

Report:

VALUTAZIONE ECO-TOSSICOLOGICA DELLE ACQUE ORIGINATE DA “IMPIANTO LIMENET” DI AUGUSTA

In accordo con le finalità operative, in data 17 aprile 2025, sono stati trasferiti dalla Limenet S.r.L Società Benefit, presso l’Istituto per le Risorse Biologiche e Biotecnologie Marine (IRBIM)-CNR sede di Messina un totale di dieci (10) campionature di acqua trattata dall’impianto sperimentale presente presso il porto di Augusta. Caratteristiche e le quantità dei campioni (**Figura 1**) sono riportanti in **Tabella 1**. I campioni, una volta arrivati in laboratorio, sono stati conservati a $10\pm 1^{\circ}\text{C}$ in attesa di essere analizzati.



Figura 1 – Fotografia di alcuni dei bidoni contenenti campioni di acqua in studio presso l’IRBIM-CNR Sede di Messina.

Nome Campione	Limenet	%	pH	Temp. (°C)	Volume (~ L)
Acqua di Mare			8,11	19,8	20
30 Mare			8,11	19,4	30
19,34 Mare	0,66	3,3	8,21	19,8	20
29,01 Mare	0,99	3,3	8,26	19,6	30
18,66 Mare	1,34	6,7	8,33	19,7	20
28 Mare	2	6,7	8,29	19,5	30
46 Mare	4	13,3	8,39	19,4	30
17,34 Mare	2,66	13,3	8,33	19,5	20
22,11 Mare	7,89	26,3	8,18	19,7	30
14,74 Mare	5,26	26,3	8,16	19,6	20

Tabella 1 – Lista e caratteristica dei campioni sperimentali in analisi in questo studio.

Messina

Sede Principale
Via S. Raineri, 86
98122 - Messina, IT
+39 090 6015411
C.F. 80054330586 - P.IVA 02118311006
www.irbim.cnr.it
protocollo.irbim@pec.cnr.it

Ancona

Largo Fiera della Pesca, 2
60125 - Ancona, IT
+39 071 2078826

Mazara del Vallo

Via Vaccara, 61
91026 - Mazara del Vallo, IT
+39 0923 948966

Lesina

Via Pola, 4
71010 - Lesina, IT
+39 0882 992702

Al fine di valutare un'eventuale tossicità delle acque in analisi sono state programmate una serie di analisi ecotossicologiche applicando una batteria di saggi (bioluminescenza batterica, mortalità e vitalità di crostacei, crescita micro-algale e spermio-tossicità di mitili su fase liquida) tale da poter determinare l'impatto, se presente, delle acque marine dopo trattamento con il sistema sperimentale Limenet sulla catena trofica marina. Al fine di avere una visione d'insieme più accurata sono state realizzate analisi di acque seguito differenti livelli di trattamento.

1. MATERIALI E METODI

1.1 Preparazione dei campioni in studio

I campioni di acqua, prima di essere sottoposti alle analisi eco-tossicologiche, sono stati riportati a temperatura ambiente. Dopo circa un'ora, le acque sottoposte allo stesso trattamento ma presenti in contenitori differenti, sono state unificate tale da avere campioni i più omogenei possibili.

1.2 Test di bioluminescenza batterica (MicroTox)

Il test di tossicità acuta su *Vibrio fischeri* è stato condotto seguendo il metodo descritto nella linea guida UNI EN ISO 11348-3.

Il saggio si basa sulla capacità di questo batterio marino di essere bioluminescente in condizioni ottimali. Una diminuzione della luce emessa è quindi attribuibile ad effetti tossici del campione testato. In queste prove preliminari è stato utilizzato il sistema automatizzato Microtox® Model 500 (M500; Alco Automation Pte Ltd) con batteri congelati di *Vibrio fischeri* ceppo NRRL-B-11177 (conservati a $-20\pm 1^\circ\text{C}$).

Il test è stato realizzato esponendo un'aliquota di batteri ai campioni (acque di trattamento) in studio. Al fine di valutare la reale tossicità delle matrici in uscita dagli impianti di trattamento non sono state realizzate delle diluizioni dei campioni stessi; pertanto si è valutata la possibile tossicità delle matrici in studio alla massima e reale concentrazione.

All'inizio di ogni saggio, i batteri congelati sono stati riattivati aggiungendo 1000 μL di una specifica soluzione ricostituente e lasciandoli incubare a temperatura di $5\pm 1^\circ\text{C}$ per 40 minuti. Al termine del periodo di incubazione la sospensione batterica ricostituita è stata diluita in opportuna soluzione (150 μL di reagente di sperimentazione in 1350 μL di diluente Microtox® SPT).

Trascorsi 20 minuti dalla preparazione del reagente diluito, ad ogni tubo è stata aggiunta un'aliquota pari a 100 μL di sospensione batterica (tale da presentare una quantità di cellule microbiche pari a circa 10^6 cell mL^{-1}). I tubi vengono incubati a $15\pm 1^\circ\text{C}$ per 20 minuti e la luminescenza è stata misurata dopo un periodo di acclimatemento di 10 minuti nei pozzetti di incubazione. L'inibizione della bioluminescenza è stata analizzata effettuando misure di emissione luminosa dopo l'esposizione dei batteri per 15 e 30 minuti al campione da analizzare, confrontandola con quella dei batteri esposti al controllo negativo (rappresentata solo dall'acqua di mare senza trattamento).

1.3 Test Tossicità Acuta con *Artemia salina*

Il saggio di tossicità acuta realizzato con *Artemia salina* è stato realizzato secondo indicazioni ufficiali (protocollo APAT IRSA-CNR, 2003).

La riattivazione delle cisti è stata realizzata circa 48 ore prima dell'inizio del saggio. A tal fine, una quantità di cisti pari a circa 100 mg, sono state versate in una piastra Petri (\emptyset , 9 cm) in cui sono stati aggiunti 20 ml di una soluzione marina (sterile) opportunamente preparata (NaCl, 26,4 g; KCl, 0,84 g; $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 1,67 g; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 4,6g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 5,58 g; NaHCO_3 , 0,17 g; HBO_3 , 0,03 g per litro, pH=7.8). Le cisti sono state incubate in presenza di luce (3.000-4.000 lux) per circa un (1) ora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Successivamente le cisti sono state incubate al buio ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) per 24 ore. Dopo il periodo d'incubazione, le larve schiuse (naupli) sono state trasferite in una nuova piastra Petri riempita con 20 mL di soluzione marina (sterile) ed incubate, ulteriormente, per 24 ore.

Alla fine del periodo di incubazione e la riattivazione delle cisti, le forme giovanili di *Artemia salina* (in numero di 10 naupli allo stadio larvale) sono state utilizzate per realizzare due prove. La prima prova è stata realizzata trasferendo in piastre dal diametro di 9 cm gli organismi riempite con 20 mL delle differenti soluzioni in studio. La seconda prova gli organismi sono stati trasferiti in beaker dalla capacità volumetrica di 50 mL riempiti con le differenti soluzioni in studio (volume sperimentale 40 mL). Per entrambe le prove in oggetto, ciascuna concentrazione è stata saggiata in doppio.

Sia le piastre petri che i beaker sono stati chiusi con parafilm e tenuti alla temperatura costante di $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un ciclo di illuminazione di 14:10 luce:buio. Ogni 24 ore dall'inizio del periodo di incubazione, gli organismi presenti nei sistemi sono stati esaminati per valutarne la vitalità (% di organismi vivi e morti). Tutti gli organismi che risultavano immobili per più di 10 secondi sotto il campo di osservazione del microscopio sono stati considerati come morti.

1.4 Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

La metodica del saggio algale è stata aggiornata nella norma UNI ISO 10253 (2006) che prevede l'utilizzo di *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

Il principio del test consiste nell'esporre una coltura algale pura in fase di crescita esponenziale per diverse generazioni a concentrazioni note di campione, in condizioni fisico-chimiche standardizzate e con un definito e omogeneo apporto di nutrienti. Al termine del periodo d'incubazione viene confrontata la crescita algale nel campione con quella del controllo (acqua di mare senza trattamento).

Le colture cellulari madri sono state mantenute in opportuno mezzo di crescita con periodici rinnovi per mantenere (le stesse) nella fase di crescita esponenziale. A partire dalla coltura madre, una pre-coltura con una densità cellulare compresa tra 2×10^3 e 10^4 cellule mL^{-1} è stata preparata 2 - 4 giorni prima dell'inizio del test ed incubata alle stesse condizioni previste per il test. La densità cellulare raggiunta dalla pre-coltura è stata poi valutata immediatamente prima dell'utilizzo, per la preparazione della coltura di inoculo a densità cellulare definita.

Un'aliquota della coltura di inoculo è stata quindi addizionata alle acque in studio insieme ad una appropriata quantità di mezzo di coltura concentrato. La soluzione così ottenuta, presentava una densità cellulare di circa 8×10^3 mL^{-1} . Le cellule così preparate sono state distribuite (in doppio) in piastre monouso sterili a 6 pozzetti ed incubate per 72 ore a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con regime di illuminazione continua (luce bianca) con una intensità compresa tra 7.000-8.000 lux.

Acqua di mare naturale senza trattamento (campioni indicati come "Acqua di Mare", Tabella 1), è stata utilizzata come controllo negativo. Parallelamente, un controllo positivo, ad alta tossicità, è stato effettuato utilizzando bicromato di potassio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) in quanto stabilito matrice tossica di riferimento per controllare la procedura e la sensibilità del test. Al termine del prefissato periodo di incubazione è stata determinata la crescita algale di ogni replicato, attraverso letture al microscopio ottico [Axioplan 2 Imaging (Zeiss) microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)].

1.5 Test di spermiotossica di *Mytilus galloprovincialis*

Esemplari di *Mytilus galloprovincialis* sono acquistati presso un rivenditore autorizzato e trasportati in laboratorio a secco, avvolti in un panno umido, all'interno di un contenitore termico.

Successivamente i molluschi sono stati puliti dal detrito e dagli organismi epibionti (mediante raschiatura manuale della conchiglia), sciacquati rapidamente sotto acqua corrente e stabulati per 5 giorni presso il "Laboratorio/Impianto Mesocosmi" dell'IRBIM-CNR di Messina (vasche dalla capacità volumetrica di 100 litri con flusso di acqua in continuo, temperatura di $19 \pm 1^\circ\text{C}$).

Dopo il periodo di stabulazioni i riproduttori di *Mytilus galloprovincialis* (10 organismi) sono stati posti nelle vasche sperimentali (capacità volumetrica di 25 litri) riempite con le differenti acque in studio. Ogni vasca è stata dotata di un sistema di aereazione indipendente. Dopo 3 giorni di condizionamento nei sistemi sperimentali, sono stati indotti all'emissione di gameti applicando un protocollo di stimolazione termica.

Gli individui sono stati posti a secco alla temperatura di 4°C per 3-4 ore e successivamente sono stati trasferiti in vasche tipo acquario (dalla capacità volumetrica di 5 litri) contenente le

differenti acque in studio alla temperatura sperimentale di $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ (riscaldata utilizzando due riscaldatori elettrici ed un aeratore per favorirne il movimento). Dal momento in cui la quasi totalità degli organismi ha aperto le valve e ha ripreso la filtrazione si sono attesi 30 minuti; dopo questo periodo, gli organismi, sono stati trasferiti in ulteriori vasche (dalla capacità volumetrica di 5 litri) contenenti sempre le acque sperimentali in studio alla temperatura di $18\pm 1^{\circ}\text{C}$. Gli organismi produttori sono stati prontamente rimossi per essere posti singolarmente in becker da 250 ml contenenti 200 ml di acqua sperimentale. Successivamente sono stati preparati 100 ml complessivi di soluzione di spermi, ottenuti da almeno due maschi diversi, ed è stata osservata la mobilità dei gameti maschili al microscopio ottico.

2. RISULTATI

2.1 Test di bioluminescenza batterica (MicroTox)

Analisi di possibile tossicità delle acque trattate con il sistema Limenet sono state realizzate valutando il test di bioluminescenza batterica (MicroTox). Inoculi del batterio *V. fischeri* sono stati incubati, in accordo con la metodologia di riferimento, per 15 e 30 minuti con le matrici in studio. Come evidenziato in **Tabella 2**, la valutazione della riduzione di luminosità (indice di tossicità) non ha per nessuno delle acque sperimentali (sottoposte a differenti trattamenti) in studio.

Ecotossicità con <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox)							
ID campione	Composizione	Descrizione campione	Tipo di matrice	EC50 15'	EC50 30'	% effetto campione TOTO a 15'	% effetto campione TOTO a 30'
1	SW	liquido	liquido	>100	>100	no	no
2	3.3	liquido	liquido	>100	>100	no	no
3	6.7	liquido	liquido	>100	>100	no	no
4	13.3	liquido	liquido	>100	>100	no	no
5	26.3	liquido	liquido	>100	>100	no	no
Metodica		UNI EN ISO 11348-3:2019					

Tabella 2 – Risultati della tossicità di *V. fischeri* durante esposizione (15 e 30 minuti) delle acque trattate a differente concentrazione (3.3, 6.7, 13.3 e 26.3) con il sistema Limenet; il controllo negativo è stato realizzato utilizzando campionature di acqua non trattata (SW).

2.2 Test Tossicità Acuta con *Artemia salina*

Dati grezzi del test di tossicità acuta realizzata con il crostaceo *A. salina* sono illustrati in **Tabella 3 e Figura 3**. Come indicato nella sezione “Materiali e Metodi”, dopo opportuna preparazione gli organismi sono stati esposti (per 24, 48 e 72 ore) ad acqua trattata con differente concentrazione di prodotto Limenet in due differenti prove sperimentali (**Figure 4 e Figura 5**). In nessuna delle sperimentazioni realizzate sono state osservate particolari variazioni, intese come aumento dell'indice di mortalità, nei differenti tempi sperimentali (**Figura 3**).

	SW			3,3			6,7			13,3			26,3		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
I prova	10	10	10	10	10	10	10	9	9	10	10	10	10	10	10
II prova	10	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9

Tabella 3 – Risultati grezzi della vitalità/mortalità del crostaceo *A. salina* durante l'esposizione (per 24, 48 e 72 ore) alle

differenti acque trattate con il sistema Limenet. il controllo negativo è stato realizzato utilizzando campionature di acqua non trattata (SW). Prova I realizzata di piastre petri; Prova II realizzata in baeker.

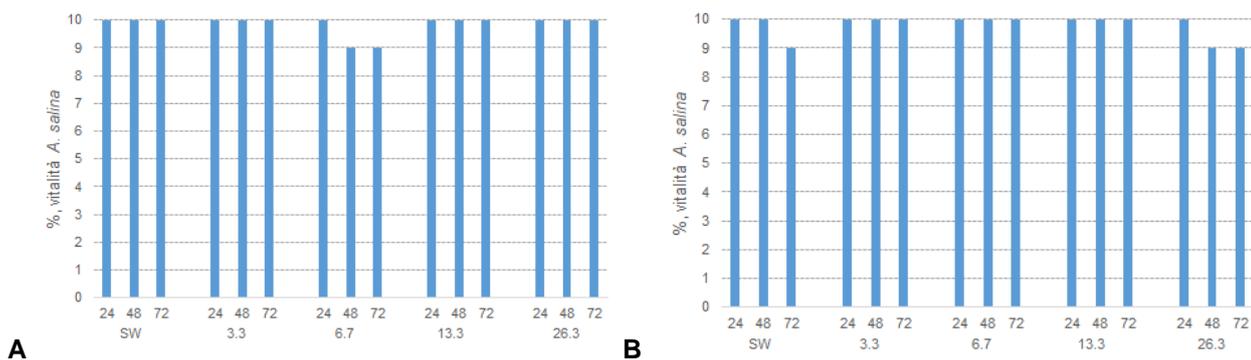


Figura 3 – Risultati grezzi della prima (A; realizzata in piastre Petri) e seconda (B; realizzata in baeker) sperimentazione relativa alla vitalità/mortalità del crostaceo *A. salina* durante l’esposizione (per 24, 48 e 72 ore) alle differenti acque trattate con il sistema Limenet. Dati espressi come percentuale assoluta. il controllo negativo è stato realizzato utilizzando campionature di acqua non trattata (SW).

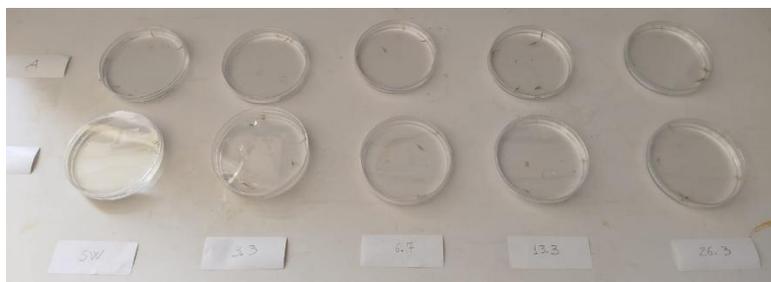


Figura 4 – Immagine dei sistemi sperimentali realizzati durante l’esecuzione della “I Prova” per osservazione dell’indice di vitalità/mortalità del crostaceo *A. salina* esposto alle acque in analisi.



Figure 5 – Immagine dei sistemi sperimentali realizzati durante l’esecuzione della “II Prova” per osservazione dell’indice di vitalità/mortalità del crostaceo *A. salina* esposto alle acque in analisi.

2.3 Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

Valutazione della crescita della diatomea *Phaeodactylum tricornutum* è stata osservata tramite coltivazione in terreno minerale addizionato con le acque sperimentali in studio. Inoculi iniziali

(concentrazione cellulare di circa 8×10^3 cellule mL^{-1}) sono stati incubati in piastre multi-pozzetto per 72 ore a condizioni controllate. Dopo il periodo di incubazione è stato possibile osservare per tutte le sperimentazioni in studio un incremento cellulare costante di circa 1 unità logaritmica (**Figura 6**). Tale incremento è stato uniforme sia nella sperimentazione di controllo (realizzata con l'acqua di mare non trattata) che nelle sperimentazioni con l'acqua sottoposta a differenti trattamenti.

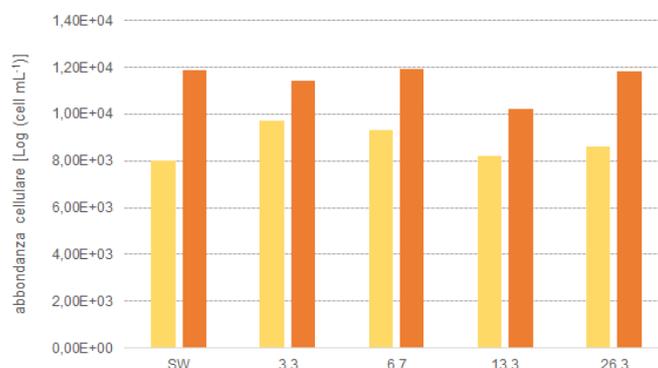


Figura 6 – Valutazione della crescita *Phaeodactylum tricornutum* durante le prove di esposizione alle acque sperimentali.

2.4 Tesi di spermiotossica di *Mytilus galloprovincialis*

A seguito dell'esposizione degli esemplari di mitili (*Mytilus galloprovincialis*; cozza comune) alle acque sperimentali in studio è stata valutato l'eventuale effetto tossico delle spesse tramite valutazione della mobilità dei gameti maschili (sperma). In tutte le condizioni osservate la mobilità spermatica non risultava alterata mantenendosi simile a quella presente nella sperimentazione di controllo (acqua di mare non trattata). Un valore del 100% di mobilità spermatica è stato attribuito a tutte le condizioni sperimentali.

3. DISCUSSIONI e CONCLUSIONI

Risultati ottenuti dalle prove eco-tossicologiche realizzate in questo studio non hanno rilevato un'apparente tossicità delle acque trattate con la metodologia Limenet. Così come dà indicazioni dei protocolli dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) i test eco-tossicologici sono stati sviluppati su di una batteria di organismi target dal differente livello evolutivo (batteri, crostacei, micro-alghe e mitili). Per nessuno dei saggi di tossicità cronica realizzati in accordo con i protocolli ufficiali, è stata osservata una forma di tossicità o di inibizione totale o parziale verso gli organismi o i gameti in studio. I dati ottenuti dalle acque sottoposte a trattamento Limenet hanno presentato lo stesso comportamento di campionature di acqua non trattata che è servita come controllo negativo escludendo, pertanto, una tossicità della stessa verso gli organismi bioindicatori in uso.

Possibili sviluppi della ricerca potrebbero essere orientati alla realizzazione di una serie di test molecolari ed immunoistochimici atti a valutare l'eventuale risposta genetica di organismi scelti esposti alle acque dopo trattamento.

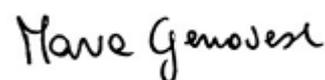
Messina, 30 maggio 2025

Dott. Simone Cappello



Ricercatore, IRBIM-CNR Sede di Messina

Dott.ssa Maria Genovese



Ricercatore, IRBIM-CNR Sede di Messina