

## APPROFONDIMENTI TECNICO-SCIENTIFICI SUI SAGGI BIOLOGICI DEI CAMPIONI DEI SEDIMENTI DEL PORTO DI RAVENNA FORNITI DA ARPAE

A cura di ISPRA-CNR-UNIVPM – SETTEMBRE 2021

Nel mese di Aprile 2021 l'ARPAE ha richiesto la collaborazione tecnico-scientifica di ISPRA con la finalità di approfondire alcune criticità evidenziate riguardo le risposte della batteria di saggi biologici considerata per la caratterizzazione dei sedimenti da dragare nel porto di Ravenna, in applicazione all'Allegato Tecnico al DM173/16 (in seguito Allegato). In particolare, dopo prime prove effettuate su alcuni campioni conservati da ARPAE e analizzati presso i laboratori ISPRA di Livorno, si è evidenziata una anomala presenza di sostanze azotate che non rientrano nei parametri chimici standard previsti dall'Allegato. Si tratta di composti quali ammonio e nitriti che costituiscono comuni parametri di controllo nelle prove ecotossicologiche, in quanto possono essere responsabili di effetti tossici, soprattutto nei saggi di embriotossicità afferenti alla cosiddetta "terza tipologia", e determinare talvolta un peggioramento della classe di qualità ambientale del materiale da rimuovere.

Sulla base dei campioni e della documentazione messa a disposizione da ARPAE sono state eseguite una serie di attività di approfondimento tecnico-scientifico, che vengono di seguito riportate in sintesi. Tali attività sono state svolte in collaborazione con il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona) e con l'Istituto per lo studio degli Impatti Antropici e Sostenibilità in ambiente marino (IAS-CNR) di Genova, per l'esecuzione di alcune delle prove di laboratorio e per un supporto nell'analisi dei dati e nell'interpretazione dei risultati.

1. Su un primo gruppo di 10 campioni di sedimento (decongelati) messi a disposizione da ARPAE, ISPRA ha eseguito il saggio di embriotossicità con il riccio di mare *Paracentrotus lividus*, che ha confermato l'influenza della presenza di ammonio;
2. Su un secondo gruppo di circa 30 campioni di riserva (decongelati) resi disponibili da ARPAE sono state effettuate analisi di approfondimento applicando un metodo di elutriazione specifico (1:10 p/v) previsto in un nuovo protocollo ISPRA-SNPA in corso di definizione per l'applicazione della terza tipologia di saggio biologico indicata dall'Allegato;
3. Dopo la misura di ammonio totale e nitriti su tutti gli elutriati preparati da ISPRA sono state eseguite le prove con il saggio di embriotossicità di *Crassostrea gigas* sull'elutriato tal quale (al 100 %) e con diluizione al 50 %;
4. E' stato eseguito un ulteriore saggio della terza tipologia, il saggio cronico a 7 gg con *Acartia tonsa*, su 10 campioni, di cui alcuni in pool; inoltre, sono stati eseguiti i saggi di conferma con *Amphibalanus amphitrite* (a 24 e 48h) e con *Tigriopus fulvus* (a 24, 48 e 96h), saggi che rientrano tra quelli di seconda tipologia.
5. Sono stati confermati i valori soglia riportati in letteratura per l'accettabilità dei vari saggi riguardo le concentrazioni di ammonio e nitriti per le principali specie utilizzate (*C. gigas*, *A. amphitrite* e *A. tonsa*);
6. Sono stati elaborati i risultati delle possibili batterie mediante il criterio di integrazione ponderata e individuate le rispettive classi di qualità ambientale del materiale, facendo alcune ipotesi sotto il profilo tecnico-scientifico sulla possibile classificazione e gestione ambientalmente compatibile del materiale da dragare.

## Prime considerazioni sui risultati

Tutti i campioni di elutriato preparati con rapporto 1:10 ed analizzati con *C. gigas* alla diluizione del 50 % sono ritenuti idonei per l'esecuzione del saggio in termini di valori di ammonio e nitriti, essendo risultati con concentrazioni inferiori ai valori soglia di letteratura e già verificati ed adottati per i sedimenti del Porto di Ancona (4 mg/L per lo ione  $\text{NH}_4^+$  totale e < 0,1 mg/L per lo ione  $\text{NO}_2^-$ ; quest'ultimo valore in attesa di ulteriori prove di conferma). I risultati sono riportati in Tabella 1.

Considerato quindi che il saggio effettuato con *C. gigas* è rientrato nei parametri di accettabilità, l'effetto di tossicità misurato è stato integrato con i restanti saggi della batteria effettuati da ARPAE. I risultati della ecotossicità della batteria, combinati con quelli della chimica, secondo quanto previsto dall'Allegato, hanno condotto alla classificazione qualitativa di cui alla Tabella 2, che riporta anche la comparazione con la classificazione con la batteria composta solamente dai saggi delle prime due tipologie al fine di valutare il peso effettivo della terza tipologia di saggio nella classificazione ecotossicologica.

Nel 50 % dei campioni la comparazione della batteria a 3 specie con la batteria a 2 specie non comporta alcuna variazione di classe di pericolo ecotossicologico, mentre nel 30 % e nel 20 % dei casi si osservano delle differenze rispettivamente di una o due classi di qualità. A questi ultimi, in particolare, appartengono i campioni profondi delle carote 380, 384 e 387 per i quali l'elutriato continua a conservare livelli di  $\text{NH}_4^+$  prossimi ai valori di accettabilità e per i quali sono emerse alcune criticità anche sugli altri saggi della batteria (test di bioluminescenza in fase solida e saggio algale), non particolarmente sensibili ai composti azotati.

In Tabella 3 vengono riportati i contributi percentuali dei singoli saggi all'indice di pericolo ecotossicologico della batteria, in base ai quali *C. gigas* contribuisce mediamente del 53 % al pericolo ecotossicologico dei campioni con  $\text{HQ} > 1$ , seguito da *A. fischeri* e *P. tricorutum* con il 34 % e il 13 %, rispettivamente. Ciò riflette pienamente l'ordine di sensibilità generale dei tre saggi in questione.

Ulteriori prove con *A. amphitrite*, saggio noto per la sua minore sensibilità nei confronti di ammonio e nitriti, hanno confermato la parziale tossicità ancora rilevabile in diversi campioni, segno evidente della presenza di inquinanti diversi dai composti di ossidazione dell'ammoniaca. Indicazioni simili erano state ottenute anche in campioni di sedimenti ancora provenienti dal Porto di Ravenna e precedentemente analizzati da UNIVPM, dopo aver eseguito una procedura di rimozione chimica dell'ammonio: in alcuni campioni la tossicità continuava ad essere alta anche dopo l'abbattimento di questo composto, evidenziando che l'ammonio non è sempre l'unico o il principale fattore responsabile della tossicità e che i risultati ottenuti con *C. gigas* non sono esclusivamente riferibili ad una sua interferenza sull'esecuzione del saggio.

Su un numero più limitato di campioni è stato possibile testare anche *Acartia tonsa*, un altro saggio di "terza tipologia" incluso nell'Allegato Tecnico al DM 173/2016.

Il confronto tra i risultati ottenuti con queste due batterie conferma sostanzialmente l'idoneità delle prove con *C. gigas* per tutti i campioni analizzati.

Il dettaglio dei risultati delle diverse prove elencate è disponibile nel caso di ulteriori specifiche richieste.

Tabella 1 - risultati saggio di embriotossicità con *C. gigas* (elutriato 1:10 testato al 50 %)

Campioni			Codice campione	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (dil. 50 %)	50%					
					% Normoformati					% Malformati
					R1	R2	R3	MEDIA	DEV ST	Cor. Abbott
		C379-1	225	0,35	61	55	64	60,0	4,6	31,7
		C379-4	228	1,72	78	76	74	76,0	2,0	13,5
		C380-1	229	1,74	62	83	84	76,3	12,4	13,1
		C380-2	230	3,40	18	0	3	7,0	9,6	92,0
		C380-3	231	2,40	41	64	44	49,7	12,5	43,5
		C380-4	232	1,97	33	38	30	33,7	4,0	61,7
		C382-2	238*	-	57	48	56	53,7	4,9	38,9
	C382-4	C383-1	240/241	1,11	62	60	78	66,7	9,9	24,1
		C383-2	242	3,41	61	53	55	56,3	4,2	35,9
		C383-3	243	2,72	50	55	48	51,0	3,6	41,9
		C383-4	244	2,23	60	65	49	58,0	8,2	34,0
		C384-1	245	1,68	25	40	41	35,3	9,0	59,8
C384-2	C384-3	C384-4	246/247/248	2,56	42	40	11	31,0	17,3	64,7
	C385-1	C385-2	249/250	1,20	76	76	60	70,7	9,2	19,5
	C385-3	C385-4	251/252	3,15	32	43	27	34,0	8,2	61,3
	C387-1	C387-2	260/299	2,89	37	40	56	44,3	10,2	49,5
	C387-3	C387-4	261/262	2,64	7	6	0	4,3	3,8	95,1
		C388-1	263	0,06	48	67	66	60,3	10,7	31,3
		C388-3	265*	-	28	39	46	37,7	9,1	57,1
		C388-4	266	2,54	71	47	55	57,7	12,2	34,3
	C389-2	C389-3	268/269	2,94	60	67	70	65,7	5,1	25,2
		C390-1	270	0,77	71	60	72	67,7	6,7	23,0
			CTRL	<b>R1</b>	<b>R2</b>		<b>R3</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DEV ST</b>	
				88	85		90	87,8	3,0	
				<b>R4</b>	<b>R5</b>		<b>R6</b>			
				84	88		92			

Verdi: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> < 2.5 mg/l ; gialli: 2.5 < NH<sub>4</sub> < 3 mg/l); rossi: 3 < NH<sub>4</sub><sup>+</sup> < 4 (valore soglia considerato)

**Tabella 2 – Livello di pericolo chimico, ecotossicologico e Classe qualità ottenuta con la batteria di 3 saggi costituita da *P. tricornutum* (P), *A. fischeri* (V) e *C. gigas* (O, con elutriato 1:10, al 50%).**

Area	Campione	pelite (%)	Livello di pericolo chimico	Livello pericolo ecotossicologico		Classe qualità dei sedimenti	
				P-V-O	P-V	P-V-O	P-V
C379-1	8919000225	63,9	HQc(L2) <= Trascurabile	ASSENTE	ASSENTE	A	A
C379-4	8919000228	99,4	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	MEDIO	C	C
C380-1	8919000229	60,7	HQc(L2) <= Trascurabile	ASSENTE	ASSENTE	A	A
C380-2	8919000230	79,3	HQc(L2) <= Basso	ALTO	BASSO	D	B
C380-3	8919000231	79,9	HQc(L2) <= Trascurabile	ASSENTE	ASSENTE	A	A
C380-4	8919000232	94,2	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	ASSENTE	C	A
C382-2	8919000238	99,2	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	BASSO	C	B
C382-4	8919000240	94,1	HQc(L2) <= Trascurabile	ASSENTE	ASSENTE	A	A
C383-1	8919000241	87,1	HQc(L2) <= Trascurabile	ASSENTE	ASSENTE	A	A
C383-2	8919000242	96,1	HQc(L2) <= Basso	BASSO	ASSENTE	B	A
C383-3	8919000243	93,6	HQc(L1) >= Medio e HQc(L2) <= Basso	ASSENTE	ASSENTE	B	A
C383-4	8919000244	95,5	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	MEDIO	C	C
C384-1	8919000245	92,7	HQc(L1) >= Medio e HQc(L2) <= Basso	BASSO	ASSENTE	B	A
C384-2	8919000246	96,5	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	ASSENTE	C	A
C384-3	8919000247	98,4	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	ASSENTE	C	A
C384-4	8919000248	93,8	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	MEDIO	C	C
C385-1	8919000249	88,8	HQc(L2) <= Trascurabile	ASSENTE	ASSENTE	A	A
C385-2	8919000250	99,2	HQc(L1) >= Medio e HQc(L2) <= Basso	BASSO	ASSENTE	B	A
C385-3	8919000251	88,9	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	MEDIO	C	C
C385-4	8919000252	98,7	HQc(L2) <= Basso	ALTO	ALTO	D	D
C387-1	8919000299	92,9	HQc(L1) >= Medio e HQc(L2) <= Basso	BASSO	ASSENTE	B	A
C387-2	8919000260	98,7	HQc(L1) >= Medio e HQc(L2) <= Basso	BASSO	ASSENTE	B	A
C387-3	8919000261	99	HQc(L2) <= Basso	ALTO	BASSO	D	B
C387-4	8919000262	98,6	HQc(L2) <= Basso	ALTO	BASSO	D	B
C388-1	8919000263	88,6	HQc(L1) >= Medio e HQc(L2) <= Basso	BASSO	ASSENTE	B	A
C388-3	8919000265	98,7	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	MEDIO	C	C
C388-4	8919000266	99,6	HQc(L1) >= Medio e HQc(L2) <= Basso	BASSO	ASSENTE	B	A
C389-2	8919000268	99,5	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	BASSO	C	B
C389-3	8919000269	99,2	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	MEDIO	C	C
C390-1	8919000270	99	HQc(L2) <= Basso	MEDIO	MEDIO	C	C

**Tabella 3 – Livello di pericolo ecotossicologico della nuova batteria con i contributi percentuali dei singoli saggi**

Area	Campione	Specie	Contributo % HQ batteria	HQ batteria	Livello pericolo ecotossicologico
C379-1	8919000225	<i>C. gigas</i>	-	0,95	ASSENTE
		<i>P. tricornutum</i>	-		
		<i>V. fischeri</i>	-		
C379-4	8919000228	<i>C. gigas</i>	16	1,84	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	84		
C380-1	8919000229	<i>C. gigas</i>	-	0,12	ASSENTE
		<i>P. tricornutum</i>	-		
		<i>V. fischeri</i>	-		
C380-2	8919000230	<i>C. gigas</i>	69	3,31	ALTO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	31		
C380-3	8919000231	<i>C. gigas</i>	-	0,79	ASSENTE
		<i>P. tricornutum</i>	-		
		<i>V. fischeri</i>	-		
C380-4	8919000232	<i>C. gigas</i>	64	2,26	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	3		
		<i>V. fischeri</i>	34		
C382-2	8919000238	<i>C. gigas</i>	47	1,84	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	53		
C382-4	8919000240	<i>C. gigas</i>	-	0,7	ASSENTE
		<i>P. tricornutum</i>	-		
		<i>V. fischeri</i>	-		
C383-1	8919000241	<i>C. gigas</i>	-	0,44	ASSENTE
		<i>P. tricornutum</i>	-		
		<i>V. fischeri</i>	-		
C383-2	8919000242	<i>C. gigas</i>	51	1,47	BASSO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	49		
C383-3	8919000243	<i>C. gigas</i>	-	0,96	ASSENTE
		<i>P. tricornutum</i>	-		
		<i>V. fischeri</i>	-		
C383-4	8919000244	<i>C. gigas</i>	38	2,04	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	62		
C384-1	8919000245	<i>C. gigas</i>	100	1,15	BASSO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	0		
C384-2	8919000246	<i>C. gigas</i>	65	2,33	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	35		
C384-3	8919000247	<i>C. gigas</i>	67	2,23	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	33		
C384-4	8919000248	<i>C. gigas</i>	54	2,95	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	46		

C385-1	8919000249	<i>C. gigas</i>	-	0,82	ASSENTE
		<i>P. tricornutum</i>	-		
		<i>V. fischeri</i>	-		
C385-2	8919000250	<i>C. gigas</i>	34	1,07	BASSO
		<i>P. tricornutum</i>	36		
		<i>V. fischeri</i>	29		
C385-3	8919000251	<i>C. gigas</i>	52	2,9	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	5		
		<i>V. fischeri</i>	43		
C385-4	8919000252	<i>C. gigas</i>	40	3,94	ALTO
		<i>P. tricornutum</i>	13		
		<i>V. fischeri</i>	47		
C387-1	8919000299	<i>C. gigas</i>	70	1,46	BASSO
		<i>P. tricornutum</i>	30		
		<i>V. fischeri</i>	0		
C387-2	8919000260	<i>C. gigas</i>	69	1,49	BASSO
		<i>P. tricornutum</i>	29		
		<i>V. fischeri</i>	2		
C387-3	8919000261	<i>C. gigas</i>	68	3,51	ALTO
		<i>P. tricornutum</i>	0		
		<i>V. fischeri</i>	32		
C387-4	8919000262	<i>C. gigas</i>	70	3,42	ALTO
		<i>P. tricornutum</i>	1		
		<i>V. fischeri</i>	29		
C388-1	8919000263	<i>C. gigas</i>	48	1,33	BASSO
		<i>P. tricornutum</i>	52		
		<i>V. fischeri</i>	0		
C388-3	8919000265	<i>C. gigas</i>	50	2,79	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	18		
		<i>V. fischeri</i>	32		
C388-4	8919000266	<i>C. gigas</i>	60	1,08	BASSO
		<i>P. tricornutum</i>	36		
		<i>V. fischeri</i>	4		
C389-2	8919000268	<i>C. gigas</i>	35	1,53	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	29		
		<i>V. fischeri</i>	37		
C389-3	8919000269	<i>C. gigas</i>	32	1,72	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	26		
		<i>V. fischeri</i>	42		
C390-1	8919000270	<i>C. gigas</i>	29	1,73	MEDIO
		<i>P. tricornutum</i>	24		
		<i>V. fischeri</i>	47		

## Considerazioni finali

L'anomala presenza di composti azotati nei campioni in esame, in particolare di ammonio, supera i valori soglia riportati nei protocolli internazionali di analisi per il saggio di embriotossicità con *C. gigas* (ASTM 2002), rendendo inapplicabile l'esecuzione del saggio nelle condizioni indicate dall'Allegato.

In attesa di completare la predisposizione di un protocollo esecutivo che disciplini nel dettaglio le modalità operative di preparazione ed analisi di elutriati con analoghe criticità, considerata anche l'assenza o il modesto livello di pericolo chimico dei campioni in esame e la loro collocazione al di fuori dell'area portuale (a diversi km di distanza dalla costa) in assenza di fonti rilevabili di contaminazione, qualora non sia possibile ripetere il campionamento e le analisi ecotossicologiche con una batteria di saggi che soddisfi pienamente i requisiti previsti dai rispettivi protocolli e fatta salva ogni verifica del percorso giuridico-amministrativo sul quale gli istituti scientifici non hanno competenza, viene di seguito formulata una ipotesi di percorso gestionale ambientalmente compatibile sotto il profilo tecnico-scientifico:

- A. Definire la classificazione dei sedimenti oggetto del presente approfondimento sulla base della batteria costituita da tre saggi, incluso quello di terza tipologia (ovvero l'ostrica *C. gigas*) condotto secondo la metodologia proposta (elutriato 1:10 pf/v ed eventuale diluizione al 50 % per rientrare nei parametri di accettabilità della prova per le concentrazioni di ammonio).
- B. Definire la classificazione dei sedimenti oggetto del presente approfondimento considerando la batteria composta da due saggi, ovvero quelli di prima e seconda tipologia.
- C. Per i sedimenti per i quali le classificazioni ottenute con le due batterie di cui ai punti A e B risultino concordi o comunque la classificazione di cui al punto A non risulti peggiorativa, utilizzare la classificazione dei sedimenti ottenuta con la batteria a tre saggi e di procedere secondo le opzioni gestionali previste dall'Allegato.
- D. Per i sedimenti per i quali le classificazioni ottenute con le due batterie di cui ai punti A e B risultino non concordi, ed in particolare la classificazione di cui al punto A risulti peggiorativa, considerato che la metodologia utilizzata per la conduzione del saggio della terza tipologia è ancora in via di sperimentazione (quaderno SNPA in corso di definizione), è necessario individuare un ulteriore livello di controllo ante opera o in corso d'opera, come parte integrante delle attività di monitoraggio ambientale riguardante il sito autorizzato di immersione in mare.

Al fine di ottimizzare la gestione definitiva del materiale da dragare, comprensiva delle tolleranze previste al paragrafo 2.2.1 e Fig.5 dell'Allegato, è opportuno eseguire una rappresentazione grafica del fondale lungo il canale, con le rispettive classificazioni applicate ai diversi livelli di sedimento, a partire dalla quota di dragaggio.

Si fa presente infine che, considerata l'attualità e l'approfondimento tecnico-scientifico della problematica trattata, il presente documento tecnico sarà sottoposto all'attenzione dell'Osservatorio Esperto al DM173/16, come contributo alla risoluzione delle criticità in corso di discussione.

*Hanno contribuito alla stesura del presente report:*

### **Per ISPRA**

*David Pellegrini*

*Davide Sartori*

*Stefano Ferrari*

*Cristian Mugnai*

*Fulvio Onorati*

*Lorenzo Morroni  
Valentina Vitiello  
Isabella Buttino*

**Per UNIVPM**

*D'Errico Giuseppe  
Francesco Regoli*

**Per IAS-CNR**

*Veronica Piazza  
Marco Faimali*