

MONITORAGGIO *Corso Opera*

Il Anno di Attività

Report Risultati – Metodologie



2020/21

GRUPPO DI LAVORO

Stazione Zoologica "Anton Dohrn"

Relazione effettuata con il contributo di:

Maria Abagnale, Martina Austoni, Daniele Bellardini, Angela Buondonno, Valerio Caruso, Fabio Conversano, Iole Di Capua, Marco Cannavacciuolo, Sarah Ciancimino, Daniela Cianelli, Francesco Di Nuzzo, Paolo Fasciglione, Miriam Ferretti, Sara Fioretti, Giulio Franzitta, Marta Furia, Roberto Gallia, Rosanna Guglielmo, Francesca Margiotta, Andrea Montalbano, Augusto Passarelli, Isabella Percopo, Vincenzo Rando, Eugenio Rastelli, Francesco Riccio, Maria Saggiomo, Maria Beatrice Scipione, Diana Sarno, Francesco Terlizzi, Ferdinando Tramontano

In collaborazione con

Università degli Studi di Napoli Parthenope

Vincenzo Pasquale

Università Politecnica delle Marche

Daniele Fattorini, Giuseppe d'Errico, Marta Di Carlo, Francesco Regoli

Bioscience Research Center BSRC

Monia Renzi

Sommario

Premessa	1
1.1. Colonna d'acqua	3
1.1.1 <i>Analisi dei dati CTD e campionamento colonna d'acqua</i>	3
1.1.2 <i>Analisi per la caratterizzazione chimica</i>	3
1.1.3 <i>Analisi per la caratterizzazione biologica</i>	7
1.1.4 <i>Acquisizione in continuo da boe oceanografiche</i>	9
1.2. Sedimenti	11
1.2.1 <i>Campionamento</i>	11
1.2.2 <i>Analisi per la caratterizzazione fisica</i>	13
1.2.3 <i>Analisi per la caratterizzazione chimica</i>	14
1.2.4 <i>Analisi ecotossicologiche</i>	20
1.2.5 <i>Applicazione dei criteri di integrazione ponderata per l'elaborazione dei dati chimici ed ecotossicologici e la valutazione della classe di qualità</i>	24
1.2.6 <i>Analisi microbiologiche</i>	31
1.2.7 <i>Analisi del Biota</i>	35
1.3. Biota	39
1.3.1 <i>Bioaccumulo di contaminanti organici e inorganici in mitili trapiantati (Mussel Watch)</i>	39
1.3.2 <i>Analisi di biomarker</i>	44
1.3.3 <i>Criteri di integrazione ponderata per l'elaborazione dei dati di bioaccumulo e dei biomarker nei mitili trapiantati</i>	49
1.4. Monitoraggio satellitare	53

Premessa

L'obiettivo primario del piano di monitoraggio in *Corso d'Opera* è quello di definire gli eventuali impatti sugli ecosistemi marini in relazione all'attività di dragaggio e all'immersione a mare dei sedimenti del Porto commerciale di Salerno e nel Canale d'Ingresso. Il monitoraggio in oggetto ha anche il compito di valutare se il trasporto verso l'area di immersione è condotto secondo le procedure convenute, minimizzando così l'impatto sull'ecosistema pelagico e bentonico. L'affidamento formale dell'incarico alla Stazione Zoologica A. Dohrn (SZN) per il monitoraggio in fieri è stato contestuale all'inizio delle operazioni di escavo. La complessità dell'organizzazione logistica delle operazioni previste non ha permesso alla SZN di iniziare l'attività di monitoraggio prima della metà di febbraio e in particolare cui l'acquisto e l'installazione di due sistemi di monitoraggio in continuo della torbidità all'esterno dell'area portuale. Di contro, come ampiamente riportato all'interno di questa relazione, già dallo 01/01/2020 è stato avviato il monitoraggio satellitare ad alta risoluzione della torbidità in termini di solidi totali sospesi (TSM) e delle biomasse fitoplanctoniche (Chl α). Alla luce di quanto sopra e per fare fronte a queste difficoltà, l'Autorità Portuale di Salerno si è fatta carico, con il supporto scientifico della SZN, di approntare i due sistemi di monitoraggio in continuo della torbidità della direzione e velocità della corrente (boe equipaggiate con torbidimetro e correntometro ADCP, stazione meteo e telecamera), all'imboccatura del porto (Figura 1). I due sistemi di monitoraggio in continuo sono stati resi operativi il 30/01/2020 la Boa 1, il 12/02/2020 la Boa 2 e dal 1/12/2020 la Boa 3 "Li Galli", infine è stato installato il Torbidimetro T01 "faro rosso"- collocato in testata del molo sottoflutto ad una profondità di circa 1.5m, è costituito da un torbidimetro *Turner Designs Torbidimetro Turbidity Plus*, completo di dispositivo wiper per pulizia meccanica dell'ottica per protezione da biofouling, range 0-3000 NTU, collegato tramite cavo subacqueo ad un sistema di gestione, acquisizione e invio dati basato su piattaforma Arduino. È programmato per fare 5 letture ogni 5 secondi con intervalli di 30 minuti. Il sistema è stato reso operativo il 27 novembre 2020.

Tabella 1. Coordinate e profondità fondale dei 4 sistemi di monitoraggio

SISTEMI	Latitudine N	Longitudine E	Fondale m
BOA1	40° 39.990' N	14° 44.037' E	10
BOA2	40° 39.657' N	14° 44.750' E	14
BOA3	40° 35.000' N	14° 25.928' E	20
Torbidimetro	40° 39.994' N	14° 44.811' E	1.5

Questa operazione è di grande utilità perché permette di monitorare, in *real-time*, la torbidità, potenzialmente indotta dall'attività di escavo sia nell'area portuale che nel canale d'ingresso, e permette di misurare la direzione e la velocità della corrente dalla superficie al fondo contestualmente ai dati meteorologici. Le boe, attrezzate per effettuare il monitoraggio in continuo, sono state dotate di un sistema di *early warning* che invia segnale ai centri di controllo in caso di superamento del limite soglia della torbidità determinato, in collaborazione con ARPAC, sulla base dei risultati delle campagne di monitoraggio *ante operam*. Il superamento dei livelli soglia prevede il blocco delle attività di dragaggio. La gestione e la manutenzione delle stazioni di monitoraggio in continuo all'imboccatura del Porto è stata affidata alla Stazione Zoologica A. Dohrn anche per il periodo di tempo intercorrente tra la fine della prima fase dei lavori di dragaggio e l'inizio della seconda fase, sia per la necessità garantire la perfetta efficienza della strumentazione installata sia in quanto detta attività di monitoraggio è connessa ai lavori di modifica dell'imboccatura del Porto Commerciale di Salerno. Per questo specifico aspetto, si ritiene utile far presente che il modello di dispersione dei sedimenti, realizzato sempre dalla SZN nell'attività preliminare all'operazione di escavo, esclude la possibilità d'impatto dall'operazione di escavo e di immersione a mare dei sedimenti dragati sugli ecosistemi delle due AMP. Si consideri che le due AMP di Punta Licosa e Punta Campanella distano, dal centro del quadrilatero dell'area di immersione dei sedimenti dragati, 19,5 e 17,5 nm (miglia nautiche) rispettivamente, e di 25,5 e 20,0 nm dall'area di dragaggio, rispettivamente.

Questa relazione riporta il quadro dei risultati del monitoraggio svolto indirizzato a valutare l'impatto delle attività di dragaggio e immersione a mare dei sedimenti del Porto di Salerno e del suo Canale d'ingresso sugli ecosistemi marini. I risultati analitici delle attività svolte, benché il piano di monitoraggio non sia stato attuato nella piena rispondenza di quanto approvato dagli organi di controllo per una serie di problematiche di tipo amministrativo e gestionale e con le difficoltà di inizio del periodo Covid, permettono di valutare gli eventuali impatti sugli ecosistemi marini costieri e di largo nel rispetto degli obiettivi del piano di monitoraggio.



Figura 1. Posizionamento e distanza delle due boe nelle due AMP di Punta Campanella e Punta Licosa rispetto al sito di dragaggio (Porto commerciale di Salerno e canale d'ingresso) e a quello di immersione (A22).

1.1. Colonna d'acqua

1.1.1 Analisi dei dati CTD e campionamento colonna d'acqua

I dati acquisiti durante la campagna in *corso opera* sono stati elaborati secondo procedure oceanografiche standard, convertiti in unità fisiche e, infine, mediati ad un metro di profondità utilizzando un *software* specifico *Data Processing WIN 32* della *SeaBird*. Sono state realizzate rappresentazioni grafiche che permettono di visualizzare la distribuzione delle grandezze idrologiche su sezioni verticali e su planimetrie orizzontali nelle aree di campionamento mediante il programma *Ocean Data View (ODV)* (www.odv.awi.de). Per la raccolta dei campioni d'acqua è stato utilizzato un campionatore di tipo ROSETTE con dodici bottiglie NISKIN da 10 litri ciascuna, interfacciato al sistema CTD e collegato al computer di bordo per la visione in *real time* del profilo e per la chiusura *ad hoc* delle bottiglie alle quote previste dal piano di monitoraggio.

1.1.2 Analisi per la caratterizzazione chimica

1.1.1.1 Nutrienti

I campioni di nutrienti inorganici sono stati conservati a -20°C e scongelati in bagno termostato a 37°C al momento delle analisi. La determinazione delle concentrazioni dei nutrienti inorganici è stata effettuata con un analizzatore a flusso continuo *Flow-Sys Systema* (Figura 2). Le analisi sono state eseguite utilizzando le metodiche riportate in Saggiomo et al., 2010. Lo strumento è equipaggiato con cinque canali per determinazione simultanea di ammoniaca (NH_4), nitriti (NO_2), nitrati (NO_3), ortofosfati (PO_4) e silicati (SiO_4) ed è interfacciato con un PC che utilizza il *software* *SYSLYZER*.



Figura 2. Analizzatore a flusso continuo *Flow-Sys Systema*.

In tabella 2 sono riportati i limiti di rilevabilità dello strumento.

Tabella 2. Limiti di rilevabilità per i nutrienti inorganici.

	Limite di rilevabilità (mmoli m ⁻³)
NH₄	0.05
NO₂	0.01
NO₃	0.01
PO₄	0.01
SiO₄	0.1

Per quanto riguarda la determinazione dell'Azoto e del Fosfato totali (disciolti), si è proceduto ad una prima fase di ossidazione, mediante digestione con perossidosolfato, in autoclave a temperatura e pressione elevata. Al termine della fase di ossidazione tutto l'azoto contenuto nel campione è convertito in nitrato ed il fosforo in ortofosfato. In una seconda fase, si è proceduto con la determinazione di questi analiti come riportato per i nutrienti inorganici. La metodica utilizzata è riportata in Cozzi et al., 2010. Le concentrazioni di Azoto Organico Disciolto (DOC) e Fosforo Organico Disciolto (DOP) sono state calcolate per differenza tra la frazione totale e quella inorganica.

1.1.1.2 Solidi sospesi

I filtri per la determinazione dei solidi sospesi totali (TSS) (Figura 3) sono stati posti in stufa alla temperatura di 105 °C per un'ora, sono stati fatti raffreddare per 30 minuti in essiccatore e poi sono stati nuovamente pesati con una bilancia *Sartorius* CP225D. La concentrazione totale dei solidi sospesi è calcolata come differenza tra le pesate. La metodologia analitica di riferimento utilizzata è APAT CNR IRSA 2090 (2003).

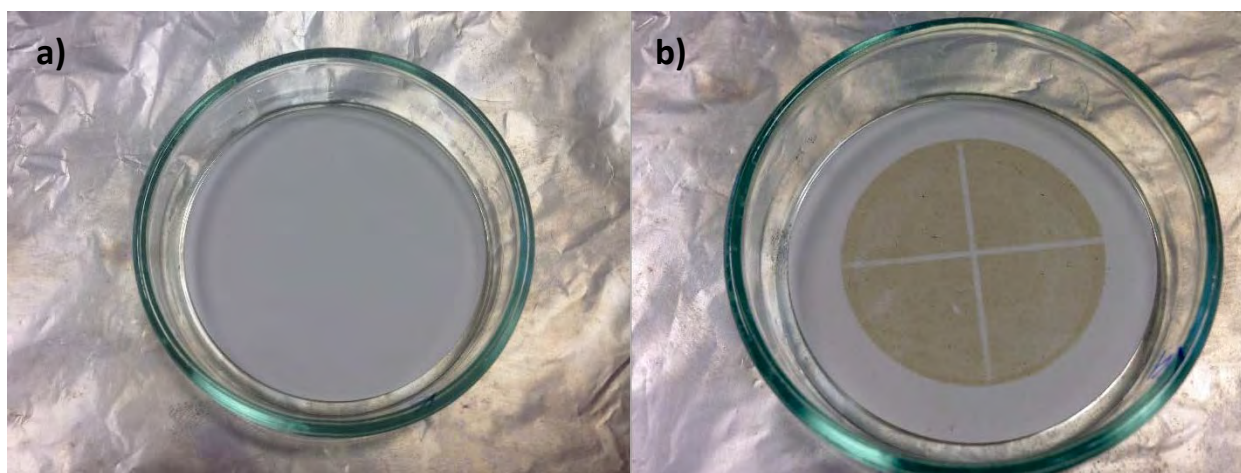


Figura 3. Filtri per la determinazione del TSS a) prima e b) dopo il campionamento.

1.1.1.3 Metalli disciolti

Il campione acquoso, pervenuto in laboratorio già stabilizzato con acido nitrico al 4%, è stato sottoposto ad analisi previa opportuna diluizione con acqua ultrapura Millipore per minimizzare l'effetto matrice. Le determinazioni dei metalli sono state effettuate seguendo le seguenti metodiche:

- Cromo, Zinco e Rame: è stata impiegata la metodica EPA 6010D:2014. L'analisi è stata condotta con ICP ottico impiegando un ICP Agilent VDV 5110. Il Limite di Quantificazione è pari a $1.0 \mu\text{g l}^{-1}$ per Cromo e Zinco e pari a $5.0 \mu\text{g/l}$ per il Rame.
- Cadmio e Piombo: è stata impiegata la metodica EPA 7010:2007. L'analisi è stata condotta con Assorbimento Atomico equipaggiato con fornello di grafite modello SpectrAA-240Z. Il Limite di Quantificazione è pari a $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ per Cadmio e $1.0 \mu\text{g l}^{-1}$ per Piombo.
- Mercurio: è stata impiegata la metodica APAT CNR IRSA 3200. L'analisi è stata condotta mediante spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi CV-AAS, impiegando un FIMS 100 Perkin Elmer. Il limite di quantificazione è pari a $0.05 \mu\text{g l}^{-1}$.

Le prestazioni analitiche sono state controllate mediante l'impiego di soluzioni standard di riferimento certificate NIST, come previsto da EPA, accettando uno scostamento massimo del 10% dal valore certificato. È stato considerato come Limite di Quantificazione il primo punto della curva di taratura moltiplicato per la diluizione effettuata.

1.1.1.4 Metalli e composti organici nel particolato.

La determinazione delle sostanze chimiche su particolato è stata effettuata mediante estrazione ed analisi dei materiali filtranti. Per ogni categoria di sostanza chimica (metalli e metalloidi, idrocarburi pesanti $C>12$, Idrocarburi policiclici aromatici e composti organostannici) sono stati utilizzati materiali filtranti diversi e specifici come riportato nella relazione relativa alle operazioni di campo. Il filtro utilizzato, opportunamente pre-pesato e decontaminato, dopo filtrazione in campo è stato riposto in apposita capsula Petri singola codificata, sigillato ed inviato al laboratorio di analisi in condizioni refrigerate. In laboratorio i filtri sono stati essiccati in stufa a 40°C per non perdere la frazione volatile delle sostanze chimiche di interesse specifico. Quindi al raggiungimento del peso costante sono stati pesati per la determinazione della quantità di particolato presente. Ogni tipologia di filtro (quattro filtri distinti per ogni campione) è stata sottoposta ad opportuna procedura di estrazione e successiva analisi secondo i metodi riportati nella tabella 3. La tabella riporta le unità di misura ed il limite di rilevabilità riferito al filtro estratto (LOQ) per ogni sostanza chimica o classe di sostanze chimiche analizzate. Le analisi effettuate sui filtri prevedono la distruzione totale del campione sottoposto a prova. Pertanto, per evitare di perdere campioni, il metodo per ogni tipologia di analisi è stato preventivamente testato effettuando prove di efficienza di estrazione e recupero degli analiti su filtri di prova aggiuntivi realizzati in campo appositamente con questa finalità. Inoltre, alcuni filtri *in blank*

sono stati analizzati per ogni tipologia di analisi per determinare il segnale di base ed effettuare opportune correzioni dovute all'eventuale effetto matrice. I risultati acquisiti sulla concentrazione per ogni molecola (espressa in mg o sottomultipli di essi) sono stati rapportati al volume di acqua filtrata su ogni filtro per la determinazione delle concentrazioni di sostanza per litro di acqua filtrata. Sono stati forniti anche i dati relativi al peso totale di materiale particolato/filtro per l'eventuale stima delle concentrazioni di sostanza per milligrammo o microgrammo di particelle totali.

Tabella 3. Metodi di estrazione ed analisi e limiti di rilevabilità per tipologia di sostanza.

	Metodo	um	LOQ
Peso filtro 40°C	CNR IRSA 2.4.1 Q 64 Vol 2 1994	g	-
Cadmio	3050B 1996 + EPA 6020B 2014	µg	0.0125
Cromo totale	3050B 1996 + EPA 6020B 2014	µg	0.025
Mercurio	3050B 1996 + EPA 6020B 2014	µg	0.0031
Piombo	3050B 1996 + EPA 6020B 2014	µg	0.025
Rame	3050B 1996 + EPA 6020B 2014	µg	0.025
Zinco	3050B 1996 + EPA 6020B 2014	µg	0.25
Idrocarburi pesanti (C>12)	EPA 3545A 2007 + EPA 8015C 2007	mg	0.01
Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)*	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2017	µg	0.005
Composti organostannici**	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2017	mg	0.0001

Note. Molecole identificate: *Acenaftilene; Benzo(a)antracene; Fluorantene; Naftalene; Antracene; Benzo(a)pirene; Benzo(b)fluorantene; Benzo(k)fluorantene; Benzo(g,h,i)perilene; Acenaftene; Fluorene; Fenantrene; Pirene; Dibenzo (a,h) antracene; Crisene; Indeno (1,2,3-c,d) pirene. **Monobutil stagno tricloruro; Di-n-butilstagno dicloruro; Tributilstagno cloruro; Sommatoria composti organostannici.

Carbonio Organico Totale (TOC)

Le misure di Carbonio Totale Organico (TOC) sono state effettuate mediante un analizzatore di carbonio Shimadzu, Mod. TOC-L, equipaggiato con autocampionatore, utilizzando il metodo di ossidazione catalitica ad alta temperatura (HTCO) così come riportato in Giani et al., 2010. Per ogni campione sono state eseguite da 3 a 5 misure. Ogni giorno lo strumento è stato tarato utilizzando soluzioni di ftlato acido di potassio a diverse concentrazioni (5 punti compresi tra 0 e 2 mg C l-1). Inoltre, per verificare l'affidabilità delle misure, due volte al giorno, è stato analizzato un campione di acqua di mare di riferimento a concentrazione nota (Deep Sea Water Reference, Hansell Laboratory, University of Miami; FL, USA). A causa dell'eccessivo contenuto di solidi sospesi, i campioni raccolti nell'area sottoposta alle operazioni di dragaggio (stazioni A01-A07) sono stati filtrati prima delle analisi (utilizzando un filtro nylon *Minisart NY Sartorius*, porosità 0.2 um), in modo da non arrecare danni allo strumento.

1.1.3 Analisi per la caratterizzazione biologica

1.1.1.5 Caratterizzazione delle comunità fitoplanctoniche

Clorofilla a

In laboratorio, i filtri per la determinazione della biomassa fitoplanctonica espressa come clorofilla *a* (Chl *a*), conservati in azoto liquido ($T \sim -195^{\circ}\text{C}$), sono stati distrutti meccanicamente con una bacchetta di vetro dopo essere stati immersi in una soluzione acquosa di acetone al 90% neutralizzato, all'interno di provette di polipropilene (PP) da 10 ml. Successivamente, le provette sono state poste in centrifuga refrigerata a 4°C (*Thermo Scientific* SL 16R) per 20 minuti a 3000 rpm. Dopo la centrifugazione, il surnatante è stato prelevato dall'estratto ed è stato analizzato utilizzando uno spettrofluorimetro *Shimadzu* RF-6000 (Figura 4), interfacciato ad un PC mediante il *software* LabSolutions RF.



Figura 4. Spettrofluorimetro *Shimadzu* RF-5301 PC.

La Fluorescenza è stata misurata prima e dopo acidificazione con acido cloridrico, in modo da misurare la frazione fotosinteticamente attiva (Chl *a*) ed inattiva (feopigmenti) come riportato in Lazzara et al., 2010. Lo strumento è stato calibrato prima di ogni giornata di analisi con una soluzione pura di Chl *a* estratta da *Anacystis nidulans* (Sigma), la cui concentrazione è stata determinata mediante misure di assorbanza specifica utilizzando uno spettrofotometro (Agilent 8453 UV-Visible spectrophotometer) interfacciato ad un PC mediante il *software* UV-visible ChemStation.

Caratterizzazione tassonomica della comunità fitoplanctonica

I campioni di fitoplancton sono stati raccolti con bottiglia Niskin e fissati in Lugol (1% concentrazione finale) in bottiglie di vetro scuro da 250 mL. Le analisi sono state effettuate al microscopio ottico invertito (*Leica DMI*) a contrasto di fase con un ingrandimento finale di 400X, secondo il metodo Utermöhl (Zingone et al., 2010). Il volume del subcampione da sedimentare per il conteggio è stato scelto in base ai valori di concentrazione



di Chl *a* in modo da ottenere un numero di cellule tale da risultare rappresentativo di tutto il campione. In molti casi, a causa della presenza di una notevole quantità di detrito che pregiudica la qualità dell'osservazione, è stato necessario ridurre il volume del campione sedimentato (10 o 25 ml) ed aumentare il numero dei transetti analizzati (da 1 a 4 transetti).

Sono stati determinati a livello di specie, ove possibile, diatomee, dinoflagellati, coccolitofori e fitoflagellati. Le piccole forme flagellate e i dinoflagellati di difficile identificazione sono stati riuniti in categorie più generiche (fitoflagellati < 10 µm, nudi < 15 µm etc.). Particolare attenzione è stata data all'identificazione di specie potenzialmente tossiche.

1.1.1.6 Caratterizzazione delle comunità zooplanctonica

Il campione di zooplancton fissato in etanolo al 95%, è stato filtrato e concentrato attraverso una maglia più piccola o della stessa dimensione della maglia della rete di campionamento. Il campione di zooplancton concentrato è stato diluito con etanolo denaturato al 95°, in una coppa graduata fino ad un volume noto di 100 ml. Il campione è stato quindi accuratamente mescolato, fino a quando i microrganismi non si sono distribuiti in modo casuale all'interno della coppa, prima di sub-campionarne un'aliquota. Il sub-campionamento è stato effettuato con l'utilizzo di una pipetta tipo Stempel (due sub-campioni da 5 ml sono stati compiuti per ciascun campione). Il sub-campione è stato quindi collocato in una camera di conteggio Mini-Bogorov ed osservato allo stereomicroscopio (Leica MZ125). Si precisa, inoltre, che ci si è imbattuti in diversi campioni marcati da una così bassa presenza di individui, in cui, è stato necessario il conteggio della totalità del campione (si allegano foto esemplificative nella sezione delle Conclusioni).

La determinazione tassonomica dei campioni è stata effettuata per copepodi (separati in base al sesso) e cladoceri a livello di Specie e/o Genere. I giovani di copepodi (copepoditi da CII e CIII lì dove è possibile campionarli con una rete da 200 µm) sono identificati a livello di Genere o Famiglia (ad esempio, *Calocalanus*, *Oithona*, *Oncaeidae*, *Corycaeidae*). Gli altri gruppi zooplanctonici sono stati identificati a livelli tassonomici superiori (Phylum, Ordine, Famiglia).

Durante questa fase del monitoraggio sono stati raccolti ed analizzati 127 campioni di zooplancton. I campioni sono stati raccolti a seguito di sei diverse fasi, che hanno scandito il monitoraggio effettuato in relazione al lavoro condotto della draga operante. Tutti i campioni sono stati utilizzati per effettuare un'analisi quali-quantitativa della comunità zooplanctonica e calcolare la relativa abbondanza, definita come numero di individui in una unità di volume (ind.m⁻³). Durante l'analisi ed il conteggio di questi campioni, è stata osservata la presenza di microplastiche e fibre (>200 µm) visibili allo stereomicroscopio, ed un denso particellato terrigeno, visibile anche ad occhio nudo (si veda foto in allegato nella sezione delle Conclusioni).

1.1.4 Acquisizione in continuo da boe oceanografiche

La Boa 1 è stata posizionata nel punto di coordinate $40^{\circ} 39.990' N - 14^{\circ} 44.037' E$ su un fondale di circa 10m, e resa operativa il pomeriggio del giorno 30/01/2020.

La Boa 2 è stata posizionata nel punto di coordinate $40^{\circ} 39.657' N$ e $14^{\circ} 44.750' E$ su un fondale di circa 14m, e resa operativa il pomeriggio del giorno 12/02/2020.

La Boa 3 è stata posizionata nel punto di coordinate $40^{\circ} 35.000' N$ e $14^{\circ} 25.928' E$ su un fondale di circa 16m, e resa operativa il pomeriggio del giorno 1/12/2020.

Nella Figura 5 sono raffigurate le posizioni delle tre boe oceanografiche utilizzate per il monitoraggio.

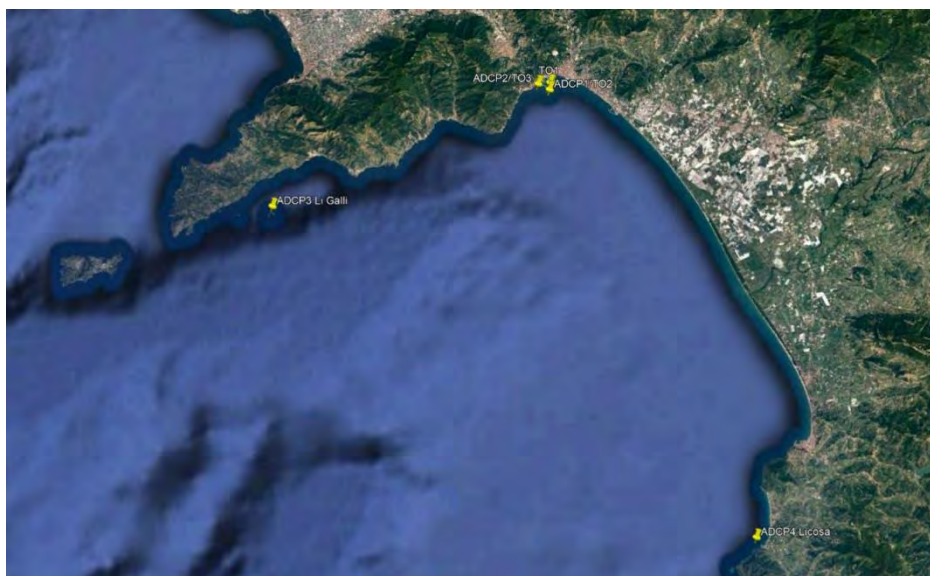


Figura 5. Ubicazione delle boe oceanografiche.

Le boe erano equipaggiate con un sistema di galleggiamento, moduli di gestione e controllo remoto, sistemi di controllo, sensori meteorologici, torbidimetro e profilatore per misure di corrente.

Il sensore di torbidità utilizzato è il *Turner Designs Torbidimetro Turbidity Plus*, completo di dispositivo per pulizia meccanica dell'ottica per protezione da *biofouling*, range 0-3000 NTU, completo di cavo subacqueo di collegamento al Datalogger LISC.

Il profilatore per misure di corrente utilizzato sulla boa 1 è il Teledyne RDI Sentinel V20 1000 kHz ADCP, completo di 4 trasduttori in configurazione Janus (posizionati a 90° l'uno dall'altro), necessari per la misura della *error velocity* come controllo di qualità dei dati.

Sulla boa 2 è stato utilizzato il Correntometro *Teledyne RDI Monitor* 600 kHz Direct-Reading ADCP, completo di 4 trasduttori in configurazione Janus (posizionati a 90° l'uno dall'altro).

I sistemi di galleggiamento sono corredati di correntometri ADCP a differente frequenza in relazione alla profondità d'uso, in particolare *Teledyne RDI Sentinel V20* 1000 kHz posizionato sulla BOA 1, resa operativa il



30 gennaio 2020, su un fondale di circa 10 m e un *Teledyne RDI Monitor 600 kHz Direct-Reading* posizionato sulla Boa 2, resa operativa il 15 febbraio 2020, su un fondale di circa 14 m.

Gli strumenti, ADCP, torbidimetro, centralina meteo e telecamera sono stati settati per acquisire i dati ogni ora. In particolare, ogni ora, l'ADCP effettua le misure per un arco temporale di 10 minuti ovvero un *ping* ogni dieci secondi per sessanta volte, mentre il torbidimetro effettua cinque misure consecutive, ognuna per cinque secondi. La pulizia della strumentazione è stata effettuata dai tecnici della Stazione Zoologica non appena sono stati trasmessi, dai sensori di torbidità, *spikes* e valori non verosimili, e naturalmente appena le condizioni meteo-marine lo hanno permesso.

Il monitoraggio in continuo della torbidità nell'area di escavo è stata un'operazione realmente utile perché monitora, in real-time, la torbidità, indotta dall'attività di escavo, sia nell'area portuale che nel canale d'ingresso oltre che la direzione e velocità della corrente dalla superficie al fondo e i dati meteorologici (Boa 1). I sistemi di monitoraggio in continuo (Boa 1, 2 e 3), sono dotati di un sistema di *early warning* che invia un messaggio in tempo reale ai centri di controllo, nel caso di superamento del limite d'intervento, che prevede il blocco delle attività di dragaggio.

1.2. Sedimenti

1.2.1 Campionamento

Il prelievo dei sedimenti è stato effettuato mediante benna Van Veen nei giorni 18, 19, 22 e 25 maggio 2020, in 20 stazioni ubicate nell'area potenzialmente impattata dalle operazioni di dragaggio (A08, A11, A14, A17 e A72) (Figura 6), nelle aree potenzialmente impattate dall'attività d'immersione dei sedimenti dragati (A47, A50, A53, A59, A62, A65, A68) (Figura 7), e nell'area d'immersione dei sedimenti dragati (A20, A21, A22, A23, A24, A74, A75, A76). (Figura 8).

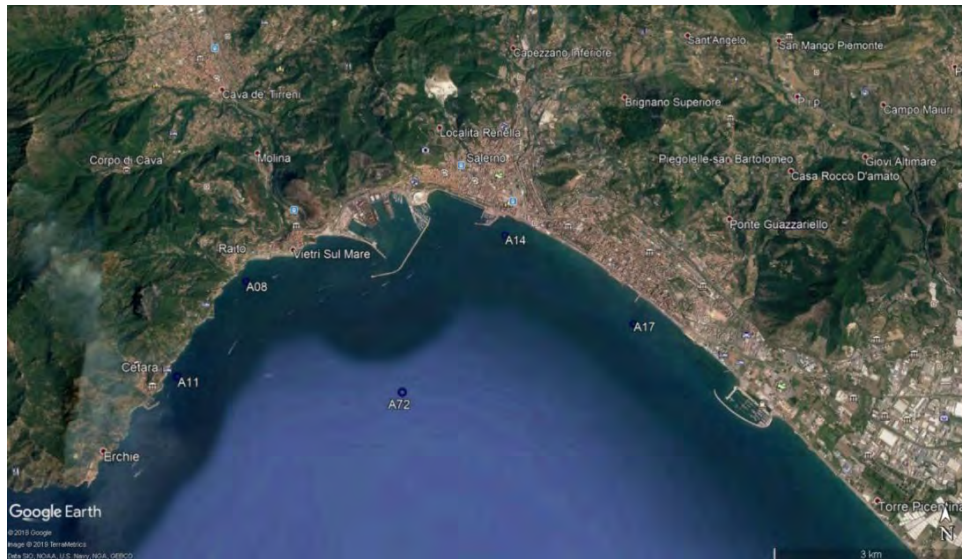


Figura 6. Ubicazione delle stazioni di campionamento nell'area interessata dai lavori di dragaggio.

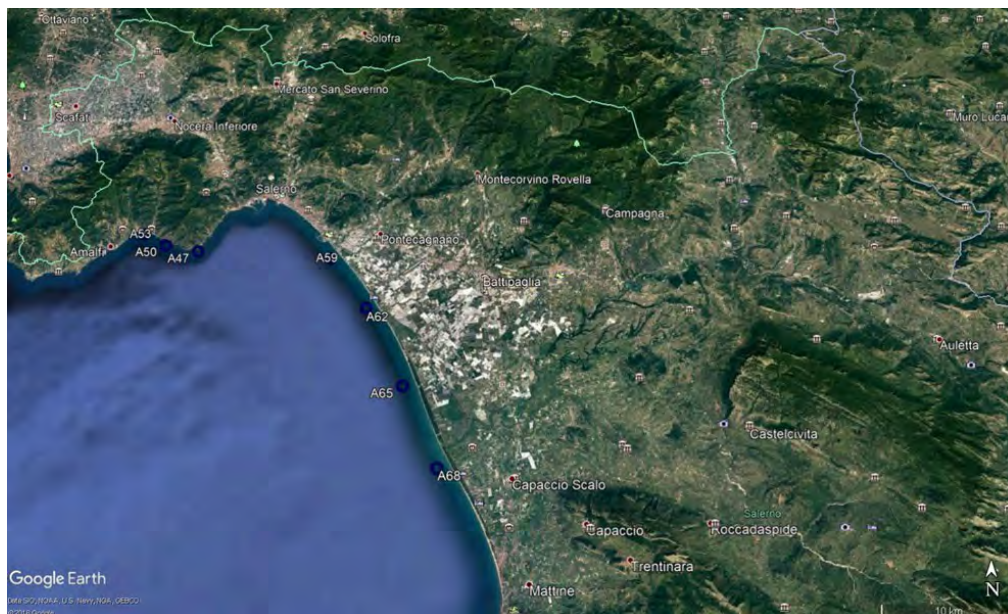


Figura 7. Ubicazione delle stazioni di campionamento nell'area potenzialmente impattata dalle operazioni di immersione.

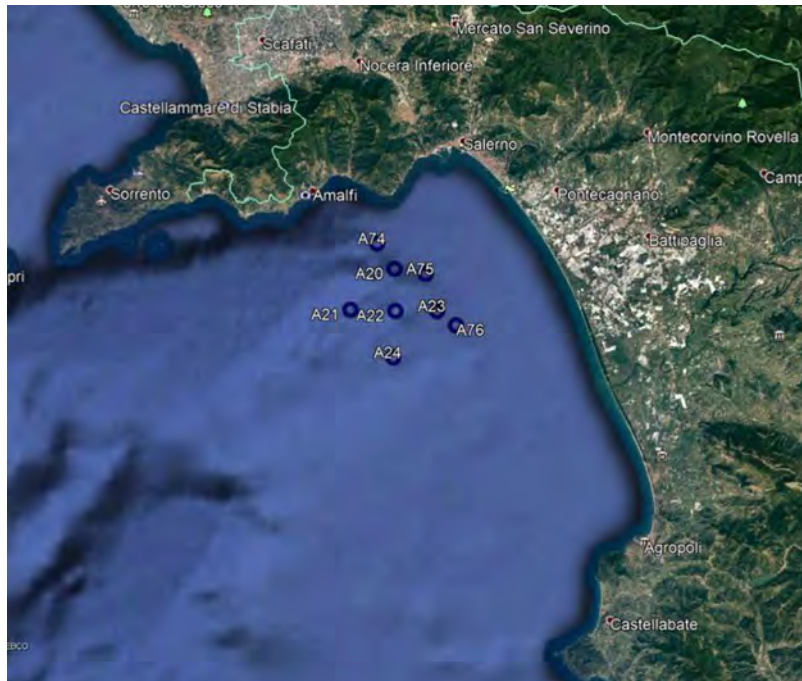


Figura 8. Ubicazione delle stazioni di campionamento nell'aera di immersione.

Per le attività di caratterizzazione fisica, chimica, ecotossicologica e microbiologica le metodiche di campionamento, confezionamento e trasporto in laboratorio per le analisi sono state svolte in conformità ai protocolli nazionali ed internazionali. Per ogni campione prelevato, il personale tecnico ha provveduto ad etichettare il campione e a compilare la scheda di campionamento. I campioni di sedimento prelevati sono stati maneggiati con cura in modo da garantire:

- l'assenza di contaminazione derivante dall'ambiente circostante o dagli strumenti impiegati per il campionamento ed il prelievo;
- l'assenza di perdite di sostanze inquinanti dalle pareti dei campionatori o dei contenitori;
- la protezione del campione da contaminazione derivante da cessione dei contenitori;
- un'adeguata temperatura di conservazione dei campioni;
- l'assenza di alterazioni biologiche nel corso dell'immagazzinamento e conservazione;
- l'assenza, in qualunque fase, di modificazioni chimico-fisiche delle sostanze;
- la pulizia degli strumenti ed attrezzi usati per il campionamento, il prelievo, il trasporto e la conservazione, dopo ogni campionamento.
- Il prelievo del sedimento è stato effettuato mediante una benna Van Veen dotata di sportelli superiori, necessari per limitare il disturbo al sedimento e consentire il recupero dello strato superficiale, per ogni recupero dello strumento è stata redatta una scheda di campionamento con i dati inerenti la stazione e la descrizione macroscopica del sedimento. In ogni stazione è stato prelevato il livello superficiale (0 - 2 cm).

- I sedimenti prelevati dallo strato superficiale sono stati preventivamente omogeneizzati in situ e suddivisi in differenti sub-campioni destinati alle successive analisi microbiologiche, fisiche, chimiche ed ecotossicologiche. I campioni da destinare alle analisi microbiologiche, prelevati rispettando le condizioni di sterilità, sono stati posti all'interno di contenitori sterili e immediatamente conservati e trasportati a +4°C. Per le analisi fisiche il campione è stato raccolto in contenitori di plastica, trasportato e conservato a temperatura compresa tra +4°C e +6°C. I sedimenti destinati alle analisi chimiche sono stati raccolti in contenitori in HDPE, trasportati e conservati a temperatura <20°C. Per le analisi ecotossicologiche il sedimento è stato raccolto in contenitori in HDPE, trasportato e conservato a temperatura compresa tra +4°C e +6°C. In Tabella 5 sono riportate le coordinate geografiche, l'orario e la profondità delle stazioni di campionamento.

Per l'analisi delle comunità bentoniche, lo studio è stato effettuato dividendo le varie aree d'indagine che corrispondono all'area potenzialmente impattata dalle operazioni di dragaggio, area potenzialmente impattata dalle operazioni di immersione e l'area di immersione dei sedimenti dragati. L'area potenzialmente impattata dalle operazioni di immersione è a sua volta divisa in due, a causa dell'eterogeneità del substrato e la distanza fisica che comporta una notevole diversità nella comunità macrozoobentonica. La comunità di ciascuna area è stata analizzata sia dal punto di vista strutturale che ambientale.

Area potenzialmente impattate dalle operazioni di dragaggio stazioni:

- 1) A08, A11, A14, A17, A72 prospicienti il porto commerciale di Salerno

Aree potenzialmente impattate dalle operazioni di immersione dei sedimenti:

- 1) A47, A50, A53 costiera amalfitana
- 2) A59, A62, A65, A68 litorale piana del Sele

Area di Immersione dei sedimenti dragati:

- 1) A20, A21, A22, A23, A24, A74, A75, A76

1.2.2 Analisi per la caratterizzazione fisica

1.2.2.1. Determinazione del contenuto d'acqua e del peso specifico

La determinazione del contenuto di umidità residua è stata eseguita come riportato nel D.M. 185 del 13/09/99, mediante perdita di peso per essiccaamento. La percentuale d'acqua contenuta nel sedimento è ottenuta dal rapporto tra il peso del sedimento umido e il peso secco, ottenuto in stufa alla temperatura di 105°C per almeno 8 ore.

La determinazione del peso specifico si basa sul rapporto tra il peso del campione di sedimento e il rispettivo volume ed è espresso in g/cm³.

1.2.3 Analisi per la caratterizzazione chimica

Le analisi chimiche sono state effettuate considerando tutti i parametri chimici previsti dal DM n. 173 del 15 luglio 2016 “Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini”. I risultati analitici ottenuti sono stati successivamente elaborati mediante il *software* SediQualsoft 109.0®, applicando i criteri di integrazione ponderata per determinare l'indice di pericolo chimico HQC, utilizzato per l'integrazione finale con i risultati ecotossicologici e la classificazione della qualità dei sedimenti (allegato tecnico del DM 173/2016).

1.2.3.1. Determinazione della materia organica totale

La materia organica totale è stimata attraverso il metodo per calcinazione. Esso consiste nella valutazione della differenza tra il peso del sedimento essiccato a 105°C per otto ore e il peso del residuo dopo combustione in muffola a 450°C per quattro ore.

1.2.3.2. Determinazione dell'azoto totale (TN)

La determinazione dell'azoto totale è stata condotta mediante metodi conformi alle specifiche approvate dal DM del 13/09/1999 del Ministero per le Politiche Agricole (Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo"), utilizzando un analizzatore elementare Perkin Elmer 2400 (Series II, CHNSO elemental analyzer). Il metodo prevede una completa ed istantanea ossidazione del campione per "*flash combustion*", con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche in prodotti gassosi. I gas di combustione vengono fatti passare in corrente di elio su uno strato di opportuno catalizzatore per completare il processo di ossidazione, e quindi su strato di rame per allontanare l'eccesso di ossigeno e per ridurre gli ossidi di azoto ad azoto molecolare (N₂). Successivamente, la miscela gassosa viene separata per gascromatografia e CO₂, N₂, H₂O e SO₂ vengono rilevati da un detector a conducibilità termica.

Nello specifico, la determinazione dell'azoto totale è stata effettuata depositando aliquote pari a circa 4 mg dei sedimenti essiccati alla temperatura di 55°C per almeno 8 ore direttamente all'interno dell'analizzatore elementare automatico, previa taratura dello stesso utilizzando soluzioni standard pure di Acetanilide, come descritto da Buurman et al. (1996). Il risultato finale viene espresso in mg/g di azoto e riferiti al peso secco (ps). Il limite di determinazione (LOD) è pari a 0.1 mg/g (ps).

1.2.3.3. Determinazione del fosforo totale (TP)

L'analisi del fosforo totale è stata effettuata secondo specifiche analoghe a quanto descritto da Hansen e Koroleff (1999). In breve, circa 100 mg di sedimento sono stati calcinati in muffola a 450°C per 4 ore. Al sedimento sono stati aggiunti 10 ml di HCl 1 M, e il campione è stato posto in agitazione per 16 ore a Temperatura ambiente. Dopo centrifugazione (4000 rpm, 15 min), la determinazione analitica del contenuto di fosforo totale è stata eseguita nel surnatante mediante metodo spettrofotometrico. Nello specifico,

l'ortofosfato (PO_4^{3-}) si determina con il metodo spettrofotometrico al blu di molibdeno, come descritto nel metodo 4110 dei protocolli IRSA-CNR (APAT Manuali e Linee Guida 29/2003), attraverso il kit di determinazione analitica Hach-Lange LCK 348 ed il Fotometro Hach-Lange DR3900 ed applicando le specifiche fornite dal costruttore. Gli ioni fosfato reagiscono con il molibdato di ammonio ed il potassio antimonil tartrato, in ambiente acido, formando un eteropoliacido che viene ridotto con acido ascorbico a blu di molibdeno, intensamente colorato, la cui assorbanza viene misurata alla lunghezza d'onda di 850 nm. Il risultato finale viene espresso in mg/g di fosforo e riferiti al peso calcinato (pc). Il limite di determinazione (LOD) è pari a 0.002 mg/g (pc).

1.2.3.4. Determinazione dei metalli

Per la determinazione dei metalli, tra cui alluminio (Al), arsenico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), ferro (Fe), manganese (Mn), mercurio (Hg), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), vanadio (V) e zinco (Zn), i campioni di sedimento sono stati accuratamente mescolati al fine di renderli omogenei, ed aliquote pari a circa 10 g sono state poste in idonee piastre petri in vetro, pesate (peso umido) e mantenute in stufa alla Temperatura di $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per almeno 8 ore, al fine di ottenere un peso costante; successivamente i campioni sono stati recuperati e nuovamente pesati (peso secco); il peso umido ed il peso secco dei campioni consente di calcolare il contenuto d'acqua interstiziale associata ai sedimenti, utile a convertire in peso secco le aliquote umide destinate ad altre determinazioni analitiche. Per ciascun punto di prelievo è stata processata una replica di sedimento. I campioni sono stati quindi polverizzati con l'ausilio di un mortaio, ed aliquote omogenee pari a circa 0.5 g sono state trasferite in appositi contenitori per mineralizzazione sotto pressione in forno a microonde, previa addizione di 2 ml di H_2O_2 e 5 ml di HNO_3 . La mineralizzazione è stata condotta mediante sistema a microonde *CEM Mars 5 (CEM Corporation)*, dotato di sistema controllo e regolazione di Temperatura e potenza delle microonde. Al termine del ciclo di mineralizzazione i campioni sono stati raffreddati a Temperatura ambiente quindi recuperati e portati a volume noto, con acqua ultrapura (10 ml).

La determinazione analitica dei metalli è stata effettuata mediante tecniche di spettrofotometria ad assorbimento atomico; Cu, Fe, Mn e Zn sono stati determinati mediante atomizzazione in fiamma con spettrofotometro *SpectrAA 220FS (Agilent Technologies)*, mentre Al, As, Cd, Cr, Ni, Pb e V sono stati analizzati mediante spettrofotometro *SpectrAA 240Z (Agilent Technologies)*, munito di elettrofornace GTA120 con microforno di grafite ed effetto Zeeman: Quando necessario l'interferenza della matrice è stata risolta utilizzando apposite soluzioni di modificatori di matrice (palladio 1 g^{-1} , 10% acido citrico, 20% HNO_3), mentre le interferenze spettrali sono state verificate utilizzando standardizzazioni con metodo delle aggiunte. La determinazione del mercurio (Hg) è stata eseguita tramite generazione di vapori freddi utilizzando un apposito analizzatore di mercurio *CETAC QuickTrace M-6100 Mercury Analyzer (Agilent Technologies)* munito di auto campionatore *ASX-130*.

Tutte le determinazioni analitiche sono state effettuate previa calibrazione della strumentazione analizzando

apposite soluzioni di bianco e standard di riferimento a concentrazione nota e certificata; i risultati finali sono stati espressi in $\mu\text{g/g}$ (peso secco).

La determinazione dei composti organici dello stagno, è stata effettuata utilizzando un'aliquota omogenea di ciascun campione, pari a circa 2-3 g, addizionata con una soluzione di *n*-esano:acetone (2:1) in un rapporto di 1:3, peso campione rispetto al volume di solvente (m:v). Successivamente, i campioni sono stati estratti utilizzando un sistema di estrazione controllata a microonde, alla Temperatura di 110°C per 15 minuti (*Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM Corporation*). Le soluzioni così ottenute sono state concentrate a secchezza, mediante un evaporatore centrifugo (*SpeedVack Juan RC 1009*), alla Temperatura ambiente. Infine, i campioni sono stati solubilizzati in 1 ml di acido nitrico (HNO_3) e portati a volume noto (2 ml) con acqua ultrapura. Per la quantificazione del TBT, un'aliquota dell'estratto è stata trattata con NaOH 10M per la precipitazione e l'allontanamento delle specie mono- e di- butilate. La successiva determinazione analitica è stata effettuata mediante le tecniche di spettrofotometria ad assorbimento atomico precedentemente descritte, utilizzando tecniche di assorbimento atomico con microforno di grafite ed effetto Zeeman, mediante l'uso di modificatore di matrice (palladio 1 g l^{-1} , 10% acido citrico, 20% HNO_3) e applicando standardizzazione con metodo delle aggiunte. Il risultato finale è stato espresso in $\mu\text{g/g}$ (peso secco), convertendo il peso umido dei campioni in peso secco, mediante il contenuto d'acqua determinato in precedenza.

1.2.3.5. Determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

La determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei campioni di sedimento è stata effettuata utilizzando un'aliquota omogenea di campione, pari a circa 2-3 g (peso umido). Al momento della preparazione, i campioni sono stati addizionati con 5 ml di una soluzione di KOH 0.5 M in metanolo puro per cromatografia liquida e mantenuti in agitazione per almeno 8 ore, al fine di operare una preliminare estrazione solido-liquido. Il completamento dell'estrazione è stato eseguito mediante microonde a 55°C per 15 min (*Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM*). I campioni sono stati concentrati a circa 0.5 ml mediante centrifuga evaporante (*Speedvack, Juan*), a 45°C per 60-120 min, successivamente purificati attraverso una cromatografia a bassa pressione con resine per estrazione in fase solida (SPE) del tipo *Backerbond SPE C18* (500 mg, 6 ml) ed infine recuperati in 1 ml di acetonitrile puro per cromatografia liquida. Tale purificazione è stata effettuata utilizzando il sistema automatico *Gilson Aspec GX271 (Gilson Inc.)*. Le determinazioni analitiche sono state effettuate mediante tecniche di cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) utilizzando un sistema di pompe per gradiente binario e coppia di detector in Fluorescenza e serie di diodi *Agilent Infinity 1260 Series (Agilent Technologies)*.

L'analisi è stata condotta mediante gradiente dinamico utilizzando acqua ultrapura e acetonitrile come fasi mobili. Il volume di campione iniettato è stato pari a 20 μl ed è garantito costante per tutte le analisi

utilizzando un apposito auto campionatore. La determinazione qualitativa e quantitativa degli analiti è stata eseguita attraverso il confronto dei cromatogrammi e dei segnali, con quelli ottenuti iniettando soluzioni standard a concentrazioni note e scalari, preparate utilizzando una miscela di idrocarburi aromatici puri (EPA 610, Supelco). Gli analiti determinati mediante il metodo appena descritto possono essere classificati in IPA a basso peso molecolare (acenaftene, acenaftilene, antracene, fenantrene, fluorene e naftalene), IPA ad alto peso molecolare (benzo(a)antracene, benzo(a)pirene, benzo(b)fluorantrene, benzo(g,h,i)perilene, benzo(k)fluorantrene, crisene, dibenzo(a,h)antracene, fluorantrene, indeno(1,2,3-cd)pirene, pirene) ed alcuni IPA metilati (1-metilnaftalene, 2-metilnaftalene e 7,12-dimetilbenzo(a)antracene); l'accuratezza e la precisione analitica sono state verificate analizzando apposite soluzioni di bianco e standard di riferimento (SRM-NIST 1944). Le concentrazioni sono espresse in ng/g di campione (peso secco).

1.2.3.6. Determinazione degli idrocarburi alifatici totali (C₁₀-C₄₀)

La determinazione di idrocarburi alifatici totali (C₁₀-C₄₀) è stata effettuata mediante tecniche di gascromatografia (GC); aliquote pari a circa 2-3 g per ciascun campione di sedimento sono state addizionate con una soluzione di *n*-esano:acetone (2:1) in un rapporto di 1:3, peso campione rispetto al volume di solvente (m:v). Dopo una vigorosa agitazione, i campioni sono stati estratti utilizzando un sistema di estrazione controllata a microonde, alla Temperatura di 110°C per 15 minuti (*Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM Corporation*).

Le soluzioni così ottenute sono state purificate con tecniche di estrazione in fase solida (SPE) utilizzando resine di estrazione del tipo Strata-X (*Phenomenex, Strata-X 33u Polymeric Reversed Phase*) da 500 mg e 6 ml, oltre a resine del tipo Strata-FL (*Phenomenex, FL-PR*) da 1000 mg e 6 ml, utilizzando il sistema automatico *Gilson Aspec GX271*. I campioni eluiti con l'ausilio di soluzioni di acetone ed esano sono stati raccolti in appositi tubi pyrex e quindi posizionati all'interno di un evaporatore centrifugo (*SpeedVack Juan RC 1009*), dove sono stati concentrati fino a secchezza, alla Temperatura ambiente. Infine, i campioni sono stati solubilizzati in 1 ml di *n*-esano. L'analisi degli idrocarburi alifatici è stata effettuata mediante gascromatografia con detector a ionizzazione di fiamma (FID) (*Perkin Elmer Clarus 500*); la determinazione quantitativa è stata effettuata calibrando il sistema mediante uno standard puro costituito da un mix di specie chimiche di idrocarburi con pari numero di carbonio da C₁₀ a C₄₀, lineari ed insaturi, conforme alle specifiche EN ISO 9377-3; i risultati finali sono stati espressi in µg/g (peso secco).

1.2.3.7. Determinazione di pesticidi organoclorurati, pesticidi organofosfati, clorofenoli, clorobifenili, policlorobifenili (PCB), polibromo-difenil eteri ed altri ritardanti di fiamma organo brominati.

Nella tabella 6 viene riportata la lista completa dei pesticidi organoclorurati, pesticidi organofosfati, clorofenoli, clorobifenili, policlorobifenili, polibromo-difenil eteri ed altri ritardanti di fiamma organo brominati che sono stati analizzati nei sedimenti. La preparazione dei campioni di sedimento è analoga a quella già descritta nel precedente paragrafo (Determinazione degli idrocarburi alifatici totali C10-C40). Per quanto riguarda le determinazioni analitiche, queste sono state effettuate mediante gascromatografia accoppiata a spettrometro di massa con singolo quadrupolo (Agilent Technology). Al fine di garantire l'accuratezza e la precisione delle determinazioni, durante ogni sessione analitica sono state processate soluzioni di bianco preparate con le stesse procedure descritte per i campioni, apposite soluzioni a diverse concentrazioni di standard analitici puri, oltre a standard di riferimento (SRM-NIST 1944) a concentrazione nota e certificata, e miscele di standard puri a concentrazioni note delle varie classi di contaminanti. Le concentrazioni sono state espresse in ng/g riferite al peso secco dei campioni.

Tabella 6. Elenco dei contaminanti organici persistenti analizzati.

<u>Pesticidi clorurati (EPA 8081)</u>	<u>Fenoli clorurati</u>	<u>PCB (continua):</u>
Aldrina	2-Clorofenolo	PCB70
α -Clordano	4-Clorofenolo	PCB77
γ -Clordano	2,4-Diclorofenolo	PCB81
p,p'-DDD	2,4,6-Triclorofenolo	PCB90
p,p'-DDE		PCB101
p,p'-DDT		PCB105
Dieldrina	<u>Clorobifenili</u>	PCB118
Endosulfano I		PCB126
Endosulfano II	2-Clorobifenile	PCB127
Endosulfano (solfato)	3-Clorobifenile	PCB128
Endrina	4-Clorobifenile	PCB130
Endrina (aldeide)		PCB138
Endrina (chetone)		PCB146
Eptacloro	<u>Policlorobifenili (PCB):</u>	PCB153
Eptacloro (eossido)		PCB156
α -Lindano	PCB4	PCB169
β -Lindano	PCB7	PCB170
δ -Lindano	PCB8	PCB175
γ -Lindano	PCB11	PCB180
Metossicloro	PCB13	PCB182
	PCB15	PCB187
	PCB16	PCB195
<u>Altri pesticidi clorurati</u>	PCB17	PCB206
	PCB18	PCB209
Diclorobenzidina	PCB19	
Esaclorobenzene	PCB23	
Esaclorobutadiene	PCB26	
Mirex	PCB28	
	PCB32	
	PCB33	PBDE28
<u>Pesticidi organofosfati</u>	PCB36	PBDE47
	PCB38	PBDE99
Azinphos-methyl	PCB40	PBDE100
Chlorpyrifos	PCB42	PBDE153
Dichlorvos	PCB44	PBDE154
Disulfoton	PCB45	PBDE183
Ethoprophos	PCB46	Esabromociclododecano
Fenclorphos	PCB47	Tetrabromobisfenolo-A
Metilparathion	PCB52	
Metolcarb	PCB58	
Prothiofos	PCB66	

Ulteriori informazioni tecniche sull'esecuzione delle analisi chimiche (materiale standard certificato e percentuale di recupero, limite di quantificazione, incertezza estesa, valutazioni di QA/QC)

I metodi di preparazione dei campioni e di determinazione analitica descritti sono stati accuratamente testati e validati analizzando periodicamente soluzioni di bianco (solo reagenti puri trattati nelle medesime condizioni dei campioni analitici) ed apposite matrici di riferimento con standard certificati. Per quanto riguarda i bianchi, questi hanno sempre mostrato risultati al di sotto dei limiti di misurazione strumentale, lasciando quindi escludere fenomeni di inavvertita contaminazione o di interferenze analitiche non conosciute.

Per quanto concerne invece le matrici certificate di riferimento, sono state utilizzati appositi standard tra i quali: NIST 1944 (New York/New Jersey Waterway Sediment), NIST 2976 (Trace elements and Methylmercury in Mussel Tissues), NIST 2974a (Organics in freeze-dried mussel tissue), ERM-CE278k (Certified Reference Material, Mussel Tissue). Aliquote di questi standard sono state preparate ed analizzate periodicamente con le medesime condizioni descritte in precedenza. L'errore analitico, seppur con alcune variazioni che dipendono dalle differenti metodologie adottate, si aggira sempre tra circa 1.5% e 3%, determinato come coefficiente di variazione percentuale della deviazione standard riferita alla media dei valori ottenuti su un numero di repliche pari ad almeno 5; tale incertezza rientra pertanto sempre abbondantemente all'interno del range di variabilità descritto per i valori certificati (deviazioni standard). Le rese analitiche risultano generalmente sempre comprese tra il 95% ed il 97% dei valori certificati.

1.2.4 Analisi ecotossicologiche

Le analisi ecotossicologiche dei sedimenti sono state effettuate applicando una batteria di saggi (bioluminescenza batterica in fase solida, crescita algale ed embriotossicità su fase liquida), secondo quanto previsto dal DM n. 173 del 15 luglio 2016 "*Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini*". I risultati analitici ottenuti sono stati successivamente elaborati mediante il software SediQualsoft 109.0[®], applicando i criteri di integrazione ponderata per determinare l'indice di qualità ecotossicologica $HQ_{batteria}$, utilizzato per l'integrazione finale con i risultati chimici e la classificazione della qualità dei sedimenti (allegato tecnico del DM173/2016).

1.2.4.1. Saggio biologico con *Vibrio fischeri* in fase solida

Vibrio fischeri è un batterio marino Gram-negativo ed eterotrofo, appartenente alla famiglia delle Vibrionaceae. È cosmopolita, ma con maggior diffusione nelle fasce temperate e subtropicali.

Il sistema Microtox[®] è un test biologico di tossicità acuta basato sulla misura della bioluminescenza naturale di questa specie. Poiché in presenza di contaminanti l'emissione di luce da parte di *V. fischeri* diminuisce,



l'eventuale inibizione della bioluminescenza a seguito dell'esposizione del batterio ad una sostanza nota o ad un campione naturale di acqua o sedimento, consente di valutare il grado di tossicità della sostanza o della matrice testata.

Il sistema di misura risulta piuttosto versatile in quanto è applicabile a matrici naturali, in particolare acquose (acqua interstiziale, elutriato, ecc.) e solide (fanghi, sedimenti), nonché a soluzioni acquose di sostanze tossiche pure sia organiche che inorganiche.

Protocolli di riferimento e procedura adottata

Questo saggio è stato applicato entro 7 giorni dal campionamento direttamente alla fase solida, preparata per semplice centrifugazione refrigerata (1200 xg a 4°C per 30'), eliminando successivamente l'acqua interstiziale come sovrantante.

Il metodo utilizzato è riconducibile al protocollo standard ISO 11348 (2006). In particolare, ai campioni di sedimento centrifugato è stato applicato il protocollo *Solid Phase Test* (SPT) con la procedura *Large Sample Method* (Azur Environmental, 1995) organizzato con 9-12 diluizioni e 3 controlli a seconda della granulometria del campione. Il test prevede una prima esposizione di 20 minuti durante i quali i batteri si trovano a diretto contatto con il sedimento ed una seconda fase di ulteriori 10 minuti in cui la risospensione batterica viene incubata nel luminometro.

Poiché il test in fase solida viene effettivamente applicato sulla frazione granulometrica < 1 mm e poiché la componente naturale della tossicità è funzione della frazione pelitica, l'analisi granulometrica è stata necessaria per la valutazione del reale livello di tossicità acuta.

L'emissione della bioluminescenza è stata misurata all'interno del luminometro M500, dotato di pozzetti termostatati a 15 °C per i controlli e i campioni, e a 4°C per il reagente. La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, è stata elaborata mediante il software dedicato (Microtox Omni™ v. 1.16).

Caratteristiche granulometriche dei sedimenti testati in fase solida

Per la determinazione delle caratteristiche granulometriche dei sedimenti marini necessarie per la normalizzazione del saggio, ogni campione (circa 70 g) è stato trattato con una soluzione di perossido di idrogeno ed acqua distillata (1:8) per 48h a Temperatura ambiente, per facilitare la separazione dei granuli. Successivamente il campione di sedimento è stato setacciato su maglia 63 µm in umido con acqua distillata, al fine di ottenere la separazione di due frazioni, che sono state essiccate in stufa a 60°C ed infine pesate. Dopo questa prima fase di separazione, si è proceduto con la separazione del sedimento con granulometria > 63 µm (sabbia e ghiaia) con pile di setacci da 2000, 1000, 500, 250, 125 e 63 µm; si è pesato il sedimento corrispondente a ciascun intervallo e al termine delle operazioni si è calcolata la percentuale delle varie

frazioni all'interno del campione.

1.2.4.2. Preparazione dell'elutriato per i saggi in fase liquida

L'elutriato è stato preparato entro 7 giorni dalla data di campionamento. In accordo con il protocollo standard US EPA (1991) quattro parti di acqua di mare filtrata sono state combinate in peso con una parte di sedimento; dopo agitazione per 1 h a 400 giri/min, la fase liquida è stata raccolta e centrifugata per 20 min a 1200 xg. Subcampioni di surnatante sono stati congelati e utilizzati nei vari test, in modo da impiegare sempre lo stesso campione nel corso dei vari esperimenti. Il congelamento, infatti, non altera in modo significativo le caratteristiche dei nutrienti (NO_3 e PO_4) della fase liquida (Clementson e Wayte, 1992) e non determina differenze significative tra la tossicità di campioni di matrici acquose appena estratte o congelate (Carr e Chapman, 1995). Il congelamento è pertanto un passaggio indispensabile per garantire la confrontabilità fra i dati sperimentali, in quanto permette di stoccare adeguatamente i subcampioni rendendoli disponibili per la ripetizione del saggio in periodi diversi.

1.2.4.3. 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, o *Skeletonema costatum*. Entrambe le alghe possono essere impiegate utilizzando tale protocollo per saggi con elutriati, estratti da sedimento intero, con acqua sovranatante o interstiziale. Per i campioni in esame, il saggio biologico è stato eseguito con *P. tricornutum*.

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.

Mantenimento della coltura algale madre e fasi preparatorie

Le colture cellulari madri sono state mantenute in opportuno mezzo di crescita con periodici rinnovi per mantenerle 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 cells/ml 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.

Metodologia di esecuzione del test

L'elutriato ottenuto da ciascun campione di sedimento è stato testato tal quale. Un'aliquota della coltura di inoculo è stata quindi addizionata alla soluzione test (elutriato puro) insieme ad una appropriata quantità di mezzo di coltura concentrato. La soluzione così ottenuta, con una Densità cellulare compresa tra 8×10^3 e 1.2×10^4 cells/ml, è stata distribuita in triplice replica in piastre monouso sterili a 6 pozzetti (Environment Canada, 1992) e posta per 72h in camera termostatica a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con regime di illuminazione continua del tipo cool white e con una intensità compresa tra 7.000 e 8.000 lux.

Acqua di mare naturale filtrata, è stata considerata come controllo negativo. In contemporanea, un controllo positivo è stato effettuato utilizzando bicromato di potassio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) come tossico 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.

1.2.4.4. Saggio di embriotossicità con *Crassostrea gigas*

Il test di embriotossicità è stato condotto con l'ostrica, *Crassostrea gigas*, e la matrice sottoposta alla valutazione ecotossicologica è stata l'elutriato testato tal quale (100%), preparato come già descritto precedentemente. Il metodo utilizzato è riconducibile al protocollo ICES (2013).

Reperimento degli organismi

Le ostriche (*C. gigas*) adulte sono state acquistate presso un impianto di acquacoltura (*Guernsey Sea Farms*) che garantisce la maturità sessuale dei bivalvi in qualsiasi periodo dell'anno. All'interno di una camera termostata, gli esemplari vengono posti in acquari di vetro contenenti acqua di mare dotati di un sistema di areazione e di filtraggio. Periodicamente vengono controllati Temperatura ($16 \pm 2^\circ\text{C}$), salinità (33‰ - 36‰), pH (7,8 - 8,2), ammoniaca e nitrati. In questo modo le ostriche sono mantenute in condizioni stabili.

Modalità di esecuzione del test di embriotossicità

La fase vera e propria del test consiste nell'ottenere gli zigoti attraverso l'unione della sospensione spermatica (concentrazione desiderata) con la sospensione di uova in un rapporto spermatozoi:uova di 10:1. Il saggio di embriotossicità viene eseguito esponendo una concentrazione fissa di uova fecondate alla soluzione test in cella termostatica al buio, a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ per 24h, al fine di garantire che tutti gli zigoti raggiungano lo stadio di larva nel controllo negativo. Il test viene fermato con fissativo di Lugol ed etanolo. La stima della percentuale di larve normali avviene contando 100 larve.

Elaborazione dei dati

L'effetto tossico del campione viene determinato dalla percentuale di embrioni malformati rispetto a un controllo di acqua di mare applicando la correzione di Abbott (ASTM, 1995). Il test viene considerato valido se la percentuale di larve normoformate nel controllo è superiore all' 80% del totale degli embrioni contati.

1.2.5 Applicazione dei criteri di integrazione ponderata per l'elaborazione dei dati chimici ed ecotossicologici e la valutazione della classe di qualità

1.2.5.1. Criteri di integrazione ponderata per l'elaborazione dei dati chimici e la definizione dell'indice di pericolo chimico dei sedimenti

I risultati analitici ottenuti per i sedimenti sono stati elaborati mediante il software *SediQualsoft 109.0*[®], applicando i criteri di integrazione ponderata che sono stati recepiti dal DM n. 173 del 15 luglio 2016 "Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini". La successiva integrazione con i risultati ecotossicologici ha permesso di determinare la classificazione della qualità dei sedimenti mediante la procedura descritta nell'allegato tecnico del DM 173/2016.

I criteri di integrazione ponderata elaborano un indice di pericolo chimico complessivo basato sul confronto tra le concentrazioni delle sostanze misurate nei sedimenti ed i riferimenti normativi nazionali L1 e L2 (DM 173/2016), che valuta il numero dei contaminanti che eccedono tali riferimenti, la pericolosità di tali parametri, e l'entità dei superamenti misurati. Viene dunque abbandonata la logica del mero superamento del valore tabellare, anche minimo e da parte di un unico parametro, come principio fondamentale per la classificazione chimica.

Tutti i parametri chimici di cui è prevista l'analisi, hanno un "peso" (da 1 a 1.3) a seconda che non siano contemplati dalla Direttiva 2013/39/UE (peso 1), o che al contrario siano inseriti nella lista delle sostanze "prioritarie" (peso 1.1) o in quella delle sostanze "pericolose e prioritarie" (peso 1.3). Il diverso peso assegnato ai vari composti ha lo scopo di conferire una maggiore rilevanza nella classificazione chimica dei sedimenti alla variazione di quegli inquinanti che siano caratterizzati da una più elevata tossicità, tendenza al bioaccumulo e persistenza nell'ambiente (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012).

L'elaborazione dei dati chimici inizia con il confronto delle concentrazioni misurate per ciascun parametro rispetto ai valori indicati nei riferimenti normativi. In funzione del riferimento, per ciascun parametro chimico analizzato, viene calcolata la variazione rispetto al limite, ovvero il *Ratio To Reference (RTR)* (equazione 3 del *flow-chart* di Figura 1.2.5.1); il valore di *RTR* viene corretto in funzione del "peso" del



contaminante per ottenere un valore di RTR_w (equazione 4), al fine di enfatizzare l'importanza delle variazioni osservate per i contaminanti più pericolosi. Il calcolo dell'indice di pericolo quantitativo (*Hazard Quotient*), specifico per la caratterizzazione chimica dei sedimenti (HQ_c), è ottenuto dalla media di tutti gli RTR_w dei parametri con $RTR \leq 1$ (cioè valori inferiori rispetto al limite del riferimento), addizionato con la sommatoria Σ degli RTR_w di tutti i contaminanti con $RTR > 1$ (equazione 5), dove N e M sono il numero dei parametri con RTR rispettivamente \leq o > 1 , mentre j e k sono indici che permettono di ripetere il calcolo per N o M volte (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012).

L'indice chimico HQ_c è assegnato ad una classe di pericolo (da assente a molto alto), identificata da un diverso colore: Assente/bianco se $HQ_c < 0.7$; Trascurabile/verde se $0.7 \geq HQ_c < 1.3$; Basso/azzurro se $1.3 \geq HQ_c < 2.6$; Medio/giallo se $2.6 \geq HQ_c < 6.5$; Alto/rosso se $6.5 \geq HQ_c < 13$; Molto Alto/nero se $HQ_c \geq 13$ (equazione 6).

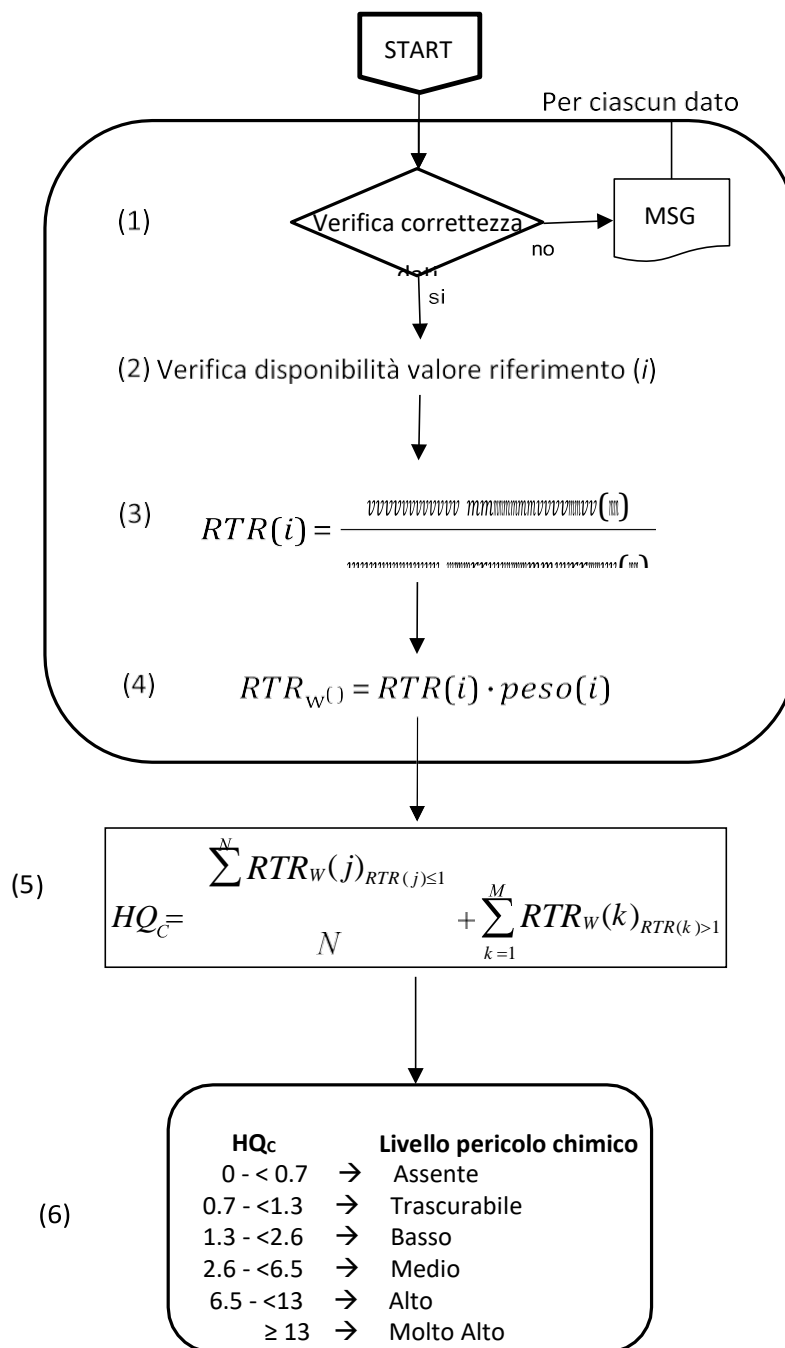


Figura 1.2.5.1. Flow-chart con la procedura per l’elaborazione dei dati di caratterizzazione chimica dei sedimenti.

1.2.5.2. Criteri di integrazione ponderata per l'elaborazione dei dati ecotossicologici e la definizione dell'indice di pericolo ecotossicologico dei sedimenti

L'elaborazione dei risultati ecotossicologici dei sedimenti è stata effettuata applicando i criteri di integrazione ponderata che sono stati recepiti dal D.M. n. 173 del 15 luglio 2016 *“Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini”*.

Tali criteri considerano aspetti importanti e caratteristiche specifiche dei singoli saggi biologici utilizzati nella batteria, tra cui la rilevanza tossicologica della risposta biologica misurata, l'entità e la significatività statistica della differenza di effetto tra campione e controllo, la sensibilità della specie testata, la tipologia di esposizione (acuta o cronica) e la matrice testata. In questo senso, per ciascuno dei saggi previsti nelle diverse tipologie di batterie è prevista una “soglia” di effetto che rappresenta la variazione minima ritenuta biologicamente significativa per ciascuna condizione sperimentale, e dei “pesi” che vengono attribuiti a ciascun saggio in funzione della rilevanza biologica dell'end-point misurato, della durata dell'esposizione, della matrice testata (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012).

Vengono di seguito descritti i passaggi e le procedure di calcolo per l'integrazione dei risultati e la formulazione del giudizio di tossicità di cui è riportato uno schema complessivo nella Figura 1.2.5.2:

- dopo la verifica dei dati, per ciascun saggio biologico viene calcolato l'effetto (E_i), inteso come variazione percentuale dell'endpoint misurato, compensato tramite la correzione di Abbott rispetto alle variazioni osservate nel controllo (equazione 2 del flow chart di Figura 1.2.5.2);
- l'effetto E_i viene corretto in base alla significatività statistica della variazione rispetto ai controlli, applicando il coefficiente Z (punto 3). Questa correzione riduce progressivamente il peso complessivo di un saggio non statisticamente significativo, ma non ne elimina completamente il contributo alla batteria;
- ciascun effetto (E_i) moltiplicato per il suo coefficiente Z , viene rapportato con la “soglia” specifica per quel saggio (equazione 4); l'effetto corretto ($E_{i,w}$) così ottenuto indica di quante volte la variazione misurata in un saggio supera quella ritenuta biologicamente rilevante;
- solo per determinati saggi, quando sia possibile ottenere un eventuale effetto ormetico (come nel caso della bioluminescenza batterica o della crescita algale), viene assegnato un valore di $E_{i,w}$ pari a 0 se l'effetto ormetico è < 40%, 1.25 se l'effetto ormetico è > 40% ma < 100%, pari a 1.5 se l'effetto ormetico è > 100%;
- l'indice di pericolo complessivo della batteria di saggi ecotossicologici (*Hazard Quotient*, $HQ_{Batteria}$) viene calcolato come sommatoria degli effetti pesati ($E_{i,w}$) dei singoli saggi (equazione 5 del flow-chart), ulteriormente corretti secondo il fattore W_2 che corrisponde al prodotto dei pesi assegnati in funzione della rilevanza biologica dell'endpoint considerato, della rilevanza ecologica della matrice testata, dell'esposizione acuta o cronica degli organismi.
- Per l'attribuzione del livello di pericolo derivante dalla batteria di saggi ecotossicologici, il valore ottenuto per l'indice $HQ_{Batteria}$ è normalizzato ad una scala compresa tra 0 e 10 (equazione 6), dove 1 corrisponde al

valore di soglia della batteria (cioè il valore di HQ che si otterrebbe se tutti i saggi della batteria mostrassero un effetto pari alla rispettiva soglia) e 10 corrisponde al valore massimo della batteria (quando tutti i saggi mostrano il 100% di effetto). A seconda del valore dell' $HQ_{Batteria}$ normalizzato, il livello di pericolo ecotossicologico viene attribuito ad una classe di gravità (da assente a molto alto), identificata da un diverso colore: Assente/bianco se $HQ_{Batteria} < 1$; Basso/azzurro se $HQ_{Batteria} \geq 1$ e < 1.5 ; Medio/giallo se $HQ_{Batteria} \geq 1.5$ e < 3 ; Alto/rosso se $HQ_{Batteria} \geq 3$ e < 6 ; Molto Alto/nero se $HQ_{Batteria} \geq 6$ (punto 6 del flow chart della Figura 1.2.5.2).

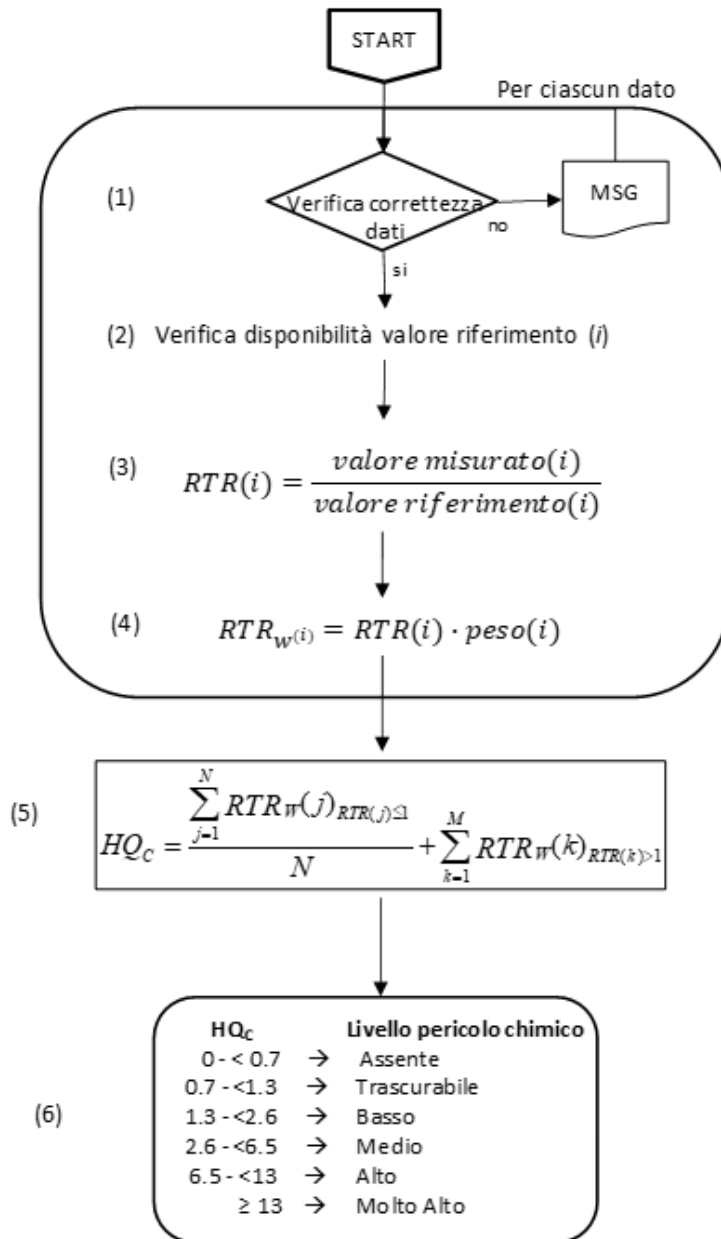


Figura 1.2.5.2. Flow-chart con la procedura per l’elaborazione dei dati delle analisi ecotossicologiche dei Sedimenti

1.2.5.3. Classificazione ponderata di qualità dei sedimenti

L'attribuzione della Classe di Qualità dei sedimenti è data dall'integrazione della classificazione chimica ed ecotossicologica ottenute attraverso l'applicazione dei criteri di integrazione ponderata descritti in precedenza. La classificazione ponderata (Tabella 7) e la successiva opzione di gestione sono state determinate mediante la procedura descritta nell'Allegato tecnico del DM 173 del 2016.

Tabella 7. Classificazione della Qualità dei sedimenti secondo i criteri di integrazione ponderata; HQ_c = Hazard Quotient (chimico).

Classe di pericolo ecotossicologico	Classificazione chimica	Classe di Qualità del materiale
Assente	$HQ_c(L2) \leq$ Trascurabile	A
	Basso $\leq HQ_c(L2) \leq$ Medio	B
	$HQ_c(L2) =$ Alto	C
	$HQ_c(L2) >$ Alto	D
Basso	$HQ_c(L1) \leq$ Basso	A
	$HQ_c(L1) \geq$ Medio e $HQ_c(L2) \leq$ Basso	B
	Medio $\leq HQ_c(L2) \leq$ Alto	C
	$HQ_c(L2) >$ Alto	D
Medio	$HQ_c(L2) \leq$ Basso	C
	$HQ_c(L2) \geq$ Medio	D
\geq Alto	$HQ_c(L2) \leq$ Basso	D
	$HQ_c(L2) \geq$ Medio	E

1.2.6 Analisi microbiologiche

I metodi impiegati in questa indagine hanno permesso la determinazione dei batteri indici di contaminazione fecale e di alcuni batteri di interesse igienico-sanitario nei campioni di sedimento oggetto di indagine. Sono state, inoltre, condotte analisi per l'isolamento dei miceti. I miceti sono microrganismi ampiamente diffusi negli ambienti naturali e partecipano, assieme ai batteri, al riciclo della materia organica e sono coinvolti nei cicli biogeochimici. Alcune specie di miceti possono essere causa di patologie a carico di piante ed animali, uomo compreso. A seconda del tipo di microrganismi ricercati, i risultati delle analisi

sono stati espressi come numero più probabile per grammo di peso secco di sedimento (*Most Probable Number* g^{-1} p.s.) (MPN· g^{-1} ps), o come unità formanti colonia per grammo di sedimento peso secco (UFC· g^{-1} ps).

I campioni di sedimento sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca di batteri indici di contaminazione fecale: Coliformi totali, Coliformi fecali, *Escherichia coli*, Streptococchi fecali tramite il metodo MPN (MPN g^{-1} ps). In funzione delle combinazioni di provette positive e negative in 3 repliche di diluizioni decimali del campione e dopo consultazione delle tabelle di MacCraday, realizzate in base al calcolo di probabilità statistiche, i risultati analitici sono stati espressi come MPN· g^{-1} ps. Tra gli indici di contaminazione fecale sono stati ricercati anche i Clostridi solfito-riduttori (spore comprese), i cui risultati sono stati espressi come unità formanti colonia UFC· g^{-1} ps). Sono stati, inoltre, ricercati mediante analisi qualitativa (presenza/assenza) di batteri appartenenti al genere *Salmonella* ed al genere *Staphylococcus*, con particolare attenzione verso i ceppi potenzialmente patogeni (produttori di coagulasi).

1.2.6.1. Coliformi totali

Per la ricerca dei Coliformi totali è stato utilizzato il terreno di coltura liquido Brodo Lattosato. Sono state allestite tre serie di cinque provette con campanelle di Durham, contenenti 10 ml di terreno di coltura liquido. Ciascuna serie è stata inoculata rispettivamente con aliquote equivalenti ad 1 g di campione tal quale, e 1 ml delle differenti diluizioni corrispondenti a 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 g di sedimento ed incubata in termostato alla Temperatura di 37°C. Dopo 24-48 h le provette sono state sottoposte a controllo per verificare la presenza di Torbidità e la produzione di gas nelle campanelle di Durham, in seguito allo sviluppo di microrganismi capaci di fermentare il lattosio presente nel terreno di coltura. Le provette risultate positive sono state, poi, sottoposte alla prova di conferma. Per la prova di conferma è stato utilizzato il terreno Brodo Bile Verde Brillante (BBVB) costituito da brodo lattosato addizionato di bile al 2% e verde brillante. Aliquote di 0,1 ml dalle brodoculture di ciascun campione risultato positivo sono state inoculate in provette contenenti terreno BBVB ed incubate a 37°C per confermare la presenza di Coliformi totali (IRSA 7000-7010, 1994). In base alle provette positive, che evidenziavano Torbidità e produzione di gas, e dopo consultazione della tabella di *MacCraday*, è stato possibile calcolare la concentrazione di Coliformi totali per grammo di campione fresco. Considerando le percentuali di umidità dei campioni di sedimento fresco, le concentrazioni di Coliformi totali sono state, infine, espresse come MPN· g^{-1} ps.

1.2.6.2. Coliformi fecali

Anche per la ricerca dei Coliformi fecali è stato utilizzato il terreno di coltura Brodo Lattosato. Sono state allestite tre serie di cinque provette con campanelle di Durham, contenenti 10 ml di terreno di coltura liquido. Ciascuna serie è stata inoculata rispettivamente con aliquote equivalenti a 1 g di

campione tal quale ed 1 ml delle differenti diluizioni corrispondenti a 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 g di sedimento ed incubate in termostato alla Temperatura di 37°C. Dopo 24 e 48 ore le provette sono state sottoposte a controllo per verificare quelle positive con Torbidità e presenza di gas nelle campanelle di Durham, per lo sviluppo di microrganismi capaci di fermentare il lattosio presente nel terreno di coltura. Le provette positive sono state poi sottoposte alla prova di conferma, per evidenziare tra i microrganismi lattosio fermentanti i batteri Coliformi fecali. Per la prova di conferma è stato utilizzato il terreno Brodo Bile Verde Brillante (BBVB) (brodo lattosato addizionato di bile al 2% e verde brillante). Da ciascun campione risultato positivo sono state prelevate aliquote di 0,1 ml ed inoculate in terreno di coltura BBVB, incubando a 44°C per 24–48 h (IRSA 7000-7020, 1994). In base alle indicazioni ottenute dalle provette positive, con Torbidità e produzione di gas, ed in seguito alla consultazione della tabella di *MacCrady*, è stato possibile calcolare la concentrazione dei batteri Coliformi fecali per unità di peso fresco (1 g) del campione in esame. Considerando le percentuali di umidità dei campioni di sedimento fresco, le concentrazioni di Coliformi fecali sono state espresse come MPN·g⁻¹ps.

Escherichia coli

Dalle provette di brodo lattosato risultate positive si è proceduto all'inoculo di 0,1 ml di brodocoltura in provette contenenti 5 ml di acqua triptonata ed incubando a 44,5 ±0,2 °C per 24 ±2 h. Dopo incubazione, alle brodoculture sono stati aggiunti 0,2 ml di reattivo di Kovac: dopo 10 min, la formazione di un colore rosso scuro nella fase alcolica è indice di positività al test dovuta allo sviluppo di *E. coli* (IRSA 7000-7020, 1994). Considerando le percentuali di umidità dei campioni di sedimento fresco, le concentrazioni di *E. coli* sono state espresse come MPN·g⁻¹ps.

1.2.6.3. Streptococchi fecali (Enterococchi intestinali)

Per la ricerca presuntiva degli Streptococchi fecali è stato utilizzato il terreno di coltura Brodo Azide (brodo glucosato con azide sodica). Sono state allestite tre serie di cinque provette con 10 ml di brodo di coltura. Ciascuna serie è stata inoculata con 1 g di campione tal quale e 1 ml delle differenti diluizioni corrispondenti a 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 g di sedimento ed incubate in termostato alla Temperatura di 37°C. Dopo 24-48 h di incubazione, le provette sono state controllate per verificare la presenza di Torbidità del terreno di coltura e la formazione di un deposito biancastro sul fondo. Le brodoculture risultate positive sono state, quindi, sottoposte a prova di conferma trasferendone un'aliquota di 0,1 ml in brodo glucosato contenente etilvioletto e azide sodica (EVA Broth) ed incubando a 36°C fino a 48 h. Sono state considerate positive le brodoculture che evidenziavano Torbidità e formazione di un deposito violetto (IRSA 7000-7040, 1994). Dalla combinazione delle provette confermate positive, e dopo consultazione della tabella di *MacCrady*, è stato possibile calcolare la concentrazione di Streptococchi fecali per 1 g di campione in esame. Considerando le percentuali di umidità dei campioni di sedimento fresco, le concentrazioni di Streptococchi fecali sono state

esprese come MPN·g⁻¹ps.

Salmonella spp.

Il metodo ha per oggetto la determinazione della presenza dei batteri appartenenti al genere *Salmonella* nei sedimenti. I prearricchimenti per la ricerca dei batteri del genere *Salmonella*, allestiti inoculando 25 g di sedimento in 225 ml di Acqua Peptonata Tamponata, sono stati incubati in termostato a 37°C. Dopo incubazione overnight è stato effettuato l'arricchimento selettivo trasferendo 10 ml della coltura di prearricchimento in 100 ml di Rappaport Vassiliadis Soya broth (RVS) ed incubando a 42°C per 24 h; contemporaneamente, 5 ml della stessa coltura di prearricchimento sono stati trasferiti anche in 50 ml di Muller Kauffmann Tetrathionate broth (MKTT) addizionato di 20 mg L⁻¹ di novobiocina, ed incubati a 37°C per 24 h. Ciascun arricchimento selettivo, successivamente, è stato strisciato su piastre di XLD agar e Agar Verde Brillante (BGA). Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 h. Le colonie morfologicamente riferibili al genere *Salmonella*, cresciute su ciascuna piastra, sono state trasferite in piastre di Agar Nutrient ed incubate a 37°C per 18-24 h. Sono state successivamente effettuate prove di conferma biochimica inoculando le colonie selezionate in Kligler Iron Agar (KIA) ed incubando per 24 h a 37°C; in caso di prove biochimiche compatibili con *Salmonella* è stata effettuata la prova di conferma sierologica per evidenziare la presenza di antigeni specifici.

1.2.6.4. Stafilococchi

Per la ricerca dei batteri appartenenti al genere *Staphylococcus* nei campioni di sedimento sono state allestite diluizioni seriali decimali a partire da 25 g di sedimento. Aliquote di 0,1 ml delle diluizioni del sedimento sono state piastrate, mediante la spatolamento, su Baird-Parker Agar. Le piastre sono state poi incubate a 36 ±1 °C per 24-48 h. Dopo l'esecuzione della prova della catalasi, per verificare la presenza di fattori di virulenza tra i ceppi di *Staphylococcus* isolati si è proceduto all'esecuzione del test della coagulasi. La coagulasi è un enzima presente nella maggior parte dei biotipi appartenenti alla specie *Staphylococcus aureus* e in alcuni biotipi appartenenti alle specie *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*, patogeni opportunisti per gli animali; la coagulasi è, di solito, assente nelle specie saprofiti e commensali (Rapporti ISTISAN 07/5). Considerando le percentuali di umidità dei campioni di sedimento fresco, i risultati finali relativi alle concentrazioni di *Staphylococcus* coagulasi positivi sono stati espressi come UFC·g⁻¹ps.

1.2.6.5. Clostridi solfito-riduttori

Il metodo basato sul conteggio delle colonie in terreno selettivo, utilizzando la tecnica dell'inclusione, consente di rilevare la concentrazione dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* in grado di ridurre il solfito. Per ogni campione di sedimento sono state allestite diluizioni seriali decimali a partire da 1 g pu di sedimento. Con 1 ml della sospensione del campione sono state effettuate le rispettive semine, in

doppio, per inclusione in piastre Petri con Solfito-Polimixina-Solfadiazina agar (SPS), contenente solfito di sodio e citrato ferrico. Le piastre sono state incubate a 37°C in giare per anaerobiosi, per un periodo di 24-24 h. Dopo incubazione, sono state eseguite prove di conferma sul 5% delle colonie presuntive, previo trasferimento su terreno di coltura TSA o agar Columbia al 5% di sangue di montone, e successivamente sottoposte a colorazione di Gram e prova della catalasi. I risultati finali sono stati espressi come UFC g⁻¹ps. Nel corso delle analisi, controlli di qualità sono stati effettuati con prove atte a valutare l'efficienza del metodo, utilizzando standard specifici contenenti una Densità nota di microrganismi (ICRAM Scheda 6S, 2001-2003).

1.2.6.6. Miceti

Per la ricerca dei miceti, dai campioni di sedimento sono state allestite diluizioni seriali decimali a partire da 1 g pu di sedimento. Aliquote di 0,1 ml di ciascuna diluizione sono state seminate, mediante la tecnica di spatolamento, in piastre di Petri contenente *Sabouraud Dextrose Agar* addizionato dell'antibiotico cloramfenicolo. Le piastre così inoculate sono state incubate alla Temperatura di 25 °C per 3-5 giorni. Successivamente si è proceduto all'osservazione delle colonie al microscopio ottico. Per la conferma dei lieviti, una piccola aliquota della colonia, stemperata in una goccia di acqua distillata sterile su un vetrino portaoggetti, è stata osservata al microscopio contrasto di fase (ingrandimento 200-400X), per evidenziare la presenza di forme a lievito o di pseudoife. L'osservazione microscopica (ingrandimento 200-400X) dei funghi filamentosi è stata effettuata con l'impiego di blu cotone in lattofenolo per distinguere eventuali corpi fruttiferi (Rapporti ISTISAN 96/35; Quaderno 64 – IRSA/CNR 1983). Le concentrazioni di miceti rilevate, tenendo conto della percentuale di umidità dei campioni di sedimento, sono state espresse UFC·g⁻¹ps.

1.2.7 Analisi del Biota

1.2.7.1. Comunità macro-zoobentoniche

I campioni raccolti sono stati successivamente smistati in laboratorio mediante osservazione con stereomicroscopio binoculare: gli individui raccolti sono stati divisi nei singoli taxa (sorting) e successivamente contati e identificati fino al più basso livello tassonomico possibile (LPT= Lowest Possible Taxon) coincidente quasi sempre con il livello di specie. Per la determinazione tassonomica degli individui e le caratteristiche ecologiche delle specie rinvenute sono stati consultati i testi e gli articoli elencati nella bibliografia ecologico-tassonomica e per la corretta nomenclatura delle specie sono state utilizzate la Checklist della fauna italiana ed il *World Register of Marine Species* (WoRMS). Quest'ultimo, oltre a fornire una lista autorevole e completa dei nomi di organismi marini a livello mondiale, fornisce indicazioni sulle eventuali sinonimie riscontrate.

Il numero di specie rinvenute de minimis, ovvero gli individui identificati come taxon ind. sono stati conteggiati solo se non presenti altri esemplari dello stesso taxon a livello sistematico inferiore. Ad esempio

se nel foglio sono presenti *Ampelisca diadema* e *Ampelisca ind.*, quest'ultima non verrà conteggiata, al contrario, se è presente *Ampelisca ind* e nessun altro esemplare appartenente al genere *Ampelisca*, l'individuo ind. andrà conteggiato. Tale matrice è stata quindi utilizzata per le successive analisi. Per gli indici strutturali sono stati utilizzati i soli taxa identificati a livello di specie.

La struttura dei popolamenti macrozoobentonici che vivono nell'area oggetto di studio è stata descritta tramite studio tassonomico condotto sui campioni del benthos, ma sono stati visionati anche i dati relativi alla granulometria dei sedimenti per le stesse stazioni, prendendo in considerazione così anche la natura fisica del substrato. Per lo studio delle comunità bentoniche, infatti, è essenziale analizzare la natura dei rapporti che esse contraggono con il substrato su cui vivono: la natura dello stesso è un fattore di importanza fondamentale nella loro distribuzione, sia da un punto di vista strutturale che trofico - funzionale, poiché gli organismi stabiliscono un rapporto intimo con il fondo marino.

Ai fini dello studio delle aree in oggetto è stata analizzata la struttura trofica della comunità in quanto il comportamento alimentare degli organismi bentonici è strettamente correlato, oltre che alla disponibilità del cibo, a fattori ambientali quali la natura del substrato, il contenuto in materia organica, la profondità, l'idrodinamismo, l'esposizione. L'analisi trofica fornisce un quadro delle modalità in cui l'energia solare, convertita e immagazzinata in forma chimica dai vegetali mediante la fotosintesi, viene distribuita nella zoocenosi; gli organismi stenotrofici, poco o per nulla eclettici sul piano alimentare, forniscono indicazioni sulla prevalenza o meno di uno o più parametri ambientali.

La categoria trofica di un organismo animale può essere definita come l'insieme delle relazioni tra la composizione delle particelle di cibo, le loro dimensioni e il meccanismo implicato nell'assunzione. Sulla base della composizione e delle modalità di raccolta del cibo, ciascuna specie è stata attribuita a uno dei seguenti gruppi trofici: Carnivori, Erbivori, Onnivori, Sospensivori, Detritivori e Limivori.

Analisi dei dati

I dati di abbondanza sono stati elaborati e la struttura della comunità macrozoobentonica è stata descritta tramite le seguenti variabili strutturali ed indici ecologici:

- Dominanza (D): l'importanza quantitativa dei taxa più numerosi rinvenuti, espressa in percentuale sul totale degli individui raccolti;
- Abbondanza totale (N): il numero complessivo di individui per stazione;
- Ricchezza specifica totale (S): il numero totale di specie presenti in ogni stazione;
- Diversità di specie: un parametro ottenuto rapportando l'abbondanza totale e la ricchezza specifica tra loro e con i dati relativi all'intero stock campionato; per l'analisi di questo parametro esistono diversi indici; in questo studio è stato utilizzato l'indice di Diversità specifica di Shannon-

Wiener (H' ; Shannon & Weaver, 1949):

$$H' = \sum_{i=1}^s (p_i)(\log_e p_i)$$

dove p_i = frequenza numerica della specie i -esima rispetto al totale degli individui = n_i/N

dove s = numero di specie

- Equitabilità di Pielou (J' - Pielou, 1974): una misura della distribuzione degli individui tra le specie e si basa sulla teoria dell'informazione di Shannon-Wiener:

$$J = H' / H'_{max}$$

dove H'_{max} = valore massimo di $H' = \log_2 S$ (se $p=1/S$)

Le comunità macrozoobentoniche di fondo mobile adottano differenti strategie adattative come risposta a stress ambientali. I numerosi lavori che attestano l'importanza dell'impiego degli organismi bentonici di fondi mobili come bioindicatori dello Status di Qualità Ecologica (EQS) si riferiscono all'utilizzo di particolari indici biotici nella valutazione di impatti naturali ed antropici per le acque costiere e di transizione. In particolare, in questo studio sono stati utilizzati: gli indici AMBI e M-AMBI.

L'indice AMBI (Borja et al., 2000) si basa sulla classificazione di specie (o gruppi di specie) in gruppi ecologici rappresentanti livelli di sensibilità o tolleranza ai diversi tipi di inquinamento. L'indice identifica 5 gruppi ecologici in funzione dell'arricchimento organico: GI (specie molto sensibili), GII (specie indifferenti), GIII (specie tolleranti), GIV (specie opportunistiche di secondo ordine), GV (specie opportunistiche di primo ordine). La distribuzione di questi gruppi ecologici, in accordo con la loro sensibilità allo stress d'inquinamento, fornisce una "Disturbance classification" di otto livelli (da 0 a 7) con valori crescenti di disturbo e 5 livelli di Ecological Quality Status (ECoQ). I dati calcolati sono stati riportati in tabella 8.

L'indice M-AMBI (Multimetric-AZTI Marine Biotic Index), permette una valutazione sinecologica dell'ecosistema in esame. È basato sull'analisi della struttura della comunità a macroinvertebrati bentonici, considerando il valore ecologico delle specie di macrozoobenthos di fondi mobili. Le specie sono suddivise in cinque gruppi ecologici (opportuniste (I ordine), opportuniste (II ordine), tolleranti, sensibili/tolleranti e sensibili) in relazione alla sensibilità ai gradienti di stress ambientale. L'indice descrive lo stato di qualità dell'EQB macroinvertebrati bentonici in 5 classi: elevato, buono, sufficiente, scarso e cattivo.

Tabella 8. Valori dell'indice Ambi e riferimenti di ECoQ

<i>Disturbance classification</i>	AMBI	<i>Ecological Quality Status (ECoQ)</i>
<i>Undisturbed</i>	0,0 < AMBI < 1,2	<i>High</i>
<i>Slightly disturbed</i>	1,2 < AMBI < 3,3	<i>Good</i>
<i>Moderately disturbed</i>	3,3 < AMBI < 4,3	<i>Moderate</i>

<i>Heavily disturbed</i>	4,3 < AMBI < 5,5	<i>Poor</i>
<i>Extremely disturbed</i>	5,5 < AMBI < 7,0	<i>Bad</i>

1.2.7.2. Inquinanti prioritari nelle comunità macro-zoobentoniche

Per quanto riguarda le analisi di bioaccumulo sugli organismi del benthos, è stato possibile recuperare un unico individuo di bivalve *Callista* spp. proveniente dalla stazione SF-65. Su questo unico campione si è deciso di analizzare il contenuto di pesticidi organoclorurati, pesticidi organofosfati, clorofenoli, clorobifenili, policlorobifenili (PCB), polibromo-difenil eteri ed altri ritardanti di fiamma organo brominati. I composti analizzati sono quelli già riportati nella Tabella 1.2.1.1. Il tessuto umido è stato addizionato con una soluzione di n-esano:acetone (2:1) in un rapporto di 1:3, peso campione rispetto al volume di solvente (m:v). Dopo una vigorosa agitazione, il campione è stato estratto utilizzando un sistema di estrazione controllata a microonde, alla Temperatura di 110°C per 15 minuti (Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM Corporation). La soluzione è stata purificata con tecniche di estrazione in fase solida (SPE) utilizzando resine di estrazione del tipo Strata-X (Phenomenex, Strata-X 33u Polymeric Reversed Phase) da 500 mg e 6 ml, oltre a resine del tipo Strata-FL (Phenomenex, FL-PR) da 1000 mg e 6 ml, utilizzando il sistema automatico Gilson Aspec GX271. Il campione eluito con l'ausilio di una soluzione di acetone ed esano è stato raccolto in tubo pyrex e quindi concentrato a secchezza in un evaporatore centrifugo (SpeedVack Juan RC 1009). Infine, il campione è stato solubilizzato in 1 ml di n-esano. Le determinazioni analitiche sono state effettuate mediante gascromatografia accoppiata a spettrometro di massa con singolo quadrupolo (Agilent Technology) insieme ai campioni di mitili.

1.3. Biota

Per lo studio del bioaccumulo di contaminanti organici e inorganici in organismi filtratori e per le analisi di biomarker sono stati trapiantati circa 200 esemplari di *Mytilus galloprovincialis* in ognuno dei 5 siti di indagine. Le stazioni MW1, MW2 e MW3 erano ubicate all'interno del Porto mentre le stazioni MW4 e MW5 all'esterno (Figura 1.3, Tabella 1.3).



Figura 1.3 - Ubicazione dei siti di indagine per lo studio del bioaccumulo in organismi filtratori.

Tabella 1.3 – Bioaccumulo in organismi filtratori: data e ora dell'impianto e dei prelievi, coordinate e profondità dei siti di indagine.

Sito	Latitudine GG PP.dd	Longitudine GG PP.dd	Profondità sito (m)
MW1	40° 40.402'N	14° 44.902'E	6
MW2	40° 40.335'N	14° 45.183'E	5
MW3	40° 40.048'N	14° 44.755'E	2
MW4	40° 39.717'N	14° 44.803'E	13
MW5	40° 40.003'N	14° 44.057'E	9

1.3.1 Bioaccumulo di contaminanti organici e inorganici in mitili trapiantati (Mussel Watch)

Per le analisi chimiche, per ogni punto di campionamento sono stati preparati 10 pool, ciascuno costituito dalle intere parti molli di circa 5 organismi, rapidamente congelati in azoto liquido e successivamente conservati a -20°C fino alla determinazione delle concentrazioni tissutali dei metalli, composti organostannici, idrocarburi policiclici aromatici, idrocarburi alifatici e composti organici di sintesi.

Le analisi dei parametri chimici nei tessuti dei mitili sono state condotte, per ogni punto di campionamento, su 5 aliquote omogenee di campione, ognuna costituita dai tessuti di almeno 5 individui.

1.3.2. Determinazione dei metalli

Per la determinazione dei metalli, tra cui alluminio (Al), arsenico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), ferro (Fe), manganese (Mn), mercurio (Hg), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), vanadio (V) e zinco (Zn), i campioni di tessuto sono stati pesati (tessuto umido) e successivamente essiccati alla Temperatura di $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per almeno 8 ore. Il rapporto tra il peso umido ed il peso secco dei campioni ha consentito di convertire in peso secco le aliquote umide destinate ad altre determinazioni analitiche. I campioni sono stati quindi polverizzati con l'ausilio di un mortaio, ed aliquote omogenee pari a circa 0.5 g (per i mitili) sono state trasferite in appositi contenitori per mineralizzazione sotto pressione in forno a microonde, previa addizione di 2 ml di H_2O_2 e 5 ml di HNO_3 . La mineralizzazione è stata condotta mediante sistema a microonde CEM Mars 5 (CEM Corporation), dotato di sistema controllo e regolazione di Temperatura e potenza delle microonde. Al termine del ciclo di mineralizzazione i campioni sono stati raffreddati a Temperatura ambiente quindi recuperati e portati a volume noto, con acqua ultrapura (10 ml).

La determinazione analitica dei metalli è stata effettuata mediante tecniche di spettrofotometria ad assorbimento atomico; Cu, Fe, Mn e Zn sono stati determinati mediante atomizzazione in fiamma con spettrofotometro SpectrAA 220FS (Agilent Technologies), mentre Al, As, Cd, Cr, Ni, Pb e V sono stati analizzati mediante spettrofotometro SpectrAA 240Z (Agilent Technologies), munito di elettrofornace GTA120 con microforno di grafite ed effetto Zeeman; quando necessario l'interferenza della matrice è stata risolta utilizzando apposite soluzioni di modificatori di matrice (palladio 1 g/l, 10% acido citrico, 20% HNO_3), mentre le interferenze spettrali sono state verificate utilizzando standardizzazioni con metodo delle aggiunte. La determinazione del mercurio (Hg) è stata eseguita tramite generazione di vapori freddi utilizzando un apposito analizzatore di mercurio CETAC QuickTrace M-6100 Mercury Analyzer (Agilent Technologies) munito di auto campionatore ASX-130.

Tutte le determinazioni analitiche sono state effettuate previa calibrazione della strumentazione analizzando apposite soluzioni di bianco e standard di riferimento (SRM-NIST 2977) a concentrazione nota e certificata; i risultati finali sono stati espressi in $\mu\text{g/g}$ (peso secco).

La determinazione dei composti organo-stannici è stata effettuata utilizzando un'aliquota omogenea di ciascun campione, pari a circa 2-3 g di tessuto umido, addizionati con una soluzione di *n*-esano:acetone (2:1) in un rapporto di 1:3, peso campione rispetto al volume di solvente (m:v). Successivamente, i campioni sono stati estratti utilizzando un sistema di estrazione controllata a microonde, alla Temperatura di 110°C per 15 minuti (Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM Corporation). Le soluzioni così ottenute sono state concentrate a secchezza, mediante un evaporatore centrifugo (SpeedVack Juan RC 1009), alla

Temperatura ambiente. Infine, i campioni sono stati solubilizzati in 1 ml di acido nitrico (HNO_3) e portati a volume noto (2 ml) con acqua ultrapura. Per il TBT, un'aliquota dell'estratto è stata trattata con NaOH 10M per la precipitazione e l'allontanamento delle specie mono- e di-butilate. La successiva determinazione analitica è stata effettuata mediante le tecniche di spettrofotometria ad assorbimento atomico precedentemente descritte, utilizzando microforno di grafite ed effetto Zeeman, mediante l'uso di modificatore di matrice (palladio 1 g/l, 10% acido citrico, 20% HNO_3) e applicando standardizzazione con metodo delle aggiunte. Il risultato finale è stato espresso in $\mu\text{g/g}$ (peso secco), convertendo il peso umido dei campioni in peso secco, mediante il rapporto determinato in precedenza.

1.3.3. Determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

La determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei tessuti dei mitili è stata effettuata utilizzando un'aliquota omogenea di campione, pari a circa 2-3 g in peso umido. Al momento della preparazione, i campioni sono stati addizionati con 5 ml di una soluzione di KOH 0.5 M in metanolo puro per cromatografia liquida e mantenuti in agitazione per almeno 8 ore, al fine di operare una preliminare estrazione solido-liquido. Il completamento dell'estrazione è stato eseguito mediante microonde a 55°C per 15 min (Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM). I campioni sono stati concentrati a circa 0.5 ml mediante centrifuga evaporante (Speedvack, Juan), a 45°C per 60- 120 min, successivamente purificati attraverso una cromatografia a bassa pressione con resine per estrazione in fase solida (SPE) del tipo Backerbond SPE C18 (500 mg, 6 ml) ed infine recuperati in 1 ml di acetonitrile puro per cromatografia liquida. Tale purificazione è stata effettuata utilizzando il sistema automatico *Gilson Aspec GX271* (Gilson Inc.). Le determinazioni analitiche sono state effettuate mediante tecniche di cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) utilizzando un sistema di pompe per gradiente binario e coppia di detector in Fluorescenza e serie di diodi *Agilent Infinity 1260 Series* (Agilent Technologies).

L'analisi è stata condotta mediante gradiente dinamico utilizzando acqua ultrapura e acetonitrile come fasi mobili. Il volume di campione iniettato è stato pari a 20 μl ed è garantito costante per tutte le analisi utilizzando un apposito auto-campionatore. La determinazione qualitativa e quantitativa degli analiti è stata eseguita attraverso il confronto dei cromatogrammi e dei segnali, con quelli ottenuti iniettando soluzione standard a concentrazioni note e scalari, preparate utilizzando una miscela di idrocarburi aromatici puri (EPA 610, Supelco). Gli analiti determinati mediante il metodo appena descritto possono essere classificati in IPA a basso peso molecolare (acenaftene, acenaftilene, antracene, fenantrene, fluorene e naftalene), IPA ad alto peso molecolare (benzo(a)antracene, benzo(a)pirene, benzo(b)fluorantrene, benzo(g,h,i)perilene, benzo(k)fluorantrene, crisene, dibenzo(a,h)antracene, fluorantrene, indeno(1,2,3-cd)pirene, pirene) ed alcuni IPA metilati (1- metilnaftalene, 2-metilnaftalene e 7,12-dimetilbenzo(a)antracene); l'accuratezza e la precisione analitica sono state verificate analizzando apposite soluzioni di bianco e standard di riferimento

(SRM- NIST 2977). Le concentrazioni sono espresse in ng/g di campione (peso secco), convertendo il peso umido dei campioni in peso secco, mediante il rapporto determinato in precedenza.

1.3.4 Determinazione degli idrocarburi alifatici totali (C₁₀-C₄₀)

La determinazione di idrocarburi alifatici totali (C₁₀-C₄₀) nei mitili è stata effettuata mediante tecniche di gascromatografia (GC); aliquote pari a circa 2-3 g di tessuto umido sono state addizionate con una soluzione di *n*-esano:acetone (2:1) in un rapporto di 1:3, peso campione rispetto al volume di solvente (m:v). Dopo una vigorosa agitazione, i campioni sono stati estratti utilizzando un sistema di estrazione controllata a microonde, alla Temperatura di 110°C per 15 minuti (*Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM Corporation*).

Le soluzioni così ottenute sono state purificate con tecniche di estrazione in fase solida (SPE) utilizzando resine di estrazione del tipo Strata-X (*Phenomenex, Strata-X 33u Polymeric Reversed Phase*) da 500 mg e 6 ml, oltre a resine del tipo Strata-FL (*Phenomenex, FL-PR*) da 1000 mg e 6 ml, utilizzando il sistema automatico *Gilson Aspec GX271*. I campioni eluiti con l'ausilio di soluzioni di acetone ed esano sono stati raccolti in appositi tubi pyrex e quindi posizionati all'interno di un evaporatore centrifugo (*SpeedVack Juan RC 1009*), dove sono stati concentrati fino a secchezza, alla Temperatura ambiente. Infine, i campioni sono stati solubilizzati in 1 ml di *n*-esano. L'analisi degli idrocarburi alifatici è stata effettuata mediante gascromatografia con detector a ionizzazione di fiamma (FID) (*Perkin Elmer Clarus 500*); la determinazione quantitativa è stata effettuata calibrando il sistema mediante uno standard puro costituito da un mix di specie chimiche di idrocarburi con pari numero di carbonio da C₁₀ a C₄₀, lineari ed insaturi, conforme alle specifiche EN ISO 9377-3; i risultati finali sono stati espressi in µg/g (peso secco), convertendo il peso umido dei campioni in peso secco, mediante il rapporto determinato in precedenza.

1.3.5. Determinazione di pesticidi organoclorurati, pesticidi organofosfati, clorofenoli, clorobifenili, policlorobifenili (PCB), polibromo-difenil eteri ed altri ritardanti di fiamma organo brominati

Nella Tabella 9 viene riportata la lista completa dei pesticidi organoclorurati, pesticidi organofosfati, clorofenoli, clorobifenili, policlorobifenili, polibromo-difenil eteri ed altri ritardanti di fiamma organo brominati che sono stati analizzati nei tessuti dei mitili. La preparazione dei campioni è analoga a quella già descritta per gli idrocarburi alifatici totali C₁₀-C₄₀. Le determinazioni analitiche sono state effettuate

mediante gascromatografia accoppiata a spettrometro di massa con singolo quadrupolo (*Agilent Technology*). Al fine di garantire l'accuratezza e la precisione delle misure, durante ogni sessione analitica sono state processate soluzioni di bianco preparate con le stesse procedure descritte per i campioni, apposite soluzioni a diverse concentrazioni di standard analitici puri, oltre a standard di riferimento (SRM- NIST 2977) a concentrazione nota e certificata, e miscele di standard puri a concentrazioni note delle varie classi di contaminanti. Le concentrazioni sono state espresse in ng/g riferite al peso secco dei campioni, convertendo il peso umido dei campioni in peso secco, mediante il rapporto determinato in precedenza.

Tabella 9. Elenco dei contaminanti organici persistenti analizzati.

<u>Pesticidi clorurati (EPA 8081)</u>	<u>Fenoli clorurati</u>	<u>PCB (continua):</u>
Aldrina	2-Clorofenolo	PCB70
α -Clordano	4-Clorofenolo	PCB77
γ -Clordano	2,4-Diclorofenolo	PCB81
p,p'-DDD	2,4,6-Triclorofenolo	PCB90
p,p'-DDE		PCB101
p,p'-DDT		PCB105
Dieldrina	<u>Clorobifenili</u>	PCB118
Endosulfano I		PCB126
Endosulfano II	2-Clorobifenile	PCB127
Endosulfano (solfato)	3-Clorobifenile	PCB128
Endrina	4-Clorobifenile	PCB130
Endrina (aldeide)		PCB138
Endrina (chetone)		PCB146
Eptacloro	<u>Policlorobifenili (PCB):</u>	PCB153
Eptacloro (epossido)		PCB156
α -Lindano	PCB4	PCB169
β -Lindano	PCB7	PCB170
δ -Lindano	PCB8	PCB175
γ -Lindano	PCB11	PCB180
Metossicloro	PCB13	PCB182
	PCB15	PCB187



<u>Altri pesticidi clorurati</u>	PCB16	PCB195
	PCB17	PCB206
	PCB18	PCB209
Diclorobenzidina	PCB19	
Esaclorobenzene	PCB23	
Esaclorobutadiene	PCB26	<i>Polibromodifelineteri ed altri</i>
Mirex	PCB28	<u>ritardanti fiammabrominati</u>
	PCB32	
<u>Pesticidi organofosfati</u>	PCB33	PBDE28
	PCB36	PBDE47
	PCB38	PBDE99
Azinphos-methyl	PCB40	PBDE100
Chlorpyrifos	PCB42	PBDE153
Dichlorvos	PCB44	PBDE154
Disulfoton	PCB45	PBDE183
Ethoprophos	PCB46	Esabromociclododecano
Fenchlorphos	PCB47	Tetrabromobisfenolo-A
Metilparathion	PCB52	
Metolcarb	PCB58	
Prothiofos	PCB66	

1.3.2. Analisi di biomarker

Per quanto riguarda le analisi dei biomarker, è stata identificata una lista di parametri standardizzati e riconosciuti a livello scientifico internazionale e già utilizzati da organizzazioni e gruppi di lavoro europei (OSPAR, ICES, MedPol). I biomarker analizzati nei mitili si riferiscono alla stabilità delle membrane lisosomiali, la capacità fagocitaria, il rapporto granulociti/ialinociti, la frequenza dei micronuclei e l'attività dell'acetilcolinesterasi nell'emolinfa, l'analisi nella ghiandola digestiva della acil-CoA ossidasi, del glutatione totale, degli enzimi antiossidanti (GR, GST, GPx, CAT) della Capacità Antiossidante Totale. Oltre che per la validità scientifica e l'elevato grado di standardizzazione e riconoscimento internazionale, questi biomarker sono noti anche per la loro semplicità, possibilità di essere trasferiti alle agenzie di controllo e potenziale applicazione a più gruppi funzionali di habitat dominanti, in funzione delle caratteristiche territoriali locali.

La stabilità delle membrane lisosomiali rappresenta un biomarker estremamente sensibile, indicativo dello stato di salute generale dell'organismo e della comparsa precoce di condizioni di stress ossidativo (Moore, 1982; Regoli, 1992; Moore et al., 2006). Tale parametro è stato misurato nell'emolinfa dei mitili (0.5 ml) prelevata dal muscolo adduttore anteriore, mediante siringa ipodermica contenente un eguale volume di soluzione fisiologica (protocollo ufficiale ICES No 56, 2015). Una aliquota di tale sospensione è stata poi dispersa su un vetrino da microscopia dove le cellule sono state lasciate aderire per 15 min a 4°C in camera buia e umida. Dopo la rimozione dell'eccesso di emolinfa, le cellule sono state incubate con una soluzione di Rosso Neutro ed esaminate ad intervalli di 15 min (fino ad un tempo massimo di 120 min) per determinare il tempo al quale il 50% degli emociti presenta il Rosso Neutro non più compartimentalizzato nei lisosomi ma rilasciato nel citosol. La soluzione stock di Rosso Neutro è stata preparata dissolvendo 28.8 mg di colorante in 1 ml di dimetilsolfossido (DMSO) e conservata a 4°C per non più di 3 settimane; al momento dell'analisi 10 µl di soluzione stock sono stati diluiti in 5 ml di soluzione fisiologica.

La capacità fagocitaria, è stata misurata su emolinfa fresca, prelevata come per la stabilità delle membrane lisosomiali, dal muscolo adduttore degli organismi (Benedetti et al., 2014). Nello specifico 50 µL di emolinfa vengono incubati al buio in camera umida per due ore con 50 µL di Zymosan (lieviti fluorescenti in polvere). La soluzione di lieviti fluorescenti si ottiene preparando una soluzione madre composta da 1 mg di polvere di Zymosan in 50 µL di PBS e 1 µL di NaN₃, successivamente 1 µL di questa soluzione viene diluita in 150 µL di soluzione fisiologica (acqua di mare sintetica al 37 ‰ filtrata). Dopo l'incubazione, i campioni vengono sciacquati in soluzione fisiologica (acqua di mare sintetica), fissati in Baker's Ca-formolo e montati tramite Eukitt; l'analisi tramite microscopia ottica e a Fluorescenza valuta la percentuale di granulociti che al termine delle due ore di incubazione hanno fagocitato almeno tre cellule di lievito fluorescente. *Il rapporto granulociti vs. ialinociti* rappresenta un'altra risposta del sistema immunitario dei mitili, complementare alla capacità fagocitaria. Nello specifico, 50 µL di emolinfa prelevata dal muscolo adduttore degli organismi, vengono fatti

aderire su vetrino da microscopia per circa 10 minuti e, dopo averne eliminato l'eccesso, vengono fissati in Baker's Ca-formolo per 15 minuti (Benedetti et al., 2014). Dopo un risciacquo in acqua deionizzata, il campione viene lasciato per 3 minuti in ematossilina, la quale colora di viola gli acidi nucleici, le membrane e le proteine di membrana. Seguono una serie di lavaggi in acqua corrente e acido cloridrico (HCl 0,5%) e la successiva colorazione in eosina 1% (fa risultare rosa le componenti acidofile, come mitocondri e proteine cellulari) per 3 minuti. Dopo il risciacquo finale ed il montaggio in Eukitt, il rapporto cellulare granulociti ialinociti viene misurato tramite microscopia ottica; il numero dei granulociti (cellule rosa con pseudopodi) e degli ialinociti (cellule viola, con un nucleo evidente) vengono contati su un totale di 200 cellule.

La frequenza dei micronuclei (MN), è stata determinata nelle sospensioni di emolinfa conservate in fissativo di Carnoy (acido acetico:metanolo 1:3), successivamente strisciate su vetrino da microscopia e colorate con un colorante specifico per il DNA, il 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI), alla concentrazione di 1 µg/ml. Per il loro riconoscimento e conteggio i micronuclei vengono descritti come piccole strutture rotonde e ben definite, con una grandezza inferiore a un terzo del diametro del nucleo principale, completamente separati da esso e posizionati sullo stesso piano ottico. La valutazione della frequenza di comparsa dei MN è effettuata attraverso l'osservazione con microscopio a Fluorescenza e conta cellulare; per ciascun campione vengono analizzate almeno 2000 cellule e i risultati sono espressi come percentuale di cellule con micronuclei (Bolognesi et al., 2004; protocollo ufficiale ICES No 315, 2012).

L'attività dell'acetilcolinesterasi è stata determinata nei campioni di emolinfa opportunamente centrifugati per 5 minuti a 3.000 xg. Il sovrinatante è stato utilizzato per determinare l'attività della acetilcolinesterasi (ACh) secondo il metodo di Ellman, alla Temperatura di $18 \pm 1^\circ\text{C}$, alla lunghezza d'onda di 412 nm, con $\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ellman et al., 1961; protocollo ufficiale ICES No 22, 1998).

L'analisi dell'attività enzimatica della acil-CoA ossidasi (AOX), enzima localizzato a livello dei perossisomi, coinvolto nella beta-ossidazione degli acidi grassi, ed utilizzato come biomarker specifico di esposizione a proliferatori perossisomiali, è stata valutata per via spettrofotometrica. Campioni di ghiandole digestive sono stati omogenati in tampone sodio bicarbonato 1 mM, pH 7.6, contenente EDTA 1mM, etanolo 0.1%, TRITON X-100 0.01% e centrifugati a 500 xg per 15 min a 4°C . L'attività enzimatica della AOX è stata determinata seguendo la reazione di ossidazione della diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) in presenza di una perossidasi esterna e con l'aggiunta di un substrato specifico (Palmitoil CoA) alla Temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\lambda = 502 \text{ nm}$ (Benedetti et al., 2014).

Per la determinazione del glutatione totale, gli omogenati di ghiandola digestiva sono stati preparati in acido sulfosalicilico 5% con EDTA 4 mM (1:5 p/v). I campioni sono quindi stati lasciati in ghiaccio per 45 min al fine di ottenere una completa deproteinizzazione e centrifugati a 37.000 xg per 15 min. Il contenuto di glutatione totale è stato determinato nel sovrinatante misurando per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda $\lambda = 412 \text{ nm}$,

l'intensità di reazione tra i gruppi -SH e DTNB. Il saggio è stato condotto in tampone K-fosfato 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTNB 0.1 mM, NADPH 0.24 mM, glutatione reduttasi 1 U ed opportune aliquote di campione. I valori di assorbanza ottenuti sono stati quantificati mediante una curva di calibrazione standard a concentrazioni note di glutatione ridotto (Regoli et al., 2011; Benedetti et al., 2014).

Per le analisi degli enzimi antiossidanti, le ghiandole digestive sono state omogenate (1:5 p/v) in tampone K-fosfato 100 mM, pH 7.5, con cloruro di sodio 1.8% e PMSF 0.1 mM. Dopo centrifugazione a 100.000 xg per 1h e 10 min a 4°C, la frazione citosolica è stata aliquotata e conservata a -80°C. Le attività enzimatiche sono state misurate con specifici saggi spettrofotometrici a Temperatura costante di $18 \pm 1^\circ\text{C}$ (Regoli et al., 2011; Benedetti et al., 2012).

La glutatione reduttasi riconverte il glutatione ossidato nella sua forma ridotta, cioè quella funzionalmente attiva, utilizzando come cofattore riducente il NADPH. Il saggio della glutatione reduttasi è stato condotto alla lunghezza d'onda $\lambda=340$ nm, con coefficiente di estinzione millimolare $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, misurando il decremento di assorbanza dovuto al consumo di NADPH nel tempo. La reazione è stata effettuata in un volume di saggio finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.0, GSSG 1 mM, NADPH 0.12 mM ed opportune aliquote di campione.

Le glutatione S-transferasi catalizzano la coniugazione di una molecola di glutatione ridotto (GSH) ai gruppi elettrofili di composti organici. Delle molte isoforme, alcune possono avere funzione antiossidante, ma la maggior parte sono coinvolte nella detossificazione di substrati organici, resi più idrosolubili e di più facile escrezione. L'attività catalitica delle glutatione S-transferasi è stata analizzata seguendo l'aumento di assorbanza dovuto alla formazione del complesso di coniugazione tra GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), ad una lunghezza d'onda $\lambda=340$ nm e con un coefficiente di estinzione millimolare $\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La reazione è seguita per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM pH 6.5, CDNB 1.5 mM, GSH 1 mM ed opportune aliquote di campione.

Gli enzimi glutatione perossidasi, Se-dipendenti e Se-indipendenti, svolgono la loro funzione agendo su perossidi organici ed inorganici riducendoli all'alcool corrispondente. L'attività enzimatica è stata misurata seguendo l'azione di un sistema di enzimi accoppiati dove il GSSG formato nella reazione delle perossidasi viene convertito nella forma ridotta GSH dalla glutatione reduttasi. Il consumo di NADPH è stato seguito come diminuzione di assorbanza a $\lambda=340$ nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). L'attività delle forme enzimatiche Se-dipendenti e dell'insieme di quelle Se-dipendenti e Se-indipendenti è stata misurata usando come substrato rispettivamente, perossido di idrogeno (H_2O_2), per verificare l'efficacia di detossificazione degli enzimi su perossidi inorganici, e idroperossido di cumene (CuPx) per valutarne l'azione su perossidi organici. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, EDTA 1 mM, GSH 2 mM, NADPH 0.24 mM, 0.5 mM H_2O_2 o

0.8 mM CuPx, 1U GR ed opportune aliquote di campione.

La catalasi trasforma il perossido di idrogeno (H_2O_2) in acqua e ossigeno molecolare, rimuovendo così oltre che un potente ossidante cellulare, anche il principale precursore del radicale idrossilico, il più reattivo e tossico fra le specie reattive dell'ossigeno. L'attività della catalasi è stata misurata seguendo la diminuzione di assorbanza in funzione del tempo, dovuta alla riduzione del perossido di idrogeno ad acqua; la lunghezza d'onda utilizzata è stata $\lambda = 240$ nm ed il coefficiente di estinzione millimolare applicato è stato $\epsilon = 0.04$ mM \cdot 1cm \cdot 1. Il saggio è condotto per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.0, con H_2O_2 12 mM ed opportune aliquote di campione.

La Capacità Antiossidante Totale è stata stimata tramite il saggio TOSC che misura l'efficienza complessiva di un tessuto biologico di neutralizzare diverse forme di ROS tra cui i radicali perossilici ($ROO\bullet$) e i radicali idrossilici ($HO\bullet$) (Winston et al., 1998; Regoli e Winston, 1999; Regoli & Gorbi 2011).

Le analisi sono state effettuate sulla componente citosolica della ghiandola digestiva ottenuta dopo omogenizzazione (1:5 p/v) in un working-buffer costituito da tampone K-fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 1.8%. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 100.000 xg per 1 ora e 10 minuti a 4°C, e la frazione citosolica subaliquotata e conservata a -80°C fino al momento delle analisi. Il saggio TOSC-A (Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay) prevede la reazione tra le diverse forme di radicali che sono artificialmente generati, e l'acido α -cheto- γ -metiolbutirrico (KMBA), che funge da substrato e si ossida liberando gas etilene. La produzione di etilene risulta quantitativamente diminuita in presenza di agenti antiossidanti (come quelli contenuti nel materiale biologico) che reagiscono con i radicali neutralizzandoli e sottraendoli alla reazione con il KMBA. I radicali perossilici ($ROO\bullet$) sono stati generati attraverso l'omolisi termica del 2,2'-azo-bis-amidinopropano (ABAP) mentre i radicali idrossilici ($HO\bullet$) attraverso la reazione di Fenton ferro-ascorbato. Le reazioni sono state condotte in appositi contenitori di vetro da 10 ml (vials), sigillati con speciali tappi muniti di setto, mantenuti alla Temperatura costante di 35°C in bagno termostatico continuamente agitato per consentire una generazione costante delle varie forme di radicali. Le condizioni finali di saggio sono state le seguenti:

- per l'analisi con i radicali perossilici ($ROO\bullet$): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM e ABAP 20 mM in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4;
- per l'analisi con i radicali idrossilici ($\bullet OH$): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM, Fe^{3+} 1.8 μM , EDTA 3.6 μM e acido ascorbico 180 μM in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4.

Il KMBA viene ossidato dalle diverse forme di radicali generando gas etilene. La formazione dell'etilene è stata monitorata nel tempo mediante analisi gas-cromatografica su colonna capillare "Supelco SPB-1" (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) e mediante rivelatore FID (Flame Ionization Detector), utilizzando le seguenti condizioni strumentali: Temperatura del forno pari a 35°C, Temperatura del FID pari a 220°C, Temperatura d'iniezione pari

a 160°C, flusso d'idrogeno pari a 30 ml/minuto; flusso d'elio pari a 3 ml/minuto. La differenza di produzione d'etilene tra la reazione nei vials di controllo e la reazione nei vials contenenti i campioni, è calcolata matematicamente, integrando l'area al di sotto delle rispettive curve cinetiche della produzione d'etilene in funzione del tempo, considerando che ogni campione viene letto ogni 12 minuti per un tempo totale di saggio pari a 96 minuti. I risultati ottenuti permettono di quantificare il parametro TOSC, compreso tra 0 e 100, indice della capacità complessiva del campione analizzato, di neutralizzare le varie forme di specie reattive dell'ossigeno.

Il valore TOSC sperimentale è ottenuto secondo la formula:

$$TOSC = 100 - (\int SA / \int CA \times 100)$$

dove $\int SA$ e $\int CA$ sono gli integrali delle aree al di sotto delle curve che rappresentano rispettivamente le reazioni di un campione SA (Sample Area) e del controllo CA (Control Area).

Un campione che sia privo di qualsiasi capacità di neutralizzare i radicali mostrerà una produzione di etilene in funzione del tempo uguale a quella dei controlli ($\int SA / \int CA = 1$) ed il risultante valore TOSC sarà pertanto pari a 0. Al contrario un ipotetico valore TOSC=100 corrisponderebbe ad un campione che neutralizza tutte le specie reattive prodotte, inibendo completamente la formazione di etilene nell'intera durata del saggio ($\int SA = 0$). Dai risultati sperimentali viene ottenuto un valore TOSC specifico, rapportato al contenuto di proteine ed espresso come unità TOSC/mg di proteine.

Le proteine sono state analizzate secondo il metodo di Lowry, utilizzando albumina di siero bovino (BSA) come standard (Lowry et al., 1951).

1.3.3. Criteri di integrazione ponderata per l'elaborazione dei dati di bioaccumulo e dei biomarker nei mitili trapiantati

1.3.3.1. Elaborazione ponderata dei dati di bioaccumulo

L'elaborazione dei dati di biodisponibilità è fondamentale in quanto permette di stabilire il pericolo associato al possibile trasferimento di contaminanti ambientali al comparto biotico. Nel calcolo del pericolo biodisponibilità (HQ_{BA}), per ciascun parametro viene calcolata la variazione di concentrazione rispetto ai controlli (RTR), corretta in funzione della tipologia del contaminante e della significatività statistica delle differenze ($RTRw$) (Regoli et al., 2019). La significatività statistica della variazione rispetto ai controlli viene pesata applicando il coefficiente Z , calcolato in funzione del valore ottenuto dal test T per dati con varianza disomogenea (punto 4 del *flow chart* di Figura 1.3.3.1). Il coefficiente Z ha un valore pari a 1 (nessuna riduzione dell'effetto) quando il campione risulta significativamente diverso dal controllo ($p < 0.05$), mentre decresce con il diminuire della significatività, passando in maniera lineare da 1 a 0.5 quando p cresce da 0.05 a 0.06; per valori di p superiori a 0.06, il coefficiente Z diminuisce rapidamente in maniera non lineare fino a 0.2 quando p tende a 1. Questa correzione riduce progressivamente il peso complessivo di un parametro la cui variazione media non sia statisticamente significativa, ma non ne elimina completamente il contributo al calcolo dell' HQ_{BA} .

A seconda dell'entità della variazione, che considera anche la variabilità naturale delle concentrazioni tissutali dei contaminanti, i singoli parametri analizzati vengono attribuiti a una di 5 classi di effetto (da assente a molto alto): da assente a lieve se $RTRw$ è < 2.6 , moderato se $2.6 \leq RTRw < 6.5$, elevato se $6.5 \leq RTRw < 13$, e molto alto se $RTRw \geq 13$. Il valore cumulativo di HQ_{BA} viene poi calcolato senza considerare i parametri con $RTRw < 1.3$ (effetto assente), facendo la media per quelli con $RTRw$ tra 1.3 e 2.6 (effetto basso), e sommando (Σ) tutti gli $RTRw > 2.6$ (effetti medio, alto e molto alto): in funzione della distribuzione % dei parametri nelle varie classi di effetto, il modello indica la classe complessiva di pericolo per la biodisponibilità.

1.3.3.2. Elaborazione ponderata dei dati dei biomarker

Il modulo sulle analisi dei Biomarker può elaborare i risultati ottenuti da un'ampia lista di biomarker tra quelli maggiormente utilizzati dalla comunità scientifica. A ciascun biomarker è associato un peso diverso (tra 1 e 3) a seconda della rilevanza biologica della risposta e del livello di conoscenze sui meccanismi coinvolti; per ciascun biomarker, inoltre, in funzione della specie e del tessuto, è stabilita anche una soglia di variazione biologicamente significativa (*Threshold*) che tiene conto delle possibili risposte bi-fasiche di certi biomarker che possono essere sia indotti che inibiti (Regoli et al., 2019). Per garantire un approccio multi-biomarker, il modello richiede alcuni requisiti minimi in termini di numero ed importanza dei biomarker analizzati. Per calcolare l'indice cumulativo di pericolo per i biomarker HQ_{BM} (*flow chart* di Figura 1.3.3.2), la variazione

misurata per ciascun biomarker è confrontata con la soglia specifica e corretta sia per l'importanza biologica della risposta, che per la significatività statistica della differenza rispetto al controllo applicando il coefficiente Z già descritto per l'elaborazione dei dati di biodisponibilità. Ogni biomarker è quindi assegnato ad una classe di effetto (da assente a molto alto) a seconda dell'entità della variazione rispetto alla soglia: assente o basso se $E < 1$, medio con E compreso tra 1 e 2, alto se E è tra 2 e 3, molto alto per i biomarker con $E > 3$. I risultati di tutti i biomarker sono diversamente pesati nel calcolo del pericolo cumulativo HQ_{BM} , che non considera il contributo dei biomarker con effetto assente o basso, calcola la media degli Ew per le risposte con effetto moderato e addiziona (Σ) gli Ew delle risposte con effetto alto o molto alto. L'attribuzione di una di 5 classi di gravità deriva dalla distribuzione percentuale delle risposte dei biomarker nelle 5 classi di effetto. Il modello indica il numero di biomarker all'interno di ciascuna delle 5 classi, il valore di pericolo cumulativo HQ_{BM} e la classe di pericolo complessivo per i biomarker.

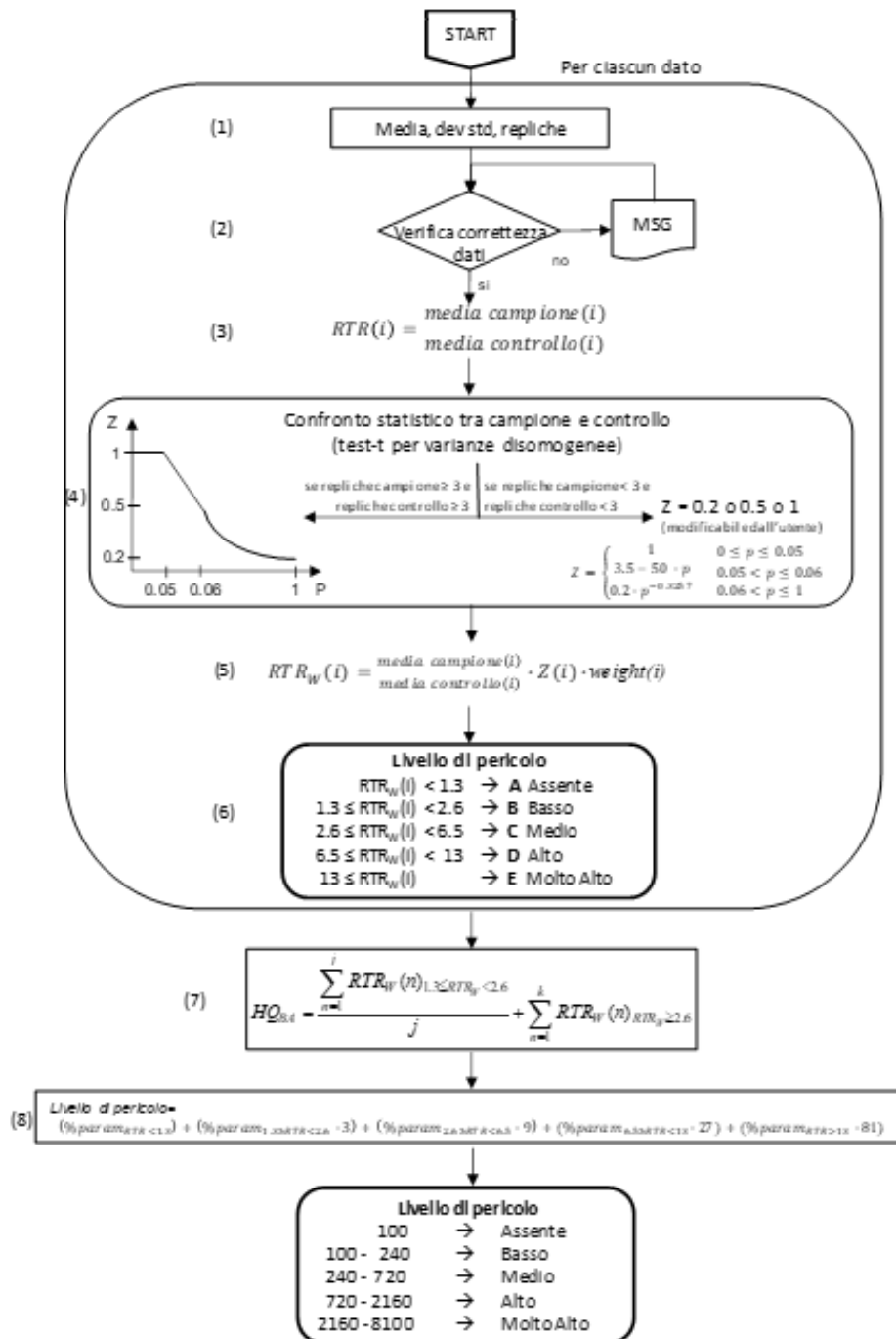


Figura 1.3.3.1. Flow-chart con la procedura per l'elaborazione dei dati di bioaccumulo nei mitili trapiantati.

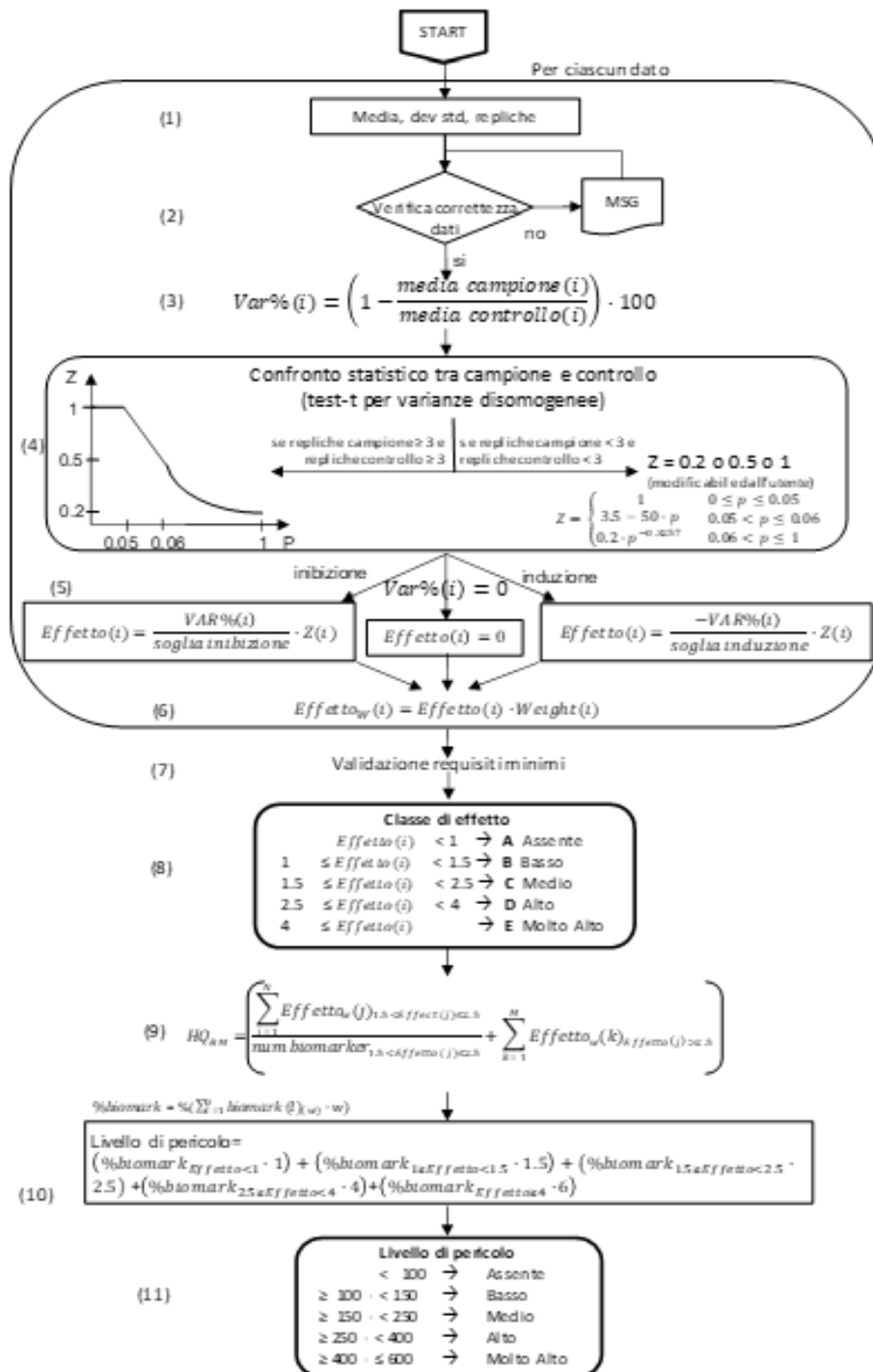


Figura 1.3.3.2. Flow-chart con la procedura per l'elaborazione dei dati dei biomarker nei mitili trapiantati.

1.4. Monitoraggio satellitare

Le immagini satellitari fornite dal CNR-ISMAR per il monitoraggio del Golfo di Salerno durante i lavori di dragaggio derivano da 2 fonti: 1. Prodotti multisensore a bassa risoluzione; 2. Sentinel3-OLCI ad alta risoluzione.

Le riflettanze sono le misure primarie fornite dai sensori satellitari di Ocean Color e danno informazione riguardo le sostanze presenti negli strati superficiali del mare. Queste grandezze derivano dalle misure di radianza fatte dai sensori al top dell'atmosfera dopo che hanno subito un processo di correzione per l'eliminazione del segnale captato dai sensori ma dovuto all'interazione della luce con l'atmosfera (correzione atmosferica). Per ottenere stime di parametri geofisici a partire dalle riflettanze satellitari si sfruttano degli algoritmi bio-ottici basati su dati raccolti a mare. In pratica si mettono in relazione le radianze, misurate con strumentazione apposita, con le concentrazioni (o assorbimenti) misurate in mare. Una volta sviluppato l'algoritmo, viene applicato alle riflettanze satellitari. In questo modo è ad esempio possibile ottenere la concentrazione di clorofilla superficiale in mare.

Il prodotto a bassa risoluzione deriva direttamente dai prodotti distribuiti dal Copernicus Marine Environment Monitoring Service (CMEMS; <http://marine.copernicus.eu/>) ritagliati sull'area di interesse. Questo prodotto è il risultato di una composizione dei dati forniti da vari sensori ad 1km di risoluzione: *MODIS-Aqua*, *SNPP-VIIRS* e *OLCI-Sentinel3*. Questa composizione è fatta andando a correggere, con apposite procedure, il bias tra i sensori nell'ottica di avere dei dati uniformi senza gradienti artificiali derivati dalla diversa fonte (sensore). In particolare da CMEMS vengono prese le riflettanze nelle lunghezze d'onda del visibile e la concentrazione di clorofilla superficiale. Per quanto riguarda la concentrazione di materiale sospeso in mare (TSM), viene sfruttata la neurale sviluppata da D'Alimonte et al. (2011) che stima il TSM a partire dalle riflettanze satellitari.

I prodotti ad alta risoluzione (300m) derivano dal Sentinel3-OLCI. Questo sensore europeo, oltre ad avere una risoluzione maggiore rispetto ai satelliti statunitensi, ha un maggior numero di bande di acquisizione nell'infrarosso. Questo permette di ottenere delle osservazioni più realistiche nelle acque costiere più complesse. Le concentrazioni di TSM del Sentinel3, fornite per il monitoraggio del Golfo di Salerno, derivano dall'applicazione di una rete neurale sviluppata appositamente per questo sensore (<https://sentinel.esa.int/web/sentinel/technical-guides/sentinel-3-olci/level-2/imt-neural-net>).

Per il monitoraggio del Golfo di Salerno vengono fornite immagini giornaliere (a bassa e alta risoluzione) di concentrazione di clorofilla, TSM e pseudo-true-color.



La concentrazione di clorofilla è un buon proxy per valutare la biomassa autotrofa presente. Nel caso specifico, una ri-sospensione di materiale e quindi di nutrienti, in determinate condizioni ambientali (luce, temperatura, condizioni meteo marine adeguate) può portare ad uno sviluppo algale locale “anomalo”.

Il TSM è un ottimo indicatore della qualità delle acque. Per il monitoraggio in esame è ovviamente il parametro più indicato da osservare poiché dovrebbe dare un immediato riscontro delle attività di dragaggio in essere nel Golfo di Salerno.

Le immagini di pseudo-true-color sono delle vere e proprie fotografie dell’area in esame dalle quali è possibile individuare abbastanza facilmente le zone interessate da input fluviali o alte concentrazioni di materiale sospeso.

Il monitoraggio satellitare è iniziato il 1° gennaio 2020 e si è concluso il 7 aprile 2020. In totale sono state elaborate 97 immagini ad alta definizione della distribuzione del TSM per l’intero Golfo di Salerno. Al fine di individuare le fonti della torbidità ogni immagine è stata elaborata tenendo conto del range di valori registrati per ogni giorno.