congeners were PCB 138, 114 and 180 that accounted approximately of 60 % and 50 % of total in amphipods and in sand samples respectively. The comparison of PCBs content recorded in specimens of *T. saltator* collected in the two sampling sites showed significant differences ($n=18$, $x=1$, $p<0.001$, Sign test) (Fig. 1A). In fact, individuals from Calambrone had an higher concentration of PCBs ($\sum_{18}\text{PCBs}=159.8$ ng/g l.w.) respect to that one collected at Fiume Morto ($\sum_{18}\text{PCBs}=69.6$ ng/g l.w.) (Fig. 1A).

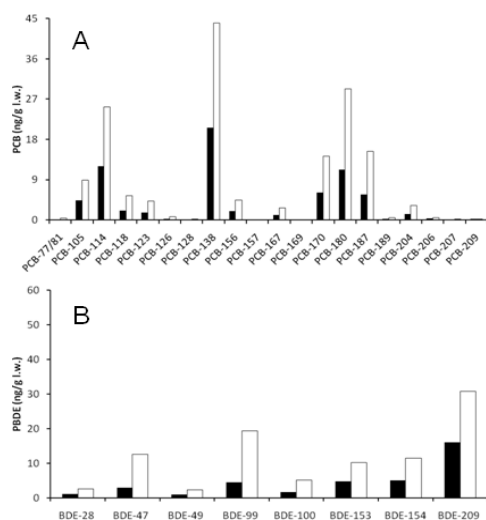


Figure 1. Comparison of PCBs (A) and PBDEs (B) concentration in *T. saltator* collected at Fiume Morto (black bars) and Calambrone (white bars).

Of 20 PBDEs congeners analyzed, only 8 were found in amphipods and sand samples. However, as observed for PCBs, PBDEs concentration was higher in amphipods than in the sand collected in the two sampling sites ($n=8$, $x=0$, $p=0.004$, Sign test). The most abundant congener found in samples from both localities was BDE-209, that represented, respectively, 37% and 80% of total in animals and sand. Moreover, as well observed for PCBs, significant differences were observed in PBDEs concentration between individuals of *T. saltator* collected in different sites ($n=8$, $x=0$, $p=0.004$, Sign test). In fact, amphipods from Calambrone had an higher content of PBDEs ($\sum_8\text{PBDEs}=94.6$ ng/g l.w.) respect to animals sampled at Fiume Morto ($\sum_8\text{PBDEs}=37.3$ ng/g l.w.) (Fig. 1B).

4. DISCUSSION

Our results show that *T. saltator* accumulates 8/20 PBDEs and 18/21 PCBs analyzed at higher concentration than in sand. In fact, despite sediments represent an important recipient of POPs and therefore are characterized by an high concentration of organic contaminants (Dachs and Méjanelle, 2010), amphipods tissue had an higher level of PCBs and PBDEs respect to sand. These results are in agreement with the data reported for freshwater species of amphipods (e.g. Viganò *et al.*, 2007; 2009) that showed an higher concentration of PCBs and PBDEs in animals respect to sediment. Furthermore, as previously reported for these species (Viganò *et al.*, 2009), BDE-209 was an important congener also in *T. saltator*. Despite we compared only two sampling sites located approximately 20 Km apart,

significant differences were observed. In particular Calambrone, located near the Livorno harbor, was most contaminated respect to Fiume Morto (situated in the S.Rossore Regional Park). Similar differences between these sites has been reported also for other contaminants (e.g. trace metals, Ugolini and Ungherese, in press).

5 CONCLUSIONS

Despite PCBs and PBDEs could have harmful effects of living organisms and constitute widespread contaminants, no studies have been reported concerning the presence and distribution of these contaminants in organisms of supralittoral of sandy shores. Our results show that the selected species could represent a suitable biomonitor of PCBs and PBDEs contamination of sandy shores showing differences between localities. Therefore, *T. saltator* could represent a good bioindicator of PCBs and PBDEs contamination of the supralittoral zone of sandy shores. Since talitrid amphipods represent a key species in the energy flow of sandy shore ecosystems (e.g. see Griffiths *et al.*, 1983), sandhoppers can transfer PCBs and PBDEs to higher trophic levels and thus could act as vectors of pollutants. Moreover, the use of *T. saltator* in biomonitoring programmes could offer some advantages represented by the simplicity and cheapness of sampling and the wide geographic distribution of this species that could offer the possibility to compare different localities.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was funded by the Fondazione Monte dei Paschi (Siena) (grant 33798 assigned to A. Ugolini) and by Fondazione Cassa di Risparmi di Livorno (Livorno) (2010 Settore Arte - Educazione - Salute - Ricerca Scientifica).

REFERENCES

- Dachs, J. and L. Méjanelle (2010) Organic pollutants in coastal waters, sediments and biota: a relevant driver for ecosystems during the Anthropocene?. *Estuaries and Coasts*, vol. 33: 1-14.
- Griffiths, C.L., J.M.E. Stenton-Dozey and K. Koop (1983) Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: McLachlan, A., and T. Erasmus (eds.), *Sandy beaches as ecosystems*, Junk Publications, The Hague, pp. 547-556.
- Marsden, I.D. and P.S. Rainbow (2004). Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* vol. 300:373-408.
- Ugolini A. and G. Ungherese (In press) Sandhoppers as bioindicators of anthropogenic influences on Mediterranean sandy beaches. In Stambler N. (Ed.), *Life in the Mediterranean Sea: A look to the habitat change*. Nova Science Publishers Inc. New York.
- Viganò, L., A. Farkas, L. Guzzella, C. Roscioli and C. Erratico (2007). The accumulation of PAHs, PCBs and DDTs are related in an inverse way to the size of a benthic amphipod (*Echinogammarus stammeri* Karaman) in the river Po. *Science of the Total Environment*, vol. 373: 131-145.
- Viganò, L., C. Roscioli, C. Erratico, L. Guzzella and A. Farkas (2009). Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in gammarid, caddisflies, and bed sediments of the lowland river Po. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 82: 200-205.

Mother-embryo transfer of heavy metals in *Dermochelys coriacea* and effects on hormonal levels

A. Zaccaroni ^{a,*}, B. Flori ^a, D. Scaravelli ^a, Jean Yves Georges ^b

^a Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Gruppo di Ricerca Grandi Vertebrati Pelagici, Cesenatico, Italy – ricerca.gvp@acquacoltura.unibo.it

^b Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, UMR UoS CNRS, Strasbourg, France - jean-yves.georges@c-strasbourg.fr

Abstract –This work reports about the levels of heavy metals in female leatherback turtles and in their eggs and evaluates any potential correlation between blood heavy metals levels and thyroid hormones concentration. No correlation was found between mothers and eggs metals concentration nor between hematic metals and hormonal levels. Exposure levels in leatherbacks seems to be low, and there seems to be no active transfer of metals to the eggs, with the only exception of arsenic and chromium. Thus there seems to be no risk for both adult females and eggs from the exposure to environmental levels of heavy metals. Nevertheless, a certain concern arises for As and Cr, which should be further investigated for their toxic action on embryos.

Keywords: *Dermochelys coriacea*, metals, T3, T4.

1. INTRODUCTION

Heavy metals can represent a great risk for marine life. Among sea turtles Loggerhead turtle (*Caretta caretta*) appears to be the most studied from the toxicological point of view, due to its worldwide presence and availability of blood, eggs and tissue samples (Caurant et al., 2000; Stoneburner et al., 1980; Clark and Krynskiy, 1985; Blumton et al., 1990; Bishop et al., 1991; Sakai et al., 1995; Vazquez et al., 1996). Meanwhile there is a great paucity of information on the presence of contaminants (heavy metals in particular) in Leatherback turtle, *Dermochelys coriacea* (Caurant et al., 2000; Edmonds et al., 1993; Guirlet et al., 2008; Vazquez et al., 1996). Similarly, there is a great lack of information on the hormonal profile of adult leatherback and on the potential transfer of contaminant to the embryo (Rostal et al., 2001).

In present work we report about the quantification of heavy metal in adult females and eggs of leatherback turtles and on any possible correlation with hematic thyroid hormones levels.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1 Sample collection

Eggs and blood samples were collected from female leatherback turtles nesting along French Guyana coasts in 2005 (Figure 1). Blood was collected from jugular vein and the first and last egg were collected during deposition. Multiple samples could be obtained from the same female, whenever she returned to the beach for nesting after few weeks intervals.



Figure 1- Sampling area.

Eggs, a sample of whole blood and plasma from centrifugation were frozen at -20°C until analysis.

2.2 Heavy metals analysis

Eggs were divided into the three components (albumen, yolk and shell) and a 0.7 g subsample of each underwent microwave wet digestion and inductively coupled plasma-Optic Emission Spectrometry (ICP-OES) analysis for heavy metal quantification (As, Cd, Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Pb, Hg, Se, Zn). For females blood analysis, 0.5 g of whole blood were wet digested and analyzed with ICP-OES.

2.3 Thyroid hormones quantification

Plasma samples were thawed at room temperature and analyzed for total T3 and total T4 by using a commercial RIA kit (Chematyl S.r.L., Angri, Sa, Italy).

2.3 Statistical analysis

Given the normal distribution of obtained data (Shapiro-Wilk test), parametric statistic tests (ANOVA and correlation) were applied.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Sampling

A total of 49 blood samples and 36 eggs from 16 adult females were used.

In none of the egg samples lead and mercury were detected, despite the positivity of mothers' blood. Arsenic was found at very low levels, always below background concentration of 1 mg/kg fresh weight.

Cadmium was detected in blood, probably because of the high exposure to cadmium rich preys like jellyfish (Table 1).

* Corresponding author. Corso di Laurea in Acquacoltura, Viale Vespucci 2, Cesenatico (FC) 47042. Tel.: 0547-338944; Fax: 0547-338941

Table 1. Metal concentration in mg/kg as median and \pm standard error

Metal	Yolk	Albumen	Shell	Blood
As	1.035 \pm 0.091	1.027 \pm 0.069	0.990 \pm 0.069	0.241 \pm 0.070
Co	0.083 \pm 0.071	/	0.003 \pm 0.0007	/
Cd	0.011 \pm 0.002	0.012 \pm /	0.011 \pm 0,002	0.055 \pm 0.003
Cr	0.156 \pm 0.008	0.033 \pm 0.005	0.047 \pm 0.005	0.079 \pm 0.014
Cu	1.590 \pm 0.110	0.564 \pm 0.163	4.972 \pm 0.206	1.677 \pm 0.073
Mn	0.305 \pm 0.016	0.091 \pm 0.013	0.404 \pm 0.051	0.029 \pm 0.003
Fe	23 \pm 0.946	5.882 \pm 0.704	14.3 \pm 1.447	352.3 \pm 65.06
Ni	0.085 \pm 0.034	0.056 \pm 0.009	0.099 \pm 0.010	0.138 \pm 0.026
Se	1.224 \pm 0.067	0.489 \pm 0.036	6.302 \pm 0.354	4.290 \pm 0.304
Zn	101.6 \pm 5.296	18.443 \pm 4.701	5.723 \pm 1.115	38.626 \pm 1.694

No significant correlation was found between blood and egg components. Thus it can be speculated that the mother-embryos transfer of metal could little impact the final concentration of contaminants in eggs and thus represents a little risk for developing embryos.

Mean concentration of thyroid hormones in blood were 1.002 \pm 0,9 nmol/l and 2,816 \pm 2,590 nmol/l for T3 and T4 respectively.

No correlation was found between heavy metals in females blood and thyroid hormones levels, making it possible to consider the exposure to these contaminant not high enough to alter endocrine balance in adult leatherback turtles.

4. CONCLUSION

The non-essential metals generally accumulate in organs as liver, kidney and pancreas but other tissues as the blood and the eggs can be employed for appraising recent exposures (Caurant et al., 2000).

For females leatherback turtles results show that preys seems to be a minor source of exposure to heavy metals, as hematic levels are well below the toxic threshold. Also their absence in the eggs, and particularly in the yolk, make it possible to exclude heavy metals as potential risks for the normal development and the survival of the embryo.

Generally speaking for the Leatherback turtle in the area the level of contamination has to be considered as limited and not dangerous for the species.

The lack of meaningful correlations among the levels of pollutants in the mothers' blood and in the eggs make us believe that at least in the studied population the transfer of these inorganic contaminants, although present, cannot be considered an important mechanism of excretion for the mother and a risk for the embryo.

Nevertheless there are evidences of transfer and accumulation (i.e. arsenic and chromium) of these metals in eggs. Additionally, the lack of any correlation between hematic concentrations of metals and thyroid hormones levels underlines how environmental exposure to these contaminants has to be considered as safe for the endocrine balance of leatherback turtles.

A potential effect of other contaminants should not be excluded and will be considered in future.

REFERENCES

Caurant F., Bustamante P., Bordes M. and Miramand P. (2000). "Bioaccumulation of Cadmium, Copper and Zinc in some Tissues of Three Species of Marine Turtles Stranded

Along the French Atlantic Coasts". Marine Pollution Bulletin, vol. 38, no. 12, pp. 1085-1091.

Edmonds J. S., Shibata Y., Prince R.T.I., Francesconi K.A. and Morita M. (1993). "Arsenic compounds in tissues of the leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*". Short communications, pp 483-486.

Guirlet E., Das K., Girondot M., (2008), Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles. Aquatic toxicology journal, ELSEVIER, pp 267-276.

Rostal D. C., Grumbles J. S., Palmer K. S., Lance V. A., Spotila J. R., Paladino F.V., (2001). Changes in gonadal and adrenal steroid levels in the leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) during the nesting cycle. Gen. Comp. Endocrinol. 122, 139-147.

Vazquez G. F., Reyes M. C., Fernandez G., Aguayo J. E. C., Sharma V. K. (1996), Contamination in marine turtle (*Dermochelys coriacea*) egg shell of Playon de Mexiquillo, Michoacan, Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58:326-333.

Clark D.R., Krynitsky A.J. (1985). DDE residues and artificial incubation of Loggerhead Sea Turtle eggs. Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology, 34: 121.125.

Blumton A.K., Fraser J.D., Young R.W., Goodbred S., Porter S.L., Luukkonen D.L. (1990). Pesticide and PCB residues for Loggerhead shrikes in the Shenandoah Valley, Virginia, 1985-88. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, 45: 697-702.

Bishop C., Brooks R.J., Carey J.H., Norstrom R.J., Lean D.R.S. (1991). The case fir a cause-effect between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra S. Serpentina*) from Ontario, Canada. Journal of Toxicology Environmental Health, 33: 521-547.

Sakai H., Ichihashi H., Suganuma H., Tatsukawa R. (1995). Heavy metal monitoring in sea turtles using eggs. Marine Pollution bulletin, 30: 347-353.

Stoneburner D.L., Nicora M.N., Blood E.R. (1980). Heavy metals in Loggerhead Sea Turtle eggs (*Caretta caretta*): evidence to support the hypothesis that demes exist in the Western Atlantic population. Journal of Herpetology, 14: 171-175.