



Autorità di Sistema Portuale del Mar Tirreno Settentrionale  
Scali Rosciano, 6 - 57123 Livorno, Italia

R.U.P. ing. Enrico Pribaz  
D.E.C. ing. Ilaria Lotti

R.T.P.



30035 Mirano (VE)  
Viale Belvedere, 8/10  
www.fm-ingegneria.com

Tel. +39 041 5785 711  
Fax +39 041 4355 933  
portolivorno@fm-ingegneria.com



P.O. Box 1132  
3800 BC Amersfoort  
The Netherlands  
www.royalhaskoningdhv.com

Tel. +44 (0)207 222 2115  
Fax +44 (0)207 222 2659  
info@rhdhv.com



35027 Noventa Padovana (PD)  
Via Panà 56/a

Tel. +39 049 8945 087  
Fax +39 049 8707 868  
mail@hsmarinesrl.com



31027 Spresiano (TV)  
Via Tiepolo, 8  
www.gtgeo.eu

Tel. +39 0422 8870 31  
Fax +39 0422 8895 89  
info@gtgeo.it

PROGETTO

**PROGETTAZIONE PRELIMINARE E DEFINITIVA DELLE  
OPERE MARITTIME DI DIFESA E DEI DRAGAGGI PREVISTI  
NELLA NUOVA PRIMA FASE DI ATTUAZIONE DELLA  
PIATTAFORMA EUROPA, COMPRESO LO STUDIO DI  
IMPATTO AMBIENTALE E LA VALUTAZIONE DI INCIDENZA  
AMBIENTALE**

EMISSIONE

**PROGETTO DEFINITIVO**

TITOLO

**C - STUDI AMBIENTALI**

Allegato 18 - Relazioni di monitoraggio ambiente marino

REV.	DATA	FILE	OGGETTO	DIS.	APPR.
0	24/07/2023	1233_PD-C-015(18)_0	Aggiornamento in riscontro a Istruttoria VIA [ID VIP 8058]	-	T. Tassi
1					
2					
3					
4					

ELABORATO N.

**C015(18)**

DATA:	SCALA:	FILE:	J.N.
24/07/2023		1233_PD-C-015(18)_0.doc	1233/19
PROGETTO	DISEGNO	VERIFICA	APPROVAZIONE
-	-	C. Galli	T. Tassi



**ISPRA**  
Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



# **MONITORAGGIO AMBIENTALE DELLA SECONDA VASCA DI COLMATA DEL PORTO DI LIVORNO**



**Relazione conclusiva - Attività 2012-2017**

**Responsabile della Convenzione ISPRA**

*David Pellegrini*

**Coordinamento delle attività di campionamento e analisi**

*Simona Macchia – Fabiano Pilato – Davide Sartori – Alice Scuderi*

**Relazione a cura di**

*Simona Macchia – David Pellegrini – Alice Scuderi*

**Collaboratori ISPRA**

*Enrichetta Barbieri – Andrea Bianco – Isabella Buttino – Gianluca Chiaretti –  
Silvia Giuliani – Andrea La Camera – Stefano Ferrari – Ezio Orfelini –  
Lorenzo Morroni – Margherita Secci – Valentina Vitiello*

## INDICE

1.	PREMESSA .....	5
2.	ATTIVITÀ DI CAMPIONAMENTO .....	5
3.	MATERIALI E METODI DI ANALISI .....	10
3.1	SEDIMENTI.....	10
3.1.1	CARATTERISTICHE GRANULOMETRICHE .....	10
3.1.2	METALLI E SOSTANZA ORGANICA .....	10
3.1.3	IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI .....	11
3.1.4	SAGGIO BIOLOGICO CON <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> .....	12
3.1.5	SAGGIO BIOLOGICO CON <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....	14
3.1.6	SAGGIO BIOLOGICO CON <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i> .....	16
3.1.7	SAGGIO BIOLOGICO CON <i>ACARTIA TONSA</i> .....	20
3.2	COLONNA D'ACQUA .....	23
3.2.1	MUSSEL WATCH .....	23
3.2.2	SAGGI BIOLOGICI.....	26
3.2.3	SAGGI <i>IN SITU</i> .....	27
3.2.4	ANALISI CHIMICO-FISICHE TRAMITE SONDA MULTIPARAMETRICA.....	29
3.3	ACQUE DI SFIORO .....	29
3.4	BIOCENOSI.....	31
4.	RISULTATI .....	32
4.1	SEDIMENTI.....	32
4.1.1	CARATTERISTICHE GRANULOMETRICHE .....	33
4.1.2	METALLI E SOSTANZA ORGANICA .....	36
4.1.3	IPA.....	40
4.1.4	SAGGIO BIOLOGICO CON <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....	43
4.1.5	SAGGIO BIOLOGICO CON <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i> .....	46
4.1.6	SAGGIO BIOLOGICO CON <i>ACARTIA TONSA</i> .....	47
4.1.7	SAGGIO BIOLOGICO CON <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> .....	48
4.2	COLONNA D'ACQUA .....	50
4.2.1	MUSSEL WATCH .....	50
4.2.2	SAGGI BIOLOGICI.....	54
4.2.3	SAGGI <i>IN SITU</i> .....	59
4.2.4	ANALISI CHIMICO-FISICHE TRAMITE SONDA MULTIPARAMETRICA.....	60
4.3	ACQUE DI SFIORO .....	62
4.3.1	SOLIDI SOSPESI .....	62
4.3.2	SAGGI BIOLOGICI.....	63
4.4	BIOCENOSI.....	65
5.	CONCLUSIONI.....	66
5.1	SEDIMENTI SUPERFICIALI .....	66
5.1.1	GRANULOMETRIA .....	66
5.1.2	CARATTERISTICHE CHIMICHE (METALLI IN TRACCE E IPA) .....	66
5.1.3	SAGGI BIOLOGICI.....	66
5.2	COLONNA D'ACQUA.....	67
5.2.1	MW (METALLI, IPA E BIOMARKERS).....	67
5.2.2	SAGGI SULLE ACQUE DELLA COLONNA (IN LABORATORIO ED <i>IN SITU</i> ).....	67
5.2.3	BIOCENOSI BENTONICHE .....	67
5.3	CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE GENERALI .....	68
6.	BIBLIOGRAFIA CITATA E/O DI CONSULTAZIONE .....	69

**ALLEGATO 1** – Schede granulometriche

**ALLEGATO 2** – Documentazione fotografica effettuata durante le operazioni di campionamento delle acque di sfioro

**ALLEGATO 3** – Bioaccumulo di IPA e analisi delle risposte biologiche nei mitili

**ALLEGATO 4** – Descrizione del popolamento bentonico e inquadramento biocenotico

## 1. PREMESSA

L'ISPRA ha iniziato ad occuparsi del monitoraggio ambientale delle attività di movimentazione dei fondali nel porto di Livorno a partire dalla fine degli anni novanta. Già dai primi anni 2000 l'Istituto ha condotto indagini ambientali relative a tutte le fasi della costruzione della prima vasca di contenimento (prima, durante e dopo) e del successivo utilizzo.

Nel 2012 è stato stipulato un contratto tra Autorità Portuale e ISPRA, della durata di 5 anni, per il supporto tecnico scientifico alla gestione ecocompatibile dei materiali da dragare nel Porto di Livorno tramite studi sperimentali e attività di monitoraggio ambientale.

Le attività realizzate da ISPRA, previste nel contratto e nei successivi atti aggiuntivi stipulati tra i due enti, sono state riportate in rapporti tecnici annuali e hanno riguardato la prosecuzione del monitoraggio della prima vasca di colmata, la caratterizzazione e il monitoraggio dell'area destinata alla costruzione della nuova vasca e le successive attività di gestione che hanno interessato questo bacino in seguito al conferimento di sedimenti derivanti da attività di movimentazione in diverse aree portuali.

Nella presente relazione vengono riportati i risultati del monitoraggio ambientale dei diversi comparti indagati (sedimenti superficiali, colonna d'acqua e acque di sfioro) effettuato nell'ultimo anno della convenzione in corso tra ISPRA e Autorità di Sistema portuale Alto Tirreno (2017).

Inoltre, riguardo le caratteristiche dei sedimenti superficiali, è stato effettuato un confronto con i risultati degli anni precedenti, utilizzando, per la valutazione della qualità ambientale dei sedimenti superficiali, anche i valori di riferimento chimici riportati nel recente Allegato tecnico al DM173/2016, sebbene lo studio attuale sia riferito a sedimenti non sottoposti ad attività di dragaggio.

## 2. ATTIVITÀ DI CAMPIONAMENTO

Di seguito si riportano le sigle delle stazioni di campionamento e le relative coordinate geografiche rilevate tramite sistemi Global Position System (GPS) (Tab. 1).

**Tab. 1** – Coordinate delle stazioni di campionamento

Stazione	Coordinate WGS 84	
	NORD UTM	EST UTM
<b>Ve1</b>	43°32.278'	10°17.191'
<b>Ve4</b>	43°33.484'	10°17.439'
<b>Ve5*</b>	43°33.829'	10°17.759'
<b>Ve7</b>	43°33.754'	10°17.969'
<b>Ve8</b>	43°33.540'	10°18.744'
<b>DP*</b>	43° 33' 52.12"	10° 18' 02.79"

<b>Vn1</b>	43° 33' 07.70"	10° 17' 12.77"
<b>Vn2*</b>	43° 34' 20.63"	10° 17' 34.82"
<b>Vn3*</b>	43° 34' 41.78"	10° 17' 34.44"
<b>Vn4</b>	43° 35' 37.35"	10° 17' 20.21"

\*stazioni di monitoraggio presenti sia nel campionamento completo che in quello ridotto

La posizione delle stazioni interessate dalle diverse attività di monitoraggio sono riportate nella Figura 1. Il Piano di Monitoraggio ha previsto, dopo la caratterizzazione iniziale di tutta l'area effettuata nel 2012, l'alternanza di un campionamento "completo" in 10 stazioni negli anni 2013, 2015, 2017 e di un campionamento "ridotto" in 4 stazioni (Ve5, DP, Vn2 e Vn3, evidenziate nella Tabella 1 con l'asterisco) negli anni 2014 e 2016.



Figura 1 – Stazioni di monitoraggio

Si ricorda che i campionamenti effettuati nell'anno 2012 sono da considerarsi fase “*ante operam*”, quelli eseguiti nel 2013 e 2014 appartengono alla fase “*in corso d'opera*” - durante la quale si è completata la costruzione degli argini esterni della seconda vasca di colmata - mentre quelli a partire dal 2015 fanno parte della fase di “*gestione*” - in cui si è iniziato a monitorare lo sversamento dei sedimenti dragati nella vasca.

Secondo quanto riportato nel Piano di Monitoraggio, nelle varie fasi del monitoraggio sono state eseguite le attività di seguito descritte:

- *campionamento di sedimenti all'interno dell'area del bacino e lungo l'area di perimetrazione*: valutazione della qualità ecotossicologica e fisico-chimica;
- *raccolta di sedimenti superficiali all'interno ed all'esterno del porto*: valutazione della qualità ecotossicologica e fisico-chimica;
- *controllo della colonna d'acqua all'interno ed all'esterno del porto*: prove di mussel watch (bioaccumulo e analisi di alcuni biomarker), misure fisico-chimiche tramite sonda multiparametrica, prove ecotossicologiche *in situ* (saggi biologici in laboratorio ed *in situ* con embrioni di riccio di mare);
- *controllo delle acque di sfioro delle vasche di colmata*: prelievo di campioni di acque di sfioro (in prossimità dello sfioro posizionato nella darsena Petroli), durante lo sversamento in vasca di sedimenti dragati all'interno del porto, da sottoporre ad analisi fisiche (contenuto di solidi sospesi) e a una batteria di saggi ecotossicologici;
- *analisi delle principali biocenosi bentoniche nelle aree limitrofe al bacino*.

Per una migliore interpretazione della tempistica delle attività di monitoraggio, dei risultati presentati in questa relazione e del confronto effettuato con le campagne di monitoraggio precedenti, si riporta l'elenco delle attività di dragaggio che hanno previsto lo sversamento dei sedimenti nella seconda vasca di colmata, fornito dall'Autorità Portuale di Livorno:

- ❖ *Novembre 2014 - Gennaio 2015*: dragaggio Molo Italia lato Nord (ca. 430.000 m<sup>3</sup>);
- ❖ *Febbraio 2015*: dragaggio della Banchina del Marzocco (I fase, ca. 70.000 m<sup>3</sup>);
- ❖ *Giugno 2015*: dragaggio della Darsena Toscana (intervento preliminare accosti 15 C/D, ca. 2.000 m<sup>3</sup>);
- ❖ *Dicembre 2015*: dragaggio della Darsena Toscana (intervento preliminare accosto 15 B, ca. 5.000 m<sup>3</sup>);
- ❖ *Marzo – Giugno 2016*: dragaggio della Darsena Toscana e del Bacino di Evoluzione (ca. 700.000 m<sup>3</sup>).
- ❖ *Dicembre 2017*: dragaggio dell'Imboccatura Sud del porto (ca. 125.000 m<sup>3</sup>).



Fino ad oggi sono state condotte le seguenti campagne di monitoraggio:

- ✓ **Analisi chimico-fisiche ed ecotossicologiche sui sedimenti:**
  - Fase *ante operam*: ottobre 2012
  - Fase di costruzione: maggio 2013; maggio 2014
  - Fase di gestione: giugno 2015; maggio 2016; maggio 2017
- ✓ **Analisi ecotossicologiche sulla colonna d'acqua:**
  - Fase di costruzione: novembre 2013; maggio e ottobre 2014
  - Fase di gestione: giugno e ottobre 2015; maggio e ottobre 2016; maggio e ottobre 2017
- ✓ **Test in situ:**
  - Fase *ante operam*: ottobre 2012
  - Fase di costruzione: giugno e ottobre 2013; luglio 2014
  - Fase di gestione: giugno 2015; maggio 2016; maggio e ottobre 2017
- ✓ **Mussel watch**, sono state completate 10 campagne di traslocazione nelle seguenti date:
  - I Campagna (*ante operam*): organismi traslocati nei giorni 20/02/2012 e recuperati il giorno 22/03/2012;
  - II Campagna (*costruzione*): organismi traslocati il giorno 27/06/2013 e recuperati il giorno 25/07/2013.
  - III Campagna (*costruzione*): organismi traslocati il giorno 04/09/2013 e recuperati il giorno 02/10/2013.
  - IV Campagna (*costruzione*): organismi traslocati il giorno 19/05/2014 e recuperati il giorno 19/06/2014.
  - V Campagna (*costruzione/gestione*): organismi traslocati il giorno 08/10/2014 e recuperati il giorno 11/11/2014. A causa di condizioni meteo-marine avverse, delle tre stazioni posizionate ne è stata recuperata solo una (DP).
  - VI Campagna (*gestione*): organismi traslocati il giorno 28/05/2015 e recuperati il 25/06/2015.
  - VII Campagna (*gestione*): organismi traslocati il giorno 20/10/2015 e recuperati il 16/11/2015.
  - VIII Campagna (*gestione*): organismi traslocati il giorno 18/05/2016 e recuperati il 08/06/2016 (solo la stazione DP).
  - VIII Campagna-bis (*gestione*): organismi traslocati il giorno 19/07/2016 e recuperati il 08/08/2016

- IX Campagna (*gestione*): organismi traslocati il giorno 25/10/2016 e recuperati il 30/11/2016
  - X Campagna (*gestione*): organismi traslocati il giorno 10/05/2017 e recuperati il 05/06/2017
- ✓ **Acque di sfioro:**
- dragaggio della Darsena Toscana (intervento preliminare accosto 15 B): 16/12/2014, 18/12/2014, 30/12/2014, 08/01/2015, 15/01/2015, 21/01/2015
  - dragaggio della Darsena Toscana e del Bacino di Evoluzione: 30/03/2016, 13/04/2016, 20/04/2016, 04/05/2016, 19/05/2016, 25/05/2016, 08/06/2016
  - dragaggio dell'Imboccatura Sud del porto: 06/12/2017, 20/12/2017
- ✓ **Sonda Multiparametrica:**
- Fase *ante operam*: ottobre 2012
  - Fase di costruzione: aprile, settembre, novembre 2013; febbraio, maggio, luglio, ottobre 2014
  - Fase di gestione: marzo, giugno, ottobre, novembre 2015; marzo, maggio, ottobre 2016; marzo, maggio, ottobre 2017.
- ✓ **Biocenosi:**
- Fase *ante operam*: ottobre 2012
  - Fase di costruzione: maggio 2013; maggio 2014
  - Fase di gestione: giugno 2015; maggio 2016; maggio 2017.

### 3. MATERIALI E METODI DI ANALISI

Le metodiche seguite sono generalmente quelle riportate nel volume ICRAM – Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio (Servizio Difesa Mare) “Metodologie analitiche di riferimento nell’ambito del “Programma di monitoraggio per il controllo dell’ambiente marino costiero (triennio 2001-2003)”. In particolare sono state eseguite secondo quanto sotto riportato.

#### 3.1 Sedimenti

##### 3.1.1 Caratteristiche granulometriche

Per la determinazione delle caratteristiche granulometriche dei sedimenti marini, si tratta ogni campione (circa 70 g) con una soluzione di perossido di idrogeno ed acqua distillata (1:8) per 48 h a temperatura ambiente, per facilitare la separazione dei granuli.

In seguito, si separa il sedimento su maglia da 63 µm in umido con acqua distillata; le due frazioni così ottenute vengono essiccate in stufa a 60 °C e successivamente pesate.

Si procede a vagliare la frazione > 63 µm (sabbia e ghiaia) con pile di setacci da 2000, 1000, 500, 250, 125 e 63 µm della serie ASTM; si pesa il sedimento corrispondente a ciascun intervallo e al termine delle operazioni si calcola in quale percentuale le varie frazioni sono presenti all’interno del campione.

##### 3.1.2 Metalli e Sostanza Organica

Il campione (circa 0.3 g s.s.) è stato mineralizzato in bombe in teflon, con l’impiego di un forno a microonde opportunamente programmato (Milestone 1200), mediante l’aggiunta di 7 ml di HNO<sub>3</sub> (65%), 3 ml di HCl (30%) e 2 ml di acqua tutti ultrapuri. Alla soluzione ottenuta è stata aggiunta una quantità di acqua ultrapura tale da raggiungere il volume finale di 25 ml. La determinazione analitica è stata effettuata mediante l’impiego di Spettrofotometria ad Emissione Ottica (Agilent AX Simultaneous ICP-OES 720) per tutti i metalli a eccezione del mercurio. Per quest’ultimo le analisi sono state condotte mediante l’utilizzo di Spettroscopia ad Assorbimento Atomico (metodo dei Vapori Freddi; Cetac M-7600). L’accuratezza della metodica è stata valutata impiegando il materiale standard di riferimento LGC 6137 (Promochem), che è stato processato con le stesse modalità dei campioni. Il limite di rilevabilità della metodica e il limite di quantificazione per ogni metallo analizzato è riportato in Tabella 2.

**Tab. 2** – Limiti di rilevabilità e di quantificazione

	Al	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	V	Zn
<b>Rilevabilità (mg/l)</b>	0,078	0,0005	0,00004	0,0061	0,0035	0,0001	0,0071	0,0036	0,027	0,1672
<b>Quantificazione (mg/kg)</b>	6,50	0,0441	0,0029	0,512	0,2951	0,0004	0,5907	0,2998	2,2499	13,93

Per la determinazione della sostanza organica si pesano circa 3 g di campione e si lasciano in muffola a 365° per 12 ore. La percentuale di sostanza organica è determinata per differenza di peso dopo calcinazione. In particolare viene valutata la perdita sia di sostanza organica “termolabile” che di sostanza organica “stabile” sottraendo il valore della pesata dopo l’esposizione in muffola da quella effettuata prima.

### **3.1.3 Idrocarburi Policiclici Aromatici**

La determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) è stata effettuata utilizzando un’aliquota, omogenea del campione, pari a 3 grammi. Al momento della preparazione dei campioni, i sedimenti sono stati addizionati di 5 ml di una soluzione di KOH 0.5 M in metanolo, per l’idrolisi dei lipidi e l’estrazione solido-liquido. I campioni sono stati agitati vigorosamente ed in seguito mantenuti in movimento per una notte intera a 4°C. Il completamento dell’idrolisi della componente lipidica e l’estrazione solido-liquido è stata eseguita mediante microonde a 200W e 55°C per 15 min (Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM). I campioni sono stati centrifugati a 1000×g per 5 min al fine di eliminare il residuo solido e i sovrantanti recuperati in nuovi tubi. Il volume dei campioni è stato ridotto a 0.5 ml mediante una centrifuga evaporante (Speedvack, Juan), a 45°C per 60-120 min.

Infine ai campioni è stato applicato un processo di purificazione e concentrazione attraverso una cromatografia a bassa pressione con resine SPE (estrazione in fase solida) del tipo Backerbond SPE C18 (500mg, 6mL) condizionate con 10 ml di fase mobile (tampone KHCO<sub>3</sub> 10mM in H<sub>2</sub>O ultrapura e metanolo al 10%) e recuperati in fine con 1 ml di acetonitrile puro per HPLC.

Il sistema cromatografico utilizzato è costituito da una pompa HPLC per gradiente binario e un detector in fluorescenza (Perkin Elmer Serie 200 Pump and Fluorescence Detector). La separazione cromatografica è stata eseguita mediante equilibri di ripartizione utilizzando una colonna analitica Supelcosil LC-PAH (LC18 modificata e specifica per l’analisi di idrocarburi policiclici aromatici) da 10 cm di lunghezza, 4.6 mm di diametro interno e particelle da 3µm di diametro. L’analisi è stata condotta mediante gradiente dinamico utilizzando acqua ultrapura e acetonitrile come fasi mobili. Il gradiente utilizzato è il seguente: acqua 40% e acetonitrile 60% per 2 min; acetonitrile dal 60% al 100% con gradiente lineare per 10 min; acetonitrile 100% per 5 min; acetonitrile dal 100% al 60% con gradiente lineare per 2 min; acqua 40% e acetonitrile 60% per 6 min (ricondizionamento). La durata complessiva dell’analisi è di 25 minuti.

La misurazione dei segnali è stata eseguita in fluorescenza modulando nel tempo le coppie di lunghezza d’onda applicate in eccitazione ed emissione secondo il seguente programma: 0 min, E<sub>c</sub>=280nm, E<sub>m</sub>=330nm; 6 min, E<sub>c</sub>=250nm, E<sub>m</sub>=370nm; 8 min, E<sub>c</sub>=280nm, E<sub>m</sub>=450nm; 9 min, E<sub>c</sub>=265nm, E<sub>m</sub>=380nm; 13 min, E<sub>c</sub>=290nm, E<sub>m</sub>=410nm; 25 min, E<sub>c</sub>=280nm, E<sub>m</sub>=330nm.

Il volume di campione iniettato è pari a 20µl ed è garantito costante per tutte le analisi utilizzando un loop a volume noto, montato su una valvola di iniezione. 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). L'accuratezza della procedura analitica e l'efficienza dell'estrazione e preparazione dei campioni è stata controllata attraverso la stima del recupero degli analiti ricercati in appropriate matrici certificate standard (SRM-NIST 2977; SRM-NIST 1944). Gli analiti determinati mediante il metodo appena descritto possono essere classificati in IPA a basso peso molecolare (naftalene, 1-metil naftalene, 2-metil naftalene, acenaftene, fluorene, fenantrene ed antracene) e IPA ad alto peso molecolare (fluorantrene, pirene, benzo[a]antracene, crisene, 7,12-dimetil benzo[a]antracene, benzo[b]fluorantrene, benzo[k]fluorantrene, benzo[a]pirene, dibenzo[a,h]antracene, benzo[g,h,i]perilene, indeno(1,2,3-cd)pirene).

#### **3.1.4 Saggio biologico con *Phaeodactylum tricorutum***

I primi metodi internazionali di riferimento per l'utilizzo di alghe monocellulari in prove di inibizione della crescita algale per lo studio della contaminazione di acque marine e costiere risalgono agli anni '70 (EPA, 1974; IRSA, 1978). In seguito, metodi EPA sono stati pubblicati anche per il controllo di acque di scarico (EPA, 1988). La metodica del saggio algale per organismi marini è stata aggiornata con la norma UNI ISO 10253 (2006) che prevede l'utilizzo di *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin e *Skeletonema costatum*. Entrambe le alghe possono essere impiegate, utilizzando tale protocollo, per saggi con elutriati o estratti da sedimento intero o con acqua sovrantante o interstiziale.

I saggi con microalghe sono tra i più comunemente utilizzati per la facilità ed economicità del loro mantenimento in laboratorio e per la loro risposta rapida alla qualità dell'ambiente (Kraynukova 1988; Lewis 1995).

*Phaeodactylum tricorutum* è una diatomea Bacillariophyta ampiamente distribuita in aree estuariali e costiere e, in campo eco tossicologico, il suo impiego per la valutazione della qualità delle acque, dei sedimenti e delle acque di scarico industriali è stato riportato da numerosi autori (dos Santos et al. 2002; Nash et al. 2005; Zhuravel et al. 2009; Morreno Garrido et al. 2007; Morelli et al. 2009; Okay et al. 1994).

I principali indici presi in considerazione in questi lavori sono stati la densità cellulare (Okay et al. 1994; dos Santos et al. 2002; Morreno-Garrido et al. 2007; Zhuravel et al. 2009), ma anche risposte fisiologiche e biochimiche, come il contenuto di clorofilla *a* e la taglia cellulare (Zhuravel et al. 2009), la concentrazione di fitochelatine e peptidi endocellulari che legano i metalli (Morelli et al. 2009), nonché la fluorescenza ritardata (Nash et al. 2005).

La valutazione del tasso di crescita costituisce una procedura di facile esecuzione nonché di buona sensibilità, poiché l'aumento o la riduzione della crescita cellulare delle microalghe rispetto al controllo può essere connessa con fenomeni di inquinamento di matrici acquose (Khristoforova et al. 2001; Aizdaicher et al. 1999).

#### *Caratteristiche generali del test*

Il principio del test consiste nell'espore 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 ed omogeneo apporto di nutrienti. Al termine del periodo d'incubazione viene confrontata la crescita algale nel campione con quella del controllo.

Il saggio biologico è stato eseguito seguendo i protocolli ISO 10253 (2006) e ARPAT (1998; Draft, 2003), con alcune modifiche specifiche.

#### *Mantenimento della coltura algale madre e fasi preparatorie*

Le colture cellulari madri sono state mantenute in opportuno mezzo di crescita a salinità di  $30 \pm 5$  ‰, con periodici rinnovi per mantenerle nella fase di crescita esponenziale. A partire dalla coltura madre, una pre-coltura con una densità cellulare compresa tra  $2 \times 10^3$  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*

Un'aliquota della coltura di inoculo è stata addizionata alla soluzione test e ad una appropriata quantità di mezzo di coltura concentrato. La soluzione così ottenuta, con una densità cellulare compresa tra  $8 \times 10^3$  e  $1,2 \times 10^4$  cells/mL, è stata quindi distribuita in triplice replica in piastre monouso sterili a 24 pozzetti (ARPAT, 2003; UNI EN ISO 10253, 2006) 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 filtrata, sterilizzata e portata a salinità 30‰ con aggiunta della medesima quantità di mezzo di coltura ed inoculo usato per i campioni, è stata considerata come controllo negativo. In contemporanea, un controllo positivo è stato effettuato utilizzando dicromato 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 densità algale di ogni replicato, previa risospensione della soluzione contenuta in ciascun pozzetto.

Tutte le valutazioni della densità algale sono state effettuate tramite conta al microscopio invertito utilizzando una camera di conta cellulare Thoma.

### Analisi dei risultati

Le densità cellulari registrate al termine del test sono state comparate con la concentrazione cellulare iniziale, determinando:

$$\text{Fattore di Crescita (FC)} = C_f/C_i,$$

$$\text{Tasso di Crescita (TC)} = (\ln C_f - \ln C_i)/3,$$

$$\text{Coefficiente di Variazione (CV)} = \text{Scarto tipo dei valori del Tasso di Crescita delle singole repliche} / \text{Media dei Tassi di Crescita delle repliche} * 100,$$

in cui risulta:

$C_f$  = concentrazione finale (cells/mL)

$C_i$  = concentrazione iniziale (cells/mL).

Affinché il test fosse ritenuto valido, il controllo negativo (SW) ha dovuto rispettare i seguenti criteri di validazione:  $FC \geq 16$ ;  $TC \geq 0.9 \text{ d}^{-1}$ ;  $CV \leq 5 \%$ .

Un ulteriore criterio di validazione del test è stata la determinazione del valore di EC50 registrato con il dicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), valore poi comparato all'intervallo preso come riferimento dal Protocollo ISO 10253 (2006) ( $EC_{50} K_2Cr_2O_7 = 14.8 - 25.4 \text{ mg/L}$ ,  $n = 7$ ).

Per ciascun campione testato è stata quindi calcolata la Percentuale di Inibizione (I):

$$I = (TC \text{ Campione X} - TC \text{ Controllo}) / TC \text{ Controllo} * 100.$$

Per esprimere il giudizio di tossicità è stata utilizzata la scala di valutazione riportata in Tabella 3 basata sulla percentuale di inibizione registrata testando l'elutriato all'100%.

Tab. 3 - Scala di tossicità utilizzata nel saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

Valore di Inibizione	Valutazione di Tossicità
$I \leq -50\%$	Biostimolazione
$-50\% < I < 20\%$	Assente/Trascurabile
$20\% \leq I \leq 50\%$	Moderata
$50\% \leq I \leq 80\%$	Alta
$80\% < I \leq 100\%$	Molto Alta

### 3.1.5 Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

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

Il sistema Microtox® è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di questa specie. Poiché in presenza di contaminanti l'emissione di luce da parte di *V. fischeri* diminuisce, la misura dell'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 marine, acquose (acqua interstiziale, elutriato, ecc.) e solide (fanghi, sedimenti), nonché a soluzioni acquose di sostanze tossiche pure sia organiche che inorganiche.

#### *Preparazione delle matrici ambientali*

I saggi biologici sono stati applicati all'elutriato e direttamente alla fase solida. Gli elutriati sono stati preparati miscelando aliquote di sedimento ed acqua di mare artificiale ISO in rapporto 1:4 di peso secco, lasciando le miscele in agitazione per un'ora e centrifugando per 20 minuti a 3500 rpm.

Il sovranatante, filtrato a 0.45  $\mu\text{m}$  al fine di eliminare eventuali particelle di sedimento in sospensione in grado di determinare interferenze ottiche, è stato successivamente utilizzato per il saggio a 30 min.

La fase solida è stata preparata per semplice centrifugazione refrigerata (3500 rpm a 4°C per 30'), eliminando successivamente l'acqua interstiziale come sovranatante.

#### *Protocolli di riferimento e procedura adottata*

L'emissione della bioluminescenza è stata misurata all'interno del luminometro termostato M500, dotato di pozzetti termostatati a 15 °C per i controlli e i campioni e a 4°C per il reagente.

I metodi utilizzati sono riconducibili al protocollo standard ISO 11348. In particolare l'organizzazione specifica dei saggi biologici in termini di scansione delle diluizioni e numero di controlli è stata la seguente:

- ✓ per i campioni di elutriato è stata applicato il protocollo Comparison al 90% (Azur Environmental, 1995a) organizzato con 5 repliche del controllo e del campione al 90% di concentrazione, effettuando le letture dopo esposizione di 5 e 15 minuti;
- ✓ per campioni di sedimento centrifugato è stato applicato il protocollo Solid Phase Test (SPT) con la procedura Large Sample Method (Azur Environmental, 1995b) 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.

La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, è stata elaborata mediante un software dedicato (Microtox Omni™ v. 1.16) che, nel caso degli elutriati, ha consentito di individuare la variazione media percentuale di emissione di luce rispetto al controllo, mentre, nel caso della fase solida, la EC50 (concentrazione del campione cui corrisponde una riduzione della bioluminescenza pari al 50%). In quest'ultimo caso la EC50 è stata ulteriormente elaborata,



esprimendola come TU (Unità Tossiche = 100/EC50), che consente di ottenere una relazione diretta fra tossicità e riduzione della bioluminescenza, e come Sediment Toxicity Index (S.T.I.), che permette di esprimere la reale tossicità acuta del campione rispetto alla tossicità "naturale" di un campione di riferimento avente le medesime caratteristiche granulometriche (Onorati *et al.*, 1999). Al fine di esprimere il risultato del saggio nella scala S.T.I., 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, è stata eseguita anche un'analisi granulometrica mirata ad individuare la proporzione tra le due frazioni citate, indispensabile per la valutazione del reale livello di tossicità acuta. Le modalità utilizzate per l'individuazione di tali frazioni granulometriche si dividono in 3 fasi:

1. Trattamento del campione con una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per facilitare la separazione e la disgregazione del sedimento;
2. Setacciatura su getto di acqua distillata mediante setacci ASTM da 63 µm e da 1 mm;
3. Recupero delle frazioni ottenute ed essiccamento in stufa, scartando quella > di 1 mm.

L'elutriato è stato considerato tossico quando il campione ha mostrato una inibizione media della bioluminescenza statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) e maggiore o uguale al 10%.

L'elutriato è stato considerato biostimolante quando il campione ha mostrato una bioluminescenza statisticamente superiore al controllo ( $p > 0.05$ ) di almeno il 10%.

La matrice solida (centrifugata) è stata giudicata tossica quando il valore di S.T.I è risultato superiore a 1. La scala adottata per la quantificazione della tossicità è riportata in Tabella 4 (ICRAM-APAT, 2007).

Tab. 4 – Scale di tossicità acuta utilizzate nel saggio biologico mediante *V. fischeri*

Matrice	Tossicità assente/ trascurabile	Tossicità presente	Tossicità elevata	Tossicità molto elevata
Elutriato	EC <sub>20</sub> ≥ 90% % Effetto ≤ 20%	EC <sub>20</sub> < 90% e EC <sub>50</sub> ≥ 90% 20% < Effetto ≤ 50%	20% ≤ EC <sub>50</sub> < 90% Effetto > 50%	EC <sub>50</sub> < 20%
Fase solida	S.T.I. ≤ 3	3 < S.T.I. ≤ 6	6 < S.T.I. ≤ 12	S.T.I. > 12

### 3.1.6 Saggio biologico con *Paracentrotus lividus*

L'affidabilità del riccio di mare come bioindicatore è riconosciuta a livello mondiale e già negli anni '80 i test di fecondazione e di sviluppo embrionale sono stati inclusi nella lista ICES (1997) dei test biologici più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino. Procedure standard per i test di fecondazione e di sviluppo embrionale sono state messe a punto per le specie della costa orientale (*Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus droebachiensis*) e per quelle della costa occidentale (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Dendraster excentricus*) degli Stati Uniti (USEPA, 1994, 1995,

2000; ASTM, 1995, 2004) e per il Canada (Environment Canada, 1992). In Italia, la specie autoctona *Paracentrotus lividus*, ha trovato applicazione in campo ecotossicologico in particolare per quanto riguarda lo studio degli effetti sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale (difetti nello sviluppo e aberrazioni mitotiche) di sostanze pure e di effluenti. In effetti, il saggio biologico con *P. lividus* può essere impiegato sia nella valutazione della qualità di matrici ambientali (acque e sedimenti marini) sia nella stima della tossicità di sostanze o preparati solubili in acqua di mare. In particolare, per quanto riguarda i sedimenti marini esso è compatibile con l'acqua interstiziale e l'elutriato, come riportato in “Quaderni – Ricerca Marina n.11/2017 – Saggio di fecondazione e saggio di sviluppo embrionale con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea)”, protocollo pubblicato da ISPRA nel 2017.

#### *Matrici acquose testate*

La matrice ambientale soggetta alla valutazione ecotossicologica in questo saggio biologico è l'elutriato. L'elutriato fornisce informazioni su tutte quelle componenti estraibili in acqua. Quest'ultima rappresenta una delle matrici più indicative nello studio degli effetti della movimentazione dei fondali (USACE, 1991) come nei dragaggi portuali, nei siti di discarica, ecc.

#### *Preparazione dell'elutriato*

L'elutriato è stato preparato in accordo con il protocollo standard US EPA (1991) combinando in peso quattro parti di acqua filtrata prelevata da una zona non contaminata con una parte di sedimento. Il tutto è stato messo ad agitare per 1 h a 400 giri/min. La fase liquida è stata quindi raccolta e centrifugata per 20 min a 3500 giri/min. 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 sembra alterare in modo significativo le caratteristiche dei nutrienti ( $\text{NO}_3$  e  $\text{PO}_4$ ) della fase liquida (Clementson & Wayte, 1992) e uno studio condotto da Carr e Chapman (1995) ha permesso di verificare l'assenza di differenze significative tra la tossicità di campioni di matrici acquose appena estratte o congelate. 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.

L'elutriato viene testato sia non diluito (100%) che diluito, con acqua di mare filtrata a  $0,45 \mu\text{m}$  alle concentrazioni finali del 25% e 50%.

#### *Raccolta degli organismi*

Per assicurare la maturità sessuale, i ricci di mare adulti vengono raccolti tra Settembre e Maggio (Fenaux, 1968). Esemplari adulti sono stati prelevati da fondali rocciosi del litorale di Livorno in una zona distante da fonti di inquinamento antropico (scarichi urbani e industriali).

I ricci vengono raccolti ad una profondità tra 1 e 3 m e posti in un contenitore di plastica e ricoperti con abbondante carta bibula umida per minimizzare lo stress da trasporto ed evitare così possibili emissioni di gameti. In laboratorio gli esemplari vengono posti in una camera termostata, in acquari di vetro contenenti acqua di mare raccolta nello stesso sito di campionamento degli organismi e dotati di un sistema di aereazione e di filtraggio (20 individui per 100 l di acqua). Giornalmente vengono controllati temperatura ( $16\pm 1^\circ\text{C}$ ), salinità (34‰ - 38‰), pH (7,8-8,2), ammoniaca e nitrati. I ricci sono stabulati negli acquari, prima dell'esecuzione del test, per almeno una settimana.

#### *Modalità di esecuzione del test di spermiossicità*

La metodologia segue il protocollo messo a punto da Dinnel et al. (1987), in accordo con le procedure standard descritte in US EPA (1991, 1994, 1995) e riprese dalla ASTM (1991, 1995) e dalla EPS (1991, 1992). La scelta di alcuni parametri utilizzati si basa su dati riportati in letteratura (Giambartolomei, 1990; Galarin et al., 1992; Volpi Ghirardini et al. 2005; Ennas et al., 2002; Lera, 2002; Lera e Pellegrini, 2006 a ; Lera et al, 2006 b).

Il saggio consiste nell'esporre un numero definito di gameti maschili per 1 h ad una sostanza tossica o ad una matrice acquosa complessa di cui si vuole valutare la tossicità. Lo scopo è di valutare l'efficacia della fecondazione rispetto a un controllo negativo (acqua di mare filtrata a  $0.45\mu\text{m}$ ). Successivamente vengono aggiunte le uova e dopo 20 minuti il test viene bloccato con l'aggiunta di poche gocce di soluzione di Lugol al 5% (Carlo Erba, Milan). Il rapporto sperma:uova adottato è di 15000:1 con 1000 uova in 10 ml di soluzione test.

Al fine di valutare la sensibilità dei gameti impiegati nell'allestimento del saggio viene allestito un controllo positivo, rappresentato da concentrazioni crescenti della sostanza tossica di riferimento ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).

Al termine delle prove vengono conteggiate le uova fecondate e calcolate le percentuali di fecondazione corrispondenti alle diverse diluizioni della matrice acquosa complessa testata.

#### *Modalità di esecuzione del test di embriossicità*

La metodologia è stata sviluppata a partire dalla procedura standard ASTM (2004) e da studi di letteratura (Volpi Ghirardini et al. 2005; Sartori et al. 2016; Morroni et al. 2018). Il test consiste nell'ottenere gli zigoti di *P. lividus* attraverso l'unione della sospensione spermatica (concentrazione desiderata) con la sospensione di uova in un rapporto spermatozoi:uova di 10:1. Il beaker è così incubato a  $18\pm 1^\circ\text{C}$  per almeno 20 min affinché possa avvenire la fecondazione delle uova.

Il saggio di embriossicità viene eseguito esponendo 1 mL di soluzione di uova fecondate a 10 mL della soluzione test in cella termostatica al buio a  $18^\circ\text{C}\pm 1$  per 72h. Il rapporto sperma:uova adottato è di 15000:1 con 1000 uova in 10 ml di soluzione test.

Il tempo di esposizione scelto per il test (72h), in modo da garantire che tutti gli zigoti raggiungano lo stadio larvale di pluteo 4 braccia nel controllo negativo.

Al fine di valutare la sensibilità dei gameti impiegati nell'allestimento del saggio viene allestito un controllo positivo, rappresentato da concentrazioni crescenti della sostanza tossica di riferimento ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).

Il test viene fissato con poche gocce di soluzione di Lugol al 5% (Carlo Erba, Milan).

La stima della percentuale di plutei normali avviene contando 100 larve. Per ottenere una stima più accurata degli effetti embriotossici, si distinguono le anomalie dello sviluppo distinguendo tra plutei malformati, cioè larve sviluppate ma che presentano malformazioni scheletriche e/o all'apparato digerente, e fasi pre-larvali di blastula, gastrula, prisma e pluteo precoce, che si sono bloccate prima del raggiungimento del completo sviluppo.

#### *Elaborazione dei risultati*

L'effetto della sostanza testata, di cui si vuole valutare la tossicità, viene rilevato dalla percentuale di plutei normoformati rispetto a un controllo di acqua di mare (controllo negativo). Il test viene considerato accettabile se la percentuale dei plutei normoformati nel controllo negativo è superiore all'80%. Applicando la formula di Abbott (Finney, 1971), la percentuale plutei malformati in ogni camera test viene confrontata e normalizzata rispetto al controllo.

$$\text{Abbott} = (\text{X}-\text{Y})/(\text{100}-\text{Y}) \cdot \text{100}$$

X=% di plutei malformati campione da testare    Y=% di di plutei malformati nel controllo

I valori così ottenuti vengono impiegati in due elaborazioni differenti: per quanto riguarda i campioni, la loro eventuale tossicità viene valutata mediante il calcolo dell' EC<sub>20</sub> e dell' EC<sub>50</sub> ottenuti con lo specifico programma Tox Calc 5.0 mediante il metodo della Probit Analysis. I valori ottenuti vengono confrontati con la scala di tossicità riportata in Tabella 5 ed il campione può essere valutato contaminato o non contaminato (ICRAM-APAT, 2007).

Tab. 5 – Scala di tossicità del saggio con *P. lividus*

EC20/EC50	Tossicità
EC20 ≥ 90%	Assente/ Trascurabile
EC20 < 90% e EC50 > 100%	Media
40% ≤ EC50 ≤ 100%	Alta
EC50 < 40%	Molto alta

Per il tossico di riferimento, invece, i valori di EC<sub>50</sub> vengono ottenuti utilizzando due metodi statistici differenti: il Trimmed Spearman-Kärber (Hemilton et al.,1978) e la Probit Analysis (Finney, 1971). Il valore dell'EC<sub>50</sub> indica la concentrazione della sostanza di prova ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 1000 mg/l) che

causa una riduzione della fecondazione del 50% rispetto a un controllo negativo. I valori di EC<sub>50</sub> ottenuti con il tossico di riferimento sono stati confrontati con la carte di controllo del laboratorio in modo tale da verificare se la risposta delle prove effettuate è confrontabile con quella normalmente riscontrata nei saggi dello stesso tipo effettuati in precedenza nello stesso laboratorio di prova con lo stesso protocollo metodologico

### **3.1.7 Saggio biologico con *Acartia tonsa***

Il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848) è una specie cosmopolita delle regioni temperate, dove è comunemente ritrovato in aree costiere ed estuari. Esso rappresenta un importante membro delle comunità zooplanctoniche e costituisce una fonte primaria per consumatori secondari.

*Acartia tonsa* è stato proposto per i test di tossicità e gli studi di inquinamento marino a partire dal 1977 (Lee W. 1977) ed è ampiamente utilizzato in studi ecotossicologici sia in Europa che negli Stati Uniti, rientrando tra le specie indicate dalla International Organization for Standardization (ISO, 1999) per l'esecuzione di saggi tossicologici applicati agli ambienti marini e salmastri. Successivamente alla pubblicazione della metodica ISO che prevede l'utilizzo di individui adulti o al V stadio di copepodite, Andersen et al (2001) e Wollenberger et al (2003) hanno proposto l'utilizzo di embrioni in saggi di tossicità cronica e, recentemente, Gorbi et al (2012) ha proposto metodi standardizzati per un saggio acuto (24- e 48-h) ed uno semicronico (7 giorni) a partire dagli embrioni di *A. tonsa*, prevedendo anche una standardizzazione delle procedure di allevamento in laboratorio di tale specie. Embrioni e stadi naupliari di diverse specie di copepodi sono risultati ampiamente sensibili a sostanze tossiche (Lindley et al, 1999).

Lo sviluppo dei primi stadi vitali da uova a copepoditi può essere utilizzato come endpoint per la valutazione degli effetti tossici di sostanze chimiche, effluenti o campioni d'acqua in condizioni semi-statiche: gli stadi larvali naupliari e quelli giovanili di copepodite infatti sono morfologicamente distinti e quindi, la transizione dall'ultimo stadio naupliare (VI) al primo stadio di copepodite è facile da valutare. In tal senso, recentemente è stato pubblicato il protocollo ISO 16778 (2015) che standardizza tale tipo di test (Larval Development Rate test) con *A. tonsa* in fase acquosa.

Tale tipologia di test inoltre è stata proposta come approccio alternativo per la valutazione della tossicità di sedimenti marini, ponendo uova appena emesse direttamente all'interfaccia sedimento-acqua in condizioni statiche e mantenendo la presenza del sedimento fino al termine del test, al raggiungimento degli stadi giovanili di copepodite.

#### *Caratteristiche generali del saggio LDR (Larval Development Rate Test)*

Il principio del test consiste nell'espore embrioni di *A. tonsa* rilasciati al massimo da 48 ore (prevedendo una conservazione a freddo degli embrioni raccolti i giorni precedenti l'inizio del test) ed i

successivi stadi di sviluppo a quantità definite di sedimento, in condizioni fisico-chimiche standard. Al termine del periodo d'incubazione (6 giorni) viene confrontato il tasso di stadi giovanili (copepoditi) ottenuto con l'esposizione al sedimento con i valori registrati nel sedimento di controllo (sedimento con livelli minimi di contaminazione o che comunque non evidenzia effetto sullo sviluppo di *A. tonsa*, come la sabbia quarzifera del Po) determinando un valore di inibizione percentuale poi confrontato alla tabella per la valutazione della tossicità del sedimento analizzato. Parallelamente è svolto un saggio in fase acquosa con acqua di mare filtrata secondo la modalità riportata nel protocollo ISO 16778 (2015).

Il saggio biologico è stato eseguito seguendo il protocollo ISO 16778:2015 con alcune modifiche specifiche (Wollenberger and Kusk, 2006).

#### *Mantenimento della coltura di A. tonsa*

La coltura di *A. tonsa* è stata allevata in bidoni da 20 l contenenti acqua di mare naturale filtrata 0,22 µm (FSW) (salinità 30 ‰, pH 8,2 ± 0,1) ed alimentata tre volte a settimana con una dieta multi algale costituita dalle specie *Rhinomonas reticulata*, *Rhodomonas baltica* e *Isochrysis galbana*, ad una concentrazione finale totale corrispondente ad un contenuto di carbonio di almeno 1500 µg l<sup>-1</sup>. I tre ceppi algali sono stati coltivati come descritto da Zhang et al. (2013) ed utilizzati per l'alimentazione degli animali durante la fase esponenziale di crescita. La coltura di *A. tonsa* è stata mantenuta in una camera termostata a 20 ± 1 °C con un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 ore di buio. L'acqua di coltura è stata parzialmente rinnovata ogni mese.

#### *Fasi preparatorie del test*

Adulti di *A. tonsa* sono stati selezionati dalla coltura principale ed incubati ad una densità ≤ 40 ind/l in beaker contenenti una miscela di alghe *R. reticulata* and *R. baltica* ad una concentrazione tale da fornire un quantitativo di carbonio totale > 1500 µg C l<sup>-1</sup>. Dopo 24 ore, il contenuto dei beaker è stato filtrato utilizzando una maglia da 55 µm che trattiene sia gli embrioni che gli adulti. Una successiva filtrazione con maglia da 155 µm ha permesso di separare gli embrioni (di dimensione inferiore) dagli organismi che, trattenuti dal filtro, sono stati successivamente trasferiti nuovamente in beaker con mezzo fresco al fine di ripetere la raccolta di embrioni anche nelle successive 24-48 ore.

Gli embrioni raccolti sono stati conservati a 4°C fino all'inizio del test.

Il giorno prima dell'inizio del saggio, 3,5 g di sedimento sono stati introdotti in ciascuna camera test (contenitori in polistirene da 125 ml) aggiungendo FSW (60 ml) e inserendo in ciascun replicato un filtro cilindrico con maglia da 55 µm (utile per facilitare il recupero degli organismi a fine test). Infine sono stati mantenuti in camera termostata per 24 ore circa fino all'inoculo degli embrioni.

#### *Esecuzione del test*

Embrioni rilasciati al massimo da 48h e mantenuti in frigorifero sono stati concentrati in un volume definito e la loro densità è stata valutata mediante conte di sub aliquote al fine di calcolare il volume di sospensione di embrioni da aggiungere in ciascuna camera test per ottenere un numero compreso tra 65 e 80. Aggiunto il volume di sospensione di embrioni (inserito nel volume d'acqua interno al filtro), un opportuno volume di una coltura concentrata di *R. baltica* è stato addizionato in ciascuna camera test per avere una densità algale finale di  $5 \cdot 10^4$  cells/ml (considerando un volume finale di 80 ml).

Il volume finale in ciascuna camera test è stato poi portato a 80 ml mediante aggiunta di FSW. Le camere test sono state quindi incubate in armadio termostato a  $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 16h:8h luce:buio (500 – 1000 lux).

Parallelamente è stato eseguito un test in fase acquosa secondo la metodologia ISO 16778 (2015) con FSW e con il tossico di riferimento 3,5-diclorofenolo ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$ ) (Pestanal® analytical standard, Fluka, Sigma-Aldrich, concentrazioni testate comprese tra 20 e 750  $\mu\text{g/l}$ ) per testare la procedura e la sensibilità della coltura di *A. tonsa*.

La prova è stata effettuata prevedendo 6 repliche per ciascun campione di sedimento, 9 repliche per il sedimento di controllo (9 repliche per l'FSW e 5 repliche per ciascuna delle 6 concentrazioni di 3,5-diclorofenolo testate).

Tre gruppi da 65-80 uova sono poi stati posti in volumi di 40 ml di acqua di mare in cristallizzatori da 60 ml ed incubati alle stesse condizioni del test per valutare dopo 48-72h la percentuale di successo di schiusa sulla base del numero di uova schiuse (che al microscopio invertito, appaiono come membrane vuote in cui è spesso possibile distinguere una frattura) e di quello di uova non schiuse (scure, con un contenuto che può apparire più o meno omogeneo o con zone di differente colorazione), percentuale calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Schiusa uova (\%)} = \left[ \frac{\text{N. uova schiuse}}{\text{N. uova schiuse} + \text{N. uova non schiuse}} \right] * 100.$$

Dopo due giorni di incubazione in ciascuna camera test contenente sedimento (e sedimento di controllo) è stato aggiunto un volume definito di coltura algale tale da avere  $5 \cdot 10^4$  cells/ml finale mentre i replicati di FSW e controllo positivo sono invece stati addizionati con FSW, alga e, nel caso del 3,5-diclorofenolo, opportuni volumi di soluzione concentrata di tossico, determinando un parziale rinnovo delle soluzioni (volume finale 80 ml). Le condizioni di incubazione sono state quindi mantenute costanti.

Al termine del quinto giorno ciascun replicato di FSW e controllo positivo è stato filtrato su maglia da 55  $\mu\text{m}$ , posto in cristallizzatore con volume minore (20-30 ml) di FSW e quindi fissato aggiungendo 0.5 ml di Lugol.

Il test è stato concluso per tutte le altre camere test (campioni di sedimento e sedimento di controllo) al sesto giorno, poiché la presenza di sedimento può indurre un ritardo nello sviluppo larvale: gli organismi sono stati recuperati estraendo il filtro cilindrico, sono stati quindi sciacquati con FSW e concentrati in un cristallizzatore e fissati mediante l'aggiunta di Lugol.

Il numero di nauplii e copepoditi è stato quindi valutato utilizzando uno stereomicroscopio Leica.

I valori di nauplii e copepoditi ottenuti al termine del test sono stati quindi sommati per calcolare il numero totale di organismi arrivati a fine test (TO).

Il numero di copepoditi ed il numero totale di organismi sono poi stati utilizzati per calcolare l'LDR ratio, vale a dire la frazione di organismi sul totale che ha raggiunto lo stadio di copepodite, utilizzando la seguente formula:

$$\text{LDR ratio} = [\text{N. copepoditi}/(\text{TO})].$$

La percentuale di inibizione (% I) dello sviluppo larvale indotta dall'incubazione con ciascun sedimento è stata calcolata come segue utilizzando i valori di LDR ratio registrati nel campione (LDRs) e nel sedimento di controllo (LDRc):

$$\% I = 1 - (\text{LDRs}/\text{LDRc}) * 100.$$

Affinché il test condotto fosse ritenuto valido, le seguenti condizioni di accettabilità sono state prese in considerazione:

- il successo di schiusa medio ottenuto nei cristallizzatori deve essere di almeno il 75%;
- il valore di LDR medio registrato nel controllo (sedimento di controllo) deve essere di almeno 0.3;
- il valore di EC50 per il 3,5-DCP per il parametro inibizione dello sviluppo larvale deve essere compreso nell'intervallo 33 – 380 µg/l.

La tossicità del campione di sedimento è stata quindi determinata utilizzando la scala di tossicità riportata di seguito:

Tab. 6 - Scala tossicità test LDR

Inibizione Percentuale	Tossicità
$I \leq 25 \%$	Assente/Trascurabile
$25\% < I \leq 40 \%$	Media
$40\% < I \leq 75 \%$	Alta
$I > 75 \%$	Molto Alta

## 3.2 Colonna d'acqua

### 3.2.1 Mussel watch

*Descrizione delle strutture utilizzate per le attività di traslocazione dei mitili*



L'indagine di monitoraggio è stata effettuata secondo la tecnica degli organismi trapiantati. I mitili sono stati raccolti da una popolazione proveniente da un sito di allevamento e traslocati, senza alcuna stabulazione, per un periodo di 4-5 settimane nelle aree da monitorare. Da questa popolazione sono stati prelevati 40 esemplari (10 per ogni replica), utilizzati per determinare il T=0 (condizione pre-trapianto).

Contestualmente sono stati trapiantati circa 200-300 individui di taglia omogenea (5-7 cm) approssimativamente compresa tra il 70 ed il 90% delle dimensioni massime della popolazione da cui sono stati raccolti.

Il trapianto è stato effettuato mantenendo gli organismi in reti di nylon o strutture plastiche fissate nella stazione da monitorare, ad una profondità compresa tra 1 e 5 m e ad almeno un metro dal fondo.

Trascorso il periodo *in situ*, i mitili sono stati recuperati, se necessario mantenuti refrigerati a circa 4°C in ambiente umido (ma non immersi in acqua) fino ad un massimo di 24 ore, e rapidamente dissezionati e preparati per le successive analisi chimiche e tossicologiche.

Per ogni punto di campionamento sono stati immediatamente preparati 7 pool, ciascuno costituito generalmente dalle intere parti molli di circa 10 organismi, da destinare alle analisi chimiche di idrocarburi policiclici aromatici (3 pool per l'Università Politecnica delle Marche), alle analisi chimiche dei metalli in traccia (3 pool per ISPRA STS Livorno) e per riserva (1 pool). I tessuti molli dei mitili selezionati sono stati prelevati, lavati con acqua deionizzata (MilliQ) e congelati a -20°C fino al momento dell'analisi.

Per le analisi dei biomarkers di competenza dell'Università Politecnica delle Marche, subito dopo il recupero dei mitili sono state dissezionate le ghiandole digestive di 30 organismi, suddivise in 10 pool ciascuno costituito dai tessuti di 3 organismi, congelate in azoto liquido e mantenute successivamente a -80°C fino al momento delle analisi. Ulteriori ghiandole digestive di altri 5 organismi sono state dissezionate e opportunamente congelate in azoto liquido, per le analisi istochimiche; infine, sono stati preparati 5 pool di emolinfa ciascuno costituito dall'emolinfa di 3 organismi, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C per la determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi.

Mentre le analisi di bioaccumulo dei metalli e degli IPA sono state condotte in tutte le stazioni di monitoraggio, le analisi dei biomarker sono state effettuate su 5 pools di organismi derivanti dall'accorpamento di alcune stazioni di monitoraggio, come meglio illustrato nel Piano di monitoraggio, rappresentative di altrettante zone dell'area interessata dal monitoraggio e potenzialmente soggette ad impatti antropici differenti.

#### *Bioaccumulo di metalli*

Per quanto riguarda le analisi del bioaccumulo di metalli nei mitili, la mineralizzazione del campione è stata effettuata su aliquote di circa 0,3-0,4 grammi di sostanza preventivamente seccata in stufa a 50 °C fino al raggiungimento di un peso costante. I tessuti molli dei mitili sono stati successivamente polverizzati in mortaio, pesati con bilancia, avente risoluzione al decimo di mg, direttamente nel recipiente in teflon in cui avviene la mineralizzazione.

Il metodo di analisi ha previsto l'attacco con HNO<sub>3</sub> ultrapuro al 65% (5 ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%(1 ml) e 2 ml acqua ultrapura (Millipore – MilliQ Direct 8) e digestione mediante un sistema chiuso a microonde a alta pressione e temperatura opportunamente programmato.

I metalli in traccia determinati sui tessuti molli di *Mytilus galloprovincialis* sono stati As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni Pb e Zn. Le analisi sono state condotte mediante l'impiego di Spettrofotometria ad Emissione Ottica (Agilent AX Simultaneous ICP-OES 720).

Per il mercurio le analisi sono state condotte mediante l'utilizzo Spettroscopia ad Assorbimento Atomico (metodo dei Vapori Freddi CVAA; Cetac M-7600).

L'accuratezza è stata verificata impiegando il materiale standard di riferimento SRM NIST 2976 Mussel Tissue (Nationa Institute of Standards & Technology, USA), che è stato processato con le stesse modalità dei campioni.

#### *Bioaccumulo di Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)*

La determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei tessuti degli organismi è stata effettuata secondo metodiche precedentemente descritte (Bocchetti et al., 2008), utilizzando un'aliquota decongelata, omogenea di campione, pari a circa 2-3 g. Al momento della preparazione i campioni sono stati addizionati con 5 ml di una soluzione di KOH 0.5M in metanolo puro per HPLC, al fine di operare una preliminare l'estrazione solido-liquido dei campioni; questi sono stati quindi agitati vigorosamente ed in seguito mantenuti in movimento per una notte intera a 4°C. Il completamento dell'estrazione solido-liquido è stata eseguita mediante microonde a 400W e 55°C per 15 min (Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM). I campioni sono stati centrifugati a 1000×g per 5 min al fine di eliminare il residuo solido e i sovrantanti recuperati in nuovi tubi. Il volume dei campioni è stato concentrato a 0.5 mL mediante centrifuga evaporante (Speedvack, Juan), a 45°C per 60-120 min. Infine ai campioni è stato applicato un processo di purificazione e concentrazione attraverso una cromatografia a bassa pressione con resine SPE (estrazione in fase solida) del tipo Backerbond SPE C18 (500 mg, 6 mL) condizionate con 10 mL di fase mobile (tampone KHCO<sub>3</sub> 10 mM in H<sub>2</sub>O ultrapura e metanolo al 10%) e recuperati in fine con 1 ml di acetonitrile puro per HPLC. Tale purificazione è stata effettuata utilizzando il sistema automatico Gilson Aspec GX271.

Il sistema cromatografico utilizzato è costituito da una pompa HPLC per gradiente binario e coppia di detector in fluorescenza e serie di diodi (Agilent Technology Serie Infinity 1260), capace di ottenere contemporaneamente 4 cromatogrammi in fluorescenza e 5 in ultravioletto, consentendo una maggiore accuratezza della determinazione di ciascun congenere ed un controllo qualitativo degli analiti su più canali. La separazione cromatografica è stata eseguita mediante equilibri di ripartizione utilizzando una colonna analitica Phenomenex Envirosep PP da 125 mm di lunghezza, 3.2 mm di diametro interno e particelle da 5µm di diametro, munita di una precolonna da 20 mm di lunghezza e riempita con la stessa fase stazionaria della colonna. 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 10 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). L'accuratezza della procedura analitica e l'efficienza dell'estrazione e preparazione dei campioni è stata controllata attraverso la stima del recupero degli analiti ricercati in appropriate matrici certificate standard (SRM-NIST 2977; SRM-NIST 1944). Gli analiti determinati mediante il metodo appena descritto possono essere classificati in IPA a basso peso molecolare (naftalene, acenaftilene, 1-metil naftalene, 2-metil naftalene, acenaftene, fluorene, fenantrene ed antracene) e IPA ad alto peso molecolare (fluorantrene, pirene, benzo[a]antracene, crisene, 7,12-dimetil benzo[a]antracene, benzo[b]fluorantrene, benzo[k]fluorantrene, benzo[a]pirene, dibenzo[a,h]antracene, benzo[g,h,i]perilene, indeno(1,2,3-cd)pirene). Le concentrazioni sono espresse in ng/g di campione (peso secco); il peso secco dei campioni è stato determinato essiccando delle aliquote degli stessi alla temperatura di circa 60°C per almeno 8 ore e determinando, per ciascun sedimento, il contenuto d'acqua associato.

#### *Analisi ecotossicologiche (biomarkers)*

I materiali e metodi dei biomarkers sono forniti, insieme ai risultati, nell'**Allegato 4 – Bioaccumulo di IPA e analisi delle risposte biologiche nei mitili**.

#### **3.2.2 Saggi biologici**

In ogni stazione sono state prelevate due aliquote di acqua, che sono state miscelate in un unico campione, sottoposto poi a una batteria composta da tre saggi ecotossicologici: *Vibrio fischeri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Paracentrotus lividus*. (per metodi e scale di tossicità, vedi paragrafi 3.1.4 – 3.1.5. – 3.1.6.)

### 3.2.3 Saggi *in situ*

I saggi biologici condotti *in situ* prevedono l'esposizione della specie test direttamente in campo, al fine di verificare la comparsa di possibili effetti tossici. Rispetto ai saggi condotti in condizioni controllate di laboratorio, i saggi *in situ* permettono di ridurre la manipolazione dei campioni e di integrare nel tempo possibili effetti dovuti alle variazioni di parametri ambientali (idrodinamismo, temperatura, luce, sedimentazione, ecc) che possono influire sulla biodisponibilità e sulla tossicità dei contaminati presenti nell'ambiente. Di conseguenza è possibile giungere a un'interpretazione più realistica dell'inquinamento presente nell'ecosistema oggetto di studio.

In questo caso il saggio di embriotossicità con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* è stato eseguito esponendo gli embrioni sia in laboratorio che *in situ*.

#### Materiali

Per consentire l'esposizione *in situ* nella colonna d'acqua degli embrioni di *P. lividus* è stata appositamente costruita una "sonda biologica" (Fig. 2).

Questa è costituita da un supporto rigido sul quale sono inserite tre camere d'esposizione contenenti gli embrioni. Non è stato impiegato nessun tipo di materiale metallico, al fine di evitare l'ossidazione dovuta all'esposizione prolungata all'acqua di mare.

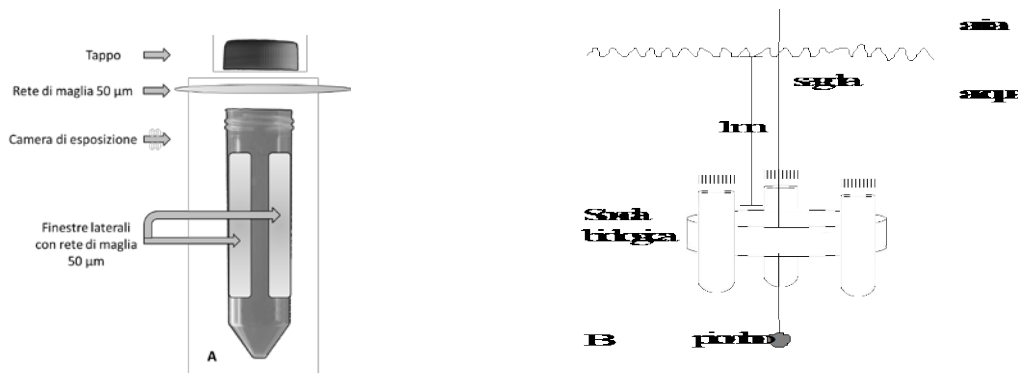


Fig. 2 – Sonda biologica: camera d'esposizione (A) e posizione in mare della sonda biologica (B)

In particolare, il supporto realizzato in PVC è stato dotato di appositi fori, al fine di fissarvi saldamente le camere utilizzando fascette in materiale plastico. Ogni singola camera è di forma cilindrica per un volume di 50 ml (Fig. 2A). In corrispondenza dell'estremità superiore è dotata di un'apertura, realizzata forando il tappo a vite, e alla quale è applicata una rete con maglia di 55 µm. E' così possibile esporre alla matrice ambientale il contenuto della camera senza però provocare la fuoriuscita degli embrioni, visto che il diametro delle uova non fecondate è compreso tra gli 80 e i 90 µm. Le camere sono inoltre dotate di due finestre laterali al fine di assicurare il ricircolo d'acqua al loro interno. Al centro del

supporto è stato fissato un peso di 300 gr. La sonda così realizzata è stata collegata ad una boa appositamente posizionata nella stazione oggetto di studio e collegata ad un corpo morto in cemento predisposto sul fondale. In questo modo le camere sono state mantenute a un metro di profondità (Fig. 2B).

Una sonda biologica è stata posizionata in 3 stazioni di monitoraggio (Vn1, Vn2, Vn4), con 3 camere d'esposizione e quindi 3 repliche per stazione.

### *Metodologia*

Come metodologia di laboratorio è stata utilizzata quella precedentemente riportata (vedi par. 3.1.5). La metodica utilizzata *in situ* è stata applicata seguendo quanto riportato da Morrioni et al. (2018).

In particolare i gameti vengono prelevati in laboratorio, separati in diverse aliquote e successivamente portati in campo. Localizzata la stazione oggetto di studio, viene prelevato il giusto volume di sperma e trasferito nella sospensione di uova, agitando e aspettando 20 minuti in modo da essere sicuri che avvenga la fecondazione. Intanto le camere d'esposizione sono predisposte per essere posizionate in mare e, al termine dei 20 minuti, 50 ml della soluzione di uova fecondate vengono iniettati all'interno delle camere d'esposizione. Appena conclusa l'operazione, le repliche vengono contemporaneamente calate e bloccate in acqua. Tale operazione deve essere fatta tassativamente entro un'ora dalla fecondazione, per essere sicuri che l'esposizione alla matrice avvenga precedentemente alla prima divisione cellulare dell'embrione. A tal fine devono essere opportunamente preparate 2 aliquote di gameti provenienti dallo stesso pool da portare in campo.

Inoltre, deve essere preso un campione di acqua di mare da riportare in laboratorio per allestire un test sullo stesso pool di embrioni parallelamente a quello condotto *in situ*.

Dopo 72 ore gli embrioni allo stadio di pluteo 4 braccia vengono recuperati in campo. Il contenuto delle camere di esposizione viene fissato direttamente in campo con formaldeide e trasportato in laboratorio per le letture. Lo stesso viene eseguito fatto in laboratorio.

I dati del test condotto in laboratorio vengono elaborati come descritto al Paragrafo 3.1.6, i risultati del saggio *in situ* essendo eseguiti ad una sola concentrazione possono essere elaborati secondo il criterio riportato nella Tabella 7.

Tab. 7 – Scala di tossicità per i saggi *in situ* con *P. lividus*

Valore di Abbott	Test T	Tossicità
$A < 0$	-	<b>Assente</b>
$0 < A \leq 8$	$p \geq 0,05$	
$0 < A \leq 8$	$p < 0,05$	<b>Bassa</b>
$A > 8$	$p > 0,05$	
$8 < A \leq 24$	$p < 0,05$	<b>Media</b>
$24 < A \leq 56$	$p < 0,05$	<b>Alta</b>
$A \geq 56$	$p < 0,05$	<b>Molto alta</b>

### 3.2.4 Analisi chimico-fisiche tramite sonda multiparametrica

Le analisi chimico-fisiche della colonna d'acqua sono state effettuate con la sonda multiparametrica Hydrolab DataSonde5 che presenta i sensori per la misurazione di:

- **Profondità:** Range di misura: da 0 a 10 m; da 0 a 25 m; da 0 a 100 m; da 0 a 200 m; Precisione:  $\pm 0,003$  m fino a 10 m;  $\pm 0,05$  fino a 25 m;  $\pm 0,5$  fino a 100 m;  $\pm 0,1$  fino a 200 m; Risoluzione: 0,001 m fino a 10 m; 0,01 fino a 25 m; 0,01 fino a 100 m; 0,1 m fino a 200 m;
- **Temperatura:** Range di misura: da  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}$ ; Precisione:  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ; Risoluzione:  $0,01^{\circ}\text{C}$ ;
- **pH:** Range di misura: da 0 a 14; Precisione:  $\pm 0,2$  unità; Risoluzione: 0,02;
- **Salinità** Range di misura: da 0 a 70 ppt; Precisione:  $\pm 0,2$  ppt; Risoluzione: 0,01 ppt;
- **Potenziale Redox (ORP):** Range di misura: da -999 a 999 mV; Precisione:  $\pm 20$  mV; Risoluzione: 1 mV;
- **Ossigeno disciolto:** Sensore a luminescenza HACH LDO; Range di misura: da 0 a 20 mg/l; Precisione:  $\pm 0,1$  mg/l (per  $\text{DO} < 8$  mg/l);  $\pm 0,2$  mg/l per  $\text{DO} > 8$  mg/l; Risoluzione: 0,01 mg/l;
- **Torbidità:** Range di misura: da 0 a 3000 NTU; Precisione: 1% fino a 100 NTU, 3% fino a 400 NTU; 5% fino a 3000 NTU; Risoluzione: 0,1 NTU fino a 400 NTU; 1 NTU fino a 3000 NTU;
- **Conducibilità:** Range di misura: da 0 a 100 mS/cm; Precisione:  $\pm 0,5\%$  del valore misurato; 0,001 mS/cm; Risoluzione: 0,001 (4 digit);
- **Clorofilla:** Range di misura: da 0,03 a 500  $\mu\text{g/l}$ ; Precisione:  $\pm 3\%$  equiv 1ppt Rhod WT standard; Risoluzione: 0,01  $\mu\text{g/l}$ .

In ogni stazione di campionamento sono state effettuate 2 misurazioni: la prima a un metro dalla superficie e la seconda a un metro dal fondo.

### 3.3 Acque di sfioro

Nell'area del pozzetto di sfioro della vasca, in prossimità della Darsena Petroli, sono stati prelevati due campioni d'acqua: uno all'interno della panna (SF-INT) e uno all'esterno (SF-EXT), raccolti miscelando acque superficiali e profonde. Questi campioni sono stati sottoposti ad analisi fisiche (contenuto di solidi sospesi) e una batteria di saggi ecotossicologici.

#### Solidi sospesi totali (TSS)

Con il termine Solidi Sospesi Totali (TSS: Total Suspended Solids) si intendono tutte quelle sostanze indisciolte, presenti nel campione di acqua da esaminare, che vengono trattenute da un filtro a membrana, di determinata porosità, quando il campione stesso viene sottoposto a filtrazione.

Il filtro da usarsi, per ottenere una separazione della totalità di solidi sospesi (colloidal compresi), deve avere pori di diametro medio pari a  $0,45 \mu\text{m}$ .

Il procedimento è stato eseguito secondo quanto indicato nel manuale “Metodi Analitici per le Acque” di APAT e IRSA-CNR, 2004 (Volume I - sezione 2090); in particolare, il filtro in nitrocellulosa viene essiccato in stufa per 1 h alla temperatura di 105°C e lasciato raffreddare per 30 minuti in essiccatore e pesato al decimo di milligrammo.

Successivamente il filtro viene collocato nell'apparecchio di filtrazione (pompa da vuoto). Viene prelevata un'opportuna aliquota del campione da analizzare, dopo preventiva omogeneizzazione del campione, ed effettuata la filtrazione sotto vuoto avendo cura di lavare il dispositivo di prelievo (cilindro graduato o altro) con il liquido filtrato. Per campioni a bassa torbidità (50 mg/L SiO<sub>2</sub> o meno) il volume prelevato deve essere almeno di un litro, mentre per valori di torbidità più elevati deve essere tale da fornire da 20 a 100 mg di solidi sospesi.

Alla fine della filtrazione del campione di acqua, il filtro viene lavato con acqua deionizzata e distillata (10 ml per volta) e, a filtrazione completata, viene mantenuto il vuoto per qualche minuto.

Ultimata la filtrazione, il filtro con il suo contenuto viene posto in stufa alla temperatura di 105°C. Dopo 1 h il filtro viene lasciato raffreddare e successivamente pesato.

L'operazione viene ripetuta fino ad ottenere un peso costante o fino a quando la perdita di peso sia inferiore a 0,5 mg.

Il valore di TSS (in mg/l) viene calcolato:

$$TSS (mg/l) = \frac{(M_1 - M_0) * 1000}{V}$$

dove:

M1 = peso (mg) del filtro e del residuo dopo l'essiccamento;

M0 = peso (mg) del filtro prima della filtrazione;

V = volume (ml) di campione di acqua sottoposto a filtrazione.

#### Saggi ecotossicologici

I campioni di acqua di sfioro prima della conduzione dei saggi biologici sono stati sottoposti a filtrazione a vuoto con filtri Millipore 0,45 µm in nitrocellulosa, per eliminare il particolato in sospensione che potrebbe alterare la risposta degli organismi.

La batteria di saggi ecotossicologici utilizzata è costituita da 3 specie-test appartenenti a gruppi tassonomici diversi: il batterio marino *Vibrio fischeri* (Microtox<sup>®</sup>), il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (test di fecondazione e embriotossicità), l'alga unicellulare *Phaeodactylum tricorutum*, rappresentanti rispettivamente i decompositori (batterio), i produttori primari (alga) e i consumatori della rete trofica (riccio di mare).

Per le metodiche dei saggi biologici si faccia riferimento a quanto riportato nei paragrafi 3.1.4, 3.1.5 e 3.1.6.

### **3.4 Biocenosi**

In laboratorio i campioni sono stati sciacquati su setaccio di maglia inferiore a 0,5 mm e quindi posti allo stereomicroscopio per l'individuazione e lo smistamento degli organismi nei principali taxa animali. Finite le operazioni di sorting gli organismi sono stati classificati, quando possibile, a livello di specie. La nomenclatura utilizzata fa riferimento alla versione aggiornata della "Check list della fauna italiana" pubblicata dalla Società Italiana di Biologia Marina:

<http://www.sibm.it/CHECKLIST/principalechecklistfauna.htm>.

Gli organismi, fissati in formalina, una volta identificati sono stati conservati in alcool etilico al 70%.

Per le procedure di laboratorio sono state seguite le metodiche ICRAM (Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero - triennio 2001-2003. ICRAM, Min. dell'Ambiente e della Tutela del Territorio.)

#### *Analisi dei dati*

Per ogni stazione di campionamento sono state compilate le liste faunistiche delle specie raccolte (vedi **Allegato 4**). Per ogni specie è stata indicata, quando possibile, l'appartenenza alle biocenosi-tipo in base alla standardizzazione di Pèrés e Picard (1964) in modo da definirne l'inquadramento bionomico ed ecologico (Picard 1965).





## 4. RISULTATI

### 4.1 Sedimenti

Come anticipato nella premessa alla presente relazione, è stato effettuato un confronto con i risultati degli anni precedenti, utilizzando, per la valutazione della qualità ambientale dei sedimenti superficiali, anche i valori di riferimento chimici riportati nel recente Allegato tecnico al DM 173/2016, sebbene i sedimenti qui indagati non siano sottoposti ad attività di dragaggio (Tab.8).

Tab.8 - Livelli chimici di riferimento nazionali riportati nell'Allegato tecnico al D.lgs 173/2016

PARAMETRO	L1	L2
Elementi in tracce	[mg kg <sup>-1</sup> ] p.s.	
Arsenico	12	20
Cadmio	0,3	0,80
Cromo	50	150
Cromo VI	2	2
Rame	40	52
Mercurio	0,3	0,80
Nichel	30	75
Piombo	30	70
Zinco	100	150

PARAMETRO	L1	L2
Contaminanti organici	[µg kg <sup>-1</sup> ] p.s.	
Composti organo stannici	5 <sup>(1)</sup>	72 <sup>(2)</sup>
Σ PCB <sup>(3)</sup>	8	60
Σ DDD <sup>(4)</sup>	0,8	7,8
Σ DDE <sup>(4)</sup>	1,8	3,7
Σ DDT <sup>(4)</sup>	1,0	4,8
Clordano	2,3	4,8
Aldrin	0,2	10 <sup>(7)</sup>
Dieldrin	0,7	4,3
Endrin	2,7	10
α - HCH	0,2	10 <sup>(7)</sup>
β - HCH	0,2	10 <sup>(7)</sup>
γ - HCH (lindano)	0,2	1,0
Eptacloro epossido	0,6	2,7
HCB	0,4	50 <sup>(7)</sup>
Idrocarburi C>12	Non disponibile	50000
ΣIPA(16) <sup>(5)</sup>	900	4000
Antracene	24	245
Benzo[a]antracene	75	500
Benzo[a]pirene	30	100
Benzo[b]fluorantene	40	500 <sup>(7)</sup>
Benzo[k]fluorantene	20	500 <sup>(7)</sup>
Benzo[g,h,i]perilene	55	100 <sup>(7)</sup>
Crisene	108	846
Indenopirene	70	100 <sup>(7)</sup>
Fenantrene	87	544
Fluorene	21	144
Fluorantene	110	1494
Naftalene	35	391

<b>Pirene</b>	153	1398
<b>Σ T.E. PCDD, PCDF<sup>(6)</sup> (Diossine e furani) e PCB diossina simili</b>	2 x 10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-2*</sup>

(1) riferito al solo TBT;

(2) riferito alla sommatoria di MBT, DBT, TBT;

(3) come sommatoria dei seguenti congeneri: 28, 52, 77, 81, 101, 118, 126, 138, 153, 156, 169, 180;

(4) come sommatoria degli isomeri 2,4 e 4,4;

(5) come sommatoria dei 16 IPA di maggior rilevanza ambientale indicati dall'USEPA (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);

(6) L'elenco dei congeneri e relativi Fattori di Tossicità Equivalente (EPA, 1989) e l'elenco congeneri PCB Diossina simili (WHO, 2005) e quello riportato alle note della tabella 3/A di cui al D.lgs 172/2015 ;

(7) Concentrazione valida solo per attività di ripascimento emerso;

#### 4.1.1 Caratteristiche granulometriche

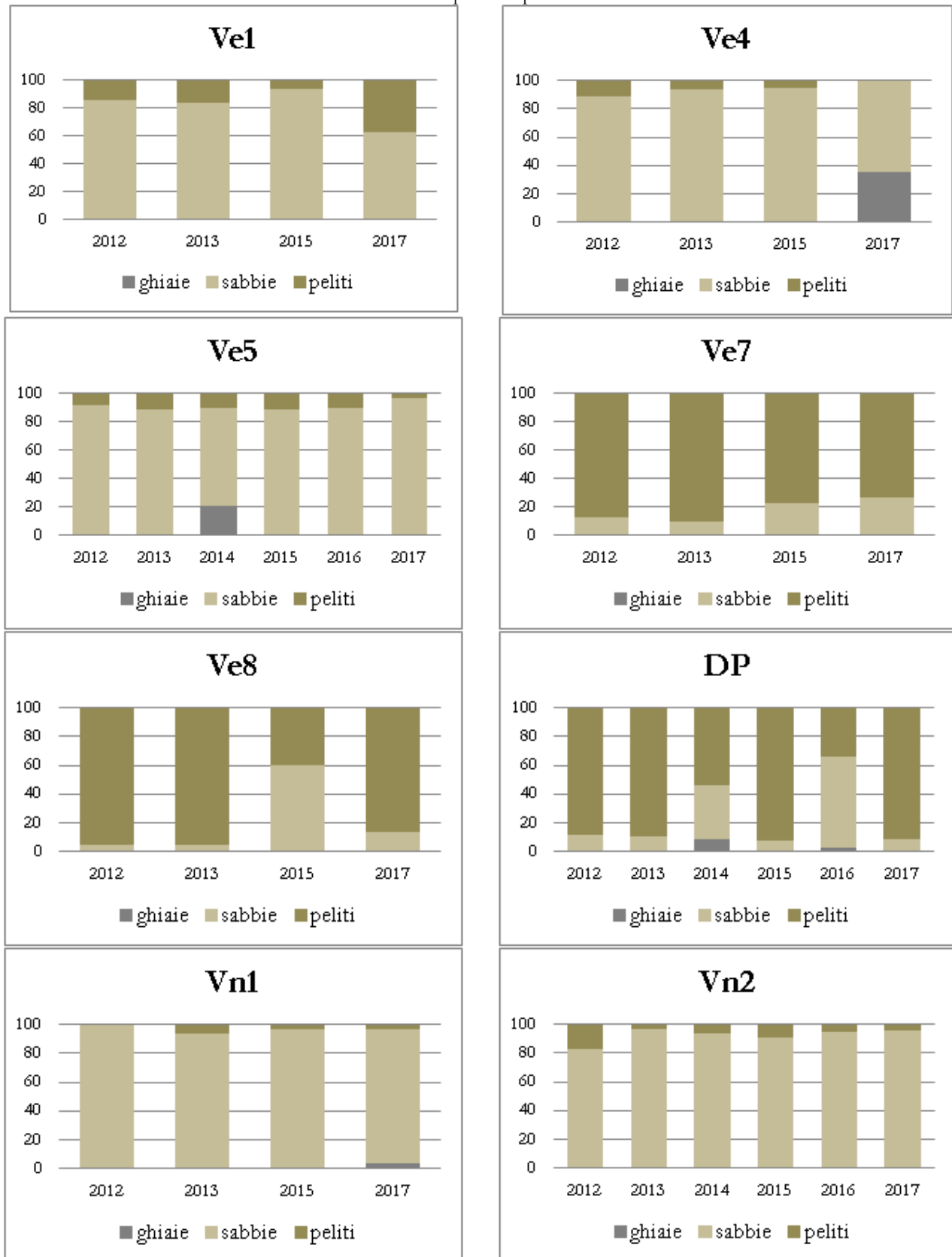
Nella Tabella 9 sono riportati i risultati delle analisi granulometriche dei sedimenti campionati nella campagna di maggio 2017. Le schede granulometriche delle singole stazioni sono riportate nell'**Allegato 1 - Schede granulometriche**.

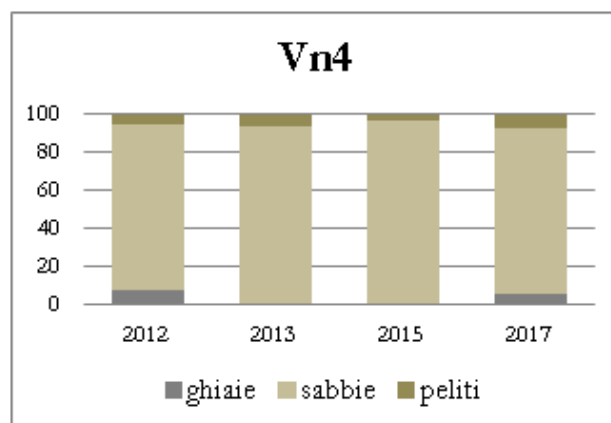
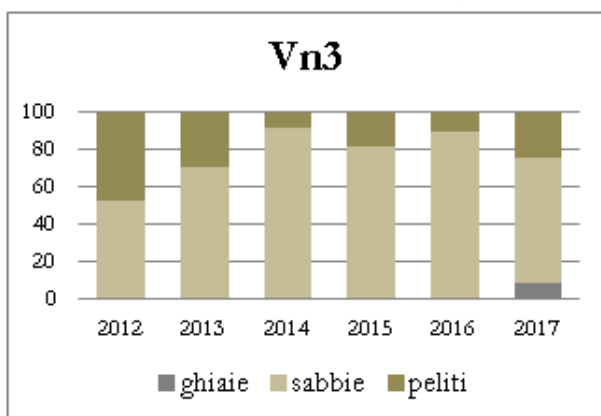
Tab. 9 - Granulometria dei sedimenti campionati nella fase *di gestione* (maggio 2017) espressa in percentuale

Campione	GHIAIE	SABBIE						PELITI
	2000µm	1000µm	500µm	250µm	125µm	63µm	TOT	< 63µm
<b>Ve1</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,76	3,28	14,90	43,43	<b>62,37</b>	<b>37,63</b>
<b>Ve4</b>	<b>35,83</b>	32,88	19,95	7,03	3,40	0,68	<b>63,94</b>	<b>0,23</b>
<b>Ve5</b>	<b>0,00</b>	0,42	0,84	1,47	60,71	32,98	<b>96,42</b>	<b>3,58</b>
<b>Ve7</b>	<b>0,00</b>	1,63	1,36	2,17	13,32	8,15	<b>26,63</b>	<b>73,37</b>
<b>Ve8</b>	<b>0,00</b>	1,36	1,36	1,36	4,41	5,08	<b>13,57</b>	<b>86,43</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,32	0,97	2,26	5,48	<b>9,03</b>	<b>90,97</b>
<b>Vn1</b>	<b>4,15</b>	5,02	5,68	3,06	37,55	41,48	<b>92,79</b>	<b>3,06</b>
<b>Vn2</b>	<b>0,00</b>	0,22	0,43	0,43	19,87	74,73	<b>95,68</b>	<b>4,32</b>
<b>Vn3</b>	<b>8,48</b>	7,14	12,95	13,62	26,79	7,14	<b>67,64</b>	<b>23,88</b>
<b>Vn4</b>	<b>5,70</b>	2,11	2,95	3,80	13,92	64,14	<b>86,92</b>	<b>7,38</b>

In Figura 3 vengono riportate le variazioni delle composizioni granulometriche, espresse in percentuale, dei sedimenti prelevati nelle 10 stazioni di campionamento indagate annualmente a partire dal 2012.

Fig. 3 – Variazione temporale (2012-2017) della composizione granulometrica nelle stazioni di monitoraggio.  
I dati sono espressi in percentuale





Per quanto riguarda la composizione granulometrica dei sedimenti prelevati, considerata anche la campagna del maggio 2017, si evidenzia una ampia variabilità di composizione tra le differenti stazioni campionate, andando da sedimenti prevalentemente sabbiosi (Ve1, Ve4, Ve5, Vn1, Vn2, Vn3, Vn4, la gran parte) a sedimenti prevalentemente pelitici (Ve7, Ve8 e DP, stazioni posizionate nelle aree più interne del porto). Riguardo l'andamento nel tempo sulla singola stazione, accertata una composizione granulometrica pressochè identica nei primi due anni di monitoraggio (2012 e 2013), nell'anno 2014 si rileva qualche variazione granulometrica in molte stazioni, in maniera più evidente nelle stazioni Ve5, Ve8 e DP.

La distribuzione percentuale della componenti sabbiose (medie e fini) e pelitiche nelle differenti stazioni risulta bilanciata e costante nel periodo indagato 2012-2017. Più particolare è la distribuzione della frazione sabbiosa grossolana/ghiaiosa che non compare in nessuna stazione nella campagna del 2015, si manifesta nuovamente nel campionamento del 2016 nella sola stazione DP, mentre ritorna ad essere presente nel 2017 nella stazione Vn4 (alla pari del 2012) e compare per la prima volta nelle stazioni Vn1 (4,15%), Vn3 (8,48%) e Ve4 (35,83%).

Nei sei anni indagati, l'andamento più variabile della composizione granulometrica si registra nella stazione di campionamento Vn3 in cui si evidenzia tendenzialmente un aumento della frazione sabbiosa perfino a carattere ghiaioso nel 2017, a discapito delle frazioni pelitiche rilevate nei primi anni di indagine; questa variazione potrebbe essere dovuta alla costruzione della seconda vasca di colmata, il cui argine ha in qualche modo alterato la distribuzione dei sedimenti di natura prevalentemente pelitica trasportati dal Canale dello Scolmatore.

In estrema sintesi, nel periodo di monitoraggio esaminato ed appena concluso, possiamo confermare che in tutto l'arco temporale osservato (2012-2017) ed in tutte le stazioni di monitoraggio indagate, non si evidenziano variazioni sostanziali nella composizione granulometrica dei sedimenti.

#### 4.1.2 Metalli e Sostanza Organica

Nella Tabella 10 sono riportati i risultati dell'analisi dei metalli e della sostanza organica nei sedimenti prelevati nell'area d'indagine nella campagna di maggio 2017.

Tab. 10 - Risultati delle analisi dei metalli (mg/kg s.s.) e della sostanza organica (%) nei sedimenti prelevati nella fase di *gestione* (maggio 2017)

Stazioni	S.O.	Al	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
<b>Ve1</b>	3,32	12364	11,28	0,11	<b>53,95*</b>	15,80	0,042	<b>43,16</b>	12,52	64,7
<b>Ve4</b>	Analisi non effettuate a causa dell'alto contenuto di ghiaia presente nel campione									
<b>Ve5</b>	0,82	8681	9,21	0,09	38,88	7,63	<b>0,514</b>	<b>32,80</b>	8,36	53,7
<b>Ve7</b>	2,93	20646	8,11	0,20	<b>66,83</b>	39,91	0,086	<b>54,95</b>	19,42	<b>107,9</b>
<b>Ve8</b>	4,17	24719	9,84	0,20	<b>75,23</b>	<b>46,74</b>	0,102	<b>61,68</b>	21,00	<b>107,6</b>
<b>DP</b>	4,26	24602	11,45	0,22	<b>75,13</b>	<b>48,45</b>	0,110	<b>63,63</b>	21,62	<b>115,4</b>
<b>Vn1</b>	0,63	6326	9,93	0,14	32,46	4,98	0,014	<b>27,65</b>	6,47	36,4
<b>Vn2</b>	0,80	8030	9,74	0,13	35,90	6,48	0,011	<b>34,39</b>	7,17	51,7
<b>Vn3</b>	1,93	10800	7,49	0,11	42,29	19,07	0,044	<b>32,57</b>	10,50	53,5
<b>Vn4</b>	0,63	6916	6,01	0,03	32,92	4,92	0,014	25,89	5,67	36,9

\* *Testo in grassetto: L1<Valori<L2 (vedi Tab.8)*

L'accuratezza della metodica rispetto a materiali certificati (sedimento portuale; LGC 6137 Promochem) viene riportata di seguito.

% recupero LGC	Al	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
<b>2017</b>	100,00	118,88	100,00	87,87	103,15	86,58	97,37	89,42	93,20

I risultati dei campioni analizzati nel 2017 cadono tutti all'interno del range di quantificazione (LOQ) e la metodica risulta avere un'accuratezza conforme ai requisiti analitici stabiliti con intervalli di recupero compresi entro l'80%.

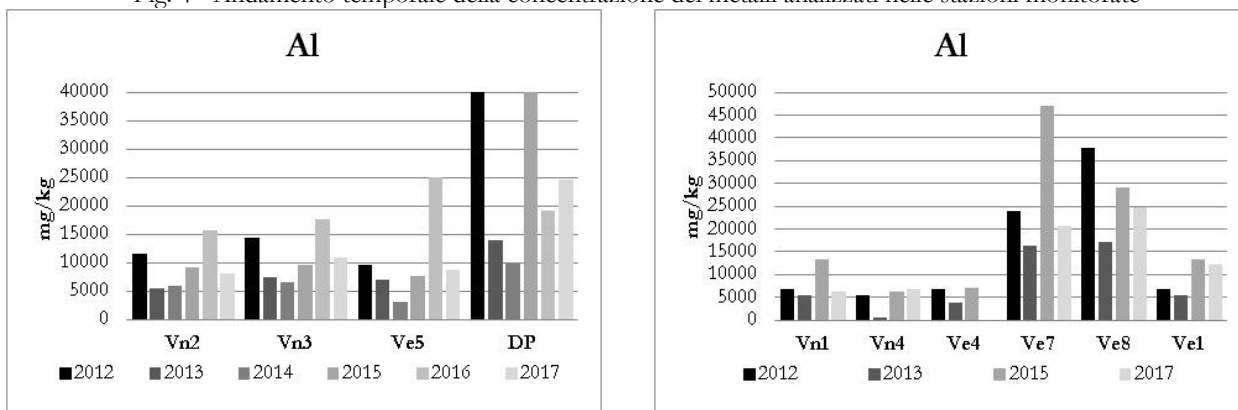
Nella Figura 4 si confrontano le concentrazioni misurate nei 5 anni di monitoraggio per i metalli analizzati in ciascuna delle stazioni di monitoraggio. Per ciascun metallo sono stati elaborati 2 grafici: nel primo vengono presentati i risultati ottenuti nelle stazioni monitorate annualmente, nel secondo quelli ottenuti nelle stazioni monitorate ogni 2 anni. La valutazione della concentrazione dei metalli è stata fatta confrontando i risultati con i Livelli Chimici di Riferimento (L1, L2) riportati nell'Allegato Tecnico al D.M. 173/2016.

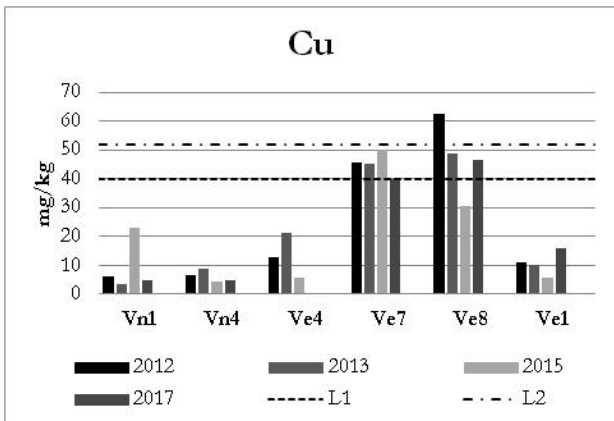
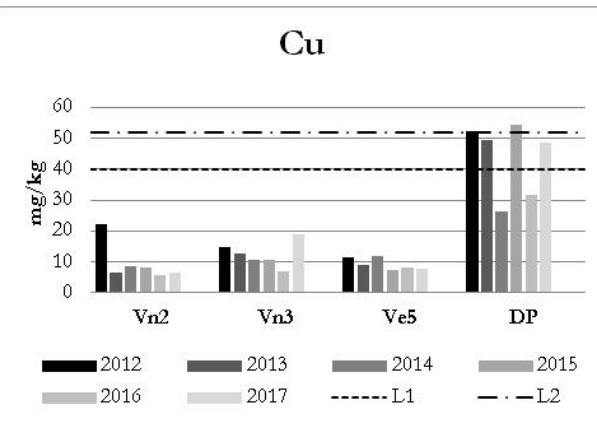
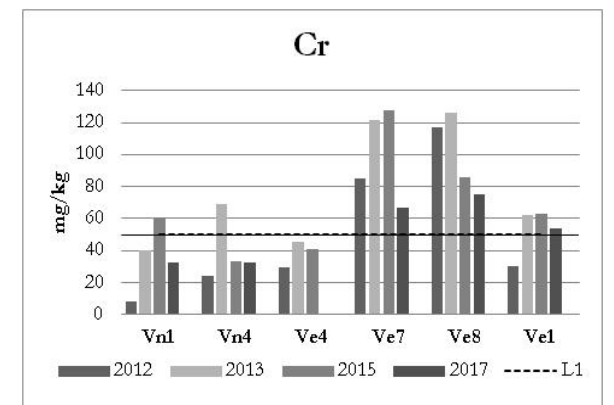
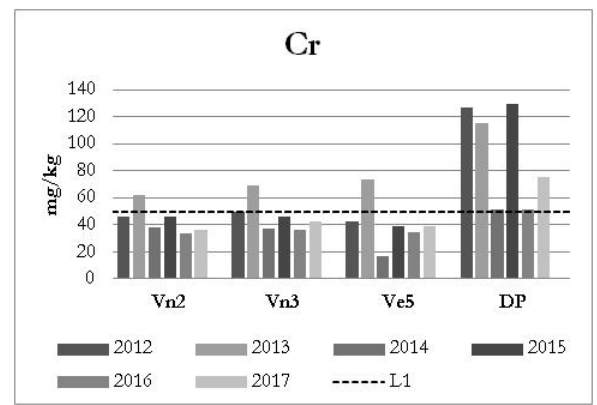
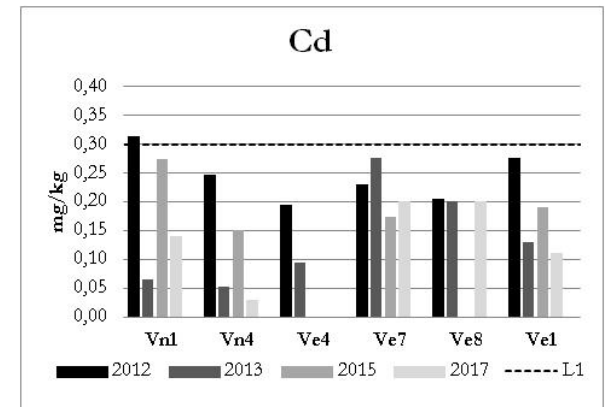
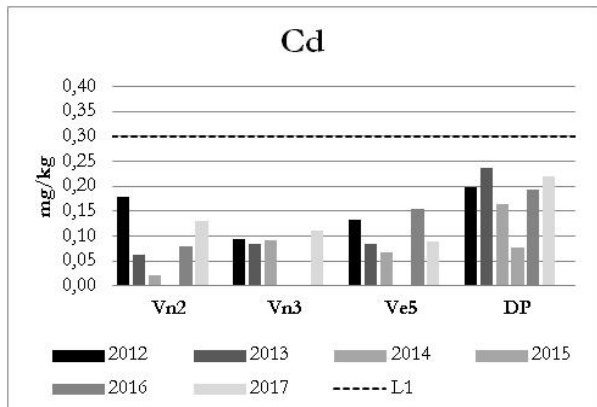
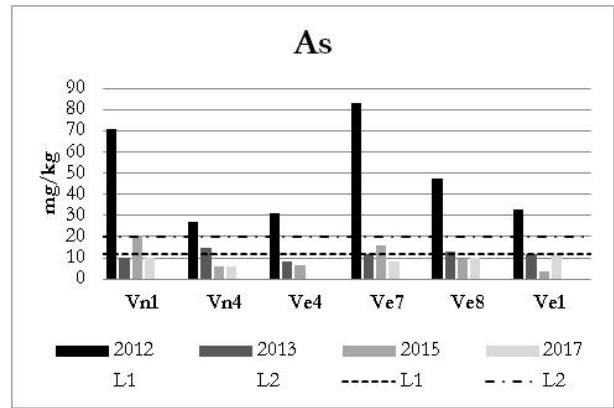
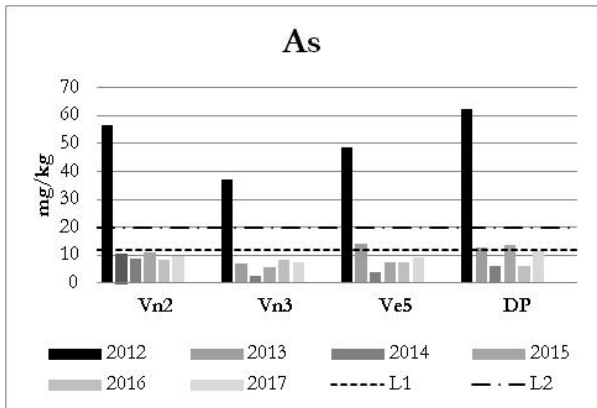
Dal confronto delle concentrazioni dei metalli ottenute nel 2017 con i risultati ottenuti negli anni precedenti, emerge che:

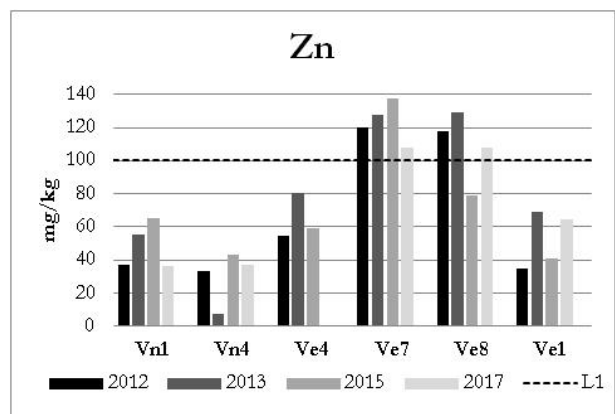
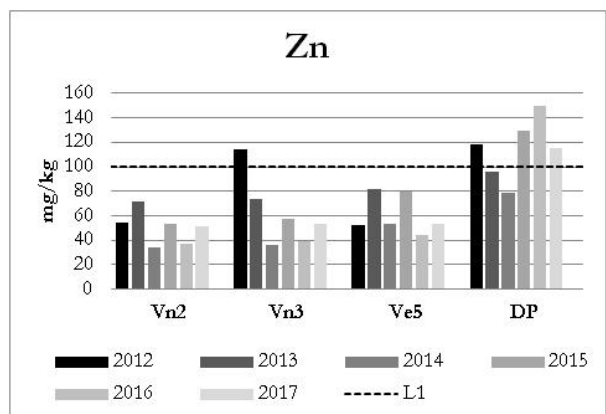
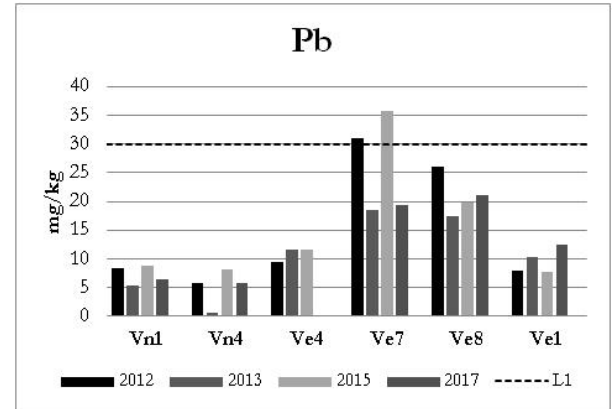
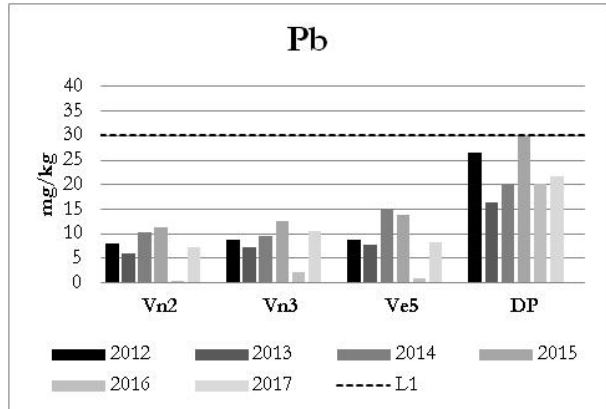
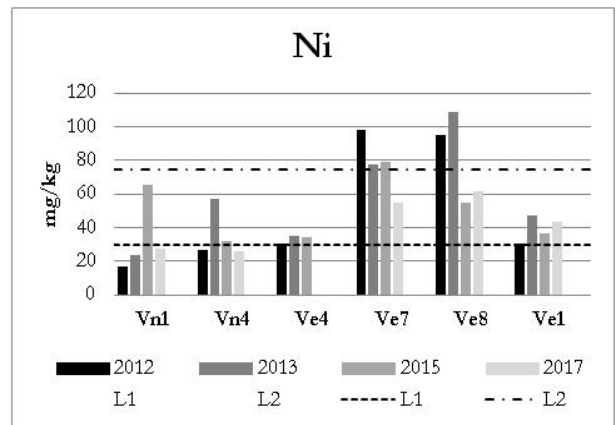
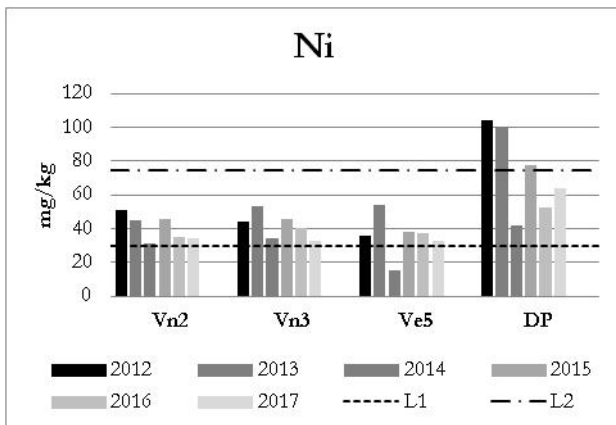
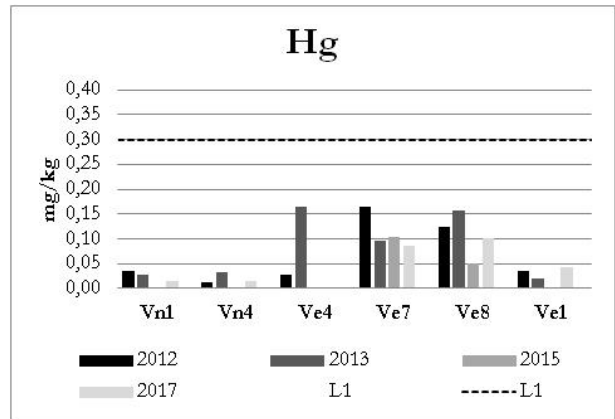
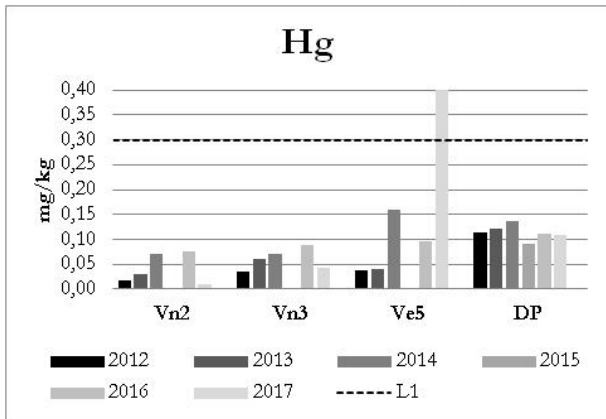
- *Alluminio*: i valori sono confrontabili con quelli registrati negli anni precedenti di monitoraggio;
- *Arsenico*: i valori sono in linea con la media storica (ad eccezione della prima campagna di monitoraggio in cui si sono registrati valori mai più raggiunti in tutte quelle successive) e in tutte le stazioni non si registrano superamenti del limite L1;

- *Cadmio*: i valori sono inferiori ai livelli massimi registrati in precedenza ed alla media storica ad eccezione delle stazioni Vn2, Vn3 e DP, nelle quali la concentrazione del cadmio resta comunque ben al di sotto del limite L1;
- *Cromo*: il limite L1 è stato superato nelle stazioni DP, Ve7, Ve8, Ve1 come accaduto in molte delle precedenti campagne di monitoraggio, anche se nel 2017 le concentrazioni di Cr sono risultate più basse rispetto a quelle registrate negli anni precedenti (con l'eccezione della stazione DP); nessuna stazione presenta concentrazioni superiori al limite L2;
- *Rame*: il limite L1 è stato superato nelle stazioni DP e Ve8, stazioni nelle quali nel corso degli anni (2012 e 2015) si era registrato in alcuni casi anche un superamento del livello L2 non presente invece in questa ultima campagna;
- *Mercurio*: i valori sono in linea con quelli registrati in precedenza ad eccezione della stazione Ve5 che risulta avere la più alta concentrazione individuata dal 2012, superiore anche al valore di L1.
- *Nichel*: i valori sono inferiori ai livelli massimi i registrati in precedenza ed alla media storica. Il limite L1 è stato superato nelle stazioni Vn2, Vn3, Ve5, DP, Ve7, Ve8, Ve1, come già accaduto in molte della campagne precedenti, senza mai però superare il valore L2; questo limite è stato superato nelle campagne del 2012, 2013 e 2015 solo nelle stazioni Ve7, Ve8 e DP;
- *Piombo*: i valori sono inferiori ai livelli massimi i registrati in precedenza-e in linea con quelli delle precedenti campagne di monitoraggio senza mai essere superiori al valore L1;
- *Zinco*: i valori sono inferiori ai livelli massimi registrati in precedenza, anche se il limite L1 è stato superato nelle stazioni DP, Ve7 e Ve8, come avvenuto in molte delle precedenti campagne di monitoraggio (2012, 2013, 2015 e 2016). Nessuna stazione presenta concentrazioni superiori al limite L2.

Fig. 4 - Andamento temporale della concentrazione dei metalli analizzati nelle stazioni monitorate









### 4.1.3 IPA

Nella Tabella 11 sono riportate le concentrazioni di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) misurate nei sedimenti campionati a maggio 2017.

Tab. 11 - Concentrazione (ng/g peso secco) di idrocarburi policiclici aromatici a basso peso molecolare, alto peso molecolare, IPA totali e rapporto tra congeneri a basso e alto PM nei sedimenti campionati nelle diverse aree portuali di Livorno nel 2017 – fase di gestione

	Ve1	Ve4	Ve5	Ve7	Ve8	DP	Vn1	Vn2	Vn3	Vn4
<b>Naftalene*</b>	< 1	< 1	9,81	44,17	< 1	6,59	31,23	< 1	< 1	< 1
<b>Acenaftilene*</b>	6,06	< 1	< 1	< 1	11,91	< 1	44,56	< 1	< 1	< 1
<b>1-Metilnaftalene</b>	< 1	< 1	< 1	28,49	19,45	< 1	34,45	< 1	7,44	1,69
<b>2-Metilnaftalene</b>	< 1	< 1	2,63	< 1	36,57	< 1	22,78	1,68	11,21	1,38
<b>Acenaftene*</b>	0,358	8,41	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>Fluorene*</b>	< 0.1	< 0.1	0,439	4,01	5,04	< 0.1	0,871	0,272	1,49	0,268
<b>Fenantrene*</b>	< 0.1	< 0.1	1,40	3,90	3,32	< 0.1	1,35	0,69	1,01	1,10
<b>Antracene*</b>	2,87	6,55	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0,219	1,54	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>Fluorantene*</b>	14,58	4,15	0,534	15,82	11,48	< 0.1	9,998	0,505	2,27	0,368
<b>Pirene*</b>	4,85	60,66	0,144	0,643	6,54	0,963	< 0.5	0,206	0,143	0,137
<b>Benzo(a)antracene*</b>	< 0.1	< 0.1	0,108	0,902	1,43	0,291	< 0.5	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>Crisene*</b>	1,78	3,46	< 0.1	1,30	2,67	0,428	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>7,12-Dimetilbenzo(a)antracene</b>	< 0.1	157,99	0,63	0,974	13,37	1,05	< 0.5	0,326	4,25	0,747
<b>Benzo(b)fluorantene*</b>	< 0.01	15,71	0,304	1,48	0,516	0,561	0,345	0,061	0,134	0,108
<b>Benzo(k)fluorantene*</b>	0,594	13,05	0,198	0,726	1,00	0,254	0,653	< 0.01	0,291	0,056
<b>Benzo(a)pirene*</b>	0,304	7,88	0,113	0,354	0,541	0,166	0,443	0,055	0,167	0,053
<b>Dibenzo(ah)antracene*</b>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0,287	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<b>Benzo(ghi)perilene*</b>	0,079	0,508	0,059	0,132	0,222	0,076	0,234	0,026	< 0.01	0,029
<b>Indeno(123cd)pirene*</b>	0,015	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0,026	0,12	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<b>IPA basso PM</b>	9,29	15,0	14,3	80,6	76,3	6,87	136,78	2,64	21,2	4,45
<b>IPA alto PM</b>	22,2	263,4	2,12	22,3	37,8	3,82	12,08	1,25	7,33	1,56
<b>IPA totali</b>	<b>31,5</b>	<b>278,4</b>	<b>16,4</b>	<b>102,9</b>	<b>114,1</b>	<b>10,7</b>	<b>149,9</b>	<b>3,89</b>	<b>28,5</b>	<b>6,00</b>

\* I 16 IPA usati nella sommatoria della Tab. 2.5 dell'allegato tecnico al D.M. 173/2016 (Tab.8 della presente relazione)

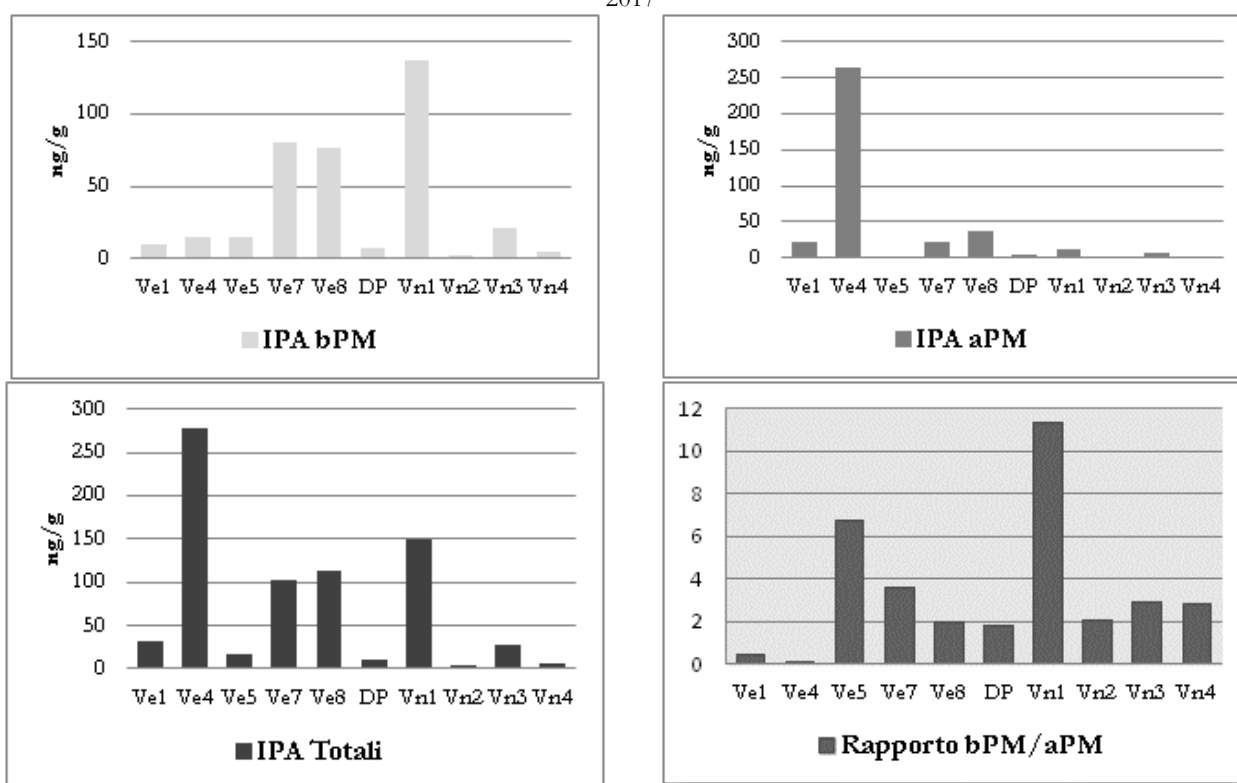
I valori osservati risultano in generale bassi, anche rispetto a livelli tipici per sedimenti di ambienti portuali, sia per quanto riguarda gli idrocarburi a basso peso molecolare (che rappresentano la frazione più abbondante) sia per gli idrocarburi ad alto peso molecolare, con l'unica eccezione del campione Ve4 (Tab. 11 e Fig. 5).

Per quanto riguarda gli *IPA a basso peso molecolare*, i valori più alti sono stati riscontrati nei siti Ve7, Ve8 e Vn1; questa situazione è ascrivibile a livelli mediamente più alti rispetto agli altri siti di alcuni congeneri quali Naftalene e 1-Metilnaftalene per i sedimenti della stazione Ve7 (rispettivamente 44,17 e 28,49 ng/g), Acenaftilene, 1-Metilnaftalene e 2-Metilnaftalene per i campioni prelevati nel sito VE8 (rispettivamente 11,91, 19,45 e 36,57 ng/g) e Naftalene, Acenaftilene, 1-Metilnaftalene e 2-Metilnaftalene nei sedimenti del sito VN1 (rispettivamente 31,23; 44,56; 34,45 e 22,78 ng/g).

I livelli più alti di *IPA ad alto peso molecolare* sono stati invece misurati nei sedimenti campionati nel sito Ve4, dove i congeneri 7,12-Dimetilbenzo(a)antracene, Pirene, Benzo(b)fluorantene e Benzo(k)fluorantene rappresentano quasi il 94% degli IPA ad alto peso molecolare, con valori rispettivamente di 157,99; 60,67; 15,71 e 13,05 ng/g. Inoltre, livelli lievemente più alti di Fluorantene sono stati misurati nei sedimenti campionati nei siti Ve7, Ve8 e Ve1.

I siti Ve7 e Ve8 rappresentano quelli localizzati nella parte più interna del porto e quindi potenzialmente più interessata alla presenza di una contaminazione che proviene dalle attività industriali e commerciali che insistono nel porto; lo scarso idrodinamismo caratteristico di quest'area limita l'effetto diluizione degli inquinanti che quindi in questi siti possono essere rilevati in concentrazioni maggiori rispetto alle aree più esterne del porto. I siti Vn1 e Ve4, anch'essi interessati dalla presenza di concentrazioni più alte di IPA rispettivamente a basso e ad alto peso molecolare, sono invece localizzati nell'area esterna al porto ma immediatamente prospiciente le dighe foranee del porto; condizioni specifiche di idrodinamismo locale possono aver determinato un accumulo di IPA in questi sedimenti, anche se, come già sottolineato, i livelli riscontrati si riferiscono sempre a una condizione tipica di ambiente portuale.

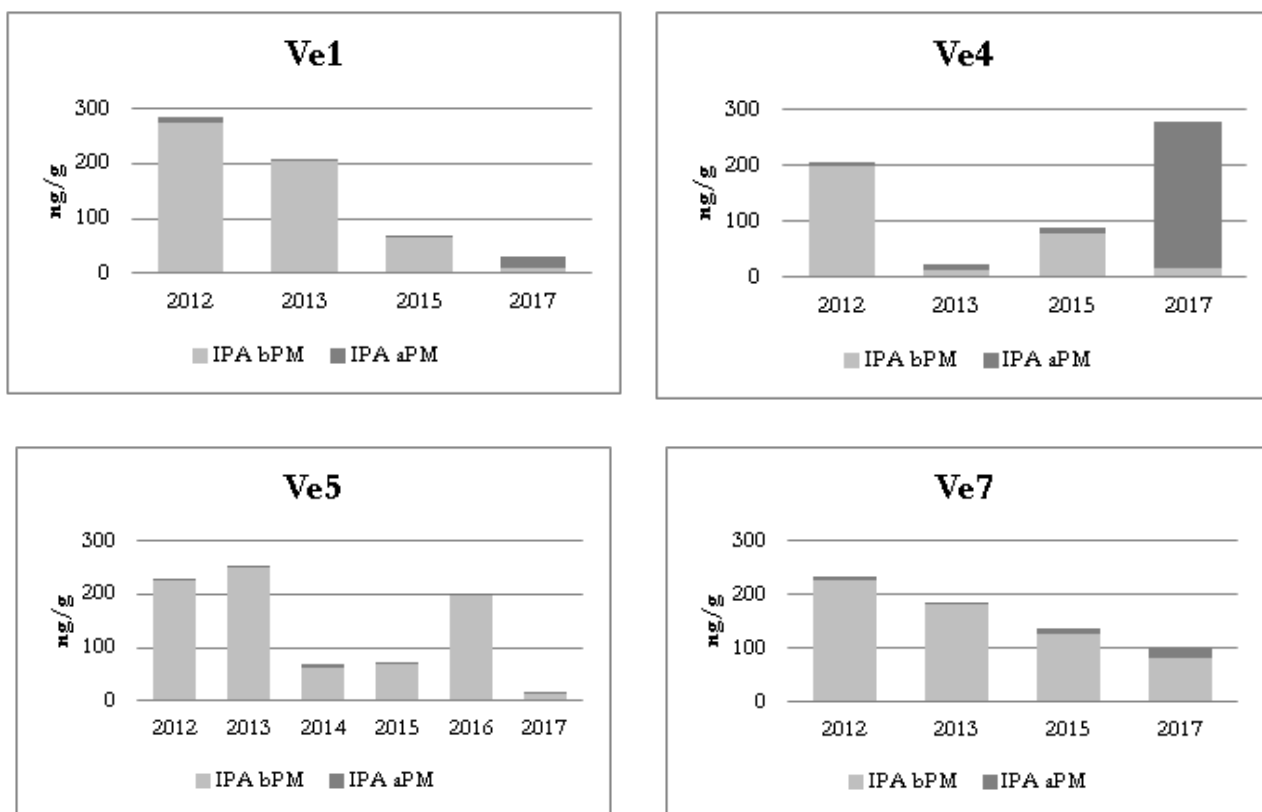
Fig. 5 - Concentrazione (ng/g peso secco) di idrocarburi policiclici aromatici a basso peso molecolare, alto peso molecolare, IPA totali e rapporto tra congeneri a basso e alto PM nei sedimenti campionati nelle diverse aree portuali di Livorno nel 2017

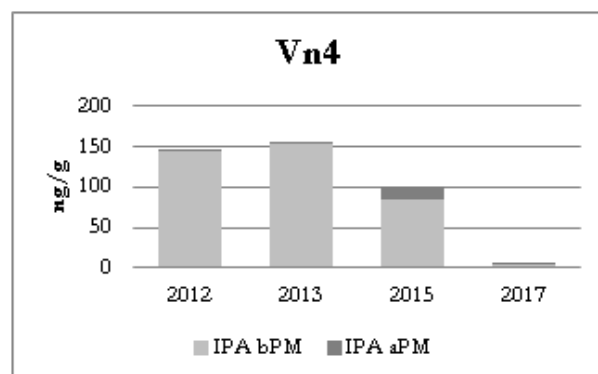
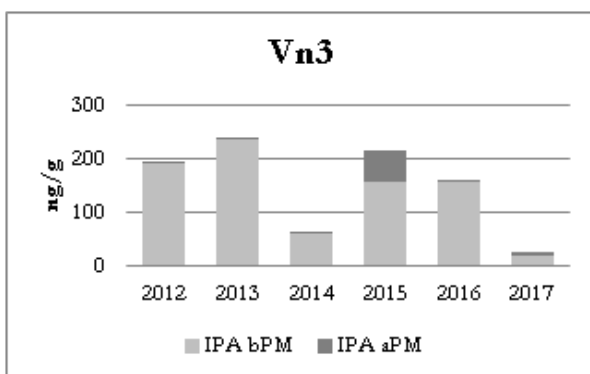
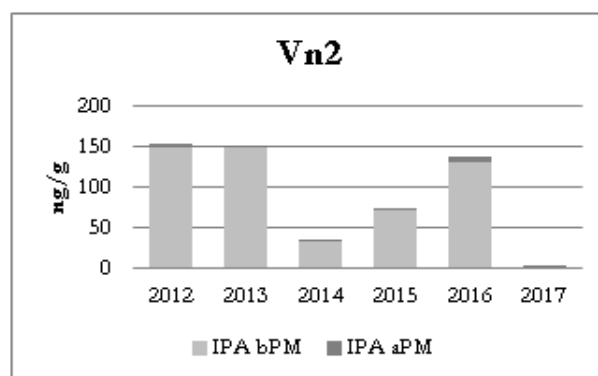
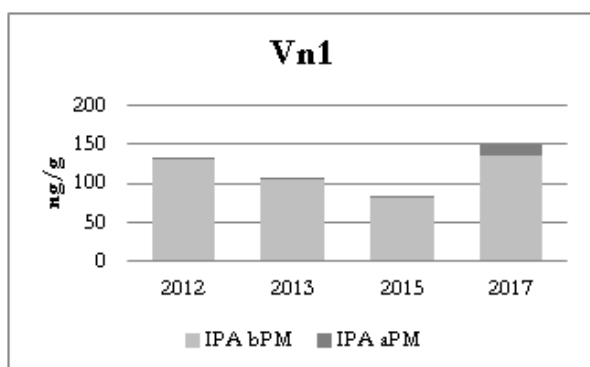
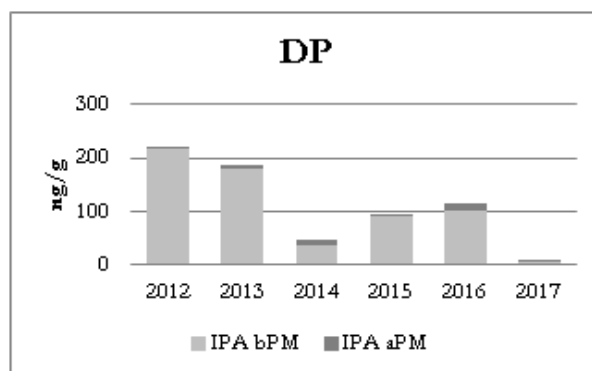
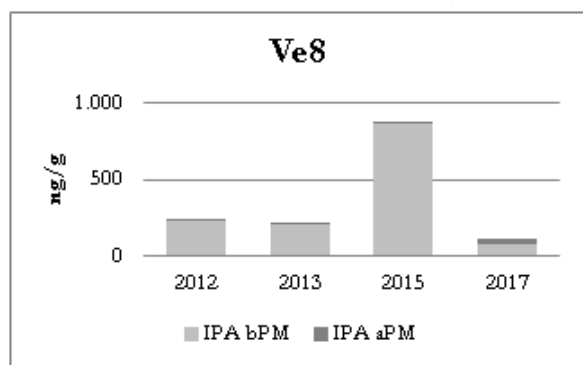


Nella Figura 6 si confrontano le concentrazioni degli IPA a basso e alto peso molecolare misurate nei 5 anni di monitoraggio nelle stazioni indagate. Le concentrazioni ritrovate nel 2017 sono in generale più basse di quelle misurate nelle campagne precedenti, ad eccezione delle stazioni Ve4 e Vn1 in cui si ritrovano le concentrazioni più alte dall'inizio del monitoraggio.

In generale gli IPA a basso peso molecolare rappresentano l'80% degli IPA totali (Fig. 6), fatta eccezione per i siti Ve4 e Ve1, dove il contributo dei congeneri ad alto peso molecolare è maggiore dei congeneri a basso peso molecolare; è importante notare comunque che nei sedimenti del sito Ve1 il rapporto tra i congeneri è dovuto a dei valori estremamente bassi di IPA a basso peso molecolare. Si sottolinea inoltre che, sebbene non si tratti di sedimenti sottoposti a dragaggio, in nessuna delle stazioni campionate si evidenziano superamenti dei limiti L1 e L2 riportati nell'allegato tecnico al D.lgs 173/2017 (Tab.8).

Fig. 6 - Andamento temporale della concentrazione degli IPA nelle stazioni di monitoraggio





#### 4.1.4 Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

Nella Tabella 12 sono riportati i risultati del saggio con il batterio marino *Vibrio fischeri* condotto sull'elutriato ottenuto dal sedimento campionato a maggio 2017.

Tab. 12 - Risultati del saggio biologico con *V. fischeri* applicato all'elutriato – fase di gestione (maggio 2017)

Campione	Incubaz.	EC20 (%)	R2	Fattore di correzione	Massimo Effetto (%)	Media ± d.s. (%)	Tossicità
Ve1	5'	>90	-	-	20,81	±	Presente
	15'	>90	-	-	22,85		
	30'	EC20 = 73,04 (33,19 – 160,7)	83,09	1,112			
Ve4	5'	>90	-	-	18,79	18,32 ± 0,55	Assente/Trascurabile
	15'	>90	-	-	17,71		



	30'	>90	-	-	18,47		
Ve5	5'	>90	-	-	18,02	18,61 ± 0,55	Assente/Trascurabile
	15'	>90	-	-	18,70		
	30'	>90	-	-	19,10		
	5'	>90	-	-	16,49		
Ve7	15'	>90	-	-	19,05	18,71 ± 2,07	Assente/Trascurabile
	30'	>90	-	-	20,58		
	5'	>90	-	-	13,39		
Ve8	15'	>90	-	-	13,62	14,47 ± 1,68	Assente/Trascurabile
	30'	>90	-	-	16,41		
	5'	>90	-	-	20,49		
DP	15'	>90	-	-	18,00	18,96 ± 1,34	Assente/Trascurabile
	30'	>90	-	-	18,39		
	5'	EC20 = 80,99 (57,85 – 113,4)	99,65	1,297			
Vn1	15'	EC20 = 81,37 (52,97 – 125,0)	99,44	1,447		24,06 ± 0	Assente/Trascurabile
	30'	>90	-	-	24,06		
	5'	>90	-	-	16,30		
Vn2	15'	>90	-	-	19,70	±	Presente
	30'	EC20 = 87,07 (61,48 – 123,3)	97,60	1,166			
	5'	>90	-	-	10,65		
Vn3	15'	>90	-	-	9,140	9,92 ± 0,76	Assente/Trascurabile
	30'	>90	-	-	9,980		
	5'	>90	-	-	18,81		
Vn4	15'	EC20 = 87,94 (39,39 – 196,3)	88,26	1,122		19,29 ± 0,68	Assente/Trascurabile
	30'	>90	-	-	19,77		

I test effettuati sull'elutriato hanno messo in evidenza un effetto della tossicità nullo o trascurabile.

Confrontando i risultati ottenuti nelle campagne precedenti (Tab. 13), si evidenzia un generale miglioramento delle condizioni.

Tab. 13 – Confronto dei risultati del saggio con *V. fischeri* condotto su elutriato

Stazioni	Monitoraggio <i>ante operam</i> 2012	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2013	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2014	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2015	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2016	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2017
Ve1	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	*	Assente/ Trascurabile	*	Presente
Ve4	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	*	Assente/ Trascurabile	*	Assente/ Trascurabile
Ve5	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile
Ve7	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	*	Elevata	*	Assente/ Trascurabile
Ve8	Presente	Assente/ Trascurabile	*	Assente/ Trascurabile	*	Assente/ Trascurabile
DP	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Elevata	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile
Vn1	Elevata	Assente/ Trascurabile	*	Elevata	*	Assente/ Trascurabile
Vn2	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Presente
Vn3	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile

	Trascurabile	Trascurabile	Trascurabile	Trascurabile	Trascurabile	Trascurabile
Vn4	Assente/ Trascurabile	Assente/ Trascurabile	*	Assente/ Trascurabile	*	Assente/ Trascurabile

\*stazione non monitorata come previsto dal Piano di Monitoraggio

Nella Tabella 14 sono riportati i risultati del saggio su fase solida con il batterio marino *Vibrio fischeri* condotto sul sedimento campionato a maggio 2017.

Tab. 14 - Risultati del saggio biologico con *V. fischeri* applicato alla fase solida – fase di gestione

Campione	Sabbia < 1mm (%)	Pelite (%)	Soglia Tox Naturale (TU)	Tox Misurata (TU)	Range al 95% di confidenza (TU)			R <sup>2</sup> (%)	S.T.I.	Tossicità
Ve1	62,37	37,63	143	45,621	44,228	-	47,048	99,99	0,32	Assente/Trascurabile
Ve4	99,26	0,74	28	0,471	0,075	-	2,946	93,98	0,02	Assente/Trascurabile
Ve5	96,41	3,59	37	6,251	1,943	-	20,080	82,84	0,17	Assente/Trascurabile
Ve7	25,41	74,59	259	385,360	350,588	-	423,519	99,77	1,49	Assente/Trascurabile
Ve8	12,38	87,62	300	406,358	340,445	-	485,114	99,36	1,36	Assente/Trascurabile
DP	9,03	90,97	310	384,298	324,968	-	454,565	99,23	1,24	Assente/Trascurabile
Vn1	96,63	3,37	36	6,908	6,449	-	7,398	99,94	0,19	Assente/Trascurabile
Vn2	95,67	4,33	39	3,809	1,009	-	14,377	89,64	0,10	Assente/Trascurabile
Vn3	71,70	28,30	114	233,170	226,036	-	240,554	99,99	2,05	Assente/Trascurabile
Vn4	91,99	8,01	50	5,062	2,868	-	8,937	97,2	0,10	Assente/Trascurabile

I test effettuati sull'elutriato hanno messo in evidenza un effetto della tossicità nullo o trascurabile.

Confrontando i risultati ottenuti nelle campagne precedenti (Tab.15; nell'anno 2016 non è stato effettuato il saggio), si evidenzia come il saggio su fase solida con *V. fischeri* non abbia rilevato nel corso degli anni situazioni di particolare criticità, fatta eccezione nella campagna *ante operam* e in quella del 2015 in cui alcune stazioni (Ve8 e Vn1 nel 2012 e Ve8, DP, Vn1 nel 2015), ma non quelle dell'area prospiciente le vasche di colmata, presentavano tossicità.

Tab. 15 – Confronto dei risultati del saggio su fase solida con *V. fischeri*

Stazioni	Monitoraggio <i>ante operam</i> 2012	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> 2013	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> 2014	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> 2015	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> 2017
Ve1	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	*	Assente/Trascurabile	Assente/Trascurabile
Ve4	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	*	Assente/Trascurabile	Assente/Trascurabile
Ve5	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	Assente/Trascurabile	Assente/Trascurabile
Ve7	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	*	Elevata	Assente/Trascurabile
Ve8	Presente	Assente/trascurabile	*	Assente/Trascurabile	Assente/Trascurabile
DP	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	Elevata	Assente/Trascurabile
Vn1	Elevata	Assente/trascurabile	*	Elevata	Assente/Trascurabile
Vn2	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	Assente/Trascurabile	Assente/Trascurabile
Vn3	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	Assente/Trascurabile	Assente/Trascurabile
Vn4	Assente/trascurabile	Assente/trascurabile	*	Assente/Trascurabile	Assente/Trascurabile

#### 4.1.5 Saggio biologico con *Paracentrotus lividus*

Nella Tabella 16 sono riportati i risultati del saggio di embriotossicità su elutriato con il riccio di mare della campagna di monitoraggio di maggio 2017.

Tab. 16 - Risultati del saggio di embriotossicità con *P. lividus* – fase di gestione (maggio 2017)

Campione	Conc.	Repliche			Media non normofornati	sd	Abbott	EC	Tossicità
<b>CONT</b>		87,00	91,00	89,00	11,00	2,00	-	-	-
<b>Ve1</b>	100	90,00	89,00	88,00	11,00	1,00	0,00	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	88,00	88,00	89,00	11,67	0,58	0,75		
	25	85,00	88,00	88,00	13,00	1,73	2,25		
<b>Ve4</b>	100	88,00	88,00	87,00	12,33	0,58	1,50	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	85,00	89,00	88,00	12,67	2,08	1,87		
	25	85,00	88,00	89,00	12,67	2,08	1,87		
<b>Ve5</b>	100	85,00	87,00	86,00	14,00	1,00	3,37	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	89,00	89,00	90,00	10,67	0,58	-0,37		
	25	89,00	90,00	90,00	10,33	0,58	-0,75		
<b>Ve7</b>	100	88,00	88,00	87,00	12,33	0,58	1,50	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	91,00	88,00	86,00	11,67	2,52	0,75		
	25	89,00	90,00	87,00	11,33	1,53	0,37		
<b>Ve8</b>	100	85,00	83,00	85,00	15,67	1,15	5,24	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	88,00	90,00	87,00	11,67	1,53	0,75		
	25	88,00	89,00	90,00	11,00	1,00	0,00		
<b>DP</b>	100	85,00	88,00	85,00	14,00	1,73	3,37	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	87,00	90,00	90,00	11,00	1,73	0,00		
	25	87,00	87,00	91,00	11,67	2,31	0,75		
<b>Vn1</b>	100	71,00	70,00	72,00	29,00	1,00	20,22	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	88,00	89,00	89,00	11,33	0,58	0,37		
	25	90,00	87,00	88,00	11,67	1,53	0,75		
<b>Vn2</b>	100	88,00	90,00	88,00	11,33	1,15	0,37	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	90,00	90,00	85,00	11,67	2,89	0,75		
	25	91,00	86,00	87,00	12,00	2,65	1,12		
<b>Vn3</b>	100	85,00	88,00	85,00	14,00	1,73	3,37	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	89,00	89,00	90,00	10,67	0,58	-0,37		
	25	88,00	88,00	91,00	11,00	1,73	0,00		
<b>Vn4</b>	100	89,00	85,00	84,00	14,00	2,65	3,37	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente</b>
	50	88,00	86,00	86,00	13,33	1,15	2,62		
	25	90,00	90,00	87,00	11,00	1,73	0,00		

Le classi di tossicità attribuite ai campioni analizzati sono state ottenute dal manuale APAT-ICRAM (“Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini”, 2007). Il valore di EC50 ottenuto con il tossico di riferimento (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O) è risultato pari a 29,67 (26,50 – 33,21). Tali valori risultano all’interno della carta di controllo del laboratorio (22,60 µg/l - 68,34 µg/l).

Dal confronto riportato nella Tabella 17 è possibile verificare come il saggio di embriotossicità con *P. lividus* abbia registrato un netto miglioramento della situazione ambientale in generale a partire dal 2015, dato che la tossicità inizialmente presente in tutte le stazioni anche a livelli alti si sia ridotta fino a scomparire nelle ultime 3 campagne.

Tab. 17 – Confronto dei risultati del saggio di embriotossicità con *P. lividus*

Stazioni	Monitoraggio <i>ante operam</i> 2012	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2013	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2014	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2015	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2016	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> 2017
Ve1	Tossicità assente	Tossicità molto alta	*	Tossicità assente	*	Tossicità assente
Ve4	Tossicità assente	Tossicità alta	*	Tossicità alta	*	Tossicità assente
Ve5	Tossicità alta	Tossicità assente	Tossicità alta	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente
Ve7	Tossicità molto alta	Tossicità molto alta	*	Tossicità assente	*	Tossicità assente
Ve8	Tossicità molto alta	Tossicità molto alta	*	Tossicità assente	*	Tossicità assente
DP	Tossicità alta	Tossicità molto alta	Tossicità alta	Tossicità alta	Tossicità assente	Tossicità assente
Vn1	Tossicità molto alta	Tossicità assente	*	Tossicità alta	*	Tossicità assente
Vn2	Tossicità molto alta	Tossicità alta	Tossicità alta	Tossicità assente	Tossicità media	Tossicità assente
Vn3	Tossicità media	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente
Vn4	Tossicità molto alta	Tossicità alta	*	Tossicità assente	*	Tossicità assente

\*saggio non eseguito come previsto dal Piano di Monitoraggio

#### 4.1.6 Saggio biologico con *Acartia tonsa*

Nella Tabella 18 sono riportati i risultati del saggio con il copepode *Acartia tonsa* (valori di Inibizione dello sviluppo espressi in %) condotto sul sedimento prelevato nelle stazioni di campionamento a maggio 2017. Questo test ha sostituito quello condotto con l'anfipode *Corophium orientale*, dato che non è stato possibile reperirlo in natura a causa delle condizioni meteorologiche sfavorevoli.

 Tab. 18 - Risultati del saggio con *A. tonsa* condotto su sedimento – fase di gestione (maggio 2017)

Campione	Inibizione Sviluppo Larvale I (%)								Tossicità
	1	2	3	4	5	6	M	DS	
Ve 1	38,19	26,03	8,91	1,10	6,91	34,94	19,35	15,74	Assente
Ve 4	48,95	20,78	7,54	2,41	27,20	21,92	21,47	16,41	Assente
Ve 5	25,25	21,92	-5,40	-8,33	14,83	32,43	13,45	16,75	Assente
Ve 7	19,69	24,93	19,23	-3,17	29,73	23,74	19,03	11,53	Assente
Ve 8	26,46	10,21	19,23	6,91	32,00	74,38	28,20	24,52	Media
DP	23,27	3,25	-10,22	-12,43	13,89	44,89	10,44	21,75	Assente
Vn 1	12,47	-2,61	-9,24	-3,10	11,14	-0,39	1,38	8,60	Assente
Vn 2	-116,65	-116,54	-91,28	-158,23	-123,80	-97,66	-117,36	23,58	Assente
Vn 3	-128,37	-121,96	-91,28	-115,19	-135,27	-118,06	-118,35	15,12	Assente
Vn 4	53,70	21,92	19,48	13,71	26,26	41,44	29,42	15,14	Media

Il test ha rispettato tutti i parametri di validazione presi in considerazione (Tab.19): infatti i valori di successo di schiusa in acqua di mare dopo 48h e LDR ratio nel sedimento di controllo hanno rispettato i criteri di validazione prefissati, ed anche il valore di EC50 calcolato con il tossico di riferimento 3,5-



diclorofenolo è rientrato nell'intervallo previsto. I risultati ottenuti con i campioni di elutriato testati possono quindi essere considerati accettabili.

Tab.19 – Parametri di validazione del saggio con *A. tonsa*

	Parametri di validazione	Risultato richiesto	Risultato registrato
<b>Controllo Negativo (FSW)</b>	Schiusa uova (48h) (%)	≥ 75	89,49 ± 2,09
<b>Controllo Negativo (Sedimento di controllo)</b>	LDR ratio (6d)	≥ 0,3	0,35 ± 0,11
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O	EC50 Inibizione sviluppo (µg/L)	33-380 µg/L	37,04

I campioni Ve8 e Vn4 hanno fatto registrare valori di Inibizione dello sviluppo larvale superiori al 25% (rispettivamente 28,20 ± 24,52% e 29,42 ± 15,14%) corrispondenti ad una tossicità media. Le percentuali di inibizione registrate per tutti gli altri campioni sono risultate inferiori al 25%, classificando i campioni come non tossici (tossicità assente).

Per completezza d'informazione, si riportano i risultati del saggio condotto con *C. orientale* nei precedenti anni di monitoraggio (Tab. 20), ricordando che per motivi legati al reperimento degli anfipodi in campo il saggio non fu eseguito nella prima campagna in *corso d'opera* del 2013 (il saggio fu sostituito con quello con l'alga).

Tab. 20 – Confronto dei risultati del saggio con *C. orientale*

Stazioni	Monitoraggio <i>ante operam</i> 2012	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> 2014	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> 2015	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> 2016
Ve1	Tossicità assente	*	Tossicità assente	*
Ve4	Tossicità assente	*	Tossicità assente	*
Ve5	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente
Ve7	Tossicità assente	*	Tossicità assente	*
Ve8	Tossicità assente	*	Tossicità assente	*
DP	Tossicità assente	Tossicità alta	Tossicità assente	Tossicità assente
Vn1	Tossicità assente	*	Tossicità assente	
Vn2	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente
Vn3	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente
Vn4	Tossicità assente	*	Tossicità assente	*

\*saggio non eseguito come previsto dal Piano di Monitoraggio

#### 4.1.7 Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

Nella Tabella 21 sono riportati i risultati del saggio con l'alga *Phaeodactylum tricornutum* condotto sull'elutriato ottenuto dal sedimento prelevato nelle stazioni di campionamento a maggio 2017.

Tab. 21 - Risultati del saggio *P. tricornutum* – fase di gestione (maggio 2017)

Campione	Inibizione Crescita Algale I (%)								Tossicità
	1	2	3	4	5	6	M	DS	
<b>Ve 1</b>	-9,76	-9,58	-11,21	-12,34	-12,14	-11,00	-11,00	1,16	<b>Assente/Trascurabile</b>
<b>Ve 4</b>	-9,17	-7,87	-7,71	-9,13	-9,51	-10,09	-8,91	0,94	<b>Assente/Trascurabile</b>
<b>Ve 5</b>	-9,13	-8,72	-9,40	-9,06	-9,28	-9,76	-9,23	0,35	<b>Assente/Trascurabile</b>
<b>Ve 7</b>	-7,95	-8,61	-7,31	-8,02	-8,37	-8,49	-8,12	0,48	<b>Assente/Trascurabile</b>
<b>Ve 8</b>	-10,16	-9,62	-9,40	-10,23	-10,05	-10,05	-9,92	0,33	<b>Assente/Trascurabile</b>
<b>DP</b>	-10,62	-9,87	-9,69	-8,83	-9,73	-10,65	-9,90	0,68	<b>Assente/Trascurabile</b>
<b>Vn 1</b>	-9,25	-4,91	-5,58	-6,40	-8,06	-7,27	-6,91	1,61	<b>Assente/Trascurabile</b>
<b>Vn 2</b>	-11,94	-9,13	-11,10	-10,79	-9,83	-9,91	-10,45	1,02	<b>Assente/Trascurabile</b>
<b>Vn 3</b>	-11,88	-10,44	-10,79	-10,93	-11,10	-11,00	-11,02	0,48	<b>Assente/Trascurabile</b>
<b>Vn 4</b>	-12,47	-13,13	-12,34	-13,04	-11,98	-12,34	-12,55	0,45	<b>Assente/Trascurabile</b>

	Parametro	Risultato richiesto	Risultati registrati	
			Saggio condotto sui campioni di maggio	Saggio condotto sui campioni di ottobre
<b>Controllo negativo (SW)</b>	FC (fattore di crescita dopo 72h)	<b>&gt; 16</b>	99,51	54,12
	TC (tasso di crescita dopo 72h)	<b>&gt; 0,9 d<sup>-1</sup></b>	1,53	1,33
	CV (Coefficiente di variazione)	<b>&lt; 5</b>	1,19	3,04
<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	EC50 Inibizione (mg/L)	<b>14,8 – 25,4 mg/L</b>	19,54 (17,22 - 21,87)	24,58 (21,61 - 27,54)

I test hanno rispettato tutti i parametri di validazione presi in considerazione: al termine dell'incubazione (72h) infatti i valori di Fattore di Crescita (FC), Tasso di Crescita (TC) e Coefficiente di Variazione del Tasso di Crescita (CV TC) calcolati per i controlli negativi hanno rispettato i criteri di validazione prefissati, ed anche i valori di EC50 calcolati con il tossico di riferimento K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> sono rientrati nell'intervallo previsto dal protocollo ISO 10253 (2006). I risultati ottenuti con i campioni di elutriato testati possono quindi essere considerati accettabili.

I valori di Inibizione della Crescita Algale (I) per tutti i campioni analizzati sono risultati compresi nell'intervallo -50% e 20%, che corrisponde a livelli assenti o trascurabili di tossicità.

Il confronto tra i dati delle 5 campagne in corso d'opera (il saggio con l'alga è stato introdotto nel 2013 in sostituzione di quello con l'anfipode e poi mantenuto anche nella campagne successive) mostra una tossicità assente in tutte le stazioni con la sola eccezione della stazione DP nel 2013 (Tab. 22).

 Tab. 22 – Confronto dei risultati del saggio con *P. tricornutum*

Stazioni	Monitoraggio in corso d'opera 2013	Monitoraggio in corso d'opera 2014	Monitoraggio in corso d'opera 2015	Monitoraggio in corso d'opera 2016	Monitoraggio in corso d'opera 2017
<b>Ve1</b>	<b>Tossicità assente</b>	*	<b>Tossicità assente</b>	*	<b>Tossicità assente</b>
<b>Ve4</b>	<b>Tossicità assente</b>	*	<b>Tossicità assente</b>	*	<b>Tossicità assente</b>
<b>Ve5</b>	<b>Tossicità assente</b>	<b>Tossicità assente</b>	<b>Tossicità assente</b>	<b>Tossicità assente</b>	<b>Tossicità assente</b>
<b>Ve7</b>	<b>Tossicità assente</b>	*	<b>Tossicità assente</b>	*	<b>Tossicità assente</b>
<b>Ve8</b>	<b>Tossicità assente</b>	*	<b>Tossicità assente</b>	*	<b>Tossicità assente</b>
<b>DP</b>	<b>Tossicità media</b>	<b>Tossicità assente</b>	<b>Tossicità assente</b>	<b>Tossicità assente</b>	<b>Tossicità assente</b>

Vn1	Tossicità assente	*	Tossicità assente	*	Tossicità assente
Vn2	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente
Vn3	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente	Tossicità assente
Vn4	Tossicità assente	*	Tossicità assente	*	Tossicità assente

\*saggio non eseguito come previsto dal Piano di Monitoraggio

## 4.2 Colonna d'acqua

### 4.2.1 Mussel watch

#### Bioaccumulo metalli

Nella Tabella 23 sono riportati i risultati del bioaccumulo di metalli negli organismi di *Mytilus galloprovincialis* nella campagna di giugno 2017. E' stato calcolato il T-test rispetto ai dati del T<sub>0</sub> così da poter individuare eventuali fenomeni statisticamente significativi di bioaccumulo.

Tab. 23 - Risultati del bioaccumulo di metalli (mg/kg s.s.) nei tessuti dei mitili – fase di gestione (giugno 2017)

Stazioni	Cr	Ni	Zn	As	Cd	Cu	Pb	Hg
<b>T=0</b>	<b>2,83</b>	<b>1,79</b>	<b>187,81</b>	<b>17,32</b>	<b>0,75</b>	<b>8,04</b>	<b>3,39</b>	<b>0,15</b>
<b>Ve4</b>	2,74	1,83	224,75	18,57	0,80	6,74	3,88	0,105
<b>ds</b>	0,54	0,28	36,65	0,78	0,06	0,38	0,41	8,67
<b>t-test (p)</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Ve5</b>	3,59	1,19	141,41	19,29	0,81	4,37	1,45	0,064
<b>ds</b>	2,09	0,05	1,29	2,60	0,06	0,16	0,27	6,33
<b>t-test (p)</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Ve7</b>	3,15	2,38	145,43	18,00	0,78	7,42	5,00	0,007
<b>ds</b>	0,25	0,15	18,78	0,61	0,06	0,31	0,96	4,16
<b>t-test (p)</b>	/	<b>0,045</b>	/	/	/	/	/	/
<b>Ve8</b>	3,58	2,45	260,46	20,07	0,89	8,09	8,16	0,094
<b>ds</b>	0,42	0,36	13,63	0,68	0,12	0,86	0,41	5,34
<b>t-test (p)</b>	<b>0,034</b>	<b>0,041</b>	/	<b>0,030</b>	/	/	<b>0,002</b>	/
<b>DP</b>	7,48	1,92	158,42	19,26	0,89	5,98	5,24	0,068
<b>ds</b>	1,28	0,14	14,76	1,26	0,11	0,39	0,82	3,81
<b>t-test (p)</b>	<b>0,012</b>	/	/	/	/	/	<b>0,040</b>	/
<b>Vn1</b>	4,27	2,81	262,83	22,84	1,05	7,10	3,94	0,105
<b>ds</b>	0,41	0,37	29,22	0,70	0,02	0,40	0,43	2,89
<b>t-test (p)</b>	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>	<b>0,008</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0001</b>	/	0,110	/
<b>Vn2</b>	3,41	2,06	219,42	19,02	0,66	8,14	3,25	0,086
<b>ds</b>	0,39	0,36	30,03	1,62	0,13	0,71	0,34	0,93
<b>t-test (p)</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Vn3</b>	1,59	1,12	180,62	16,96	1,03	4,19	1,67	0,073
<b>ds</b>	0,26	0,14	10,60	0,80	0,16	0,27	0,16	3,91

Stazioni	Cr	Ni	Zn	As	Cd	Cu	Pb	Hg
<b>t-test (p)</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Vn4</b>	2,28	1,59	236,40	17,90	0,85	6,79	2,88	0,104
<b>ds</b>	0,33	0,32	25,92	0,58	0,08	0,77	0,14	8,97
<b>t-test (p)</b>	/	/	/	/	/	/	/	/

In grassetto sono indicati i valori risultati significativamente diversi dal T=0 mediante (T-test) per  $0,01 < p < 0,05$  ed in grassetto sottolineato quelli per  $p < 0,01$

L'accuratezza della metodica è stata valutata mediante l'utilizzo di un materiale certificato standard (tessuto di mitili NIST-2976) e viene riportata di seguito.

Accuratezza della metodica per l'analisi del bioaccumulo:

% recupero	Cr	Ni	Zn	As	Cd	Cu	Pb	Hg
<b>NIST</b>	107,1	80,29	97,15	115,4	98,88	93,12	113,7	92,62

I dati ottenuti indicano che, ad non si sono verificati fenomeni di bioaccumulo statisticamente rilevanti a eccezione delle stazioni Ve7, Ve8, DP e Vn1.

In particolare:

- Vn1 riporta un incremento per Cr, Ni, Zn, As e Cd;
- Ve7 riporta un incremento per Ni;
- Ve8 riporta un incremento per Cr, Ni, As e Pb;
- DP riporta un incremento per Cr, Pb.

Per quanto riguarda il 2017, Cromo, Nichel e Piombo rappresentano metalli critici. I risultati della stazione Ve8 sono inevitabilmente dipendenti dall'attività portuale, trovandosi infatti all'interno dell'area di transito, mentre i risultati relativi alla stazione Vn1, vista la sua posizione esterna all'area portuale, indicano la necessità di prendere in considerazione tale stazione in future attività di monitoraggio, probabilmente per particolari condizioni idrodinamiche. Analizzando invece i p-value calcolati per verificare la significatività statistica del bioaccumulo rispetto al T=0 confrontati per tutti gli anni in cui sono state condotte le campagne di Mussel Watch (Tab. 24), si può notare come il metallo più critico, essendosi bioaccumulato in modo significativo in 5 anni su 6 di campionamenti e in quasi tutte le stazioni, risulti essere il Cd. Un dato che però non trova riscontro con le indagini chimiche condotte sui sedimenti dell'area (Fig. 4), nei quali non sono mai stati osservati valori critici del suddetto elemento. Sarebbe quindi opportuno porvi grande attenzione nelle indagini future, al fine di riuscire a individuare la possibile via di contaminazione. Da sottolineare inoltre la situazione del mercurio, che ha presentato fenomeni di bioaccumulo significativi in tutte le stazioni della campagna 2013, una situazione critica che però non si è più verificata nel corso del monitoraggio.

Dall'osservazione dei confronti si può anche notare come l'anno più problematico sia stato il 2016, con fenomeni di bioaccumulo significativi in quasi tutte le stazioni per 6 metalli su 7 analizzati. La situazione invece è tornata a essere più sotto controllo nel 2017.

In generale, i metalli più critici da tenere sotto osservazione sono quindi il Cd e il Cr che, ad eccezione del 2012, si è bioaccumulato in almeno una stazione in tutte le altre campagne.

Tab. 24 – Confronto tra i p-value calcolati con test T di Student per tutte le campagne condotte nel periodo 2012-2017 (vengono riportati solo i p-value risultati statisticamente significativi, quindi  $< 0,01$  e  $< 0,05$ ; n.s.=non significativo)

2012								
	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg
Ve1	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ve4	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.	n.s.
Ve5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01	n.s.
Ve7	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.
Ve8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DP	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01	p<0,01	n.s.
Vn1	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Vn2	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Vn3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Vn4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2013								
Ve1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01
Ve4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01
Ve5	p<0,01	p<0,01	p<0,01	n.s.	p<0,01	p<0,01	n.s.	p<0,01
Ve7	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01	n.s.	p<0,05	p<0,05	p<0,01
Ve8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.	p<0,01
DP	p<0,01	p<0,01	n.s.	p<0,01	p<0,01	p<0,01	n.s.	p<0,01
Vn1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01
Vn2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01
Vn3	p<0,01	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01
Vn4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01
2014								
Ve5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

**ISPRA**Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

<b>DP</b>	n.s.	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Vn2</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>2015</b>								
<b>Ve1</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Ve4</b>	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.
<b>Ve5</b>	n.s.	p<0,01	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Ve7</b>	n.s.	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Ve8</b>	n.s.	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>DP</b>	n.s.	p<0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Vn1</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Vn2</b>	n.s.	p<0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Vn3</b>	n.s.	p<0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Vn4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>2016</b>								
<b>Ve5</b>	p<0,01	p<0,01	n.s.	n.s.	p<0,01	n.s.	n.s.	p<0,01
<b>DP</b>	p<0,01	n.s.	p<0,01	p<0,01	p<0,05	n.s.	p<0,05	n.s.
<b>Vn2</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,01	n.s.	n.s.	p<0,05
<b>Vn3</b>	n.s.	p<0,05	p<0,05	p<0,01	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.
<b>2017</b>								
<b>Ve4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Ve5</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Ve7</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Ve8</b>	p<0,05	n.s.	p<0,05	n.s.	p<0,05	p<0,01	n.s.	n.s.
<b>DP</b>	p<0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.	n.s.
<b>Vn1</b>	p<0,01	p<0,01	p<0,01	n.s.	p<0,01	n.s.	p<0,01	n.s.
<b>Vn2</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Vn3</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Vn4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

### Bioaccumulo IPA e biomarkers

Nella Tabella 25 sono riportati i risultati del bioaccumulo di IPA negli organismi di *Mytilus galloprovincialis* della campagna di giugno 2017. I risultati dei singoli congeneri e i commenti ai risultati di queste analisi sono riportati nell'**Allegato 3 - Bioaccumulo di IPA e analisi delle risposte biologiche nei mitili**.

Tab. 25 - Risultati del bioaccumulo di IPA (ng/g peso secco) nei tessuti dei mitili – fase di gestione (giugno 2017)

	T=0 (1)	T=0 (2)	Ve4	Ve5	Ve7	Ve8
<b>IPA basso PM</b>	67,7±5,69	66,8±11,5	284±52,7	41,7±13,5	215±136	372±70,3
<b>IPA alto PM</b>	11±0,249	10,3±5,59	16,9±8,68	25,2±8,87	119±64,4	67±19,7
<b>IPA totali</b>	78,7±5,74	77,2±16,8	300±58,9	66,9±217	334±201	439±60,6
	DP	Vn1	Vn2	Vn3	Vn4	
<b>IPA basso PM</b>	193±119	612±65,9	408±182	257±8,24	232±67	
<b>IPA alto PM</b>	54±26,9	12±8,58	9,81±2,89	4,84±0,614	10±4,86	
<b>IPA totali</b>	247±146	624±65,6	418±180	262±7,69	242±66,5	

#### 4.2.2 Saggi biologici

Nelle Tabelle seguenti sono riportati i risultati dei saggi con *P. tricornutum* (Tab. 26, 27 e 28), *P. lividus* (Tab. 29, 30 e 31) e *V. fischeri* (Tab. 32, 33 e 34) condotti su campioni d'acqua prelevati nelle stazioni di monitoraggio nelle campagne di maggio e di ottobre 2017. Nelle Tabelle 28, 31 e 34 sono riportati i confronti tra i risultati ottenuti nelle varie campagne di monitoraggio per ognuno dei 3 saggi.

##### *Phaeodactylum tricornutum*

 Tab. 26 - Risultati del saggio con *P. tricornutum* (espresso come Inibizione % della crescita algale) – fase di gestione (maggio 2017)

Campione	Inibizione Crescita Algale I (%)								Tossicità
	1	2	3	4	5	6	M	DS	
<b>Ve 1</b>	12,84	14,59	10,95	11,59	11,87	11,59	12,24	1,30	Assente/Trascurabile
<b>Ve 4</b>	11,41	13,75	12,35	11,13	13,24	17,18	13,18	2,21	Assente/Trascurabile
<b>Ve 5</b>	9,88	11,31	13,14	13,04	11,78	11,22	11,73	1,23	Assente/Trascurabile
<b>Ve 7</b>	11,04	7,97	10,23	10,68	8,62	10,77	9,88	1,27	Assente/Trascurabile
<b>Ve 8</b>	9,12	8,95	9,71	6,88	11,31	7,11	8,85	1,66	Assente/Trascurabile
<b>DP</b>	5,77	7,89	9,03	9,88	7,19	8,45	8,04	1,44	Assente/Trascurabile
<b>Vn 1</b>	15,35	12,06	14,59	13,24	12,64	12,16	13,34	1,35	Assente/Trascurabile
<b>Vn 2</b>	10,86	10,68	8,45	12,45	9,45	11,31	10,53	1,41	Assente/Trascurabile
<b>Vn 3</b>	10,77	12,06	14,06	8,54	11,22	10,06	11,12	1,87	Assente/Trascurabile
<b>Vn 4</b>	5,92	6,88	6,73	5,92	4,78	6,66	6,15	0,79	Assente/Trascurabile

Validazione del test di maggio 2017:

	Parametro	Risultato richiesto	Risultato ottenuto
<b>Controllo negativo (SW)</b>	FC (fattore di crescita dopo 72h)	> 16	103,33
	TC (tasso di crescita dopo 72h) (d <sup>-1</sup> )	> 0,9	1,55
	CV del TC (coefficiente di variazione del TC) (%)	< 5	1,26
<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	EC50 (mg/L)	14,8 – 25,4	20,10 ± 1,63

 Tab. 27 - Risultati del saggio con *P. tricornutum* (espresso come Inibizione % della crescita algale) – fase di gestione (ottobre 2017)

Campione	Inibizione Crescita Algale I (%)								Tossicità
	1	2	3	4	5	6	M	DS	
<b>Ve 5</b>	21,44	1,57	7,94	1,06	6,46	-0,91	6,26	8,17	Assente/Trascurabile
<b>DP</b>	7,11	4,48	2,78	6,95	4,19	1,57	4,51	2,21	Assente/Trascurabile
<b>Vn 2</b>	-0,07	0,80	0,42	8,62	1,06	6,15	2,83	3,63	Assente/Trascurabile
<b>Vn 3</b>	-2,85	-3,60	-0,55	-3,50	13,79	-0,43	0,48	6,67	Assente/Trascurabile

Validazione dei test di maggio e ottobre 2017:

	Parametro	Risultato richiesto	Risultati registrati	
			Saggio condotto sui campioni di maggio	Saggio condotto sui campioni di ottobre
Controllo negativo (SW)	FC (fattore di crescita dopo 72h)	> 16	99,51	54,12
	TC (tasso di crescita dopo 72h)	> 0,9 d <sup>-1</sup>	1,53	1,33
	CV (Coefficiente di variazione)	< 5	1,19	3,04
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	EC50 Inibizione (mg/L)	14,8 – 25,4 mg/L	19,54 (17,22 - 21,87)	24,58 (21,61 - 27,54)

 Tab. 28 – Confronto dei risultati del saggio con *P. tricornutum* condotto su campioni della colonna d'acqua

Stazioni	Monitoraggio in corso d'opera giugno 2013	Monitoraggio in corso d'opera maggio 2014	Monitoraggio in corso d'opera ottobre 2014	Monitoraggio gestione giugno 2015	Monitoraggio gestione ottobre 2015
Ve 1	*	*	*	Assente	*
Ve 4	*	*	*	Assente	*
Ve 5	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
Ve 7	*	*	*	Assente	*
Ve 8	*	*	*	Assente	*
DP	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
Vn 1	-	-	-	Assente	*
Vn 2	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
Vn 3	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
Vn 4				Assente	
Stazioni	Monitoraggio gestione giugno 2016	Monitoraggio gestione ottobre 2016	Monitoraggio gestione maggio 2017	Monitoraggio gestione ottobre 2017	
Ve 1	*	*	Assente	*	
Ve 4	*	*	Assente	*	
Ve 5	Assente	Assente	Assente	Assente	
Ve 7	*	*	Assente	*	
Ve 8	*	*	Assente	*	
DP	Assente	Assente	Assente	Assente	
Vn 1	*	*	Assente	*	
Vn 2	Assente	Assente	Assente	Assente	
Vn 3	Assente	Assente	Assente	Assente	
Vn 4	*	*	Assente	*	

\*saggio non eseguito come previsto dal Piano di Monitoraggio

Nell'arco di tutte le campagne condotte sia nella fase in corso d'opera che in quelle in fase di gestione, i campioni analizzati non hanno evidenziato alcuna criticità.

#### *Paracentrotus lividus*

 Tab. 29 - Risultati del saggio di embriotossicità con *P. lividus* – fase di gestione (maggio 2017)

Campione	Conc.	Repliche			Media non normoformati	sd	Abbott	Tossicità
Cont	-	91,00	85,00	89,00	11,67	3,06	-	-
Ve 1	100	90,00	89,00	86,00	11,67	2,08	EC <sub>50</sub> >90	Assente/Trascurabile
	50	88,00	88,00	87,00	12,33	0,58		
	25	85,00	89,00	88,00	12,67	2,08		
Ve 4	100	88,00	88,00	87,00	12,33	0,58	EC <sub>50</sub> >90	Assente/Trascurabile
	50	85,00	90,00	88,00	12,33	2,52		
	25	85,00	87,00	89,00	13,00	2,00		
Ve 5	100	85,00	86,00	86,00	14,33	0,58	EC <sub>50</sub> >90	Assente/Trascurabile



	50	88,00	89,00	88,00	11,67	0,58		
	25	89,00	89,00	90,00	10,67	0,58		
<b>Ve7</b>	100	88,00	88,00	87,00	12,33	0,58	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	50	89,00	90,00	86,00	11,67	2,08		
<b>Ve8</b>	25	89,00	87,00	87,00	12,33	1,15	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	100	85,00	83,00	85,00	15,67	1,15		
<b>DP</b>	50	88,00	88,00	87,00	12,33	0,58	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	25	88,00	89,00	90,00	11,00	1,00		
<b>Vn1</b>	100	85,00	88,00	85,00	14,00	1,73	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	50	87,00	90,00	90,00	11,00	1,73		
<b>Vn2</b>	25	87,00	87,00	91,00	11,67	2,31	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	100	90,00	87,00	87,00	12,00	1,73		
<b>Vn3</b>	50	88,00	89,00	89,00	11,33	0,58	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	25	90,00	87,00	88,00	11,67	1,53		
<b>Vn4</b>	100	88,00	90,00	88,00	11,33	1,15	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	50	90,00	90,00	85,00	11,67	2,89		
<b>Vn3</b>	25	91,00	86,00	87,00	12,00	2,65	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	100	85,00	88,00	85,00	14,00	1,73		
<b>Vn4</b>	50	89,00	89,00	90,00	10,67	0,58	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	25	88,00	88,00	91,00	11,00	1,73		
<b>Vn4</b>	100	89,00	85,00	84,00	14,00	2,65	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>
	50	88,00	86,00	86,00	13,33	1,15		
<b>Vn4</b>	25	90,00	90,00	87,00	11,00	1,73	EC <sub>50</sub> >90	<b>Assente/Trascurabile</b>

 Tab. 30 - Risultati del saggio di embriotossicità con *P. lividus* – fase di gestione (ottobre 2017)

Campione	Conc.	Repliche			Media non normoformati	sd	Abbott	Tossicità
<b>Cont</b>	-	86,00	84,00	85,00	15,00	1,00	-	-
<b>Ve5</b>	100	69,00	72,00	74,00	28,33	2,52	15,69	<b>Assente/Trascurabile</b>
	50	78,00	77,00	78,00	22,33	0,58	8,63	
	25	77,00	81,00	81,00	20,33	2,31	6,27	
<b>DP</b>	100	75,00	78,00	74,00	24,33	2,08	10,98	<b>Assente/Trascurabile</b>
	50	78,00	76,00	76,00	23,33	1,15	9,80	
	25	80,00	78,00	81,00	20,33	1,53	6,27	
<b>Vn2</b>	100	78,00	76,00	75,00	23,67	1,53	10,20	<b>Assente/Trascurabile</b>
	50	78,00	81,00	78,00	21,00	1,73	7,06	
	25	80,00	77,00	81,00	20,67	2,08	6,67	
<b>Vn3</b>	100	86,00	84,00	84,00	15,33	1,15	0,39	<b>Assente/Trascurabile</b>
	50	84,00	85,00	84,00	15,67	0,58	0,78	
	25	85,00	84,00	87,00	14,67	1,53	-0,39	

I campioni analizzati non evidenziano alcuna criticità, a conferma di quanto evidenziato durante le campagne di monitoraggio effettuate negli anni passati, dove solo nel novembre 2013, per il campione prelevato nella stazione Vn3, era emersa una tossicità elevata.

 Tab. 31 – Confronto dei risultati del saggio con *P. lividus* condotto su campioni della colonna d'acqua

Stazioni	Monitoraggio in corso d'opera giugno 2013	Monitoraggio in corso d'opera maggio 2014	Monitoraggio in corso d'opera ottobre 2014	Monitoraggio gestione giugno 2015	Monitoraggio gestione ottobre 2015
<b>Ve 1</b>	*	*	*	<b>Assente</b>	*
<b>Ve 4</b>	*_	*	*	<b>Assente</b>	*
<b>Ve 5</b>	<b>Assente</b>	<b>Assente</b>	<b>Assente</b>	<b>Assente</b>	<b>Assente</b>



Ve 7	*	*	*	Assente	*
Ve 8	*	*	*	Assente	*
DP	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
Vn 1	*	*	*	Assente	*_
Vn 2	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
Vn 3	Molto alta	Assente	Assente	Assente	Assente
Vn 4	*	*	*	Assente	
Stazioni	Monitoraggio gestione giugno 2016	Monitoraggio gestione ottobre 2016	Monitoraggio gestione maggio 2017	Monitoraggio gestione ottobre 2017	
Ve 1	*	*	Assente	*	
Ve 4	*	*	Assente	*	
Ve 5	Assente	Assente	Assente	Assente	
Ve 7	*	*	Assente	*	
Ve 8	*	*	Assente	*	
DP	Assente	Assente	Assente	Assente	
Vn 1	*	*	Assente	*	
Vn 2	Assente	Assente	Assente	Assente	
Vn 3	Assente	Assente	Assente	Assente	
Vn 4	*	*	Assente	*	

\*saggio non eseguito come previsto dal Piano di Monitoraggio

Vibrio fischeri

Tab. 32 Risultati saggio con *V. fischeri* – fase di gestione (maggio 2017)

Campione	Incubaz.	EC <sub>20</sub> (%)	R <sup>2</sup>	Fattore di correzione	Massimo Effetto (%)	Media ± d,s, (%)	Tossicità
Ve 1	5'	>90	-	-	20,81		Presente
	15'	>90	-	-	22,85		
	30'	EC <sub>20</sub> = 73,04 (33,19 – 160,7)	83,09	1,112			
Ve 4	5'	>90	-	-	12,77	15,56 ± 2,64	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	15,91		
	30'	>90	-	-	18,01		
Ve5	5'	>90	-	-	14,00	16,42 ± 2,55	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	16,18		
	30'	>90	-	-	19,08		
Ve7	5'	>90	-	-	13,49	15,07 ± 1,39	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	15,60		
	30'	>90	-	-	16,12		
Ve8	5'	>90	-	-	12,83	15,18 ± 2,40	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	15,07		
	30'	>90	-	-	17,63		
DP	5'	>90	-	-	15,49	17,83 ± 2,12	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	18,39		
	30'	>90	-	-	19,61		
Vn1	5'	>90	-	-	18,41	19,89 ± 2,16	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	18,89		
	30'	>90	-	-	22,37		
Vn2	5'	>90	-	-	2,556	2,67 ± 1,04	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	1,688		
	30'	>90	-	-	3,755		
Vn3	5'	>90	-	-	14,44	15,58 ± 1,98	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	14,43		
	30'	>90	-	-	17,86		
Vn4	5'	>90	-	-	16,03	15,27 ± 1,04	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	15,69		
	30'	>90	-	-	14,09		

Tab. 33 Risultati saggio con *V. fischeri* – fase di gestione (ottobre 2017)

Campione	Incubaz,	EC <sub>20</sub> (%)	R <sup>2</sup>	Fattore di correzione	Massimo Effetto (%)	Media ± d,s, (%)	Tossicità
Ve 5	5'	>90	-	-	1,436	1,56 ± 0,64	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	0,9816		
	30'	>90	-	-	2,252		
DP	5'	>90	-	-	0,9051	1,46 ± 0,95	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	0,9139		
	30'	>90	-	-	2,561		
Vn 2	5'	>90	-	-	2,556	2,67 ± 1,04	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	1,688		
	30'	>90	-	-	3,755		
Vn 3	5'	>90	-	-	2,562	1,90 ± 0,85	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	2,203		
	30'	>90	-	-	0,9357		

I 3 saggi condotti su campioni della colonna d'acqua non hanno registrato alcuna tossicità.

 Tab.34 – Confronto dei risultati del saggio con *V. fischeri* condotto su campioni della colonna d'acqua

Stazioni	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> giugno 2013	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> maggio 2014	Monitoraggio <i>in corso d'opera</i> ottobre 2014	Monitoraggio <i>gestione</i> giugno 2015	Monitoraggio <i>gestione</i> ottobre 2015
Ve 1	-	-	-	Assente	-
Ve 4	-	-	-	Assente	-
Ve 5	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
Ve 7				Assente	
Ve 8				Assente	
DP	Presente	Assente	Assente	Assente	Assente
Vn 1	-	-	-	Assente	-
Vn 2	Assente	Assente	Presente	Assente	Assente
Vn 3	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
Vn 4				Assente	
Stazioni	Monitoraggio <i>gestione</i> giugno 2016	Monitoraggio <i>gestione</i> ottobre 2016	Monitoraggio <i>gestione</i> maggio 2017	Monitoraggio <i>gestione</i> ottobre 2017	
Ve 1	-	-	Presente	-	
Ve 4	-	-	Assente	-	
Ve 5	Assente	Assente	Assente	Assente	
Ve 7	-	-	Assente	-	
Ve 8	-	-	Assente	-	
DP	Assente	Assente	Assente	Assente	
Vn 1	-	-	Assente	-	
Vn 2	Assente	Assente	Assente	Assente	
Vn 3	Assente	Assente	Assente	Assente	
Vn 4	-	-	Assente	-	

### 4.2.3 Saggi *in situ*

Nelle Tabelle 35 e 36 sono riportati rispettivamente i risultati del saggio con il riccio di mare condotto *in situ* e in laboratorio nelle stazioni di campionamento a maggio e a ottobre 2017. Nella Tabella 37 si riporta il confronto tra i saggi *in situ*/laboratorio condotti nelle varie campagne di monitoraggio.

Tab. 35 - Risultati del saggio di embriotossicità *in situ* con *P. lividus* – fase di gestione (maggio 2017)

Campione	Repliche			Media normoformati	Media non normoformati	sd	Abbott	Tossicità
SW	91	85	89	88	12	3,06	-	-
<b>IN SITU</b>								
Vn1	85	83	80	82	19	2,12	8	Assente/Trascurabile
Vn2	82	83	81	82	18	1,41	7	Assente/Trascurabile
DP	73	72	74	73	27	1,41	17	Media
<b>IN LABORATORIO</b>								
Vn1	87	87	90	88	12	1,73	0	Assente/Trascurabile
Vn2	88	90	88	89	11	1,15	0	Assente/Trascurabile
DP	85	88	85	86	14	1,73	3	Assente/Trascurabile

Tab. 36 - Risultati del saggio di embriotossicità (condotto in laboratorio) con *P. lividus* – fase di gestione a (ottobre 2017)

Campione	Repliche					Media normoformati	Media non normoformati	sd	Abbott	Tossicità
SW	86	84	85	-	-	85	15	1,00	-	-
<b>IN SITU</b>										
Vn1	70	83	80	81	nc	78,50	21,50	6,81	7,65	Assente/Trascurabile
Vn2	85	70	74	83	83	77,50	22,50	7,77	8,82	Assente/Trascurabile
DP	81	85	87	70	85	80,33	19,67	3,96	5,49	Assente/Trascurabile
<b>IN LABORATORIO</b>										
Vn1	80	76	75	-	-	23,00	77,00	2,65	9,41	Assente/Trascurabile
Vn2	78	76	75	-	-	23,67	77,23	1,53	10,20	Assente/Trascurabile
DP	75	78	74	-	-	24,33	76,67	2,08	10,98	Assente/Trascurabile

I risultati del saggio di embriotossicità con il riccio di mare *P. lividus* hanno mostrato un'assenza di tossicità in tutte le stazioni sia nel saggio *in situ* che nel test condotto in parallelo in condizioni di laboratorio, ad eccezione del saggio *in situ* nella stazione DP condotto a maggio che ha registrato una tossicità media.

Durante le attività di monitoraggio *ante operam* del 2012 e in corso d'opera del giugno 2013 i test condotti *in situ* non hanno registrato alcuna tossicità, di contro le prove eseguite in condizioni controllate di laboratorio hanno mostrato una tossicità elevata nelle stazioni Vn2 e Vn4 (Tab. 37). Nel prosieguo delle attività di monitoraggio del 2013 e del 2014 i test condotti in laboratorio e in campo non hanno evidenziato alcuna criticità anche se è opportuno ricordare come nella campagna del luglio 2014 non sia stato possibile condurre (per condizioni meteo marine inidonee) i test *in situ*.

Nel corso del monitoraggio durante la fase di gestione della vasca di colmata che si è protratto dal 2015 al 2017, i saggi con *P. lividus* condotti in laboratorio non hanno registrato particolari criticità, mentre i

test condotti *in situ* hanno rilevato, oltre ad una tossicità elevata nel 2016 per la stazione Vn2, una tossicità costante seppure in attenuazione nel corso degli anni per la stazione DP.

Il saggio di laboratorio ha confermato l'assenza di tossicità osservata nelle precedenti campagne (Tab. 37), sia ante che durante con la sola eccezione di una tossicità media in DP nel maggio 2016.

Per quanto riguarda i test *in situ* la stazione Vn1 si conferma non tossica come durante tutte le altre fasi dei lavori (Tab. 37). Anche la stazione Vn2 posta davanti alla vasca di colmata risulta non tossica, ad eccezione del maggio 2016, quando l'alta tossicità registrata potrebbe essere stata causata da una momentanea alterazione dei parametri chimico-fisici. La stazione interna al porto DP ha presentato, a fronte di una tossicità assente in laboratorio, alcune risposte tossiche nel 2015 (molto alta), nel 2016 (alta) e una tossicità media a maggio 2017, per poi risultare non tossica nell'ottobre 2017.

Tab. 37 – Confronto tra i saggi *in situ*/laboratorio condotti nelle diverse campagne di monitoraggio

Stazioni	Monitoraggio <i>ante operam</i> 2012	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> giugno 2013	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> ottobre 2013	Monitoraggio <i>in corso</i> <i>d'opera</i> luglio 2014
Vn1 <i>in situ</i>	Assente	Assente	Assente	-
Vn2 <i>in situ</i>	Assente	Assente	Assente	-
Vn4 <i>in situ</i>	Assente	Assente	Assente	-
Vn1 lab	Assente	Assente	Assente	Assente
Vn2 lab	Alta	Molto alta	Assente	Assente
Vn4 lab	Molto alta	Alta	Assente	Assente
Stazioni	Monitoraggio <i>gestione</i> 2015	Monitoraggio <i>gestione</i> 2016	Monitoraggio <i>gestione</i> 2017	
Vn1 <i>in situ</i>	Assente	Assente	Assente	
Vn2 <i>in situ</i>	Assente	Alta	Assente	
DP <i>in situ</i>	Molto alta	Alta	Media	
Vn1 lab	Assente	Assente	Assente	
Vn2 lab	Assente	Assente	Assente	
DP lab	Assente	Media	Assente	

#### 4.2.4 Analisi chimico-fisiche tramite sonda multiparametrica

Nelle Tabella 38 sono riportati rispettivamente relativi ai campionamenti della colonna d'acqua con sonda multiparametrica del effettuati in data 21/03/2017, 11/05/2017 e 17/10/2017.

Tab. 38 - Risultati sonda multiparametrica

Campionamento: 21/03/2017



Condizioni meteo: Nuvoloso, mare poco mosso, vento di grecale

Stazione	Prof. (m)	T (°C)	pH	Salinità ‰	ORP (mV)	O <sub>2</sub> (%)	Torbidità (NTU)	SpC (µS/cm)
<b>Ve5 sup</b>	1,19	14,31	8,03	38,07	188	96,4	6,2	58,7
<b>Ve5 prof</b>	3,03	14,19	8,02	38,26	189	95,7	7,76	58,98
<b>DP prof</b>	1,20	14,15	7,99	36,95	189	90,4	16,6	57,17
<b>Vn2 sup</b>	1,20	14,27	8,02	38,08	185	98,7	7	58,74
<b>Vn2 prof</b>	4,01	14,11	8,01	38,37	186	98,9	8,7	59,1
<b>Vn3 sup</b>	1,06	14,34	8,00	37,95	183	99,2	6,3	58,6
<b>Vn3 prof</b>	5,16	14,11	7,98	38,36	184	97,2	12,5	59,09

**Campionamento: 11/05/2017**

Condizioni meteo: soleggiato, mare calmo, debole vento di scirocco

Stazione	Prof. (m)	T (°C)	pH	SpCond [µS/cm]	ORP (mV)	O <sub>2</sub> (%)	Torbidità (NTU)	SpC (µS/cm)
<b>Ve1 sup</b>	1,08	17,85	8,19	38,46	164	101,2	8,2	58,78
<b>Ve1 prof</b>	5,84	17,24	8,18	38,48	164	101,4	9	58,81
<b>Ve4 sup</b>	1,18	17,55	7,97	38,21	192	100,8	6	58,48
<b>Ve4 prof</b>	3,2	17,62	8,05	38,26	191	101,2	7,2	58,5
<b>Ve5 sup</b>	1,05	18,17	8,14	38,27	181	101,6	4,6	58,46
<b>Ve5 prof</b>	2,99	17,60	8,17	38,35	180	101,5	6,5	58,66
<b>Ve7 sup</b>	1,08	17,74	7,95	37,33	187	95,4	12,9	57,22
<b>Ve7 prof</b>	4,2	17,4	7,96	37,94	185	97,3	11,1	58,07
<b>Ve8 sup</b>	1,11	17,66	8,01	37,42	194	94,1	8,6	57,34
<b>Ve8 prof</b>	6,61	17,37	8,04	38,02	192	96,7	7,9	58,06
<b>DP sup.</b>	1,01	17,70	7,97	39,4	184	94,5	9,5	57,34
<b>DP prof.</b>	5,50	17,28	7,98	38,01	185	93,5	8,8	58,14
<b>Vn1 sup</b>	0,96	17,91	8,19	38,46	155	101,9	6,9	59,74
<b>Vn1 prof</b>	6,445	17,95	8,2	38,5	154	101,8	7,9	58,77
<b>Vn2 sup</b>	1,06	17,80	7,97	38,41	188	101,5	9,4	58,69
<b>Vn2 prof</b>	4,29	17,58	8,06	38,46	187	101,8	5,5	58,89
<b>Vn3 sup</b>	1,20	18,12	8,19	38,25	191	102,2	12,4	58,54
<b>Vn3 prof</b>	4,70	17,55	8,21	38,46	190	101,8	12,7	58,89
<b>Vn4 sup</b>	1,19	17,97	8,18	38,45	180	101,6	6,9	58,68
<b>Vn4 prof</b>	4,33	17,7	8,19	38,5	179	101,4	6,9	58,79

**Campionamento: 17/10/2017**

Condizioni meteo: Soleggiato, mare calmo

Stazione	Prof. (m)	T (°C)	pH	SpCond [µS/cm]	ORP (mV)	O <sub>2</sub> (%)	Torbidità (NTU)	SpC (µS/cm)
<b>Ve5 sup</b>	1,19	20,2	8,22	38,33	189	98,7	7,8	58240
<b>Ve5 prof</b>	3,60	20,07	8,27	38,51	187	96,9	10,9	58360
<b>DP sup</b>	0,96	20,67	8,31	38,11	189	94,2	13,4	57831

<b>DP prof</b>	1,85	20,52	8,32	38,09	188	94,1	13,6	57862
<b>Vn2 sup</b>	1,06	20,36	8,35	38,28	179	98,1	8,1	58131
<b>Vn2 prof</b>	4,7	19,93	8,39	38,37	177	100,2	11,1	58321
<b>Vn3 sup</b>	1,02	20,25	8,28	38,24	179	99,1	9,4	58200
<b>Vn3 prof</b>	4,6	20,34	8,29	38,44	178	98,2	12,1	58360

Il monitoraggio effettuato mediante la sonda multiparametrica non ha portato alla luce particolari criticità nei parametri indagati; per quanto riguarda la torbidità i valori registrati risultano compresi tra il valore minimo di 5,5 NTU (registrato ad un metro dal fondo nella stazione VN2 durante la campagna di maggio 2017), e 16,6 NTU (nella stazione DP nel marzo 2017).

Una conversione diretta tra le unità di torbidità (NTU) e i solidi sospesi (mg/l) non può essere eseguita a meno che non si sviluppi una correlazione specifica tra le due grandezze attraverso una misura diretta e concomitante dei solidi sospesi e della torbidità. Generalmente, la relazione tra i solidi sospesi e torbidità può essere interpretata mediante una regressione lineare tuttavia è sempre necessaria una validazione e calibrazione degli strumenti prima di effettuare delle misure in campo.

In linea generale i valori di torbidità riscontrati non risultano particolarmente elevati e sono valori che tipicamente possiamo ritrovare in ambiti portuali caratterizzati da un elevato traffico marittimo come nel Porto di Livorno.

### 4.3 Acque di sfioro

In questo paragrafo si riportano i risultati delle analisi fisiche (determinazione del contenuto di solidi sospesi) ed ecotossicologiche effettuate su campioni di acque di sfioro campionate in due diverse occasioni a dicembre 2017, in concomitanza del dragaggio dell'Imboccatura Sud del Porto e del conseguente sversamento dei sedimenti dragati nella seconda vasca di colmata.

Nell'**Allegato 2** si riporta la documentazione fotografica effettuata durante le operazioni di campionamento.

#### 4.3.1 Solidi sospesi

Nella Tabella 39 sono riportati i risultati dei solidi sospesi determinati nei campioni di acqua dello sfioro della vasca di colmata.

Tab. 39 Risultati dei solidi sospesi (TSS)

Campione	TSS (mg/l)	Campione	TSS (mg/l)
<b>Interno Panne 06-12-2017</b>	32,0	<b>Esterno Panne 06-12-2017</b>	27,0
<b>Interno Panne 20-12-2017</b>	78,0	<b>Esterno Panne 20-12-2017</b>	77,0

Dai risultati dei TSS presentati nella Tabella 39 si può vedere come la torbidità all'interno e all'esterno delle panne risulti aumentata dopo 2 settimane dall'inizio delle attività rispetto al primo campionamento effettuato dopo 4 giorni dall'inizio del dragaggio (02/12/2017). I valori dei TSS, durante le due campagne di monitoraggio, non hanno subito sensibili variazioni tra l'interno e l'esterno delle panne; questo è probabilmente indice di un errato posizionamento delle stesse o di una scarsa efficacia delle panne come misura di contenimento della torbidità. Complessivamente tuttavia, i valori di TSS registrati non risultano particolarmente elevati rispetto a quelli registrati nel corso dei monitoraggi effettuati negli anni precedenti, a testimonianza dell'efficacia del sistema di decantazione dei solidi sospesi, presenti nelle acque drenate dalla vasca di colmata, a monte dello sfioro all'interno delle acque portuali.

#### 4.3.2 Saggi biologici

Nelle Tabelle da 40 a 44 sono riportati e confrontati i risultati dei saggi ecotossicologici (*Phaeodactylum tricornutum*, *Paracentrotus lividus* – spermio ed embriotossicità – e *Vibrio fischeri*) effettuati sulle acque di sfioro.

##### *Phaeodactylum tricornutum*

Tab. 40 - Risultati del saggio con *P. tricornutum* – acque di sfioro

Campione	Inibizione Crescita algale I (%)					Tossicità <sup>a</sup>
	1	2	3	M	DS	
<b>06/12/2017</b>						
Interno Panne	-11,01	-12,76	-7,22	-10,33	2,83	Assente/Trascurabile
Esterno Panne	-6,48	-7,71	-4,51	-6,23	1,62	Assente/Trascurabile
<b>20/12/2017</b>						
Interno Panne	-15,43	-13,36	-13,65	-14,14	1,12	Assente/Trascurabile
Interno Panne	-11,01	-12,26	-12,96	-12,07	0,99	Assente/Trascurabile

<sup>a</sup>: Scala Tossicità in termini di Inibizione % della crescita algale

Validazione del test:

	Parametro	Risultato richiesto	Risultato registrato
Controllo negativo (SW)	Fattore di Crescita conc. cellulare 72h	> 16	132,83
	Tasso di Crescita 72h	> 0,9 d <sup>-1</sup>	1,63
	Coeff. di Variazione del T. di C. 72h	< 5	1,85
EC50 K2C2O7 72h inibizione (mg/L)	Modello Logit Hill	20,1 ± 5,1 (14,8 - 25,4)	21,035 (18,779-23,291)

Il saggio con l'alga non evidenzia alcuna tossicità nei campioni delle acque di sfioro.



*Paracentrotus lividus*

Tab. 41 Risultati saggio di spermotossicità con *P. lividus* – acque di sfioro

Campione	Conc.	% uova fecondate			Media non fecondati	DS	Abbott	EC <sub>20</sub> /EC <sub>50</sub>	Giudizio
		Repliche							
Controllo	-	86	85	85	14,67	0,58	-	-	-
Esterno Panne 06-12-2017	100	82	81	83	18,00	1,00	3,91	EC <sub>20</sub> >90	Assente
	50	83	83	82	17,33	0,58	3,12		
	25	82	84	83	17,00	1,00	2,73		
Interno Panne 06-12-2017	100	81	82	83	18,00	1,00	3,91	EC <sub>20</sub> >90	Assente
	50	81	82	82	18,33	0,58	4,30		
	25	83	84	84	16,33	0,58	1,95		
Controllo	-	85	85	84	15,33	0,58	-	-	-
Esterno Panne 20-12-2017	100	85	79	78	19,33	3,79	4,72	EC <sub>20</sub> >90	Assente
	50	81	79	83	19,00	2,00	4,33		
	25	83	81	85	17,00	2,00	1,97		
Interno Panne 20-12-2017	100	68	70	67	31,67	1,53	19,29	EC <sub>20</sub> >90	Assente
	50	77	78	78	22,33	0,58	8,27		
	25	84	84	82	16,67	1,15	1,57		

Tab. 42 Risultati saggio di embriotossicità con *P. lividus* – acque di sfioro

Campione	Conc.	% embrioni ben sviluppati			Media non sviluppati	DS	Abbott	EC <sub>20</sub> /EC <sub>50</sub>	Giudizio
		Repliche							
Controllo	-	85	84	84	15,67	0,58	-	-	-
Esterno Panne 06-12-2017	100	80	79	78	21,00	1,00	6,32	EC <sub>20</sub> >90	Assente
	50	80	81	81	19,33	0,58	4,35		
	25	81	82	82	18,33	0,58	3,16		
Interno Panne 06-12-2017	100	80	78	78	21,33	1,15	6,72	EC <sub>20</sub> >90	Assente
	50	81	82	82	18,33	0,58	3,16		
	25	82	82	81	18,33	0,58	3,16		
Controllo	-	90	86	88	12,00	2,00	-	-	-
Esterno Panne 20-12-2017	100	88	86	88	12,67	1,15	0,76	EC <sub>20</sub> >90	Assente
	50	88	87	88	12,33	0,58	0,38		
	25	88	88	88	12,00	0,00	0,00		
Interno Panne 20-12-2017	100	86	86	82	15,33	2,31	3,79	EC <sub>20</sub> >90	Assente
	50	85	85	87	14,33	1,15	2,65		
	25	85	86	86	14,33	0,58	2,65		

Il valore di EC<sub>50</sub> ottenuto con il tossico di riferimento (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O) è risultato pari a 28,49 (28,49-30,13). Tali valori risultano all'interno della carta di controllo del laboratorio (22,60 µg/l - 68,34 µg/l).

Il saggio con il riccio di mare non ha evidenziato alcuna tossicità nei campioni delle acque di sfioro.

*Vibrio fischeri*

Tab. 43 Risultati saggio con *V. fischeri* – acque di sfioro

Campione	Incubaz.	EC <sub>20</sub> (%)	R <sup>2</sup>	Fattore di correzione	Massimo Effetto (%)	Media ± d.s. (%)	Tossicità
Esterno Panne 06-12-2017	5'	>90	-	-	20,89	21,90 ± 0,99	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	21,94		
	30'	>90	-	-	22,86		
Interno Panne 06-12-2017	5'	EC <sub>20</sub> = 6,497 (5,706-7,397)	99,98	1,084		±	Presente
	15'	EC <sub>20</sub> = 7,467 (4,834-11,54)	99,82	1,085			
	30'	EC <sub>20</sub> = 4,731 (2,078-10,77)	99,04	1,100			
Esterno Panne 20-12-2017	5'	EC <sub>20</sub> = 36,61 (6,931-193,4)	98,45	1,125		±	Presente
	15'	EC <sub>20</sub> = 37,24 (1,334-1040)	99,17	1,156			
	30'	EC <sub>20</sub> = 24,86 (1,793-344,8)	93,76	1,208			
Interno Panne 20-12-2017	5'	>90	-	-	11,81	12,85 ± 0,99	Assente Trascurabile
	15'	>90	-	-	12,98		
	30'	>90	-	-	13,77		

Il saggio con il batterio evidenzia una lieve presenza di tossicità nei campioni prelevati all'interno delle panne il 06/12/17e all'esterno delle panne il 20/12/17.

Tab. 44 Confronto tra i risultati dei 3 saggi ecotossicologici effettuati sulle acque di sfioro e i valori di TSS

	Interno panne					Esterno panne				
	TSS	<i>P. tricornutum</i>	<i>P. lividus</i> spermio	<i>P. lividus</i> embrio	<i>V. fischeri</i>	TSS	<i>P. tricornutum</i>	<i>P. lividus</i> spermio	<i>P. lividus</i> embrio	<i>V. fischeri</i>
06/12/17	32,00					27,00				
20/12/17	78,00					77,00				

La batteria di saggi impiegata nella valutazione ecotossicologica delle acque di sfioro della vasca di colmata non ha evidenziato particolari criticità ad eccezione di una lieve tossicità per entrambe le date di campionamento con il batterio bioluminescente *V. fischeri*.

#### 4.4 Biocenosi

La descrizione del popolamento bentonico e l'inquadramento biocenotico per ognuna delle due campagne effettuate è riportato nell'**Allegato 4 - Descrizione del popolamento bentonico e inquadramento biocenotico**.

## 5. CONCLUSIONI

Vengono riportate alcune conclusioni suddivise per comparto indagato: sedimento superficiale, colonna d'acqua, biocenosi bentoniche; infine si riportano alcune considerazioni conclusive generali.

### 5.1 Sedimenti superficiali

#### 5.1.1 Granulometria

Per quanto riguarda la composizione granulometrica dei sedimenti prelevati, si evidenzia un'ampia variabilità di composizione tra le differenti stazioni campionate, andando da sedimenti prevalentemente sabbiosi (stazioni esterne al porto) a sedimenti prevalentemente pelitici (stazioni posizionate nelle aree interne del porto).

Nel periodo di monitoraggio esaminato (2012-2017), considerando le singole stazioni indagate, non si evidenziano comunque variazioni sostanziali nella composizione granulometrica dei sedimenti.

#### 5.1.2 Caratteristiche chimiche (metalli in tracce e IPA)

In generale i sedimenti superficiali indagati non presentano concentrazioni rilevanti di metalli pesanti nelle diverse stazioni e nei diversi anni di campionamento, pur evidenziando concentrazioni più alte nelle stazioni interne al porto, dove il sedimento risulta particolarmente ricco di pelite.

Ad un'analisi di dettaglio, gli unici metalli che presentano difformità sono il Cu, lo Zn ed il Ni, sempre nelle medesime stazioni; confrontando i valori con quelli di riferimento per sedimenti relativamente incontaminati della stessa area e con frazione pelitica paragonabile (ICRAM I Quaderni, 2002), risulta che soltanto il Cu e lo Zn presentano concentrazioni superiori alla media locale, ad esclusione dell'ultimo anno di monitoraggio.

Riguardo i contaminanti organici (IPA), si sottolinea che, sebbene non si tratti di sedimenti sottoposti a dragaggio, in nessuna delle stazioni campionate nei differenti anni di indagine, si evidenziano superamenti dei limiti L1 e L2 riportati nell'allegato tecnico al D.lgs 173/2017 (unica situazione da evidenziare è quella della stazione interna Ve8 nel 2015, anno di gestione della vasca). Ad un'analisi di dettaglio, alcuni cogeneri mostrano valori più alti nelle stazioni interne al porto e in quelle prospicienti le dighe foranee, probabilmente per condizioni idrodinamiche particolari.

Nell'ultimo anno di monitoraggio i valori osservati risultano comunque bassi, anche rispetto a livelli tipici per sedimenti di ambienti portuali, sia per quanto riguarda gli idrocarburi a basso peso molecolare (che rappresentano la frazione più abbondante) sia per gli idrocarburi ad alto peso molecolare.

#### 5.1.3 Saggi biologici

La batteria dei saggi biologici ha evidenziato una maggiore criticità delle prove a lungo termine o subletali (embriotossicità con riccio di mare) rispetto alle altre (effetti su batteri ed alghe). Queste ultime

infatti evidenziano una lieve tossicità solo negli anni di esercizio e limitatamente ad alcune stazioni (in particolare in alcune interne e in quelle a ridosso delle dighe foranee), mentre le prove di embriotossicità evidenziano una situazione piuttosto critica e generalizzata nei primi anni e con un evidente miglioramento nell'ultimo anno di monitoraggio, in cui tutti i campioni sono risultati privi di tossicità.

## **5.2 Colonna d'acqua**

### **5.2.1 MW (metalli, IPA e biomarkers)**

I dati ottenuti nell'ultimo anno di monitoraggio indagato (2017) indicano che nel complesso delle stazioni non si sono verificati fenomeni di bioaccumulo statisticamente rilevanti, con l'eccezione di alcune stazioni interne (in particolare Ve8 e DP) e di quella a ridosso della diga foranea esterna al porto (Vn1), con una maggiore evidenza per metalli quali Cr, Ni e Pb. Rispetto quindi ai valori riscontrati nei sedimenti, sembra che i fenomeni di bioaccumulo osservati, oltre a confermare la criticità nella colonna d'acqua per il Ni, evidenzino una qualche criticità anche per Cr e Pb, mettendo in risalto una minore biodisponibilità del Cu.

Le analisi dei livelli di idrocarburi policiclici aromatici nei tessuti dei mitili recuperati nel giugno 2017 hanno evidenziato dei fenomeni di bioaccumulo in tutti gli organismi trapiantati nelle diverse aree indagate rispetto agli organismi di riferimento (T0), questi ultimi provenienti dagli allevamenti del Golfo di La Spezia. Tale fenomeno evidenzia, a differenza dei sedimenti, una qualche criticità di queste sostanze nella colonna d'acqua dell'area indagata.

Una valutazione integrata (WOE) sulle tre linee di evidenza (IPA nei sedimenti, IPA nei mitili e biomarkers) è riportata nell'**Allegato 3**.

### **5.2.2 Saggi sulle acque della colonna (in laboratorio ed *in situ*)**

La batteria di saggi condotta sui campioni della colonna d'acqua analizzati in laboratorio non ha evidenziato alcuna tossicità nei diversi anni indagati e nelle differenti stazioni.

Nel corso del monitoraggio durante la fase di gestione della vasca di colmata, i saggi con *P. lividus* condotti *in situ* hanno rilevato, a fronte di alcune eccezioni, una tossicità costante seppure in attenuazione nel corso degli anni per la stazione più interna al porto e in corrispondenza dell'uscita delle acque di sfioro della vasca (DP).

### **5.2.3 Biocenosi bentoniche**

La conformazione della costa e soprattutto le influenze naturali ed antropiche sull'area determinano una elevata variabilità delle condizioni idrologiche e chimico fisiche delle acque e nella composizione sedimentologica dei fondali. Il sedimento superficiale ha una naturale prevalenza di sabbia fine e una

presenza variabile di sedimento fangoso proveniente dal vicino porto e soprattutto dal canale dello scolmatore. Queste condizioni permettono l'instaurarsi di un popolamento parzialmente stabile (biocenosi SFBC) a cui si accompagnano specie opportuniste adattate ad ambienti instabili e che determinano una certa variabilità nella composizione specifica e nelle abbondanze. È, in sintesi, un popolamento in grado di reagire a variazioni, anche estreme, delle condizioni ambientali. Durante i cinque anni di monitoraggio, non si evidenziano particolari modifiche nella composizione specifica e biocenotica del popolamento presente nell'area e quindi non si rilevano variazioni imputabili alla realizzazione o alla presenza delle due vasche di colmata. Eventuali influenze di queste opere portuali sulla composizione del popolamento bentonico potrebbero essere state mascherate dalla normale variabilità dell'intera area, tuttavia anche il confronto tra le stazioni vicine alle vasche e quella di controllo posta più a nord, non ha mai rilevato differenze significative. Tali effetti dunque, se eventualmente presenti, non sono mai risultati superiori a quelle che normalmente determinano variazioni nella composizione qualitativa e quantitativa dei popolamenti bentonici locali.

### **5.3 Considerazioni conclusive generali**

Dal confronto dei risultati per i diversi comparti ambientali nei differenti anni di indagine, si osserva un peggioramento delle condizioni ambientali per i siti interni del porto (quelli principalmente coinvolti dalle attività di sversamento delle acque di efflusso dalla vasca) e talvolta per le stazioni a ridosso delle dighe foranee (probabilmente per un particolare idrodinamismo delle acque).

La situazione sembra in parte rientrare per l'anno di indagine 2017 (ultimo anno considerato in questo piano di monitoraggio), per il quale, tramite una valutazione integrata (WOE), è stato ottenuto un livello di pericolo "Basso" per tutti i siti di indagine (considerando le linee di evidenza "IPA nei sedimenti", "IPA nei mitili" e "biomarkers nei mitili"), con livelli non critici dei metalli in tracce nei sedimenti e nei mitili dell'area, ed effetti praticamente assenti riguardo le prove ecotossicologiche sui sedimenti e sulle acque della colonna. Le variazioni fisiche, chimiche ed ecotossicologiche non sembrano inoltre avere un effetto significativo sulle biocenosi bentoniche indagate.

## 6. BIBLIOGRAFIA CITATA E/O DI CONSULTAZIONE

- AA.VV. (2001). Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003). A.M. Cicero & I. Di Girolamo (Eds), Ministero Ambiente e Territorio – ICRAM.
- Aizdaicher NA, Malynova SI, Khristoforova NK (1999) Effect of Detergents on Microalgal Growth. *Russ J Mar Biol* 25(3): 234-238
- Andersen HR, Wollenberger L, Halling-Sørensen B, Kusk KO (2001). Development of copepod nauplii to copepodites – a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (12), 2821–2829.
- APAT IRSA-CNR (2003) Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida, 29/2003, Vol. Terzo. Metodo 8060: 1043-1049.
- ARPAT (1998) Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico: 191 pp.
- ASTM (1995). Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos- E 1563-95. pp. 1029-1046. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 1029-1046.
- ASTM (2004). Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos- E 1563-98. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Azur Environmental (1995a). Microtox<sup>®</sup> Acute Toxicity Comparison & Inhibition Test, 30 pp.
- Azur Environmental (1995b). Microtox<sup>®</sup> Acute Toxicity Solid-Phase Test, 20 pp.
- Bigongiari N., Braida T., Pasteris A. (2001). Saggio biologico con l'anfipode *Corophium orientale*: metodiche ed esempi di applicazione ai sedimenti marini. *Biol. Mar. Medit.*, 8(2): 60-71.
- Dinnel PA, Link JM, Stober QJ (1987). Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Arch Environ Contam Toxicol* 1987;16:23–32. doi:10.1007/ BF01055356.
- Dos Santos MM, Moreno-Garrido I, Gonsalves F (2002) An in situ bioassay for estuarine environments using the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Envir Toxicol Chem* 21: 567-574.
- Clementson L. A. and Wayte S. E. (1992). The effects of frozen storage of open-ocean seawater sample on the concentration of dissolved Phosphate and Nitrate. *Wat. Res.* 26 (9), 1171-1176.
- Clarke K.R., Warwick R.M. (1994). Similarity-based testing for community pattern: the 2-way layout with no replication. *Mar. Biol.*, 118: 167-176.

Environment Canada (1992). Biological test method: fertilization assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars). Environmental Protection Series. EPS 1/RM/27, Ottawa, Canada.

Finney L. (1971). Probit Analysis. Cambridge University Press, London, UK.

Fowler J.E., Cohen L. (1993). Statistica per ornitologi e naturalisti. Franco Muzzio Editore, Padova, pp. 240.

Giuliani S., Ennas C., Pellegrini D., Kozinkova L. (2004) The bioassay with sea urchin *Paracentrotus lividus*: different end-points to be applied to different environmental studies. *Fres Environ Bull* 11(10): 806–809.

Giuliani S., Lera S., Kozinkova L., De Ranieri S., Pellegrini D. (2004) Sensibilità del saggio di fecondazione con gameti di *Paracentrotus lividus* (Lamarck) al variare di alcune condizioni sperimentali. *Biol Mar Medit* 11(2): 330–333.

Gorbi G., Invidia M., Savorelli F., Faraponova O., Giacco E., Cigar M., Buttino I., Leoni T., Prato E., Lacchetti I., Sei S. (2012) Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.* 31(9), 2023-2028.

Hamilton M. A., Russo R. C., Thurston R. V. (1978). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 12, 714-720.

ICRAM-APAT (2007). Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini. (consultabile sul web all'indirizzo [www.isprambiente.it](http://www.isprambiente.it))

ICRAM (2002). Aspetti tecnico-scientifici per la salvaguardia ambientale nelle attività di movimentazione dei fondali marini: dragaggi portuali. Quaderno ICRAM n.1:201 pp.

IRSA (1978) Metodologia di saggio algale per lo studio della contaminazione delle acque marine. IRSA-CNR, Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque n. 39 - IT ISSN 0390-6329. Milano

ISO International Organization for Standardization (1999). Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). Draft International Standard ISO/DIS 14669, ISO, Genève, Switzerland.

ISO (2006). Water quality: determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – part 3: method using freeze-dried bacteria. ISO/CD 11348-3.

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

ISO (2005). Water Quality: Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediments to amphipods". ISO method 16712.

ISO International Organization for Standardization (2015). Water quality - Calanoid copepod early-life stage test with *Acartia tonsa*. Draft 16778, ISO, Genève, Switzerland.

Khristoforova NK, Zhuravel EV, Nedorostkova IG (2001) Contents of detergents and phenols in the surface water near the Tumen River Mouth and Adjacent Areas of Peter the Great Bay. In: Kasyanov VL, Vaschenko MA, Pytruk DL (eds) The State of Environment and Biota of the Southwestern Part of Peter the Great Bay and the Tumen River Mouth, v. 2. Dalnauka, Vladivostok, pp 108-121.

Krainykova AN (1988) Biotesting in the water preservation from pollution. In: The Methods of Water Biotesting. Tscernogolovka, pp 4-21 (In Russian).

Lee W. (1977), Some laboratory cultured crustaceans for marine pollution studies. Mar. Pollut. Bull. 8, 258-259.

Lewis MA (1995) Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. Envir Pollut 87:319-336.

Lindley J.A., Donkin P., Evans S.V., George C.L., Uil K.F (1999). Effects of two organochlorine compounds on hatching and viability of calanoid copepod eggs. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 242(1), 59-74.

Minelli A., Ruffo S., La Posta S. (Eds.) (1995). Checklist delle specie della fauna italiana. Calderini, Bologna.

Morelli E, Marangi ML, Fantozzi L (2009) A phytochelatinbased bioassay in marine diatoms useful for the assessment of bioavailability of heavy metals released by polluted sediments. Environ Int 35:532-538

Moreno-Garrido I, Lubian LM, Blasco J (2007) Sediment toxicity tests involving immobilized microalgae (*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin). Envir Int 33:481-495

Morrone L., Giuliani S., Pellegrini D., Sartori D (2018) In situ embryo toxicity test with sea urchin: Development of exposure chamber for test execution. Chemosphere. 196: 354–360.

Nash SMB, Quayle PA, Schreiber U, and Müller JF (2005) The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. Aquat Toxicol 72:315-326

Okay OS, Morkoc E, Gaines A (1994) Effects of two herbicidal wastewaters on *Chlorella* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*. Environ Pollut 119(84):1-6.



- Onorati F., Pellegrini D., Ausili A. (1999). Valutazione della tossicità naturale nel saggio Microtox® in fase solida: la normalizzazione pelitica. *Acqua e Aria*, 6, 83-91.
- Onorati F., Volpi, Ghirardini A. (2001). Informazioni fornite dalle diverse matrici da testare con i saggi biologici: applicabilità di *Vibrio fischeri*. *Biologia Marina Mediterranea*, 8(2), 41-59
- Onorati F., Mecozzi M. (2004). Effects of two diluents in the Microtox® toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere* 54: 679-687.
- Pèrés J.M., Picard J. (1964). Nouveau manuel de bionomie benthique de la Mer Méditerranée. *Rec. Trav. Stat. Mar. Endoume*, 31 (47): 5-137.
- Picard J. (1965). Recherches qualitatives sur les biocoenoses marines des substrats meubles dragables de la région marseillaise. *Rec. Trav. Stat. Mar. Endoume*, 36 (52): 1-160.
- Sartori D. (2013) Echinocoltura: allevamento di *Paracentrotus lividus* a circuito chiuso. Sperimentazioni di diete artificiali per la maturazione sessuale. Ph. D. Thesis, Università degli Studi di Napoli « Federico II », 77pp.
- Sartori D., Gaion A., 2015. Can sea urchins benefit from an artificial diet? Physiological and histological assessment for echinoculture feasibility Evaluation. *Aquac. Nutr.* <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12326>.
- Sartori D., Scuderi A., Sansone G., Gaion A. (2015) Echinoculture: the rearing of *Paracentrotus lividus* in a recirculating aquaculture system—experiments of artificial diets for the maintenance of sexual maturation. *Aquacult Int* 23:111-125.
- Sartori D., Pellegrini D., Macchia S., Gaion A. (2016) Can echinoculture be a feasible and effective activity? Analysis of fast reliable breeding conditions to promote gonadal growth and sexual maturation in *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 451:39-46.
- Sartori, D., Pellegrini, D., Gaion, A. (2016). Analysis of variability in Embryological response of two sea urchin species to spatial and temporal features-can these factors influence responses in standardized Ecotoxicological assays? *Expert Opin. Environ. Biol.* <https://doi.org/10.4172/2325-9655.S1-002.S1>.
- Sartori, D., Macchia, S., Vitiello, V., Morroni, L., Onorati, F., Pellegrini, D. (2017). Quaderni – Ricerca Marina n. 11/2017. ISPRA. A cura di Macchia, S., Sartori, D., Roma, pp 60.
- USACE 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal. Testing Manual USEPA-503-8-90/002: 219 pp.
- USEPA (1978). Marine Algal Assay Procedure Bottle Test. National Environmental Research Center, USEPA Corvallis, 43 pp.

USEPA (1988). Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms, Report No. 600/4-87/028. US EPA Cincinnati.

USEPA (1991). Early-Standard Operating Procedure Conducting the Sea Urchin *Arbacia punctulata* Fertilization Test. Environmental Research Laboratory, Narragansett, RI, pp 125-131.

USEPA (1994). Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Marine and Estuarine Organism. 600-4-91-003, Cincinnati, Ohio.

USEPA. Chapman, G.A., Denton, D.L., & Lazorchak, J.M. (1995). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to West Coast marine and estuarine organisms. US. EPA, 600/R-95/136, Cincinnati, Ohio.

Volpi Ghirardini, A., Arizzi Novelli, A., Tagliapietra, D., 2005. Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Environ. Int.* 31, 1065–1077.

Wollenberger L., Breitholtz M., Kusk K.O., Bengtsson B-E (2003). Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Sci. Total Environ.* 305, 53–64.

Wollenberger, L., Breitholtz M., Kusk K.O. (2006). A new sediment toxicity test with the marine copepod *Acartia tonsa*, MO1/KL/P51. Controversies and solutions in environmental sciences: SETAC Europe 16th annual meeting, The Hague, The Netherlands, 7-11 May 2006.

Zhang J., Wu C., Pellegrini D., Romano G., Esposito F., Ianora A., Buttino I. (2013). Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apoptosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture* 400-401, 65-72.

Zhuravel E, Markina Z, Aizdaicher N (2009) Growth and Physiological State of the Microalgae *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin (Bacillariophyta) in the Water taken from Peter the Great Bay. *Ocean Sci. J.* 44(3):173-179



**ISPRA**  
Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



# **ALLEGATO 1**

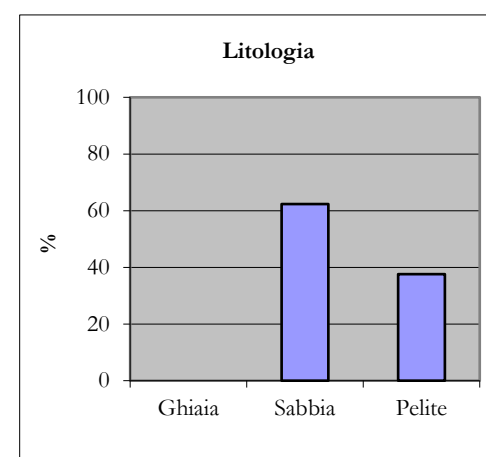
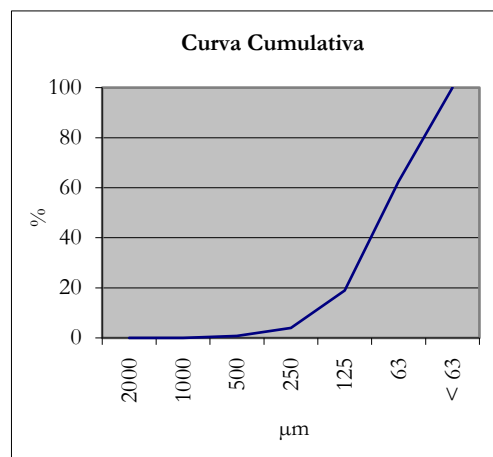
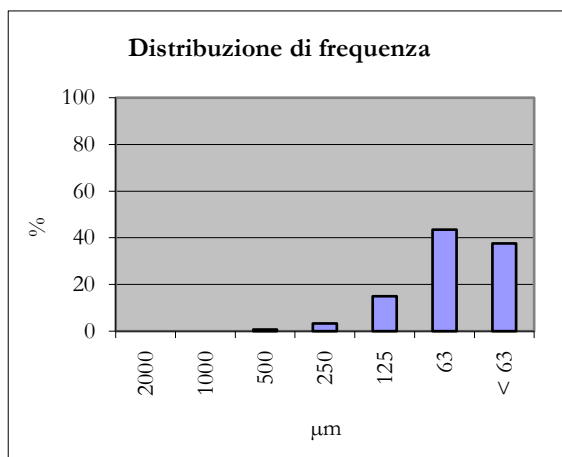
## **Schede granulometriche**

## MONITORAGGIO IN CORSO D'OPERA MAGGIO 2017

Ve1

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	0,00	0,00
1000	0,00	0,00
500	0,76	0,76
250	3,28	4,04
125	14,90	18,94
63	43,43	62,37
< 63	37,63	100,00

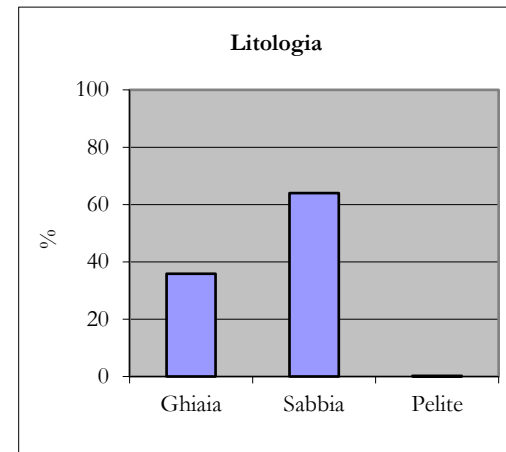
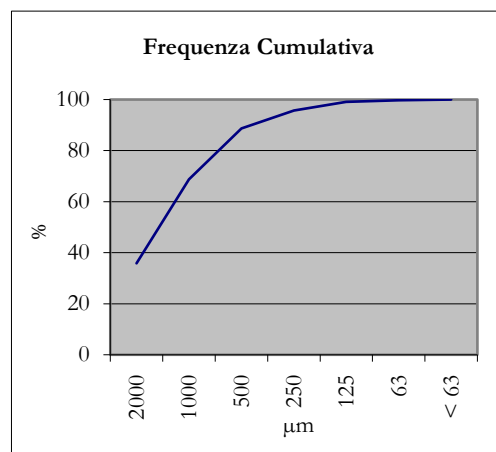
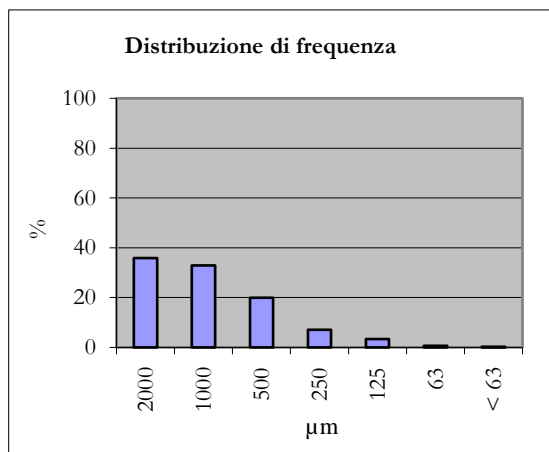
Litologia (%)	
Ghiaia	0,00
Sabbia	62,37
Pelite	37,63



**Ve4**

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	35,83	35,83
1000	32,88	68,71
500	19,95	88,66
250	7,03	95,69
125	3,40	99,09
63	0,68	99,77
< 63	0,23	100,00

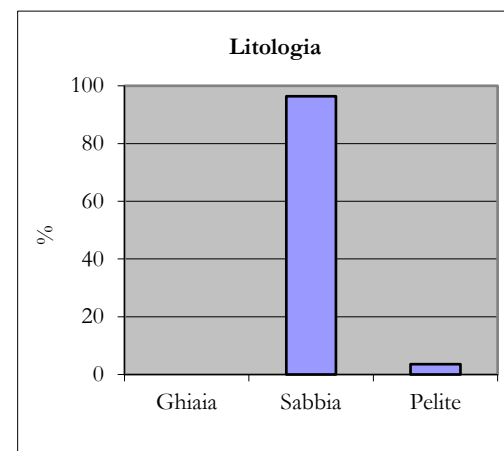
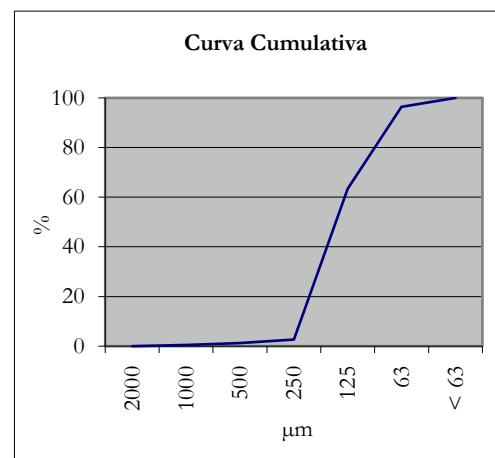
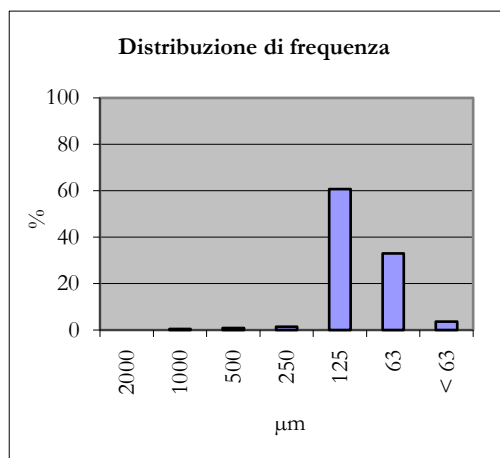
Litologia (%)	
Ghiaia	35,83
Sabbia	63,95
Pelite	0,23
100,00	



**Ve5**

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	0,00	0,00
1000	0,42	0,42
500	0,84	1,26
250	1,47	2,73
125	60,71	63,45
63	32,98	96,43
< 63	3,57	100,00

Litologia (%)	
Ghiaia	0,00
Sabbia	96,43
Pelite	3,57

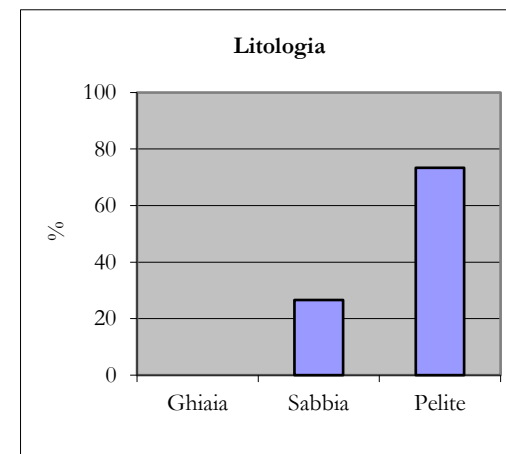
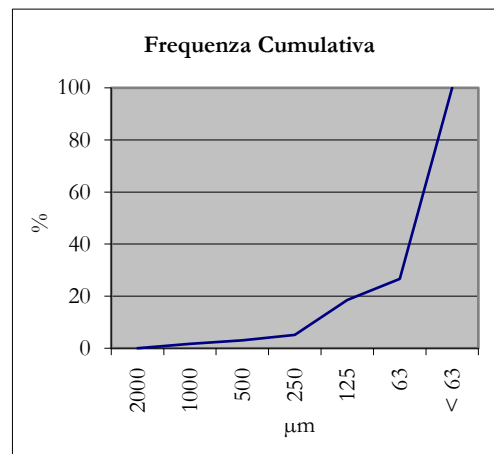
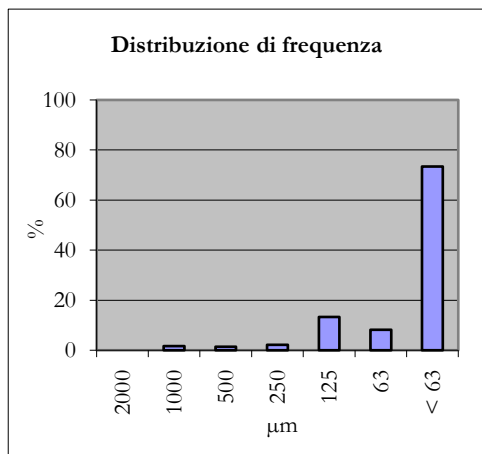




**Ve7**

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	0,00	0,00
1000	1,63	1,63
500	1,36	2,99
250	2,17	5,16
125	13,32	18,48
63	8,15	26,63
< 63	73,37	100,00

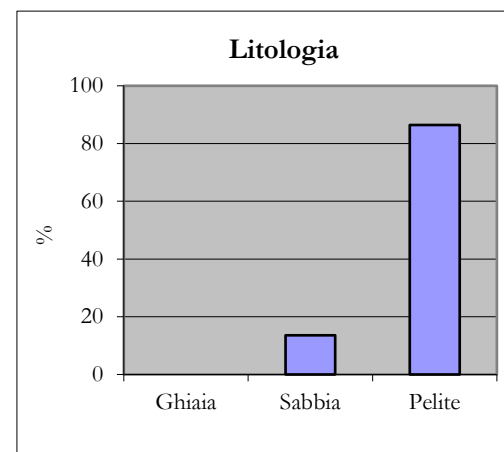
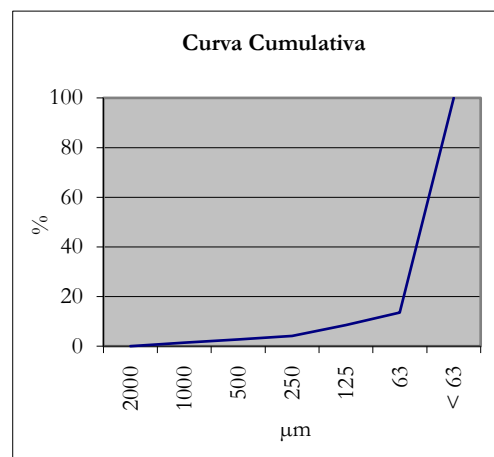
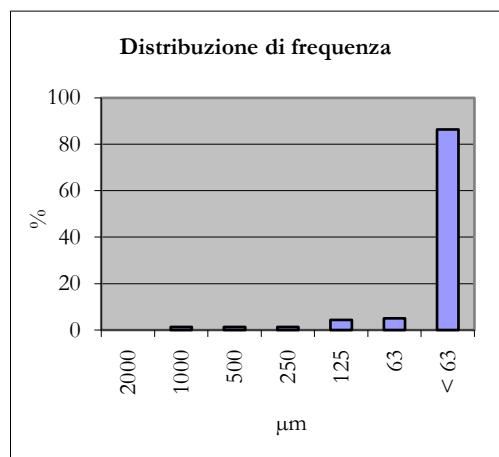
Litologia (%)	
Ghiaia	0,00
Sabbia	26,63
Pelite	73,37



Ve8

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	0,00	0,00
1000	1,36	1,36
500	1,36	2,71
250	1,36	4,07
125	4,41	8,47
63	5,08	13,56
< 63	86,44	100,00

Litologia (%)	
Ghiaia	0,00
Sabbia	13,56
Pelite	86,44



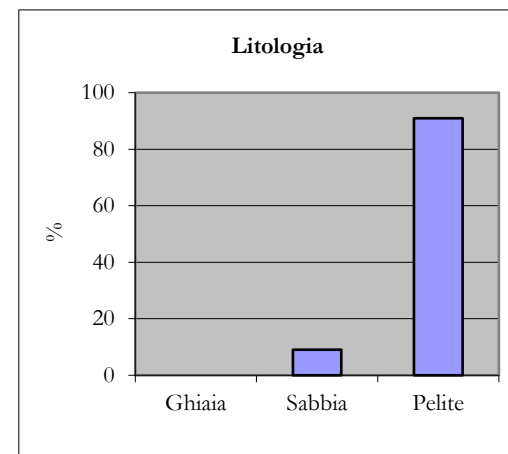
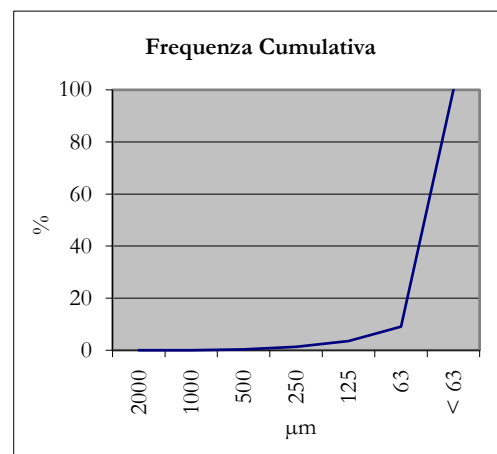
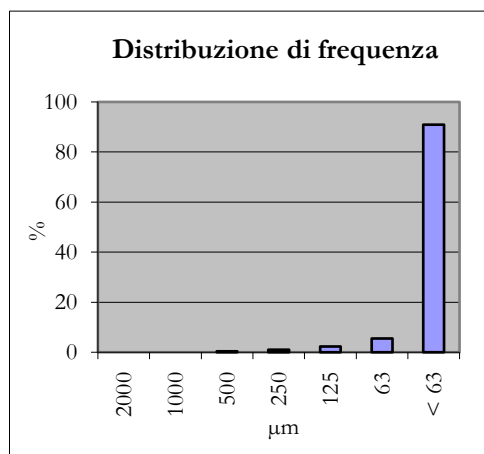




**DP**

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	0,00	0,00
1000	0,00	0,00
500	0,32	0,32
250	0,97	1,29
125	2,26	3,55
63	5,48	9,03
< 63	90,97	100,00

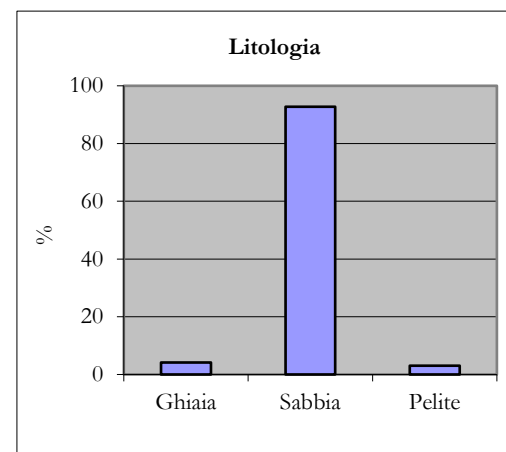
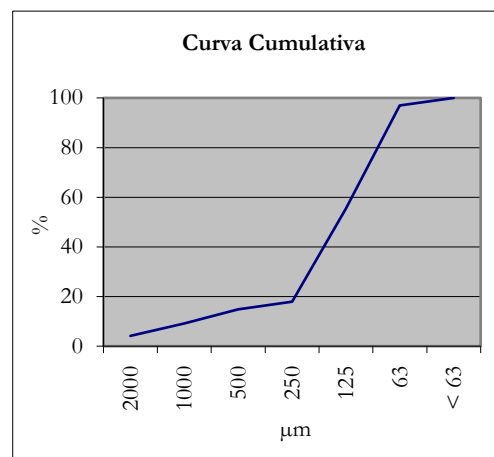
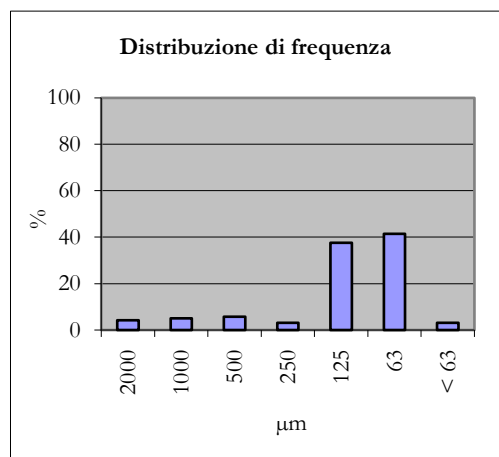
Litologia (%)	
Ghiaia	0,00
Sabbia	9,03
Pelite	90,97



Vn1

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	4,15	4,15
1000	5,02	9,17
500	5,68	14,85
250	3,06	17,90
125	37,55	55,46
63	41,48	96,94
< 63	3,06	100,00

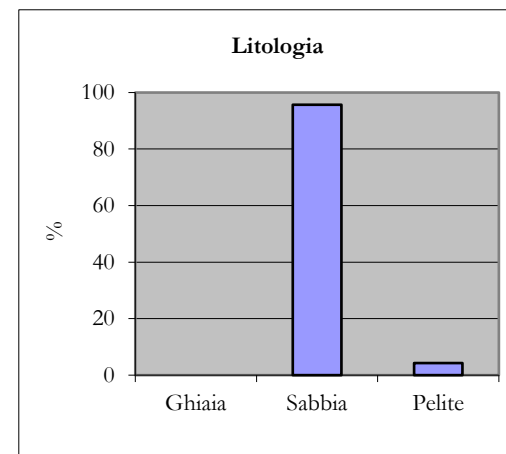
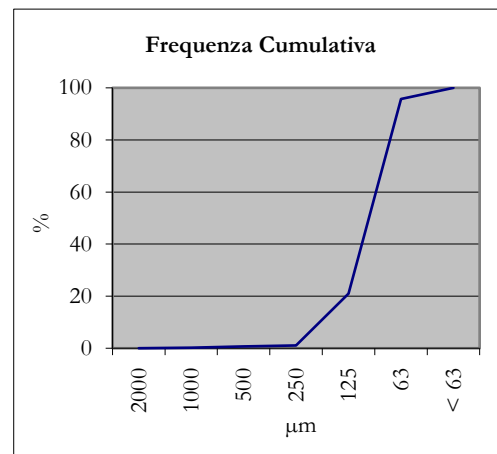
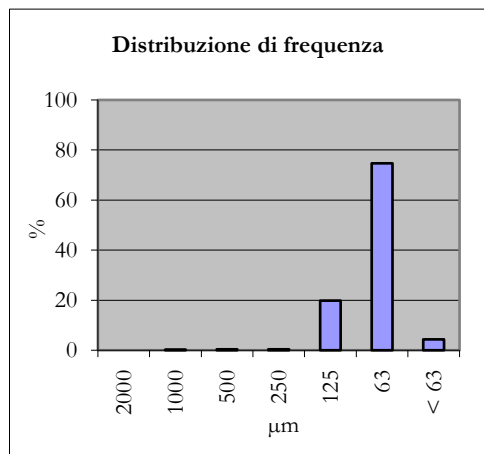
Litologia (%)	
Ghiaia	4,15
Sabbia	92,79
Pelite	3,06



Vn2

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	0,00	0,00
1000	0,22	0,22
500	0,43	0,65
250	0,43	1,08
125	19,87	20,95
63	74,73	95,68
< 63	4,32	100,00

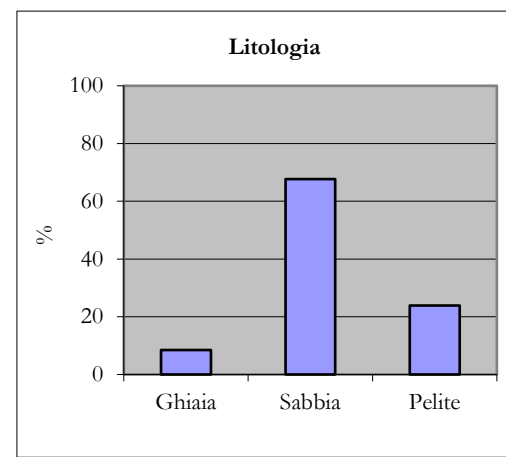
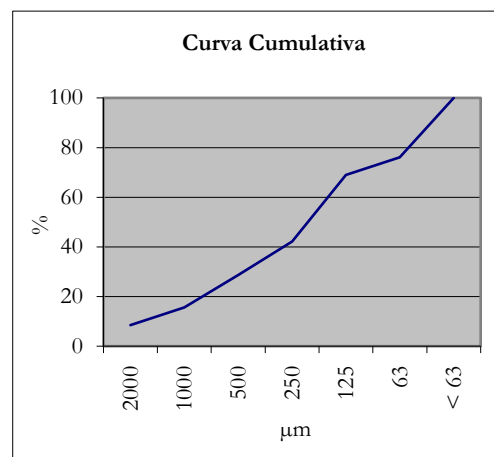
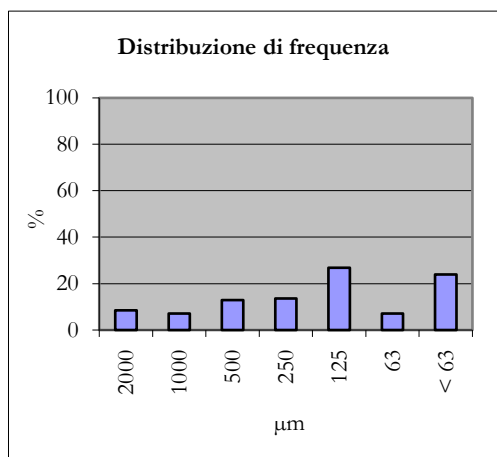
Litologia (%)	
Ghiaia	0,00
Sabbia	95,68
Pelite	4,32



Vn3

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	8,48	8,48
1000	7,14	15,63
500	12,95	28,57
250	13,62	42,19
125	26,79	68,97
63	7,14	76,12
< 63	23,88	100,00

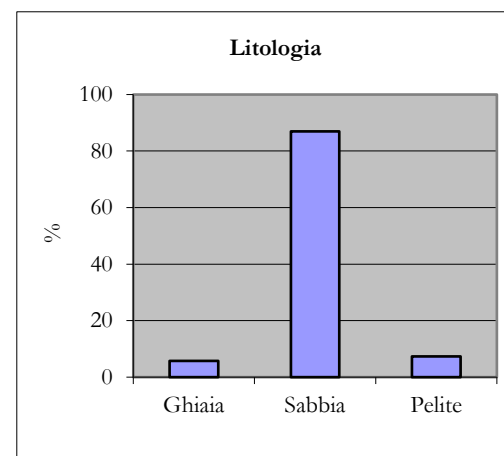
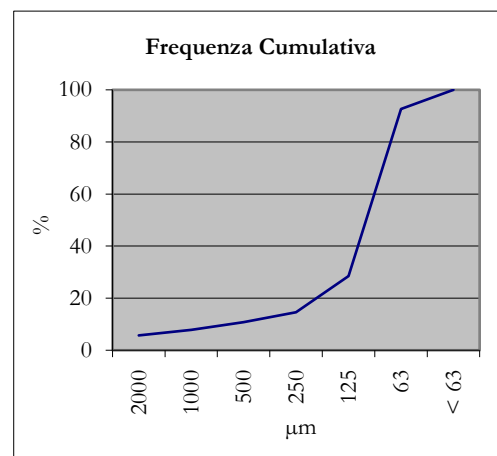
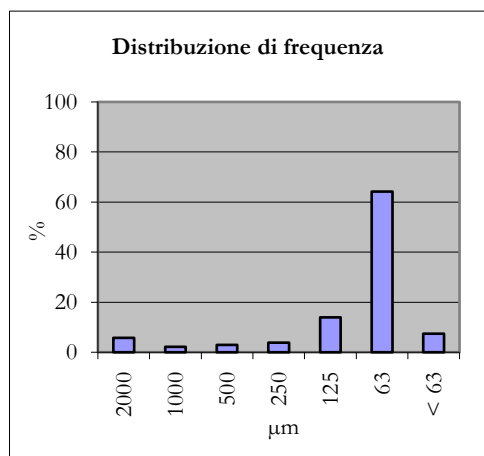
Litologia (%)	
Ghiaia	8,48
Sabbia	67,63
Pelite	23,88



Vn4

$\mu\text{m}$	F. Semplice %	F. Cumulata %
2000	5,70	5,70
1000	2,11	7,81
500	2,95	10,76
250	3,80	14,56
125	13,92	28,48
63	64,14	92,62
< 63	7,38	100,00

Litologia (%)	
Ghiaia	5,70
Sabbia	86,92
Pelite	7,38



## **ALLEGATO 2**

**Documentazione fotografica effettuata durante le  
operazioni di campionamento delle acque di sfioro**

## Campionamento del 06/12/17



Particolare del canale di raccolta delle acque provenienti dalla seconda vasca di colmata nel punto di sversamento nel bacino di decantazione prima dello sfioro nella Darsena Petroli



Panne posizionate nella Darsena Petroli all'uscita dello Sfiore



Uscita delle acque di sfioro dalla Darsena Petroli

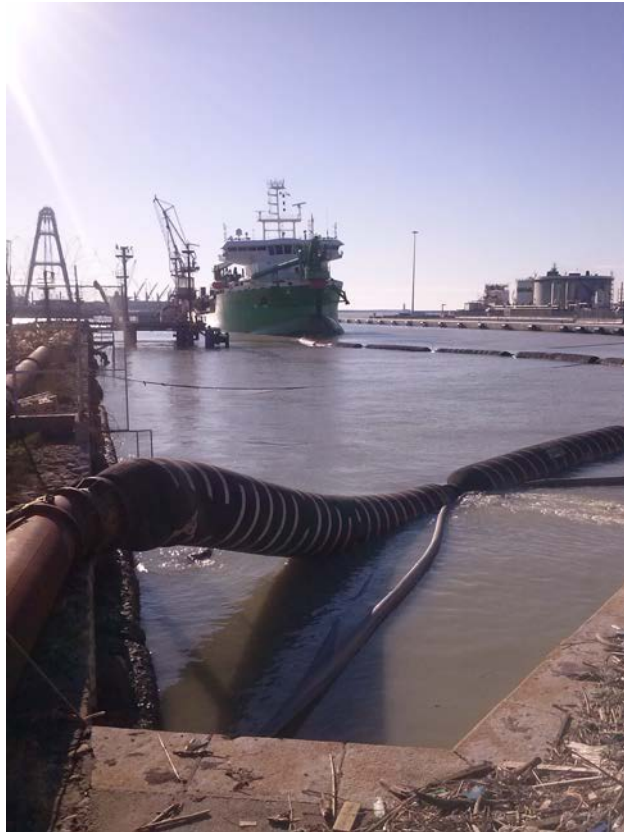


Dettaglio delle panne: l'acqua in uscita dalla vasca trovata un varco nel punto in cui la tubatura con cui viene trasferito il materiale dragato incontra le panne.





## Campionamento del 20/12/17



Doppia fila di panne posizionate nella Darsena Petroli



Uscita delle acque di sfioro dalla Darsena Petroli

## **ALLEGATO 3**

**Bioaccumulo di IPA e analisi delle risposte biologiche nei mitili**

**A cura dell'Università Politecnica delle Marche – Dipartimento delle Scienze e della Vita**

## **1. INTRODUZIONE**

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1. CAMPIONAMENTI DI SEDIMENTI E TRASLOCAZIONE DEI MITILI**

### **2.2. ANALISI CHIMICHE**

### **2.3. ANALISI DELLE RISPOSTE ECOTOSSICOLOGICHE (BIOMARKERS)**

### **2.4. ANALISI STATISTICA**

### **2.5. ELABORAZIONE DEI DATI NEL MODELLO DI ANALISI DI RISCHIO Sediqualsoft**

## **3. RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **3.1. ANALISI CHIMICHE DEI SEDIMENTI**

### **3.2. ANALISI CHIMICHE NEI TESSUTI DEI MITILI**

### **3.3. ANALISI DEI BIOMARKERS**

### **3.4. INTEGRAZIONE WEIGHT OF EVIDENCE (WOE)**

## **4. BIBLIOGRAFIA**

## 1. INTRODUZIONE

Nella presente relazione vengono riportati i risultati delle attività di monitoraggio relative all'anno di indagine 2017. Oltre alle analisi degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) misurati nei sedimenti dell'area portuale nel maggio 2017 (riportate al Paragrafo 4.1.3), le indagini hanno previsto anche la traslocazione dei mitili su cui sono state eseguite le analisi chimiche del bioaccumulo degli IPA, nonché un'ampia batteria di risposte biologiche (biomarker) analizzate a livello biochimico e cellulare. Nella presente relazione vengono quindi presentati i risultati relativi ai livelli di bioaccumulo degli IPA e analisi dei biomarker nei mitili traslocati a maggio-giugno 2017.

Dal 1997 ad oggi il porto di Livorno è stato interessato da numerose attività di dragaggio. La quantità di sedimenti rimossi nel solo triennio 1997-2000 ammontava a circa 1.800.000 m<sup>3</sup> e la relativa gestione aveva previsto la loro deposizione a mare, a circa 14 miglia dalla costa. Il monitoraggio di tali attività aveva permesso di ottenere importanti informazioni sugli effetti provocati all'ambiente costiero circostante, indirizzando le successive scelte gestionali verso opzioni a minor impatto ambientale come la deposizione in ambienti confinati (Regoli et al., 2002; Pioppi et al., 2008). A partire dal 2005 sono stati avviati i lavori per la realizzazione della I vasca di colmata all'interno dell'area portuale di Livorno, situata sul lato esterno della Darsena Toscana e successivamente a partire dal 2012 si è proceduto alla realizzazione di una seconda vasca, di volume utile pari alla precedente. Nell'ambito della realizzazione di questa seconda vasca di colmata è stato predisposto un piano di monitoraggio delle attività di dragaggio e conferimento dei sedimenti portuali all'interno della vasca stessa, con attività di campionamenti a partire dal 2012 (fase *Ante Operam*) e che sono proseguiti annualmente fino al luglio 2017.

L'interesse rivolto alla movimentazione dei sedimenti marini in ambiente portuale è giustificato dal ruolo centrale che questa matrice ricopre nei processi di deposizione, accumulo e trasporto di contaminanti. Le aree portuali rappresentano ambienti di grande importanza per l'interazione tra interessi economici, problematiche connesse alla movimentazione dei sedimenti e al necessario controllo dell'impatto ambientale causato da queste attività. I rischi legati alla diffusione dei contaminanti e alla tutela della salute umana possono essere ponderati attraverso adeguate attività di monitoraggio ambientale e numerose esperienze condotte a livello internazionale hanno chiaramente dimostrato come la strategia ottimale per raggiungere tali obiettivi sia costituita da un approccio multidisciplinare, che integri metodi e informazioni ottenuti da differenti approcci scientifici (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012; Regoli et al., 2014; Decreto Ministeriale Ambiente n. 173 del 15 Luglio 2016).

Se da un lato l'analisi chimica dei sedimenti rappresenta un aspetto fondamentale per la caratterizzazione dei contaminanti presenti nell'area di studio, dall'altro sono certamente numerosi i vantaggi che si ottengono da indagini di tipo biologico, per definire il grado di biodisponibilità dei contaminanti e per evidenziare il conseguente effetto biologico causato da tali sostanze. L'approccio integrato fornisce dunque risultati di grande importanza perché rappresenta una visione più ampia e completa delle problematiche e dei rischi determinati dall'inquinamento ambientale, con informazioni di tipo chimico sulla presenza di sostanze contaminanti, sulla loro biodisponibilità per gli organismi, e sull'effetto e le alterazioni biologiche che queste sostanze possono produrre.

In quest'ottica, i dragaggi all'interno delle aree portuali assumono una valenza particolare; si tratta infatti di ambienti complessi, caratterizzati da un'elevata eterogeneità sia geografica che temporale e dalla presenza di miscele complesse di contaminanti i cui potenziali effetti biologici non sono facilmente prevedibili solo sulla base di una caratterizzazione chimica. Le condizioni fisiche dei porti, come scarso idrodinamismo e limitato ricambio di acqua, contribuiscono ad accrescere la persistenza degli inquinanti nei sedimenti, con il potenziale rischio di trasferimento di queste sostanze agli organismi. Il processo di sedimentazione infatti, pur rimuovendo tali sostanze dalla colonna d'acqua e riducendo l'esposizione per molte specie marine, determina la costituzione di importanti depositi di inquinanti, che possono essere risospesi in seguito a operazioni di scavo o dragaggio dell'area portuale: si comprende quindi come sia importante monitorare accuratamente tali attività (Frenzilli et al., 2004; Regoli et al., 2004; Bocchetti et al., 2008).

La gestione di queste operazioni, ha previsto specifici programmi di monitoraggio nei siti di movimentazione dei sedimenti e nel sito di realizzazione della vasca di colmata, attraverso l'integrazione di indagini chimiche, analisi delle comunità bentoniche, test di tossicità ed un approccio di tipo ecotossicologico, con l'utilizzo di mitili, *Mytilus galloprovincialis*, come bioindicatori. Tali organismi infatti sono in grado di accumulare numerose classi di contaminanti e sono ampiamente utilizzati nei programmi di monitoraggio (Mussel Watch), che prevedono oltre alla valutazione della biodisponibilità anche l'analisi di numerose risposte biologiche, o biomarker, estremamente sensibili nell'evidenziare precocemente i primi effetti molecolari e cellulari, o l'insorgenza di una condizione di tossicità per gli organismi. L'analisi dei biomarker fornisce dunque importanti indicazioni sullo stato di salute, contribuendo a delineare meglio l'impatto biologico delle attività antropiche, ed il potenziale rischio ambientale legato alla presenza o al rilascio di sostanze inquinanti.

Il monitoraggio dell'anno 2017 rappresenta la fase conclusiva dell'ampio piano di indagine delle attività connesse alla realizzazione e gestione della seconda vasca di colmata nel porto di Livorno: per questo motivo nella parte conclusiva di questa relazione verranno presentati i risultati ottenuti dall'analisi di rischio dal 2012 ad oggi ottenuta integrando i risultati della chimica dei sedimenti con quelli del bioaccumulo nei tessuti dei mitili traslocati e le risposte biologiche analizzate a livello cellulare e biochimico. Questo piano di monitoraggio così strutturato rappresenta quindi la prima applicazione di un approccio multidisciplinare basato su criteri di integrazione ponderata per l'analisi di rischio applicata alla movimentazione di sedimenti di dragaggi portuali, valutato in tutte le diverse fasi dello svolgimento dell'attività.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1. CAMPIONAMENTI DI SEDIMENTI E TRASLOCAZIONE DEI MITILI**

Nella figura 1 vengono indicati tutti i siti di campionamento dei sedimenti e di traslocazione dei mitili identificati all'interno dell'area portuale; per l'anno di indagine del 2017 era previsto un piano di campionamento secondo le modalità che vengono di seguito descritte.

Campioni di sedimento sono stati prelevati in data 16 maggio 2017 dalle seguenti stazioni: VN4, VN3, VN2, VE5, VE4, VE7, VE8, DP, VN1 e VE1.

L'indagine di monitoraggio è stata effettuata anche tramite la tecnica di traslocazione di mitili *M. galloprovincialis* (Mussel Watch). Gli organismi sono stati raccolti da una popolazione proveniente da un sito di allevamento e immediatamente traslocati per un periodo di 4-5 settimane nelle aree da monitorare. Il trapianto è stato effettuato mantenendo gli organismi in reti di nylon o strutture plastiche fissate nella stazione da monitorare, ad una profondità compresa tra 1 e 5 m e ad almeno un metro dal fondo.

La campagna di traslocazione dei mitili è stata effettuata a giugno 2017 (organismi traslocati a maggio e recuperati il 5 giugno 2017). Al termine del periodo di traslocazione i mitili sono stati recuperati, mantenuti a circa 4°C in ambiente umido, fino ad un massimo di 24 ore, poi rapidamente dissezionati per le successive analisi.

L'attività di Mussel Watch ha quindi nel complesso previsto le seguenti indagini:

-analisi di bioaccumulo nei mitili traslocati a giugno 2017 nei siti VN4, VN3, VN2, VE5, VE4, VE7, VE8, DP, VN1 nei mitili prelevati dall'area di riferimento a maggio 2017 all'inizio dell'attività di traslocazione, T0(1) e T0(2).

-analisi delle risposte ecotossicologiche (biomarker) nei mitili traslocati a giugno 2017; in questo caso gli organismi provenienti da siti di traslocazione vicini sono stati accorpati secondo il seguente schema:

VN4 (sito a nord esterno al porto)

VN2 + VN3 (siti prospicienti la II vasca di colmata)

VE4 + VE5 (siti prospicienti la I vasca di colmata)

VE7 + VE8 + DP (siti interno porto)

I mitili traslocati a maggio nel sito VE1 non sono stati ritrovati al momento del recupero (giugno 2017), mentre quelli traslocati nel sito VN1 sono stati rinvenuti ma in quantità ridotta, tale da non permettere l'esecuzione delle analisi dei biomarkers.

Per le analisi chimiche, i sedimenti sono stati rapidamente congelati a -20°C; i mitili sono stati dissezionati e le intere parti molli di 30 organismi, suddivise in 3 pool ciascuno costituito dai tessuti di 10 organismi, congelate e mantenute a -20°C fino al momento delle analisi. Per le analisi dei biomarker, subito dopo il recupero, sono state dissezionate le ghiandole digestive di 30 organismi, suddivise in 10 pool ciascuno costituito dai tessuti di 3 organismi, congelate in azoto liquido e successivamente mantenute a -80°C fino al momento delle analisi. Infine sono stati preparati 5 pool di emolinfa, ciascuno costituito dai fluidi di 3 organismi, in parte congelati in azoto liquido e conservati a -80°C per la determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi e in parte immediatamente processati per la stabilità delle membrane lisosomiali, l'analisi della frequenza dei micronuclei e la stima delle rotture sui filamenti di DNA.



Figura 1. Siti di campionamento dei sedimenti e di traslocazione dei mitili all'interno dell'area portuale di Livorno.

## 2.2. ANALISI CHIMICHE

La determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei sedimenti e nei tessuti degli organismi è stata effettuata secondo metodiche precedentemente descritte (Bocchetti et al., 2008), utilizzando un'aliquota decongelata, omogenea di campione, pari a circa 2-3 g. Al momento della preparazione i tessuti sono stati addizionati con 5 ml di una soluzione di KOH 0.5 M in metanolo puro per HPLC, al fine di operare una preliminare estrazione solido-liquido dei campioni; questi sono stati quindi agitati vigorosamente ed in seguito mantenuti in movimento per una notte intera a 4 °C. Il completamento dell'estrazione solido-liquido è stato

eseguito mediante microonde a 400 W e 55 °C per 15 min (Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM). I campioni sono stati centrifugati a 1000 ×g per 5 min al fine di eliminare il residuo solido e i sovrantanti recuperati in nuovi tubi. Il volume dei campioni è stato concentrato a 0.5 mL mediante centrifuga evaporante (Speedvack, Juan), a 45 °C per 60-120 min. Infine ai campioni è stato applicato un processo di purificazione e concentrazione attraverso una cromatografia a bassa pressione con resine SPE (estrazione in fase solida) del tipo Backerbond SPE C18 (500 mg, 6 mL) condizionate con 10 mL di fase mobile (tampono KHCO<sub>3</sub> 10 mM in H<sub>2</sub>O ultrapura e metanolo al 10%) e recuperati infine con 1 mL di acetonitrile puro per HPLC. Tale purificazione è stata effettuata utilizzando il sistema automatico Gilson Aspec GX271.

Il sistema cromatografico utilizzato è costituito da una pompa HPLC per gradiente binario e coppia di detector in fluorescenza e serie di diodi (Agilent Technology Serie Infinity 1260), capace di ottenere contemporaneamente fino a 4 cromatogrammi in fluorescenza e 5 in ultravioletto, consentendo una maggiore accuratezza della determinazione di ciascun congenere ed un controllo qualitativo degli analiti su più canali. La separazione cromatografica è stata eseguita mediante equilibri di ripartizione utilizzando una colonna analitica Phenomenex Envirosep PP da 125 mm di lunghezza, 3.2 mm di diametro interno e particelle da 5 µm di diametro, munita di una pre-colonna da 20 mm di lunghezza e riempita con la stessa fase stazionaria della colonna. 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 10 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). L'accuratezza della procedura analitica e l'efficienza dell'estrazione e preparazione dei campioni è stata controllata attraverso la stima del recupero degli analiti ricercati in appropriate matrici certificate standard (SRM-NIST 2977; SRM-NIST 1944).

Gli analiti determinati mediante il metodo appena descritto possono essere classificati in IPA a basso peso molecolare (naftalene, acenaftilene, 1-metil naftalene, 2-metil naftalene, acenaftene, fluorene, fenantrene ed antracene) e IPA ad alto peso molecolare (fluorantene, pirene, benzo(a)antracene, crisene, 7,12-dimetilbenzo(a)antracene, benzo(b)fluorantrene, benzo(k)fluorantrene, benzo(a)pirene, dibenzo(a,h)antracene, benzo(g,h,i)perilene, indeno(1,2,3-cd)pirene). Le concentrazioni sono espresse in ng/g di campione (peso secco); il peso secco dei campioni è stato determinato essiccando delle aliquote degli stessi alla temperatura di circa 60°C per almeno 8 ore e determinando, per ciascun campione, il contenuto d'acqua associato.

### **2.3. ANALISI DELLE RISPOSTE ECOTOSSICOLOGICHE (BIOMARKERS)**

Nei mitili traslocati è stata analizzata un'ampia batteria di risposte biologiche a livello biochimico e cellulare (biomarkers) in grado di evidenziare precocemente la comparsa di forme di tossicità, sia acuta che cronica, ed eventuali compromissioni generali nello stato di salute degli organismi, imputabili alle sostanze potenzialmente risospese durante la movimentazione dei sedimenti. I biomarker analizzati includono:

- livelli di metallotioneine, proteine citosoliche indotte dalla esposizione ad alcuni metalli pesanti;



- proliferazione perossisomiale, biomarker specifico di esposizione a molti xenobiotici organici, valutata attraverso l'analisi dell'attività enzimatica della acil-CoA ossidasi (AOX), principale enzima coinvolto nella beta-ossidazione degli acidi grassi;
- attività dell'acetilcolinesterasi, misurata nell'emolinfa e scelta come biomarker di neurotossicità;
- analisi delle difese antiossidanti, caratterizzate come sistemi enzimatici e scavenger (catalasi, glutazione S-transferasi, glutazione reduttasi, glutazione perossidasi Se-dipendenti e Se-indipendenti, glutazione);
- capacità antiossidante totale che misura l'efficienza complessiva dei tessuti di neutralizzare diverse forme di specie reattive dell'ossigeno inclusi i radicali perossilici (ROO•) e idrossilici (HO•); integra i risultati delle singole difese antiossidanti ma con un importante valore predittivo sull'insorgenza di possibili forme di tossicità ad altri livelli cellulari e di organismo;
- contenuto di malondialdeide, uno dei principali composti che si formano durante i processi di perossidazione lipidica a carico delle membrane cellulari;
- stabilità delle membrane lisosomiali (tempo di ritenzione del rosso neutro) che rappresenta un biomarker estremamente sensibile, indicativo dello stato di salute generale dell'organismo e della comparsa precoce di condizioni di stress ossidativo;
- accumulo di lipofuscina, indicativo di aumentati fenomeni di perossidazione lipidica e compromissione lisosomiale;
- accumulo di lipidi neutri insaturi, spesso associato a fenomeni di lipidosi indotta dalla esposizione a xenobiotici organici;
- grado di danneggiamento al DNA valutato attraverso il test della cometa e la frequenza di micronuclei;
- capacità di resistenza dell'organismo valutata attraverso il test di sopravvivenza in aria (stress su stress).

Di seguito vengono descritte le principali metodologie applicate per l'analisi dei biomarker (Regoli et al., 2014).

*I livelli di metallotioneine*, proteine citosoliche indotte dalla esposizione a metalli pesanti, sono stati valutati nelle ghiandole digestive omogenate (1:3 p/v) in tampone Tris-HCl 20 mM pH 8.6, con saccarosio 0.5 M, leupeptina 0.006 mM come inibitore delle proteasi, fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF) 0.5 mM come agente proteolitico,  $\beta$ -mercaptoetanololo 0.01% come agente riducente. Dopo centrifugazione a 30000 xg per 45 minuti a 4°C, la purificazione delle metallotioneine è stata effettuata attraverso una serie di precipitazioni etanoliche. Il pellet ottenuto da questi procedimenti e contenente le metallotioneine, è stato asciugato sotto flusso d'azoto, risospeso nuovamente in una soluzione di NaCl 0.25 M e HCl 1 N, contenente EDTA 4 mM per eliminare i cationi metallici legati alle metallotioneine. Alla soluzione così ottenuta è stato aggiunto tampone Na-fosfato 200 mM pH 8, NaCl 2 M e l'acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0.43 mM ed il campione ulteriormente centrifugato a 3000 xg per 5 minuti a 4°C. La concentrazione delle metallotioneine è stata valutata in rapporto ai gruppi -SH determinati spettrofotometricamente a  $\lambda = 412$  nm mediante reazione con DTNB. La quantificazione è stata effettuata attraverso una retta standard di calibrazione, con concentrazioni note di GSH (50-500 $\mu$ M).

*La proliferazione perossisomiale*, biomarker specifico di esposizione a proliferatori perossisomiali, è stata valutata per via spettrofotometrica attraverso l'analisi dell'attività enzimatica della acil-CoA ossidasi (AOX),

enzima localizzato a livello dei perossisomi e coinvolto nella beta-ossidazione degli acidi grassi. I 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  $\lambda = 502 \text{ nm}$ .

L'attività dell'acetilcolinesterasi è stata misurata nell'emolinfia opportunamente centrifugata per 5 minuti a 3000 xg. Il sovranatante è stato utilizzato per determinare l'attività della acetilcolinesterasi (AChE) secondo il metodo di Ellman, alla temperatura di  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ , alla lunghezza d'onda di 412 nm, con  $\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

L'analisi dei sistemi enzimatici antiossidanti è stata effettuata su campioni di ghiandola digestiva omogenati (1:5 p/v) in un tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, con NaCl 2.5%, PMSF (fenilmetilsolfonilfluoruro) 0.1 mM e inibitori di proteasi: aprotinina 0.008 TIU/mL, leupeptina 1  $\mu\text{g/mL}$ , pepstatina 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Dopo centrifugazione a 100.000 xg per 1 ora a 4°C, la frazione citosolica è stata aliquotata e conservata a  $-80^\circ\text{C}$ . Le attività enzimatiche dei principali sistemi antiossidanti sono state analizzate attraverso saggi spettrofotometrici a  $18^\circ\text{C}$ .

L'attività della catalasi (CAT), sistema antiossidante che detossifica il perossido d'idrogeno catalizzando la sua trasformazione in acqua e ossigeno, è stata valutata seguendo la diminuzione di assorbanza a  $\lambda=240 \text{ nm}$ ,  $\epsilon=-0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Il saggio è condotto per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7, con  $\text{H}_2\text{O}_2$  12 mM ed opportune aliquote di campione. Gli enzimi glutazione perossidasi (GPx), Se-dipendenti e Se-indipendenti, agiscono nei confronti dei perossidi organici e inorganici riducendoli nei corrispondenti alcool. L'attività enzimatica viene misurata seguendo l'azione di un sistema di enzimi accoppiati dove il GSSG, formato nella reazione catalizzata dalla perossidasi, viene convertito in forma ridotta GSH per azione della glutazione reduttasi. Nel saggio viene seguito il consumo del NADPH tramite diminuzione di assorbanza a  $\lambda=340 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = -6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . 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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  o 0,8 mM CuPx, 1U GR ed opportune aliquote di campione. La famiglia enzimatica delle glutazione S-transferasi (GST) catalizza le reazioni di coniugazione tra diverse classi di molecole con il glutazione ridotto (GSH), diminuendone la reattività o rendendole maggiormente idrosolubili e quindi eliminabili dall'organismo. L'analisi è stata condotta tramite saggio spettrofotometrico seguendo l'andamento dell'assorbanza del complesso formatosi da GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) rilevata a  $\lambda=340 \text{ nm}$ ,  $\epsilon=-9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . 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. L'enzima glutazione reduttasi (GR), responsabile della trasformazione del glutazione ossidato GSSG nella forma ridotta GSH tramite l'utilizzo di NADPH, viene saggiato mediante l'analisi del decremento di assorbanza rilevata a  $\lambda=340 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = -6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , dovuta all'ossidazione del NADPH. La reazione viene effettuata in un volume di saggio finale di 1 ml contenente

tampone K-fosfato 100 mM a pH 7, GSSG 1 mM, NADPH 0,12 mM ed opportune aliquote di campione. Per la determinazione del glutazione totale (GSH) gli omogenati di ghiandola digestiva sono stati preparati in acido sulfosalicilico 5% con EDTA 4 mM (1:5 p/v). I campioni sono stati lasciati in ghiaccio per 45 minuti per la deproteinizzazione, poi centrifugati a 37.000 xg per 15 minuti. Il glutazione totale è stato determinato nel sovrantante misurando per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda  $\lambda=412$  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, glutazione riduttasi 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 glutazione ridotto.

*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•) e i radicali idrossilici (HO•) (Winston et al., 1998; Regoli e Winston, 1999). Le analisi sono state effettuate sulla componente citosolica dei campioni di ghiandola digestiva omogenati (1:5 p/v) in un working-buffer costituito da tampone K-fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 2.5%. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 100000 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  $\alpha$ -cheto- $\gamma$ -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•) sono stati generati attraverso l'omolisi termica del 2,2'-azo-bis-amidinopropano (ABAP) mentre i radicali idrossilici (HO•) 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•): 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 (•OH): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM, Fe<sup>3+</sup> 1.8  $\mu$ M, EDTA 3.6  $\mu$ M e acido ascorbico 180  $\mu$ M 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  $\mu$ m) 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:

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

dove  $\int\text{SA}$  e  $\int\text{CA}$  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 ( $\int\text{SA} / \int\text{CA}=1$ ) 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 ( $\int\text{SA}=0$ ). 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.

*Il contenuto di malondialdeide (MDA)* è stato determinato attraverso una reazione di coniugazione con 1-metil-2-fenilindolo, che dà luogo alla formazione di un composto con assorbanza rilevabile a lunghezza d'onda  $\lambda=586$  nm. Per questa analisi i campioni di ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* sono stati omogenati in Tris-HCl 20 mM pH 7.4 (1:3 p/v) e centrifugati a 3000 xg per 20 minuti. La reazione di coniugazione è stata condotta a 45°C per 40 minuti in una miscela di reazione contenente 1-metil-2-fenilindolo 10.3 mM in acetonitrile diluito in rapporto 3:1 con metanolo, HCl 37%. Dopo centrifugazione a 15.000 xg per 10 minuti, il contenuto di malondialdeide è stato misurato per via spettrofotometrica, utilizzando come standard 1,1,3,3-tetrametossipropano in Tris-HCl 20 mM.

*La stabilità delle membrane lisosomiali* è stata misurata in emociti liberamente circolanti attraverso l'analisi del tempo di ritenzione del rosso neutro (NRRT) (Lowe et al., 1995; Moore et al., 2004). Dopo il prelievo le cellule sono state lasciate aderire per 15 minuti a 4°C in camera umida. Le cellule sono quindi state incubate con una soluzione di Rosso Neutro ed esaminate ad intervalli di 15 minuti (fino ad un tempo massimo di 120 minuti) 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  $\mu\text{L}$  di soluzione stock sono stati diluiti in 5 mL di soluzione fisiologica.

*L'analisi dell'accumulo di lipofuscina* è stata effettuata su sezioni criostatiche di 8  $\mu\text{m}$  di ghiandola digestiva, fissate in Baker's Ca-formolo (10 mL di Formaldeide al 40%; 1 g di  $\text{CaCl}_2$ , NaCl al 2.5%, portato a volume con acqua distillata) per 15 minuti a 4°C; successivamente i vetrini vengono risciacquati in acqua distillata ed immersi per 5 minuti nella soluzione di colorazione costituita da cloruro ferrico 1% e K-ferricianuro 1% (5:1) portata al volume di 50 mL con acqua distillata. I vetrini sono quindi lavati prima in acido acetico al 2% e poi in acqua distillata e infine montati in gelatina di glicerolo. Il software d'analisi d'immagine Image Pro Plus 6.2 è stato utilizzato per determinare l'intensità di colorazione dei granuli di lipofuscina, evidenziati come granuli dal colore

verde-azzurro all'interno dei tubuli della ghiandola digestiva dei mitili. L'accumulo di lipofuscina viene espresso in termini di intensità di colorazione per  $\mu\text{m}^2$  di tessuto totale.

*L'analisi di accumulo di lipidi neutri* viene anch'essa effettuata su sezioni criostatiche dello spessore di 8  $\mu\text{m}$  di ghiandola digestiva che vengono sottoposte ad una fase di fissaggio in buffer-formolo per 15 min a 4°C, cui segue un risciacquo in alcol isopropilico al 60%. La successiva procedura di colorazione prevede 15 minuti di incubazione in una soluzione satura di Oil Red O (1% in alcool isopropilico), un lavaggio di 1 minuto in alcool isopropilico al 60% e quindi in acqua distillata, e il montaggio in glicerol gelatina. L'accumulo di lipidi neutri viene misurato attraverso il software d'analisi d'immagine Image Pro Plus 6.2, ed espresso in termini di intensità di fluorescenza per  $\mu\text{m}^2$  di tessuto totale.

*Il danno genotossico* è stato valutato nell'emolinfa dei mitili attraverso il test della cometa e l'analisi della frequenza di micronuclei. Il test della cometa misura la perdita di integrità strutturale del DNA e permette una stima delle rotture a carico dei legami zucchero-fosfato nella doppia elica (strand breaks) a livello di singole cellule. Gli strand breaks, che si formano anche in condizioni fisiologiche nel DNA cellulare, possono essere riparati da sistemi enzimatici che ne preservano l'integrità strutturale; quando l'equilibrio fra processi di rottura e riparo viene meno, si verifica un accumulo di rotture nel DNA che può avere conseguenze rilevanti per alcuni processi essenziali del ciclo cellulare, come la corretta segregazione del materiale genetico durante la mitosi e la comparsa di micronuclei (MN), cioè di piccoli frammenti di cromatina fisicamente separati dal nucleo principale. Per il test della cometa gli emociti sono stati prelevati dal muscolo adduttore posteriore e per ogni sito sono stati analizzati 5 individui in replicato. Le cellule, lavate in buffer salino (12.5 mM KCl; 0.5 M NaCl; 20 mM HEPES; 10 mM EDTA) e portate alla concentrazione di  $40 \times 10^4$  cellule/mL, sono state incluse in un triplice strato di agarosio a basso punto di fusione, allestito su vetrini da microscopia pre-trattati con agarosio a punto di fusione normale. I vetrini così allestiti sono stati immersi per 90 minuti in una soluzione di lisi cellulare (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Trizma-base; 1% Triton X-100 e 10% DMSO), a 4°C, al buio, pH 10 e sottoposti a denaturazione alcalina (75 mM NaOH; 1 mM EDTA a pH > 12 per 10 minuti) e a corsa elettroforetica (1V/cm per 10 minuti, a 4°C, al buio). Dopo lavaggio di 10 minuti in soluzione di neutralizzazione (400 mM TRIS HCl, pH 7.5) e fissaggio in metanolo (3 minuti, a -20°C), i vetrini sono stati colorati con il 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), colorante fluorescente specifico per il DNA. L'entità della frammentazione del DNA è stata misurata per via microscopica: attraverso l'utilizzo del software Image Pro-Plus 6.2, sono stati creati dei mosaici di foto, costituiti dalle fotografie di circa 70 nuclei, che sono stati successivamente analizzati con il programma di analisi di immagine CometScore 1.5. La quantificazione della perdita di integrità strutturale del DNA valutata attraverso questo programma viene espressa come percentuale di DNA nella coda su una media di 70 nuclei analizzati per singolo vetrino.

*La frequenza di micronuclei (MN)* è stata valutata negli emociti prelevati dal muscolo adduttore, dilavati in un buffer salino (500 mM NaCl, 120 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM EDTA) con brevi centrifugate. Le cellule sono state poi trattate con fissativo di Carnoy (miscela 3:1 metanolo ed acido acetico) e sottoposte ulteriormente a brevi centrifugate e cambi di fissativo, prima di allestire degli strisci su vetrino. Dopo colorazione dei preparati con 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI)  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ , i vetrini sono stati esaminati al microscopio in fluorescenza per determinare la percentuale delle cellule contenenti micronuclei. Per ciascun

campione sono state contate almeno 2000 cellule, considerando micronuclei tutte quelle porzioni di cromatina fortemente DAPI positive in discontinuità fisica con il nucleo centrale (Nigro et al., 2006), di forma circolare od ovoidale e di diametro compreso tra 1/3 e 1/20 del diametro del nucleo della cellula.

L'indice generale dello stato fisiologico degli organismi è stato misurato nei mitili traslocati come capacità di sopravvivenza all'aria o test di "stress su stress" (Viarengo et al., 1995; Nesto et al., 2004; Pampanin et al., 2005). Circa 100 individui di sono stati utilizzati per ogni sito di prelievo; gli organismi sono stati separati e mantenuti in apposite camere umidificate, alla temperatura costante di  $14\pm 1^\circ\text{C}$ . Con cadenza regolare è stata controllata la mortalità degli organismi. Gli animali venivano considerati morti quando le valve apparivano aperte senza richiudersi dopo stimolo meccanico. I risultati, riportati in valore percentuale, sono indicati in una curva di sopravvivenza degli organismi nel tempo.

## 2.4. ANALISI STATISTICA

Per ogni parametro analizzato l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via è stata applicata per testare la significatività delle differenze in funzione dei siti. La normalità di dati è stata verificata tramite il Test di Shapiro-Wilk, mentre l'omogeneità delle varianze è stata verificata mediante il Test di Levene: l'analisi *post-hoc* (Tukey HSD) ha permesso di verificare la significatività delle differenze tra le medie dei valori. Ai dati delle analisi del danno genotossico è stata invece applicata una statistica non parametrica (ANOVA di Kruskal-Wallis).

## 2.5 ELABORAZIONE DEI DATI NEL MODELLO DI ANALISI DI RISCHIO SediquaSoft

I dati, infine, sono stati elaborati in un modello di analisi di rischio (SediquaSoft) basato su un approccio quantitativo del tipo Weight Of Evidence (WOE), in grado di integrare i risultati ottenuti da diverse tipologie di indagine (o linee di evidenza, LOEs), nella valutazione di rischio ecologico (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012). Questo modello contiene specifici algoritmi e diagrammi di flusso che, sulla base di precisi obiettivi ed assunzioni da giudizio esperto, permettono di applicare criteri di integrazione ponderata ad ampi data-sets di dati ottenuti da 5 linee di evidenza: caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE-1), biodisponibilità dei contaminanti in organismi bioindicatori (LOE-2), effetti subletali misurati tramite batterie di biomarker (LOE-3), effetti tossici misurati tramite applicazione di saggi ecotossicologici (LOE-4), analisi delle comunità bentoniche (LOE-5). Ciascuna linea di evidenza è stata sviluppata all'interno di un singolo modulo in grado di fornire per ciascuna tipologia di dati, sia un indice quantitativo di pericolo (HQ, Hazard Quotient), che un giudizio sintetico del livello di pericolo (suddiviso in 5 classi da assente a molto alto).

Pur non essendo obiettivo di questo documento una discussione eccessivamente dettagliata delle procedure di calcolo, vengono di seguito riassunti i principali criteri scientifici e i relativi flow-charts sviluppati per le 3 LOEs utilizzate nell'ambito della presente indagine (caratterizzazione chimica dei sedimenti, biodisponibilità dei contaminanti per i mitili, biomarker).

Per quanto riguarda il modulo relativo alla caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE-1), il modello prevede che ai vari composti chimici analizzati venga assegnato un "peso" diverso a seconda della loro presenza

nella lista delle sostanze prioritarie o pericolose e prioritarie identificate dalla Direttiva 2008/105/CE. I valori misurati sono poi confrontati con dei livelli di riferimento che derivano da riferimenti sia normativi che di carattere scientifico utilizzati a livello nazionale, europeo o internazionale tra cui: L1 e L2 del D.M 173 del 2016; il D.Lgs 172/2015 che recepisce gli Standard di Qualità dei Sedimenti (SQS) in relazione alla Direttiva Europea 2000/60/CE; ERL, Effect Range Low, ed ERM, Effect Range Median (Long, 1992; Long et al., 1995); TEL, Threshold Effect Level, e PEL, Probable Effect Level (Long et al, 1995; Macdonald et al., 1996); SL e SQHV come Screening Levels e High Values adottate da ANZECC (2009); COLONNA A e COLONNA B della Tabella 1 dell'Allegato 5 alla parte IV Titolo 5 del Dlgs 152/2006. Nell'elaborazione dei dati sulla caratterizzazione chimica dei sedimenti di Livorno, i valori di riferimento utilizzati sono stati quelli del L2 del D.M 173 del 2016, che costituiscono i riferimenti normativi attuali in materia di dragaggi portuali.

La prima fase nella elaborazione dell'indice di pericolo specifico per la caratterizzazione chimica (Hazard Quotient,  $HQ_C$ ) è il calcolo per ogni parametro della variazione rispetto al riferimento (*Ratio To Reference*,  $RTR$ ), corretta per la tipologia (peso) del contaminante ( $RTR_W$ ), al fine di enfatizzare l'importanza delle variazioni osservate per i contaminanti più pericolosi. Il valore dell'*Hazard Quotient* specifico per la caratterizzazione chimica dei sedimenti ( $HQ_C$ ), deriva dalla media degli  $RTR_W$  di tutti quei parametri con  $RTR \leq 1$  (cioè con valori inferiori rispetto al limite della SQG di riferimento), addizionata con la sommatoria  $\Sigma$  dei singoli  $RTR_W$  di tutti contaminanti con  $RTR > 1$ :

$$HQ_C = \frac{\sum_{j=1}^N RTR_W(j)_{RTR(j) \leq 1}}{N} + \sum_{k=1}^M RTR_W(k)_{RTR(k) > 1}$$

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. Con questo calcolo, in funzione del numero di parametri che superano i riferimenti dell'entità del superamento e della tipologia del contaminante, l'indice di pericolo chimico complessivo ( $HQ_C$ ) discrimina anche sedimenti solo moderatamente inquinati (cioè vicini ai valori di riferimento), aumenta in funzione del numero dei parametri e dell'entità dello sforamento dei singoli, non è abbassato dall'analisi di molti parametri che non sfiorano. Basandosi su un giudizio esperto, l'indice di pericolo cumulativo  $HQ_C$  è assegnato ad 1 di 5 classi di pericolo (da assente a molto alto) ed il modello fornisce, per ogni normativa considerata, anche informazioni aggiuntive importanti quali ad esempio la % al pericolo complessivo dato dal parametro che sfiora di più, il numero di parametri non conformi, di quelli previsti all'interno del riferimento, di quelli analizzati ed infine la classe di pericolo (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012).

Il modulo 2 sulla biodisponibilità (LOE-2) è fondamentale in quanto permette di stabilire il rischio 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 ancora una volta in funzione della tipologia del contaminante e della significatività statistica delle differenze ( $RTR_W$ ). 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). Il valore cumulativo di  $HQ_{BA}$  viene poi calcolato in funzione della

distribuzione % dei parametri nelle varie classi, ed il modello indica il numero di parametri in ciascuna delle 5 classi di effetto, il valore di  $HQ_{BA}$  cumulativo, la classe complessiva di pericolo per la biodisponibilità.

Il modulo sulle analisi dei Biomarker (LOE-3) 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 a seconda della rilevanza biologica della risposta e del livello di conoscenze sui meccanismi coinvolti; per ciascun biomarker, sempre 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. Per calcolare l'indice cumulativo di pericolo per i biomarker  $HQ_{BM}$ , la variazione misurata per ciascun biomarker è confrontata con la soglia e corretta sia per la significatività statistica della differenza rispetto al controllo, che per l'importanza biologica della risposta; ogni biomarker è quindi assegnato ad una classe di effetto (da assente a molto alto) a seconda dell'entità della variazione rispetto alla soglia. I risultati di tutti i biomarker sono diversamente pesati nel calcolo del pericolo cumulativo  $HQ_{BM}$ , e della sua attribuzione ad 1 di 5 classi di gravità. Il modello indica il numero di biomarker all'interno di ciascuna delle 5 classi di effetto, il valore di pericolo cumulativo  $HQ_{BM}$  e la classe di pericolo complessivo per i biomarker.

I risultati ottenuti dalle singole LOEs vengono integrati nella fase finale attraverso un approccio WOE che dà pesi diversi alle varie tipologie di dati. L'elaborazione complessiva WOE porta ad una caratterizzazione del rischio che fornisce sia un valore quantitativo che una assegnazione qualitativa ad un livello che va da assente a molto alto.

Vengono di seguito riportati i flow-charts delle elaborazioni dei dati della chimica dei sedimenti (Figura 2) del bioaccumulo (Figura 3), delle risposte dei biomarker (Figura 4) e della loro integrazione complessiva (Figura 5).



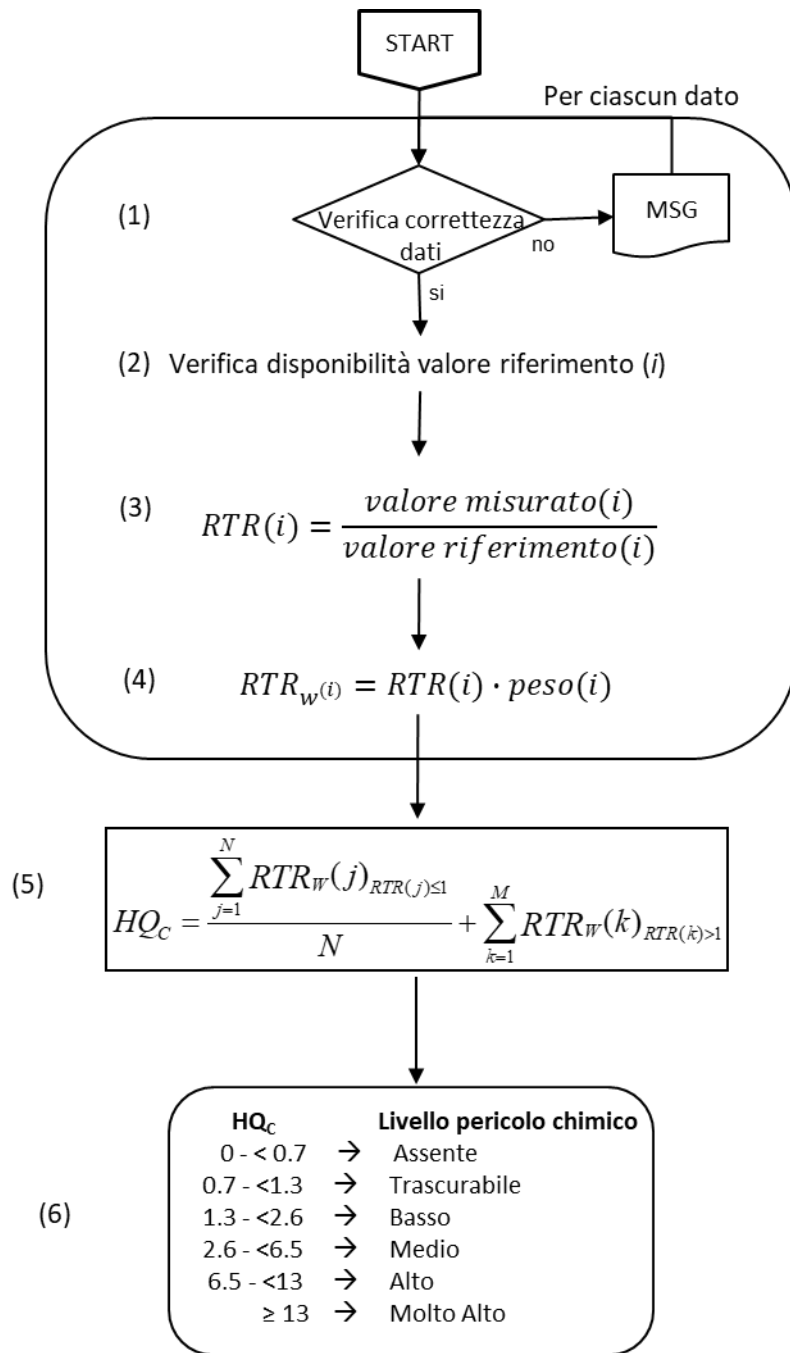


Figura 2. Flow-chart dell'elaborazione dei dati della chimica dei sedimenti (da Piva et al., 2011).

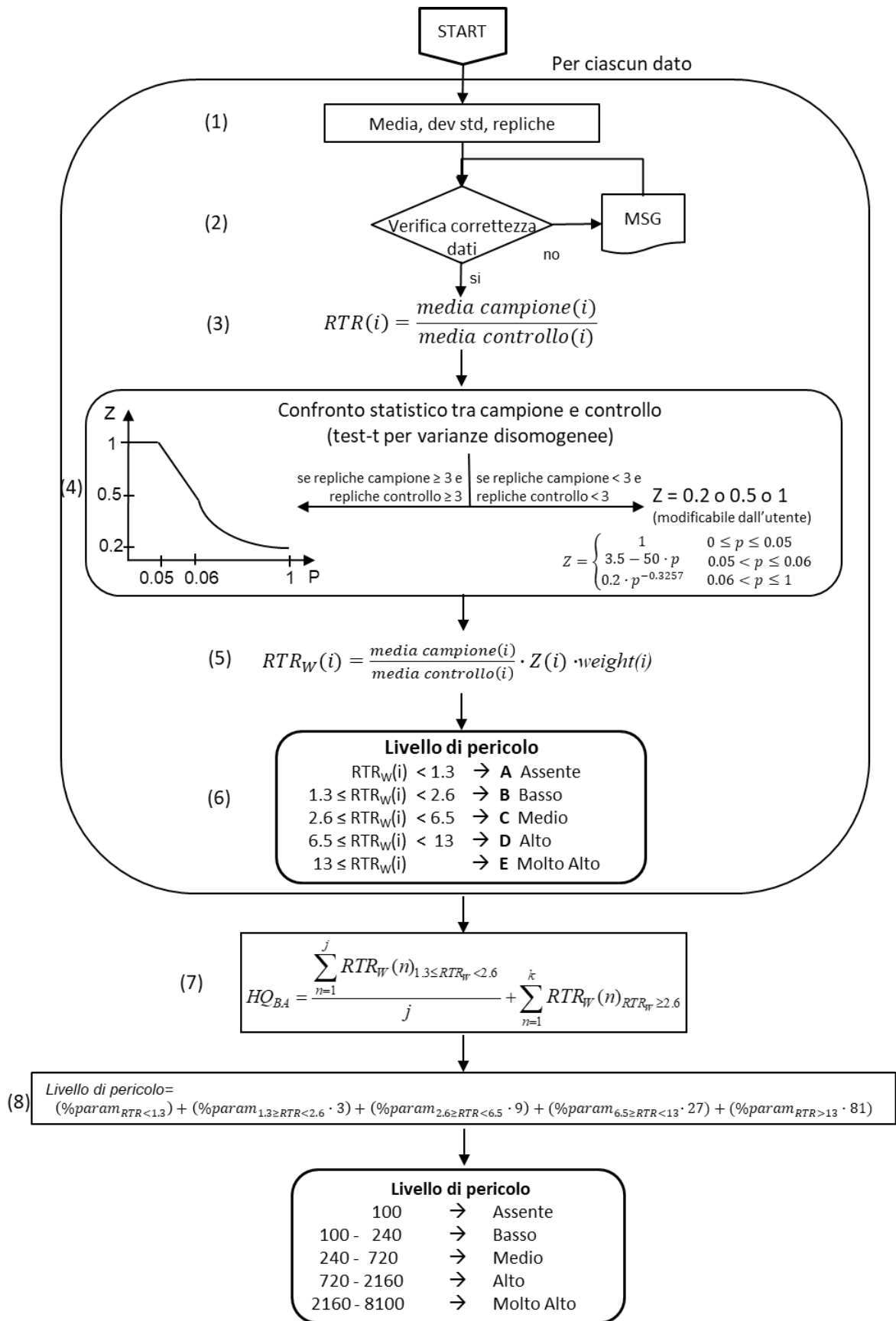


Figura 3. Flow-chart dell'elaborazione dei dati di bioaccumulo (da Piva et al., 2011).

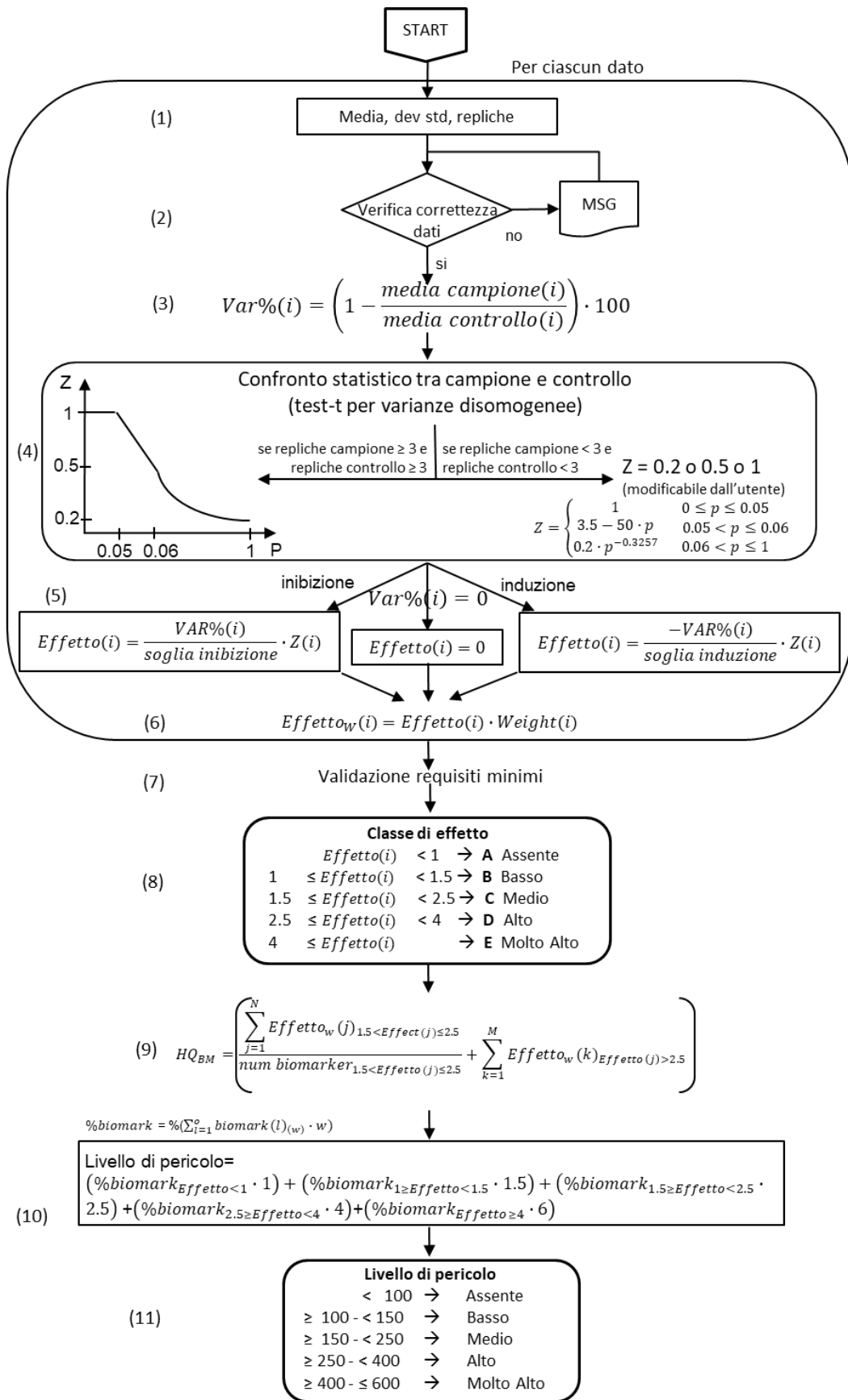


Figura 4. Flow-chart dell'elaborazione dei dati dei biomarkers (da Piva et al., 2011).

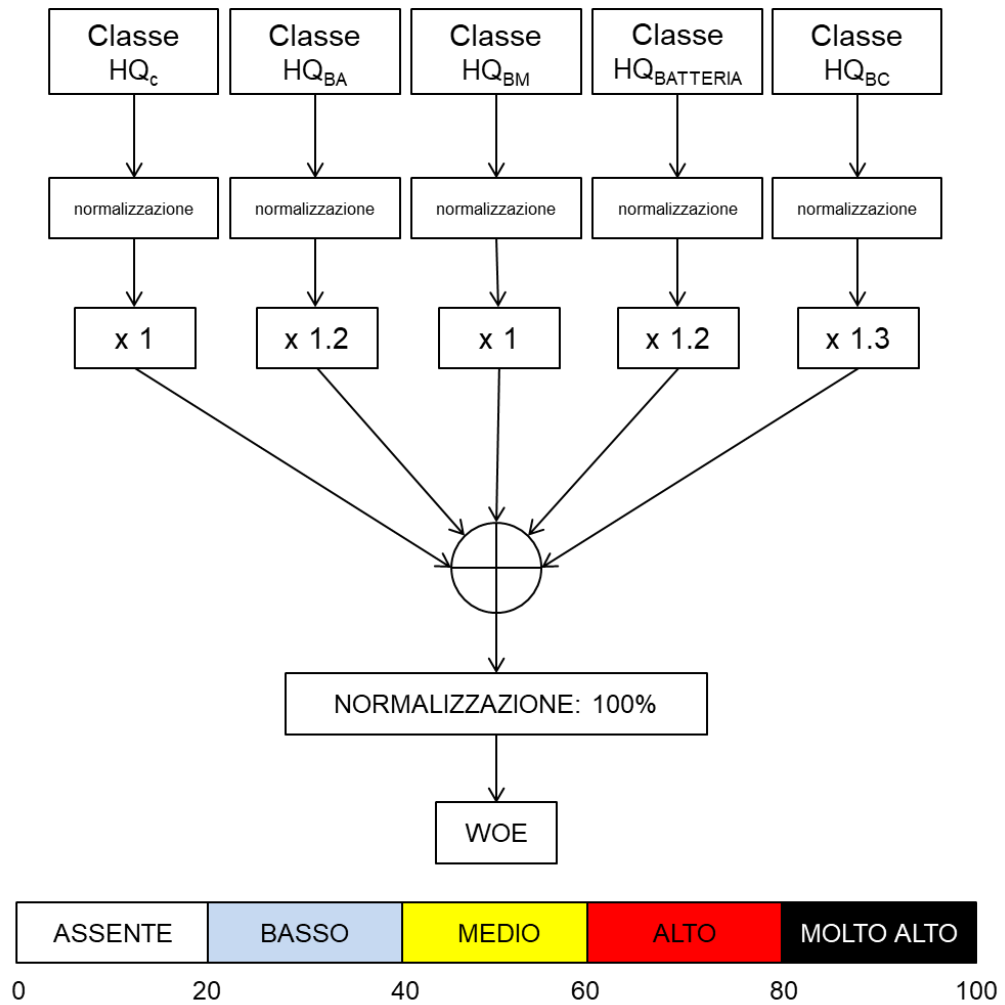


Figura 5. Flow-chart dell'elaborazione complessiva di varie LOEs secondo l'approccio Weight of Evidence (da Piva et al., 2011). In questa relazione sono stati integrati i dati relativi alle prime 3 LOEs, caratterizzazione chimica dei sedimenti ( $HQ_c$ ), biodisponibilità ( $HQ_{BA}$ ) e biomarker ( $HQ_{BM}$ ).

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 ANALISI CHIMICHE DEI SEDIMENTI

I risultati delle analisi della concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei sedimenti campionati a maggio 2017 sono riportati in Tabella 1 e Figura 6. I valori osservati risultano in generale bassi, anche rispetto a livelli tipici per sedimenti di ambienti portuali, sia per quanto riguarda gli idrocarburi a basso peso molecolare (che rappresentano la frazione più abbondante) sia per gli idrocarburi ad alto peso molecolare (con l'unica eccezione del campione VE4).

Per quanto riguarda gli IPA a basso peso molecolare, i valori più alti sono stati riscontrati nei siti VE7, VE8 e VN1; questa situazione è ascrivibile a livelli mediamente più alti rispetto agli altri siti di alcuni congeneri quali Naftalene e 1-Metilnaftalene per i sedimenti della stazione Ve7 (rispettivamente 44.17 e 28.49 ng/g), Acenaftilene, 1-Metilnaftalene e 2-Metilnaftalene per i campioni prelevati nel sito VE8 (rispettivamente 11.91, 19.45 e 36.57 ng/g) e Naftalene, Acenaftilene, 1-Metilnaftalene e 2-Metilnaftalene nei sedimenti del sito VN1 (rispettivamente 31.23, 44.56, 34.45 e 22.78 ng/g).

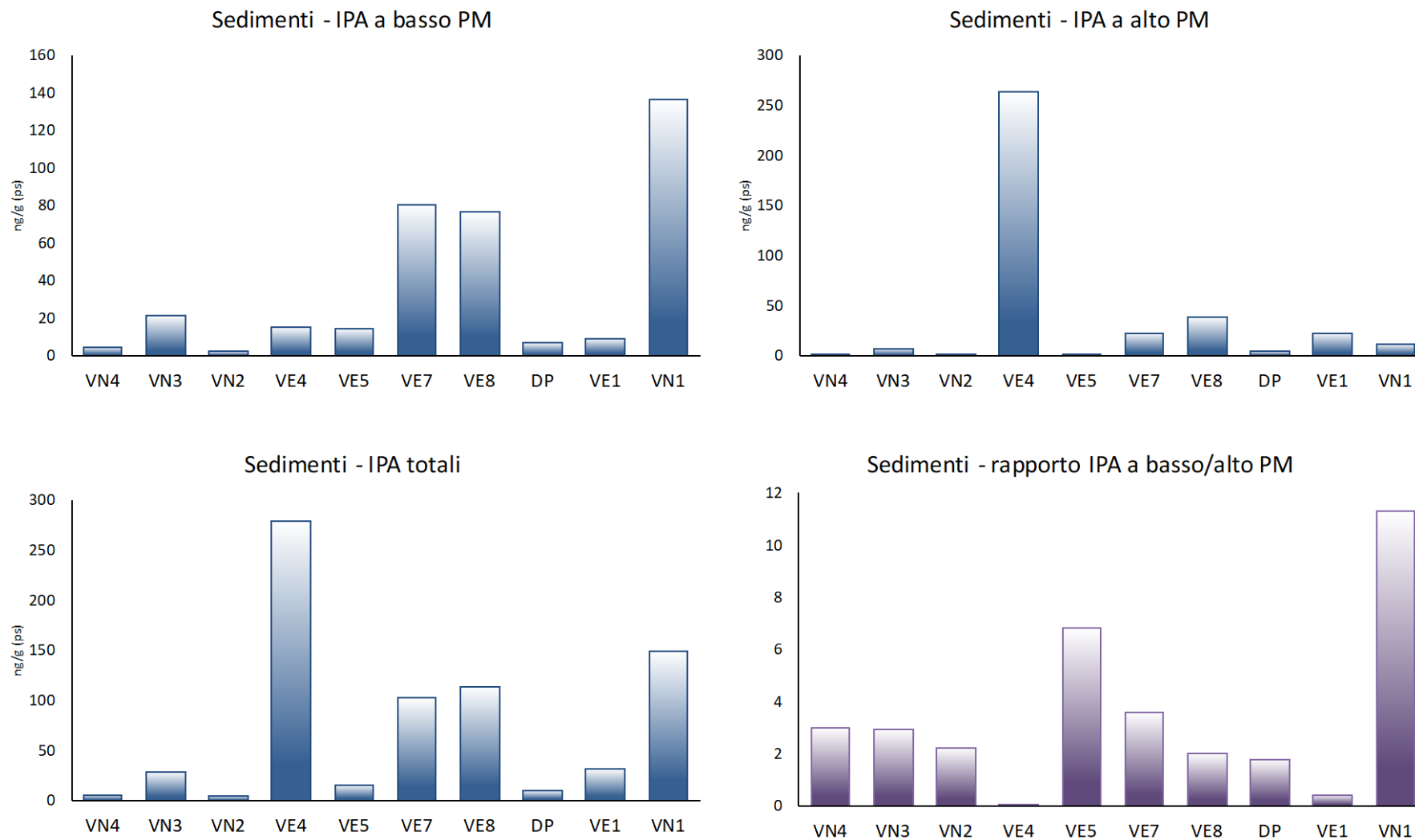
I livelli più alti di IPA ad alto peso molecolare sono stati invece misurati nei sedimenti campionati nel sito VE4, dove i congeneri 7,12-Dimetilbenzo(a)antracene, Pirene, Benzo(b)fluorantene e Benzo(k)fluorantene rappresentano quasi il 94% degli IPA ad alto peso molecolare, con valori rispettivamente di 157.99, 60.67, 15.71 e 13.05 ng/g. Inoltre, livelli lievemente più alti di Fluorantene sono stati misurati nei sedimenti campionati nei siti VE7, VE8 e VE1.

I siti VE7 e VE8 rappresentano quelli localizzati nella parte più interna del porto e quindi potenzialmente più interessata alla presenza di una contaminazione che proviene dalle attività industriali e commerciali che insistono nel porto; lo scarso idrodinamismo caratteristico di quest'area limita l'effetto diluizione degli inquinanti che quindi in questi siti possono essere rilevati in concentrazioni maggiori rispetto alle aree più esterne del porto. I siti VN1 e VE4, anch'essi interessati dalla presenza di concentrazioni più alte di IPA rispettivamente a basso e ad alto peso molecolare, sono invece localizzati nell'area esterna al porto ma immediatamente prospiciente le dighe foranee del porto; condizioni specifiche di idrodinamismo locale possono aver determinato un accumulo di IPA in questi sedimenti, anche se, come già sottolineato, i livelli riscontrati si riferiscono sempre a una condizione tipica di ambiente portuale.

In generale gli IPA a basso peso molecolare rappresentano l'80% degli IPA totali, fatta eccezione per i siti VE4 e VE1, dove il contributo dei congeneri ad alto peso molecolare è maggiore dei congeneri a basso peso molecolare; è importante notare comunque che nei sedimenti del sito VE1 il rapporto tra i congeneri è dovuto a dei valori estremamente bassi di IPA a basso peso molecolare.

**Tabella 1.** Concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici (ng/g peso secco) nei sedimenti campionati nelle diverse aree portuali di Livorno nel 2017.

		VN4	VN3	VN2	VE4	VE5	VE7	VE8	DP	VE1	VN1
Naftalene	ng/g (ps)	< 1	< 1	< 1	< 1	9,81	44,17	< 1	6,59	< 1	31,23
Acenaftilene	ng/g (ps)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	11,91	< 1	6,06	44,56
1-Metilnaftalene	ng/g (ps)	1,69	7,44	< 1	< 1	< 1	28,49	19,45	< 1	< 1	34,45
2-Metilnaftalene	ng/g (ps)	1,38	11,21	1,68	< 1	2,63	< 1	36,57	< 1	< 1	22,78
Acenaftene	ng/g (ps)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	8,41	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0,36	< 1.0
Fluorene	ng/g (ps)	0,27	1,49	0,27	< 0.1	0,44	4,01	5,041	< 0.1	< 0.1	0,871
Fenantrene	ng/g (ps)	1,10	1,01	0,69	< 0.1	1,40	3,90	3,32	< 0.1	< 0.1	1,35
Antracene	ng/g (ps)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	6,55	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0,22	2,87	1,54
Fluorantene	ng/g (ps)	0,37	2,27	0,50	4,150	0,53	15,82	11,481	< 0.1	14,58	9,998
Pirene	ng/g (ps)	0,137	0,14	0,21	60,659	0,144	0,64	6,538	0,963	4,849	< 0.5
Benzo(a)antracene	ng/g (ps)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0,108	0,90	1,43	0,29	< 0.1	< 0.5
Crisene	ng/g (ps)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	3,461	< 0.1	1,30	2,670	0,428	1,782	< 0.1
7,12-Dimetilbenzo(a)antracene	ng/g (ps)	0,75	4,25	0,33	157,99	0,626	0,97	13,373	1,054	< 0.1	< 0.5
Benzo(b)fluorantene	ng/g (ps)	0,108	0,13	0,06	15,709	0,30	1,482	0,516	0,561	< 0.01	0,345
Benzo(k)fluorantene	ng/g (ps)	0,056	0,291	< 0.01	13,049	0,198	0,73	1,003	0,254	0,594	0,653
Benzo(a)pirene	ng/g (ps)	0,053	0,167	0,05	7,882	0,113	0,354	0,541	0,166	0,304	0,443
Dibenzo(a,h)antracene	ng/g (ps)	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0,287
Benzo(g,h,i)perilene	ng/g (ps)	0,029	< 0.01	0,026	0,508	0,059	0,132	0,222	0,076	0,079	0,234
Indeno(1,2,3-cd)pirene	ng/g (ps)	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0,03	0,01	0,12
IPA basso PM	ng/g (ps)	4,45	21,16	2,64	14,96	14,27	80,57	76,29	6,81	9,29	136,78
IPA alto PM	ng/g (ps)	1,50	7,26	1,18	263,41	2,09	22,33	37,78	3,82	22,20	12,08
IPA totali	ng/g (ps)	5,9	28,4	3,8	278,4	16,4	102,9	114,1	10,6	31,5	148,9



**Figura 6.** Concentrazione (ng/g peso secco) di idrocarburi policiclici aromatici a basso peso molecolare, alto peso molecolare, IPA totali e rapporto tra congeneri a basso e alto PM nei sedimenti campionati nelle diverse aree portuali di Livorno nel 2017.

### 3.2 ANALISI CHIMICHE NEI TESSUTI DEI MITILI

Le analisi dei livelli di idrocarburi policiclici aromatici nei tessuti dei mitili traslocati e recuperati nel giugno 2017 (mostrati in Tabella 2 e Figura 7) hanno evidenziato dei fenomeni di bioaccumulo in tutti gli organismi trapiantati nelle diverse aree portuali rispetto agli organismi di riferimento campionati al T0 (maggio 2017).

In generale i congeneri a basso peso molecolare rappresentano la frazione più abbondante: questa componente mostra valori mediamente più alti in tutti gli organismi traslocati rispetto agli organismi di controllo T=0 (1) e T=0 (2), ma aumentano in maniera significativa nei mitili trapiantati nei siti VN2, VE8 e VN1; tra i congeneri principalmente responsabili di questo andamento si riscontrano l'1-Metilnafatlene nei siti VN2 e VE8, mentre Acenaftilene e 2-Metilnaftilene nel sito VN1, confermando, almeno parzialmente il dato ottenuto dall'analisi dei sedimenti e sottolineando una certa biodisponibilità di questi congeneri in queste aree.

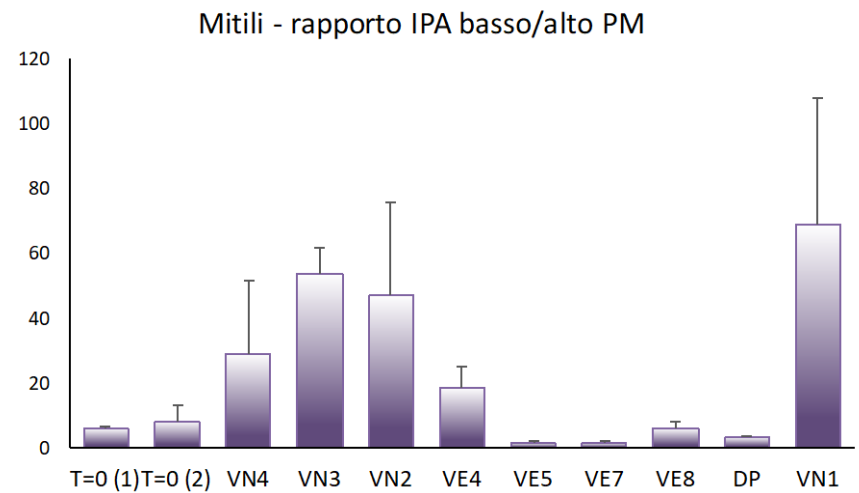
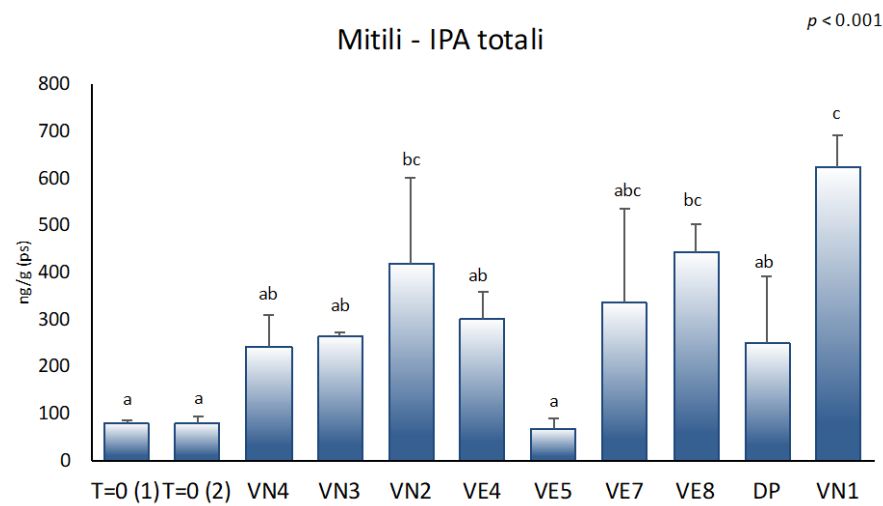
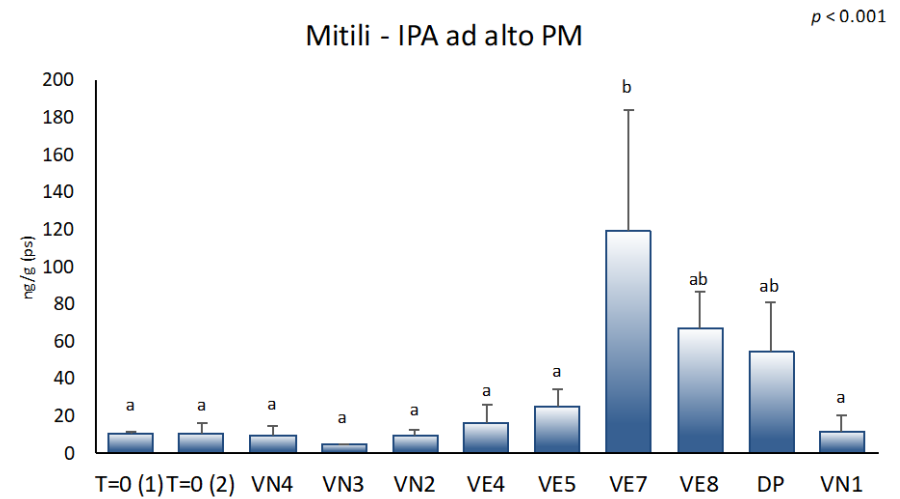
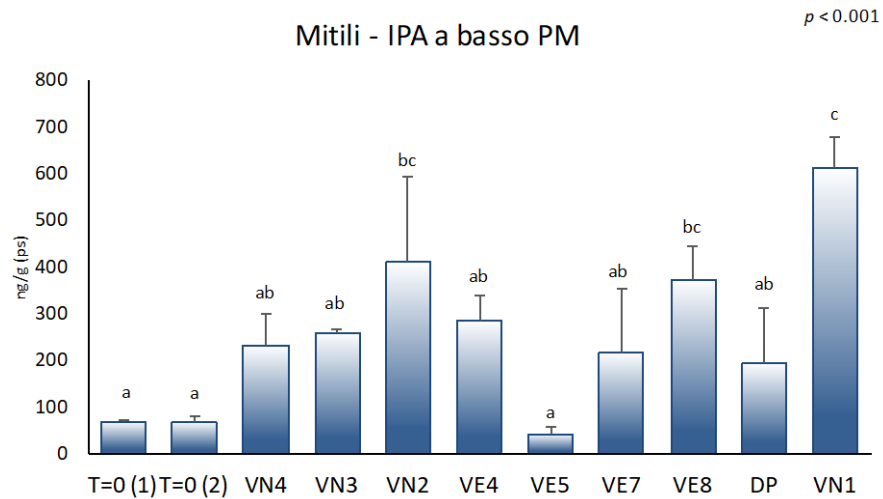
Per quanto riguarda il bioaccumulo di IPA ad alto peso molecolare, i livelli risultano in generale comparabili a quelli dei mitili di riferimento (T=0) ad eccezione degli organismi trapiantati nei siti VE7, VE8 e DP, aree interne al porto dove l'effetto della pressione antropica dovuta alle attività industriali risulta maggiore. Negli organismi trapiantati in questi siti, tra i congeneri ad alto peso molecolare hanno un elevato contributo il Fluorantene ed il Pirene, il Crisene (per i siti VE7 e VE8) ed il 7,12-Dimetilbenzo(a)antracene (per il sito VE8). Questi dati sul bioaccumulo confermano in parte i risultati già discussi per i sedimenti, che dimostravano una discreta biodisponibilità del Fluorantene nei siti VE7 e VE8, uno dei congeneri ad alto peso molecolare più abbondante nei sedimenti campionati durante questa campagna.

Dato l'elevato contributo degli IPA a basso peso molecolare al calcolo degli IPA totali, l'andamento di questi ultimi è molto simile a quello evidenziato per i primi: nei mitili trapiantati nelle stazioni VN2, VE8 e VN1 l'incremento dei livelli di IPA totali è risultato statisticamente significativo rispetto ai mitili campionati a maggio 2017 T=0 (1) e T=0 (2).



**Tabella 2.** Concentrazioni di idrocarburi policiclici aromatici (ng/g peso secco) nei tessuti dei mitili prelevati a maggio 2017 da un'area di riferimento (tempo =0), traslocati nelle diverse aree di indagine e recuperati a giugno 2017. Valori espressi come media  $\pm$  deviazioni standard (n=3).

	T=0 (1)	T=0 (2)	VN4	VN3	VN2	VE4	VE5	VE7	VE8	DP	VN1
Naftalene	49.4 $\pm$ 5.01	47.6 $\pm$ 7.07	38.6 $\pm$ 10	18.3 $\pm$ 5.82	29.1 $\pm$ 20.5	42 $\pm$ 10.6	25.2 $\pm$ 9.83	107 $\pm$ 91.9	57.7 $\pm$ 26.8	145 $\pm$ 80.8	51.5 $\pm$ 9.4
Acenaftilene	< 1	< 1	< 1	172 $\pm$ 15.9	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	211 $\pm$ 19.6
1-Metilnaftalene	< 1	< 1	< 1	51.8 $\pm$ 19.5	350 $\pm$ 169	220 $\pm$ 45.7	< 1	71.3 $\pm$ 29.2	291 $\pm$ 52.8	< 1	< 1
2-Metilnaftalene	9.03 $\pm$ 1.58	9.97 $\pm$ 5.08	179 $\pm$ 57.3	7.54 $\pm$ 0.663	12.5 $\pm$ 1.99	10.6 $\pm$ 1.46	8.14 $\pm$ 2.03	20.7 $\pm$ 16.6	14.5 $\pm$ 1.17	17.6 $\pm$ 2.68	335 $\pm$ 58.9
Acenaftene	2.46 $\pm$ 0.539	3.39 $\pm$ 0.8	10 $\pm$ 3.99	1.17 $\pm$ 0.309	4.89 $\pm$ 1.04	< 0.1	< 0.1	2.19 $\pm$ 0.991	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Fluorene	6.78 $\pm$ 0.608	5.84 $\pm$ 0.694	< 0.1	1.15 $\pm$ 0.129	4.69 $\pm$ 1.45	5.33 $\pm$ 1.95	2.23 $\pm$ 0.687	5.57 $\pm$ 1.29	4.96 $\pm$ 2.76	20.2 $\pm$ 31.4	4.12 $\pm$ 1.85
Fenantrene	< 0.1	< 0.1	2.65 $\pm$ 3.04	4.82 $\pm$ 3.12	6.38 $\pm$ 1.53	5.93 $\pm$ 2.04	5.15 $\pm$ 2.01	6.49 $\pm$ 2.2	2.96 $\pm$ 1.04	7.86 $\pm$ 5.5	7.84 $\pm$ 4.21
Antracene	< 0.1	< 0.1	1.58 $\pm$ 1.2	0.068 $\pm$ 0.0134	0.812 $\pm$ 0.0986	< 0.1	0.903 $\pm$ 0.366	1.79 $\pm$ 1.15	1.25 $\pm$ 1.38	1.94 $\pm$ 1.54	1.21 $\pm$ 1.76
Fluorantene	< 0.1	< 0.1	5.4 $\pm$ 3.68	1.92 $\pm$ 1.38	4.95 $\pm$ 3.52	4.27 $\pm$ 0.374	10.7 $\pm$ 3.41	51.4 $\pm$ 32.4	16.2 $\pm$ 2.99	25.5 $\pm$ 15.8	6.36 $\pm$ 6.82
Pirene	2.15 $\pm$ 0.549	2.13 $\pm$ 1.6	0.82 $\pm$ 0.609	0.344 $\pm$ 0.0786	0.815 $\pm$ 0.167	5.81 $\pm$ 4.1	7.61 $\pm$ 1.51	42.9 $\pm$ 21.8	15.3 $\pm$ 3.38	23.4 $\pm$ 11.5	0.533 $\pm$ 0.083
Benzo(a)antracene	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Crisene	6.6 $\pm$ 0.245	6.86 $\pm$ 3.65	0.532 $\pm$ 0.649	0.0871 $\pm$ 0.0624	0.173 $\pm$ 0.106	1.49 $\pm$ 1.1	3.86 $\pm$ 2.92	14.2 $\pm$ 7.01	12.7 $\pm$ 15.7	< 0.1	0.215 $\pm$ 0.145
7,12-Dimetilbenzo(a)antracene	< 0.1	< 0.1	1.22 $\pm$ 1.1	1.37 $\pm$ 0.0909	2.32 $\pm$ 0.455	< 0.1	< 0.1	< 0.1	19.2 $\pm$ 3.39	< 0.1	2.79 $\pm$ 0.85
Benzo(b)fluorantene	1.91 $\pm$ 0.404	0.414 $\pm$ 0.112	0.234 $\pm$ 0.122	0.288 $\pm$ 0.206	0.625 $\pm$ 0.315	2.65 $\pm$ 1.56	1.51 $\pm$ 0.979	4.23 $\pm$ 0.486	2.07 $\pm$ 0.353	0.748 $\pm$ 0.79	0.338 $\pm$ 0.335
Benzo(k)fluorantene	0.0913 $\pm$ 0.0509	0.217 $\pm$ 0.0687	0.171 $\pm$ 0.0887	0.131 $\pm$ 0.173	0.304 $\pm$ 0.182	1.65 $\pm$ 1.04	0.975 $\pm$ 0.22	4.64 $\pm$ 2.32	0.728 $\pm$ 0.643	1.79 $\pm$ 1.5	0.204 $\pm$ 0.214
Benzo(a)pirene	0.0968 $\pm$ 0.0024	0.0841 $\pm$ 0.0369	1.13 $\pm$ 1.8	0.125 $\pm$ 0.119	0.18 $\pm$ 0.112	0.742 $\pm$ 0.431	0.329 $\pm$ 0.0358	1.21 $\pm$ 1.12	0.355 $\pm$ 0.315	0.569 $\pm$ 0.0898	0.288 $\pm$ 0.275
Dibenzo(a,h)antracene	< 0.01	0.615 $\pm$ 0.584	0.489 $\pm$ 0.831	0.518 $\pm$ 0.571	0.35 $\pm$ 0.59	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.0544 $\pm$ 0.0769	1.76 $\pm$ 1.52	0.885 $\pm$ 0.934
Benzo(g,h,i)perilene	0.137 $\pm$ 0.111	0.0608 $\pm$ 0.0881	0.0817 $\pm$ 0.124	0.0563 $\pm$ 0.0802	0.1 $\pm$ 0.156	0.273 $\pm$ 0.134	0.229 $\pm$ 0.0591	0.489 $\pm$ 0.177	0.203 $\pm$ 0.17	0.197 $\pm$ 0.191	0.373 $\pm$ 0.274
Indeno(1,2,3-cd)pirene	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.026 $\pm$ 0.0277	0.0205 $\pm$ 0.0183	< 0.01	0.015 $\pm$ 0.0086
IPA basso PM	67.7 $\pm$ 5.69	66.8 $\pm$ 11.5	232 $\pm$ 67	257 $\pm$ 8.24	408 $\pm$ 182	284 $\pm$ 52.7	41.7 $\pm$ 13.5	215 $\pm$ 136	372 $\pm$ 70.3	193 $\pm$ 119	612 $\pm$ 65.6
IPA alto PM	11 $\pm$ 0.249	10.3 $\pm$ 5.59	10 $\pm$ 4.86	4.84 $\pm$ 0.614	9.81 $\pm$ 2.89	16.9 $\pm$ 8.68	25.2 $\pm$ 8.87	119 $\pm$ 64.4	67 $\pm$ 19.7	54 $\pm$ 26.9	12 $\pm$ 8.58
IPA totali	78.7 $\pm$ 5.74	77.2 $\pm$ 16.8	242 $\pm$ 66.5	262 $\pm$ 7.69	418 $\pm$ 180	300 $\pm$ 58.9	66.9 $\pm$ 21.7	334 $\pm$ 201	439 $\pm$ 60.6	247 $\pm$ 146	624 $\pm$ 65.6



**Figura 7.** Concentrazione (ng/g peso secco) di idrocarburi policiclici aromatici a basso peso molecolare, alto peso molecolare, IPA totali e rapporto tra IPA a basso PM e alto PM nei tessuti dei mitili prelevati al tempo 0 (maggio 2017), traslocati nelle diverse aree di indagine e prelevati nel giugno 2017. Valori espressi come media  $\pm$  deviazione standard ( $n=3$ ). Lettere differenti indicano differenze significative tra i siti.

### 3.3 ANALISI DEI BIOMARKERS

I risultati dei biomarker per l'anno di indagine 2017 si riferiscono ai mitili traslocati nel periodo di maggio-giugno nei siti VN4, sito a nord esterno al porto, VN2 + VN3, siti prospicienti la seconda vasca di colmata, VE4 + VE5, siti prospicienti la prima vasca di colmata, e VE 7 + VE 8 + DP, siti che risentono non solo delle attività di dragaggio ma più direttamente dell'impatto legato alle attività industriali che insistono all'interno nel porto di Livorno.

I risultati dei biomarker di risposta specifica a classi di contaminanti come metalli pesanti, pesticidi e composti organici vengono mostrati in Tabella 3 e Figura 8. I livelli di metallotioneine nella ghiandola digestiva, marker di esposizione a metalli pesanti quali mercurio, rame, cadmio e zinco, non variano significativamente tra i mitili traslocati nei diversi siti con valori medi che oscillano tra 3.21 e 3.72 nmol/mg prt. Anche l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi misurata nell'emolinfa, enzima sensibile all'esposizione a pesticidi e coinvolto negli effetti neurotossici di questi inquinanti, è risultata paragonabile tra gli organismi dei diversi siti di indagine, con valori medi compresi tra 61 e 95 nmol/min/mg prt. Per quanto riguarda l'attività dell'enzima acil-CoA ossidasi, coinvolto nel metabolismo lipidico e sensibile all'esposizione a composti organici, è stata riscontrata una inibizione statisticamente significativa nella ghiandola digestiva dei mitili traslocati nel sito interno al porto (VE7 + VE8 + DP) se comparata con l'attività enzimatica dei mitili trapiantati nel sito esterno a nord del porto (VN4), con valori che passano da  $0.64 \pm 0.11$  a  $0.33 \pm 0.08$  nmol/min/mg prt.

I risultati relativi alle singole risposte del sistema antiossidante degli organismi trapiantati sono riportati in Tabella 3 e Figura 9. Le attività degli enzimi catalasi, glutatione reduttasi e delle glutatione perossidasi totali non hanno mostrato variazioni significative negli organismi trapiantati nei diversi siti, con valori medi che oscillano rispettivamente tra 17 e 26  $\mu\text{mol/min/mg prt}$ , tra 10 e 17 nmol/min/mg prt e tra 6.8 11.9  $\mu\text{mol/min/mg prt}$ . Nonostante l'assenza di variazioni significative, vi è un trend di lieve aumento nei siti di indagine rispetto al controllo per la catalasi. I livelli di glutatione totale nella ghiandola digestiva dei mitili del sito prospiciente la prima vasca di colmata (VE4+VE5) sono risultati essere significativamente più bassi rispetto agli organismi traslocati nel sito esterno a nord del porto (VN4) mentre non sono state osservate variazioni negli organismi provenienti dagli altri siti. E' inoltre stata osservata un'induzione delle glutatione S-transferasi negli organismi trapiantati nei siti VN2 + VN3 e delle glutatione perossidasi Se-dipendente negli organismi trapiantati nei siti VE4 + VE5 rispetto ai valori misurati negli organismi di controllo (VN4).

In linea con le limitate variazioni osservate per le singole difese antiossidanti, per quanto riguarda la capacità antiossidante totale è stato misurato un lieve aumento significativo di questo parametro nei confronti del radicale perossilico (TOSC ROO•, Tabella 3 e Figura 10) negli organismi traslocati nei pressi della prima vasca di colmata (VE4 + VE5) rispetto a quelli trapiantati vicino la nuova vasca di colmata o all'interno del porto (VN2 + VN3 e VE7 + VE8 + DP) ma non rispetto agli organismi del sito a nord del porto (VN4). Non sono state osservate variazioni significative della capacità antiossidante totale nei confronti del radicale idrossilico (TOSC HO•, Tabella 3 e Figura 10), i cui valori medi oscillano da 412 a 467 U TOSC/mg prt. Parallelamente a queste lievi variazioni, è stata osservata una diminuzione significativa del contenuto di malondialdeide, marker di

perossidazione lipidica, nei mitili traslocati nel sito prospiciente la prima vasca di colmata e all'interno del porto (VE4 + VE5 e VE7 + VE8 + DP) rispetto agli organismi traslocati nel sito di esterno a nord del porto (VN4) (Tabella 3 e Figura 10).

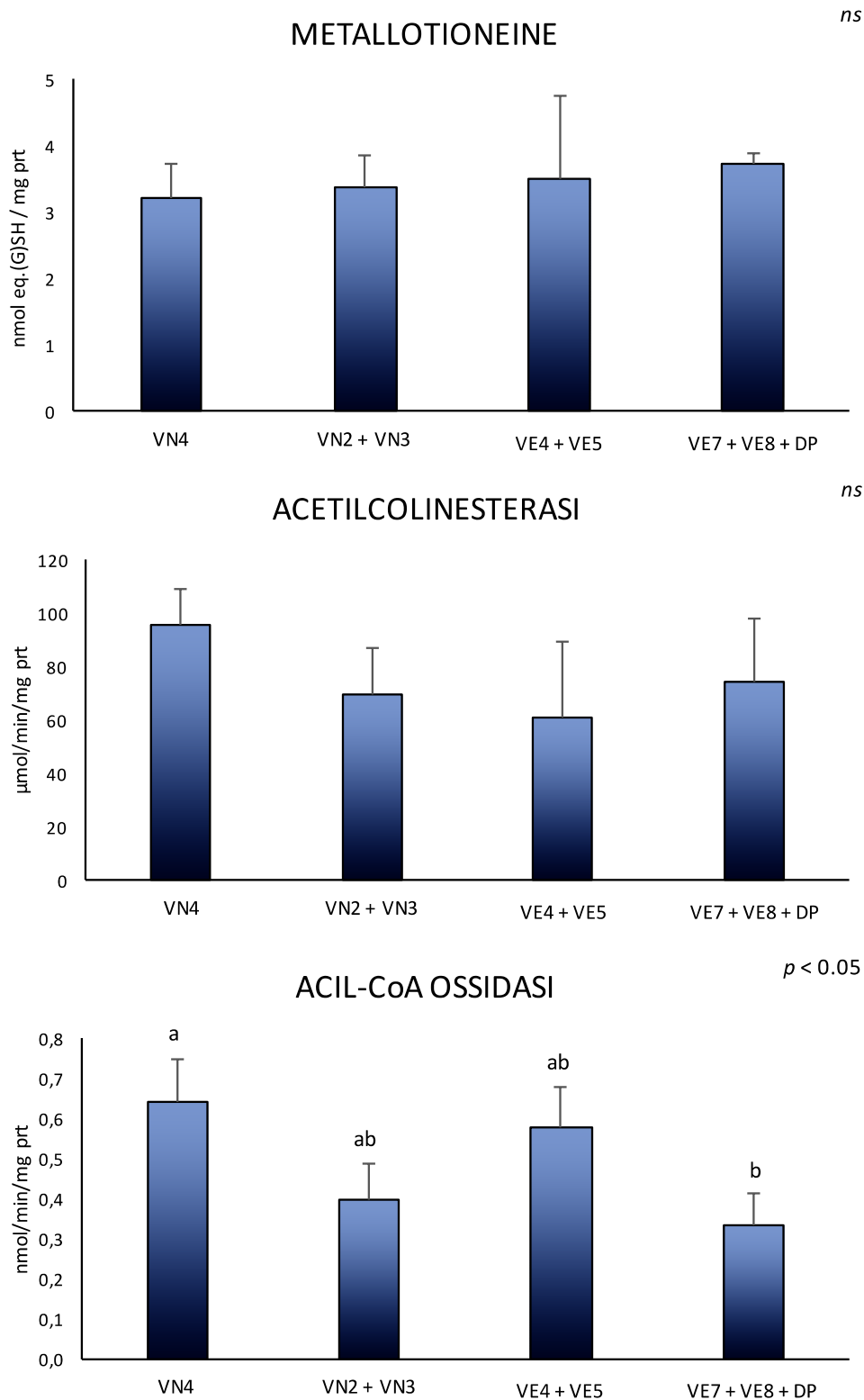
Nell'ambito delle alterazioni lisosomiali, la stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti non varia significativamente negli organismi traslocati nelle diverse aree portuali, con valori che rimangono generalmente bassi e che oscillano tra 45 e 61 minuti (Tabella 3 e Figura 11). Il contenuto di lipofuscina oscilla in media tra livelli di 54 e 116 intensità/ $\mu\text{m}^2$ , mentre i livelli di lipidi neutri sono risultati significativamente più bassi negli organismi dei siti VN2 + VN3, VE4 + VE5, VE7 + VE8 + DP rispetto a quelli del sito VN4 (Tabella 3 e Figura 11). Quest'ultimo risultato, insieme alla diminuzione dei livelli di malondialdeide e all'inibizione dell'enzima acil-CoA ossidasi osservata negli organismi trapiantati nei diversi siti di indagine può suggerire che le variazioni osservate siano ascrivibili più a situazioni di mobilitazione delle riserve energetiche per condizioni fisiologiche-ambientali (es. variata disponibilità di sostanze nutritive nei mitili traslocati nei siti più vicini al porto rispetto al sito più esterno VN4) che ad una condizione di impatto, dovuto all'effetto di contaminanti chimici, sulla salute degli organismi.

L'analisi della frammentazione del DNA non ha mostrato variazioni significative nei mitili traslocati nei diversi siti, con valori medi di frammentazione del DNA (test della cometa) che vanno da 8.85 a 13.20 % (Tabella 3, Figura 12). In maniera analoga, anche la frequenza dei micronuclei non ha mostrato variazioni significative nei mitili traslocati nei diversi siti, con livelli generalmente bassi e che in media variano da 0.75 a 1.24 ‰ (Tabella 3 e Figura 12).

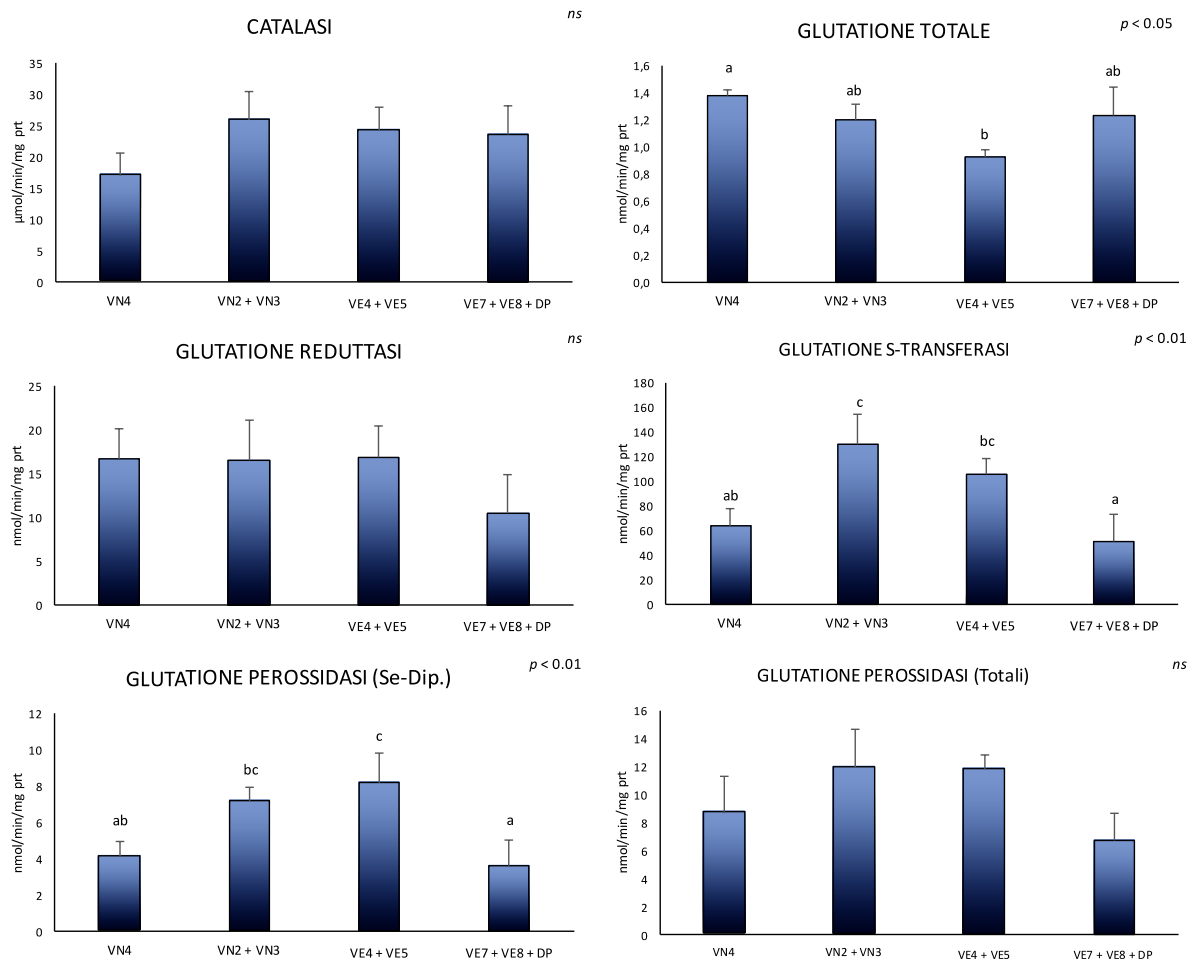
Infine la valutazione dello stress fisiologico degli organismi, analizzato come resistenza all'aria, mostra che i mitili di tutti i siti di traslocazione arrivano a sopravvivere all'aria (mantenuti alla temperatura di 14°C) fino a 17-21 giorni, con quelli del sito VN4 e VN2 + VN3 che risultano leggermente più resistenti con un tempo di mortalità del 50% degli organismi di 10 - 11 giorni rispettivamente contro i 9 giorni misurati per gli organismi provenienti dai siti VE4 + VE5 e VE7 + VE8 + DP (Tabella 3 e Figura 12).

**Tabella 3.** Media e deviazione standard dei biomarker analizzati nei mitili trapiantati nelle diverse aree portuali di Livorno nel 2017 (n=3/5).

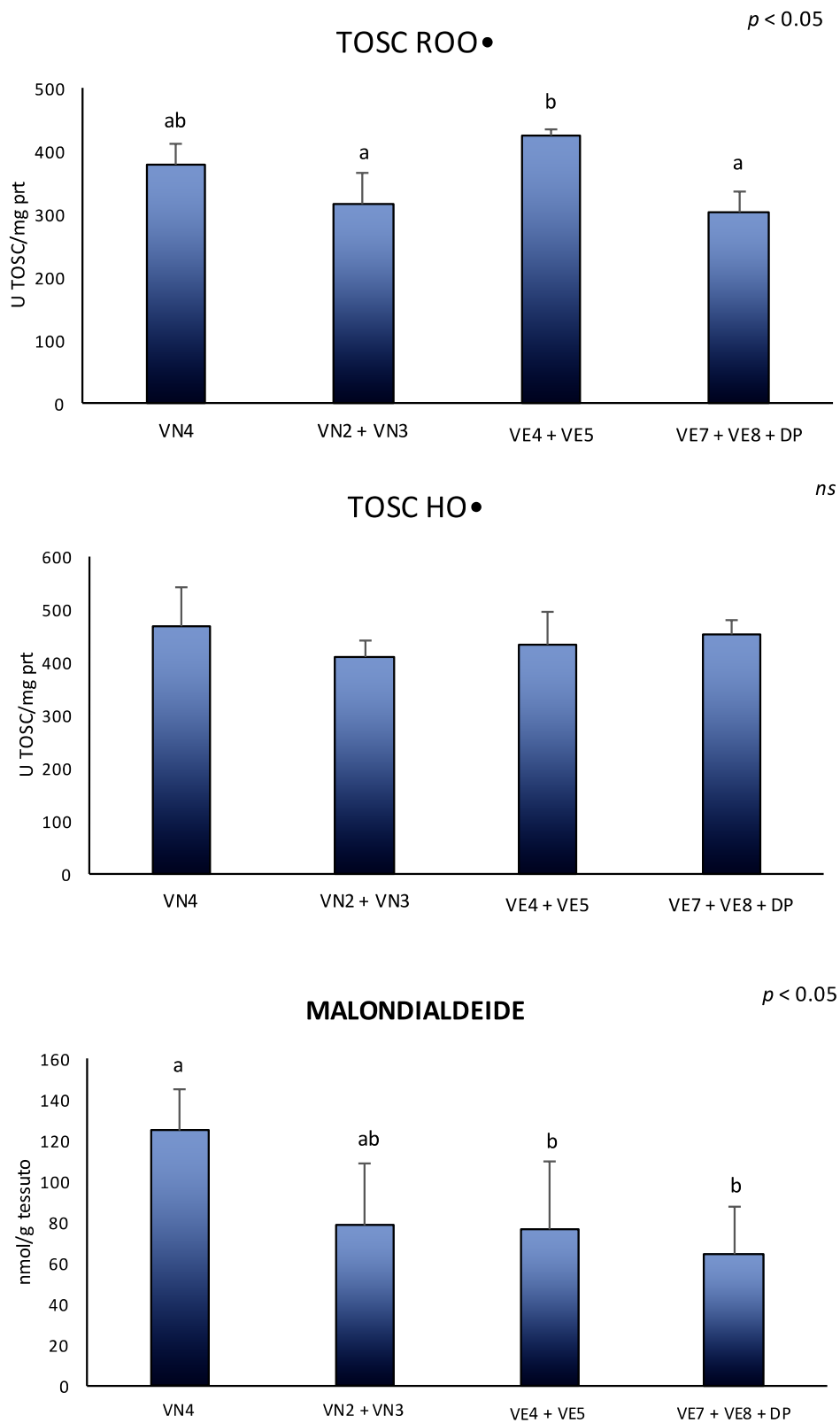
Biomarker	VN4	VN2 + VN3	VE4 + VE5	VE7 + VE8 + DP
Metallotioneine (nmol eq. (G)SH/mg prt)	3.21 ± 0.51	3.38 ± 0.46	3.51 ± 1.25	3.72 ± 0.16
Acetilcolinesterasi (nmol/min/mg prt)	95.91 ± 13.44	69.39 ± 17.18	61.18 ± 28.16	74.03 ± 23.95
Acil-CoA Ossidasi (nmol/min/mg prt)	0.64 ± 0.11	0.40 ± 0.09	0.51 ± 0.21	0.33 ± 0.08
Catalasi (μmol/min/mg prt)	17.02 ± 3.51	25.93 ± 4.59	24.23 ± 3.71	23.61 ± 4.74
Glutazione Totale (μmol/g tessuto)	1.37 ± 0.04	1.19 ± 0.12	0.92 ± 0.05	1.23 ± 0.21
Glutazione Reduttasi (nmol/min/mg prt)	16.62 ± 6.63	16.49 ± 3.63	16.75 ± 2.59	10.45 ± 3.93
Glutazione S-Transferasi (nmol/min/mg prt)	63.38 ± 13.88	129.67 ± 23.84	104.96 ± 13.69	51.09 ± 21.26
Glutazione Perossidasi (Se-Dip.) (nmol/min/mg prt)	4.05 ± 0.92	7.13 ± 0.80	8.13 ± 1.70	3.65 ± 1.36
Glutazione Perossidasi (Totali) (nmol/min/mg prt)	8.61 ± 2.65	11.90 ± 2.72	11.78 ± 1.07	6.76 ± 1.07
TOSC ROO• (U TOSC/mg prt)	377.49 ± 34.49	314.76 ± 49.78	424.26 ± 10.20	301.32 ± 33.51
TOSC HO• (U TOSC/mg prt)	467.40 ± 73.43	411.05 ± 31.23	434.67 ± 60.75	452.35 ± 28.02
Malondialdeide (nmol/g tessuto)	124.59 ± 20.50	78.90 ± 29.83	76.69 ± 32.89	64.29 ± 23.08
Stabilità membrane lisosomiali (min)	45.78 ± 22.01	55.90 ± 13.68	60.87 ± 10.55	45.44 ± 17.91
Lipofuscina (intensità/μm <sup>2</sup> )	78.11 ± 15.71	68.51 ± 11.41	53.72 ± 10.19	115.59 ± 31.43
Lipidi Neutri (intensità/μm <sup>2</sup> )	197.91 ± 61.72	64.88 ± 37.04	26.11 ± 23.79	41.73 ± 22.17
Frammentazione DNA (%)	8.85 ± 3.44	13.20 ± 4.75	10.41 ± 3.32	12.12 ± 2.11
Micronuclei (‰)	0.75 ± 0.65	1.12 ± 0.75	0.87 ± 0.85	1.24 ± 1.04
Test di Sopravvivenza (LT50%)	10	11	9	9



**Figura 8** – Biomaker di risposta specifica analizzati nei tessuti dei mitili trapiantati nelle diverse aree portuali nel Luglio 2017. Metallothioneine nella ghiandola digestiva (nmol eq. (G)SH/mg prt), attività dell'acetilcolinesterasi nell'emolinfa (µmol/min/mg prt) e attività dell'acil-CoA ossidasi nella ghiandola digestiva (nmol/min/mg prt). Dati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (n=3). Lettere differenti indicano differenze significative tra i siti.

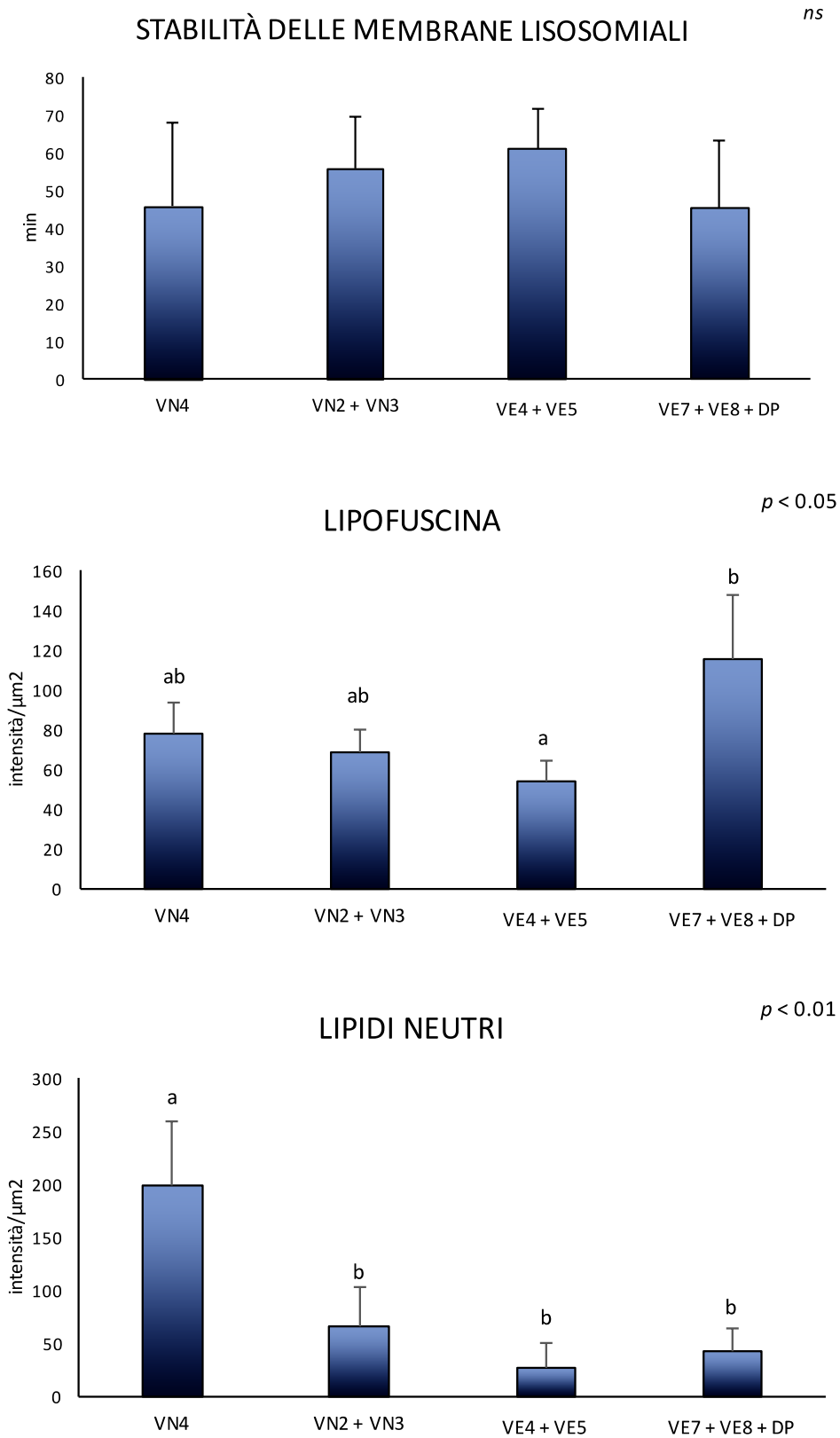


**Figura 9** – Biomaker di stress ossidativo analizzati nella ghiandola digestiva dei mitili trapiantati nelle diverse aree portuali nel Luglio 2017. Attività della catalasi (μmol/min/mg prt), glutazione totale (μmol/g tessuto), attività della glutazione reduttasi (nmol/min/mg prt), della glutazione S-transferasi (nmol/min/mg prt) e delle glutazione perossidasi Se-dipendenti e totali (nmol/min/mg prt). Dati espressi come media ± deviazione standard (n=3). Lettere differenti indicano differenze significative tra i siti.



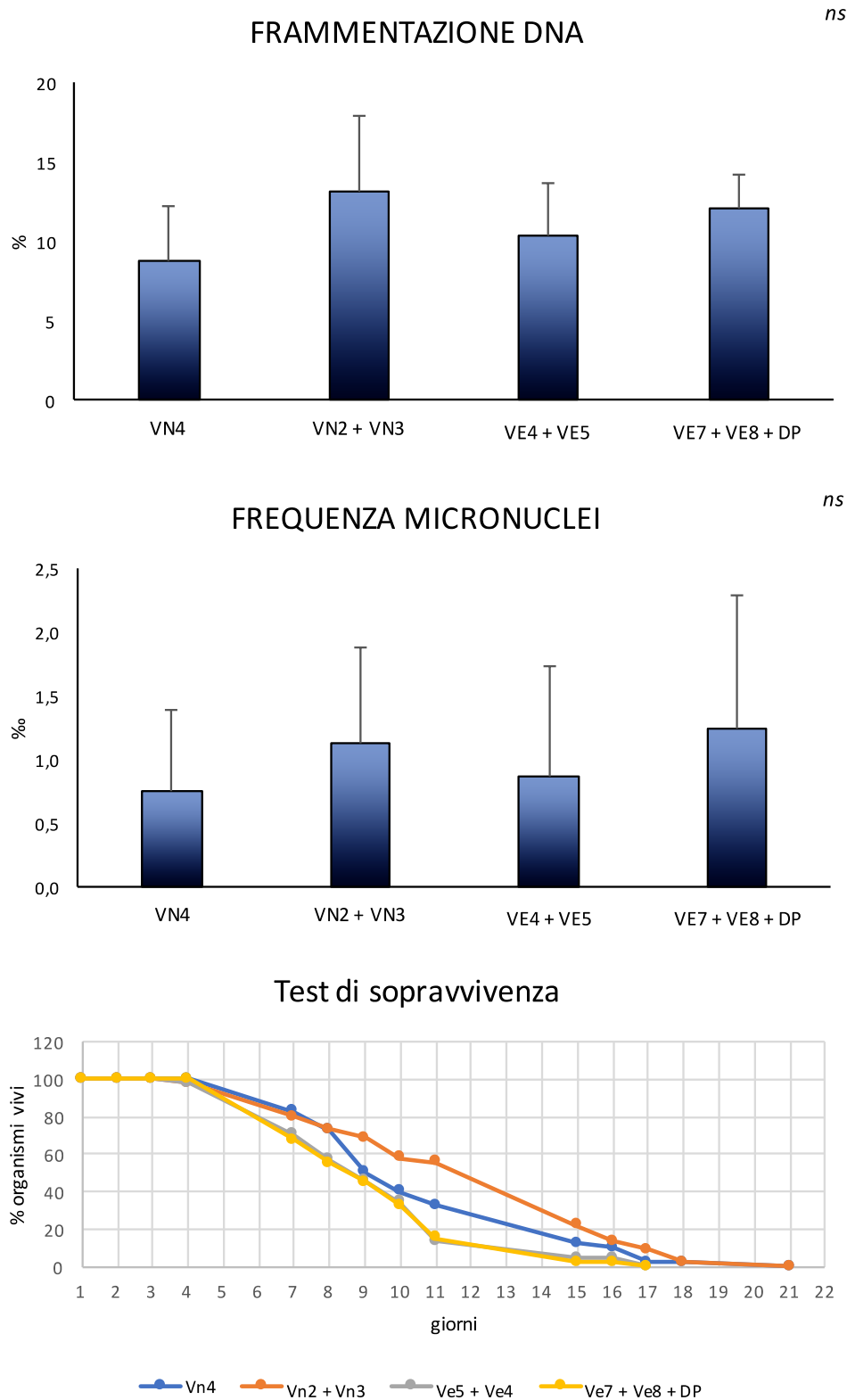
**Figura 10** – Biomaker di stress ossidativo analizzati nella ghiandola digestiva dei mitili trapiantati nelle diverse aree portuali nel Luglio 2017. Capacità antiossidante totale nei confronti del radicale perossilico (TOSC ROO•) e idrossilico (TOSC HO•) (U TOSC/mg prt) e contenuto di malondialdeide (nmol/g tessuto). Dati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (n=3). Lettere differenti indicano differenze significative tra i siti.





**Figura 11** – Biomaker di alterazione lisosomiale analizzati nei tessuti dei mitili trapiantati nelle diverse aree portuali nel Luglio 2017. Stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti (min), lipofuscina e lipidi neutri (intensità/ $\mu\text{m}^2$ ) nella

ghiandola digestiva. Dati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (n=3). Lettere differenti indicano differenze significative tra i siti.



**Figura 12** – Biomarker di danno genotossico analizzati negli emociti e test di sopravvivenza all'aria dei mitili trapiantati nelle diverse aree portuali nel Luglio 2017. Frammentazione del DNA (%) e frequenza dei micronuclei (‰), test di sopravvivenza all'aria. Fatta eccezione del test di sopravvivenza, i dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (n=3). Lettere

differenti indicano differenze significative tra i siti. Per il test di sopravvivenza, le curve rappresentano l'andamento di mortalità nel tempo.

### 3.4. INTEGRAZIONE WEIGHT OF EVIDENCE (WOE)

I dati della chimica dei sedimenti, del bioaccumulo e dei biomarker ottenuti nei mitili traslocati nel porto di Livorno durante la campagna di indagine di giugno 2017 sono stati elaborati con il modello di analisi SediquaSoft che permette di sintetizzare un livello di pericolo specifico per i dati relativi alle tre linee di evidenza analizzate in questo studio, e la loro integrazione complessiva in un livello di pericolo complessivo Weight Of Evidence (WOE).

La LOE-1 è quella relativa alla chimica dei sedimenti, la LOE-2 elabora i dati di biodisponibilità dei contaminanti e la LOE-3 è legata alla valutazione degli effetti sub letali (biomarker); per quanto riguarda la chimica dei sedimenti e il bioaccumulo, nella presente elaborazione sono stati presi in considerazione i livelli di idrocarburi policiclici aromatici (IPA).

Il modello elabora i risultati fornendo un indice quantitativo HQ che viene assegnato ad una di cinque classi di pericolo ("Assente", colore bianco; "Basso", colore celeste; "Medio", colore giallo; "Alto", colore rosso; "Molto Alto", colore nero). L'integrazione dei risultati della LOE-1, LOE-2, LOE-3 fornisce un livello di qualità complessiva (WOE);

Poiché il 2017 rappresenta la fase conclusiva del piano di monitoraggio per le attività connesse alla realizzazione e gestione della seconda vasca di colmata nel porto di Livorno, nelle Tabelle 4-7 e nella carta tematica riportata in Figura 13 vengono forniti i risultati complessivi delle elaborazioni WOE effettuate in tutti i siti per gli anni di indagine 2012, 2013, 2015 e 2017. Durante questi anni i monitoraggi sono stati effettuati sempre nello stesso periodo (maggio-giugno) e in un numero di siti ampio rispetto a quelli scelti per i monitoraggi "ridotti" (che hanno riguardato solo un numero minore di siti di indagine) effettuati negli anni 2014 e 2016, e che per questo motivo abbiamo deciso di non includere in questa comparazione complessiva.

Partendo proprio dai primi anni di indagine, l'integrazione dei risultati della LOE-1, LOE-2 e LOE-3 e la successiva analisi WOE mostra dal 2012 al 2013 una situazione stazionaria, con livelli di pericolo "Assente" o "Basso" per tutti i siti di indagine (Tabelle 4, 5 e Figura 13).

Durante la fase di esercizio del 2015, un generale peggioramento delle condizioni risulta evidente per i siti più interni del porto VE7 e VE8, quelli principalmente coinvolti dalle attività di dragaggio, che passano da un livello di pericolo "Basso" nel 2013 a un livello "Medio" (Tabelle 5, 6 e Figura 13), principalmente a causa degli alti livelli di bioaccumulo nei mitili di alcuni IPA (LOE-2 Bioaccumulo) tra cui l'acenaftilene, il benzo(a)antracene e il pirene.

La situazione sembra in parte rientrare per l'anno di indagine 2017, l'ultimo previsto per questo piano di monitoraggio, per il quale è stato ottenuto un livello di pericolo "Basso" per tutti i siti di indagine.

**Tabella 4.** Livelli di pericolo complessivo (WOE) ottenuti dall'integrazione dei dati della chimica dei sedimenti (LOE-1), bioaccumulo (LOE-2) e biomarker (LOE-3); campagna di indagine 2012.



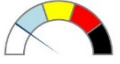
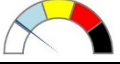

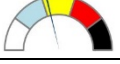




Siti (2012)	LOE-1 Chimica sedimenti	LOE-2 Biodisponibilità	LOE-3 Biomarker	WOE	
VN4	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE	
VN3	ASSENTE	-	BASSO	BASSO	
VN2	ASSENTE	BASSO	BASSO	BASSO	
VE4	ASSENTE	BASSO	MEDIO	BASSO	
VE5	ASSENTE	BASSO	MEDIO	BASSO	
VE7	ASSENTE	BASSO	BASSO	BASSO	
VE8	ASSENTE	-	BASSO	BASSO	
DP	ASSENTE	MEDIO	BASSO	BASSO	
VE1	ASSENTE	BASSO	-	ASSENTE	
VN1	ASSENTE	BASSO	BASSO	BASSO	

**Tabella 5** Livelli di pericolo complessivo (WOE) ottenuti dall'integrazione dei dati della chimica dei sedimenti (LOE-1), bioaccumulo (LOE-2) e biomarker (LOE-3); campagna di indagine 2013.

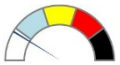
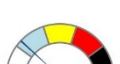
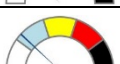
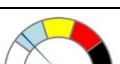
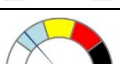
Siti (2013)	LOE-1 Chimica sedimenti	LOE-2 Biodisponibilità	LOE-3 Biomarker	WOE	
VN4	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE	
VN3	ASSENTE	-	BASSO	BASSO	
VN2	ASSENTE	BASSO	BASSO	ASSENTE	
VE4	ASSENTE	BASSO	MEDIO	BASSO	
VE5	ASSENTE	BASSO	MEDIO	BASSO	
VE7	ASSENTE	ALTO	BASSO	BASSO	
VE8	ASSENTE	ALTO	BASSO	BASSO	
DP	ASSENTE	ALTO	BASSO	BASSO	



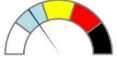
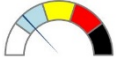
<b>VE1</b>	ASSENTE	ASSENTE	-	ASSENTE	
<b>VN1</b>	ASSENTE	BASSO	MEDIO	BASSO	

**Tabella 6.** Livelli di pericolo complessivo (WOE) ottenuti dall'integrazione dei dati della chimica dei sedimenti (LOE-1), bioaccumulo (LOE-2) e biomarker (LOE-3); campagna di indagine 2015.

<b>Siti (2015)</b>	<b>LOE-1 Chimica sedimenti</b>	<b>LOE-2 Biodisponibilità</b>	<b>LOE-3 Biomarker</b>	<b>WOE</b>	
<b>VN4</b>	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE	
<b>VN3</b>	ASSENTE	ASSENTE	BASSO	ASSENTE	
<b>VN2</b>	ASSENTE	ASSENTE	BASSO	ASSENTE	
<b>VE4</b>	ASSENTE	ASSENTE	BASSO	BASSO	
<b>VE5</b>	ASSENTE	ASSENTE	BASSO	BASSO	
<b>VE7</b>	ASSENTE	ALTO	BASSO	MEDIO	
<b>VE8</b>	ASSENTE	ALTO	BASSO	MEDIO	
<b>DP</b>	ASSENTE	MOLTO ALTO	BASSO	BASSO	
<b>VE1</b>	ASSENTE	ASSENTE	BASSO	ASSENTE	
<b>VN1</b>	ASSENTE	ASSENTE	-	ASSENTE	

**Tabella 7.** Livelli di pericolo complessivo (WOE) ottenuti dall'integrazione dei dati della chimica dei sedimenti (LOE-1), bioaccumulo (LOE-2) e biomarker (LOE-3); campagna di indagine 2017.

<b>Siti (2017)</b>	<b>LOE-1 Chimica sedimenti</b>	<b>LOE-2 Biodisponibilità</b>	<b>LOE-3 Biomarker</b>	<b>WOE</b>	
<b>VN4</b>	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE	
<b>VN3</b>	ASSENTE	ASSENTE	MEDIO	BASSO	
<b>VN2</b>	ASSENTE	ASSENTE	MEDIO	BASSO	
<b>VE4</b>	ASSENTE	BASSO	BASSO	BASSO	
<b>VE5</b>	ASSENTE	BASSO	BASSO	BASSO	

<b>VE7</b>	ASSENTE	ALTO	BASSO	BASSO	
<b>VE8</b>	ASSENTE	MEDIO	BASSO	BASSO	
<b>DP</b>	ASSENTE	MEDIO	BASSO	BASSO	
<b>VE1</b>	ASSENTE	-	-	-	
<b>VN1</b>	ASSENTE	BASSO	-	BASSO	



**Figura 13** – Rappresentazione grafica dei livelli di pericolo complessivo elaborati attraverso il modello di analisi di rischio Sediquissoft per gli anni di indagine 2012-2013-2015-2017.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- Benedetti, M., Ciaprini, F., Piva, F., Onorati, F., Fattorini, D., Notti, A., Ausili, A., Regoli, F. (2012). A multidisciplinary weight of evidence approach toward polluted sediments: integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environ. Int.* 38: 17-28.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F. (2008). Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 89(4), 257–66. doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.011
- Lowe, D., Soverchia, C., & Moore, M. (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic toxicology*, 33, 105–112. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166445X9500015V>
- Moore, M. N., Lowe, D., Köhler, A., 2004. Biological effects of Contaminants: Measurements of lysosomal membrane stability. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences (TIMES)*, 36, ICES, Copenhagen.
- Nesto, N., Bertoldo, M., Nasci, C., Da Ros, L., 2004. Spatial and temporal variation of biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Lagoon of Venice, Italy. *Marine Environmental Research* 58 (2-5), 287-291.
- Nigro, M., Falleni, A., Barga, I.D., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology* 77, 339-347.
- Pampanin, D.M., Volpato, E., Marangon, I., Nasci, C., 2005. Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 140 (1), 41-52.
- Pioppi, M., Gorbi, S., Bocchetti, R., Benedetti, M., Fattorini, D., Notti, A., Razzetti, E.M., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F., Università Politecnica delle Marche, Istituto di Biologia e Genetica, Ancona, ISPRA ex-ICRAM, Livorno, 2008. Approccio ecotossicologico per valutare il rilascio e l'impatto di contaminanti durante le attività di dragaggio nel porto di Livorno.
- Piva, F., Ciaprini, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., Regoli, F., 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: a practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere* 83 (4), 475–485.
- Regoli, F., Winston, G.W., 1999. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxyxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 156 (2), 96-105.
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research* 54, 419–423.
- Regoli F., Pellegrini D., Cicero A.M., Nigro M., Benedetti M., Gorbi S., Fattorini D., D'Errico G., Di Carlo M., Nardi A., Gaion A., Scuderi A., Giuliani S., Romanelli G., Berto D., Trabucco B., Guidi P., Bernardeschi M., Scarcelli V., Frenzilli G. 2014. A multidisciplinary weight of evidence approach for environmental risk



assessment at the Costa Concordia wreck: Integrative indices from Mussel Watch. *Marine Environmental Research* 96, 92-104.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A.C., Orunesu, M., 1995. Stress on stress response: A simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Marine Environmental Research* 39 (1-4), 245-248.

Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, a J., Fong, J. H., & Blanchard, K. a. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free radical biology & medicine*, 24(3), 480-93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9438561>.



# **ALLEGATO 4**

## **Descrizione popolamento bentonico e inquadramento biocenotico**



## INDICE

1	Descrizione del popolamento bentonico ed inquadramento biocenotico	3
2	Analisi faunistica e biocenotica	5
3	Confronto tra le campagne effettuate negli anni precedenti	9
4	Testi bibliografici di riferimento	12



## 1. Descrizione del popolamento bentonico ed inquadramento biocenotico

L'indagine ha portato alla raccolta di 147 individui ed alla determinazione di 36 taxa. I phyla più abbondanti sono rappresentati da policheti, molluschi e crostacei, con percentuali diverse nelle stazioni campionate (Fig.1). Nelle stazioni Vn4 e Ve5 i policheti rappresentano la percentuale maggiore anche se con valori diversi (rispettivamente 70% e 54%). In Vn4 ai policheti seguono come abbondanza i crostacei (27%) e i molluschi (3%). In Ve5 sono invece più abbondanti i molluschi (24%) rispetto ai crostacei (20%), seguiti infine dagli echinodermi (2%). Nella stazione Vn2 risultano invece più abbondanti i crostacei (45%), seguiti da policheti (37%), dai molluschi (13%) ed infine dagli echinodermi (5%).

Di seguito si riportano la lista dei taxa raccolti e determinati (Tab. 1).

**Tabella 1 - Lista dei taxa raccolti**

<p><b>Policheti</b></p>	<p><i>Aponuphis bilineata</i> (Baird, 1870)  <i>Chaetozone setosa</i> Malmgern, 1867  <i>Glycera alba</i> (O.F. Müller, 1776)  <i>Lumbrineris gracilis</i> (Ehlers, 1868)  <i>Lumbrineris tetraura</i> (Schmarda, 1861)  <i>Magelona filiformis</i> Wilson, 1959  <i>Mediomastus fragilis</i> Rasmussen, 1973  <i>Nephtys hombergi</i> Savigny, 1818  <i>Owenia fusiformis</i> Delle Chiaje, 1841  <i>Paradoneis armata</i> Glémarec, 1966  <i>Phyllodoce</i> sp.  <i>Prionospio</i> sp.  <i>Scoloplos (Scoloplos) armiger</i> (O.F. Müller, 1776)  <i>Sigalion mathildae</i> Audouin &amp; Milne-Edwards, 1832  Syllidae ind.</p>
<p><b>Molluschi</b></p>	<p><i>Abra alba</i> (W. Wood, 1802)  <i>Chamelea gallina</i> (Linnaeus, 1758)</p>



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



	<p><i>Donax venustus</i> Poli, 1795</p> <p><i>Dosinia lupinus</i> (Linné, 1758)</p> <p><i>Fustiaria rubescens</i> (Deshayes, 1825)</p> <p><i>Maetra stultorum</i> (Linnaeus, 1758)</p> <p><i>Phaxas adriaticus</i> (Coen, 1933)</p> <p><i>Tellina nitida</i> Poli, 1791</p> <p><i>Tellina pulchella</i> Lamarck, 1818</p>
<b>Crostacei</b>	<p><i>Apsendes latreillii</i> (Milne Edwards, 1828)</p> <p><i>Ampelisca brevicornis</i> A. Costa, 1853)</p> <p><i>Atylus guttatus</i> (A. Costa, 1851)</p> <p><i>Diogenes pugilator</i> (Roux, 1829)</p> <p><i>Iphinoe tenella</i> Sars, 1878</p> <p><i>Leptochelia savignyi</i> (Kroyer, 1842)</p> <p><i>Leucothoe</i> sp.</p> <p><i>Liocarcinus vernalis</i> (Risso, 1827)</p> <p><i>Periculodes long. longimanus</i> (Bate &amp; Westwood, 1868)</p> <p><i>Urothoe grimaldii</i> Chevreux, 1895</p>
<b>Echinodermi</b>	<p><i>Echinocardium cordatum</i> (Pennant, 1777)</p> <p><i>Ophiura albida</i> Forbes, 1839</p>

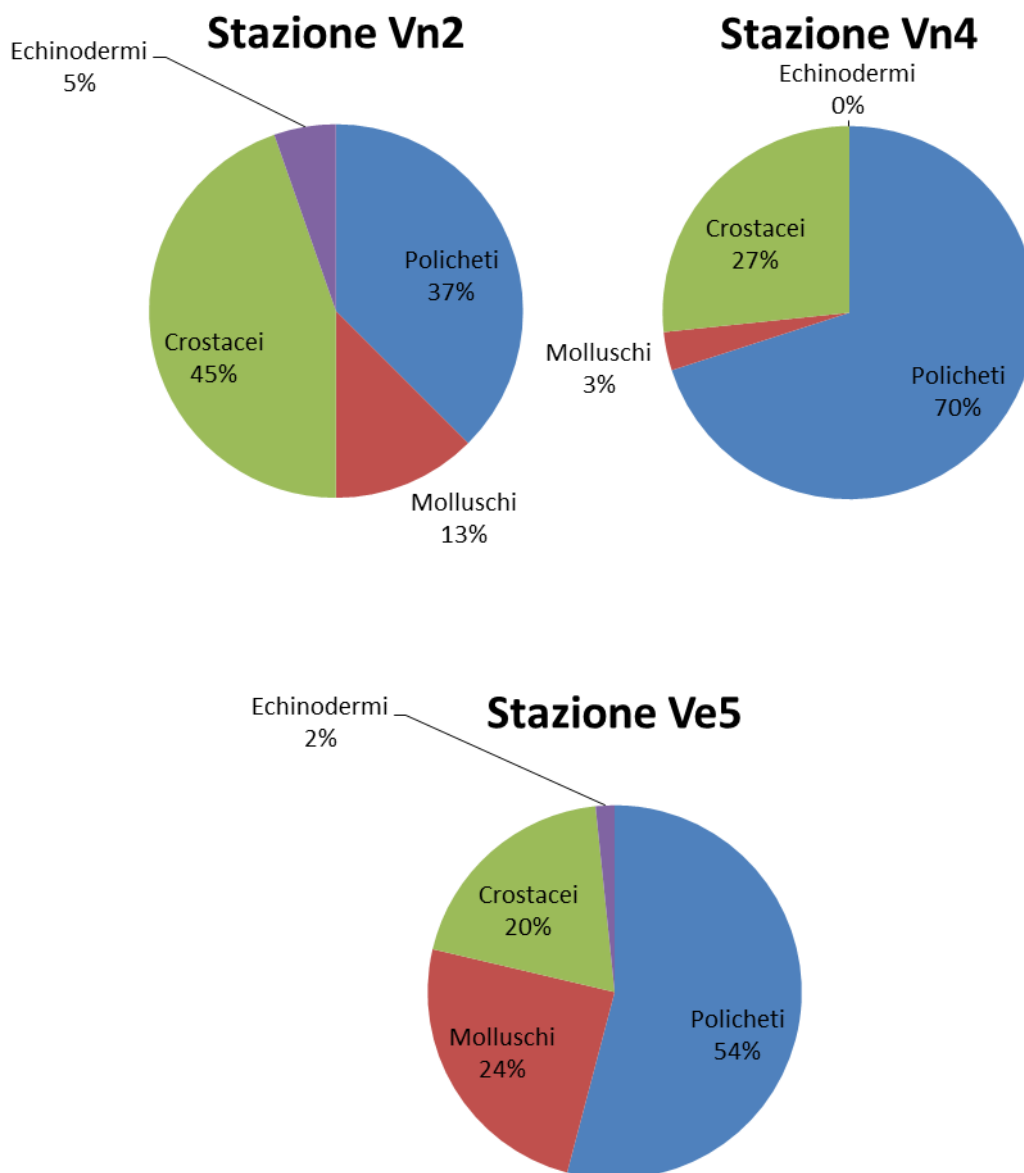


Figura 1 - Percentuali di abbondanza dei taxa trovati

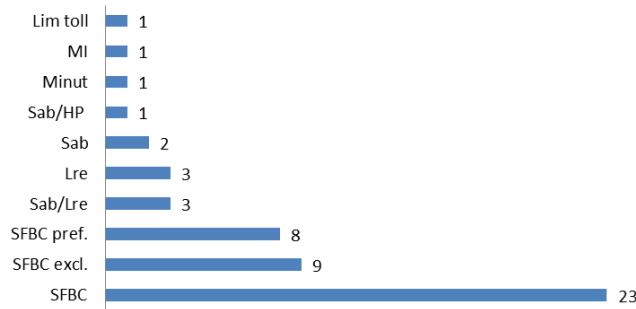
## 2. Analisi faunistica e biocenotica

La stazione Vn4 è risultata più povera sia in termini di abbondanza che di numero di specie, con un numero di organismi (30 individui) circa la metà rispetto alle altre due stazioni, risultate invece simili tra loro. Nelle stazioni Vn2 e Ve5 sono invece stati raccolti rispettivamente 56 e 61 animali.

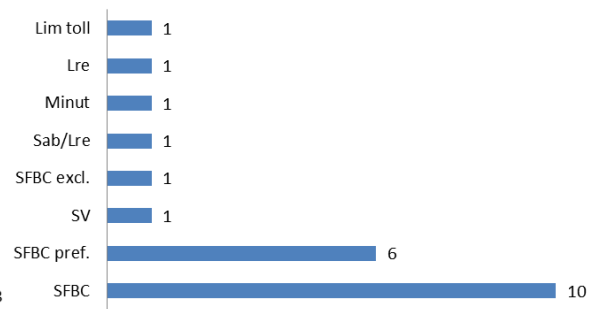
Nella figura 2 sono riportate le affinità biocenotiche e/o le esigenze ecologiche di molte delle specie presenti nelle tre stazioni campionate.



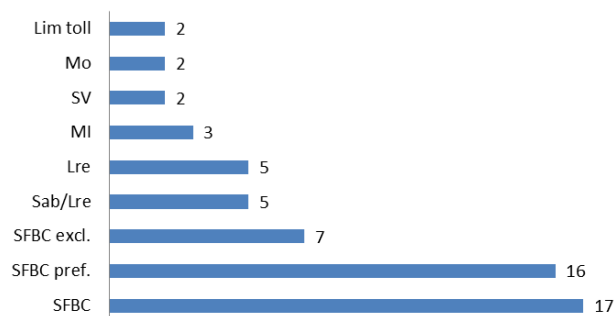
### Stazione Vn2



### Stazione Vn4



### Stazione Ve5



**Figura 2. Biocenosi ed affinità ecologiche individuate in ogni stazione sulla base degli organismi trovati.**

**Minut.:** specie minuticole; **Sab. str.:** specie strettamente sabulicola; **Sab. toll.:** specie sabulicola tollerante; **Lim. toll.:** specie limicole tollerante; **Lre:** specie a larga ripartizione ecologica; **HP:** *Posidonia oceanica*; **MO:** specie indicatrici di decantazione o di elevata presenza di materia organica; **SFBC:** biocenosi delle sabbie fini ben classate; **SV:** sabbie infangate; **SM:** biocenosi delle sabbie mesolitorali; **MI:** biocenosi di fondi mobili instabili; **pref.:** specie preferenziali; **excl.:** specie esclusive.

Risulta evidente la netta prevalenza, in tutte le stazioni, di specie affini alla biocenosi delle sabbie fini ben classate (SFBC), tipica delle zone costiere a fondi mobili. Tra queste troviamo specie esclusive di questa biocenosi come il polichete *Sigalion mathildae*, i molluschi bivalvi *Donax venustus*, *Tellina nitida*, *Tellina pulchella* e *Macra stultorum*. Tra i crostacei *Liocarcinus vernalis* e il paguro *Diogenes pugilator*. Tra le specie preferenziali segnaliamo il bivalve *Chamelea gallina*, i policheti *Paradoneis armata* e *Owenia fusiformis*. Altre specie tipiche della biocenosi SFBC sono i policheti *Scoloplos armiger* e *Nephtys hombergi*, il bivalve *Phaxas adriaticus* ed il gammaride *Ampelisca brevicornis*. Alcune specie sono poi legate al sedimento prevalente, come il polichete *Lumbrineris gracilis* e l'anfipode *Atylus guttatus*.

La vicinanza delle stazioni di campionamento al Porto di Livorno e soprattutto ai corsi d'acqua dolce (Scolmatore dell'Arno) giustifica la presenza di specie come il polichete *Aponuphis bilineata* e il



mollusco *Abra alba*, tipici di sabbie infangate (SV) e di ambienti con elevata sedimentazione e di sostanza organica (MO). Quest'ultimo dato è confermato dalla presenza dello scafopode *Fustiaria rubescens* tipico di ambienti con arricchimento organico (Mo) e dalla presenza del polichete *Chaetozone setosa*.

Si riporta di seguito la lista delle specie presenti nelle stazioni di campionamento (Tab. 2).

**Tabella 2 – Lista specie delle stazioni campionate**

Taxon	Stazione Vn2	Repliche		
		I	II	III
<b>Policheti</b>				
	<i>Glycera alba</i> (O.F. Müller, 1776)	1	0	0
	<i>Lumbrineris gracilis</i> (Ehlers, 1868)	1	0	2
	<i>Lumbrineris tetraura</i> (Schmarda, 1861)	2	0	1
	<i>Magelona filiformis</i> Wilson, 1959	0	0	1
	<i>Nephtys hombergi</i> Savigny, 1818	1	1	0
	<i>Paradoneis armata</i> Glémarec, 1966	1	2	3
	<i>Scoloplos (Scoloplos) armiger</i> (O.F. Müller, 1776)	1	0	0
	<i>Sigalion mathildae</i> Audouin & Milne-Edwards, 1832	1	2	0
	Syllidae ind.	0	0	1
<b>Molluschi</b>				
	<i>Chamelea gallina</i> (Linnaeus, 1758)	0	2	0
	<i>Dosinia lupinus</i> (Linné, 1758)	0	1	0
	<i>Maetra stultorum</i> (Linnaeus, 1758)	0	1	0
	<i>Phaxas adriaticus</i> (Coen, 1933)	1	0	0
	<i>Tellina nitida</i> Poli, 1791	0	1	0
	<i>Tellina pulchella</i> Lamarck, 1818	0	1	0
<b>Crostacei</b>				
	<i>Apsendes latreillii</i> (Milne Edwards, 1828)	2	0	3
	<i>Ampelisca brevicornis</i> A. Costa, 1853)	5	3	0
	<i>Atylus guttatus</i> (A. Costa, 1851)	1	0	0
	<i>Diogenes pugilator</i> (Roux, 1829)	2	1	0
	<i>Iphinoe tenella</i> Sars, 1878	0	1	2
	<i>Periculodes long. longimanus</i> (Bate & Westwood, 1868)	3	1	0
	<i>Urothoe grimaldii</i> Chevreux, 1895	1	0	0
<b>Echinodermi</b>				
	<i>Echinocardium cordatum</i> (Pennant, 1777)	1	0	0





<i>Ophiura albida</i> Forbes, 1839	1	0	1
------------------------------------	---	---	---

Taxon	Stazione Vn4	Repliche		
		I	II	III
<b>Policheti</b>				
	<i>Aponuphis bilineata</i> (Baird, 1870)	0	1	0
	<i>Glycera alba</i> (O.F. Müller, 1776)	0	1	0
	<i>Lumbrineris gracilis</i> (Ehlers, 1868)	0	1	0
	<i>Lumbrineris tetraura</i> (Schmarda, 1861)	0	1	0
	<i>Magelona filiformis</i> Wilson, 1959	0	0	1
	<i>Nephtys hombergi</i> Savigny, 1818	1	1	0
	<i>Owenia fusiformis</i> Delle Chiaje, 1841	0	0	1
	<i>Paradoneis armata</i> Glémarec, 1966	0	4	0
	<i>Phyllodoce</i> sp.	2	1	1
	<i>Prionospio</i> sp.	0	1	3
	<i>Sigalion mathildae</i> Audouin & Milne-Edwards, 1832	1	0	0
<b>Molluschi</b>				
	<i>Abra alba</i> (W. Wood, 1802)	0	0	0
	<i>Chamelea gallina</i> (Linnaeus, 1758)	0	1	0
<b>Crostacei</b>				
	<i>Apseudes latreillii</i> (Milne Edwards, 1828)	0	0	1
	<i>Ampelisca brevicornis</i> A. Costa, 1853)	4	2	1

Taxon	Stazione Ve5	Repliche		
		I	II	III
<b>Policheti</b>				
	<i>Chaetozone setosa</i> Malmgren, 1867	0	1	0
	<i>Glycera alba</i> (O.F. Müller, 1776)	0	1	1
	<i>Lumbrineris gracilis</i> (Ehlers, 1868)	1	3	1
	<i>Lumbrineris tetraura</i> (Schmarda, 1861)	1	0	3
	<i>Mediomastus fragilis</i> Rasmussen, 1973	0	1	0
	<i>Nephtys hombergi</i> Savigny, 1818	1	0	5
	<i>Owenia fusiformis</i> Delle Chiaje, 1841	3	0	1
	<i>Paradoneis armata</i> Glémarec, 1966	4	0	5
	<i>Scoloplos (Scoloplos) armiger</i> (O.F. Müller, 1776)	1	0	0
	Syllidae ind.	0	0	0



<b>Molluschi</b>				
	<i>Abra alba</i> (W. Wood, 1802)	0	1	1
	<i>Chamelea gallina</i> (Linnaeus, 1758)	1	0	2
	<i>Donax venustus</i> Poli, 1795	0	0	1
	<i>Dosinia lupinus</i> (Linné, 1758)	1	1	1
	<i>Fustiaria rubescens</i> (Deshayes, 1825)	0	0	1
	<i>Tellina nitida</i> Poli, 1791	0	3	0
	<i>Tellina pulchella</i> Lamarck, 1818	0	1	1
<b>Crostacei</b>				
	<i>Apseudes latreillii</i> (Milne Edwards, 1828)	1	1	0
	<i>Ampelisca brevicornis</i> A. Costa, 1853)	2	4	1
	<i>Leptochelia savignyi</i> (Kroyer, 1842)	0	1	0
	<i>Leucothoe</i> sp.	0	0	1
	<i>Liocarcinus vernalis</i> (Risso, 1827)	0	0	1
<b>Echinodermi</b>				
	<i>Echinocardium cordatum</i> (Pennant, 1777)	0	1	0

### 3. Confronto tra le campagne effettuate negli anni precedenti

Si riporta di seguito un confronto delle analisi dei popolamenti bentonici effettuate dal 2012 al 2017, durante le fasi di monitoraggio dell'area antistante il Porto di Livorno interessata dalla realizzazione, a nord di esso, e dall'utilizzo della seconda vasca di colmata destinata alla raccolta di fanghi di escavo. Le stazioni sono state individuate ad una distanza dalla costa e ad una profondità simile. Una a nord (Vn4) considerata meno influenzata dalle attività delle vasche (controllo), una stazione collocata davanti alla seconda vasca di colmata (Vn2) ed una stazione in prossimità dell'imboccatura nord del porto e davanti alla prima vasca di colmata (Ve5).

Le abbondanze totali degli organismi nelle cinque campagne svolte risultano variabili ma senza un trend definito. Sebbene nel 2016 e 2017 siano state rilevate abbondanze minori, ciò è probabilmente dovuto ad una naturale variabilità stagionale o alla particolare eterogeneità fisico-chimica dell'area, determinata dalla presenza del porto e dallo sbocco del canale dello scolmatore del fiume Arno. Le abbondanze registrate sono state di 1161 individui raccolti nel 2012, 2856 nel 2013, 513 nel 2014, 1334 nel 2015, 340 nel 2016 e 147 nel 2017.

Tale variabilità si riscontra anche tra le tre stazioni di campionamento dove, anche in questo caso non è possibile individuare una tendenza particolarmente significativa. Il numero di taxa identificati risulta sempre intorno a 50 ad eccezione della prima campagna dove si ha un valore più alto (78 taxa) e nelle ultime due dove troviamo un valori più basso (41 e 36 taxa rispettivamente).



Dalla analisi biocenotica emerge una generale omogeneità del popolamento indagato, sia tra le stazioni considerate che nelle diverse campagne effettuate. La costante prevalenza di specie esclusive, preferenziali o comunque tipiche della biocenosi delle *sabbie fini ben classate* (SFBC) ascrive il popolamento presente a questa particolare biocenosi, tipica di fondi sabbiosi a granulometria costante soprattutto presenti su bassi fondali prospicienti alla costa. Tuttavia il continuo apporto di sedimenti terrigeni determina nell'intera area una variabilità delle condizioni sedimentologiche nei fondali vicini al porto e un aumento dei valori di sostanza organica. Ciò giustifica la presenza, in tutte le stazioni ed in numero variabile nelle campagne svolte, di specie tipiche di sabbie infangate, di ambienti ad elevata sedimentazione o indicatrici di arricchimento organico. Questo non permette di avere una biocenosi SFBC ben stabile, come invece avviene in aree meno soggette ad apporti terrigeni, naturali o di origine antropica.

Nell'area di indagine le componenti tassonomiche dominanti sono rappresentate da policheti e molluschi bivalvi. In termini di numero di specie i policheti dominano il popolamento studiato condizione questa tipica dei fondi mobili e non solo. In termini di abbondanza questo gruppo è dominante soprattutto per la presenza, più volte registrata durante le campagne di monitoraggio, del polichete *Owenia fusiformis*, specie molto comune in questi tipi di ambienti a prevalenza sabbiosa e tollerante agli aumenti di torbidità, agli ambienti instabili e con fluttuazioni della salinità. Questo organismo, in condizioni ad esso favorevoli, può essere presente anche con densità molto elevate. Altri policheti presenti con elevate abbondanze sono *Paradoneis armata* e *Melinna palmata*; la prima tipica delle biocenosi a sabbie fini ben classate e sempre presente nei campionamenti effettuati, mentre la seconda risulta la specie più abbondante nel campionamento del 2015 ed è tipica di ambienti instabili influenzati da apporto di sedimenti molto fini (silt). Quest'ultima è una specie a strategia *r* e quando il reclutamento coincide con condizioni ideali può raggiungere picchi di abbondanza molto elevati, per poi scomparire al ripristino delle condizioni originali. Altri policheti presenti, seppure con abbondanze minori, sono *Sigalion mathildae*, *Nephtys hombergi*, *Prinospio malmgreni* e *Onuphis eremita*, tutti abitatori preferenziali o esclusivi delle biocenosi SFBC.

Per quanto riguarda i molluschi bivalvi la dominanza da parte di questa componente è soprattutto dovuta al reclutamento e quindi alla particolare abbondanza, registrata in alcune campagne, di individui giovanili. Le specie più comuni e abbondanti sono *Tellina nitida*, *Spisula subtruncata*, *Dosinia lupinus* e *Chamelea gallina* anch'esse tipiche di fondi sabbiosi fini e in alcuni casi il bivalve *Corbula gibba*, indicatore di presenza di sostanza organica e di apporto di sedimenti fangosi.

Per concludere, la conformazione della costa e soprattutto le influenze naturali ed antropiche sull'area determinano una elevata variabilità delle condizioni idrologiche e chimico fisiche delle acque e nella

composizione sedimentologica dei fondali. L'area è sottoposta a variazioni stagionali più o meno importanti della salinità e della torbidità e della composizione granulometrica del sedimento. Quest'ultimo ha una naturale prevalenza di sabbia fine e una variabile presenza di sedimento fangoso proveniente dal vicino porto e soprattutto dal canale dello scolmatore. Queste condizioni permettono l'istaurarsi di un popolamento parzialmente stabile (biocenosi SFBC) a cui si accompagnano specie opportuniste adattate ad ambienti instabili e che determinano una certa variabilità nella composizione specifica e nelle abbondanze. È, in sintesi, un popolamento in grado di reagire a variazioni, anche estreme, delle condizioni ambientali.

Durante i cinque anni di monitoraggio, non si evidenziano particolari modifiche nella composizione specifica e biocenotica del popolamento presente nell'area e quindi non si rilevano variazioni imputabili alla realizzazione o alla presenza delle due vasche di colmata. Eventuali influenze di queste opere portuali sulla composizione del popolamento bentonico potrebbero essere state mascherate dalla normale variabilità dell'intera area, tuttavia anche il confronto tra le stazioni vicine alle vasche e quella di controllo posta più a nord, non ha mai rilevato differenze significative. Tali effetti dunque, se eventualmente presenti, non sono mai risultati superiori a quelle che normalmente determinano variazioni nella composizione qualitativa e quantitativa dei popolamenti bentonici locali.

#### 4. Testi bibliografici di riferimento

Clarke K.R., Warwick R.M. (1994). Similarity-based testing for community pattern: the 2-way layout with no replication. *Mar. Biol.*, 118: 167-176.

Pèrés J.M., Picard J. (1964). Nouveau manuel de bionomie benthique de la Mer Méditerranée. *Rec. Trav. Stat. Mar. Endoume*, 31 (47): 5-137.

Picard J. (1965). Recherches qualitatives sur les biocoenoses marines des substrats meubles dragables de la région marseillaise. *Rec. Trav. Stat. Mar. Endoume*, 36 (52): 1-160.

AA.VV. (2001). Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003). ICRAM, Min. dell'Ambiente e della Tutela del Territorio. 128pp.

Agosto 2019



**SIDRA**

Dredging, Marine  
& Environmental Solutions

**MONITORAGGIO AMBIENTALE DELLE  
ATTIVITA' DI RIPROFILATURA DEL CANALE  
D'ACCESSO - SPONDA LATO DARSENA  
TOSCANA - DEL PORTO DI LIVORNO**



CONSORZIO PER IL CENTRO INTERUNIVERSITARIO DI BIOLOGIA MARINA ED ECOLOGIA APPLICATA - LIVORNO

**Cliente: SIDRA S.p.A. Dredging, Marine & Environmental Solutions**  
**Via Carlo Zucchi 25, 00165 Roma**

**Titolo: MONITORAGGIO AMBIENTALE DELLE ATTIVITA' DI RIPROFILATURA DEL  
CANALE D'ACCESSO - SPONDA LATO DARSENA TOSCANA - DEL PORTO DI  
LIVORNO**

---

Responsabile: Nicola Bigongiari

Personale impiegato

Attività di campionamento: Marco Pertusati, Lorenzo Pacciardi, Carlo Ceccarelli

Rilievi con sonda multiparametrica: Marco Pertusati

Analisi metalli e solidi sospesi: Susanna Dell'Ira

Analisi ecotossicologiche: Ludmila Kozinkova, Sonia Polese, Matteo Oliva

Stesura report: Nicola Bigongiari

22929-1	Rev. 0	13.08.19	Trasmissione cliente	NB	CP
N° relazione	Revisione	Data	Descrizione revisione	Preparato e verificato	Approvato

## INDICE

<b>PREMESSA.....</b>	<b>3</b>
<b>Capitolo 1 - Campionamento .....</b>	<b>4</b>
<b>Capitolo 2 – Materiali e metodi .....</b>	<b>6</b>
<b>Capitolo 3 - Risultati .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 – Analisi solidi sospesi .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2 – Analisi ecotossicologiche .....</b>	<b>8</b>
<b>3.3 – Sonda multiparametrica.....</b>	<b>14</b>
<b>Considerazioni conclusive .....</b>	<b>24</b>



## PREMESSA

Il presente studio riguarda il monitoraggio della qualità delle acque portuali interessate dai lavori di riprofilatura del Canale d'Accesso (sponda lato Darsena Toscana) del Porto di Livorno. Le attività di monitoraggio hanno valutato, in particolare, la risospensione dei materiali, l'aumento della torbidità, l'eventuale mobilizzazione dei contaminanti e le loro interazioni con il biota.

Le operazioni di controllo sono state effettuate prima dell'inizio dei lavori di dragaggio (Fase *ante operam*), durante i lavori di dragaggio (Fase in corso d'opera) e dopo il termine dei lavori (Fase *post operam*).

## Capitolo 1 - Campionamento

Il monitoraggio delle attività di riprofilatura della sponda del Canale d'Accesso e del refluento in vasca di colmata, sono state effettuate in tre stazioni denominate CA1, CA2 e CA3, disposte lungo un transetto (dall'interno verso l'esterno del porto), nello specchio acqueo in prossimità dell'area di dragaggio e dell'area di sversamento dei materiali dragati ubicata in prossimità della Darsena Petroli (vedi figura sottostante).



Nella tabella sottostante si riportano le coordinate delle stazioni:

Stazione	Coordinate	
CA1	4824835.00 N	605648.00 E
CA2	4824340.00 N	605257.00 E
CA3	4823751.00 N	604739.00 E

La campagna di monitoraggio è stata articolata in tre fasi:

1. Fase *ante operam*, prima dell'inizio del dragaggio
2. Fase *in corso d'opera* durante i lavori di dragaggio
3. Fase *post operam* al termine del dragaggio

Per ciascuna fase e in ciascuna stazione sono state effettuate le seguenti determinazioni:

- Solidi sospesi
- Saggi biologici con *Paracentrotus lividus*, *Vibrio fischeri* e *Dunaliella tertiolecta*

I prelievi di acqua sono stati effettuati mediante una bottiglia “Niskin” calata manualmente da un operatore; tali prelievi sono stati eseguiti nel livello superficiale e in quello profondo della colonna d’acqua e successivamente le due aliquote così raccolte sono state miscelate tra loro al fine di ottenere un unico campione rappresentativo dell’intera colonna d’acqua. L’acqua raccolta è stata posta all’interno di contenitori decontaminati in HDPE che sono stati trasportati e conservati fino all’inizio delle analisi alla temperatura di 4-6 °C.

Nelle stesse stazioni è stato effettuato anche il rilievo dei principali parametri chimico-fisici della colonna d’acqua mediante una sonda multiparametrica della Idromarambiente MAR-3.



Bottiglia Niskin



Sonda multiparametrica Idromarambiente MAR-3

Il campionamento delle acque sono stati realizzati secondo il seguente cronoprogramma:

Fase	Data	Attività
<i>Ante operam</i>	7 giugno 2019	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Solidi sospesi</li> <li>2. Saggio biologico con <i>Paracentrotus lividus</i></li> <li>3. Saggio biologico con <i>Vibrio fischeri</i></li> <li>4. Saggio biologico con <i>P. tricornutum</i></li> </ol>
Corso d’opera	1 luglio 2019	
<i>Post operam</i>	30 luglio 2019	

## Capitolo 2 - Materiali e metodi

**Solidi sospesi:** APAT CNR IRSA 2090 B Man. 29/2003

**Saggio di embriotossicità con *P. lividus*** (EPA/600/R-95/136) o *C. gigas* (ASTM E724-98:2004)

**Saggio di inibizione della crescita algale con *P. tricornutum*:** ISO 10253:2006

**Saggio di inibizione della bioluminescenza col batterio *Vibrio fischeri*:** ISO11348-3 (2007)

**Sonda multiparametrica:** Idromarambiente MAR-3

Specifiche tecniche dei sensori della sonda multiparametrica impiegata:

PARAMETRO	CAMPO DI MISURA	ACCURATEZZA	RISOLUZIONE
Pressione	0÷100 dbar	0.1 dbar	0.002 dbar
Temperatura	-2÷38 °C	0.01 °C	0.0007 °C
Conducibilità	0÷70 mS/cm	0.02 mS/cm	0.0015 ms/cm
Ossigeno disciolto	0÷150 %sat	1.0 %sat	0.002 %sat
pH	2÷12	0.05	0.0002
Redox	-1÷1 V	1 mV	0.03 mV
Torbidità	0÷100 FTU	0.05 FTU	0.002 FTU
Clorofilla 'a'	0÷50 mg/m <sup>3</sup>	0.05 mg/m <sup>3</sup>	0.001 mg/m <sup>3</sup>

### Criteri per la valutazione dei risultati

**Classificazione della tossicità** - La stima della tossicità dei saggi biologici impiegati è stata effettuata sulla base dei criteri riportati nella tabella seguente dove per ciascun saggio sono state individuate 4 classi di tossicità.

<i>P. tricornutum</i>	<i>P. lividus</i>	<i>V. fischeri</i>	Classe Tossicità
EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90%	EC20 ≥ 90%	Tossicità assente/trascurabile
EC20 < 90% e EC50 >100%	EC20 < 90% e EC50 >100%	EC20 < 90% e EC50 ≥90%	Tossicità media
40% ≤ EC50 < 100%	40% ≤ EC50 < 100%	20% ≤ EC50 < 90%	Tossicità alta
EC50 < 40%	EC50 < 40%	EC50 < 20%	Tossicità molto alta

Seguendo un criterio cautelativo, un campione viene classificato tossico nel caso in cui anche un solo saggio biologico manifesti tossicità, indipendentemente dal risultato degli altri saggi. Questo criterio essendo particolarmente cautelativo tende a sovrastimare la tossicità soprattutto qualora vengano impiegati organismi-test ed end-point molto sensibili.

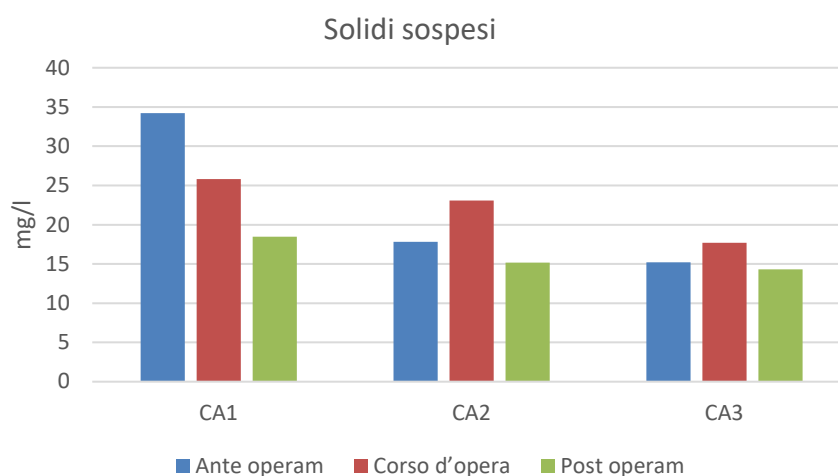
## Capitolo 3 - Risultati

### 3.1 - Analisi solidi sospesi

#### Solidi sospesi (mg/l)

Stazione	<i>Ante operam</i>	<i>Corso d'opera</i>	<i>Post operam</i>
CA1	34,2	25,8	18,5
CA2	17,8	23,1	15,2
CA3	15,2	17,7	14,3

Di seguito, al fine di una migliore visualizzazione dei risultati, si riportano gli istogrammi delle concentrazioni dei solidi sospesi:



## 3.2 - Analisi ecotossicologiche

### Fase *Ante operam* - 7 GIUGNO 2019

#### Parametri chimico-fisici misurati nei campioni di acqua di mare

Campione	Salinità (%)	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	38	8,09	6,00
CA1/1	38	7,73	5,98
CA2/1	38	7,93	5,87
CA3/1	38	7,98	6,01

#### Saggio biologico con *Paracentrotus lividus* (sviluppo embrionale)

QA-QC – Il test eseguito con la sostanza di riferimento ha fornito una EC<sub>50</sub> di 19,35 µg l<sup>-1</sup> di Cu<sup>2+</sup> (LC=18,11 e UC=20,66), che rientra nei limiti della carta di controllo del laboratorio. La percentuale media degli embrioni allo stadio di pluteo nel campione di controllo (85 ± 1,15%) è risultata conforme, in quanto superiore al limite del 75% e inferiore al limite del 95%.

Campione	Conc. %	% media plutei (± dev.st. %)	% media embrioni non sviluppati	Corr. ABBOTT (embrioni non sviluppati)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	85 ± 1,15	15	-	-	-
CA1/1	100	19 ± 1,15	81	77		
	50	38 ± 5,51	62	56	22,2	46,9
	25	69 ± 1,53	31	20		
CA2/1	100	60 ± 1,53	40	29		
	50	72 ± 1,53	28	16	65,1	>100
	25	81 ± 1,00	19	5		
CA3/1	100	57 ± 2,08	43	33		
	50	77 ± 2,08	23	9	73,8	>100
	25	81 ± 1,15	19	5		

### Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

QA-QC - Il valore della EC50 (15') = 10,82 mg/l (LC=7,88 e UC=14,86) ottenuto con la sostanza di riferimento Zn<sup>2+</sup> rientra nei limiti della carta di controllo del laboratorio.

Campione	% Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (%) (15')	EC20 (%) (30')	EC50 (%) (15')	EC50 (%) (30')
CA1/1	11,51	11,51	>90	>90	>90	>90
CA2/1	19,03	19,03	>90	>90	>90	>90
CA3/1	22,39	22,09	>90	>90	>90	>90

### Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

QA-QC - Il valore EC50 = 4,06 mg/l (LC=3,56 e UC=4,58) ottenuto con la sostanza di riferimento (Cr<sub>2</sub>K<sub>2</sub>O<sub>7</sub> come Cr<sup>2+</sup>) rientra nei limiti di carta di controllo del laboratorio

Campione	Densità algale media alla max concentrazione (n. cellule ± DS)	ΔG 72 h %	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	343333 ± 20817		-	-
CA1/1	663333 ± 20817	93,20**	>100	>100
CA2/1	753333 ± 20817	119,42**	>100	>100
CA3/1	446667 ± 35119	30,10*	>100	>100

\*Biostimolazione \*\* Biostimolazione molto significativa (>40%)

### Stima della tossicità – fase *ante operam*

Stazione	<i>Paracentrotus lividus</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
CA1/1	Media	Assente	Assente
CA2/1	Media	Assente	Assente
CA3/1	Alta	Assente	Assente

## Fase in Corso d'opera – 1 LUGLIO 2019

### Parametri chimico-fisici misurati nei campioni di acqua di mare

Campione	Salinità (‰)	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	36	8,19	6,09
CA1/2	38	8,08	6,03
CA2/2	38	8,10	5,78
CA3/2	38	8,13	5,83

### Saggio biologico con *Paracentrotus lividus* (sviluppo embrionale)

QA-QC – Il test eseguito con la sostanza di riferimento ha fornito una EC<sub>50</sub> di 18,32µg l<sup>-1</sup> di Cu<sup>2+</sup> (LC=16,99 e UC=19,75) che rientra nei limiti della carta di controllo del laboratorio. La percentuale media degli embrioni allo stadio di pluteo nel campione di controllo (81 ± 1,15%) è risultata conforme, in quanto superiore al limite del 75% e inferiore al limite del 95%.

Campione	Conc. %	% media plutei (± dev.st. %)	% media embrioni non sviluppati	Corr. ABBOTT (embrioni non sviluppati)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	81 ± 1,15	19	-	-	-
CA1/2	100	19 ± 2,08	46	37	67,8	>100
	50	38 ± 2,52	28	16		
	25	69 ± 1,53	22	8		
CA2/2	100	60 ± 1,53	38	28	76,8	>100
	50	72 ± 1,15	31	19		
	25	81 ± 2,08	21	8		
CA3/2	100	57 ± 1,00	44	34	62,4	>100
	50	77 ± 1,53	33	21		
	25	81 ± 1,00	21	7		



### Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

QA-QC - Il valore della EC50 (15') = 11,00 mg/l (LC=8,67 e UC=13,95) ottenuto con la sostanza di riferimento Zn<sup>2+</sup> rientra nei limiti della carta di controllo del laboratorio.

Campione	% Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (%) (15')	EC20 (%) (30')	EC50 (%) (15')	EC50 (%) (30')
CA1/2	-2,56	-3,75	>90	>90	>90	>90
CA2/2	4,66	0,86	>90	>90	>90	>90
CA3/2	1,71	0,06	>90	>90	>90	>90

### Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

QA-QC - Il valore EC50 = 3,80 mg/l (2,98 - 4,01) ottenuto con la sostanza di riferimento (Cr<sub>2</sub>K<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. come Cr<sup>2+</sup>) rientra nei limiti di carta di controllo del laboratorio

Campione	Densità algale media alla max concentrazione (n. cellule ± DS)	ΔG 72 h %	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	646667 ± 15275		-	-
CA1/2	693333 ± 11547	7,22	>100	>100
CA2/2	886667 ± 5774	37,11*	>100	>100
CA3/2	786667 ± 20817	21,65*	>100	>100

\* Biostimolazione

### Stima della tossicità – fase in corso d'opera

Stazione	<i>Paracentrotus lividus</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
CA1/2	Media	Assente	Assente
CA2/2	Media	Assente	Assente
CA3/2	Media	Assente	Assente

## Fase *Post-operam* - 30 LUGLIO 2019

### Parametri chimico-fisici misurati nei campioni di acqua di mare

Campione	Salinità (‰)	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	36	8,13	6,00
CA1/3	38	8,13	6,03
CA2/3	38	8,17	6,00
CA3/3	38	8,19	5,99

### Saggio biologico con *Paracentrotus lividus* (sviluppo embrionale)

QA-QC – Il test eseguito con la sostanza di riferimento ha fornito una EC<sub>50</sub> di 18,32 µg/l di Cu<sup>2+</sup> (LC=16,99 e UC=19,75 µg/l) che rientra nei limiti della carta di controllo del laboratorio. La percentuale media degli embrioni allo stadio di pluteo nel campione di controllo (81% ± 1,15) è risultata conforme in quanto superiore al limite del 75% e inferiore al limite del 95%.

Campione	Conc. %	% media plutei (± dev.st. %)	% media embrioni non sviluppati	Corr. ABBOTT (embrioni non sviluppati)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	81 ± 1,15	19	-	-	-
CA1/3	100	45 ± 2,08	55	47		
	50	67 ± 2,52	33	21	55,1	>100
	25	79 ± 1,53	21	7		
CA2/3	100	53 ± 1,53	47	38		
	50	67 ± 1,15	33	21	59,4	>100
	25	80 ± 2,08	20	6		
CA3/3	100	43 ± 1,00	57	49		
	50	63 ± 1,53	37	27	48,3	>100
	25	79 ± 1,00	21	7		

### Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

QA-QC - Il valore della EC50 (15') = 8,67 mg/l (LC=7,68 e UC=9,80) ottenuto con la sostanza di riferimento Zn<sup>2+</sup> rientra nei limiti della carta di controllo del laboratorio.

Campione	% Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (%) (15')	EC20 (%) (30')	EC50 (%) (15')	EC50 (%) (30')
CA1/3	-11,19	-11,56	>90	>90	>90	>90
CA2/3	-7,29	-7,33	>90	>90	>90	>90
CA3/3	-6,60	-6,70	>90	>90	>90	>90

### Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

QA-QC - Il valore EC50 = 4,06 mg/l (LC=3,56 e UC=4,58) ottenuto con la sostanza di riferimento (Cr<sub>2</sub>K<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. come Cr<sup>2+</sup>) rientra nei limiti di carta di controllo del laboratorio

Campione	Densità algale media alla max concentrazione (n. cellule ± DS)	ΔG 72 h %	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	646667 ± 15275		-	-
CA1/3	950000 ± 30000	46,91**	>100	>100
CA2/3	833333 ± 45092	28,87*	>100	>100
CA3/3	863333 ± 23094	33,51*	>100	>100

\*Biostimolazione      \*\* Biostimolazione molto significativa (>40%)

### Stima della tossicità – fase *post-operam*

Stazione	<i>Paracentrotus lividus</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
CA1/3	Media	Assente	Assente
CA2/3	Media	Assente	Assente
CA3/3	Media	Assente	Assente

## Analisi ecotossicologiche - quadro sinottico della tossicità

Si riporta di seguito una rappresentazione schematica riassuntiva della tossicità espressa dalla batteria di saggi biologici impiegata, secondo il criterio di assegnare il peggior giudizio espresso dal singolo test.

Stazione	Fase ante-operam 07/06/2019	Fase in corso d'opera 01/07/2019	Fase post-operam 30/07/2019
CA1	Media	Media	Media
CA2	Media	Media	Media
CA3	Alta	Media	Media

Come si osserva dalla tabella sopra esposta, in tutte le stazioni per l'intero periodo di monitoraggio, è presente un effetto tossico nelle acque portuali che però sembra essere indipendente dalle attività di dragaggio in quanto una tossicità medio-alta è stata rilevata anche prima dell'inizio dei lavori. Si evidenzia tuttavia che tale effetto tossico è stato messo in evidenza solamente dal saggio di embriotossicità con *Paracentrotus lividus* ma non dagli altri due saggi effettuati.

### 3.3 - Sonda multiparametrica

Nelle pagine seguenti si riportano i dati di Temperatura, Ossigeno, Potenziale redox, Torbidità, pH, Clorofilla A e Salinità, rilevati con la sonda multiparametrica nelle tre fasi di monitoraggio.

## SONDA MULTIPARAMETRICA - FASE ANTE OPERAM - 7 GIUGNO 2019

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C (mS/cm)	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (µg/l)	S (‰)	Oss. (mg/l)
CA1	0,5	19,99	48,84	79,03	8,02	210,07	23,25	1,93	35,77	5,82
CA1	1,0	19,95	48,78	78,85	8,02	210,20	22,91	2,14	35,75	5,82
CA1	1,5	19,92	48,82	79,10	8,01	209,63	23,34	2,29	35,82	5,83
CA1	2,0	19,91	48,82	79,37	8,01	210,27	23,14	2,39	35,82	5,85
CA1	2,5	19,84	48,84	79,15	8,01	209,84	25,22	2,32	35,89	5,84
CA1	3,0	19,84	48,78	79,16	8,01	209,84	27,06	2,28	35,85	5,84
CA1	3,5	19,79	48,76	79,23	8,01	210,03	27,86	2,28	35,88	5,85
CA1	4,0	19,78	48,75	79,15	8,01	209,70	30,07	2,32	35,88	5,85
CA1	4,5	19,76	48,72	79,04	8,01	209,70	30,00	2,16	35,87	5,84
CA1	5,0	19,75	48,73	79,09	8,01	209,70	32,30	2,08	35,88	5,85
CA1	5,5	19,77	48,73	79,15	8,01	209,56	30,99	2,19	35,86	5,85
CA1	6,0	19,75	48,72	79,21	8,01	209,84	30,05	2,11	35,87	5,86
CA1	6,5	19,75	48,73	79,24	8,01	209,27	30,47	2,19	35,88	5,86
CA1	7,0	19,75	48,71	79,26	8,01	210,20	30,19	2,12	35,87	5,86
CA1	7,5	19,72	48,73	79,25	8,01	209,27	29,05	2,11	35,91	5,86
CA1	8,0	19,75	48,71	79,27	8,01	209,27	30,10	2,10	35,87	5,86
CA1	8,5	19,74	48,71	79,42	8,01	209,42	31,05	2,24	35,87	5,88
CA1	9,0	19,72	48,70	79,42	8,01	209,63	32,47	2,14	35,88	5,88
CA1	9,5	19,72	48,70	79,54	8,01	209,13	32,59	2,09	35,89	5,88
CA1	10,0	19,72	48,68	79,52	8,01	209,98	30,36	2,15	35,86	5,88
CA1	10,5	19,68	48,68	79,48	8,01	209,70	31,53	2,16	35,90	5,88
CA1	11,0	19,71	48,70	79,55	8,01	209,63	30,28	2,23	35,89	5,88
CA1	11,5	19,73	48,70	79,56	8,01	209,84	30,93	2,15	35,87	5,88
CA1	12,0	19,71	48,65	79,99	8,01	209,78	31,83	2,22	35,85	5,92
CA1	12,5	19,71	48,68	79,76	8,01	209,93	31,47	2,21	35,87	5,90
CA1	13,0	19,72	48,68	79,77	8,01	209,63	31,83	2,19	35,87	5,90
CA1	13,5	19,71	48,65	79,75	8,01	209,70	29,44	2,18	35,85	5,90

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA2	0,5	19,92	48,94	92,21	8,05	203,58	13,15	1,44	35,87	6,77
CA2	1,0	19,94	48,92	92,10	8,05	203,26	13,14	1,51	35,88	6,78
CA2	1,5	19,90	48,86	91,94	8,05	203,15	13,18	1,48	35,86	6,78
CA2	2,0	19,91	48,90	91,82	8,05	202,80	13,22	1,70	35,89	6,77
CA2	2,5	19,96	48,95	91,84	8,05	203,86	12,35	1,69	35,88	6,76
CA2	3,0	19,93	48,94	92,14	8,05	203,72	13,23	1,85	35,90	6,79

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C (mS/cm)	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (µg/l)	S (‰)	Oss. (mg/l)
CA2	3,5	19,91	48,93	92,58	8,05	203,15	13,49	2,05	35,91	6,82
CA2	4,0	19,92	48,90	92,53	8,04	203,01	13,63	2,12	35,88	6,82
CA2	4,5	19,95	48,99	92,55	8,04	203,43	12,57	2,19	35,92	6,81
CA2	5,0	19,93	48,95	92,58	8,04	203,40	12,60	2,20	35,92	6,82
CA2	5,5	19,91	48,93	92,61	8,04	203,34	13,67	2,19	35,91	6,82
CA2	6,0	19,88	48,91	92,77	8,04	203,43	13,38	2,23	35,92	6,84
CA2	6,5	19,88	48,93	92,64	8,04	203,69	13,16	2,13	35,94	6,83
CA2	7,0	19,87	48,93	92,66	8,05	202,94	15,10	2,10	35,95	6,83
CA2	7,5	19,86	48,92	92,60	8,05	202,54	15,31	2,18	35,93	6,83
CA2	8,0	19,85	48,90	92,52	8,04	203,43	14,87	2,21	35,93	6,82
CA2	8,5	19,81	48,83	92,57	8,04	203,43	15,82	2,20	35,91	6,83
CA2	9,0	19,81	48,84	92,53	8,05	203,29	14,56	2,28	35,92	6,83
CA2	9,5	19,79	48,84	92,32	8,05	203,34	17,06	2,13	35,93	6,82
CA2	10,0	19,75	48,80	92,20	8,05	203,43	17,11	2,22	35,94	6,81
CA2	10,5	19,77	48,82	92,34	8,04	203,58	18,34	2,30	35,94	6,83
CA2	11,0	19,74	48,82	92,22	8,05	203,23	15,54	2,39	35,96	6,82
CA2	11,5	19,65	48,81	91,95	8,05	204,01	18,02	2,20	36,03	6,80
CA2	12,0	19,67	48,80	91,97	8,06	203,51	18,10	2,14	36,01	6,80
CA2	12,5	19,67	48,81	92,13	8,06	203,65	12,04	2,22	36,02	6,82
CA2	13,0	19,57	48,78	92,06	8,06	203,65	12,28	2,09	36,07	6,82

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA3	0,5	20,10	50,42	103,80	8,09	200,26	6,36	2,37	36,87	7,56
CA3	1,0	20,08	50,31	103,84	8,09	200,30	6,36	2,44	36,91	7,58
CA3	1,5	20,02	50,21	103,69	8,09	200,45	6,49	2,42	36,87	7,59
CA3	2,0	20,02	50,20	103,67	8,09	200,38	6,65	2,78	36,86	7,58
CA3	2,5	20,00	50,19	103,85	8,09	200,45	6,45	3,01	36,87	7,60
CA3	3,0	20,00	50,19	103,93	8,09	200,16	6,38	3,35	36,87	7,60
CA3	3,5	20,00	50,24	104,10	8,09	200,73	6,64	3,17	36,91	7,61
CA3	4,0	20,01	50,28	104,21	8,09	200,94	5,84	3,25	36,93	7,62
CA3	4,5	20,00	50,27	104,29	8,09	200,87	5,81	3,49	36,94	7,63
CA3	5,0	19,94	50,25	104,60	8,09	200,45	6,23	3,33	36,98	7,66
CA3	5,5	19,91	50,19	104,74	8,09	200,52	5,97	3,40	36,95	7,67
CA3	6,0	19,90	50,20	104,67	8,09	200,55	6,12	3,30	36,96	7,67
CA3	6,5	19,89	50,18	104,78	8,09	199,67	5,72	3,31	36,96	7,68
CA3	7,0	19,85	50,12	104,52	8,09	200,54	6,03	3,61	36,95	7,66
CA3	7,5	19,82	50,10	104,35	8,09	200,73	6,55	3,41	36,96	7,66
CA3	8,0	19,79	50,08	104,24	8,09	200,80	7,02	4,09	36,97	7,65
CA3	8,5	19,75	50,04	104,12	8,10	201,16	6,42	3,56	36,97	7,65

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA3	9,0	19,67	50,00	103,94	8,10	200,68	6,15	3,23	37,00	7,64
CA3	9,5	19,58	49,92	103,61	8,10	201,09	6,27	3,03	37,02	7,63
CA3	10,0	19,44	49,87	103,23	8,10	201,11	7,03	2,76	37,09	7,62
CA3	10,5	19,35	49,83	102,70	8,11	200,96	6,79	2,11	37,15	7,59
CA3	11,0	19,29	49,79	102,45	8,11	201,09	6,47	2,11	37,16	7,58
CA3	11,5	19,23	49,78	102,81	8,11	201,09	6,50	1,56	37,21	7,61

#### Parametri statistici della torbidità (valori espressi in NTU) – FASE ANTE-OPERAM

Di seguito si riportano i valori della torbidità media ( $\pm$  la deviazione standard) rilevata lungo la colonna d'acqua, la mediana cioè il valore di torbidità che nella distribuzione dei dati occupa la posizione centrale e il valore al 90° percentile cioè il valore sotto il quale si trovano il 90 % delle osservazioni.

STAZIONE	MEDIA	MEDIANA	90° PERC.
CA1	29,25 $\pm$ 3,05	30,19	32,02
CA2	14,42 $\pm$ 1,94	13,56	17,57
CA3	6,36 $\pm$ 0,35	6,36	6,76

## SONDA MULTIPARAMETRICA - FASE IN CORSO D'OPERA - 1 LUGLIO 2019

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C (mS/cm)	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (µg/l)	S (‰)	Oss. (mg/l)
CA1	0,0	22,26	51,57	78,73	7,86	190,78	18,60	0,79	36,06	5,52
CA1	0,5	22,24	51,52	78,70	7,86	190,32	19,65	0,87	36,03	5,53
CA1	1,0	22,23	51,48	78,71	7,86	190,14	19,15	1,24	36,02	5,53
CA1	1,5	22,20	51,45	78,93	7,86	189,92	18,14	1,35	36,01	5,54
CA1	2,0	22,20	51,43	78,96	7,85	189,71	19,32	1,39	35,99	5,55
CA1	2,5	22,18	51,40	78,81	7,85	190,67	18,64	1,37	35,99	5,54
CA1	3,0	22,19	51,39	78,94	7,84	190,92	18,96	1,36	35,97	5,55
CA1	3,5	22,19	51,36	79,50	7,84	191,12	19,86	1,40	35,94	5,59
CA1	4,0	22,18	51,32	80,14	7,84	191,10	18,97	1,42	35,92	5,63
CA1	4,5	22,18	51,31	80,06	7,84	191,21	18,99	1,46	35,92	5,63
CA1	5,0	22,19	51,29	80,07	7,83	191,35	19,00	1,49	35,90	5,63
CA1	5,5	22,17	51,25	80,07	7,81	191,99	19,22	1,43	35,88	5,63
CA1	6,0	22,18	51,26	80,20	7,73	191,80	19,31	1,45	35,88	5,64
CA1	6,5	22,16	51,23	80,23	7,70	191,88	19,27	1,40	35,87	5,65
CA1	7,0	22,16	51,23	80,17	7,69	191,80	20,02	1,43	35,87	5,64
CA1	7,5	22,13	51,19	80,16	7,65	192,32	21,53	1,42	35,86	5,64
CA1	8,0	22,11	51,17	80,11	7,56	192,49	21,80	1,43	35,86	5,64
CA1	8,5	22,13	51,19	80,11	7,47	192,84	22,59	1,43	35,87	5,64
CA1	9,0	22,13	51,19	80,28	7,37	192,68	22,61	1,41	35,86	5,65
CA1	9,5	22,13	51,21	80,42	7,24	192,52	20,91	1,40	35,88	5,66
CA1	10,0	22,07	51,15	80,31	7,17	193,34	19,02	1,37	35,88	5,66
CA1	10,5	22,05	51,14	80,15	7,14	193,27	19,46	1,34	35,89	5,65
CA1	11,0	22,05	51,14	80,09	7,11	193,48	20,95	1,34	35,89	5,65
CA1	11,5	22,05	51,17	80,10	7,11	193,58	20,61	1,34	35,91	5,65
CA1	12,0	22,04	51,17	80,16	7,13	193,54	20,19	1,36	35,92	5,65
CA1	12,5	22,05	51,17	80,28	7,14	193,98	21,20	1,36	35,91	5,66
CA1	13,0	22,03	51,18	80,25	7,14	194,08	22,33	1,29	35,93	5,66
CA1	13,5	22,03	51,19	80,25	7,14	194,15	25,37	1,40	35,94	5,66

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA2	0,0	23,61	53,21	94,36	7,85	202,31	6,19	1,11	36,22	6,50
CA2	0,5	23,36	52,91	93,29	7,84	201,77	8,44	1,16	36,19	6,45
CA2	1,0	23,06	52,65	90,29	7,82	201,85	10,97	1,26	36,24	6,28
CA2	1,5	23,01	52,64	89,98	7,81	202,49	10,86	1,34	36,27	6,26
CA2	2,0	23,03	52,67	90,26	7,80	202,68	10,68	1,60	36,28	6,28
CA2	2,5	22,96	52,61	90,20	7,79	202,57	11,39	1,73	36,29	6,28
CA2	3,0	22,77	52,45	88,42	7,78	202,59	12,63	1,71	36,33	6,18



STAZIONE	P (m)	T (°C)	C (mS/cm)	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (µg/l)	S (‰)	Oss. (mg/l)
CA2	3,5	22,60	52,32	87,01	7,76	203,14	14,18	1,62	36,35	6,09
CA2	4,0	22,54	52,29	86,06	7,74	203,19	14,35	1,51	36,38	6,03
CA2	4,5	22,50	52,29	85,77	7,72	203,34	14,90	1,55	36,42	6,01
CA2	5,0	22,48	52,26	85,67	7,70	203,23	15,93	1,69	36,42	6,01
CA2	5,5	22,40	52,21	84,84	7,67	203,80	16,27	1,92	36,44	5,96
CA2	6,0	22,36	52,20	84,11	7,64	203,50	17,38	1,94	36,46	5,91
CA2	6,5	22,31	52,14	83,98	7,62	203,84	16,19	1,81	36,46	5,91
CA2	7,0	22,23	52,09	83,92	7,61	203,91	15,54	1,56	36,49	5,91
CA2	7,5	22,21	52,08	84,01	7,59	204,30	16,21	1,57	36,50	5,92
CA2	8,0	22,21	52,08	84,05	7,58	204,34	15,77	1,52	36,50	5,92
CA2	8,5	22,18	52,05	84,07	7,57	204,56	16,21	1,42	36,50	5,93
CA2	9,0	22,16	52,03	84,01	7,57	204,62	16,09	1,33	36,51	5,93
CA2	9,5	22,15	52,01	84,17	7,56	204,37	16,10	1,33	36,50	5,94
CA2	10,0	22,12	52,02	84,18	7,55	204,66	15,69	1,33	36,53	5,94
CA2	10,5	22,11	52,00	84,10	7,53	204,91	16,23	1,34	36,52	5,94
CA2	11,0	22,09	51,99	83,90	7,51	204,82	16,26	1,31	36,53	5,92
CA2	11,5	22,08	52,00	83,80	7,49	204,54	16,42	1,31	36,54	5,92
CA2	12,0	22,06	51,98	83,88	7,48	205,01	17,56	1,34	36,54	5,92
CA2	12,5	22,05	51,98	83,70	7,47	205,12	16,37	1,35	36,55	5,91
CA2	13,0	22,05	51,99	83,70	7,45	205,21	17,17	1,39	36,56	5,91
CA2	13,5	22,04	51,97	83,75	7,43	205,37	16,58	1,40	36,55	5,92

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA3	0,0	24,55	53,42	108,27	8,00	208,51	2,98	1,18	36,61	7,32
CA3	0,5	24,47	53,31	106,66	7,99	208,36	3,30	1,28	36,59	7,22
CA3	1,0	24,27	53,06	105,30	7,99	208,57	3,37	1,43	36,57	7,16
CA3	1,5	24,10	52,83	104,09	7,98	208,61	3,94	1,67	36,53	7,10
CA3	2,0	23,58	52,18	100,95	7,96	209,03	4,70	2,00	36,47	6,95
CA3	2,5	23,04	51,49	98,27	7,95	209,53	5,26	2,31	36,38	6,83
CA3	3,0	22,86	51,37	95,36	7,93	209,71	5,23	2,52	36,43	6,65
CA3	3,5	22,80	51,37	94,44	7,92	209,54	5,34	2,81	36,49	6,59
CA3	4,0	22,71	51,28	93,16	7,90	209,82	5,05	2,75	36,49	6,51
CA3	4,5	22,65	51,24	92,42	7,88	209,85	5,30	2,73	36,50	6,46
CA3	5,0	22,64	51,26	92,52	7,86	210,05	5,35	2,73	36,53	6,47
CA3	5,5	22,63	51,26	92,09	7,84	210,00	5,53	2,69	36,54	6,44
CA3	6,0	22,63	51,28	91,84	7,81	210,28	5,47	2,73	36,55	6,42
CA3	6,5	22,55	51,17	91,64	7,78	209,96	5,64	2,93	36,54	6,42
CA3	7,0	22,51	51,13	91,44	7,76	210,24	5,33	2,78	36,54	6,41
CA3	7,5	22,24	50,86	90,77	7,74	209,88	6,03	2,32	36,55	6,39
CA3	8,0	21,97	50,61	89,43	7,72	210,32	6,62	1,85	36,59	6,33

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA3	8,5	21,84	50,53	87,14	7,70	211,21	7,15	1,79	36,63	6,18
CA3	9,0	21,80	50,48	85,91	7,69	210,99	7,63	1,76	36,63	6,10
CA3	9,5	21,71	50,38	85,01	7,69	211,09	8,07	1,62	36,62	6,04
CA3	10,0	21,61	50,27	84,05	7,68	211,31	7,67	1,54	36,62	5,98
CA3	10,5	21,53	50,18	83,80	7,67	211,28	8,29	1,52	36,61	5,97
CA3	11,0	21,44	50,12	83,28	7,65	211,32	8,43	1,47	36,64	5,95

### Parametri statistici della torbidità (valori espressi in NTU) – FASE IN CORSO D'OPERA

Di seguito si riportano i valori della torbidità media ( $\pm$  la deviazione standard) rilevata lungo la colonna d'acqua, la mediana cioè il valore di torbidità che nella distribuzione dei dati occupa la posizione centrale e il valore al 90° percentile cioè il valore sotto il quale si trovano il 90 % delle osservazioni.

STAZIONE	MEDIA	MEDIANA	90° PERC.
CA1	20,20 $\pm$ 1,63	19,56	22,41
CA2	14,59 $\pm$ 2,89	16,01	16,76
CA3	5,73 $\pm$ 1,58	5,73	7,99

### SONDA MULTIPARAMETRICA - FASE POST OPERAM – 30 LUGLIO 2019

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA1-3	0	24,99	55,26	97,91	7,85	216,04	15,60	1,37	36,65	6,57
CA1-3	0,5	25,01	55,16	96,82	7,86	214,95	15,37	1,35	36,55	6,50
CA1-3	1,0	24,99	55,09	96,73	7,85	215,13	15,60	1,41	36,52	6,50
CA1-3	1,5	24,99	55,08	96,60	7,85	215,06	14,94	1,50	36,51	6,49
CA1-3	2,0	24,97	55,08	97,38	7,85	215,17	13,96	1,46	36,52	6,54
CA1-3	2,5	24,98	55,07	97,85	7,85	215,48	13,85	1,46	36,51	6,57
CA1-3	3,0	24,93	55,04	98,29	7,84	215,63	14,16	1,36	36,53	6,61
CA1-3	3,5	24,93	55,04	98,84	7,82	215,54	14,11	1,41	36,52	6,64
CA1-3	4,0	24,93	55,04	98,94	7,80	215,64	14,24	1,44	36,53	6,65
CA1-3	4,5	24,93	55,05	98,87	7,77	215,86	14,33	1,45	36,53	6,65
CA1-3	5,0	24,89	55,04	98,82	7,75	215,83	14,01	1,39	36,56	6,65
CA1-3	5,5	24,85	55,01	98,71	7,73	216,12	14,18	1,38	36,57	6,64
CA1-3	6,0	24,85	55,04	98,99	7,66	216,02	13,30	1,31	36,59	6,66
CA1-3	6,5	24,85	55,07	99,26	7,56	216,03	13,30	1,34	36,61	6,68
CA1-3	7,0	24,80	55,01	99,17	7,52	216,36	14,32	1,31	36,61	6,68
CA1-3	7,5	24,77	54,98	99,01	7,50	216,45	15,11	1,33	36,61	6,67
CA1-3	8,0	24,72	54,96	99,28	7,50	216,78	15,41	1,24	36,63	6,69
CA1-3	8,5	24,67	54,93	99,24	7,48	216,57	16,15	1,26	36,66	6,70
CA1-3	9,0	24,62	54,91	99,14	7,47	216,78	16,37	1,29	36,68	6,70
CA1-3	9,5	24,60	54,91	99,06	7,47	216,22	16,76	1,30	36,70	6,69
CA1-3	10,0	24,58	54,89	98,99	7,45	216,89	18,64	1,28	36,69	6,69
CA1-3	10,5	24,52	54,84	98,93	7,42	216,99	17,91	1,28	36,70	6,69
CA1-3	11,0	24,50	54,84	98,72	7,40	216,85	19,70	1,35	36,72	6,68
CA1-3	11,5	24,47	54,83	98,62	7,37	216,85	20,28	1,31	36,74	6,67
CA1-3	12,0	24,44	54,82	98,55	7,35	216,82	19,59	1,31	36,76	6,67
CA1-3	12,5	24,29	54,69	98,21	7,30	216,96	23,43	1,23	36,79	6,67
CA1-3	13,0	23,96	54,54	98,17	7,25	217,18	23,78	1,17	36,94	6,70
CA1-3	13,5	23,78	54,46	98,59	7,22	217,71	28,96	1,09	37,03	6,74

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA2-3	0,0	24,92	55,58	101,45	7,80	214,27	11,17	1,44	36,94	6,80
CA2-3	0,5	24,93	55,48	101,72	7,80	213,99	10,99	1,42	36,85	6,82
CA2-3	1,0	24,91	55,43	101,93	7,80	213,63	11,30	1,43	36,84	6,84
CA2-3	1,5	24,90	55,38	101,81	7,79	213,79	11,71	1,42	36,81	6,84
CA2-3	2,0	24,89	55,36	101,44	7,78	213,58	11,62	1,42	36,80	6,81

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA2-3	2,5	24,87	55,34	101,51	7,77	213,46	11,69	1,45	36,80	6,82
CA2-3	3,0	24,86	55,32	101,53	7,75	213,89	12,04	1,46	36,79	6,82
CA2-3	3,5	24,83	55,32	101,30	7,73	213,89	12,16	1,57	36,82	6,81
CA2-3	4,0	24,81	55,30	100,95	7,71	214,08	12,00	1,51	36,82	6,79
CA2-3	4,5	24,70	55,25	100,30	7,70	213,88	11,14	1,56	36,87	6,75
CA2-3	5,0	24,52	55,16	100,09	7,69	214,10	13,21	1,51	36,95	6,76
CA2-3	5,5	24,44	55,11	99,98	7,68	213,92	11,68	1,56	36,98	6,76
CA2-3	6,0	24,31	55,05	99,64	7,67	214,45	11,00	1,46	37,04	6,75
CA2-3	6,5	24,25	55,07	100,16	7,68	214,47	10,09	1,49	37,11	6,79
CA2-3	7,0	24,09	55,01	99,65	7,68	214,29	10,49	1,38	37,19	6,77
CA2-3	7,5	24,04	54,99	100,39	7,68	214,39	11,19	1,37	37,22	6,82
CA2-3	8,0	24,02	54,98	100,67	7,67	214,76	10,55	1,31	37,22	6,84
CA2-3	8,5	23,87	54,89	100,64	7,67	214,86	9,29	1,26	37,29	6,86
CA2-3	9,0	23,63	54,76	100,99	7,58	214,80	10,13	1,20	37,39	6,91
CA2-3	9,5	23,47	54,64	101,53	7,45	214,81	8,60	1,17	37,44	6,96
CA2-3	10,0	23,38	54,64	102,26	7,43	215,00	9,27	1,03	37,51	7,02
CA2-3	10,5	23,24	54,53	102,11	7,41	214,69	10,47	0,98	37,54	7,02
CA2-3	11,0	23,08	54,37	102,19	7,38	215,36	11,85	0,95	37,56	7,05
CA2-3	11,5	22,77	54,12	101,47	7,33	215,23	12,68	0,90	37,63	7,03
CA2-3	12,0	22,56	53,97	101,51	7,29	215,41	14,13	0,83	37,69	7,06
CA2-3	12,5	22,36	53,82	100,76	7,25	216,06	18,71	0,80	37,74	7,03

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA3-3	0,0	24,81	54,69	100,23	7,94	211,71	9,47	1,08	36,36	6,76
CA3-3	0,5	24,76	54,78	100,19	7,94	210,87	9,89	1,21	36,46	6,75
CA3-3	1,0	24,67	54,75	100,19	7,94	210,76	10,50	1,39	36,52	6,76
CA3-3	1,5	24,62	54,72	100,02	7,94	210,65	10,83	1,42	36,53	6,76
CA3-3	2,0	24,56	54,68	99,83	7,94	210,78	9,81	1,42	36,56	6,75
CA3-3	2,5	24,46	54,60	99,73	7,95	210,66	9,45	1,33	36,58	6,76
CA3-3	3,0	24,34	54,61	99,76	7,95	210,64	9,08	1,32	36,68	6,77
CA3-3	3,5	24,32	54,67	100,22	7,95	210,95	8,90	1,33	36,75	6,80
CA3-3	4,0	24,29	54,69	99,92	7,94	211,19	8,96	1,40	36,78	6,78
CA3-3	4,5	24,20	54,61	99,73	7,94	211,36	8,99	1,38	36,80	6,78
CA3-3	5,0	24,08	54,53	99,88	7,94	211,70	9,46	1,30	36,83	6,80
CA3-3	5,5	23,91	54,43	100,03	7,94	211,90	9,11	1,23	36,90	6,83
CA3-3	6,0	23,81	54,39	100,69	7,93	212,32	8,68	1,22	36,95	6,88
CA3-3	6,5	23,67	54,32	100,65	7,93	212,44	8,77	1,27	37,02	6,89
CA3-3	7,0	23,60	54,34	100,44	7,78	212,51	8,42	1,07	37,09	6,89
CA3-3	7,5	23,47	54,27	101,02	7,54	212,65	8,14	0,97	37,15	6,94

STAZIONE	P (m)	T (°C)	C	Oss. (%)	pH (unità pH)	Rx (mV)	To (NTU)	Cl (mg/l)	S (‰)	O2 (mg/l)
CA3-3	8,0	23,33	54,18	101,51	7,50	212,62	8,57	0,96	37,19	6,99
CA3-3	8,5	23,05	53,93	101,30	7,44	212,89	8,32	0,91	37,24	7,01
CA3-3	9,0	22,94	53,89	101,50	7,35	212,85	8,51	0,88	37,30	7,03
CA3-3	9,5	22,83	53,78	101,65	7,32	212,82	8,49	0,86	37,30	7,05
CA3-3	10,0	22,74	53,76	101,78	7,29	212,85	8,73	0,86	37,36	7,07
CA3-3	10,5	22,66	53,74	101,58	7,24	212,83	8,05	0,84	37,42	7,06
CA3-3	11,0	22,46	53,57	101,12	7,20	213,17	8,99	0,89	37,46	7,05
CA3-3	11,5	22,26	53,43	100,93	7,16	213,22	9,66	0,79	37,52	7,06

### Parametri statistici della torbidità (valori espressi in NTU) – FASE POST-OPERAM

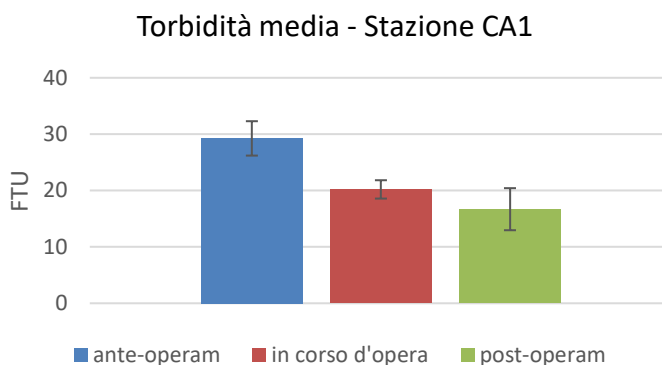
Di seguito si riportano i valori della torbidità media ( $\pm$  la deviazione standard) rilevata lungo la colonna d'acqua, la mediana cioè il valore di torbidità che nella distribuzione dei dati occupa la posizione centrale e il valore al 90° percentile cioè il valore sotto il quale si trovano il 90 % delle osservazioni.

STAZIONE	MEDIA	MEDIANA	90° PERC.
CA1	16,69 $\pm$ 3,73	15,39	21,23
CA2	11,51 $\pm$ 1,90	11,25	12,95
CA3	9,07 $\pm$ 0,70	9,07	9,87

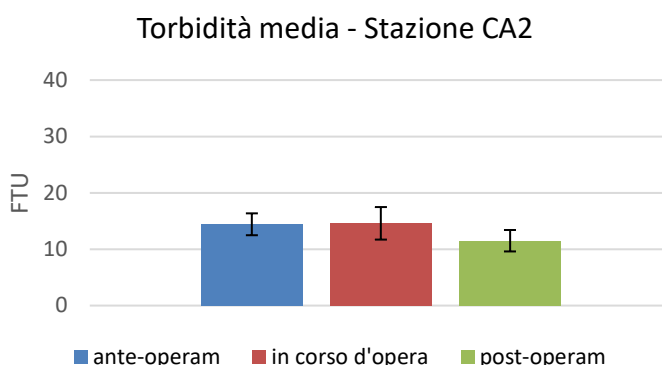
## Considerazioni conclusive

I valori della torbidità rilevata mediante la sonda multiparametrica, risultano, nella fase *Ante operam*, leggermente più elevati o comunque paragonabili ai valori riscontrati nelle successive fasi in corso d'opera e *post-operam*. Di seguito si riportano i valori medi e la deviazione standard della torbidità rilevata lungo la colonna d'acqua nelle tre stazioni indagate, nei tre periodi di monitoraggio:

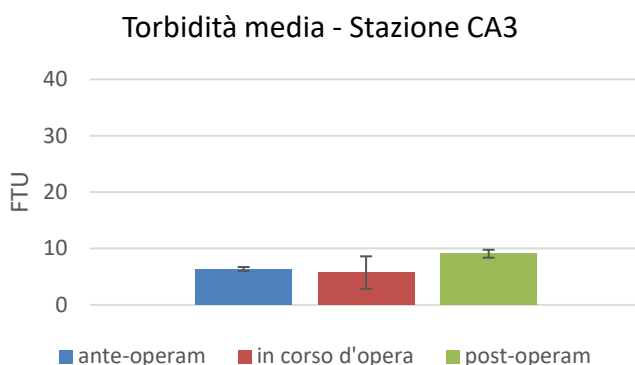
Fase	CA1
Ante-operam	29,25 ± 3,05
In corso d'opera	20,20 ± 1,63
Post-operam	16,69 ± 3,73



Fase	CA2
Ante-operam	14,42 ± 1,94
In corso d'opera	14,59 ± 2,89
Post-operam	11,51 ± 1,90



Fase	CA3
Ante-operam	6,36 ± 0,35
In corso d'opera	5,73 ± 1,58
Post-operam	9,07 ± 0,70



Si può osservare che in tutte le tre fasi di monitoraggio, la stazione CA1 presenta dei valori medi di torbidità più elevati rispetto alle altre due stazioni mentre i valori più bassi sono stati riscontrati nella stazione CA3. La torbidità delle acque tende quindi ad aumentare passando dall'esterno verso l'interno del porto.

Nella fase in corso d'opera la torbidità risulta più bassa rispetto alla fase precedente pur evidenziando lo stesso gradiente dall'interno verso l'esterno del porto. Si sottolinea che nella stazione CA2, ubicata in prossimità delle operazioni di dragaggio/sversamento, i valori medi riscontrati nelle tre fasi del monitoraggio sono molto simili tra loro. Nella campagna eseguita dopo la fine dei lavori di dragaggio (*post-operam*) è stata riscontrata rispetto alla fase *ante-operam* una leggera diminuzione della torbidità nella stazione più interna al porto (CA1) e una sostanziale omogeneità nelle stazioni CA2 e CA3.

Le analisi dei solidi sospesi hanno evidenziato un andamento differente nelle tre stazioni indagate. Nella stazione CA1 più interna al porto si osserva una concentrazione abbastanza elevata di solidi sospesi nella fase *ante-operam* (34,2 mg/l) che tuttavia nella successiva fase in corso d'opera si riduce (25,8 mg/l) per poi diminuire ulteriormente dopo il termine dei lavori. Le stazioni CA2 e CA3 mostrano invece, per l'intero periodo di monitoraggio, un andamento più omogeneo, con un leggero incremento di solidi sospesi durante l'esecuzione del dragaggio; la situazione comunque si normalizza nella fase *post-operam* in quanto le concentrazioni ritornano a dei valori paragonabili a quelli *ante-operam*.

In generale si può affermare che le operazioni di dragaggio/refluimento possono aver determinato, nelle stazioni CA2 e CA3, un leggero ma temporaneo incremento dei solidi sospesi poichè la situazione si normalizza una volta terminati i lavori. La stazione CA1 non sembra essere influenzata dai lavori quanto piuttosto da altre pressioni che insistono nella zona.

I saggi biologici effettuati sui campioni acquosi hanno evidenziato assenza di tossicità relativamente ai test con *Vibrio fischeri* e con *Phaeodactylum tricornutum* in tutti i campioni e in tutte le fasi del monitoraggio (*ante*, *durante* e *post-operam*). Solamente il saggio di embriotossicità effettuato con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* ha mostrato nella fase *ante-operam*, in corso d'opera durante il dragaggio/refluimento e al termine delle attività, la presenza di tossicità in tutte le stazioni. In particolare è stata rilevata una tossicità media in tutte le stazioni ad eccezione della stazione CA3 nella fase *ante-operam*, in cui è stata riscontrata una tossicità alta. A fronte di questi risultati non è quindi possibile imputare gli effetti ecotossicologici riscontrati nelle acque portuali, alle attività di dragaggio.

# PIANO DI MONITORAGGIO DELL'AREA MARINA INTERESSATA DALLA DEPERIMETRAZIONE *- PORTO DI LIVORNO -*



Ottobre 2019



**Responsabile scientifico della convenzione:**

**David Pellegrini**

**Collaboratori:**

**Simona Macchia**

**Maria Elena Piccione**

**Fabiano Pilato**

**Davide Sartori**

**Alice Scuderi**

## Indice

1. Introduzione	4
2. Finalità del piano di monitoraggio	5
3. Attività di campionamento e analisi dei sedimenti	6
3.1 Analisi granulometriche	7
3.2 Analisi chimiche	8
3.3 Analisi ecotossicologiche	10
4. Attività di campionamento e analisi delle acque	11
4.1 Mussel Watch	12
4.2 Biomarkers	13
4.3 Accumulatori passivi	15
4.4 Saggi in situ	19
4.5 Analisi chimico-fisiche tramite sonda multiparametrica e determinazione dei Solidi Sospesi (TSS)	20
5. Attività di campionamento e analisi del biota	23
6. Bibliografia di riferimento	24

*Allegato 1 – Stazioni di monitoraggio*

*Allegato 2 – Scheda di campo*

*Allegato 3 – Stazioni di monitoraggio dei sedimenti: analisi previste e frequenza di campionamento*

*Allegato 4 – Stazioni di monitoraggio della colonna d'acqua: analisi previste e frequenza di campionamento*

## 1. Introduzione

A partire dalla fine degli anni novanta l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA, allora ICRAM) è stato coinvolto nel monitoraggio ambientale delle attività di movimentazione dei fondali nel porto di Livorno. Con la costruzione della prima vasca di contenimento nei primi anni 2000, seguita dalla costruzione della seconda vasca nel 2012, le indagini ambientali sono state estese all'esterno del porto per monitorare le fasi di costruzione e la successiva gestione dei bacini per il conferimento di sedimenti derivanti da attività di dragaggio in diverse aree portuali.

Attualmente sono in corso le procedure di deperimetrazione del S.I.N. del porto di Livorno ai sensi del DD 08.06.16 *“Criteri per la definizione dei valori di riferimento specifici di concentrazione degli inquinanti per i materiali risultanti dalle attività di dragaggio riguardo la derivazione dei valori di riferimento in aree marine e salmastre interne alla perimetrazione dei Siti di Interesse Nazionale”* per cui l'Autorità di Sistema Portuale del Mar Tirreno Settentrionale (AdSP-MTS) ha previsto significativi interventi di escavo e manutenzione dei fondali portuali e la realizzazione di importanti opere infrastrutturali (ad esempio la Darsena Europa).

Tra AdSP-MTS e ISPRA è stato stipulato in data 16/03/2018 un Protocollo d'Intesa, di cui è parte anche la Direzione Marittima della Toscana, finalizzato alla collaborazione e alla condivisione di risorse ed esperienze per lo sviluppo di studi e ricerche e per lo svolgimento di monitoraggi relativi alle aree costiere dei porti di Livorno, Piombino e dell'Isola d'Elba.

A questo accordo è seguita la sottoscrizione di una Convenzione tra i due Enti, che ha come oggetto la collaborazione tecnico-scientifica relativa alle tematiche di cui ai punti 1, 2 e 3 del comma 3.3 dell'art.3 *“Strumenti per l'attuazione del Protocollo d'Intesa”* del Protocollo d'Intesa, descritti di seguito in dettaglio:

- *piani di caratterizzazione ambientale* delle aree portuali di competenza dell'AdSP-MTS interessate da attività di movimentazione dei fondali e relative valutazioni ambientali, anche attraverso la definizione di schede di inquadramento delle diverse aree costituenti l'intero bacino portuale,
- *programmi di monitoraggio ambientale*, inclusi approfondimenti sperimentali e applicazione di nuove tecnologie, relativamente alla gestione dei materiali da dragare all'interno dei porti di competenza dell'AdSP-MTS,
- *attività di deperimetrazione dei SIN di Livorno e di Piombino*, inclusa l'esecuzione di parte di attività di campo ed elaborazione dei dati.

## 2. Finalità del piano di monitoraggio

Il Piano di Monitoraggio è stato progettato, coerentemente con le attività di monitoraggio effettuate in precedenza e con l'obiettivo di monitorare la qualità ambientale dell'area circostante il porto di Livorno, in virtù dell'utilizzo delle infrastrutture esistenti ed in previsione degli interventi di escavo e della realizzazione di importanti opere infrastrutturali da parte di AdSP-MTS.

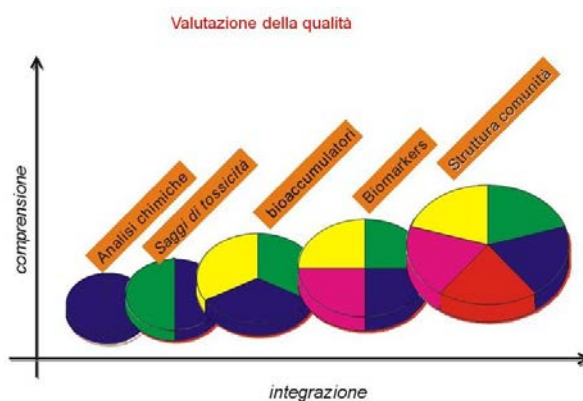
Le attività interesseranno i seguenti comparti ambientali:

- sedimenti,
- colonna d'acqua,
- biota.

Lo scopo prioritario del presente piano è quello di fornire informazioni sulle condizioni ambientali locali, evidenziando le possibili alterazioni dovute alla gestione delle infrastrutture portuali e alla realizzazione di nuove banchine, rendendo quindi possibile la pianificazione di interventi di contenimento.

Per raggiungere al meglio tale obiettivo, si è stabilito di utilizzare un approccio integrato che rispecchi la complessità dell'ambiente marino, interno ed esterno al porto in cui fattori fisici, chimici, biologici e antropici agiscono in maniera sinergica a diversi livelli della catena trofica (Fig. 1).

*Figura 1 – Valutazione integrata della qualità dell'ambiente marino*



Nei paragrafi successivi si descrivono nel dettaglio le attività previste, le stazioni di monitoraggio individuate e la tempistica di esecuzione del monitoraggio nei diversi comparti ambientali interessati.

Le stazioni di campionamento sono state posizionate, dove possibile, in continuità con i precedenti piani di monitoraggio e nelle aree ritenute di maggiore interesse relativamente al progetto di costruzione della Darsena Europa.

L'ubicazione e le coordinate delle stazioni di monitoraggio sono riportate nell'**Allegato 1 - Stazioni di monitoraggio**.

### 3. Attività di campionamento e analisi dei sedimenti

Il campionamento dei sedimenti superficiali sarà effettuato con una benna Van Veen (Fig. 2) con caratteristiche idonee a prelevare uno strato di almeno 30 cm (generalmente 0 - 30 cm). Ciascun campione sarà omogeneizzato e conservato in appositi contenitori, idonei alle analisi da effettuare, etichettati e datati (Tab. 1).

Per ogni stazione di campionamento sarà compilata una scheda (**Allegato 2 - Scheda di campo**) in cui dovranno essere riportati i dati inerenti il punto (nome della stazione, data e ora, coordinate reali del punto di prelievo, strumentazione utilizzata, profondità del fondale, ecc.), la sigla dei campioni prelevati e la descrizione macroscopica del campione (caratteristiche fisiche, colore, ecc.). Ciascun campione prelevato dovrà essere suddiviso in quattro aliquote destinate alle analisi fisiche, chimiche, ecotossicologiche e alla conservazione di un'aliquota di riserva (conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

*Figura 2 – Benna Van Veen*



Le aliquote successivamente dovranno essere trasportate nei laboratori di analisi e refrigerate a  $4 - 6^{\circ}\text{C}$  in contenitori a tenuta termica (Tab. 1).

*Tabella 1 – Schema di imballaggio e conservazione dei campioni*

Parametro	Contenitore	Trasporto ( $^{\circ}\text{C}$ )	Conservazione ( $^{\circ}\text{C}$ )
<b>Metalli</b>	Falcon 50 ml (PS o vetro)	4 - 6	4 - 6 se analisi entro 48 ore altrimenti $\leq -20$
<b>IPA</b>	Falcon 50 ml (PS o vetro)	4 - 6	4 - 6 se analisi entro 48 ore altrimenti $\leq -20$
<b>Ecotossicologia</b>	3 barattoli 200 ml (PE sterile)	4 - 6	4 - 6

<b>Granulometria</b>	Falcon 50 ml (PS o vetro)	4 - 6	4 - 6
<b>Riserva</b>	1 barattolo 200 ml (PE sterile)	4 - 6	≤ - 20

Il prelievo dei sedimenti sarà effettuato nelle seguenti stazioni di monitoraggio (**Allegato 1**):

- **Ve7, DE01:** interne al porto,
- **DE10:** in prossimità delle vasche di colmata,
- **DE02, DE03, DE04, DE06, DE08, DE09:** nell'area SIN soggetta alla procedura di deperimetrazione,
- **DE05, DE07:** all'esterno dell'area SIN soggetta alla procedura di deperimetrazione e in prossimità dell'area soggetta ai futuri interventi infrastrutturali,
- **VN4:** controllo esterno all'area soggetta ai futuri interventi infrastrutturali.

I campionamenti nelle stazioni sopra indicate verranno svolti con una frequenza annuale. I parametri da ricercare nei campioni di sedimento sono descritti nei paragrafi successivi e nell'**Allegato 3 - Stazioni di monitoraggio dei sedimenti: analisi previste e frequenza di campionamento**.

### 3.1 Analisi granulometriche

Le analisi granulometriche forniscono una serie di informazioni utili all'analisi morfologica e sedimentologica delle fasce costiere, nonché informazioni legate alle caratteristiche quantitative e qualitative del sedimento osservato. Le caratteristiche tessiturali e la deposizione dei sedimenti marini sono influenzate da molteplici fattori come, ad esempio, le condizioni idrodinamiche (correnti e maree) e morfologiche locali, la presenza o meno di foci fluviali, le caratteristiche delle rocce affioranti, la morfologia dei fondali.

La presenza di eventuali opere portuali e di difesa costiera può alterare lo schema generale di trasporto e deposizione dei sedimenti marini lungo la costa, così come intensi eventi meteorologici possono alterare significativamente i processi sedimentari.

La dimensione delle particelle costituenti un sedimento è convenzionalmente misurata in unità metriche. Il grado di dimensione è riferito ad una scala geometrica di valori, suddivisa in diverse classi di appartenenza. Una delle scale di suddivisione granulometrica più comunemente usata è la scala Udden-Wentworth (1922). Una ulteriore metodologia di classificazione è quella proposta da Krumbein (1934) in cui si propone come unità di misura *phi* ovvero il logaritmo negativo in base 2 del diametro delle particelle espresso in mm. I dati ricavati dall'analisi granulometrica sono utilizzati per quantificare

le singole frazioni che costituiscono il sedimento. La suddivisione di queste frazioni deriva da Wentworth (1922) ed è basata sui limiti dimensionali definiti da Udden nel 1898 (Fig. 3).

Esistono classificazioni diverse per identificare la tipologia di sedimento analizzato; la scelta generalmente dipende dalle finalità dell'indagine, dagli ambienti investigati o dalla necessità di eventuali confronti con dati pregressi. Le classificazioni comunemente utilizzate sono quelle di Shepard (1954), Folk (1954) e Nota (1958).

*Figura 3 - Scala Udden-Wentworth (1922)*

UDDEN & WENTWORTH			
mm	Scala phi	Definizione	
>256	-8	masso	GHIAIA
da 256 a 128	-7	ciottolo molto grossolano	
da 128 a 64	-6	ciottolo grossolano	
da 64 a 32	-5	ciottolo medio grossolano	
da 32 a 16	-4	ciottolo medio	
da 16 a 8	-3	ciottolo medio-fine	
da 8 a 4	-2	ciottolo fine	
da 4 a 2	-1	granulo	
da 2 a 1	0	sabbia molto grossolana	SABBIA
da 1 a 1/2	1	sabbia grossolana	
da 1/2 a 1/4	2	sabbia media	
da 1/4 a 1/8	3	sabbia fine	
da 1/8 a 1/16	4	sabbia finissima	
da 1/16 a 1/32	5	silt medio	FANGO
da 1/32 a 1/64	6	silt fine	
da 1/64 a 1/128	7	silt finissimo	
<1/128	8	argilla	

Le analisi granulometriche condotte sui campioni previsti dal presente Piano di Monitoraggio prevedono la classificazione del sedimento nelle tre classi granulometriche ghiaie, sabbie e peliti, mediante separazione a umido con setacciatore meccanico.

### 3.2 Analisi chimiche

I sedimenti (e in particolare quelli marini e lacustri) rappresentano il punto di raccolta finale sia dei materiali provenienti dalle rocce nelle terre emerse, sia di quanto sversato nell'ambiente dalle attività antropiche, costituendo quindi un sito preferenziale di accumulo di molti contaminanti organici (IPA, PCB) e inorganici (metalli in traccia). Una volta presenti nei corpi idrici infatti, gli inquinanti tendono ad

adsorbirsi sul particolato in sospensione e, attraverso il deposito di quest'ultimo, ad accumularsi nei sedimenti di fondo. Ne risulta la formazione di sedimenti contaminati definiti come *“suolo, sabbia, minerali e sostanza organica accumulata sul fondo di un corpo idrico e contenente sostanze tossiche o pericolose a livelli che possono generare effetti negativi sulla salute umana o sull'ambiente”* (US EPA, 1998). Le caratteristiche idrodinamiche e geofisiche dell'ambiente acquatico, la composizione del sedimento stesso, oltre alle intrinseche proprietà delle sostanze inquinanti, determinano poi il loro destino: una volta adsorbite dal particolato sospeso e accumulate nel sedimento sotto forma di complessi sostanzialmente inattivi, processi fisici quali correnti, disturbi di origine antropica (dragaggi, ripascimenti, passaggio di navi) e l'attività degli organismi bentonici possono causare la risospensione dei sedimenti stessi e un rimescolamento con l'acqua ossigenata sovrastante. Questa risospensione e miscelazione altera la ripartizione dei contaminanti nell'acqua e nei sedimenti, con conseguenze sulla loro biodisponibilità. I fattori principali che possono influenzarla sono:

- pH: ambienti acidi favoriscono la presenza della specie ionica dei metalli rendendo così alte le loro concentrazioni nella fase acquosa e di conseguenza la loro biodisponibilità;
- sostanze organiche: agiscono sull'equilibrio dei metalli e influiscono anche sulle concentrazioni di Idrocarburi Policiclici Aromatici;
- potenziale di ossidoriduzione: la solubilità e la formazione di complessi dipendono dallo stato di ossidazione del metallo quindi, in funzione del tipo di ambiente (ossidante o riducente) variano le forme in cui sono presenti i metalli e di conseguenza la loro biodisponibilità. Il potenziale redox influisce anche sugli IPA, determinando la possibilità di reazioni di degradazione o decomposizione fotochimica;
- salinità: l'influenza di tale parametro è importante soprattutto in quegli ambienti in cui può variare rapidamente, come estuari e zone di transizione. I metalli rilasciati vengono infatti complessati dallo ione cloruro e da altri leganti diventando così meno probabile il loro riassorbimento sul particolato sospeso.
- Contenuto di acqua: soprattutto per quanto riguarda gli IPA, sedimenti con un alto contenuto di acqua (40% = fango) sono caratterizzati da elevati valori di questi contaminanti.

Ne consegue che i sedimenti, rappresentando una potenziale fonte di inquinamento, rivestono un ruolo strategico nella valutazione della qualità ambientale, vista la loro importanza sia in quanto habitat di molti organismi marini sia per le interazioni che stabiliscono con l'acqua interstiziale e i livelli idrici sovrastanti.



Nell'ambito delle attività previste dal presente Piano di Monitoraggio, si procederà quindi indagando i seguenti parametri chimici:

- contenuto di sostanza organica,
- metalli in traccia (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn),
- IPA (Naftalene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benz(a)antracene, Crisene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(a)pirene, Dibenzo(a,h)antracene, Benzo(g,h,i)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pirene).

Le analisi saranno effettuate utilizzando il metodo della spettrometria a emissione atomica (ICP-OES) e la spettroscopia ad assorbimento atomico a vapori freddi (CVAAS), per quanto riguarda metalli in traccia e mercurio rispettivamente.

La determinazione degli IPA sarà a carico dell'AdSP-MTS, come stabilito nell'Allegato tecnico alla Convenzione.

### 3.3 Analisi ecotossicologiche

Il saggio ecotossicologico è un esperimento biologico atto a verificare se un composto potenzialmente tossico, o un campione ambientale, causa una risposta biologica rilevante negli organismi utilizzati per il test. Solitamente, gli organismi vengono esposti a differenti concentrazioni o dosi di una sostanza di prova o di un campione (acqua di scarico, fango di depurazione, suolo, sedimento fluviale o marino, ecc.) diluiti in un mezzo opportuno. Il parametro osservato e misurato (endpoint) nei differenti gruppi di organismi, può essere la mobilità, la sopravvivenza, la dimensione o crescita, il numero di uova o prole, oppure qualsiasi variabile biochimica o fisiologica che può essere attendibilmente quantificata.

I test ecotossicologici hanno diversi vantaggi: permettono valutazioni globali dell'impatto di tutti gli agenti inquinanti sull'ambiente naturale; accertano e quantificano gli effetti tossici sugli organismi viventi, utilizzando specie indicatrici sensibili; sono semplici, poco costosi e danno risposte facilmente comprensibili; sono condotti in laboratorio in condizioni controllate e standardizzate.

Essi presentano tuttavia anche alcuni svantaggi: valutano l'effetto inquinante, ma non identificano la causa; non permettono di testare tutte le specie ambientali esposte, né tutte le possibili vie di esposizione; le condizioni di campo possono essere differenti da quelle di laboratorio.

L'organismo test deve possedere determinate caratteristiche per essere impiegato in test ecotossicologici, in particolare sensibilità agli inquinanti, relazione quantitativa tra la risposta biologica e le concentrazioni di esposizione ad un inquinante, ampia distribuzione nell'area di indagine, scarsa mobilità (nel caso di un test *in situ*), lungo ciclo vitale, uniformità genetica.

L'approccio ecotossicologico è anche utilizzato per la determinazione e la valutazione degli effetti tossici acuti e cronici esercitati da matrici ambientali contaminate su organismi o gruppi di organismi: l'effetto tossico "acuto" si evidenzia in un lasso di tempo breve e, comunque, inferiore al tempo di generazione dell'organismo in esame, e prevede la valutazione di endpoints facilmente evidenziabili (ad esempio, l'immobilizzazione o la morte degli organismi impiegati nei saggi); l'effetto tossico "cronico" si sviluppa, viceversa, in un periodo di tempo più lungo, può coinvolgere più generazioni di individui esposti e produce risposte che non compromettono la sopravvivenza degli organismi.

La tossicità viene solitamente ricercata su matrici liquide (campioni di acque di scarico, acque superficiali, acque di falda, elutriati di matrici solide) o solide (terreni/sedimenti). Le prove di tossicità vengono effettuate sulla fase acquosa per valutare la tossicità dovuta alla presenza e alla biodisponibilità di contaminanti inorganici e microinquinanti idrosolubili. Nelle prove di tossicità sulle matrici solide, la determinazione della tossicità può essere condotta sia direttamente sulla matrice tal quale che sull'elutriato. Le prove di tossicità condotte direttamente sulla matrice solida risentono, a differenza delle normali prove di tossicità acquatica, delle interazioni tra il suolo e la componente tossica, interazioni che esercitano effetti non trascurabili sulla biodisponibilità delle sostanze tossiche. D'altronde, le prove sulla matrice solida hanno il vantaggio di utilizzare la matrice "in toto" e non solo l'estratto acquoso, avvicinandosi in tal modo maggiormente alla situazione reale.

La forza di una analisi ecotossicologica risiede nella scelta accurata dei test da effettuare, degli organismi chiave da utilizzare e degli endpoints da valutare. La tossicità di matrici complesse deve pertanto essere valutata mediante una batteria di bioindicatori, allo scopo di analizzare il più ampio spettro di effetti su organismi con risposte differenti ai vari composti presenti nelle matrici.

Per quanto detto in precedenza, nel presente studio la batteria sarà composta da almeno 3 saggi biologici appartenenti a livelli trofici diversi e a taxa filogeneticamente distanti, al fine di costruire una batteria di saggi biologici maggiormente rappresentativa dell'ecosistema di studio. La batteria utilizzata sarà pertanto composta da: saggio di inibizione algale con *Phaeodactylum tricorutum* e saggio di embriotossicità con *Paracentrotus lividus* condotti sulla matrice elutriato, saggio su fase solida con il batterio *Vibrio fischeri*.

#### **4. Attività di campionamento e analisi delle acque**

In funzione delle attività di dragaggio e deperimetrazione, e in continuità con le attività di *Mussel Watch* svolte nei precedenti monitoraggi delle vasche di colmata, si è deciso di posizionare i mitili nelle seguenti stazioni:

1. **Ve7**: interne al porto,
2. **DE10**: in prossimità delle vasche di colmata,
3. **DE02, DE06, DE09**: nell'area SIN soggetta alla procedura di deperimetrazione,
4. **VN4**: controllo esterno all'area soggetta ai futuri interventi infrastrutturali.

Le diverse tipologie d'indagine messe in campo per il monitoraggio di questo comparto ambientale e la frequenza di campionamento sono descritte nei paragrafi successivi e nell'**Allegato 4 – Stazioni di monitoraggio della colonna d'acqua: analisi previste e frequenza di campionamento**.

#### 4.1 Mussel Watch

L'impiego dei molluschi bivalvi per il monitoraggio della contaminazione chimica degli ambienti costieri è utilizzato da decenni sia negli Stati Uniti sia in numerosi Paesi europei in programmi internazionali di *Mussel Watch*. La specie scelta come bioindicatore deve essere caratterizzata dalla mancanza di meccanismi biochimici o fisiologici in grado di regolare le concentrazioni tissutali dei contaminanti, ma allo stesso tempo deve possedere caratteristiche biologiche che la rendano idonea a questo scopo (nel caso specifico l'attiva filtrazione dei bivalvi), in questo modo, infatti, l'organismo concentra le sostanze nei propri tessuti in maniera proporzionale al loro livello ambientale.

I principali vantaggi offerti da un programma di monitoraggio condotto mediante l'utilizzo di *Mussel Watch* si possono riassumere nei seguenti punti:

- valutazione del grado di contaminazione dell'area costiera secondo una misura “integrata nel tempo” e non riferibile, quindi, al solo momento in cui è stato effettuato il prelievo;
- possibilità di evidenziare facilmente gradienti di inquinamento sia in senso spaziale che temporale, nonché di effettuare confronti tra aree geograficamente distanti;
- stima della “biodisponibilità” delle sostanze tossiche presenti nell'ambiente marino e valutazione del rischio legato al trasferimento di questi elementi attraverso la catena alimentare;
- basso costo e facilità di manipolazione degli organismi.

La specie sicuramente più utilizzata a livello mondiale per questo tipo di studi è il mitilo comune, per il quale la letteratura internazionale offre numerosi dati di riferimento ed indicazioni sulle principali variabili biologiche da considerare nell'interpretazione dei dati. Pertanto, nel programma di monitoraggio iniziato nei primi anni 2000 nel porto di Livorno è stato utilizzato il mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis*.

Sui tessuti molli degli organismi trapiantati nelle 6 stazioni di monitoraggio, con una frequenza di campionamento annuale, saranno effettuate le seguenti analisi chimiche:

- metalli: Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn;
- IPA: Naftalene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benz(a)antracene, Crisene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(a)pirene, Dibenzo(a,h)antracene, Benzo(g,h,i)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pirene).

Le analisi saranno effettuate utilizzando il metodo della spettrometria a emissione atomica (ICP-OES) e la spettroscopia ad assorbimento atomico a vapori freddi (CVAAS), per quanto riguarda metalli in traccia e mercurio rispettivamente.

La determinazione degli IPA sarà a carico dell'AdSP-MTS, come stabilito nell'Allegato tecnico alla Convenzione.

#### 4.2 Biomarkers

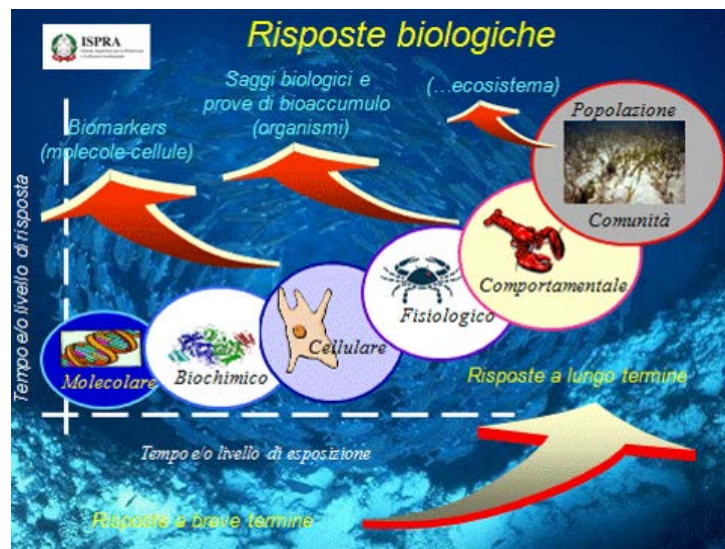
Il biomarker può essere definito come una risposta biologica a una o più sostanze chimiche che dia una misura dell'esposizione e, talvolta, anche dell'effetto tossico su un organismo.

Queste variazioni o risposte possono essere cercate a livelli crescenti di complessità (Focardi e Leonzio, 2001): la tossicità primaria di un contaminante si esercita a livello biochimico e molecolare (modificazioni di attività enzimatiche, alterazioni a livello del DNA, ecc.) e, solo successivamente, gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, nei livelli superiori di organizzazione, ossia cellule, tessuti, organi, fino a giungere a livello di organismi e popolazione (Fig. 4). I biomarkers non forniscono informazioni dirette sul tipo di contaminante ambientale, tuttavia informano in maniera precoce dell'avvenuta esposizione ad inquinanti, permettendo interventi a breve termine e la messa a punto di adeguati programmi di gestione sostenibile dell'ambiente in esame.

A seconda della loro specificità di risposta nei confronti degli inquinanti, i biomarkers possono essere suddivisi in due categorie:

- *biomarkers generali*: traducono una risposta dell'organismo a un insieme di inquinanti, senza consentire di determinare la natura degli inquinanti stessi (ad esempio la stabilità delle membrane lisosomiali, ecc.);
- *biomarkers specifici*: traducono una risposta dell'organismo ad una specifica famiglia di inquinanti (ad esempio l'accumulo cellulare di metallotioneine, l'inibizione delle attività delle colinesterasi, ecc.).

Fig. 4 Risposte biologiche



In merito all'induzione della risposta, i biomarkers possono essere suddivisi in altre 2 categorie (Peakall and Shugart, 1993):

- *biomarkers di esposizione*: forniscono informazioni sul grado di esposizione ad uno o più contaminanti presenti nell'ambiente, ma non sugli effetti tossici che questi generano a livello dell'organismo;
- *biomarkers di effetto*: queste risposte indicano sia l'eventuale esposizione che gli effetti tossici. Essi comprendono gli indici che riflettono una condizione di deterioramento dovuta all'esposizione a un contaminante, come ad esempio la produzione di macromolecole dannose, lesioni di cellule o di tessuti, ridotte capacità di crescita, riproduzione e sopravvivenza.

Nella valutazione di queste risposte si deve tenere in considerazione che esistono, oltre ai contaminanti presenti nell'ambiente, altri fattori di tipo fisiologico, comportamentale o ambientale che possono alterare il segnale fornito dalle analisi sui biomarkers e portare ad interpretazioni errate. Questi limiti possono però essere superati con una buona conoscenza delle caratteristiche fisiologiche e del ciclo vitale e riproduttivo dell'organismo sentinella. Un biomonitoraggio efficace deve saper identificare e distinguere gli effetti delle attività umane dagli effetti naturali ambientali (Temperatura, salinità, ossigeno, ecc.).

La variabilità biologica degli organismi determina che l'analisi di un singolo biomarker sia difficilmente in grado di rispondere in maniera corretta alle richieste del piano di monitoraggio, dato che un parametro può essere soggetto alla variabilità insita negli organismi viventi e fornire risultati ambigui, causando sovrastime o sottostime degli effetti sulle biocenosi.

È necessario quindi l'impiego di una batteria di biomarkers, al fine di produrre un risultato integrato, che da un lato minimizzi gli effetti della variabilità biologica e dall'altro sia confermato da più di una indagine.

I Biomarkers analizzati nei mitili trapiantati nelle 6 stazioni di monitoraggio, con una frequenza di campionamento annuale, saranno:

a) *Biomarker di stress ossidativo:*

1. Capacità antiossidante totale per radicali perossilici e ossidrilici (TOSCAROO+TOSCAOH)
2. Attività della catalasi (CAT)
3. Livelli di malondialdeide (MDA)

b) *Biomarker di esposizione a contaminanti organici e/o inorganici:*

4. Attività dell'acetilcolinesterasi (ACHE)
5. Attività dell'acylcoenzima A-ossidasi (AOX)
6. Livelli delle metallotioneine (MT)

c) *Biomarker di genotossicità:*

7. Frequenza dei micronuclei (MN)

d) *Biomarker di stato fisiologico:*

8. Stress on stress o Test di Sopravvivenza all'aria (SOS).

### 4.3 Accumulatori passivi

Il campionamento passivo, sperimentato sin dagli anni '70, rappresenta una tecnica avanzata e innovativa basata sulla TWA (Time Weighed Average), la media ponderata nel tempo o concentrazione all'equilibrio, di inquinanti presenti in varie matrici ambientali quali aria, suolo, sedimenti e acqua.

I dati forniti da questi dispositivi possono essere utilizzati insieme a quelli ottenuti con strumenti convenzionali, al fine di restituire un'immagine più complessa e verosimile dell'ambiente, in modo da influire sui futuri programmi di monitoraggio, migliorare la valutazione del rischio e il livello di confidenza nel monitoraggio dei dati.

Rispetto ai metodi tradizionali, i campionatori passivi:

- misurano la frazione libera disciolta di un inquinante e quindi quella biologicamente disponibile,
- forniscono una misura più rappresentativa delle concentrazioni medie dell'inquinante nel tempo,
- possono essere utilizzati per misurare le concentrazioni di inquinanti organici polari e non-polari e di composti inorganici, inclusi metalli, anioni e radionuclidi. I metodi di analisi sono gli

stessi che si utilizzano per i campioni raccolti puntualmente. I risultati possono inoltre essere correlati a quelli del biomonitoraggio.

I campionatori passivi possono essere di grande utilità sia in una campagna di screening per la sorveglianza che per mostrare i trend quando le concentrazioni sono basse e consentire l'adozione di misure preventive.

I vantaggi potenziali dell'utilizzo dei campionatori passivi possono essere così riassunti:

- facilità di deposizione, ritiro e trattamento, misura dei soli analiti non legati al particolato o alla materia organica disciolta o debolmente complessati,
- per le sostanze organiche, maggiore semplicità di estrazione e purificazione degli analiti in maniera standardizzata ed uguale per ciascun campionamento,
- pre-concentrazione dell'analita nella resina/membrana captante, con forte abbassamento del limite di quantificazione della metodica analitica rispetto alle tecniche tradizionali,
- forniscono una misura integrata nel tempo e non puntiforme,
- correlazione dei valori riscontrati con la biodisponibilità ambientale degli analiti,
- possibilità di effettuare saggi ecotossicologici sull'eluato.

Esistono diversi tipi di accumulatori passivi in funzione degli analiti che si vogliono indagare.

I **DGT** (Diffusive Gradient in Thin Films, Davison & Zhang, 1994), sono utilizzati per l'analisi dei metalli in traccia e sono composti da una capsula in materiale plastico, al cui interno sono disposti in sequenza una membrana filtro più superficiale, un gel diffusivo di poliacrilammide e una resina a base di iminodiacetato, che rappresenta lo strato chelante (Fig. 5). Le resine sono selettive nei confronti delle specie metalliche investigabili, è possibile quindi utilizzare DGT diversi in base ai metalli che si vogliono indagare (Chelex-100, Metsorb, Ferrihydrite, Chelex-Metsorb, Spheron-Thiol).

L'analisi dei contaminanti organici lipofili (IPA, PCB, pesticidi, ritardanti di fiamma) viene fatta invece utilizzando i **Silicone Rubber Strip**. Si tratta di strisce di polidimetilsilossano che possono essere tagliate in modo da avere una superficie di assorbimento funzionale al tasso di campionamento. Per poterle collocare nei siti di indagine, vengono fissate su una struttura di supporto in acciaio inossidabile (Fig. 6).

Fig. 5 - Rappresentazione dei componenti del DGT, dell'accumulo e dell'eluizione di ioni metallici in una resina Chelex-

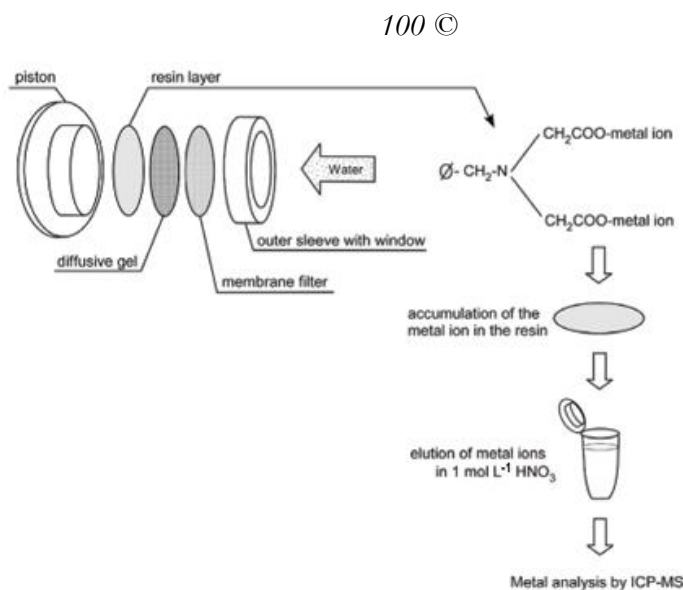


Fig. 6 - Supporto per Silicone Rubber Strip



I POCIS (Polar Organic Chemical Sampler Integrator Sampler) sono utilizzati per monitorare i contaminanti idrofilici, composti che includono pesticidi, farmaci, steroidi, ormoni, antibiotici, prodotti per la cura personale, ecc. Questi composti cominciano a rappresentare una seria criticità, essendo ormai presenti in molte matrici ambientali e negli ecosistemi su scala globale, associati inoltre a molte anomalie croniche.

Il POCIS è composto da due fogli di membrana in polietersulfone microporoso ( $0,1 \mu\text{m}$  di dimensione dei pori) che racchiude un substrato assorbente in fase solida (Oasis HLB) che trattiene i prodotti chimici campionati, fissati su un supporto in acciaio inossidabile (Fig. 7).



*Fig. 7 - Supporto in acciaio inossidabile contenente tre POCIS*



L'elevata solubilità in acqua dei prodotti chimici organici polari (POC) rende difficile l'estrazione e il rilevamento utilizzando tecniche standard di campionamento e analisi. Il POCIS consente di stimare l'esposizione acquosa dell'organismo acquatico a POC disciolti e consente di determinare la concentrazione media ponderata in base al tempo in acqua per periodi prolungati.

I Silicone Rubber Strip e i POCIS vengono calati nelle stazioni di monitoraggio in contenitori in acciaio inossidabile 304 (detti canister, Fig. 8), di dimensioni variabili a seconda delle esigenze, che consentono una posizione di campionamento fissa eliminando i problemi di migrazione e mortalità connessi agli organismi acquatici.

*Fig. 8 – Supporto in acciaio inossidabile per Silicone Rubber Strip e POCIS*



I campionatori passivi utilizzati nel presente studio sono i DGT e i Silicone Rubber Strip che verranno posizionati nelle 6 stazioni di monitoraggio previste con una frequenza di campionamento annuale (in contemporanea al Mussel Watch) per 3 anni di monitoraggio a partire dalla campagna 2020.

Sugli estratti saranno effettuate le seguenti analisi:

- *Analisi chimiche:* metalli (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn), IPA (Naftalene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benz(a)antracene, Crisene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(a)pirene, Dibenzo(a,h)antracene, Benzo(g,h,i)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pirene) e PCB (**Allegato 4**);
- *Analisi ecotossicologiche su estratti di Silicone Rubber:* batteria di saggi biologici appartenenti a livelli trofici diversi e a taxa filogeneticamente distanti.

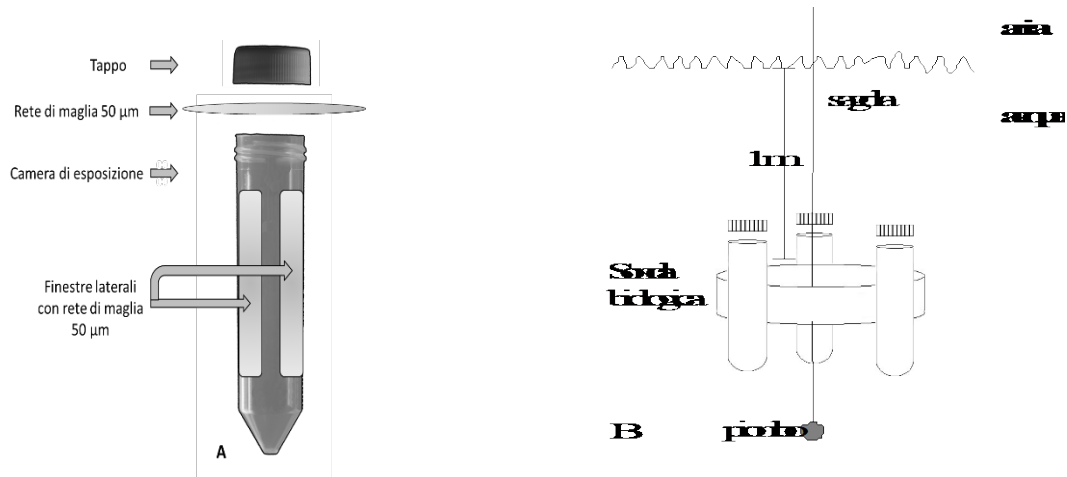
#### 4.4 Saggi *in situ*

I saggi biologici condotti *in situ* prevedono l'esposizione della specie test direttamente in campo al fine di verificare la comparsa di possibili effetti tossici. Rispetto ai saggi condotti in condizioni controllate di laboratorio, i saggi *in situ* permettono di ridurre la manipolazione dei campioni e di integrare nel tempo possibili effetti dovuti alle variazioni di parametri ambientali (idrodinamismo, temperatura, luce, sedimentazione, ecc.) che possono influire sulla biodisponibilità e sulla tossicità dei contaminati presenti nell'ambiente. Di conseguenza è possibile giungere a un'interpretazione più realistica dell'inquinamento presente nell'ecosistema oggetto di studio.

Il saggio *in situ* proposto nel presente piano di monitoraggio è quello di embriotossicità con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* che sarà eseguito esponendo gli embrioni in parallelo sia in laboratorio che *in situ* con una cadenza semestrale (una delle 2 campagne dovrà essere effettuata preferibilmente nel periodo in cui vengono deposti mitili e campionatori passivi).

Per consentire l'esposizione *in situ* nella colonna d'acqua degli embrioni di *P. lividus* sarà utilizzata una "sonda biologica" (Fig. 8), costituita da un supporto rigido sul quale sono inserite tre camere d'esposizione contenenti gli embrioni.

Fig. 8 – Sonda biologica: camera d'esposizione (A) e posizione in mare della sonda biologica (B)



#### 4.5 Analisi chimico-fisiche tramite sonda multiparametrica e determinazione dei Solidi Sospesi (TSS)

I programmi di monitoraggio ambientale delle operazioni di dragaggio in aree marine costiere prevedono abitualmente la determinazione del particolato solido in sospensione e della torbidità. La disponibilità di questi dati per più anni, in stagioni diverse e in condizioni meteo-marine differenti, può permettere la creazione di un database utile per la definizione dei valori di riferimento della torbidità utile durante le attività di dragaggio o di costruzione di nuove infrastrutture portuali.

La determinazione dei solidi sospesi effettuata sui campioni d'acqua costituisce il valore del peso secco a 105°C del materiale sospeso per unità di volume d'acqua e viene espressa in milligrammi di solidi per litro d'acqua (mg/l). La misura della torbidità, invece, sfrutta la proprietà ottica di una soluzione di attenuare o disperdere un fascio di luce che la attraversa (fenomeno di scattering). La torbidità, espressa in NTU (Nephelometric Turbidity Units) o FTU (Formazine Turbidity Units), viene determinata utilizzando un dispositivo ottico denominato torbidimetro che misura l'attenuazione di un raggio di luce proiettato nell'acqua in direzione di una fotocellula (lightscattering) o la luce dispersa rispetto un angolo formato dal raggio incidente (Backscattering).

I due parametri, pur essendo in relazione con gli stessi fenomeni, sono funzione di variabili differenti. La misura dei solidi sospesi infatti dipende esclusivamente e direttamente dal peso totale delle particelle solide in sospensione con diametro maggiore di 0.45 µm ed è quindi funzione diretta del numero, della dimensione e del peso specifico delle particelle. Le proprietà ottiche di una soluzione sono invece influenzate direttamente dall'indice di rifrazione delle particelle sospese, che è funzione della loro

quantità, forma, colore e dimensioni, oltre che dalla pluralità di fattori che interagiscono col raggio incidente, nonché dalla lunghezza d'onda del raggio incidente (APAT CNR-IRSA, 2003).

Sulla misura della torbidità pertanto, oltre che le caratteristiche morfologiche e tessiturali del sedimento, possono incidere significativamente sia la presenza di luce, che il materiale organico in sospensione, ma anche semplicemente la formazione di bolle d'aria generate dalle eliche delle imbarcazioni di passaggio (Baker and Lavelle, 1984; Capello et al., 2010; Cutroneo et al., 2012, Cutroneo et al., 2013; Puig and Palanques, 1998).

Un accurato studio della torbidità media dell'area oggetto di monitoraggio, effettuato preliminarmente alle operazioni di movimentazione, risulta pertanto indispensabile, al fine di conoscere le caratteristiche medie dell'area e valutare le eventuali alterazioni discriminando quelle attribuibili alle movimentazioni del sedimento da quelle legate ad altri fattori.

L'utilizzo di una sonda multiparametrica (Fig. 9) permette inoltre di registrare altri parametri chimico-fisici-biologici della colonna d'acqua (temperatura, pH, salinità, potenziale redox, ossigeno disciolto, conducibilità e clorofilla) utili alla definizione dello stato di salute dell'ambiente e all'interpretazione dei risultati ottenuti con gli altri metodi di monitoraggio (ad esempio accumulatori passivi e test *in situ*).

*Fig. 9 – Sonda multiparametrica*



In ogni stazione di campionamento i dati saranno acquisiti lungo il profilo verticale della colonna d'acqua con sonda multiparametrica. Nelle stesse stazioni saranno prelevati 2 campioni d'acqua con una bottiglia Niskin (Fig. 10) a un metro dalla superficie e a un metro dal fondo, che saranno miscelati e sottoposti alla determinazione dei TSS.

*Fig. 10 – Bottiglia Niskin*



I campionamenti nelle 6 stazioni di monitoraggio saranno effettuati con una cadenza stagionale e il set analitico prevede la determinazione della concentrazione dei solidi sospesi e la misurazione, mediante sonda multiparametrica, dei seguenti parametri:

- ✓ **Profondità:** Range di misura: da 0 a 10 m; da 0 a 25 m; da 0 a 100 m; da 0 a 200 m; Precisione:  $\pm 0,003$  m fino a 10 m;  $\pm 0,05$  fino a 25 m;  $\pm 0,5$  fino a 100 m;  $\pm 0,1$  fino a 200 m; Risoluzione: 0,001 m fino a 10 m; 0,01 fino a 25 m; 0,01 fino a 100 m; 0,1 m fino a 200 m;
- ✓ **Temperatura:** Range di misura: da  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}$ ; Precisione:  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ; Risoluzione: 0,01  $^{\circ}\text{C}$ ;
- ✓ **pH:** Range di misura: da 0 a 14; Precisione:  $\pm 0,2$  unità; Risoluzione: 0,02;
- ✓ **Salinità** Range di misura: da 0 a 70 ppt; Precisione:  $\pm 0,2$  ppt; Risoluzione: 0,01 ppt;
- ✓ **Potenziale Redox (ORP):** Range di misura: da -999 a 999 mV; Precisione:  $\pm 20$  mV; Risoluzione: 1 mV;
- ✓ **Ossigeno disciolto:** Sensore a luminescenza HACH LDO; Range di misura: da 0 a 20 mg/l; Precisione:  $\pm 0,1$  mg/l (per  $\text{DO} < 8$  mg/l);  $\pm 0,2$  mg/l per  $\text{DO} > 8$  mg/l); Risoluzione: 0,01 mg/l;
- ✓ **Torbidità:** Range di misura: da 0 a 3000 NTU; Precisione: 1% fino a 100 NTU, 3% fino a 400 NTU; 5% fino a 3000 NTU; Risoluzione: 0,1 NTU fino a 400 NTU; 1 NTU fino a 3000 NTU;
- ✓ **Conducibilità:** Range di misura: da 0 a 100 mS/cm; Precisione:  $\pm 0,5\%$  del valore misurato; 0,001 mS/cm; Risoluzione: 0,001 (4 digit);

- ✓ **Clorofilla:** Range di misura: da 0,03 a 500 µg/l; Precisione: ± 3% equiv 1ppt Rhod WT standard; Risoluzione: 0,01 µg/l.

## 5. Attività di campionamento e analisi del biota

Con il termine “comunità zoobentoniche” si indicano quelle associazioni di animali che vivono a contatto con il fondo dei sistemi acquatici, o che a esso sono strettamente legate, da relazioni trofiche ed ecologiche.

Lo studio della componente macrobentonica è parte integrante della valutazione delle caratteristiche dell'ambiente marino e fornisce parametri importanti per valutarne la qualità. La composizione delle comunità bentoniche dei fondali può essere utilizzata per rilevare eventuali specie di elevato pregio naturalistico e caratterizzare le condizioni ambientali di aree da indagare.

Questi organismi, data la stretta associazione con il fondo e la scarsa mobilità, sono efficaci descrittori dell'ecosistema, poiché direttamente esposti alla variazione di parametri ambientali. Dall'analisi delle modificazioni nella struttura quali-quantitativa delle comunità, si possono infatti trarre informazioni sufficientemente complete circa la qualità dell'ambiente e le sue alterazioni.

Fanno parte dei popolamenti macrozoobentonici gli organismi di dimensioni superiori a 0,5 mm o 1 mm (secondo diversi autori). In tali comunità dominano, sia come numero di specie che di individui, i taxa degli Anellidi Policheti, dei Molluschi, dei Crostacei (Decapodi e Anfipodi) e degli Echinodermi.

L'estrema eterogeneità trofico-funzionale delle specie che compongono le comunità di fondo mobile e la presenza di cicli vitali complessi, fornisce un prezioso strumento di valutazione dell'integrità eco sistemica. Infatti la risposta delle comunità agli stress ambientali consiste in un'alterazione più o meno marcata della struttura dei popolamenti, a partire da un cambiamento nella composizione specifica, con la scomparsa delle specie più sensibili. Lo studio delle comunità bentoniche dei fondi mobili e l'elaborazione di indici di biodiversità sono quindi ulteriori mezzi per monitorare lo stato di qualità degli ambienti marino-costieri.

I parametri più utilizzati sono:

- Ricchezza totale specifica (S): il numero totale di specie presenti in ogni stazione;
- Abbondanza totale (A): il numero complessivo di individui per stazione;
- Indice di ricchezza specifica di Margalef (d): tale indice esprime il numero di specie presenti dato un certo numero di individui, e viene espresso come il rapporto tra il numero di specie totali e il numero di individui per ogni stazione;

- Indice di diversità specifica di Shannon-Wiener ( $H'$ ): si ottiene rapportando l'abbondanza totale e la ricchezza specifica tra loro e con i dati relativi all'intero stock campionato;
- Indice di Equiripartizione di Pielou ( $J'$ ): è invece una misura della distribuzione degli individui tra le specie, basata sul rapporto tra il valore dell'indice di Shannon-Wiener in ogni stazione e il massimo numero di specie presenti nell'area considerata;
- Indice di diversità di Simpson: esprime il complemento dell'indice di dominanza, ovvero la probabilità che due individui raccolti a caso in uno stesso campione appartengano a specie differenti.

Il presente piano di monitoraggio prevede il campionamento con una frequenza annuale delle comunità macrozoobentoniche, eseguito tramite l'utilizzo di una benna Van Veen, nelle seguenti stazioni di campionamento:

- DE02, DE09: nell'area SIN soggetta alla procedura di deperimetrazione,
- VN4: controllo esterno all'area soggetta ai futuri interventi infrastrutturali.

In laboratorio si procederà poi al sorting, ovvero allo smistamento degli individui nei singoli gruppi tassonomici identificati. Il campione ottenuto sarà analizzato, grazie all'ausilio di uno stereomicroscopio, per l'identificazione tassonomica degli organismi fino al più basso livello tassonomico possibile. Si procederà poi alla valutazione degli indici sopra elencati

## 6. Bibliografia di riferimento

AA.VV. (2001). Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003). A.M. Cicero & I. Di Girolamo (Eds), Ministero Ambiente e Territorio – ICRAM.

APAT IRSA-CNR (2003) Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida, 29/2003, Vol. Primo. Metodo 2110: 177-182.

APAT IRSA-CNR (2003) Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida, 29/2003, Vol. Terzo. Metodo 8060: 1043-1049.

Baker E.T and Lavelle J.W (1984). The effect of particle size on the light attenuation coefficient of natural suspensions. *Journal of geophysical research - Ocean*: (89) 8197-8203.

Capello M., Cutroneo L., Castellano M., Orsi M., Pieracci A., Bertolotto R.M., Povero P., Tucci S. (2010). Physical and sedimentological characterisation of dredged material. *Chemistry and Ecology*, 26

Supplement, 359-369.

Cutroneo L., Castellano M., Ferranti M.P., Povero P., Tucci S., Capello M. (2013). Use of optical and acoustic instruments to study the turbid plumes generated by three different types of dredges during dredging inside and outside a port. *Journal of Soils and Sediments*, 12 (9), 1645-1654. DOI 10.1007/s11368-013-0756-5.

Cutroneo L., Castellano M., Pieracci A., Povero P., Tucci S., Capello M. (2012). The use of a combined monitoring system for following a turbid plume generated by dredging activities in a port. *Journal of Soils and Sediments*, 12: 797-809. DOI: 10.1007/s11368-012-0486-0.

Davison W. and Zhang H. (1994). In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367, pages 546–548.

Decreto Direttoriale n.351 dell'8 giugno 2016 che approva la “Procedura per la derivazione dei valori di riferimento in aree marine e salmastre interne alla perimetrazione dei Siti di Interesse Nazionale (SIN)

Decreto Ministeriale 173, 2016. Decreto n. 173 del 15 luglio 2016 del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, pubblicato sul Supplemento ordinario n. 208 alla “Gazzetta Ufficiale del 6 settembre 2016 - Serie generale Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini.

Focardi S., Leonzio C., 2001. I bioindicatori nel monitoraggio costiero. *Biol. Mar. Medit.*, 8 (2): 136-145.

Folk R.L. (1954). The distinction between grain size and mineral composition in sedimentary rock nomenclature. *Journal of Geology*, 62 (4), 344-359.

ICRAM-APAT (2007). Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini. (consultabile sul web all'indirizzo [www.isprambiente.it](http://www.isprambiente.it))

ISPRA (2015). Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne salmastre. Manuali e Linee Guida 121/2015, 78 pp.

Krumbein, W.C. (1934). Size Frequency Distribution of Sediments. *Journal of Sedimentary Petrology*, 4, 65-77.

Nota D.J.G. (1958). Sediments of the western Guyana shelf. Report of Orinoco shelf expedition, 2, Mendedel. Landbomvhogedrool, Wegeningera, 98 p



- Peakall D.B. and Shugart L.R. (eds) (1993). *Biomarkers. Research and Application in the Assessment of Environmental Health. Cell Biology*, Vol. 68. Springer-Verlang, Heidelberg.
- Puig P. and Palanques A. (1998). Temporal variability and composition of settling particle fluxes on the Barcelona continental margin (Northwestern Mediterranean). *Journal of Marine Research*, 56 (3): pp. 639-654(16).
- Sartori D., Macchia S., Vitiello V., Morroni L., Onorati F., Pellegrini D. (2017). Quaderni – Ricerca Marina n. 11/2017. ISPRA. A cura di Macchia, S., Sartori, D., Roma, pp 60.
- Shepard, F.P. (1954) Nomenclature Based on Sand-Silt-Clay Ratios. *Journal of Sedimentary Petrology*, 24, 151-158.
- USACE (1991). Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal. Testing Manual USEPA-503-8-90/002: 219 pp.
- USEPA (1994). Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Marine and Estuarine Organism. 600-4-91-003, Cincinnati, Ohio.
- USEPA. Chapman, G.A., Denton, D.L., & Lazorchak, J.M. (1995). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to West Coast marine and estuarine organisms. US. EPA, 600/R-95/136, Cincinnati, Ohio.
- USEPA (1998). In situ Treatment of Contaminated Sediments. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington D. C.
- USEPA (1988). Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms, Report No. 600/4-87/028. US EPA Cincinnati.
- Udden J. A (1914). Mechanical composition of clastic sediments, *Bull. Geol. Soc. Am.* 25, 655-744.
- Wentworth C. K. (1922). A scale of grade and class terms for clastic sediments, *J. Geology* V. 30, 377-392.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



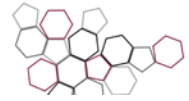
Sistema Nazionale  
per la Protezione  
dell'Ambiente

# ALLEGATO 1

\*\*\*\*

## *Stazioni di monitoraggio*

Ubicazione delle stazioni di monitoraggio



Istitu



Nazionale  
tezione  
Ambiente



*Stazioni di monitoraggio: coordinate e comparto ambientale interessato dal monitoraggio*

Codice stazione	Comparto ambientale	Batimetria	WGS84				UTM WGS84	
			Longitudine (dd)	Latitudine (dd)	Longitudine (dms)	Latitudine (dms)	X (m)	Y (m)
DE01	sedimenti	-10,75	10,291316	43,557676	10° 17' 28.737" E	43° 33' 27.634" N	604297	4823557
DE02	sedimenti, colonna d'acqua, biota	-8,00	10,284176	43,557982	10° 17' 3.032" E	43° 33' 28.736" N	603719	4823582
DE03	sedimenti	-10,25	10,278505	43,563087	10° 16' 42.617" E	43° 33' 47.114" N	603253	4824142
DE04	sedimenti	-9,25	10,284866	43,552595	10° 17' 5.518" E	43° 33' 9.342" N	603784	4822984
DE05	sedimenti	-12,00	10,271229	43,557572	10° 16' 16.425" E	43° 33' 27.261" N	602674	4823520
DE06	sedimenti, colonna d'acqua	-11,00	10,280503	43,548981	10° 16' 49.810" E	43° 32' 56.331" N	603438	4822578
DE07	sedimenti	-15,00	10,272875	43,552615	10° 16' 22.348" E	43° 33' 9.414" N	602816	4822972
DE08	sedimenti	-16,00	10,276515	43,545164	10° 16' 35.455" E	43° 32' 42.589" N	603123	4822149
DE09	sedimenti, colonna d'acqua, biota	-11,25	10,278432	43,570416	10° 16' 42.355" E	43° 34' 13.498" N	603234	4824956
DE10	sedimenti, colonna d'acqua	-5,00	10,294939	43,569938	10° 17' 41.779" E	43° 34' 11.775" N	604568	4824923
VE7	sedimenti, colonna d'acqua	-5,00	10,297549	43,562151	10° 17' 51.176" E	43° 33' 43.742" N	604792	4824062
VN4	sedimenti, colonna d'acqua, biota	n.v.	10,286806	43,589389	10° 17' 12.502" E	43° 35' 21.800" N	603878	4827073

NOTA: la batimetria delle stazioni fa riferimento ai rilievi effettuati dall'AdSP-MTS nel 2011; nella stazione VN4 non è stato possibile valutare la batimetria perché al di fuori dell'area oggetto dell'indagine del 2011.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale  
per la Protezione  
dell'Ambiente

# ALLEGATO 2

\*\*\*\*

*Scheda di campo*







**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale  
per la Protezione  
dell'Ambiente

# ALLEGATO 3

\*\*\*\*

*Stazioni di monitoraggio dei sedimenti: analisi  
previste e frequenza di campionamento*



STAZIONE	AREA	FREQUENZA	ANALISI				
			Fisiche	Chimiche		Ecotossicologiche	Biologiche
<b>Vn4</b>	Scolmatore	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	<i>P. lividus, P. tricornutum, V. fischeri</i> ***	Benthos
<b>Ve7</b>	Interno porto	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	<i>P. lividus, P. tricornutum, V. fischeri</i> ***	-
<b>DE01</b>	Interno porto	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	-	-
<b>DE02</b>	Area SIN	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	<i>P. lividus, P. tricornutum, V. fischeri</i> ***	Benthos
<b>DE03</b>	Area SIN	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	-	-
<b>DE04</b>	Area SIN	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	-	-
<b>DE05</b>	Esterno SIN	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	-	-
<b>DE06</b>	Area SIN	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	<i>P. lividus, P. tricornutum, V. fischeri</i> ***	

STAZIONE	AREA	FREQUENZA	ANALISI				
			Fisiche	Chimiche		Ecotossicologiche	Biologiche
DE07	Esterno SIN	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	-	-
DE08	Area SIN	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	-	-
DE09	Area SIN	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	<i>P. lividus, P. tricornutum, V. fischeri</i> ***	Benthos
DE10	Vasche di colmata	Annuale	Granulometria	Metalli*	IPA**	<i>P. lividus, P. tricornutum, V. fischeri</i> ***	-

\* Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn

\*\* La determinazione degli IPA (Naftalene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benz(a)antracene, Crisene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(a)pirene, Dibenzo(a,h)antracene, Benzo(g,h,i)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pirene) sarà a carico dell'AdSP-MTS, come stabilito nell'Allegato tecnico alla Convenzione.

\*\*\* Saggio di inibizione algale con *P. tricornutum* e saggio di embriotossicità con *P. lividus* condotti sulla matrice elutriato, saggio su fase solida con il batterio *V. fischeri*

# ALLEGATO 4

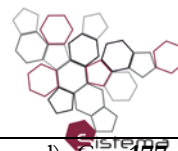
\*\*\*\*

*Stazioni di monitoraggio della colonna d'acqua:  
analisi previste e frequenza di campionamento*

Analisi		Dettaglio parametri analizzati
<b>Mussel Watch</b>	metalli	As, Cd, Cr, Cu, <a href="#">Fe</a> , Hg, Ni, Pb, Zn
	IPA*	Naftalene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benz(a)antracene, Crisene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(a)pirene, Dibenzo(a,h)antracene, Benzo(g,h,i)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pirene
<b>Biomarkers</b>		Capacità antiossidante tot. per radicali perossili e ossidrilici (TOSCAROO+TOSCAOH), Attività catalasi (CAT), Livelli malondialdeide (MDA), Attività acetilcolinesterasi (ACHE), Attività acylcoenzima A-ossidasi (AOX), Livelli metallotioneine (MT), Frequenza micronuclei (MN), Stress on stress o Test di Sopravvivenza all'aria (SOS)
<b>Campionatori passivi</b>	metalli	As, Cd, Cr, Cu, <a href="#">Fe</a> , Hg, Ni, Pb, Zn
	IPA	Naftalene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benz(a)antracene, Crisene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(a)pirene, Dibenzo(a,h)antracene, Benzo(g,h,i)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pirene
	PCB	Cog. <b>18</b> (2,2',5'-trichlorobiphenyl), Cog. <b>28</b> (2,4,4'-trichlorobiphenyl), Cog. <b>31</b> (2,4',5-trichlorobiphenyl), Cog. <b>44</b> (2,2',3,5'-tetrachlorobiphenyl), Cog. <b>52</b> (2,2'5,5'-tetrachlorobiphenyl), Cog. <b>77</b> (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl), Cog. <b>81</b> (3,4,4'5-tetrachlorobiphenyl), Cog. <b>95</b> (2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl), Cog. <b>99</b> (2,2'4,4',5-pentachlorobiphenyl), Cog. <b>101</b> (2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl), Cog. <b>110</b> (2,3,3',4',6-pentachlorobiphenyl), Cog. <b>126</b> (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl), Cog. <b>128</b> (2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl), Cog. <b>138</b> (2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl), Cog. <b>146</b> (2,2'3,4',5,5'-hexachlorobiphenyl), Cog. <b>149</b> (2,2',3,4',5',6-hexachlorobiphenyl), Cog. <b>151</b> (2,2',3,5,5',6-hexachlorobiphenyl), Cog. <b>153</b> (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl), Cog. <b>169</b> (3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl), Cog. <b>105</b> (2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl), Cog. <b>114</b> (2,3,4,4',5-pentachlorobiphenyl), Cog. <b>118</b> (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl), Cog. <b>123</b> (2',3,4,4',5-pentachlorobiphenyl), Cog. <b>156</b> (2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl), Cog. <b>157</b> (2,3,3',4,4',5'-hexachlorobiphenyl), Cog. <b>167</b> (2,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl),



ISPPA



		Cog.170 (2,2',3,3',4,4',5-heptachlorobiphenyl), Cog.171 (2,2',3,3',4',5,6-heptachlorobiphenyl), Cog.180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl), Cog.183 (2,2',3,4,4',5,6-heptachlorobiphenyl), Cog.187 (2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl), Cog.189 (2,3,3',4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl).
	ecotossicologia	Batteria di saggi biologici appartenenti a livelli trofici diversi e a taxa filogeneticamente distanti.
Test <i>in situ</i>	ecotossicologia	Saggio di embriotossicità con <i>P. lividus</i> .
Sonda multiparametrica		<p><b>Profondità:</b> Range di misura: da 0 a 10 m; da 0 a 25 m; da 0 a 100 m; da 0 a 200 m; Precisione: <math>\pm 0,003</math> m fino a 10 m; <math>\pm 0,05</math> fino a 25 m; <math>\pm 0,5</math> fino a 100 m; <math>\pm 0,1</math> fino a 200 m; Risoluzione: 0,001 m fino a 10 m; 0,01 fino a 25 m; 0,01 fino a 100 m; 0,1 m fino a 200 m;</p> <p><b>Temperatura:</b> Range di misura: da -5°C a 50 °C; Precisione: <math>\pm 0,1</math> °C; Risoluzione: 0,01 °C;</p> <p><b>pH:</b> Range di misura: da 0 a 14; Precisione: <math>\pm 0,2</math> unità; Risoluzione: 0,02;</p> <p><b>Salinità</b> Range di misura: da 0 a 70 ppt; Precisione: <math>\pm 0,2</math> ppt; Risoluzione: 0,01 ppt;</p> <p><b>Potenziale Redox (ORP):</b> Range di misura: da -999 a 999 mV; Precisione: <math>\pm 20</math> mV; Risoluzione: 1 mV;</p> <p><b>Ossigeno disciolto:</b> Sensore a luminescenza HACH LDO; Range di misura: da 0 a 20 mg/l; Precisione: <math>\pm 0,1</math> mg/l (per DO &lt; 8 mg/l); <math>\pm 0,2</math> mg/l per DO &gt; 8 mg/l); Risoluzione: 0,01 mg/l;</p> <p><b>Torbidità:</b> Range di misura: da 0 a 3000 NTU; Precisione: 1% fino a 100 NTU, 3% fino a 400 NTU; 5% fino a 3000 NTU; Risoluzione: 0,1 NTU fino a 400 NTU; 1 NTU fino a 3000 NTU;</p> <p><b>Conducibilità:</b> Range di misura: da 0 a 100 mS/cm; Precisione: <math>\pm 0,5\%</math> del valore misurato; 0,001 mS/cm; Risoluzione: 0,001 (4 digit);</p> <p><b>Clorofilla:</b> Range di misura: da 0,03 a 500 <math>\mu\text{g/l}</math>; Precisione: <math>\pm 3\%</math> equiv 1ppt Rhod WT standard; Risoluzione: 0,01 <math>\mu\text{g/l}</math>.</p>
Solidi sospesi (TSS)		valore del peso secco a 105°C del materiale sospeso per unità di volume d'acqua (mg/l).

\* La determinazione degli IPA nei mitili sarà a carico dell'AdSP-MTS, come stabilito nell'Allegato tecnico alla Convenzione.



STAZIONE	AREA	FREQUENZA ANALISI				
		Mussel Watch	Biomarkers	Campionatori passivi*	Test <i>in situ</i>	Sonda multiparametrica e TSS
Vn4	Scolmatore	Annuale	Annuale	Annuale	Semestrale	Stagionale
Ve7	Interno porto	Annuale	Annuale	Annuale	Semestrale	Stagionale
DE02	Area SIN	Annuale	Annuale	Annuale	Semestrale	Stagionale
DE06	Area SIN	Annuale	Annuale	Annuale	Semestrale	Stagionale
DE09	Area SIN	Annuale	Annuale	Annuale	Semestrale	Stagionale
DE10	Vasche di colmata	Annuale	Annuale	Annuale	Semestrale	Stagionale

\* per 3 anni di monitoraggio a partire dal 2020

VIA PEC  
[adsp@pec.portialtotirreno.it](mailto:adsp@pec.portialtotirreno.it)  
[arp.at.protocollo@postacert.toscana.it](mailto:arp.at.protocollo@postacert.toscana.it)

**Autorità di Sistema Portuale  
del Mar Tirreno Settentrionale**  
c.a.: **Presidente**  
**Ing. Stefano Corsini**  
**Scali Rosciano 6**  
**57123 Livorno**

p.c.: **ARPAT – Direzione Tecnica**  
c.a.: **Dott. Guido Spinelli**  
**Via N. Porpora, 22**  
**50144 Firenze**

**Oggetto: Trasmissione documentazione tecnica relativa alle prescrizioni del Decreto Direttoriale del MATTM dell'8 giugno 2016 – Rif.to Convenzione ISPRA- AdSP del Mar Tirreno Settentrionale.**

Con riferimento alla Convenzione stipulata tra ISPRA e Codesta Autorità di Sistema Portuale (Protocollo n.58166 del 02/10/2018), con la presente si trasmette il documento “*Sito di bonifica di interesse nazionale di Livorno - Applicazione della procedura per la derivazione di valori di riferimento in aree marine e salmastre interne alla perimetrazione dei S.I.N. - Analisi di differenti scenari ambientali per la valutazione ambientale*” (Allegato 1).

Nel documento è rappresentato il percorso adottato nell'applicazione della Procedura per la derivazione di valori di riferimento nel S.I.N. di Livorno, ai sensi del Decreto Direttoriale del MATTM dell'8 giugno 2016 “*Criteri per la definizione dei valori di riferimento specifici di concentrazione degli inquinanti per i materiali risultanti dalle attività di dragaggio*”.

Inoltre, alla luce delle risultanze analitiche acquisite da ARPAT e degli esiti delle analisi ecotossicologiche condotte da questo Istituto, è stato possibile procedere all'elaborazione sito specifica volta all'individuazione di nuovi valori di riferimento da adottare per i sedimenti marini nel SIN di Livorno secondo il suddetto DD dell'8 giugno 2016 (valutazione ambientale).

Come contributo alla successiva e necessaria fase di valutazione sanitaria prevista dal DD 08.06.2016, si invia la nota tecnica “*Sintesi delle indagini di bioaccumulo di metalli e IPA nei mitili trapiantati per le attività di monitoraggio della seconda vasca di colmata del Porto di Livorno negli anni 2012-2017*” (Allegato 2), in cui si riportano i risultati delle analisi di bioaccumulo in popolazioni di mitili trapiantati (*Mussel Watch*) eseguite da ISPRA.

Ad integrazione dei dati forniti e al fine di raccogliere ulteriori informazioni utili alla valutazione sanitaria per i parametri chimici indicati dal Regolamento europeo 1881/2006/EC, si suggerisce di acquisire da ARPAT le risultanze analitiche in loro possesso relativamente alle campagne sul pescato che la predetta Agenzia conduce nelle aree limitrofe alla zona portuale.

Rimanendo a disposizione per eventuali chiarimenti, si porgono distinti saluti.

Centro Nazionale per la caratterizzazione ambientale  
e la protezione della fascia costiera,  
la climatologia marina e l'oceanografia operativa

Il Dirigente  
Ing. Maurizio Ferla





## **SITO DI BONIFICA DI INTERESSE NAZIONALE DI LIVORNO**

**Applicazione della procedura per la derivazione di valori di riferimento  
in aree marine e salmastre interne alla perimetrazione dei S.I.N.**

**Analisi di differenti scenari ambientali per la valutazione ambientale**



## **Responsabile della Convenzione ISPRA**

*David Pellegrini*

## **Relazione a cura di**

*Simona Macchia – Enrichetta Barbieri – Margherita Secci*

## **Collaboratori ISPRA**

*Davide Sartori – Maria Elena Piccione – Cristian Mugnai – Fabiano Pilato*

*Valentina Vitiello – Gianluca Chiaretti – Lorenzo Morroni – Fulvio Onorati*

## SOMMARIO

1. PREMESSA.....	4
2. DESCRIZIONE DELL'AREA MARINA A MARE RIENTRANTE NEL SIN DI LIVORNO .....	5
3. CRITERI PER LA DETERMINAZIONE DEI VALORI CHIMICI DI RIFERIMENTO SITO SPECIFICI AI SENSI DD 8 GIUGNO 2016.....	8
4. APPLICAZIONE DELLA PROCEDURA AI SENSI DD 8 GIUGNO 2016.....	13
4.1 Elaborazione dei dati .....	13
4.2 Livelli chimici di riferimento .....	21
4.3 Superamenti dei LEA .....	23
4.4 Scenari di superamento dei LEA.....	29
4.5 Confronto fra scenari diversi.....	34
5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	37
6. BIBLIOGRAFIA .....	40

**ALLEGATO 1 – ANALISI ECOTOSSICOLOGICHE**

**ALLEGATO 2 – ANALISI CHIMICHE**

## 1. PREMESSA

L' Autorità Portuale del Mar Tirreno Settentrionale (AdSP-MTS) intendendo procedere all'applicazione della "Procedura per la derivazione di valori di riferimento in aree marine e salmastre interne alla perimetrazione dei S.I.N.", ai sensi del Decreto Direttoriale del MATTM dell'8 giugno 2016 "Criteri per la definizione dei valori di riferimento specifici di concentrazione degli inquinanti per i materiali risultanti dalle attività di dragaggio" ha richiesto al MATT (Nota Prot. n.6452 del 05/07/2016) la possibilità di avvalersi della collaborazione di ISPRA per la redazione ed esecuzione del piano d'indagine finalizzato all'aggiornamento della caratterizzazione dei fondali marini.

La Direzione Generale per la Salvaguardia del Territorio e delle acque del MATTM, con Nota Prot. n.0013232/STA del 13/07/2016 DIV III, ha accolto la richiesta dell'AdSP raccomandando il coinvolgimento di ARPAT. In seguito a questa risposta, l'AdSP-MTS ha stipulato due convenzioni separate con ISPRA e ARPA per formalizzare le attività di supporto richieste ai due Enti nell'applicazione della procedura approvata con il DD 8 giugno 2016.

ISPRA e AdSP-MTS in data 20 dicembre 2018 hanno stipulato la convenzione sopracitata che ha come oggetto la collaborazione tecnico-scientifica relativa alle tematiche di cui ai punti 1, 2 e 3 del comma 3.3 dell'art.3 "Strumenti per l'attuazione del Protocollo d'Intesa" del Protocollo d'Intesa e cioè la definizione di piani di caratterizzazione ambientale delle aree portuali di competenza dell'AdSP-MTS interessate da attività di movimentazione dei fondali, la definizione e realizzazione di programmi di monitoraggio ambientale, inclusi approfondimenti sperimentali e applicazione di nuove tecnologie, relativamente alla gestione dei materiali da dragare all'interno dei porti di competenza dell'AdSP-MTS, l'attività di deperimetrazione dei SIN di Livorno e di Piombino, inclusa l'esecuzione di parte di attività di campo ed elaborazione dei dati.

Nell'ambito di tale accordo, ISPRA ha predisposto la proposta di "Procedura per la derivazione di valori di riferimento in aree marine e salmastre interne alla perimetrazione – Applicazione al S.I.N. di Livorno" (Prot. ISPRA n.4446 del 31.01.19), con riferimento all'area marina prospiciente le due vasche di colmata ricompresa nel SIN, eseguito le analisi ecotossicologiche sui campioni prelevati dall'AdSP-MTS e proceduto all'elaborazione statistica dei dati chimici (analisi condotte da ARPAT) ed ecotossicologici per la derivazione dei nuovi valori di riferimento al fine della sola valutazione ambientale ai sensi del D D del MATTM dell'8 giugno 2016.

## 2. DESCRIZIONE DELL'AREA MARINA A MARE RIENTRANTE NEL SIN DI LIVORNO

Il D.M. 8 settembre 2001 n. 468 «Regolamento recante: Programma nazionale di bonifica e ripristino ambientale» il MATMM ha individuato, tra gli altri, il sito di Livorno come sito d'intervento di bonifica di interesse nazionale. Il perimetro del Sito di Interesse Nazionale per le Bonifiche di Livorno è stato definito con il successivo D.M. 24 febbraio 2003.

Al momento della sua prima configurazione l'area complessiva S.I.N. di Livorno ammontava a circa 21,935 Km<sup>2</sup> suddivisi in 14,885 Km<sup>2</sup> marini (di cui 14,202 Km<sup>2</sup> marino costiere e 0,683 Km<sup>2</sup> di acque interne) e 7,050 Km<sup>2</sup> continentali (Fig. 1). La parte dell'area marina era delimitata a Nord dalla foce del Canale dello Scolmatore e a Sud dal Faro di Livorno per una lunghezza totale di circa 4,250 Km. La fascia perimetrata si protendeva verso il largo dalla foce dello Scolmatore dell'Arno a 3,125 Km.

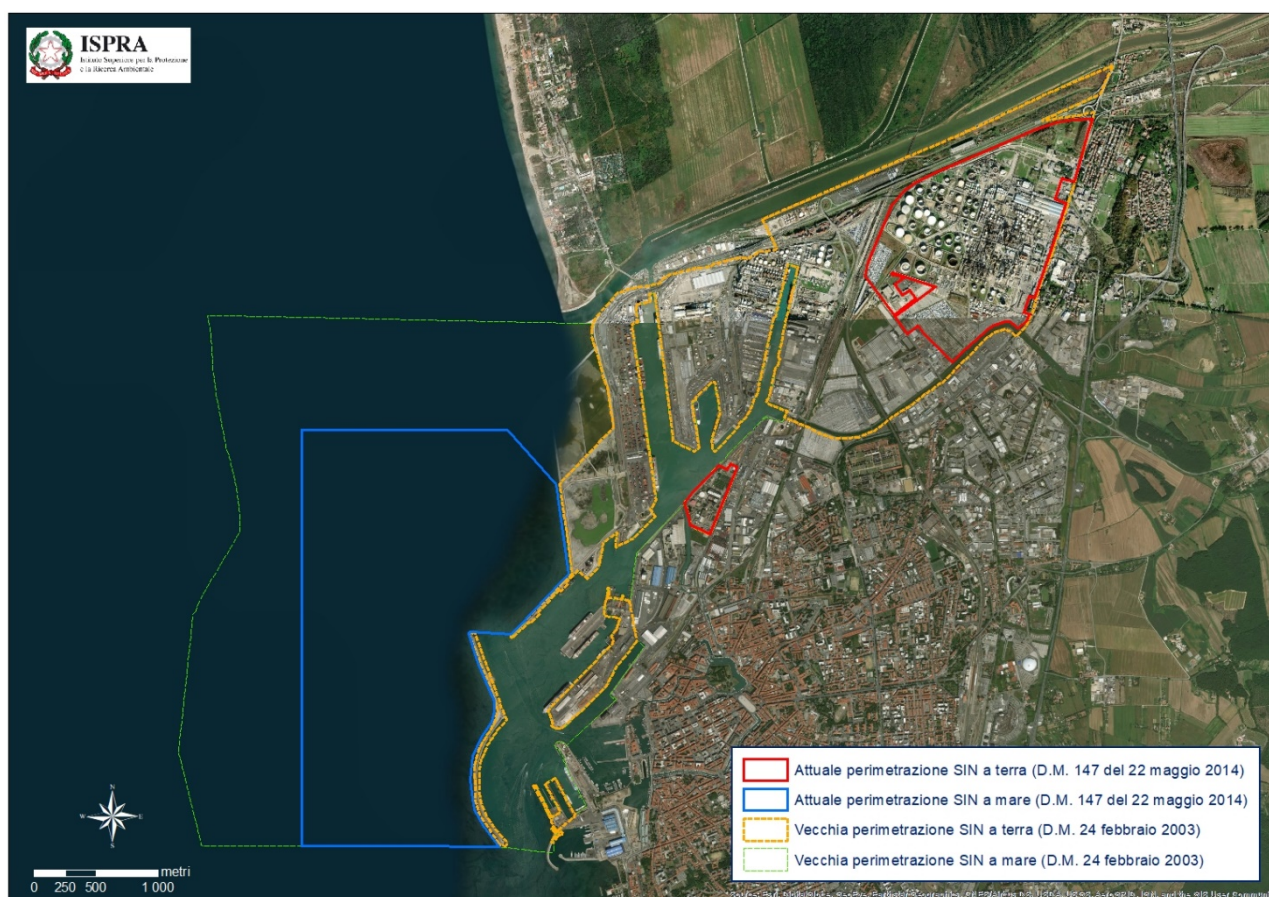


Figura 1 – Evoluzione del perimetro del Sito di Interesse Nazionale per le Bonifiche (S.I.N.) di Livorno

Attualmente il perimetro del S.I.N. è diverso da quello istituito nel 2003, infatti con D.M. n. 147 del 22 maggio 2014, il Ministero dell'Ambiente ha ridefinito il perimetro del S.I.N., riducendolo in ampiezza. Il

suo territorio è stato ricompreso nelle sole aree della Raffineria ENI, della Centrale ENEL e nelle acque esterne alle Dighe foranee (Fig.1). Il restante territorio è stato inserito nel Sito di Interesse Regionale (SIR) di Livorno e di conseguenza le competenze della procedura di bonifica sono state trasferite alla Regione Toscana.

Come primo passo nel percorso di applicazione della “*Procedura per la derivazione di valori di riferimento in aree marine e salmastre interne alla perimetrazione dei S.I.N.*” ai sensi del Decreto Direttoriale del MATTM dell’8 giugno 2016, nell’estate del 2019 l’AdSP-MTS ha effettuato una serie di attività di campionamento ambientale (dal 23 luglio 2019 al 13 ottobre 2019), precedute dalle necessarie indagini per l’individuazione di eventuali ordigni bellici e masse metalliche. I campionamenti, inseriti all’interno di una più estesa campagna di indagini ambientali geotecniche e geofisiche finalizzate alla caratterizzazione multi-parametrica dei fondali marini dell’area esterna all’attuale configurazione portuale, hanno interessato una superficie di circa 5,7 km<sup>2</sup>, compresa nella fascia batimetrica tra -3 m l.m.m. e -16 m l.m.m. circa.

Le operazioni di carotaggio ambientale sono state eseguite con l’ausilio della motonave M/N Grecale Primo per i carotaggi fino a 6 m allestita con un vibrocarotiere e dalla piattaforma galleggiante COMAP II con carotaggio continuo ad aste e carotiere per i carotaggi di lunghezza maggiore di 6 m.

La campagna complessiva di indagini ambientali a mare ha messo in evidenza la presenza più o meno continua di orizzonti litostratigrafici discretamente eterogenei sia sul piano orizzontale che verticale.

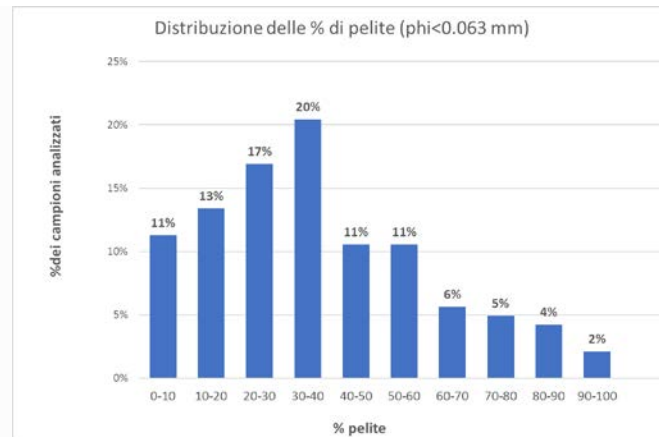
Nello specifico nell’area di indagine si possono riconoscere tre unità stratigrafiche principali:

- 1) *Orizzonte superiore*: limo da sabbioso a debolmente sabbioso, con resti di bivalvi e di fanerogame di *Posidonia oceanica*, generalmente da sciolto a poco addensato e con spessori variabili da 3 a 8 m;
- 2) *Orizzonte intermedio*: sabbia medio-fine limosa con clasti calcarenitici poligenici (che derivano dalla disgregazione della panchina, di spessori medi da 1 a 3 m) passante localmente a ghiaia sabbioso-limosa di spessori plurimetrici;
- 3) *Orizzonte inferiore*: sabbie da medie a fini limose, alternate a livelli limoso-sabbiosi e argilloso-limosi, con orizzonti plurimetrici di ghiaia eterometrica sabbioso-limosa.

Dalle informazioni rese disponibili dall’AdSP, dal punto di vista della composizione granulometrica i sedimenti (della più estesa campagna di indagini ambientali su 142 campioni) risultano costituiti da due frazioni prevalenti in un rapporto quasi 1:1, ovvero ‘sabbia’ (prevalente, > 50 %) e ‘limo più argilla’ (mediamente 40 %, corrispondente alla frazione pelitica). La restante frazione granulometrica è composta da ghiaia grossa-medio-fine, ciottoli poligenici, tritume conchigliare e, nell’orizzonte superiore, resti di *P. oceanica*.

Il grafico sottostante (Fig. 2) rappresenta la distribuzione delle percentuali di pelite nei 142 campioni ambientali prelevati e sottoposti ad analisi granulometrica nell’ambito delle indagini effettuate ai fini della

deperimetrazione del SIN (n.83 campioni) e per la caratterizzazione preliminare dell'area oggetto della futura costruzione della Darsena Europa (n.59 campioni).



*Figura 2 - Distribuzione delle percentuali di pelite nei campioni ambientali prelevati e sottoposti ad analisi granulometrica*

Dai risultati forniti risulta che il 72 % dei campioni di sedimento finora analizzati ha percentuali di sabbia (più precisamente, di sedimenti di natura non pelitica) superiori al 50 %.

In particolare gli orizzonti che mostrano una percentuale di pelite inferiore al 20 % corrispondono più precisamene ai livelli litostratigrafici di sabbia calcarenitica e di ghiaia e sabbia (corrispondente all'orizzonte intermedio e orizzonte inferiore).

### 3. CRITERI PER LA DETERMINAZIONE DEI VALORI CHIMICI DI RIFERIMENTO SITO SPECIFICI AI SENSI DD 8 GIUGNO 2016

Nell'ottobre 2015 ISPRA – CNR – ISS hanno formulato, su mandato del MATTM, una metodologia (*“Procedura per la derivazione di valori di riferimento in aree marine e salmastre interne alla perimetrazione dei S.I.N. Proposta ISPRA – CNR – ISS”*) per l'individuazione dei criteri scientifici finalizzati alla determinazione dei valori chimici di riferimento per la matrice sedimento di aree marine e salmastre situate all'interno del perimetro dei Siti di Bonifica d'Interesse Nazionale (SIN). La proposta, successivamente recepita nel **Decreto Direttoriale del MATTM 8 giugno 2016** (*“Criteri per la definizione dei valori di riferimento specifici di concentrazione degli inquinanti per i materiali risultanti dalle attività di dragaggio”*), è basata per la parte ambientale su modelli probabilistici ed ingloba la logica e le elaborazioni che hanno condotto in precedenza alla formulazione dei cosiddetti “Valori di Intervento”, costituendone quindi una evoluzione.

Tale procedura è da considerarsi valida esclusivamente nell'ambito dei SIN, ovvero in siti in cui si presume sia presente un certo grado di compromissione delle matrici ambientali. Il superamento dei valori chimici di riferimento, derivabili dall'applicazione della procedura in un determinato SIN, presuppone un'elevata probabilità di riscontrare effetti tossici per le comunità bentoniche e rischi per la salute umana in caso di consumo di prodotti ittici provenienti da tale area (bioaccumulo). La conformità ai valori di riferimento potrebbe comportare, invece, una riconsiderazione delle condizioni che hanno portato all'inclusione dell'area all'interno del SIN.

Tale approccio risulta sito specifico e permette di identificare i valori di riferimento mediante un'integrazione di informazioni che emergono dalla valutazione degli effetti sull'ambiente (***valutazione ambientale***), tramite saggi ecotossicologici, e degli effetti potenziali e indiretti sulla salute umana in relazione al bioaccumulo (***valutazione indiretta di carattere sanitario***), attraverso la misura delle concentrazioni tissutali di organismi edibili rispetto alle sostanze ed ai limiti previsti dal Regolamento Europeo 1881/2006/EC (e ss.mm.ii.).

Il modello concettuale del percorso tecnico procedurale è rappresentato in Figura 3.

I valori di riferimento calcolati secondo questa procedura basata, per la parte ambientale, su modelli probabilistici di tipo GAMs (Modelli Additivi Generalizzati), integrano le specifiche caratteristiche chimico-biologiche del SIN indagato, fornendo alcuni elementi utili per scelte gestionali differenti, in relazione anche ad altri fattori relativi al contesto ambientale, quale la presenza di impianti di acquacoltura, biocenosi sensibili, aree protette e all'eventuale esigenza di individuare “fasce tampone”, cioè margini di sicurezza tra area SIN e l'esterno.

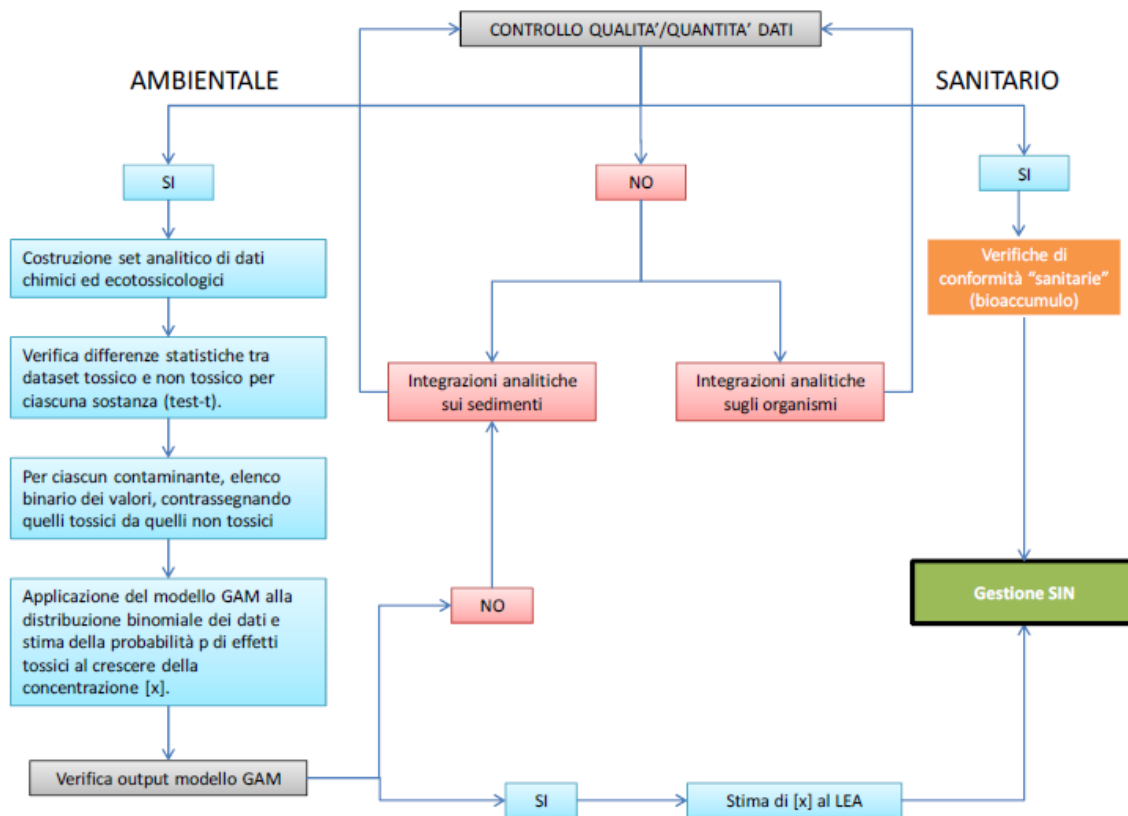


Figura 3 – Modello concettuale

Considerato che i perimetri delle aree marine dei SIN sono stati stabiliti sulla base delle pressioni presenti e di ipotesi di impatto, spesso in assenza di dati di caratterizzazione dei fondali e che in alcuni casi includono anche aree di pregio, con usi sensibili (es. aree destinate a molluschicoltura), nella procedura ISPRA – CNR – ISS si propone che la soglia probabilistica di rischio a cui associare i valori chimici di riferimento per gli aspetti ambientali (**Livello di Effetto Accettabile - LEA**) debba essere scelta in funzione del contesto ambientale (presenza di aree protette, biocenosi sensibili, impianti di allevamento, ecc.), delle pressioni che insistono nell'area (aree portuali, effluenti, ecc.) e degli impatti già individuati. A titolo esemplificativo, si potrebbero definire gli scenari ambientali corrispondenti ai seguenti livelli di probabilità attesa di riscontrare generici effetti tossici (Fig. 4):

- **Livello di Effetto Certo (LEC)**, si trova in corrispondenza di una probabilità attesa di effetti tossici pari al 95 % ( $p = 0.95$ ): si tratta di un livello chimico di riferimento che denota una compromissione particolarmente elevata, in quanto associata alla certezza statistica di ottenere effetti ecotossicologici, seppur generici;
- **Livello di Effetto Molto Probabile (LEMP)**, si trova in corrispondenza di una probabilità attesa di effetti tossici pari al 75 % ( $p = 0.75$ ): denota un livello di pericolo ecotossicologico relativamente elevato, in quanto associato a miscele di contaminanti in grado di determinare effetti tossici con elevata frequenza (circa 3 casi su 4);



- **Livello di Effetto Soglia (LES)**, si trova in corrispondenza di una probabilità attesa di effetti tossici pari al 50 % ( $p = 0.5$ ): rappresenta una soglia di transizione non ben distinta, in quanto la probabilità di ottenere effetti tossici equivale a quella di non averne ed il contributo dei singoli contaminanti alle eventuali risposte tossiche non è ancora evidenziabile da un punto di vista statistico.

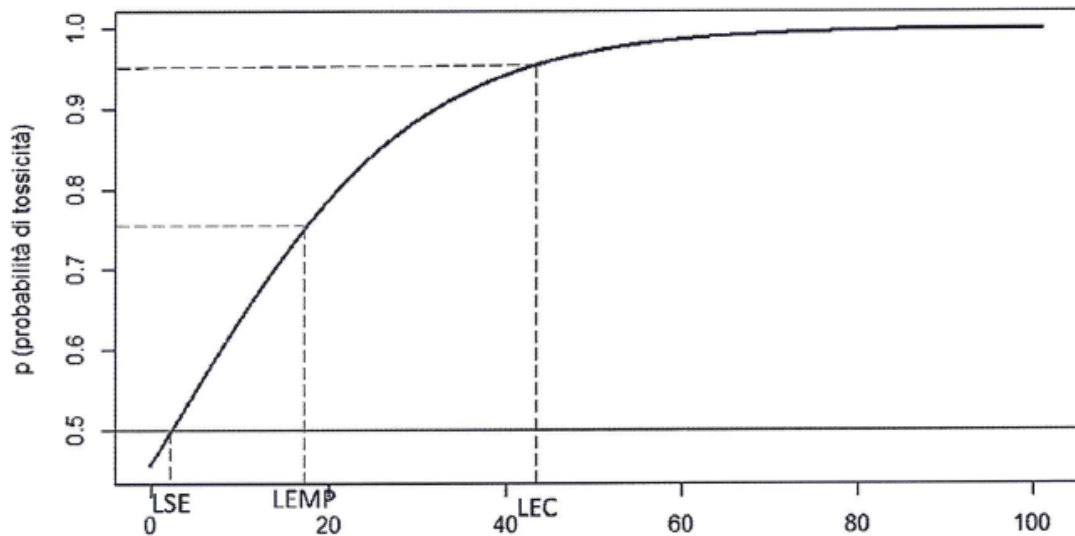


Figura 4 – Modello additivo generalizzato applicato alla distribuzione binomiale degli effetti tossici in funzione della concentrazione del contaminante con esempi di livelli di effetto (LSE: livello di effetto soglia,  $p=0.5$ ; LEMP: livello di effetto molto probabile,  $p=0.75$ ; livello di effetto certo,  $p=0.95$ )

Qualora la maggior parte dei campioni presenti effetti tossici lievi o moderati è ragionevole supporre che il valore di  $p = 0.95$  sia sufficientemente cautelativo, anche in caso di componenti da tutelare. Nel caso invece che la maggioranza degli effetti sia grave o molto grave, denotando una situazione di particolare pericolo ecotossicologico, è ragionevole supporre che il valore di  $p$  debba essere opportunamente ridotto, in particolare in caso di componenti da tutelare.

Qualora si decida di procedere ad una variazione di  $p$  accettabile rispetto al LEC ( $p=0.95$ ), in funzione del contesto ambientale e delle esigenze territoriali, le ARPA e/o le Regioni o, più in generale, i soggetti interessati potranno definire il LEA attribuendo uno specifico “peso” a ciascuno dei fattori selezionati da considerare ai fini della descrizione del contesto ambientale.

A tal fine, nell’ambito dei lavori del Tavolo Tecnico per la predisposizione della proposta, è stata formulata una lista di variabili con i relativi range all’interno dei quali è possibile stabilire il peso di ciascun fattore. Il peso cumulativo dei fattori ambientali selezionati, a partire dal LEC ( $p = 0.95$ ), tenderà a ridurre progressivamente il LEA per lo specifico SIN (Fig. 5).

Variabile	Peso rispetto a p (proposta)
Presenza entro il perimetro di habitat/biocenosi sensibili/specie protette/aree di nursery	0.01 - 0.05
Presenza entro 3 mn dal perimetro esterno di habitat/biocenosi sensibili/specie protette/aree di nursery	0.01 - 0.02
Presenza entro il perimetro di aree marine a vario titolo protette	0.05 - 0.10
Presenza entro 3 mn dal perimetro esterno di aree marine a vario titolo protette	0.01 - 0.02
Presenza di interconnessione tra falda superficiale e falda profonda	0.01 - 0.02
Presenza di impianti o aree adibite a molluschicoltura/acquacoltura/pesca e/o ad attività ricreative (balneazione)	0.01 - 0.1

Figura 5 – Variabili e relativo peso da considerare nella scelta del LEA sito specifico

Il Livello di Effetto Accettabile dovrà comunque essere compreso tra LEMP e LEC, ovvero con un livello di **p** compreso tra 0.75 e 0.95, indipendentemente dalla risultante del peso cumulativo dei pesi attribuiti.

Ciascun valore di riferimento così individuato potrà essere applicato solo a sedimenti dell'area con concentrazioni ricadenti nel range individuato dal set di dati utilizzato per le elaborazioni e non può essere estrapolato a materiali/sedimenti aventi livelli di contaminazione superiori o inferiori a tale range. L'estensione dell'utilizzo dei valori di riferimento a sedimenti con caratteristiche diverse dovrà prevedere la rielaborazione dei dati, includendo i valori di questi ultimi, eventualmente ottenibili da indagini integrative.

Per stimare la probabilità di effetti tossici in relazione alla concentrazione del contaminante la procedura è basata sui Modelli Additivi Generalizzati (modelli GAMs; Hasti e Tibshirani, 1990). Questi modelli sono estensioni semi-parametriche dei più classici modelli lineari. Non conoscendo esattamente la migliore interpolazione tra probabilità di effetti tossici e contaminante, essi costituiscono un approccio flessibile all'identificazione e alla descrizione di relazioni di tipo non lineare, non essendo legati a particolari forme funzionali.

Il modello valuta l'effetto del contaminante sulla probabilità di tossicità, analizzando l'esposizione diretta del campione sul sito, che dovrà pertanto essere rappresentativo dell'area indagata, al fine di consentire la definizione del limite di concentrazione sito specifico in funzione del livello di effetto ritenuto accettabile. La procedura individua livelli chimici di riferimento solo per quei parametri che, nell'ambito del range di concentrazione individuato, contribuiscono in misura statisticamente evidenziabile alla tossicità complessiva rilevata nel campione.

I requisiti del set analitico, le caratteristiche dei saggi biologici da impiegare e i requisiti di qualità delle risultanze chimiche sono riportati in dettaglio nel Decreto Direttoriale MATTM 8 giugno 2016 pubblicato nella G.U. n. 145 del 23 giugno 2016.

Per la classificazione delle risultanze ecotossicologiche la procedura si basa sull'applicazione di due metodi alternativi:

1. *Approccio “pass to fail”*: calibrato sul risultato peggiore ottenuto dalla batteria di saggi biologici impiegata, approccio cautelativo ma spesso poco verosimile; questo approccio può essere utilizzato solo in caso di risultanze pregresse su cui non sono disponibili i cosiddetti “dati grezzi” dei saggi ecotossicologici;
2. *Criteri di integrazione ponderata*: consentono di formulare una valutazione oggettiva della tossicità dell'intera batteria, superando le limitazioni connesse al giudizio basato sul risultato peggiore ottenuto (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012; Regoli et al. 2019)

Si rimanda al Decreto Direttoriale del MATTM 8 giugno 2016 per i dettagli sulle due procedure e si precisa che, nell'applicazione della procedura per la determinazione dei nuovi valori di riferimento del SIN di Livorno, l'elaborazione dei dati ecotossicologici è stata effettuata secondo i criteri di integrazione ponderata.

## 4. APPLICAZIONE DELLA PROCEDURA AI SENSI DD 8 GIUGNO 2016

### 4.1 Elaborazione dei dati

Prima dell'applicazione della procedura descritta, sulla totalità dei campioni sono stati ricercati i parametri chimici risultati critici nel “*Progetto preliminare di bonifica dell'area marina inclusa nella perimetrazione del sito di bonifica di interesse nazionale di Livorno*” (BoI-Pr-TO-L-01.08) e quindi:

- metalli ed elementi in tracce (Cd, Hg, Pb e Zn, ma ad integrazione di questi anche Al, As, Cr, Cu e Ni);
- composti organo-stannici;
- IPA;

Il database è costituito da 96 campioni per i quali sono disponibili dati ecotossicologici (riportati in Allegato 1) e dati chimici (riportati in Allegato 2), provenienti non solo dalla caratterizzazione effettuata con la campagna prelievi del 2019 (83 campioni) finalizzata alla determinazione dei nuovi valori di riferimento, ma anche da precedenti indagini condotte da ISPRA nell'area perimetrata (13 campioni di sedimento superficiale, 0-30 cm, provenienti da 3 stazioni, effettuati tra il 2012 e il 2017) e riguardanti il monitoraggio ambientale delle vasche di colmata presenti nel porto di Livorno.

Sul 30 % dei campioni prelevati della campagna eseguita nel 2019 (pari a n.23 campioni) è stata determinata anche la concentrazione di PCB e composti organo-clorurati.

Inoltre, è stata eseguita sulla totalità dei campioni una batteria di saggi biologici (secondo quanto riportato nella Tab. 2.3 dell'Allegato Tecnico al DM Ambiente 173 del 15 luglio 2016), al fine di avere a disposizione per ogni campione un set di dati completo di dati chimici ed ecotossicologici da utilizzare per la valutazione ambientale.

Nelle elaborazioni effettuate, come soglia discriminante tra campioni tossici e non tossici, è stato utilizzato un valore di Hazard Quotient (HQ) pari a 1, oltre il quale il campione è giudicato “tossico” in senso generico, senza ulteriori specifiche in merito alla gravità dell'effetto. Tale valore di HQ costituisce una soglia particolarmente cautelativa, in quanto i campioni vengono catalogati come tossici anche in risposta a deboli effetti biologici da parte della batteria di saggi impiegata. Per tale motivo, è stata valutata anche la distribuzione del livello di pericolo ecotossicologico (gravità degli effetti tossici) nei campioni risultati non conformi rispetto ai diversi livelli di riferimento individuati.

Seguendo la procedura prevista nel Decreto Direttoriale del MATTM 8 giugno 2016, già richiamata precedentemente, si è proceduto ad effettuare l'elaborazione statistica/probabilistica dei dati al fine di ricavare una stima della probabilità (**p**) attesa di effetti tossici rispetto alla concentrazione [**x**] di ciascun contaminante.

Per mettere in relazione la concentrazione dei contaminanti chimici con gli HQ (della matrice ecotossicologica), per ogni parametro chimico è stato costruito un foglio di calcolo (.csv) in cui sono state inserite due colonne di dati:

1. nella prima sono stati riportati i valori delle concentrazioni dell'elemento chimico misurati nelle stazioni campionate;
2. nella seconda, sono stati riportati (con stesso ordine delle stazioni campionate) i valori binari di HQ risultanti dall'elaborazione dei dati ecotossicologici con il software SediquaSoft, attribuendo "0" al campione privo di effetti tossici e "1" al campione con effetti tossici ( $HQ > 1$ ).

In Figura 6 viene mostrato uno screenshot del database dei dati chimici ed ecotossicologici con relativa classificazione, mentre in Figura 7 è riportato il dataset in formato .csv per ciascun contaminante e il dettaglio delle due colonne che compongono ciascun file.

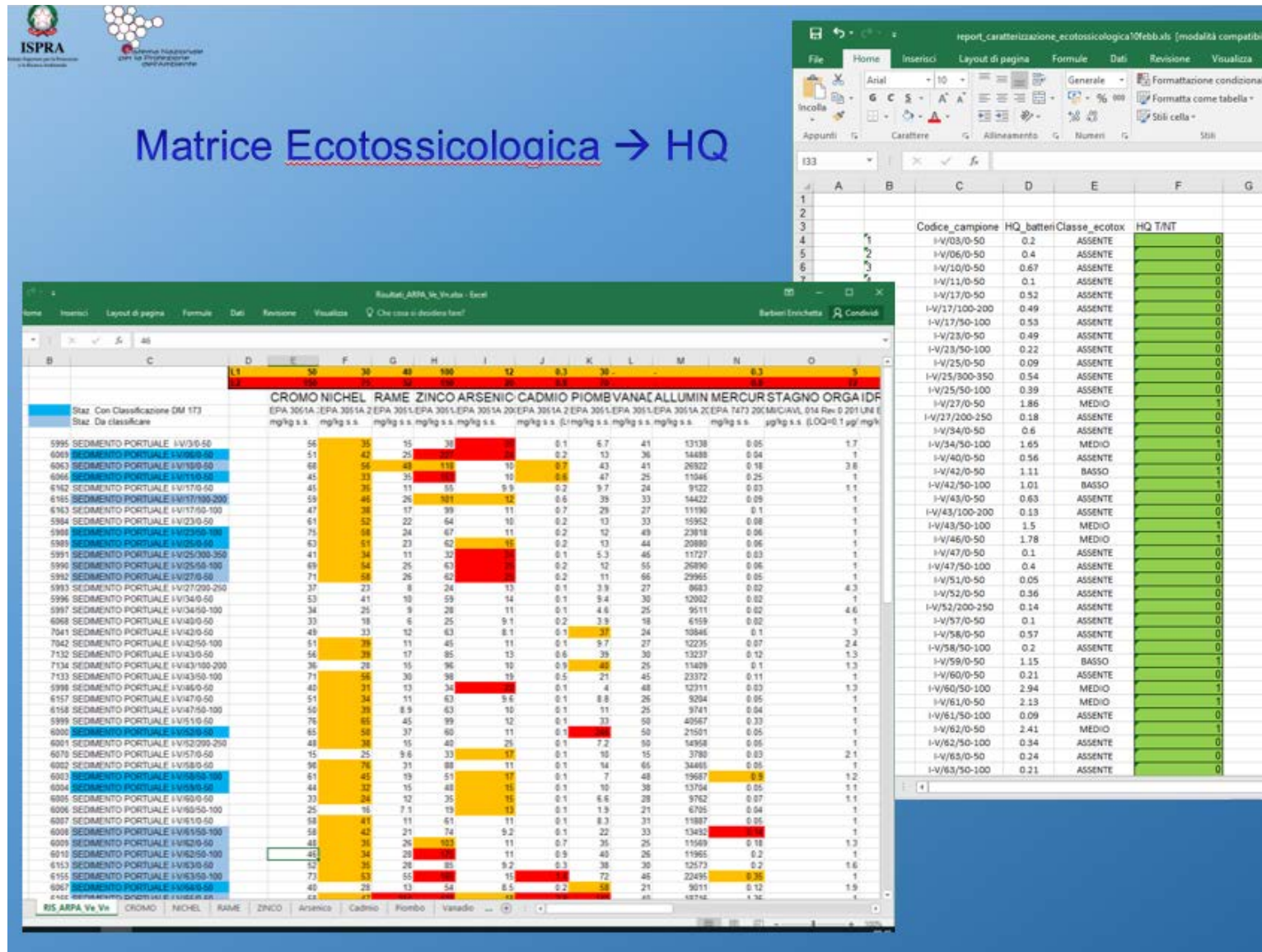


Figura 6 – Dati chimici e dati ecotossicologici da mettere in relazione

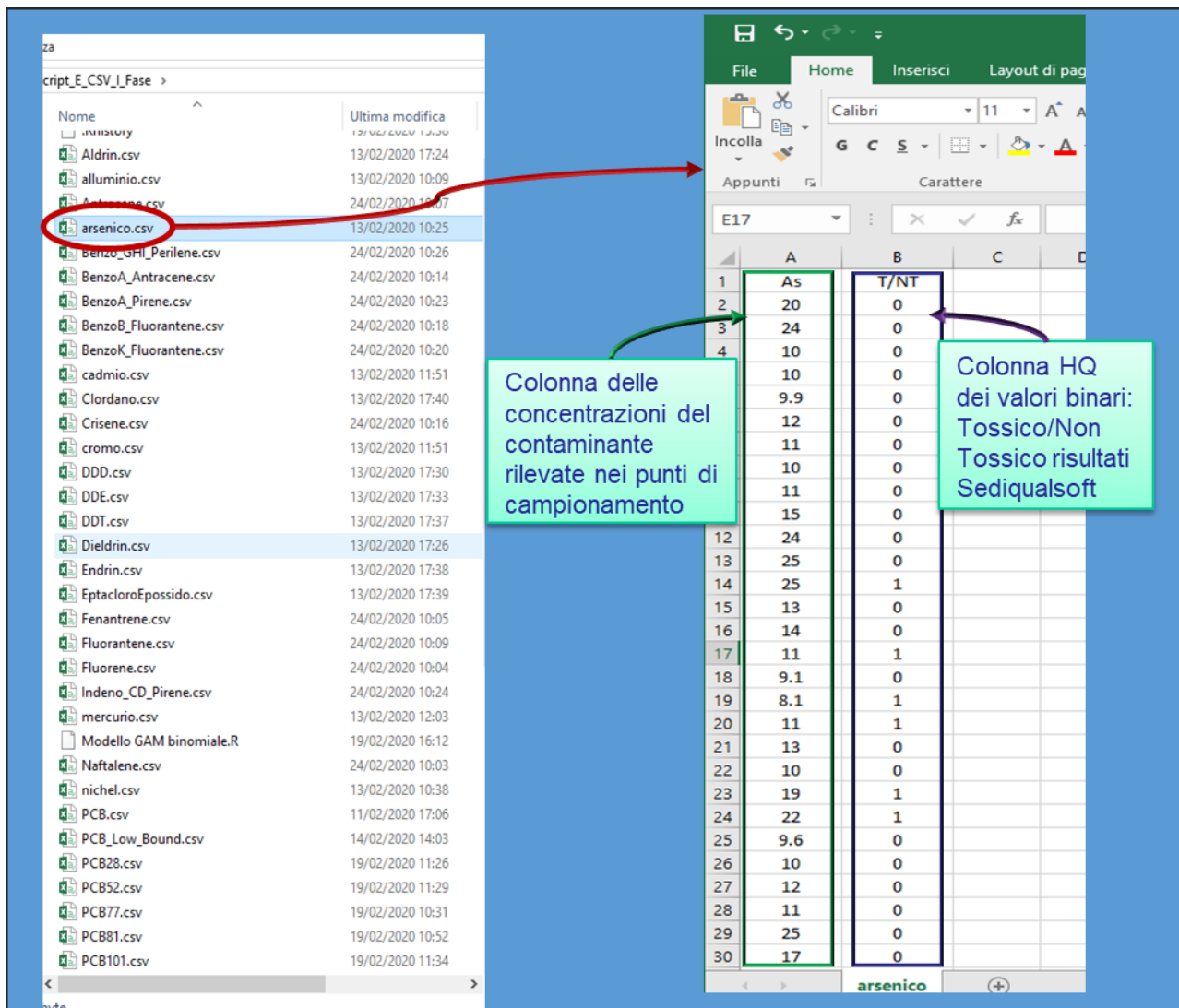


Figura 7 – Costruzione del set di dati per l'elaborazione statistica

Per l'elaborazione statistica/probabilistica dei dati ci si è serviti del software *open source* R che permette, tra le varie funzionalità, l'implementazione di funzioni di calcolo e la rappresentazione grafica delle distribuzioni statistiche. A ciascun file .csv sono stati applicati 2 script.

Il primo script implementa il test-t di Student per la verifica delle differenze statistiche tra dataset tossico e non tossico per ciascuna sostanza. L'applicazione del t- test fornisce un livello di probabilità (*p-value*). Un *p-value* inferiore a 0.05 indica che la differenza statistica tra i due set di dati è significativa.

Il secondo script genera una funzione probabilistica di insorgenza di effetti tossici in relazione alla concentrazione del contaminante utilizzando i già richiamati Modelli Additivi Generalizzati (GAM).

Nonostante la procedura indichi che tali modelli vengano applicati nel caso di significatività statistica tra i due set di dati (con *p-value* < 0.05), in questa circostanza sono stati considerati anche i casi di non significatività (con *p-value* > 0.05), in considerazione dell'esiguo numero di dati tossici.

In Figura 8 viene schematizzato il modello GAM applicato alle distribuzioni di dato

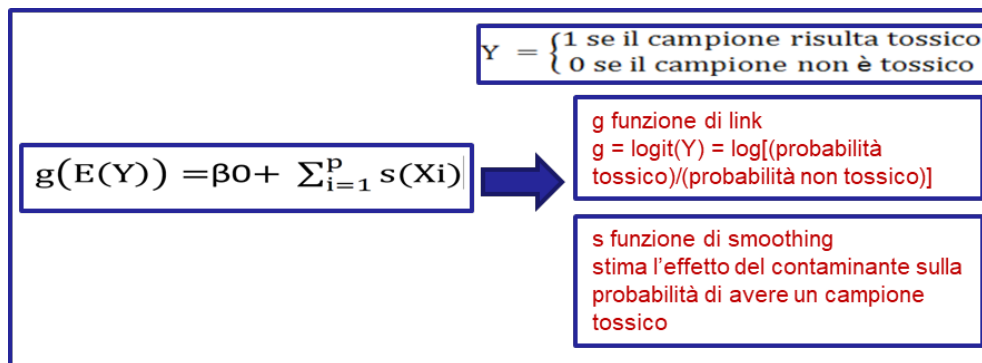


Figura 8 – Modello GAM

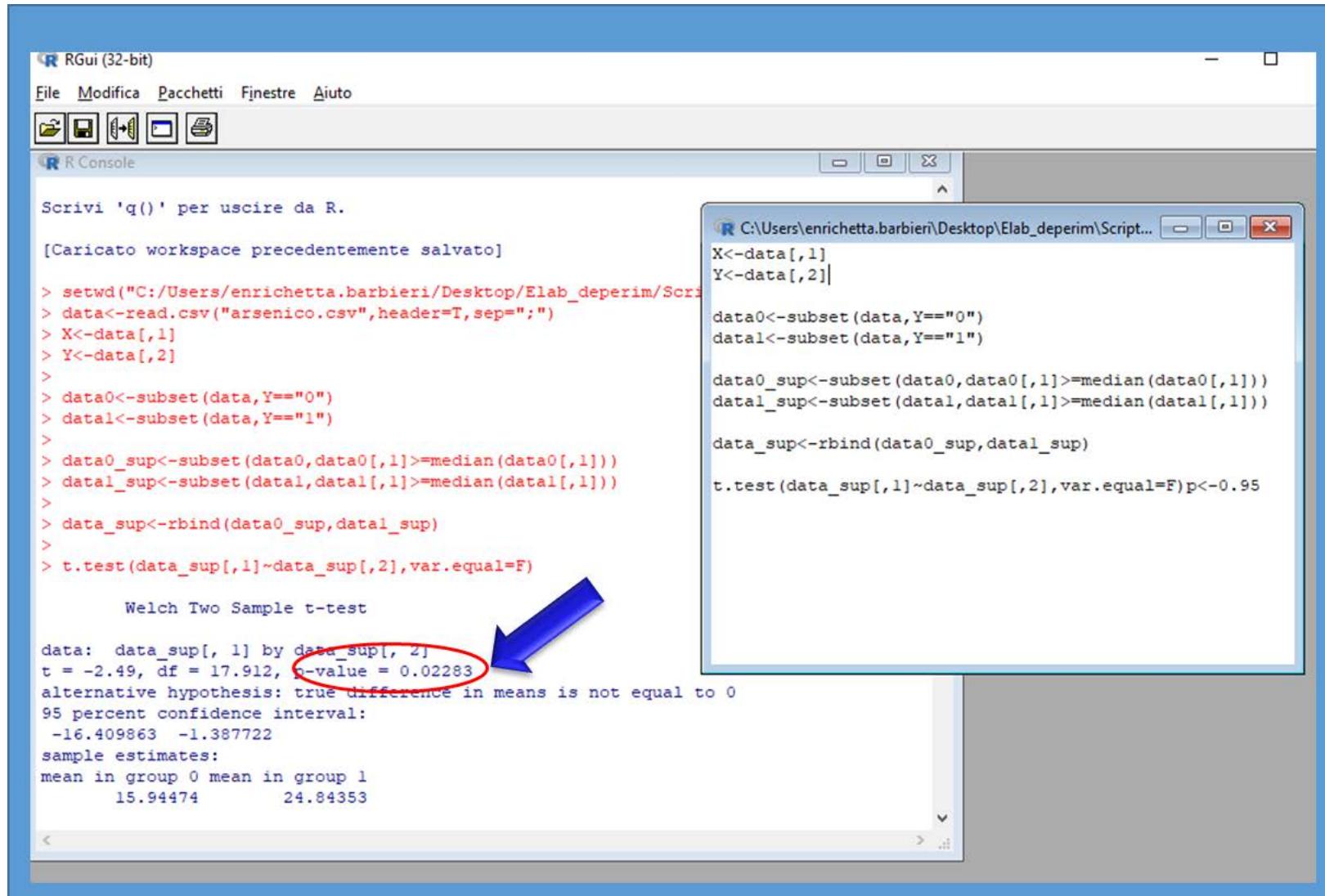
Prima di applicare lo script è necessario impostare il “**livello di probabilità attesa di riscontrare generici effetti tossici**” ( $0.95- 0.75 - 0.50$ ), di seguito abbreviato con  $\mathbf{p}$ .

A titolo di esempio è di seguito riportata l’elaborazione del parametro “Arsenico”. Nelle successive figure vengono riportate rispettivamente un particolare dell’esecuzione del test-t di Student (Figura 9) con  $p\text{-value} < 0.05$  e l’applicazione dello script che riproduce il modello GAM per un  $\mathbf{p}$  impostato a 0.95 (Figura 10).

I risultati dell’elaborazione R per ciascun file .csv sono stati riportati in fogli separati di un unico file excel per le successive valutazioni.

In Figura 11 è possibile vedere il foglio che riporta l’elaborazione in R per l’”Arsenico”: a sinistra è visibile il risultato del test t di Student e a destra le tre curve ottenute applicando il modello GAM rispettivamente con livello di  $\mathbf{p} = 0.95$ ,  $\mathbf{p} = 0.75$  e  $\mathbf{p} = 0.50$ .





```

RGui (32-bit)
File Modifica Pacchetti Finestre Aiuto
[Caricato workspace precedentemente salvato]
> setwd("C:/Users/enrichetta.barbieri/Desktop/Elab_deperim/Script...")
> data<-read.csv("arsenico.csv",header=T,sep=";")
> X<-data[,1]
> Y<-data[,2]
>
> data0<-subset(data,Y=="0")
> data1<-subset(data,Y=="1")
>
> data0_sup<-subset(data0,data0[,1]>=median(data0[,1]))
> data1_sup<-subset(data1,data1[,1]>=median(data1[,1]))
>
> data_sup<-rbind(data0_sup,data1_sup)
>
> t.test(data_sup[,1]~data_sup[,2],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data: data_sup[, 1] by data_sup[, 2]
t = -2.49, df = 17.912, p-value = 0.02283
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -16.409863 -1.387722
sample estimates:
mean in group 0 mean in group 1
 15.94474      24.84353

C:\Users\enrichetta.barbieri\Desktop\Elab_deperim\Script...
X<-data[,1]
Y<-data[,2]

data0<-subset(data,Y=="0")
data1<-subset(data,Y=="1")

data0_sup<-subset(data0,data0[,1]>=median(data0[,1]))
data1_sup<-subset(data1,data1[,1]>=median(data1[,1]))

data_sup<-rbind(data0_sup,data1_sup)

t.test(data_sup[,1]~data_sup[,2],var.equal=F)p<-0.95
  
```

Figura 9 – Applicazione del test t di student a ciascun file csv

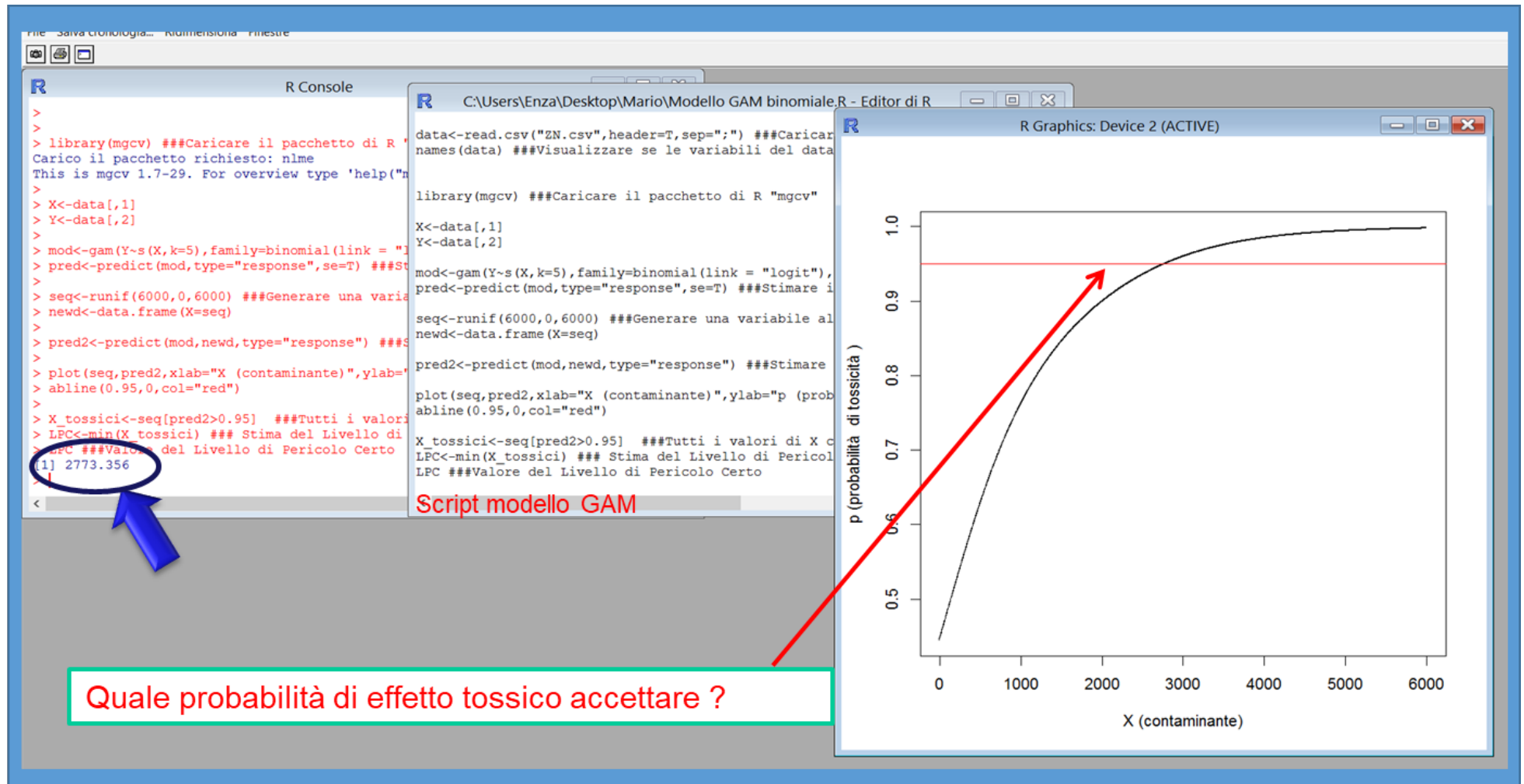


Figura 10 – Applicazione dello script che costruisce il Modello GAM per il contaminante sotto esame

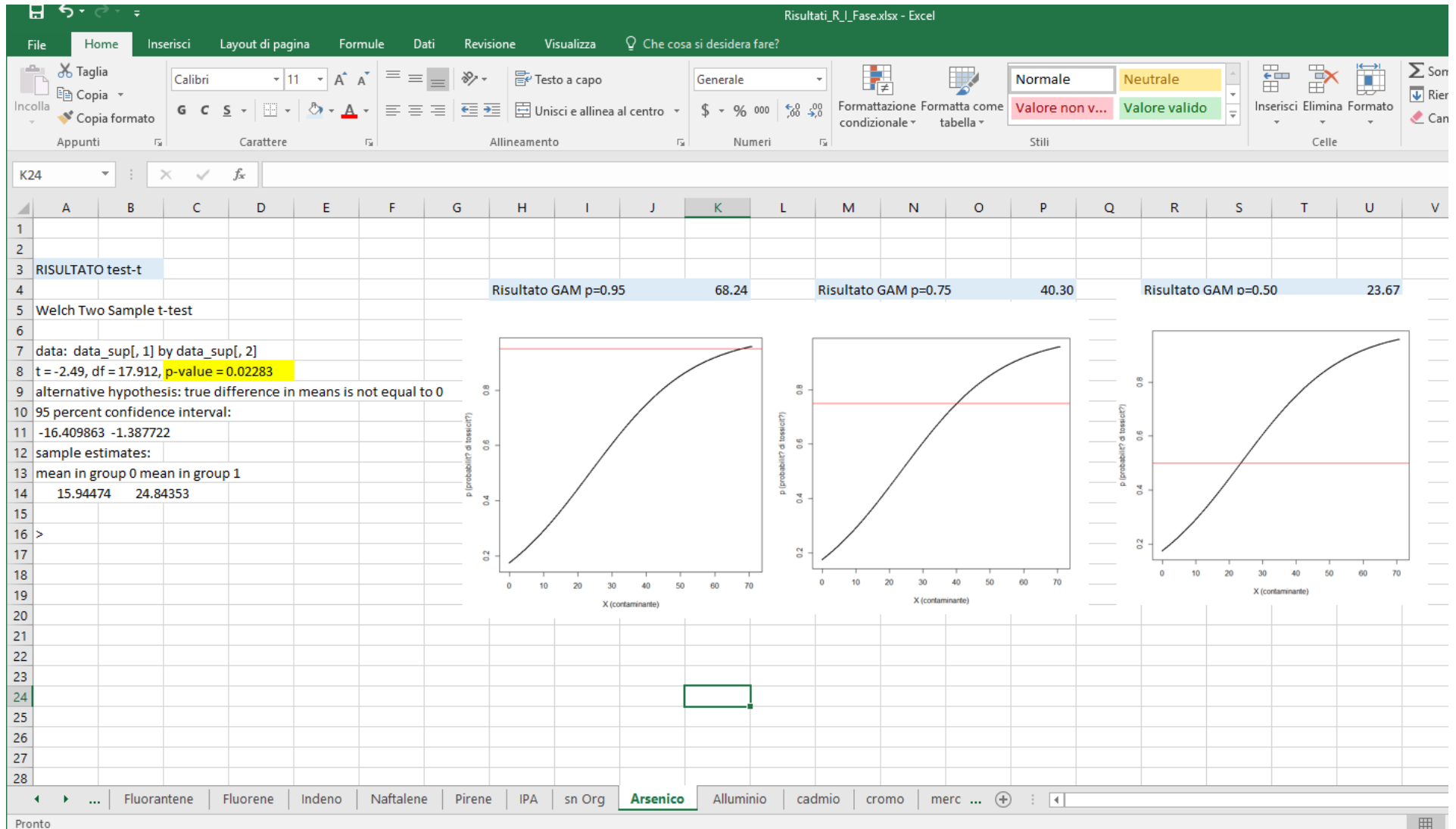


Figura 11 – Determinazione dei valori di riferimento per l'arsenico

## 4.2 Livelli chimici di riferimento

Nelle elaborazioni condotte sono stati considerati i seguenti livelli chimici di riferimento, già citati al Capitolo 3:

- **Livello di Effetto Certo (LEC)**, in corrispondenza di una probabilità attesa pari al 95 % ( $p = 0.95$ ), senza specificare la tipologia e l'entità degli effetti;
- **Livello di Effetto Molto Probabile (LEMP)**, in corrispondenza di una probabilità attesa di effetti generici tossici pari al 75 % ( $p = 0.75$ );
- **Livello di Effetto Soglia (LES)**, in corrispondenza di una probabilità attesa pari al 50 % ( $p = 0.5$ ), cioè quando la probabilità di misurare effetti tossici e quella di non registrare alcun effetto si equivalgono.

In Tabella 1 sono riportati i valori chimici derivanti dall'applicazione della procedura citata con il relativo range di applicazione per ciascuna sostanza ed il numero di campioni effettivamente utilizzati nelle elaborazioni per ciascuna sostanza.

*Tabella 1 - Livello di Effetto Certo (LEC), Livello di Effetto Molto probabile (LEMP), Livello di Effetto Probabile (LEP) e Livello di Effetto Soglia (LES) determinati per i sedimenti dell'area marina esterna al porto compresa nel SIN di Livorno*

Sostanza	Unità di misura	LES $p = 0.50$	LEMP $p = 0.75$	LEC $p = 0.95$	<i>p-value</i> (t-student)	Range di applicazione	Casi utili
CROMO	mg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	8.38-98	95
NICHEL	mg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.24	12 – 76	95
RAME	mg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.94	3.66 – 154	95
ZINCO	mg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.82	19 – 410	95
ARSENICO	mg/Kg s.s.	23.67	40.30	68.24	0.02	1 - 70.98	95
CADMIO	mg/Kg s.s.	4.00	n.d.	n.d.	0.65	0.0125 - 5.5	95
PIOMBO	mg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.65	0.7 – 246	95
VANADIO	mg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.52	7.3 – 75	83
ALLUMINIO	mg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.13	3016 -40567	95
MERCURIO	mg/Kg s.s.	1.51	1.56	1.64	1.00	0.001 - 1.65	95
STAGNO ORGANICO	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.82	1 - 8.3	83
NAFTALENE	µg/Kg s.s.	10220.8 6	10943.26	12083.93	0.22	0.5 – 40000	96
FLUORENE	µg/Kg s.s.	7286.36	7851.72	8741.93	0.21	0.05 – 27000	96
FENANTRENE	µg/Kg s.s.	21760.5 4	22423.71	23511.79	0.22	0.05 – 77000	96
ANTRACENE	µg/Kg s.s.	2102.65	2370.44	2777.45	0.19	0.05 – 4200	96
FLUORANTENE	µg/Kg s.s.	5179.36	13912.01	n.d.	0.48	0.05 – 19000	96
PIRENE	µg/Kg s.s.	2965.52	7926.88	n.d.	0.62	0.144 – 8000	96
BENZO [A] ANTRACENE	µg/Kg s.s.	706.30	n.d.	n.d.	0.47	0.025 – 1000	96
CRISENE	µg/Kg s.s.	772.59	n.d.	n.d.	0.51	0.005 – 1100	96
BENZO[B]FLUORANTENE	µg/Kg s.s.	296.65	744.37	1497.15	0.22	0.025 – 400	96
BENZO[K]FLUORANTENE	µg/Kg s.s.	102.76	n.d.	n.d.	0.30	0.072 – 150	96
BENZO [A] PIRENE	µg/Kg s.s.	158.41	n.d.	n.d.	0.38	0.005 – 350	96

<b>INDENO[1,2,3-CD]PIRENE</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.48	0.005 – 150	96
<b>BENZO[GHI]PERILENE)</b>	µg/Kg s.s.	101.85	131.71	n.d.	0.89	0.005 – 570	96
<b>SOMMATORIA IPA</b>	µg/Kg s.s.	23611	51406	98115	0.23	16.4 – 200000	96
<b>3,4,4',5-TETRACLOROBIFENILE (PCB-81)</b>	µg/Kg s.s.	2.75E-07	n.d.	n.d.	0.92	0.0011-0.0022	27
<b>3,3',4,4'-TETRACLOROBIFENILE (PCB-77)</b>	µg/Kg s.s.	1.56E-06	n.d.	n.d.	0.97	0.0011-0.037	27
<b>2'.3,4,4',5-PENTA CLOROBIFENILE (PCB-123)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.33	0.0011-0.047	27
<b>2.3',4,4',5-PENTA CLOROBIFENILE (PCB-118)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.33	0.0072-3.6	27
<b>2,3,4,4',5-PENTA CLOROBIFENILE (PCB-114)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.18	0.0011-0.045	27
<b>2,3,3',4,4'-PENTA CLOROBIFENILE (PCB-105)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0011-1	27
<b>3,3',4,4',5-PENTA CLOROBIFENILE (PCB-126)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.98	0.0011-0.0053	27
<b>2,3',4,4',5,5'-ESACLOROBIFENILE (PCB-167)</b>	µg/Kg s.s.	2.40E-05	n.d.	n.d.	0.52	0.0011-0.28	27
<b>2,3,3',4,4',5-ESACLOROBIFENILE (PCB-156)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.17	0.0012-0.51	27
<b>2,3,3',4,4',5'-ESACLOROBIFENILE (PCB-157)</b>	µg/Kg s.s.	2.87E-04	n.d.	n.d.	0.35	0.0011-0.06	27
<b>3,3',4,4',5,5'-ESACLOROBIFENILE (PCB-169)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.20	0.0011-0.0013	27
<b>2,3,3',4,4',5,5'-EPTACLOROBIFENILE (PCB-189)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.30	0.0011-0.0091	27
<b>PCB TOTALI (XPCB_TOT)</b>	µg/Kg s.s.	0.00330 1474	n.d.	n.d.	0.37	0.036-35	27
<b>2,4,4'-TRICLOROBIFENILE (PCB 28)</b>	µg/Kg s.s.	3.70E-06	n.d.	n.d.	0.52	0.0027-0.16	27
<b>2,2',5,5'-TETRA CLOROBIFENILE (PCB-52)</b>	µg/Kg s.s.	0.00013 5304	n.d.	n.d.	0.34	0.007-1.9	27
<b>2,2',4,5,5'-PENTA CLOROBIFENILE (PCB-101)</b>	µg/Kg s.s.	0.00017 3822	n.d.	n.d.	0.35	0.0079-3.2	27
<b>2,2',3,3',4,4'-ESACLOROBIFENILE (PCB-128)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.20	0.0012-5.3	27
<b>2,2',3,4,4',5'-ESACLOROBIFENILE (PCB-138)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.30	0.0056-11	27
<b>2,2',4,4',5,5'-ESACLOROBIFENILE (PCB-153)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.25	0.0012-8.2	27
<b>2,2',3,4,4',5,5'-EPTACLOROBIFENILE (PCB-180)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	0.0011	27

<b>ESACLOROBENZENE (HCB)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	26
<b>ESACLOROCICLOESANO-ALFA</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	26
<b>ESACLOROCICLOESANO-BETA</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	26
<b>ESACLOROCICLOESANO-GAMMA (LINDANO)</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	26
<b>ALDRIN</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	26
<b>DIELDRIN</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	26
<b>DDD</b>	µg/Kg s.s.	0.00020 1917	n.d.	n.d.	0.43	0.2-1.2	26
<b>DDE</b>	µg/Kg s.s.	0.00068 5474	n.d.	n.d.	0.08	0.2-1.6	26
<b>DICLORODIFENILTRICLOROETANO (DDT)</b>	µg/Kg s.s.	0.00028 255	n.d.	n.d.	0.39	0.13-0.56	26
<b>ENDRIN</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	26
<b>EPTACLORO EPOSSIDO</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	26
<b>CLORDANO</b>	µg/Kg s.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	26

n.d.: non definibile sulla base della distribuzione dei dati disponibili

### 4.3 Superamenti dei LEA

Nelle Tabelle 2, 3 e 4 sono indicati i superamenti totali per ciascuna sostanza e le frequenze relative ai superamenti rispetto a LEC, LEMP e LES. Nelle Figure 12, 13 e 14 sono rappresentati i diagrammi delle frequenze relative ai superamenti dei 3 livelli probabilistici di pericolo di ciascun elemento.

Tabella 2 - Numero di superamenti delle concentrazioni rispetto al LEC e frequenza relativa

Parametro	Superamenti	%	campioni
<b>CROMO</b>	-	-	-
<b>NICHEL</b>	-	-	-
<b>RAME</b>	-	-	-
<b>ZINCO</b>	-	-	-
<b>ARSENICO</b>	1	-	Vn1 (2012)
<b>CADMIO</b>	-	-	-
<b>PIOMBO</b>	-	-	-
<b>VANADIO</b>	-	-	-
<b>ALLUMINIO</b>	-	-	-
<b>MERCURIO</b>	1	10	65/100-200
<b>STAGNO ORGANICO</b>	-	-	-
<b>NAFTALENE</b>	2	20	65/100-200; 65/50-100
<b>FLUORENE</b>	2	20	65/100-200; 65/50-100
<b>FENANTRENE</b>	2	20	65/100-200; 65/50-100
<b>ANTRACENE</b>	2	20	65/100-200; 65/50-100
<b>FLUORANTENE</b>	-	-	-
<b>PIRENE</b>	-	-	-
<b>BENZO [A] ANTRACENE</b>	-	-	-
<b>CRISENE</b>	-	-	-
<b>BENZO[B]FLUORANTENE</b>	-	-	-
<b>BENZO[K]FLUORANTENE</b>	-	-	-
<b>BENZO [A] PIRENE</b>	-	-	-
<b>INDENO[1,2,3-CD]PIRENE</b>	-	-	-
<b>BENZO[GHI]PERILENE)</b>	-	-	-

<b>SOMMATORIA IPA</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>65/50-100</b>
<b>TOTALE SUPERAMENTI</b>	<b>11</b>		

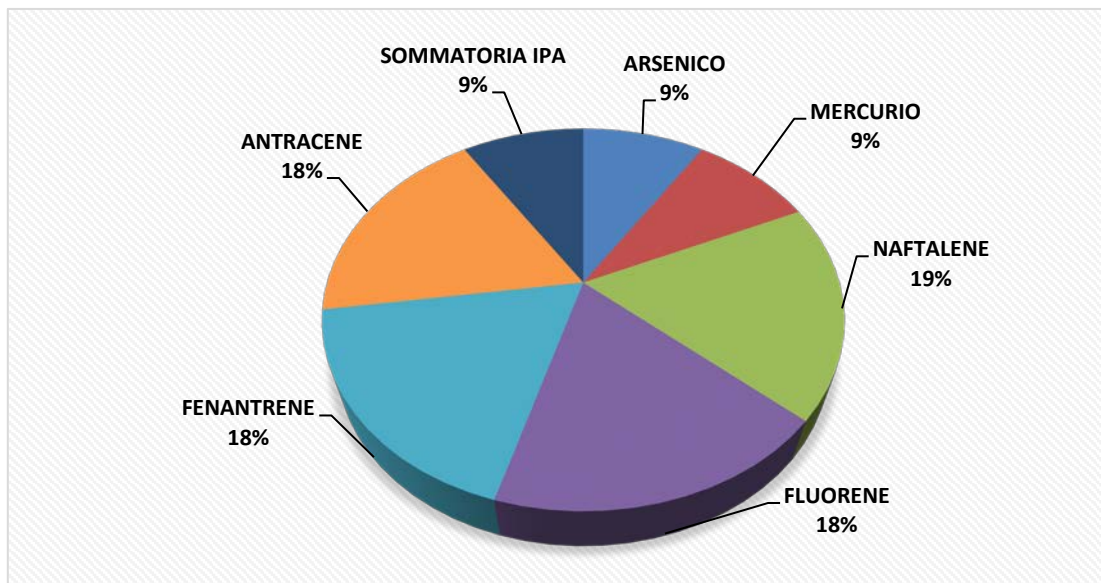


Fig. 12 - Diagramma delle frequenze relative dei superamenti del LEC

Tabella 3 - Numero di superamenti delle concentrazioni rispetto al LEMP e frequenza relativa

Parametro	Superamenti	%	Campioni
CROMO	-	-	-
NICHEL	-	-	-
RAME	-	-	-
ZINCO	-	-	-
ARSENICO	2	-	Ve5(2012); Vn1(2012)
CADMIO	-	-	-
PIOMBO	-	-	-
VANADIO	-	-	-
ALLUMINIO	-	-	-
MERCURIO	1	5.6	65/100-200
STAGNO ORGANICO	-	-	-
NAFTALENE	2	11.1	65/100-200; 65/50-100
FLUORENE	2	11.1	65/100-200; 65/50-100
FENANTRENE	2	11.1	65/100-200; 65/50-100
ANTRACENE	2	11.1	65/100-200; 65/50-100
FLUORANTENE	1	5.6	65/50-100
PIRENE	1	5.6	65/50-100
BENZO [A] ANTRACENE	-	-	-
CRISENE	-	-	-
BENZO[B]FLUORANTENE	-	-	-
BENZO[K]FLUORANTENE	-	-	-
BENZO [A] PIRENE	-	-	-
INDENO[1,2,3-CD]PIRENE	-	-	-
BENZO[GHI]PERILENE)	5	27.8	86/0-50; 65/100-200; 10/0-50; 11/0-50; 17/100-200
SOMMATORIA IPA	2	11.1	65/100-200; 65/50-100
<b>TOTALE SUPERAMENTI</b>	<b>20</b>		

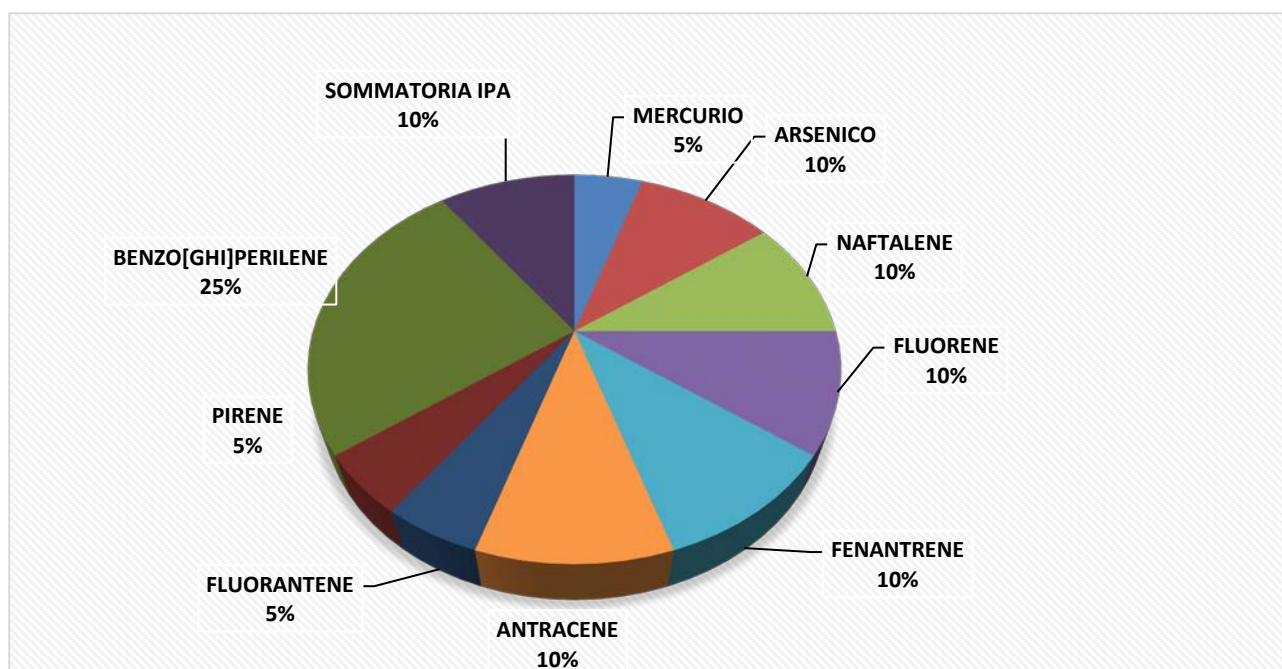


Fig. 13 - Diagramma delle frequenze relative dei superamenti del LEMP

Tabella 4 - Numero di superamenti delle concentrazioni rispetto al LES e frequenza relativa

Parametro	Superamenti	%	Campioni
CROMO	-	-	
NICHEL	-	-	
RAME	-	-	
ZINCO	-	-	
ARSENICO	11	15.69	06/0-50; 25/300-350; 25/50-100; 27/0-50; 52/200-250; 68/0-50; 81/0-50; 86/50-100; Ve4(2012); Ve5(2012); (Vn1(2012)
CADMIO	1	1.96	72/50-100
PIOMBO	-	-	
VANADIO	-	-	
ALLUMINIO	-	-	
MERCURIO	1	1.96	65/100-200
STAGNO ORGANICO	-	-	
NAFTALENE	2	3.92	65/100-200; 65/50-100
FLUORENE	2	3.92	65/100-200; 65/50-100
FENANTRENE	2	3.92	65/100-200; 65/50-100
ANTRACENE	2	3.92	65/100-200; 65/50-100
FLUORANTENE	3	5.88	10/0-50; 65/100-200; 65/50-100
PIRENE	3	5.88	10/0-50; 65/100-200; 65/50-100
BENZO [A] ANTRACENE	2	3.92	10/0-50; 65/50-100
CRISENE	2	3.92	10/0-50; 65/50-100
BENZO[B]FLUORANTENE	3	5.88	10/0-50; 11/0-50; 65/50-100
BENZO[K]FLUORANTENE	3	5.88	10/0-50; 11/0-50; 86/0-50



<b>BENZO [A] PIRENE</b>	7	13.73	10/0-50; 11/0-50; 17/100-200; 59/0-50; 65/100-200; 65/50-100; 86/0-50
<b>INDENO[1,2,3-CD]PIRENE</b>	-	-	
<b>BENZO[GHI]PERILENE</b>	8	15.69	10/0-50; 11/0-50; 17/100-200; 59/0-50; 64/0- 50; 65/100-200; 65/50-100; 86/0-50
<b>SOMMATORIA IPA</b>	2	3.92	65/100-200; 65/50-100
<b>TOTALE SUPERAMENTI</b>	<b>54</b>		

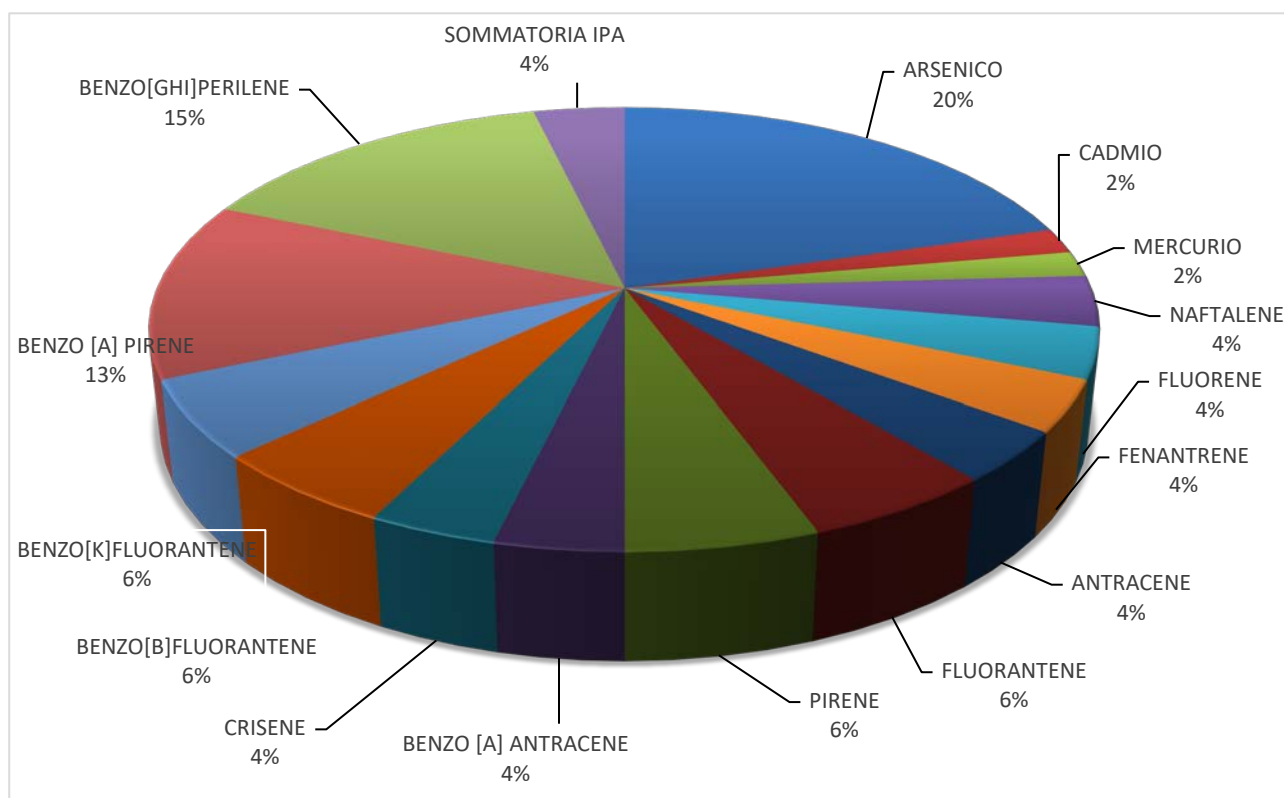


Fig. 14 - Diagramma delle frequenze relative dei superamenti del LES

L'elaborazione dei dati evidenzia come la maggior parte dei superamenti del LES sia circoscritta allo strato superficiale compreso nei primi 50 cm nella zona antistante le vasche di colmata (Tab. 5). I superamenti del LEMP si registrano sempre nel livello superficiale delle stazioni di prelievo localizzate all'imboccatura nord del porto. Il LEC viene superato in una sola stazione (ID65) sia nel livello 50-100 che in quello 100-200.

Le sostanze caratterizzate dalle maggiori frequenze di superamento sono:

- per il LES: alcuni IPA (con particolare riferimento al Benzo(ghi)perilene e Benzo(a)pirene) e all'arsenico;
- per il LEMP: alcuni IPA (con particolare riferimento al Benzo(ghi)perilene);
- per il LEC: alcuni IPA (Naftalene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, compresa la ΣIPA)

Tabella 5 – Riepilogo dei superamenti rispetto ai 3 livelli di pericolo

Livello carota	Campione	HQ batteria	Classe ecotossicologica	LES (p=0.50)	LEMP (=0.75)	LEC (p=0.95)
0-50	06/0-50	0.4	ASSENTE	Arsenico	-	-
	10/0-50	0.67	ASSENTE	Fluorantene; Pirene; Benzo[A]Antracene; Crisene; Benzo[B]Fluorantene; Benzo[K]Fluorantene; Benzo[A]Pirene; Benzo[GHI]Perilene	Benzo(ghi)Perilene	-
	11/0-50	0.1	ASSENTE	Benzo[B]Fluorantene; Benzo[K]Fluorantene; Benzo[A]Pirene; Benzo[GHI]Perilene	Benzo(ghi)Perilene	-
	27/0-50	1.86	MEDIO	Arsenico	-	-
	59/0-50	1.15	BASSO	Benzo[A]Pirene; Benzo[GHI]Perilene	-	-
	64/0-50	0.47	ASSENTE	Benzo[GHI]Perilene	-	-
	68/0-50	1.92	MEDIO	Arsenico	-	-
	81/0-50	0.81	ASSENTE	Arsenico	-	-
	86/0-50	1.04	BASSO	Benzo[A]Pirene; Benzo[GHI]Perilene; Benzo[K]Fluorantene	Benzo(ghi)Perilene	-
	Ve4 (2012)	1.58	MEDIO	Arsenico		
	Ve5 (2012)	1.14	BASSO	Arsenico	Arsenico	
	Vn1 (2012)	1.69	MEDIO	Arsenico	Arsenico	Arsenico
50-100	25/50-100	0.39	ASSENTE	Arsenico	-	-

Livello carota	Campione	HQ batteria	Classe ecotossicologica	LES (p=0.50)	LEMP (=0.75)	LEC (p=0.95)
	65/50-100	3.88	ALTO	Naftalene; Fluorene; Antracene; Fluorantene; Fenantrene; Pirene; Benzo[A]Antracene; Crisene; Benzo[B]Fluorantene; Benzo[A]Pirene; Benzo[GHI]Perilene; ΣIPA	ΣIPA; Naftalene; Fluorene; Fenantrene; Antracene; Fluorantene;Pirene	ΣIPA; Naftalene; Fluorene; Fenantrene; Antracene
	72/50-100	1.16	BASSO	Cadmio	-	-
	86/50-100	0.14	ASSENTE	Arsenico	-	-
100-200	65/100-200	3.64	ALTO	Mercurio; Naftalene; Fluorene; Fenantrene; Antracene; Fluorantene; Pirene; Benzo[A]Pirene; Benzo[GHI]Perilene; ΣIPA	Benzo(ghi)perilene; ΣIPA; Naftalene; Fluorene; fenantrene; antracene; Mercurio	Naftalene; Fluorene; Fenantrene; Antracene; Mercurio
	17/100-200	0.49	ASSENTE	Benzo[A]Pirene; Benzo[GHI]Perilene	Benzo(ghi)Perilene	-
200-250	52/200-250	0.14	ASSENTE	Arsenico	-	-
300-350	25/300-350	0.54	ASSENTE	Arsenico	-	-
<b>TOTALE SUPERAMENTI</b>				<b>54</b>	<b>20</b>	<b>11</b>

#### **4.4 Scenari di superamento dei LEA**

Ciascun livello chimico di riferimento (LES, LEMP e LEC) è stato confrontato con i dati di caratterizzazione, consentendo la ricostruzione di altrettanti scenari di conformità dell'area investigata, rappresentati a livello cartografico dalla serie di Figure 15-18, in cui vengono riportati i superamenti individuati. Nelle suddette figure vengono illustrate, suddivisi per i livelli stabiliti, le stazioni non conformi per almeno un parametro rispetto al LEC (rosso), LEMP (arancione) e LES (giallo).

In ogni figura alle immagini di base fotogrammetriche è stato sovrapposto il progetto preliminare della nuova Darsena Europa, al fine di rappresentare il futuro assetto portuale.

Si evidenzia che mentre nell'elaborazione statistica finalizzata alla determinazione dei valori di riferimento sono stati utilizzati tutti i dati delle stazioni di monitoraggio Ve4, Ve5 e Vn1 disponibili nel periodo 2012-2017 in aggiunta a quelli ottenuti dalle analisi dei campioni prelevati nella campagna del 2019, nelle seguenti rappresentazioni grafiche (Figura 15-18) si è convenuto di considerare solo il dato più recente perché maggiormente rappresentativo della attuale situazione.

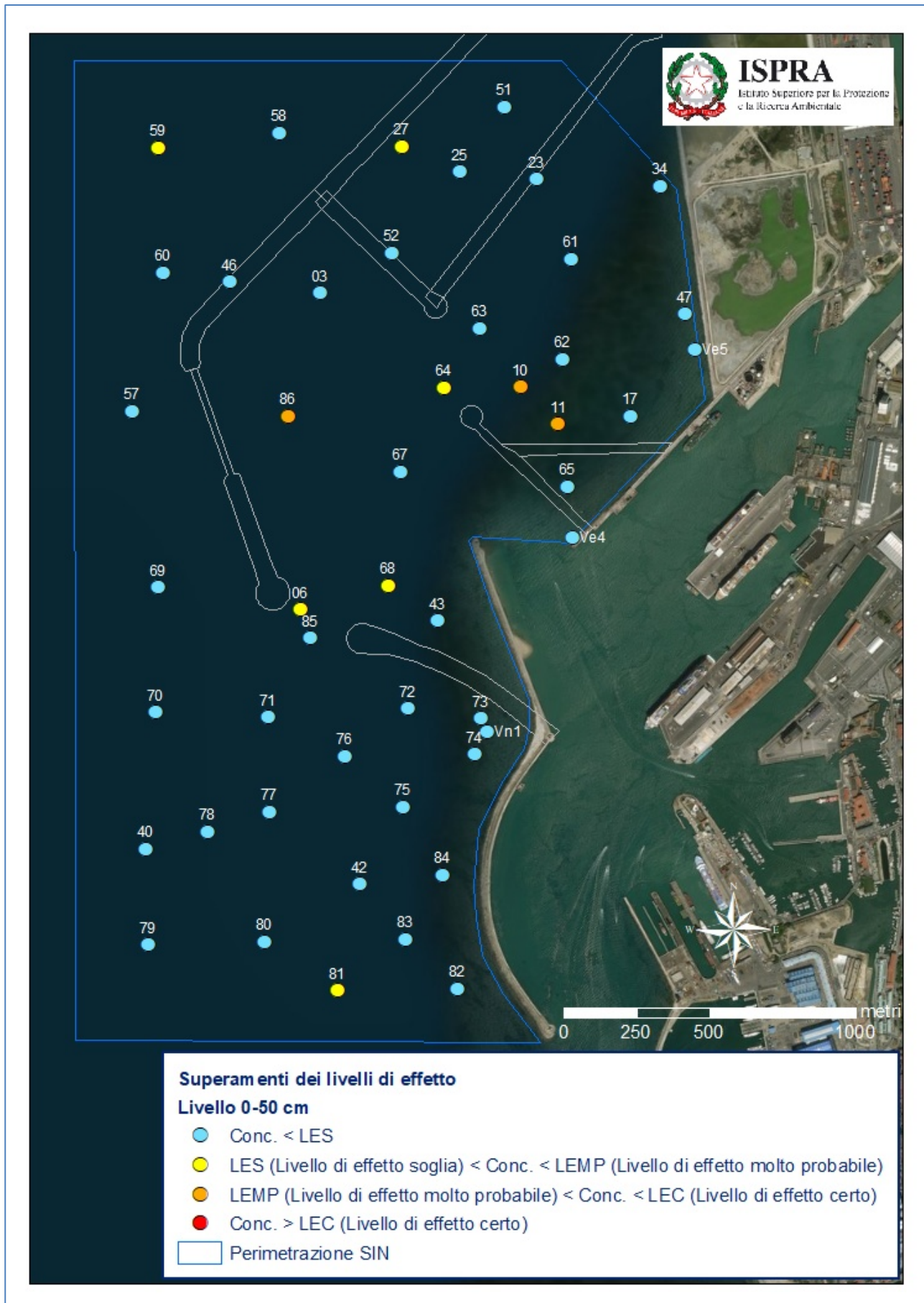


Figura 25 – Superamenti dei livelli di effetto nello strato 0 - 50 cm

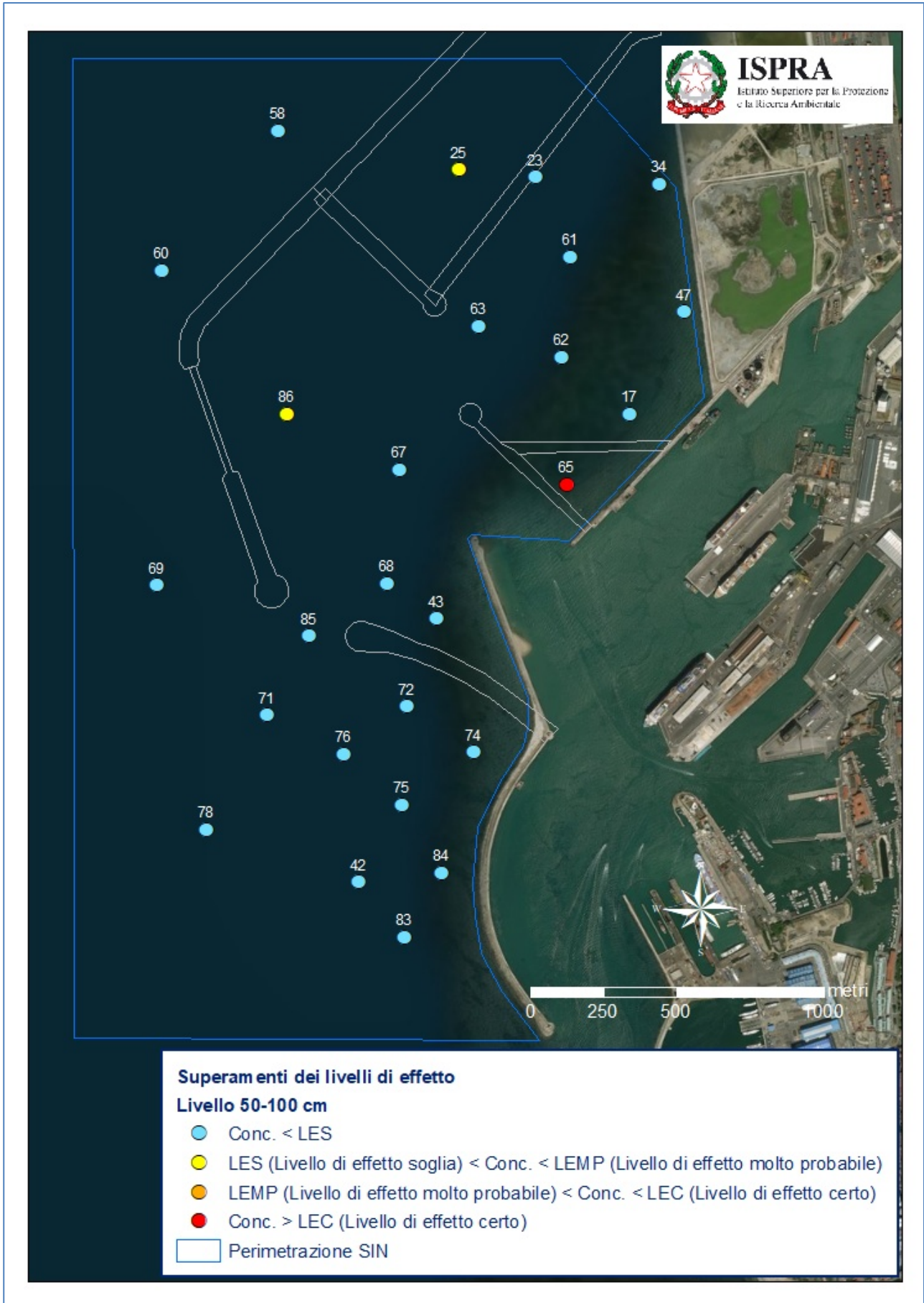


Figura 36 – Superamenti dei livelli di effetto nello strato 0 - 50 cm



Figura 17 – Superamenti dei livelli di effetto nello strato 100 - 200 cm



Figura 18 – Superamenti dei livelli di effetto nello strato 200 - 400 cm



#### 4.5 Confronto fra scenari diversi

Analizzando la ripartizione percentuale tra le diverse classi di pericolo (*HQ* *batteria*) ottenute dall'applicazione dei criteri di integrazione ponderata alle risultanze ecotossicologiche, è possibile fornire ulteriori elementi di valutazione utili ad orientare la scelta del LEA rispetto allo specifico quadro ambientale emerso dalle elaborazioni condotte.

Analizzando la classificazione ecotossicologica dei campioni utilizzati per determinare i nuovi valori di riferimento (Fig. 19 e 20), si osserva che la maggior parte di essi appartengono alla classe di pericolo “assente” (65 %) seguita da un 10 % di “pericolo basso”, 19 % “medio” e solo il 6 % “alto” (Figura 19).

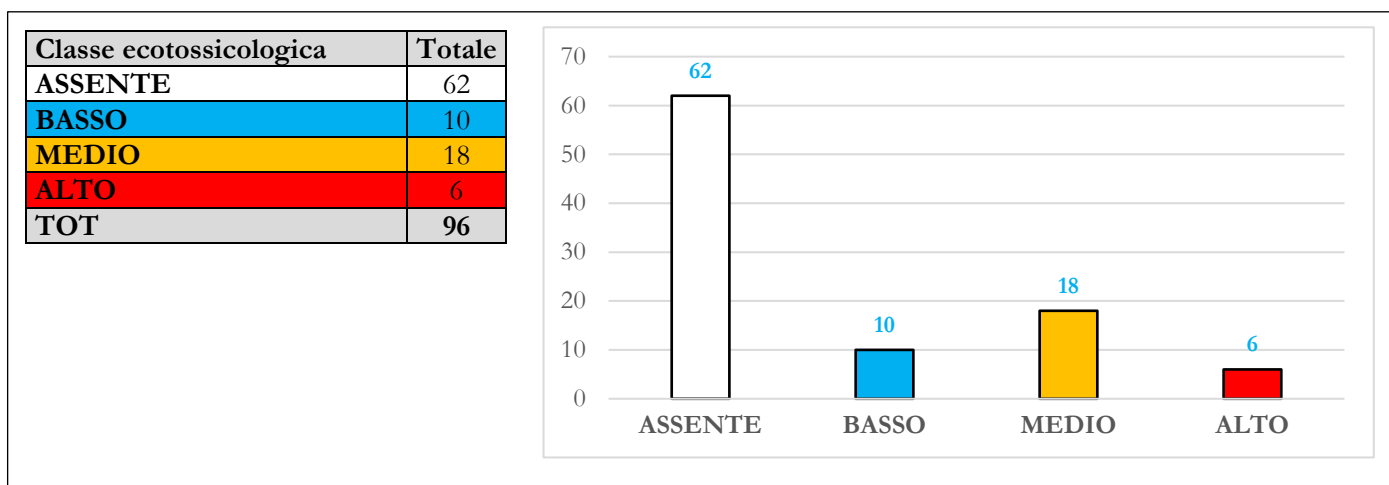


Figura 19 – Suddivisione in classi ecotossicologiche

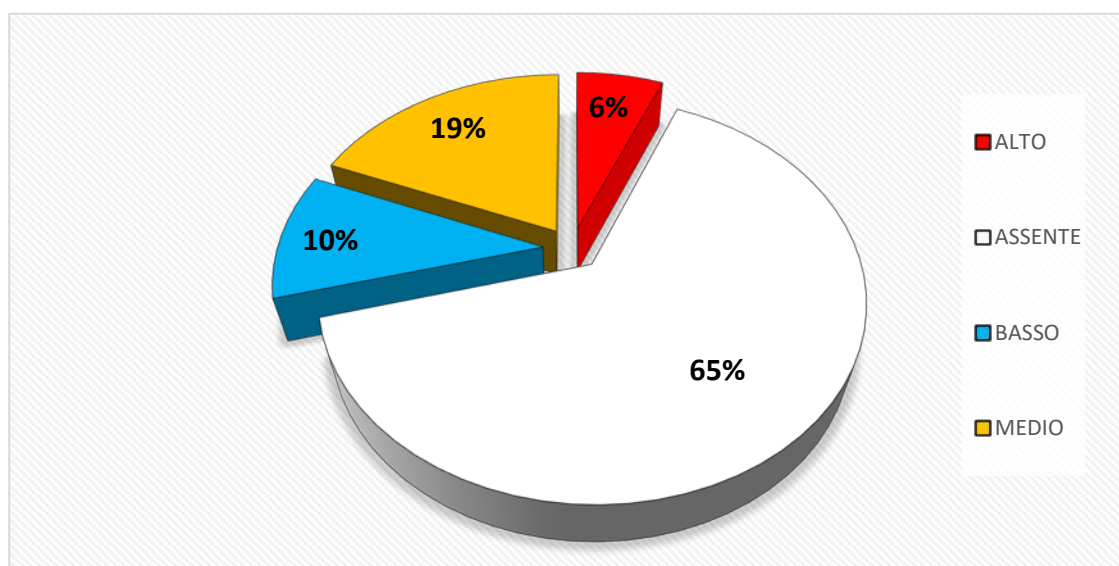
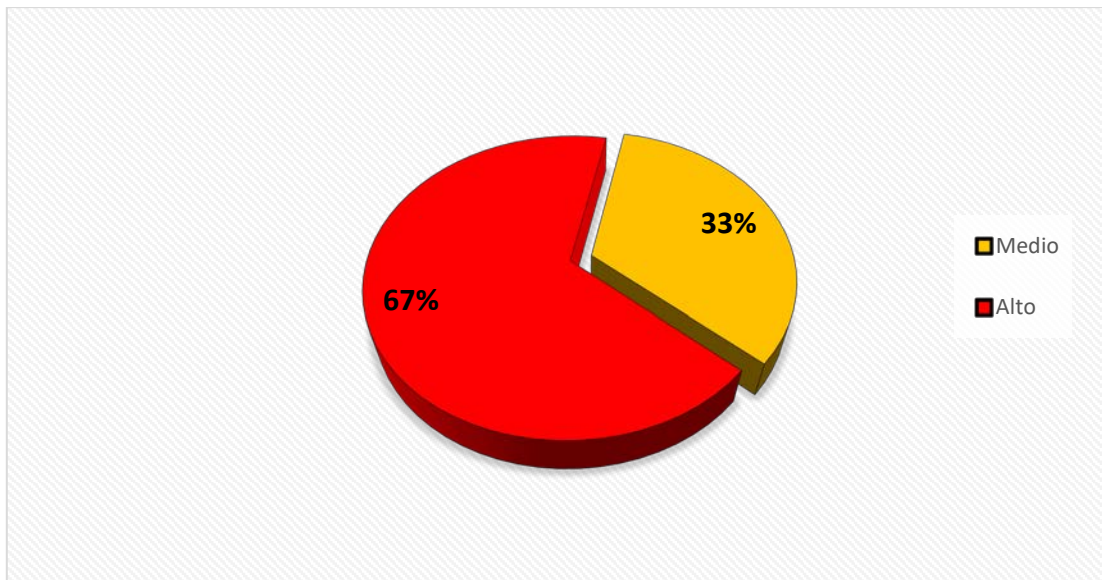


Figura 20 – Ripartizione percentuale del livello di pericolo ecotossicologico (su 96 campioni)

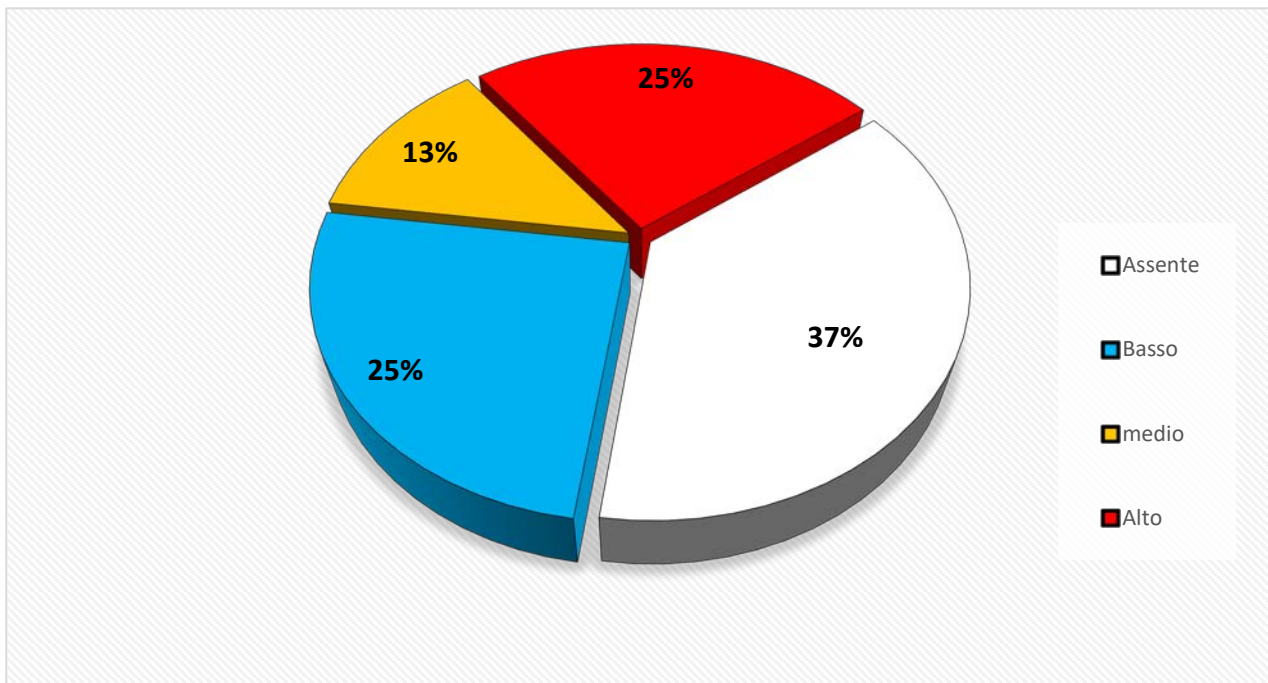
Nel caso di superamento del LEC, si registrano casi di tossicità elevata al 67 %, confermando l’alta probabilità di effetti tossici corrispondenti (Figura 21). Occorre tuttavia osservare che, sebbene i risultati

ecotossicologici siano concordi con la distribuzione probabilistica, sono però riferiti ad un numero esiguo di casi: i superamenti con tossicità elevata (67 %) sono limitati a un'unica stazione (ID65, livelli 50-100 e 100-200) nel 2019 come pure i superamenti con tossicità media (33 %; Vn1 nel 2012).

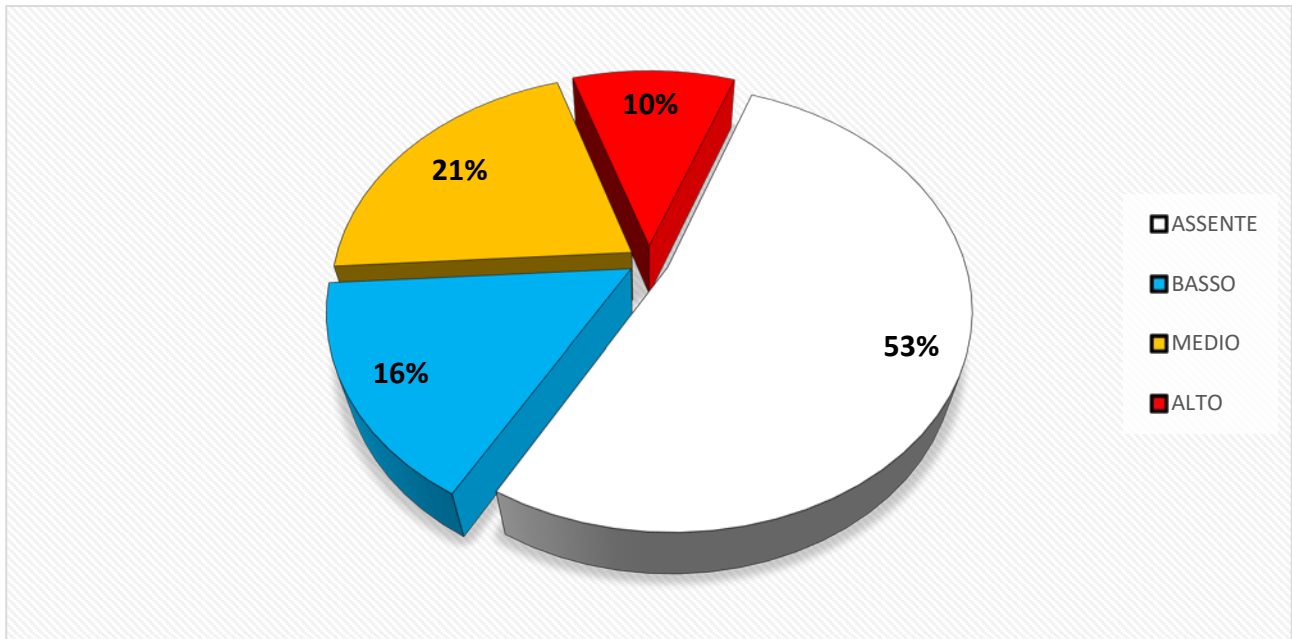
Nel caso del LEMP, 2/3 dei campioni (75 %) presenta tossicità lieve o moderata, in particolare assente (37 %), bassa (25 %) e media (13 %), mentre meno di 1/3 dei campioni (25 %) mostra una tossicità alta (Figura 22).



*Figura 21 – Ripartizione del livello di pericolo ecotossicologico tra i campioni risultati non conformi in corrispondenza del LEC (n. 11)*



*Figura 22– Ripartizione del livello di pericolo ecotossicologico tra i campioni risultati non conformi in corrispondenza del LEMP (n. 20)*



*Figura 23 – Ripartizione del livello di pericolo eco tossicologico tra i campioni risultati non conformi in corrispondenza del LES (n. 54)*

La percentuale dei campioni che presentano una tossicità lieve o moderata, tra cui assente (53 %), bassa (16 %) e media (21 %), aumenta nei campioni risultati non conformi al LES. Il restante 10 % dei campioni presenta tossicità alta (Figura 23).

## 5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Nella procedura di cui al Decreto Direttoriale del MATTM 8 giugno 2016 viene data la seguente indicazione tecnica per la scelta del LEA più opportuno: “qualora la maggior parte dei campioni, presenti effetti tossici lievi o moderati, è ragionevole supporre che il valore di  $p = 0.95$  sia sufficientemente cautelativo, anche in caso di componenti da tutelare”.

Dall'analisi degli effetti di tossicità osservata nei campioni risultati non conformi ai vari livelli di pericolo, appare evidente come la maggior parte di essi nella classe tossicologica assente considerando l'*HQ* batteria (capitolo 4), motivo per cui la scelta del LEC ( $p = 0.95$ ) come LEA appare quella da privilegiare per l'individuazione dei valori di riferimento del SIN di Livorno (Tab. 6), scelta supportata inoltre dall'assenza di obiettivi sensibili come impianti di acquacoltura o praterie di *Posidonia oceanica* all'interno dell'attuale perimetro del S.I.N..

Tabella 6 - Livello di effetto accettabile (LEA) determinato per i sedimenti dell'area marina esterna al porto compresa nel SIN di Livorno

Sostanza	Unità di misura	LEA $\equiv$ LEC ( $p = 0.95$ )	Casi utili
CROMO	mg/Kg s.s.	n.d.	95
NICHEL	mg/Kg s.s.	n.d.	95
RAME	mg/Kg s.s.	n.d.	95
ZINCO	mg/Kg s.s.	n.d.	95
ARSENICO	mg/Kg s.s.	68.24	95
CADMIO	mg/Kg s.s.	n.d.	95
PIOMBO	mg/Kg s.s.	n.d.	95
VANADIO	mg/Kg s.s.	n.d.	83
ALLUMINIO	mg/Kg s.s.	n.d.	95
MERCURIO	mg/Kg s.s.	1.64	95
STAGNO ORGANICO	$\mu$ g/Kg s.s.	n.d.	83
NAFTALENE	$\mu$ g/Kg s.s.	12083.93	96
FLUORENE	$\mu$ g/Kg s.s.	8741.93	96
FENANTRENE	$\mu$ g/Kg s.s.	23511.79	96
ANTRACENE	$\mu$ g/Kg s.s.	2777.45	96
FLUORANTENE	$\mu$ g/Kg s.s.	n.d.	96
PIRENE	$\mu$ g/Kg s.s.	n.d.	96
BENZO [A] ANTRACENE	$\mu$ g/Kg s.s.	n.d.	96
CRISENE	$\mu$ g/Kg s.s.	n.d.	96
BENZO[B]FLUORANTENE	$\mu$ g/Kg s.s.	1497.15	96
BENZO[K]FLUORANTENE	$\mu$ g/Kg s.s.	n.d.	96
BENZO [A] PIRENE	$\mu$ g/Kg s.s.	n.d.	96
INDENO[1,2,3-CD]PIRENE	$\mu$ g/Kg s.s.	n.d.	96
BENZO[GHI]PERILENE)	$\mu$ g/Kg s.s.	n.d.	96
SOMMATORIA IPA	$\mu$ g/Kg s.s.	98115	96

Ad ulteriore specifica di quanto riportato si osserva che:

- nel livello superficiale del sedimento (0 - 50 cm), si ha la totalità dei campioni con effetti tossici lievi o moderati, nel quale non sussiste alcun superamento del LEC (ad eccezione di un superamento relativo ad un campione presente esclusivamente nella campagna del 2012);
- nei livelli sub-superficiali indagati (50 - 100 cm e 100 - 200 cm), laddove invece risultano evidenti effetti tossici alti in due campioni appartenenti alla medesima stazione (ID65 livello 50-100 e 100-200), è altresì evidente il corrispondente superamento del LEC (Fig. 24).

Pertanto, a fronte dei risultati sopra riportati, si suggerisce di riservare a questi ultimi livelli di sedimento analizzati una specifica attenzione nel caso di una possibile futura gestione.

In particolare, al fine di meglio circoscrivere la qualità dei sedimenti, nell'immediato o successivamente in occasione di attività che prevedano la loro movimentazione, è opportuno approfondirne le caratteristiche nell'intorno della stazione ID65 infittendo i punti di prelievo ad una scala non superiore ai 50 metri.

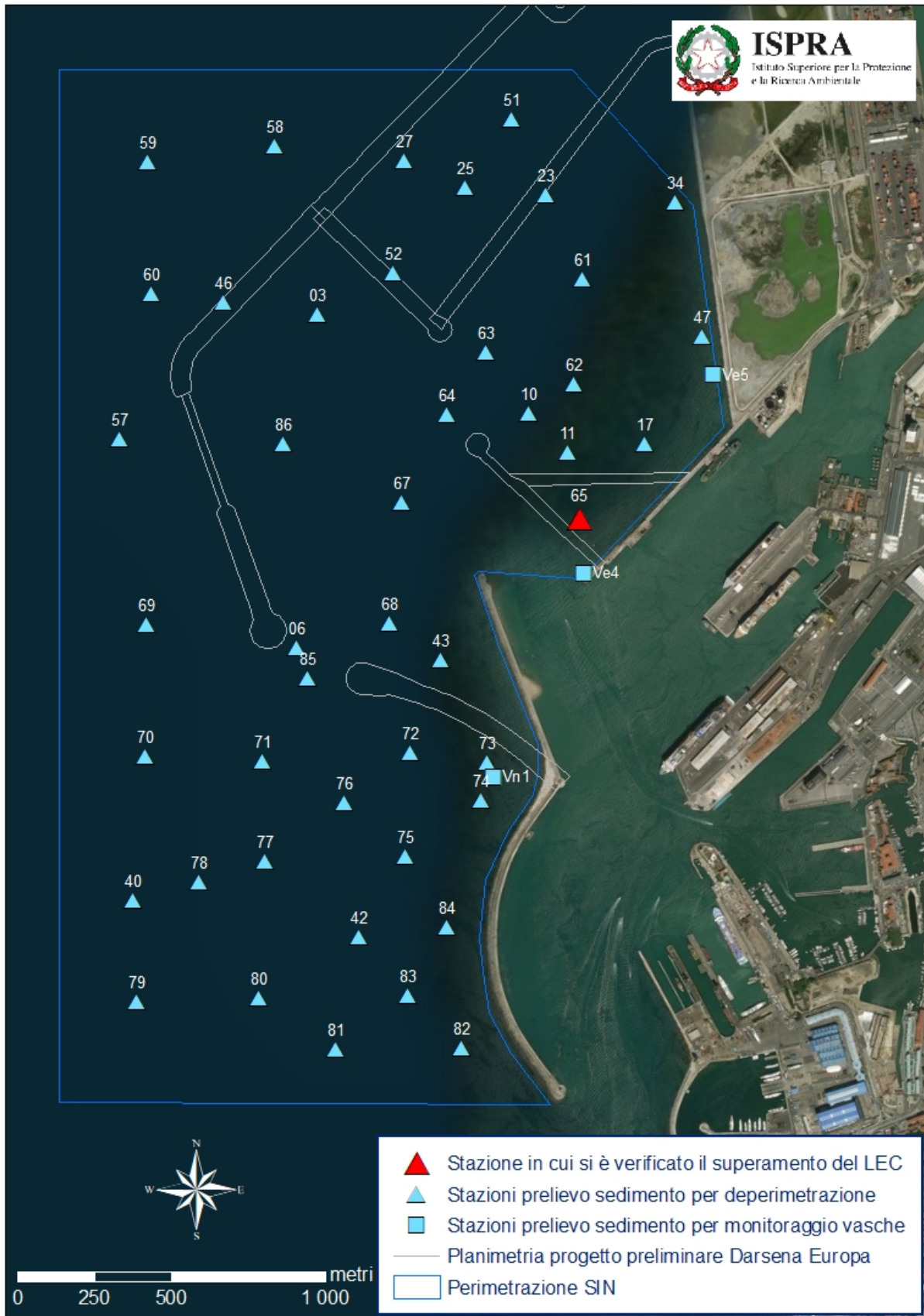


Figura 44 – Carta riassuntiva dei superamenti del LEA ai sensi del DD 8 giugno 2016

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Benedetti, M., Ciaprini, F., Piva, F., Onorati, F., Fattorini, D., Notti, A., Ausili, A., Regoli, F. (2012). A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environ Int* 38:17–28
- Piva, F., Ciaprini, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., Regoli, F. (2011). Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere* 83:475–485.
- Regoli, F., D'Errico, G., Nardi, A., Mezzelani, M., Fattorini, D., Benedetti, M., Di Carlo, M., Pellegrini, D., Gorbi, S. (2019). Application of a Weight of Evidence Approach for Monitoring Complex Environmental Scenarios: the Case-Study of Off-Shore Platforms. *Front Mar Sci* 6:1–15.

## **ALLEGATO 1**

# **ANALISI ECOTOSSICOLOGICHE**



## 1. Materiali e metodi

### 1.1 Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

I primi metodi internazionali di riferimento per l'utilizzo di alghe monocellulari in prove di inibizione della crescita algale per lo studio della contaminazione di acque marine e costiere risalgono agli anni '70 (EPA, 1974; IRSA, 1978). In seguito, metodi EPA sono stati pubblicati anche per il controllo di acque di scarico (EPA, 1988). La metodica del saggio algale per organismi marini è stata aggiornata con la norma UNI ISO 10253 (2006) che prevede l'utilizzo di *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin e *Skeletonema costatum*. Entrambe le alghe possono essere impiegate, utilizzando tale protocollo, per saggi con elutriati o estratti da sedimento intero o con acqua sovrantante o interstiziale.

I saggi con microalghe sono tra i più comunemente utilizzati per la facilità ed economicità del loro mantenimento in laboratorio e per la loro risposta rapida alla qualità dell'ambiente (Kraynikova, 1988; Lewis, 1995).

*Phaeodactylum tricornutum* è una diatomea Bacillariophyta ampiamente distribuita in aree estuariali e costiere e, in campo ecotossicologico, il suo impiego per la valutazione della qualità delle acque, dei sedimenti e delle acque di scarico industriali è stato riportato da numerosi autori (Okay et al., 1994; dos Santos et al., 2002; Nash et al., 2005; Morreno Garrido et al., 2007; Morelli et al., 2009; Zhuravel et al., 2009).

I principali indici presi in considerazione in questi lavori sono stati la densità cellulare (Okay et al. 1994; dos Santos et al. 2002; Morreno-Garrido et al. 2007; Zhuravel et al. 2009), ma anche risposte fisiologiche e biochimiche, come il contenuto di clorofilla *a* e la taglia cellulare (Zhuravel et al. 2009), la concentrazione di fitochelatine e peptidi endocellulari che legano i metalli (Morelli et al. 2009), nonché la fluorescenza ritardata (Nash et al. 2005).

La valutazione del tasso di crescita costituisce una procedura di facile esecuzione nonché di buona sensibilità, poiché l'aumento o la riduzione della crescita cellulare delle microalghe rispetto al controllo può essere connessa con fenomeni di inquinamento di matrici acquose (Aizdaicher et al. 1999; Khristoforova et al. 2001).

#### *Caratteristiche generali del test*

Il principio del test consiste nell'espore 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 ed omogeneo apporto di nutrienti. Al termine del periodo d'incubazione viene confrontata la crescita algale nel campione con quella del controllo.

Il saggio biologico è stato eseguito seguendo i protocolli ISO 10253 (2006) e ARPAT (1998), con alcune modifiche specifiche.

#### *Mantenimento della coltura algale madre e fasi preparatorie*

Le colture cellulari madri sono state mantenute in opportuno mezzo di crescita a salinità di  $30 \pm 5$  ‰, con periodici rinnovi per mantenerle nella fase di crescita esponenziale. A partire dalla coltura madre, una pre-coltura con una densità cellulare compresa tra  $2 \times 10^3$  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*

Un'aliquota della coltura di inoculo è stata addizionata alla soluzione test e ad una appropriata quantità di mezzo di coltura concentrato. La soluzione così ottenuta, con una densità cellulare compresa tra  $8 \times 10^3$  e  $1,2 \times 10^4$  cells/mL, è stata quindi distribuita in triplice replica in piastre monouso sterili a 24 pozzetti (APAT, 2003; UNI EN ISO 10253, 2006) e posta per 72 h in camera termostatica a  $20 \pm 2$  °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 filtrata, sterilizzata e portata a salinità 30 ‰ con aggiunta della medesima quantità di mezzo di coltura ed inoculo usato per i campioni, è stata considerata come controllo negativo. In contemporanea, un controllo positivo è stato effettuato utilizzando dicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ) come tossico di riferimento per controllare la procedura e la sensibilità del test.

Al termine del prefissato periodo di incubazione è stata determinata la densità algale di ogni replicato, previa risospensione della soluzione contenuta in ciascun pozzetto.

Tutte le valutazioni della densità algale sono state effettuate tramite conta al microscopio invertito utilizzando una camera di conta cellulare Thoma.

#### *Analisi dei risultati*

Le densità cellulari registrate al termine del test sono state comparate con la concentrazione cellulare iniziale, determinando:

$$\text{Fattore di Crescita (FC)} = C_f / C_i,$$

$$\text{Tasso di Crescita (TC)} = (\ln C_f - \ln C_i) / 3,$$

$$\text{Coefficiente di Variazione (CV)} = \text{Scarto tipo dei valori del Tasso di Crescita delle singole repliche} / \text{Media dei Tassi di Crescita delle repliche} * 100,$$

in cui risulta:

$C_f$  = concentrazione finale (cells/mL)

$C_i$  = concentrazione iniziale (cells/mL).

Affinché il test fosse ritenuto valido, il controllo negativo (SW) ha dovuto rispettare i seguenti criteri di validazione:  $FC \geq 16$ ;  $TC \geq 0.9 \text{ d}^{-1}$ ;  $CV \leq 5 \%$ .

Un ulteriore criterio di validazione del test è stata la determinazione del valore di EC50 registrato con il dicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), valore poi comparato all'intervallo preso come riferimento dal Protocollo ISO 10253 (2006) ( $EC_{50} K_2Cr_2O_7 = 14.8 - 25.4 \text{ mg/L}$ ,  $n = 7$ ). Il calcolo del valore di EC50 e del relativo intervallo di confidenza al 95% è stato effettuato mediante l'utilizzo del modello di regressione non lineare Logit Hill.

Per ciascun campione testato è stata quindi calcolata la Percentuale di Inibizione (I):

$$I = (TC \text{ Campione } X - TC \text{ Controllo}) / TC \text{ Controllo} * 100.$$

Per esprimere il giudizio di tossicità è stata utilizzata la scala di valutazione riportata in Tabella 1 basata sulla percentuale di inibizione registrata testando l'elutriato al 100 %.

Tab. 1 - Scala di tossicità utilizzata nel saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

Valore di Inibizione	Valutazione di Tossicità
$I \leq -50\%$	Bioestimolazione
$-50\% < I < 20\%$	Assente/Trascurabile
$20\% \leq I \leq 50\%$	Moderata
$50\% \leq I \leq 80\%$	Alta
$80\% < I \leq 100\%$	Molto Alta

## 1.2 Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

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

Il sistema Microtox® è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di questa specie. Poiché in presenza di contaminanti l'emissione di luce da parte di *V. fischeri* diminuisce, la misura dell'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 marine, acquose (acqua interstiziale, elutriato, ecc.) e solide (fanghi, sedimenti), nonché a soluzioni acquose di sostanze tossiche pure sia organiche che inorganiche.

### *Preparazione delle matrici ambientali*

I saggi biologici sono stati applicati a direttamente alla fase solida, che è stata preparata per semplice centrifugazione refrigerata (3500 rpm a 4 °C per 30'), eliminando successivamente l'acqua interstiziale come sovranatante.

### *Protocolli di riferimento e procedura adottata*

L'emissione della bioluminescenza è stata misurata all'interno del luminometro termostato M500, dotato di pozzetti termostatati a 15 °C per i controlli e i campioni e a 4°C per il reagente.

I metodi utilizzati sono riconducibili al protocollo standard ISO 11348. Per campioni di sedimento centrifugato è stato applicato il protocollo Solid Phase Test (SPT) con la procedura Large Sample Method (Azur Environmental, 1995b) 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.

La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, è stata elaborata mediante un software dedicato (Microtox Omni™ v. 1.16) che consente di individuare nel caso della fase solida la EC<sub>50</sub> (concentrazione del campione cui corrisponde una riduzione della bioluminescenza pari al 50%). La EC<sub>50</sub> è stata ulteriormente elaborata, esprimendola come:

- *Unità Tossiche (TU = 100/EC50)*, che consentono di ottenere una relazione diretta fra tossicità e riduzione della bioluminescenza,
- *Sediment Toxicity Index (S.T.I.)*, che permette di esprimere la reale tossicità acuta del campione rispetto alla tossicità "naturale" di un campione di riferimento avente le medesime caratteristiche granulometriche (Onorati *et al.*, 1999).

Al fine di esprimere il risultato del saggio nella scala S.T.I., 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, è stata eseguita anche un'analisi granulometrica mirata ad individuare la proporzione tra le due frazioni citate, indispensabile per la valutazione del reale livello di tossicità acuta.

Le modalità utilizzate per l'individuazione di tali frazioni granulometriche si dividono in 3 fasi:

1. Trattamento del campione con una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per facilitare la separazione e la disgregazione del sedimento;
2. Setacciatura su getto di acqua distillata mediante setacci ASTM da 63 µm e da 1 mm;
3. Recupero delle frazioni ottenute ed essiccamento in stufa, scartando quella > di 1 mm.

La matrice solida (centrifugata) è stata giudicata tossica quando il valore di S.T.I è risultato superiore a 1.

La scala adottata per la quantificazione della tossicità è riportata in Tabella 2 (ICRAM-APAT, 2007).

Tab. 2 – Scale di tossicità acuta utilizzate nel saggio biologico mediante *V. fischeri*

Matrice	Tossicità assente/trascurabile	Tossicità presente	Tossicità elevata	Tossicità molto elevata
Fase solida	S.T.I. $\leq 3$	$3 < \text{S.T.I.} \leq 6$	$6 < \text{S.T.I.} \leq 12$	S.T.I. $> 12$

### 1.3 Saggio biologico con *Paracentrotus lividus*

L'affidabilità del riccio di mare come bioindicatore è riconosciuta a livello mondiale e già negli anni '80 i test di fecondazione e di sviluppo embrionale sono stati inclusi nella lista ICES (1997) dei test biologici più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino. Procedure standard per i test di fecondazione e di sviluppo embrionale sono state messe a punto per le specie della costa orientale (*Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus droebachiensis*) e per quelle della costa occidentale (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Dendraster excentricus*) degli Stati Uniti (USEPA, 1994, 1995, 2000; ASTM, 1995, 2004) e per il Canada (Environment Canada, 1992). In Italia, la specie autoctona *Paracentrotus lividus*, ha trovato applicazione in campo ecotossicologico in particolare per quanto riguarda lo studio degli effetti sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale (difetti nello sviluppo e aberrazioni mitotiche) di sostanze pure e di effluenti. In effetti, il saggio biologico con *P. lividus* può essere impiegato sia nella valutazione della qualità di matrici ambientali (acque e sedimenti marini) sia nella stima della tossicità di sostanze o preparati solubili in acqua di mare.

In particolare, per quanto riguarda i sedimenti marini esso è compatibile con l'acqua interstiziale e l'elutriato, come riportato in “Quaderni – Ricerca Marina n.11/2017 – Saggio di fecondazione e saggio di sviluppo embrionale con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea)”, protocollo pubblicato da ISPRA nel 2017.

#### *Matrici acquose testate*

La matrice ambientale soggetta alla valutazione ecotossicologica in questo saggio biologico è l'elutriato. L'elutriato fornisce informazioni su tutte quelle componenti estraibili in acqua. Quest'ultima rappresenta una delle matrici più indicative nello studio degli effetti della movimentazione dei fondali (USACE, 1991) come nei dragaggi portuali, nei siti di discarica, ecc.

#### *Preparazione dell'elutriato*

L'elutriato è stato preparato in accordo con il protocollo standard US EPA (1991) combinando in peso quattro parti di acqua filtrata prelevata da una zona non contaminata con una parte di sedimento. Il tutto è stato messo ad agitare per 1 h a 400 giri/min. La fase liquida è stata quindi raccolta e centrifugata per 20 minuti a 3500 giri/min. 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

sembra alterare in modo significativo le caratteristiche dei nutrienti ( $\text{NO}_3$  e  $\text{PO}_4$ ) della fase liquida (Clementson & Wayte, 1992) e uno studio condotto da Carr e Chapman (1995) ha permesso di verificare l'assenza di differenze significative tra la tossicità di campioni di matrici acquose appena estratte o congelate. 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.

L'elutriato viene testato sia non diluito (100 %) che diluito, con acqua di mare filtrata a  $0,45 \mu\text{m}$  alle concentrazioni finali del 25 % e 50 %.

#### *Raccolta degli organismi*

Per assicurare la maturità sessuale, i ricci di mare adulti vengono raccolti tra Settembre e Maggio (Fenaux, 1968). Esemplari adulti sono stati prelevati da fondali rocciosi del litorale di Livorno in una zona distante da fonti di inquinamento antropico (scarichi urbani e industriali).

I ricci vengono raccolti ad una profondità tra 1 e 3 m e posti in un contenitore di plastica e ricoperti con abbondante carta bibula umida per minimizzare lo stress da trasporto ed evitare così possibili emissioni di gameti. In laboratorio gli esemplari vengono posti in una camera termostata, in acquari di vetro contenenti acqua di mare raccolta nello stesso sito di campionamento degli organismi e dotati di un sistema di areazione e di filtraggio (20 individui per 100 l di acqua). Giornalmente vengono controllati temperatura ( $16 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), salinità (34 ‰ – 38 ‰), pH (7,8 - 8,2), ammoniaca e nitrati. I ricci sono stabulati negli acquari, prima dell'esecuzione del test, per almeno una settimana.

#### *Modalità di esecuzione del test di spermiossicità*

Il saggio consiste nell'espore un numero definito di gameti maschili per 1 h ad una sostanza tossica o ad una matrice acquosa complessa di cui si vuole valutare la tossicità. Lo scopo è di valutare l'efficacia della fecondazione rispetto a un controllo negativo (acqua di mare filtrata a  $0,45 \mu\text{m}$ ). Successivamente vengono aggiunte le uova e dopo 20 minuti il test viene bloccato con l'aggiunta di poche gocce di soluzione di Lugol al 5 % (Carlo Erba, Milan). Il rapporto sperma : uova adottato è di 15000 : 1 con 1000 uova in 10 ml di soluzione test.

Al fine di valutare la sensibilità dei gameti impiegati nell'allestimento del saggio viene allestito un controllo positivo, rappresentato da concentrazioni crescenti della sostanza tossica di riferimento ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).

Al termine delle prove vengono conteggiate le uova fecondate e calcolate le percentuali di fecondazione corrispondenti alle diverse diluizioni della matrice acquosa complessa testata.

#### *Modalità di esecuzione del test di embriossicità*

La metodologia è stata sviluppata a partire dalla procedura standard ASTM (2004) e da studi di letteratura (Volpi Ghirardini et al. 2005; Sartori et al. 2016;). Il test consiste nell'ottenere gli zigoti di *P. lividus*

attraverso l'unione della sospensione spermatica (concentrazione desiderata) con la sospensione di uova in un rapporto delle sospensioni di spermatozoi e uova di 10 : 1. Il beaker è così incubato a  $18 \pm 1$  °C per almeno 20 minuti affinché possa avvenire la fecondazione delle uova.

Il saggio di embriotossicità viene eseguito esponendo 1 ml di soluzione di uova fecondate a 10 ml della soluzione test in cella termostatica al buio a  $18$  °C  $\pm 1$  per 72 h. Il rapporto sperma : uova adottato è di 15000 : 1 con 1000 uova in 10 ml di soluzione test.

Il tempo di esposizione scelto per il test è di 72 h, in modo da garantire che tutti gli zigoti raggiungano lo stadio larvale di pluteo 4 braccia nel controllo negativo.

Al fine di valutare la sensibilità dei gameti impiegati nell'allestimento del saggio viene allestito un controllo positivo, rappresentato da concentrazioni crescenti della sostanza tossica di riferimento ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).

Il test viene fissato con poche gocce di soluzione di Lugol al 5 % (Carlo Erba, Milan).

La stima della percentuale di plutei normali avviene contando 100 larve. Per ottenere una stima più accurata degli effetti embriotossici, si distinguono le anomalie dello sviluppo distinguendo tra plutei malformati, cioè larve sviluppate ma che presentano malformazioni scheletriche e/o all'apparato digerente, e fasi pre-larvali di blastula, gastrula, prisma e pluteo precoce, che si sono bloccate prima del raggiungimento del completo sviluppo.

#### *Elaborazione dei risultati*

L'effetto della sostanza testata, di cui si vuole valutare la tossicità, viene rilevato dalla percentuale di plutei normoformati rispetto a un controllo di acqua di mare (controllo negativo). Il test viene considerato accettabile se la percentuale dei plutei normoformati nel controllo negativo è superiore all'80 %.

I valori così ottenuti vengono impiegati in due elaborazioni differenti: per quanto riguarda i campioni, la loro eventuale tossicità viene valutata mediante il calcolo dell'EC<sub>20</sub> e dell'EC<sub>50</sub> ottenuti con lo specifico programma Tox Calc 5.0 mediante il metodo della Probit Analysis. I valori ottenuti vengono confrontati con la scala di tossicità riportata in Tabella 3 ed il campione può essere valutato contaminato o non contaminato (ICRAM-APAT, 2007).

Tab. 3 – Scala di tossicità del saggio con *P. lividus*

EC20/EC50	Tossicità
EC20 $\geq$ 90%	Assente/ Trascurabile
EC20 < 90% e EC50 > 100%	Media
40% $\leq$ EC50 $\leq$ 100%	Alta
EC50 < 40%	Molto alta

Per il tossico di riferimento, invece, i valori di EC<sub>50</sub> vengono ottenuti utilizzando due metodi statistici differenti: il Trimmed Spearman-Kärber (Hemilton et al.,1978) e la Probit Analysis (Finney, 1971). Il valore dell'EC<sub>50</sub> indica la concentrazione della sostanza di prova (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, 1000 mg/l) che causa una riduzione della fecondazione del 50% rispetto a un controllo negativo. I valori di EC<sub>50</sub> ottenuti con il tossico di riferimento sono stati confrontati con la carte di controllo del laboratorio in modo tale da verificare se la risposta delle prove effettuate è confrontabile con quella normalmente riscontrata nei saggi dello stesso tipo effettuati in precedenza nello stesso laboratorio di prova con lo stesso protocollo metodologico

## 2. Risultati

### 2.1 Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

In Tabella 4 sono riportati i risultati del saggio con l'alga *Phaeodactylum tricornutum* condotto sull'elutriato ottenuto dal sedimento prelevato nelle stazioni di campionamento eseguite durante la campagna di prelievo del 2019. Dato l'elevato numero, è stato necessario suddividere i campioni ed effettuare il saggio algale in quattro differenti allestimenti (test I – IV). I parametri di validazione registrati nei quattro allestimenti sono riportati in Tabella 5. I risultati del saggio con l'alga relativi al monitoraggio delle vasche di colmata (campagne 2012-2017) e i rispettivi parametri di validazione sono riportati nelle Tabelle 6 e 7.

Tab. 4 – Risultati del saggio con *P. tricornutum* – campagna deperimetrazione 2019

Campione	Inibizione Crescita Algale I (%)					Tossicità
	1	2	3	M	DS	
I-V/03/00-50	-0,53	3,30	5,21	2,66	2,93	Assente
I-V/06/00-50	5,09	7,77	17,61	10,16	6,59	Assente
I-V/10/00-50	-12,50	12,51	6,77	2,26	13,10	Assente
I-V/11/00-50	2,45	6,24	-3,81	1,63	5,08	Assente
I-V/17/00-50	-11,67	-8,03	-20,92	-13,54	6,65	Assente
I-V/17/50-100	-15,39	-12,81	-17,71	-15,30	2,45	Assente
I-V/17/100-200	-16,06	-13,40	-5,43	-11,63	5,53	Assente
I-V/23/00-50	-14,73	-14,81	-23,21	-17,58	4,87	Assente
I-V/23/50-100	2,61	-2,90	21,21	6,97	12,63	Assente
I-V/25/00-50	-1,04	-3,73	-9,37	-4,71	4,25	Assente
I-V/25/50-100	-10,48	-18,95	-14,14	-14,52	4,25	Assente
I-V/25/300-350	-8,33	-4,77	-12,41	-8,50	3,82	Assente
I-V/27/00-50	-24,73	-13,11	-6,55	-14,80	9,20	Assente
I-V/27/200-250	-11,96	-14,49	-13,55	-13,34	1,28	Assente
I-V/34/00-50	-24,59	-25,28	-23,02	-24,30	1,16	Assente
I-V/34/50-100	2,34	-29,73	2,36	-8,34	18,52	Assente
I-V/40/00-50	-19,02	-12,92	-10,59	-14,18	4,36	Assente
I-V/42/00-50	-6,64	-6,27	-1,04	-4,65	3,13	Assente
I-V/42/50-100	2,32	18,86	19,50	13,56	9,74	Assente
I-V/43/00-50	-9,60	-16,04	-2,34	-9,33	6,85	Assente
I-V/43/50-100	-1,44	-6,28	18,22	3,50	12,97	Assente
I-V/43/100-200	-12,14	0,67	-2,03	-4,50	6,75	Assente
I-V/46/00-50	2,18	-4,20	-0,33	-0,78	3,22	Assente
I-V/47/00-50	-3,84	-7,66	0,02	-3,83	3,84	Assente
I-V/47/50-100	-10,40	-15,65	-7,59	-11,21	4,09	Assente



Campione	Inibizione Crescita Algale I (%)					Tossicità
	1	2	3	M	DS	
I-V/51/00-50	1,27	-0,91	-1,50	-0,38	1,46	Assente
I-V/52/00-50	16,75	-9,88	14,77	7,21	14,84	Assente
I-V/52/200-250	5,78	2,79	7,28	5,29	2,29	Assente
I-V/57/00-50	-0,10	-9,81	-8,91	-6,27	5,36	Assente
I-V/58/00-50	-15,36	4,79	-17,16	-9,24	12,19	Assente
I-V/58/50-100	-7,23	-4,24	1,74	-3,24	4,57	Assente
I-V/59/00-50	-5,30	0,33	2,06	-0,97	3,85	Assente
I-V/60/00-50	11,04	16,06	-10,66	5,48	14,20	Assente
I-V/60/50-100	-17,07	-21,60	-20,21	-19,63	2,32	Assente
I-V/61/00-50	-8,86	14,14	17,07	7,45	14,20	Assente
I-V/61/50-100	-7,78	-4,47	-4,92	-5,73	1,80	Assente
I-V/62/00-50	-10,70	15,09	14,79	6,39	14,81	Assente
I-V/62/50-100	5,20	14,27	13,07	10,85	4,92	Assente
I-V/63/00-50	18,10	-1,28	1,73	6,18	10,43	Assente
I-V/63/50-100	-0,32	0,65	-12,99	-4,22	7,61	Assente
I-V/64/00-50	-23,29	-28,34	-31,99	-27,87	4,37	Assente
I-V/65/00-50	-29,45	-37,21	-7,21	-24,62	15,57	Assente
I-V/65/50-100	-13,41	-7,99	0,05	-7,11	6,77	Assente
I-V/65/100-200	7,10	-7,11	3,75	1,25	7,43	Assente
I-V/67/00-50	6,77	5,39	-14,79	-0,88	12,07	Assente
I-V/67/50-100	4,60	10,38	-5,40	3,19	7,98	Assente
I-V/68/00-50	-23,04	-0,49	-29,67	-17,73	15,29	Assente
I-V/68/50-100	13,09	0,21	13,49	8,93	7,56	Assente
I-V/69/00-50	7,72	9,79	0,86	6,12	4,67	Assente
I-V/69/50-100	-3,01	19,18	-2,74	4,48	12,73	Assente
I-V/69/100-200	-12,75	11,27	10,42	2,98	13,63	Assente
I-V/70/00-50	-17,40	-25,40	-20,24	-21,01	4,05	Assente
I-V/71/00-50	4,82	15,42	2,47	7,57	6,90	Assente
I-V/71/50-100	-5,25	11,11	10,21	5,36	9,20	Assente
I-V/71/100-200	-3,29	-15,02	-32,38	-16,90	14,63	Assente
I-V/71/200-400	-3,88	-7,46	-4,70	-5,35	1,87	Assente
I-V/71/400-500	-0,48	15,60	15,70	10,27	9,31	Assente
I-V/72/00-50	19,17	5,30	5,74	10,07	7,88	Assente
I-V/72/50-100	25,56	-0,51	10,11	11,72	13,11	Assente
I-V/73/00-50	-24,09	-18,61	-29,54	-24,08	5,46	Assente
I-V/74/00-50	3,66	2,30	10,95	5,64	4,65	Assente
I-V/74/50-100	11,75	-1,10	11,42	7,36	7,33	Assente
I-V/74/100-200	-14,10	-10,46	-17,40	-13,99	3,47	Assente
I-V/75/00-50	-34,04	-19,38	-23,67	-25,70	7,54	Assente
I-V/75/50-100	-11,93	-2,86	-12,64	-9,14	5,45	Assente
I-V/76/00-50	-28,23	-27,30	-19,31	-24,94	4,90	Assente
I-V/76/50-100	9,65	-3,00	3,25	3,30	6,33	Assente
I-V/77/00-50	-6,63	3,07	9,83	2,09	8,27	Assente
I-V/78/00-50	-10,79	-3,06	0,23	-4,54	5,65	Assente
I-V/78/50-100	7,60	14,55	1,59	7,91	6,48	Assente
I-V/79/00-50	-16,14	-26,24	-17,01	-19,80	5,60	Assente
I-V/80/00-50	-3,08	-5,94	-4,34	-4,45	1,44	Assente
I-V/81/00-50	-20,75	-13,15	-8,54	-14,15	6,16	Assente
I-V/82/00-50	15,66	16,98	20,24	17,63	2,36	Assente
I-V/83/00-50	-23,97	-32,14	-14,96	-23,69	8,60	Assente
I-V/83/50-100	-8,69	-12,07	-30,93	-17,23	11,98	Assente
I-V/84/0-50	9,03	1,35	6,06	5,48	3,87	Assente
I-V/84/50-100	8,53	16,57	13,41	12,84	4,05	Assente
I-V/84/100-200	-0,69	-15,46	19,49	1,12	17,54	Assente
I-V/85/00-50	-9,47	-6,55	-6,55	-7,52	1,69	Assente
I-V/85/50-100	-17,97	-1,18	0,82	-6,11	10,32	Assente
I-V/86/00-50	-7,50	-6,91	-11,25	-8,55	2,35	Assente
I-V/86/50-100	-27,02	-7,69	-23,51	-19,41	10,30	Assente

Tab. 5 – Parametri di validazione i del saggio con *P. tricornutum* – campagna deperimetrazione 2019

Parametro		Valore richiesto	Valori ottenuti			
			Test I	Test II	Test III	Test IV
Controllo Negativo	Fattore di Crescita conc. cellulare 72h	> 16	97,46	90,88	82,00	100,27
	Tasso di Crescita 72h	> 0,9 d <sup>-1</sup>	1,52	1,50	1,14	1,54
	Coeff. di Variazione del T. di C. 72h	< 5%	2,84	1,14	0,80	1,50
K <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	EC50 inibizione 72h (mg/L)	20,1 ± 5,1 (14,8 - 25,4)	18,3 (15 - 21,6)	16,4 (14 - 18,8)	18,6 (17,8 - 21,5)	21,61 (19,55- 23,68)

Tab. 6 – Risultati del saggio con *P. tricornutum* – monitoraggio vasche 2012-2017

Campione	Inibizione Crescita Algale I (%)								Tossicità
	1	2	3	4	5	6	M	DS	
Ve4 (2017)	-9,17	-7,87	-7,71	-9,13	-9,51	-10,09	-8,91	0,94	Assente
Ve5 (2017)	-9,13	-8,72	-9,4	-9,06	-9,28	-9,76	-9,23	0,35	Assente
Vn1 (2017)	-9,25	-4,91	-5,58	-6,4	-8,06	-7,27	-6,91	1,61	Assente
Ve4 (2015)	-13,06	-11,83	-12,87	n.e.	n.e.	n.e.	-12,59	0,66	Assente
Ve5 (2015)	-10,96	-8,51	-11,57	n.e.	n.e.	n.e.	-10,34	1,62	Assente
Vn1 (2015)	-12,87	-7,89	-9,76	n.e.	n.e.	n.e.	-10,17	2,51	Assente
Ve5 (2014)	1.038.443	956.924	865.815	n.e.	n.e.	n.e.	953.727	86.358	Assente
Ve4 (2013)	-10,94	-10,35	-8,56	n.e.	n.e.	n.e.	-9,95	1,24	Assente
Ve5 (2013)	-10,89	-11,19	-13,16	n.e.	n.e.	n.e.	-11,75	1,24	Assente
Vn1 (2013)	-9,07	-7,14	-7,96	n.e.	n.e.	n.e.	-8,06	0,97	Assente
Ve4 (2012)	-4,35	-5,14	-5,55	n.e.	n.e.	n.e.	-5,01	0,61	Assente
Ve5 (2012)	-11,62	-9,47	-9,19	n.e.	n.e.	n.e.	-10,09	1,33	Assente
Vn1 (2012)	-9,07	-7,14	-7,96	n.e.	n.e.	n.e.	-8,06	0,97	Assente

n.e.: replica non eseguita

Tab. 7 – Parametri di validazione i del saggio con *P. tricornutum* – monitoraggio vasche 2012-2017

Sostanza tossica di riferimento	Anno	EC50 inibizione 72h (mg/L)	
		Valore richiesto	Valore registrato
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	2017	14,8 – 25,4 mg/L	19,54 ± 2,32
	2015		23,24 ± 2,17
	2014		21,3 ± 2,0
	2013		23,40 ± 1,20
	2012		

## 2.2 Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

In Tabella 8 sono riportati i risultati del saggio con con il batterio marino *Vibrio fischeri* condotto sul sedimento prelevato nelle stazioni di campionamento eseguite durante la campagna di prelievo del 2019. I risultati del saggio con il batterio relativi al monitoraggio delle vasche di colmata (campagne 2012-2017) sono riportati in Tabella 9.

Tab. 8 - Risultati del saggio biologico con *V. fischeri* applicato alla fase solida – campagna deperimetrazione 2019

Campione	Sabbia < 1mm (%)	Pelite (%)	Soglia Tox Naturale (TU)	Tox Misurata (TU)	Range al 95% di confidenza (TU)	R <sup>2</sup> (%)	S.T.I.	Toxicità
I-V/03/00-50	60,45	39,55	149	133,020	121,474 - 145,669	99,81	0,89	Assente
I-V/06/00-50	55,18	44,82	166	183,834	146,130 - 231,346	98,58	1,11	Assente
I-V/10/00-50	29,61	70,39	246	325,355	298,660 - 354,557	99,92	1,32	Assente
I-V/11/00-50	69,99	30,01	119	76,289	63,709 - 91,366	99,14	0,64	Assente
I-V/17/00-50	100,00	0,00	25	20,945	18,141 - 24,197	99,33	0,83	Assente
I-V/17/50-100	76,24	23,76	100	47,360	28,374 - 79,041	85,61	0,47	Assente
I-V/17/100-200	72,16	27,84	113	55,660	54,249 - 57,112	100	0,49	Assente
I-V/23/00-50	65,75	34,25	133	91,190	89,922 - 92,473	100	0,69	Assente
I-V/23/50-100	27,11	72,89	254	252,073	242,371 - 262,121	99,98	0,99	Assente
I-V/25/00-50	17,87	82,13	282	259,577	223,715 - 301,013	99,42	0,92	Assente
I-V/25/50-100	17,61	82,39	283	269,817	266,684 - 272,950	100	0,95	Assente
I-V/25/300-350	47,65	52,35	189	91,166	90,258 - 92,091	100	0,48	Assente
I-V/27/00-50	34,93	65,07	229	247,448	198,229 - 309,141	98,63	1,08	Assente
I-V/27/200-250	78,52	21,48	93	51,609	50,921 - 52,311	100	0,56	Assente
I-V/34/00-50	100,00	0,00	25	34,522	29,547 - 40,322	99,44	1,36	Assente
I-V/34/50-100	82,78	17,22	79	78,576	48,229 - 128,035	87,03	0,99	Assente
I-V/40/00-50	80,22	19,78	87	82,407	81,875 - 82,939	100	0,94	Assente
I-V/42/00-50	47,82	52,18	189	66,617	58,300 - 76,128	99,52	0,35	Assente
I-V/42/50-100	48,16	51,84	188	66,475	51,037 - 86,577	96,33	0,35	Assente
I-V/43/00-50	82,58	17,42	80	101,038	99,655 - 102,435	100	1,26	Assente
I-V/43/50-100	12,47	87,53	299	236,899	128,144 - 438,109	89,9	0,79	Assente
I-V/43/100-200	58,20	41,80	156	109,374	106,742 - 112,057	100	0,70	Assente
I-V/46/00-50	61,22	38,78	147	195,201	182,759 - 208,467	99,95	1,33	Assente
I-V/47/00-50	100,00	0,00	25	9,608	7,333 - 12,589	98,73	0,38	Assente
I-V/47/50-100	100,00	0,00	25	13,768	11,125 - 17,034	98,6	0,54	Assente
I-V/51/00-50	19,51	80,49	277	300,913	248,669 - 364,102	99,3	1,09	Assente
I-V/52/00-50	19,51	80,49	277	278,170	267,615 - 289,261	99,98	1,00	Assente
I-V/52/200-250	18,15	81,85	282	78,261	72,158 - 84,867	99,92	0,28	Assente
I-V/57/00-50	91,72	8,28	51	34,387	34,387 - 26,855	35,02	0,67	Assente
I-V/58/00-50	7,97	92,03	313	352,127	299,245 - 414,267	99,67	1,12	Assente
I-V/58/50-100	39,39	60,61	215	253,489	198,915 - 322,947	98,59	1,18	Assente
I-V/59/00-50	56,65	43,35	161	182,914	160,866 - 208,056	99,56	1,14	Assente
I-V/60/00-50	69,07	30,93	122	102,535	93,899 - 111,944	99,84	0,84	Assente
I-V/60/50-100	74,66	25,34	105	115,836	92,921 - 144,396	99,08	1,11	Assente
I-V/61/00-50	71,84	28,16	113	44,865	40,207 - 50,055	99,68	0,40	Assente
I-V/61/50-100	45,64	54,36	196	83,422	73,453 - 94,726	99,56	0,43	Assente
I-V/62/00-50	100,00	0,00	25	152,886	121,367 - 192,752	98,52	6,03	Elevata
I-V/62/50-100	49,16	50,84	184	211,455	191,496 - 233,584	99,74	1,15	Assente
I-V/63/00-50	71,48	28,52	115	69,555	66,140 - 73,134	99,97	0,61	Assente
I-V/63/50-100	28,70	71,30	249	797,793	413,529 - 1538,886	96,97	3,21	Presente
I-V/64/00-50	73,86	26,14	107	84,690	72,828 - 98,494	98,83	0,79	Assente
I-V/65/00-50	35,40	64,60	228	298,805	225,452 - 395,853	98,03	1,31	Assente
I-V/65/50-100	50,79	49,21	179	726,363	580,129 - 909,349	99,03	4,05	Presente
I-V/65/100-200	58,75	41,25	154	343,833	324,778 - 363,883	99,97	2,23	Assente

Campione	Sabbia < 1mm (%)	Pelite (%)	Soglia Tox Naturale (TU)	Tox Misurata (TU)	Range al 95% di confidenza (TU)	R <sup>2</sup> (%)	S.T.I.	Tossicità
I-V/67/00-50	69,27	30,73	122	68,893	52,041 - 91,193	95,81	0,57	Assente
I-V/67/50-100	58,63	41,37	155	101,179	81,086 - 126,259	98,8	0,65	Assente
I-V/68/00-50	54,34	45,66	168	139,448	134,495 - 144,528	99,99	0,83	Assente
I-V/68/50-100	59,79	40,21	151	94,815	93,861 - 95,783	100	0,63	Assente
I-V/69/00-50	82,56	17,44	80	29,002	20,909 - 40,235	90,09	0,36	Assente
I-V/69/50-100	58,98	41,02	154	174,635	134,249 - 227,124	98,18	1,14	Assente
I-V/69/100-200	41,43	58,57	209	267,583	139,673 - 512,382	90,13	1,28	Assente
I-V/70/00-50	63,15	36,85	141	187,052	163,075 - 214,708	99,5	1,33	Assente
I-V/71/00-50	82,98	17,02	79	192,104	145,365 - 254,016	97,96	2,44	Assente
I-V/71/50-100	69,34	30,66	121	24,530	20,383 - 29,522	96,76	0,20	Assente
I-V/71/100-200	92,72	7,28	48	106,440	86,967 - 130,320	98,98	2,21	Assente
I-V/71/200-400	92,81	7,19	48	18,425	15,644 - 21,699	97,62	0,38	Assente
I-V/71/400-500	86,60	13,40	67	13,291	10,792 - 16,352	97,02	0,20	Assente
I-V/72/00-50	86,84	13,16	67	133,375	121,449 - 146,320	99,76	2,00	Assente
I-V/72/50-100	37,61	62,39	221	134,103	126,902 - 141,833	99,94	0,61	Assente
I-V/73/00-50	37,56	62,44	221	178,336	145,464 - 218,714	98,89	0,81	Assente
I-V/74/00-50	38,85	61,15	217	159,084	150,001 - 168,701	99,9	0,73	Assente
I-V/74/50-100	57,99	42,01	157	153,108	139,371 - 168,219	99,75	0,98	Assente
I-V/74/100-200	59,12	40,88	153	43,674	32,670 - 58,389	95,39	0,28	Assente
I-V/75/00-50	64,45	35,55	137	185,401	154,885 - 221,749	99,6	1,36	Assente
I-V/75/50-100	61,48	38,52	146	161,575	120,103 - 217,457	97,6	1,11	Assente
I-V/76/00-50	33,58	66,42	233	186,667	161,019 - 216,433	99,39	0,80	Assente
I-V/76/50-100	36,16	63,84	225	1370,209	1036,021 - 1811,883	99,58	6,08	Elevata
I-V/77/00-50	81,36	18,64	84	100,247	77,225 - 130,155	98,43	1,20	Assente
I-V/78/00-50	70,38	29,62	118	89,754	89,696 - 89,811	100	0,76	Assente
I-V/78/50-100	71,81	28,19	114	92,871	77,985 - 110,597	99,16	0,82	Assente
I-V/79/00-50	62,39	37,61	143	123,044	119,937 - 126,224	99,98	0,86	Assente
I-V/80/00-50	76,43	23,57	99	54,730	49,267 - 60,787	99,74	0,55	Assente
I-V/81/00-50	79,46	20,54	90	8,022	7,898 - 8,148	100	0,09	Assente
I-V/82/00-50	32,85	67,15	236	234,720	225,631 - 244,210	99,98	1,00	Assente
I-V/83/00-50	66,74	33,26	129	114,187	111,812 - 116,600	100	0,88	Assente
I-V/83/50-100	64,60	35,40	136	107,155	100,601 - 114,128	93,69	0,79	Assente
I-V/84/0-50	54,01	45,99	169	85,018	79,221 - 91,248	99,87	0,50	Assente
I-V/84/50-100	64,52	35,48	136	142,815	127,697 - 159,690	99,66	1,05	Assente
I-V/84/100-200	58,96	41,04	154	86,042	84,952 - 87,158	100	0,56	Assente
I-V/85/00-50	31,37	68,63	240	238,848	231,836 - 246,147	99,99	0,99	Assente
I-V/85/50-100	26,51	73,49	255	342,815	273,002 - 430,275	99,06	1,34	Assente
I-V/86/00-50	90,32	9,68	56	46,297	35,758 - 59,955	98,28	0,83	Assente
I-V/86/50-100	86,49	13,51	68	26,029	20,552 - 32,962	98,66	0,38	Assente

Tab. 9 – Risultati del saggio con *V. fischeri* applicato alla fase solida – monitoraggio vasche 2012-2017

Campione	Sabbia < 1mm (%)	Pelite (%)	Soglia Tox Naturale (TU)	Tox Misurata (TU)	Range al 95% di confidenza (TU)	R <sup>2</sup> (%)	S.T.I.	Tossicità
Ve4 (2017)	99,26	0,74	28	0,471	0,075 - 2,946	93,98	0,02	Assente
Ve5 (2017)	96,41	3,59	37	6,251	1,943 - 20,08	82,84	0,17	Assente
Vn1 (2017)	96,63	3,37	36	6,908	6,449 - 7,398	99,94	0,19	Assente
Ve4 (2015)	98,8	1,2	29	15,345	6,482 - 36,299	83,94	0,53	Assente
Ve5 (2015)	92,76	7,24	48	4,294	1,583 - 11,646	82,96	0,09	Assente
Vn1 (2015)	96,28	3,72	37	287,707	271,403 - 305,129	99,88	7,77	Elevata
Ve5 (2014)	98,55	1,45	30	70,552	68,083 - 73,102	99,99	2,36	Assente
Ve4 (2013)	94,04	5,96	44	10,652	8,122 - 13,966	99,25	0,24	Assente
Ve5 (2013)	88,4	11,6	62	7,114	4,361 - 11,609	97,37	0,12	Assente
Vn1 (2013)	93,96	6,04	44	0	0 - 0	0	0	Assente
Ve4 (2012)	88,26	11,74	41	14,32	7,105 - 28,85	89,92	0,35	Assente
Ve5 (2012)	91,46	8,54	30	38,249	24,084 - 65,052	94,85	1,27	Assente
Vn1 (2012)	99,79	0,21	1	11,581	6,412 - 20,916	93,78	11,47	Elevata

### 2.3 Saggio biologico con *Paracentrotus lividus*

In Tabella 10 sono riportati i risultati del saggio di embriotossicità s con il riccio di mare *P. lividus* condotto sull'elutriato ottenuto dal sedimento prelevato nelle stazioni di campionamento eseguite durante la campagna di prelievo del 2019. I risultati del saggio con l'echinoderma relativi al monitoraggio delle vasche di colmata (campagne 2012-2017) sono riportati in Tabella 12. Nelle Tabelle 11 e 13 sono riportati i valori di EC50 con il tossico di riferimento  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .

Tab. 10 - Risultati del saggio biologico con *P. lividus* applicato all'elutriato – campagna deperimetrazione 2019

Campione	Conc.	Repliche			Media	Media malformati	ds	EC	Tossicità
CONT	-	85	86	86	85,67	14,33	0,58	-	
I-V/03/0-50	100	79	81	81	80,33	19,67	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	81	81	80,67	19,33	0,58		
	25	82	81	82	81,67	18,33	0,58		
I-V/06/0-50	100	79	81	81	80,33	19,67	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	80	82	80,67	19,33	1,15		
	25	82	81	82	81,67	18,33	0,58		
I-V/10/0-50	100	80	82	80	80,67	19,33	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	80	83	81,33	18,67	1,53		
	25	83	82	83	82,67	17,33	0,58		
I-V/11/0-50	100	83	81	80	81,33	18,67	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	82	82	83	82,33	17,67	0,58		
	25	83	85	81	83,00	17,00	2,00		
I-V/17/0-50	100	79	80	78	79,00	21,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	83	81	81,67	18,33	1,15		
	25	82	82	84	82,67	17,33	1,15		
I-V/17/50-100	100	78	76	81	78,33	21,67	2,52	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	82	81	81,00	19,00	1,00		
	25	83	84	84	83,67	16,33	0,58		
I-V/17/100-200	100	80	80	81	80,33	19,67	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	83	81	81,33	18,67	1,53		
	25	82	84	84	83,33	16,67	1,15		

Campione	Conc.	Repliche			Media	Media malformati	ds	EC	Tossicità
I-V/23/0-50	100	80	81	80	80,33	19,67	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	82	79	80,67	19,33	1,53		
	25	82	80	82	81,33	18,67	1,15		
I-V/23/50-100	100	82	82	81	81,67	18,33	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	80	83	81,33	18,67	1,53		
	25	82	82	83	82,33	17,67	0,58		
I-V/25/0-50	100	80	82	82	81,33	18,67	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	82	82	81,67	18,33	0,58		
	25	81	82	83	82,00	18,00	1,00		
I-V/25/50-100	100	84	81	82	82,33	17,67	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	83	83	82,33	17,67	1,15		
	25	82	83	82	82,33	17,67	0,58		
I-V/25/300-350	100	79	78	77	78,00	22,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	82	80	80,67	19,33	1,15		
	25	80	81	82	81,00	19,00	1,00		
I-V/27/0-50	100	30	31	33	31,33	68,67	1,53	EC50=70,76 (58,50-85,31)	Alta
	50	62	60	59	60,33	39,67	1,53		
	25	79	79	76	78,00	22,00	1,73		
I-V/27/200-250	100	79	76	77	77,33	22,67	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	80	81	80,33	19,67	0,58		
	25	82	81	82	81,67	18,33	0,58		
I-V/34/0-50	100	83	83	82	82,67	17,33	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	83	81	84	82,67	17,33	1,53		
	25	83	82	84	83,00	17,00	1,00		
I-V/34/50-100	100	36	37	36	36,33	63,67	0,58	EC50=79,27 (64,63-101,44)	Alta
	50	62	65	65	64,00	36,00	1,73		
	25	78	78	75	77,00	23,00	1,73		
I-V/40/0-50	100	76	78	78	77,33	22,67	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	79	78	81	79,33	20,67	1,53		
	25	81	80	81	80,67	19,33	0,58		
I-V/42/0-50	100	40	43	43	42,00	58,00	1,73	EC50=89,99 (79,43-105,48)	Alta
	50	79	80	81	80,00	20,00	1,00		
	25	82	81	82	81,67	18,33	0,58		
I-V/42/50-100	100	45	41	43	43,00	57,00	2,00	EC50=91,28 (80,56-109,97)	Alta
	50	79	80	80	79,67	20,33	0,58		
	25	83	80	81	81,33	18,67	1,53		
I-V/43/0-50	100	78	76	76	76,67	23,33	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	82	81	80	81,00	19,00	1,00		
	25	83	82	83	82,67	17,33	0,58		
I-V/43/50-100	100	40	41	42	41,00	59,00	1,00	EC50=89,48 (78,76-105,12)	Alta
	50	76	79	79	78,00	22,00	1,73		
	25	80	78	81	79,67	20,33	1,53		
I-V/43/100-200	100	80	81	78	79,67	20,33	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	80	81	80,67	19,33	0,58		
	25	81	80	82	81,00	19,00	1,00		
I-V/46/0-50	100	40	37	40	39,00	61,00	1,73	EC50=81,28 (65,29-108,80)	Alta
	50	63	58	62	61,00	39,00	2,65		
	25	78	79	77	78,00	22,00	1,00		
I-V/47/0-50	100	80	82	81	81,00	19,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	83	83	82,33	17,67	1,15		
	25	82	84	82	82,67	17,33	1,15		
I-V/47/50-100	100	79	77	82	79,33	20,67	2,52	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	80	81	80,33	19,67	0,58		
	25	82	83	83	82,67	17,33	0,58		
I-V/51/0-50	100	83	80	81	81,33	18,67	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	83	84	84	83,67	16,33	0,58		
	25	84	83	85	84,00	16,00	1,00		
I-V/52/0-50	100	76	77	79	77,33	22,67	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente

Campione	Conc.	Repliche			Media	Media malformati	ds	EC	Tossicità
I-V/52/200-250	50	80	79	79	79,33	20,67	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	81	80	79	80,00	20,00	1,00		
	100	79	79	80	79,33	20,67	0,58		
I-V/57/0-50	50	81	80	81	80,67	19,33	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	83	80	83	82,00	18,00	1,73		
	100	80	81	82	81,00	19,00	1,00		
I-V/58/0-50	50	81	82	81	81,33	18,67	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	82	84	82	82,67	17,33	1,15		
	100	80	80	77	79,00	21,00	1,73		
I-V/58/50-100	50	79	81	81	80,33	19,67	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	82	79	81	80,67	19,33	1,53		
	100	78	81	78	79,00	21,00	1,73		
I-V/59/0-50	50	80	81	79	80,00	20,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	81	80	81	80,67	19,33	0,58		
	100	40	32	35	35,67	64,33	4,04		
I-V/59/50-100	50	69	65	66	66,67	33,33	2,08	EC50=80,58 (67,56-98,83)	Alta
	25	79	80	80	79,67	20,33	0,58		
	100	83	82	83	82,67	17,33	0,58		
I-V/60/0-50	50	83	83	84	83,33	16,67	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	84	83	84	83,67	16,33	0,58		
	100	2	1	2	1,67	98,33	0,58		
I-V/60/50-100	50	36	35	38	36,33	63,67	1,53	EC50=44,37 (38,02-49,54)	Alta
	25	74	73	75	74,00	26,00	1,00		
	100	11	13	14	12,67	87,33	1,53		
I-V/61/0-50	50	54	54	51	53,00	47,00	1,73	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	78	74	73	75,00	25,00	2,65		
	100	82	81	81	81,33	18,67	0,58		
I-V/61/50-100	50	81	82	82	81,67	18,33	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	83	82	82	82,33	17,67	0,58		
	100	84	81	81	82,00	18,00	1,73		
I-V/62/0-50	50	81	82	84	82,33	17,67	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	82	84	84	83,33	16,67	1,15		
	100	82	84	83	83,00	17,00	1,00		
I-V/62/50-100	50	82	83	84	83,00	17,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	83	83	85	83,67	16,33	1,15		
	100	80	79	82	80,33	19,67	1,53		
I-V/63/0-50	50	81	80	81	80,67	19,33	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	83	82	80	81,67	18,33	1,53		
	100	80	83	83	82,00	18,00	1,73		
I-V/63/50-100	50	82	82	85	83,00	17,00	1,73	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	84	83	83	83,33	16,67	0,58		
	100	78	82	82	80,67	19,33	2,31		
I-V/64/0-50	50	81	80	80	80,33	19,67	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	82	81	83	82,00	18,00	1,00		
	100	81	80	83	81,33	18,67	1,53		
I-V/65/0-50	50	80	82	81	81,00	19,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	25	83	82	81	82,00	18,00	1,00		
	100	25	23	24	24,00	76,00	1,00		
I-V/65/50-100	50	56	52	54	54,00	46,00	2,00	EC50=61,69 (51,62-71,60)	Alta
	25	79	78	80	79,00	21,00	1,00		
	100	13	10	13	12,00	88,00	1,73		
I-V/65/100-200	50	40	37	38	38,33	61,67	1,53	EC50=46,90 (39,67-53,48)	Alta
	25	74	76	75	75,00	25,00	1,00		
	100	30	27	26	27,67	72,33	2,08		
I-V/67/0-50	50	69	65	69	67,67	32,33	2,31	EC50=74,19 (64,49-84,02)	Alta
	25	80	79	80	79,67	20,33	0,58		
	100	40	40	37	39,00	61,00	1,73		
I-V/67/50-100	50	75	78	75	76,00	24,00	1,73	EC50=86,93 (76,39-101,38)	Alta

Campione	Conc.	Repliche			Media	Media malformati	ds	EC	Tossicità
I-V/68/0-50	25	80	81	81	80,67	19,33	0,58	EC50=74,04 (63,79-84,47)	Alta
	100	27	28	28	27,67	72,33	0,58		
	50	68	66	66	66,67	33,33	1,15		
	25	80	77	77	78,00	22,00	1,73		
I-V/68/50-100	100	76	79	79	78,00	22,00	1,73	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	81	81	80,67	19,33	0,58		
	25	82	81	81	81,33	18,67	0,58		
I-V/69/0-50	100	74	74	72	73,33	26,67	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	78	79	78	78,33	21,67	0,58		
	25	80	81	82	81,00	19,00	1,00		
I-V/69/50-100	100	78	76	79	77,67	22,33	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	81	81	80,67	19,33	0,58		
	25	82	80	81	81,00	19,00	1,00		
I-V/69/100-200	100	81	81	82	81,33	18,67	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	83	81	81,67	18,33	1,15		
	25	83	82	83	82,67	17,33	0,58		
I-V/70/0-50	100	80	79	81	80,00	20,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	82	79	80	80,33	19,67	1,53		
	25	82	81	82	81,67	18,33	0,58		
I-V/71/0-50	100	31	33	33	32,33	67,67	1,15	EC50=77,86 (67,21-90,04)	Alta
	50	69	68	70	69,00	31,00	1,00		
	25	80	79	80	79,67	20,33	0,58		
I-V/72/0-50	100	37	33	36	35,33	64,67	2,08	EC50=79,01 (64,12-101,63)	Alta
	50	65	63	66	64,67	35,33	1,53		
	25	80	77	78	78,33	21,67	1,53		
I-V/72/50-100	100	45	44	41	43,33	56,67	2,08	EC50=93,01 (75,35-133,96)	Alta
	50	69	68	69	68,67	31,33	0,58		
	25	80	78	78	78,67	21,33	1,15		
I-V/73/0-50	100	76	78	78	77,33	22,67	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	81	81	80,67	19,33	0,58		
	25	82	81	82	81,67	18,33	0,58		
I-V/74/0-50	100	74	75	76	75,00	25,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	79	80	79,67	20,33	0,58		
	25	81	82	81	81,33	18,67	0,58		
I-V/74/50-100	100	76	79	80	78,33	21,67	2,08	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	81	80	80,67	19,33	0,58		
	25	82	81	83	82,00	18,00	1,00		
I-V/74/100-200	100	0	1	0	0,33	99,67	0,58	EC50=51,64 (47,21-55,86)	Alta
	50	46	46	43	45,00	55,00	1,73		
	25	76	75	76	75,67	24,33	0,58		
I-V/75/0-50	100	21	19	19	19,67	80,33	1,15	EC50=53,25 (44,83-61,22)	Alta
	50	43	42	42	42,33	57,67	0,58		
	25	80	80	79	79,67	20,33	0,58		
I-V/75/50-100	100	79	78	80	79,00	21,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	82	81	82	81,67	18,33	0,58		
	25	84	83	84	83,67	16,33	0,58		
I-V/76/0-50	100	41	43	43	42,33	57,67	1,15	EC50=90,25 (71,15-132,83)	Alta
	50	63	66	66	65,00	35,00	1,73		
	25	78	78	75	77,00	23,00	1,73		
I-V/76/50-100	100	40	42	40	40,67	59,33	1,15	EC50=89,32 (78,14-103,65)	Alta
	50	79	80	80	79,67	20,33	0,58		
	25	81	80	82	81,00	19,00	1,00		
I-V/77/0-50	100	51	56	54	53,67	46,33	2,52	EC50>100	Media
	50	80	78	78	78,67	21,33	1,15		
	25	81	81	82	81,33	18,67	0,58		
I-V/78/0-50	100	82	81	82	81,67	18,33	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	82	83	83	82,67	17,33	0,58		
	25	82	84	83	83,00	17,00	1,00		



Campione	Conc.	Repliche			Media	Media malformati	ds	EC	Tossicità
I-V/78/50-100	100	79	79	81	79,67	20,33	1,15	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	82	81	81,33	18,67	0,58		
	25	83	81	81	81,67	18,33	1,15		
I-V/79/0-50	100	1	2	1	1,33	98,67	0,58	EC50=56,65 (52,32-60,97)	Alta
	50	57	58	59	58,00	42,00	1,00		
	25	80	78	79	79,00	21,00	1,00		
I-V/80/0-50	100	44	46	43	44,33	55,67	1,53	EC50=92,29 (81,45-113,86)	Alta
	50	76	78	80	78,00	22,00	2,00		
	25	81	82	83	82,00	18,00	1,00		
I-V/81/0-50	100	48	51	51	50,00	50,00	1,73	EC50>100	Media
	50	76	78	78	77,33	22,67	1,15		
	25	82	81	83	82,00	18,00	1,00		
I-V/82/0-50	100	4	3	4	3,67	96,33	0,58	EC50=43,75 (37,46-49,19)	Alta
	50	36	34	37	35,67	64,33	1,53		
	25	71	73	74	72,67	27,33	1,53		
I-V/83/0-50	100	32	34	34	33,33	66,67	1,15	EC50=78,43 (67,58-91,28)	Alta
	50	71	70	67	69,33	30,67	2,08		
	25	81	81	80	80,67	19,33	0,58		
I-V/83/50-100	100	81	82	81	81,33	18,67	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	80	83	83	82,00	18,00	1,73		
	25	83	82	83	82,67	17,33	0,58		
I-V/84/0-50	100	56	54	53	54,33	45,67	1,53	EC50>100	Media
	50	76	78	78	77,33	22,67	1,15		
	25	80	81	81	80,67	19,33	0,58		
I-V/84/50-100	100	54	53	56	54,33	45,67	1,53	EC50>100	Media
	50	81	80	80	80,33	19,67	0,58		
	25	82	81	81	81,33	18,67	0,58		
I-V/84/100-200	100	45	46	45	45,33	54,67	0,58	EC50=93,79 (82,34-119,37)	Alta
	50	80	77	77	78,00	22,00	1,73		
	25	81	83	79	81,00	19,00	2,00		
I-V/85/0-50	100	79	80	80	79,67	20,33	0,58	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	81	82	81,33	18,67	0,58		
	25	83	79	83	81,67	18,33	2,31		
I-V/85/50-100	100	74	70	72	72,00	28,00	2,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	79	81	80	80,00	20,00	1,00		
	25	81	83	81	81,67	18,33	1,15		
I-V/86/0-50	100	54	55	57	55,33	44,67	1,53	EC50>100	Media
	50	80	79	81	80,00	20,00	1,00		
	25	81	82	81	81,33	18,67	0,58		
I-V/86/50-100	100	79	78	80	79,00	21,00	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	81	77	79,67	20,33	2,31		
	25	83	81	84	82,67	17,33	1,53		

Tab. 11 - Accettabilità del saggio biologico con *P. lividus* applicato all'elutriato – campagna deperimetrazione 2019

Sostanza tossica di riferimento	Anno	EC50(µg /L)	
		Valore richiesto	Valore registrato
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	2019	22,60 - 68,34	25,55 (22,77 - 27,87)

Tab. 12 - Risultati del saggio biologico con *P. lividus* applicato all'elutriato – monitoraggio vasche 2012-2017

Campione	Conc.	Repliche			Media non normoformati	sd	EC	Tossicità
Ve4 (2017)	100	88	88	87	12,33	0,58	EC50 = 49,89	Alta
	50	85	89	88	12,67	2,08		
	25	85	88	89	12,67	2,08		
Ve5 (2017)	100	85	87	86	14	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente

Campione	Conc.	Repliche			Media non normoformati	sd	EC	Tossicità
	50	89	89	90	10,67	0,58		
	25	89	90	90	10,33	0,58		
Vn1 (2017)	100	71	70	72	29	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	88	89	89	11,33	0,58		
	25	90	87	88	11,67	1,53		
Ve4 (2015)	100	70	69	70	30,33	0,58	EC50=83.662 (70.922-103.179)	Alta
	50	88	86	88	12,67	1,15		
	25	80	82	81	19	1,00		
Ve5 (2015)	100	84	82	85	16,33	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	86	86	84	14,67	1,15		
	25	41	39	39	60,33	1,15		
Vn1 (2015)	100	70	69	69	29,33	2,08	EC50=86.725 (73.335-109.958)	Alta
	50	87	85	85	14,33	1,15		
	25	7	3	4	7	3,00		
Ve5 (2014)	100	50	46	49	50	46,00	EC50=52.69 (46.49-57.75)	Alta
	50	80	79	83	80	79,00		
	25	0	0	0	100	0,00		
Ve4 (2013)	100	36	48	42	58	6,00	EC50= 49,89	Alta
	50	79	82	84	18,33	2,52		
	25	81	80	88	17	4,39		
Ve5 (2013)	100	89	88	87	12	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	84	90	86	13,33	3,06		
	25	80	72	78	23,33	4,17		
Vn1 (2013)	100	80	79	78	21	1,00	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	81	84	82	17,67	1,53		
	25	22	23	20	78	1,53		
Ve4 (2012)	100	30	24	24	74	3,46	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	36	40	40	61	2,31		
	25	37	38	39	62	1,00		
Ve5 (2012)	100	79	80	77	21	1,53	EC20 ≥ 90%	Assente
	50	82	83	81	18	1,00		
	25	0	0	0	100	0,00		
Vn1 (2012)	100	1	2	1	99	0,58	EC50<40	Molto Alta
	50	21	24	24	77	1,73		
	25	70	69	70	30,33	0,58		

Tab. 13 - Accettabilità del saggio biologico con *P. lividus* applicato all'elutriato – monitoraggio vasche 2012-2017

Sostanza tossica di riferimento	Anno	EC50(µg /L)	
		Valore richiesto	Valore registrato
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	2017	22,60 - 68,34	29,67 (26,50 – 33,21)
	2015		52,275 (47,91 – 57,34)
	2014		51,19 (54,46 - 48,04).
	2013		47,91 (45,51 - 50,10)
	2012		44,45 (41,81 - 47,49)

### 3. Bibliografia citata e/o di consultazione

- AA.VV. (2001). Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003). A.M. Cicero & I. Di Girolamo (Eds), Ministero Ambiente e Territorio – ICRAM.
- Aizdaicher NA, Malynova SI, Khristoforova NK (1999) Effect of Detergents on Microalgal Growth. Russ J Mar Biol 25(3): 234-238
- APAT IRSA-CNR (2003) Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida, 29/2003, Vol. Terzo. Metodo 8060: 1043-1049.
- ARPAT (1998) Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico: 191 pp.
- ASTM (1995). Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos- E 1563-95. pp. 1029-1046. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 1029-1046.
- ASTM (2004). Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos- E 1563-98. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Azur Environmental (1995a). Microtox<sup>®</sup> Acute Toxicity Comparison & Inhibition Test, 30 pp.
- Azur Environmental (1995b). Microtox<sup>®</sup> Acute Toxicity Solid-Phase Test, 20 pp.
- Dinnel PA, Link JM, Stober QJ (1987). Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. Arch Environ Contam Toxicol 1987;16:23–32. doi:10.1007/BF01055356.
- Dos Santos MM, Moreno-Garrido I, Gonsalves F (2002) An in situ bioassay for estuarine environments using the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Envir Toxicol Chem 21: 567-574.
- Clementson L. A. and Wayte S. E. (1992). The effects of frozen storage of open-ocean seawater sample on the concentration of dissolved Phosphate and Nitrate. Wat. Res. 26 (9), 1171-1176.
- Clarke K.R., Warwick R.M. (1994). Similarity-based testing for community pattern: the 2-way layout with no replication. Mar. Biol., 118: 167-176.
- Environment Canada (1992). Biological test method: fertilization assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars. Environmental Protection Series. EPS 1/RM/27, Ottawa, Canada.
- Finney L. (1971). Probit Analysis. Cambridge University Press, London, UK.
- Fowler J.E., Cohen L. (1993). Statistica per ornitologi e naturalisti. Franco Muzzio Editore, Padova, pp. 240.

Giuliani S., Ennas C., Pellegrini D., Kozinkova L. (2004) The bioassay with sea urchin *Paracentrotus lividus*: different end-points to be applied to different environmental studies. *Fres Environ Bull* 11(10): 806–809.

Giuliani S., Lera S., Kozinkova L., De Ranieri S., Pellegrini D. (2004) Sensibilità del saggio di fecondazione con gameti di *Paracentrotus lividus* (Lamarck) al variare di alcune condizioni sperimentali. *Biol Mar Medit* 11(2): 330–333.

Hamilton M. A., Russo R. C, Thurston R. V. (1978). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 12, 714-720.

ICRAM-APAT (2007). Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini. (consultabile sul web all'indirizzo [www.isprambiente.it](http://www.isprambiente.it))

ICRAM (2002). Aspetti tecnico-scientifici per la salvaguardia ambientale nelle attività di movimentazione dei fondali marini: dragaggi portuali. Quaderno ICRAM n.1:201 pp.

IRSA (1978) Metodologia di saggio algale per lo studio della contaminazione delle acque marine. IRSA-CNR, Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque n. 39 - IT ISSN 0390-6329. Milano

ISO (2006). Water quality: determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – part 3: method using freeze-dried bacteria. ISO/CD 11348-3.

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

Khristoforova NK, Zhuravel EV, Nedorostkova IG (2001) Contents of detergents and phenols in the surface water near the Tumen River Mouth and Adjacent Areas of Peter the Great Bay. In: Kasyanov VL, Vaschenko MA, Pytruk DL (eds) *The State of Environment and Biota of the Southwestern Part of Peter the Great Bay and the Tumen River Mouth*, v. 2. Dalnauka, Vladivostok, pp 108-121.

Kraynikova AN (1988) Biotesting in the water preservation from pollution. In: *The Methods of Water Biotesting*. Tscernogolovka, pp 4-21 (In Russian).

Lewis MA (1995) Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Envir Pollut* 87:319-336.

Morelli E, Marangi ML, Fantozzi L (2009) A phytochelatinbased bioassay in marine diatoms useful for the assessment of bioavailability of heavy metals released by polluted sediments. *Environ Int* 35:532-538

Moreno-Garrido I, Lubian LM, Blasco J (2007) Sediment toxicity tests involving immobilized microalgae (*Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin). *Envir Int* 33:481-495

Morrone, L., Giuliani, S., Pellegrini, D., Sartori, D. (2018) In situ embryo toxicity test with sea urchin: Development of exposure chamber for test execution. *Chemosphere*. 196: 354–360.

Nash SMB, Quayle PA, Schreiber U, and Müller JF (2005). The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. *Aquat Toxicol* 72:315-326

Okay OS, Morkoc E, Gaines A (1994) Effects of two herbicidal wastewaters on *Chlorella* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*. *Environ Pollut* 119(84):1-6.

Onorati F., Pellegrini D., Ausili A. (1999). Valutazione della tossicità naturale nel saggio Microtox® in fase solida: la normalizzazione pelitica. *Acqua e Aria*, 6, 83-91.

Onorati F., Volpi, Ghirardini A. (2001). Informazioni fornite dalle diverse matrici da testare con i saggi biologici: applicabilità di *Vibrio fischeri*. *Biologia Marina Mediterranea*, 8(2), 41-59

Onorati F., Mecozzi M. (2004). Effects of two diluents in the Microtox® toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere* 54: 679-687.

Pèrés J.M., Picard J. (1964). Nouveau manuel de bionomie benthique de la Mer Méditerranée. *Rec. Trav. Stat. Mar. Endoume*, 31 (47): 5-137.

Picard J. (1965). Recherches qualitatives sur les biocoenoses marines des substrats meubles dragables de la région marseillaise. *Rec. Trav. Stat. Mar. Endoume*, 36 (52): 1-160.

Sartori D. (2013) Echinocoltura: allevamento di *Paracentrotus lividus* a circuito chiuso. Sperimentazioni di diete artificiali per la maturazione sessuale. Ph. D. Thesis, Università degli Studi di Napoli « Federico II », 77pp.

Sartori D., Gaion A., 2015. Can sea urchins benefit from an artificial diet? Physiological and histological assessment for echinoculture feasibility Evaluation. *Aquac. Nutr.* <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12326>.

Sartori D., Scuderi A., Sansone G., Gaion A. (2015) Echinoculture: the rearing of *Paracentrotus lividus* in a recirculating aquaculture system—experiments of artificial diets for the maintenance of sexual maturation. *Aquacult Int* 23:111-125.

Sartori D., Pellegrini D., Macchia S., Gaion A. (2016) Can echinoculture be a feasible and effective activity? Analysis of fast reliable breeding conditions to promote gonadal growth and sexual maturation in *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 451:39-46.

Sartori, D., Pellegrini, D., Gaion, A. (2016). Analysis of variability in Embryological response of two sea urchin species to spatial and temporal features-can these factors influence responses in standardized Ecotoxicological assays? *Expert Opin. Environ. Biol.* <https://doi.org/10.4172/2325-9655.S1-002.S1>.

Sartori, D., Macchia, S., Vitiello, V., Morroni, L., Onorati, F., Pellegrini, D. (2017). Quaderni – Ricerca Marina n. 11/2017. ISPRA. A cura di Macchia, S., Sartori, D., Roma, pp 60.

USACE 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal. Testing Manual USEPA-503-8-90/002: 219 pp.

USEPA (1978). Marine Algal Assay Procedure Bottle Test. National Environmental Research Center, USEPA Corvallis, 43 pp.

USEPA (1988). Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms, Report No. 600/4-87/028. US EPA Cincinnati.

USEPA (1991). Early-Standard Operating Procedure Conducting the Sea Urchin *Arbacia punctulata* Fertilization Test. Environmental Research Laboratory, Narragansett, RI, pp 125-131.

USEPA (1994). Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Marine and Estuarine Organism. 600-4-91-003, Cincinnati, Ohio.

USEPA. Chapman, G.A., Denton, D.L., & Lazorchak, J.M. (1995). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to West Coast marine and estuarine organisms. US. EPA, 600/R-95/136, Cincinnati, Ohio.

Volpi Ghirardini, A., Arizzi Novelli, A., Tagliapietra, D., 2005. Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: echinoidea) fertilization and embryo bioassays. Environ. Int. 31, 1065–1077.

Zhuravel E, Markina Z, Aizdaicher N (2009) Growth and Physiological State of the Microalgae *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin (Bacillariophyta) in the Water taken from Peter the Great Bay. Ocean Sci. J. 44(3):173-179



## **ALLEGATO 2**

# **ANALISI CHIMICHE**

## 1. MATERIALI E METODI

### 1.1 Analisi condotte da ARPAT

Di seguito si illustrano i metodi utilizzati per le analisi eseguite da ARPAT sui campioni di sedimento. L'Agenzia è stata coinvolta dall'AdSP del Mar Tirreno Settentrionale per l'esecuzione di tutte le analisi previste (n. 83 campioni) dal Piano di campionamento finalizzato alla determinazione dei nuovi valori di riferimento del SIN di Livorno secondo il D.D. del MATTM dell'8 giugno 2016.

#### 1.1.1 Metalli ed elementi in traccia

In Tabella 1 sono riportati i metodi di misura per la determinazione dei metalli ed elementi in traccia.

*Tabella 1 – Metodi di misura per metalli ed elementi in traccia*

Parametro	Metodo di misura	Unità di misura	LOQ
<b>CROMO</b>	EPA 3051A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s	-
<b>NICHEL</b>	EPA 3051A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s	-
<b>RAME</b>	EPA 3051A 2007 + EPA 6010D 2018 +EPA 6010D 2018	mg/kg s.s	-
<b>ZINCO</b>	EPA 3051A 2007 + EPA 6010D 2018 +EPA 6010D 2018	mg/kg s.s	-
<b>ARSENICO</b>	EPA 3051A 2007 + EPA 6010D 2018 +EPA 6010D 2018	mg/kg s.s	-
<b>CADMIO</b>	EPA 3051A 2007 + EPA 6010D 2018 +EPA 6010D 2018	mg/kg s.s	0.1
<b>PIOMBO</b>	EPA 3051A 2007 + EPA 6010D 2018 +EPA 6010D 2018	mg/kg s.s	-
<b>VANADIO</b>	EPA 3051A 2007 + EPA 6010D 2018 +EPA 6010D 2018	mg/kg s.s	-
<b>ALLUMINIO</b>	EPA 3051A 2007 + EPA 6010D 2018 +EPA 6010D 2018	mg/kg s.s	-
<b>MERCURIO</b>	EPA 7473 2007	mg/kg s.s	-

#### 1.1.2 Stagno Organico

In Tabella 2 sono riportati i metodi di misura per la determinazione dello stagno organico.

*Tabella 2 – Metodi di misura per Stagno Organico*

Parametro	Metodo di misura	Unità di misura	LOQ
<b>STAGNO ORGANICO</b>	MI/C/AVL.014 Rev.0 2019 (ICP/MS)	µg/kg s.s.	0.1



### 1.1.3 Idrocarburi Policiclici Aromatici

In Tabella 3 sono riportati i metodi di misura per la determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA).

Tabella 3 – Metodi di misura per IPA

Parametro	Metodo di misura	Unità di misura	LOQ
NAFTALENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
FLUORENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
FENANTRENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
ANTRACENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
FLUORANTENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
PIRENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
BENZO [A] ANTRACENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
CRISENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
BENZO[B] FLUORANTENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
BENZO[K] FLUORANTENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
BENZO [A] PIRENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
INDENO [1,2,3-CD] PIRENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
BENZO[GHI]PERILENE	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	5
Σ IPA	EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s.	100

### 1.1.4 PCB

In Tabella 4 sono riportati i metodi di misura per la determinazione dei Policlorobifenili (PCB).

Tabella 4 – Metodi di misura per PCB

Parametro	Abbreviazione	Metodo di misura	Unità di misura	LOQ
3,4,4',5'- TETRACLOROBIFENILE	(PCB-81)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
3,3',4,4'- TETRACLOROBIFENILE	(PCB-77)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
2',3,4,4',5'- PENTACLOROBIFENILE	(PCB-123)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
2,3',4,4',5'- PENTACLOROBIFENILE )	(PCB-118)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
2,3,4,4',5'- PENTACLOROBIFENILE	(PCB-114)	EPA 1668C 2011	µg/kg s.s.	0.0011
2,3,3',4,4'- PENTACLOROBIFENILE )	(PCB-105)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
3,3',4,4',5'- PENTACLOROBIFENILE	(PCB-126)	EPA 1668C 2012	µg/kg s.s.	0.0011
2,3',4,4',5,5'- ESACLOROBIFENILE	(PCB-167)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
2,3,3',4,4',5'- ESACLOROBIFENILE	(PCB-156)	EP 1668C 2013	µg/kg s.s.	0.0011
2,3,3',4,4',5' -ESACLOROBIFENILE )	(PCB-157)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
3,3',4,4',5,5'-ESACLO RO BIFENILE	(PCB-169)	EPA 1668C 2014	µg/kg s.s.	0.0011
2,3,3',4,4',5,5' - EPTACLOROBIFENILE	(PCB-189)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
2,4,4'- TRICLOROBIFENILE	(PCB 28)	EPA 1668C 2016	µg/kg s.s.	0.0011
2,2',5,5'- TETRACLOROBIFENILE	(PCB-52)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
2,2',4,5,5'- PENTACLOROBIFENILE	(PCB-101)	EPA 1668C 2017	µg/kg s.s.	0.0011
2,2',3,3',4,4'- ESACLOROBIFENILE	(PCB-128)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011
2,2',3,4,4',5' - ESACLOROBIFENILE	(PCB-138)	EPA 1668C 2018	µg/kg s.s.	0.0011
2,2',4,4',5,5'- ESACLOROBIFENILE	(PCB-153)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s.	0.0011

Parametro	Abbreviazione	Metodo di misura	Unità di misura	LOQ
<b>2,2',3,4,4',5,5' - EPTACLOROBIFENILE</b>	(PCB-180)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s	0.0011
<b>PCB TOTALI</b>	(WHO-TEQ)	EPA 1668C 2015	µg/kg s.s	0
<b>PCB TOTALI</b>	(Lower Bound)	EPA 1668C 2010	µg/kg s.s	0

### 1.1.5 Organoclorurati (Pesticidi)

In Tabella 5 sono riportati i metodi di misura per la determinazione dei Pesticidi.

*Tabella 5 – Metodi di misura per Pesticidi*

Parametro	Metodo di misura	Unità di misura	LOQ
<b>ESACLOROBENZENE (HCB)</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.1
<b>ESACLORO CICLOESANO - ALFA</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.1
<b>ESACLORO CICLOESANO - BETA</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.1
<b>ESACLORO CICLOESANO - GAMMA (LINDANO)</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2019	µg/kg s.s	0.1
<b>ALDRIN</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.1
<b>DIELDRIN</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2020	µg/kg s.s	0.1
<b>DDD</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.2
<b>DDE</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.2
<b>DICLORODIFENIL TRICLOROETANO (DDT)</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.2
<b>ENDRIN</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.1
<b>EPTACLORO EPOSSIDO</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.1
<b>CLORDANO</b>	UNI EN 15662 2009 + EPA 3535A 2007 + EPA 8270E 2018	µg/kg s.s	0.1

### 1.2 Analisi condotte da ISPRA

Di seguito si illustrano i materiali e metodi utilizzati per le analisi eseguite da ISPRA sui campioni previsti nel piano di monitoraggio delle vasche di colmata negli anni 2012-2017. Nell'applicazione della procedura per la determinazione dei valori di riferimento è stato possibile inserire le analisi di metalli e IPA di tre delle dieci stazioni di monitoraggio (sono state considerate esclusivamente quelle ricadenti nel SIN) per un totale di 13 campioni.

### 1.2.1 Metalli ed elementi in traccia

Il campione (circa 0.3 g s.s.) è stato mineralizzato in bombe in teflon, con l'impiego di un forno a microonde opportunamente programmato (Milestone 1200), mediante l'aggiunta di 3 ml di HNO<sub>3</sub> (65%) e di 1 ml di HCl (30%) ultrapuri. Alla soluzione ottenuta è stata aggiunta una quantità di acqua ultrapura tale da raggiungere il volume finale di 25 ml. La determinazione analitica è stata effettuata mediante l'impiego di Spettrofotometria ad Emissione Ottica (Varian Liberty AX Sequential ICP-OES 720) per tutti i metalli a eccezione del mercurio. Per quest'ultimo le analisi sono state condotte mediante l'utilizzo di Spettroscopia ad Assorbimento Atomico (metodo dei Vapori Freddi; Cetac M-7600). L'accuratezza della metodica è stata valutata impiegando il materiale standard di riferimento LGC 6137 (Promochem), che è stato processato con le stesse modalità dei campioni. Il limite di rilevabilità della metodica e il limite di quantificazione per ogni metallo analizzato è riportato in Tabella 6.

Tabella 6 – Limiti di rilevabilità e di quantificazione

	Al	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	V	Zn
<b>Rilevabilità (mg/l)</b>	0,078	0,0005	0,00004	0,0061	0,0035	0,0004	0,0071	0,0036	0,027	0,1672
<b>Quantificazione (mg/kg)</b>	6,50	0,0441	0,0029	0,512	0,2951	0,0369	0,5907	0,2998	2,2499	13,93

Per la determinazione della sostanza organica si pesano circa 3 g di campione e si lasciano in muffola a 365° per 12 ore. Si effettuano 2 pesate, una prima dell'esposizione in muffola ed una subito dopo e si determina la sostanza organica per sottrazione.

### 1.2.2 Idrocarburi Policiclici Aromatici

La determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) è stata effettuata utilizzando un'aliquota, omogenea del campione, pari a 3 grammi. Al momento della preparazione dei campioni, i sedimenti sono stati addizionati di 5 ml di una soluzione di KOH 0.5 M in metanolo, per l'idrolisi dei lipidi e l'estrazione solido-liquido. I campioni sono stati agitati vigorosamente ed in seguito mantenuti in movimento per una notte intera a 4°C. Il completamento dell'idrolisi della componente lipidica e l'estrazione solido-liquido è stata eseguita mediante microonde a 200W e 55°C per 15 min (Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM). I campioni sono stati centrifugati a 1000×g per 5 min al fine di eliminare il residuo solido e i sovrantanti recuperati in nuovi tubi. Il volume dei campioni è stato ridotto a 0.5 ml mediante una centrifuga evaporante (Speedvack, Juan), a 45°C per 60-120 min.

Infine ai campioni è stato applicato un processo di purificazione e concentrazione attraverso una cromatografia a bassa pressione con resine SPE (estrazione in fase solida) del tipo Backerbond SPE C18

(500mg, 6mL) condizionate con 10 ml di fase mobile (tampone KHCO<sub>3</sub> 10mM in H<sub>2</sub>O ultrapura e metanolo al 10%) e recuperati in fine con 1 ml di acetonitrile puro per HPLC.

Il sistema cromatografico utilizzato è costituito da una pompa HPLC per gradiente binario e un detector in fluorescenza (Perkin Elmer Serie 200 Pump and Fluorescence Detector). La separazione cromatografica è stata eseguita mediante equilibri di ripartizione utilizzando una colonna analitica Supelcosil LC-PAH (LC18 modificata e specifica per l'analisi di idrocarburi policiclici aromatici) da 10 cm di lunghezza, 4.6 mm di diametro interno e particelle da 3µm di diametro. L'analisi è stata condotta mediante gradiente dinamico utilizzando acqua ultrapura e acetonitrile come fasi mobili. Il gradiente utilizzato è il seguente: acqua 40% e acetonitrile 60% per 2 min; acetonitrile dal 60% al 100% con gradiente lineare per 10 min; acetonitrile 100% per 5 min; acetonitrile dal 100% al 60% con gradiente lineare per 2 min; acqua 40% e acetonitrile 60% per 6 min (ricondizionamento). La durata complessiva dell'analisi è di 25 minuti.

La misurazione dei segnali è stata eseguita in fluorescenza modulando nel tempo le coppie di lunghezza d'onda applicate in eccitazione ed emissione secondo il seguente programma: 0 min, E<sub>c</sub>=280nm, E<sub>m</sub>=330nm; 6 min, E<sub>c</sub>=250nm, E<sub>m</sub>=370nm; 8 min, E<sub>c</sub>=280nm, E<sub>m</sub>=450nm; 9 min, E<sub>c</sub>=265nm, E<sub>m</sub>=380nm; 13 min, E<sub>c</sub>=290nm, E<sub>m</sub>=410nm; 25 min, E<sub>c</sub>=280nm, E<sub>m</sub>=330nm.

Il volume di campione iniettato è pari a 20µl ed è garantito costante per tutte le analisi utilizzando un loop a volume noto, montato su una valvola di iniezione. 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). L'accuratezza della procedura analitica e l'efficienza dell'estrazione e preparazione dei campioni è stata controllata attraverso la stima del recupero degli analiti ricercati in appropriate matrici certificate standard (SRM-NIST 2977; SRM-NIST 1944). Gli analiti determinati mediante il metodo appena descritto possono essere classificati in IPA a basso peso molecolare (naftalene, 1-metil naftalene, 2-metil naftalene, acenaftene, fluorene, fenantrene ed antracene) e IPA ad alto peso molecolare (fluorantrene, pirene, benzo[a]antracene, crisene, 7,12-dimetil benzo[a]antracene, benzo[b]fluorantrene, benzo[k]fluorantrene, benzo[a]pirene, dibenzo[a,h]antracene, benzo[g,h,i]perilene, indeno(1,2,3-cd)pirene).

## 2. Risultati

### 2.1 Metalli e elementi in traccia

#### 2.1.1 Metalli analizzati da ARPAT

In Tabella 7 sono presentati i risultati delle analisi di metalli ed elementi in traccia effettuate dall'ARPAT.

*Tab. 7 - Risultati delle analisi dei metalli (mg/kg s.s.) nei sedimenti prelevati nella fase I.*

Campioni	CROMO	NICHEL	RAME	ZINCO	ARSENICO	CADMIO	PIOMBO	VANADIO	ALLUMINIO	MERCURIO
I-V/3/0-50	56	35	15	38	20	0.1	6.7	41	13138	0.05
I-V/06/0-50	51	42	25	227	24	0.2	13	36	14488	0.04
I-V/10/0-50	68	56	48	118	10	0.7	43	41	26922	0.18
I-V/11/0-50	45	33	35	153	10	0.6	47	25	11046	0.25
I-V/17/0-50	45	35	11	55	9.9	0.2	9.7	24	9122	0.03
I-V/17/50-100	47	38	17	99	11	0.7	29	27	11190	0.1
I-V/17/100-200	59	46	26	101	12	0.6	39	33	14422	0.09
I-V/23/0-50	61	52	22	64	10	0.2	13	33	15952	0.08
I-V/23/50-100	75	58	24	67	11	0.2	12	49	23818	0.06
I-V/25/0-50	63	51	23	62	15	0.2	13	44	20880	0.06
I-V/25/50-100	69	54	25	63	25	0.2	12	55	26890	0.06
I-V/25/300-350	41	34	11	32	24	0.1	5.3	46	11727	0.03
I-V/27/0-50	71	58	26	62	25	0.2	11	66	29965	0.05
I-V/27/200-250	37	23	8	24	13	0.1	3.9	27	8683	0.02
I-V/34/0-50	53	41	10	59	14	0.1	9.4	30	12002	0.02
I-V/34/50-100	34	25	9	28	11	0.1	4.6	25	9511	0.02
I-V/40/0-50	33	18	6	25	9.1	0.2	3.9	18	6159	0.02
I-V/42/0-50	49	33	12	63	8.1	0.1	37	24	10846	0.1
I-V/42/50-100	51	39	11	45	11	0.1	9.7	27	12235	0.07
I-V/43/0-50	56	39	17	85	13	0.6	39	30	13237	0.12
I-V/43/50-100	71	56	30	98	19	0.5	21	45	23372	0.11
I-V/43/100-200	36	28	15	96	10	0.9	40	25	11409	0.1
I-V/46/0-50	40	31	13	34	22	0.1	4	48	12311	0.03
I-V/47/0-50	51	34	11	63	9.6	0.1	8.8	26	9204	0.05

Campioni	CROMO	NICHEL	RAME	ZINCO	ARSENICO	CADMIO	PIOMBO	VANADIO	ALLUMINIO	MERCURIO
I-V/47/50-100	50	39	8.9	63	10	0.1	11	25	9741	0.04
I-V/51/0-50	76	65	45	99	12	0.1	33	50	40567	0.33
I-V/52/0-50	65	50	37	60	11	0.1	246	50	21501	0.05
I-V/52/200-250	48	38	15	40	25	0.1	7.2	50	14958	0.05
I-V/57/0-50	15	25	9.6	33	17	0.1	10	15	3780	0.03
I-V/58/0-50	98	76	31	88	11	0.1	14	65	34465	0.05
I-V/58/50-100	61	45	19	51	17	0.1	7	48	19687	0.9
I-V/59/0-50	44	32	15	48	15	0.1	10	38	13704	0.05
I-V/60/0-50	33	24	12	35	15	0.1	6.6	28	9762	0.07
I-V/60/50-100	25	16	7.1	19	13	0.1	1.9	21	6705	0.04
I-V/61/0-50	58	41	11	61	11	0.1	8.3	31	11887	0.05
I-V/61/50-100	58	42	21	74	9.2	0.1	22	33	13492	0.14
I-V/62/0-50	48	35	26	103	11	0.7	35	25	11569	0.18
I-V/62/50-100	46	34	28	175	11	0.9	40	26	11965	0.2
I-V/63/0-50	52	35	28	85	9.2	0.3	38	30	12573	0.2
I-V/63/50-100	73	53	55	165	15	1.4	72	46	22495	0.35
I-V/64/0-50	40	28	13	54	8.5	0.2	58	21	9011	0.12
I-V/65/0-50	58	47	154	410	18	2.9	140	40	18716	1.36
I-V/65/50-100	49	44	52	193	12	0.8	50	33	16115	0.21
I-V/65/100-200	56	39	136	191	17	0.8	86	33	15181	1.65
I-V/67/0-50	30	20	11	40	21	0.1	12	21	7938	0.08
I-V/67/50-100	34	30	7.9	26	11	0.1	5.9	24	9681	0.03
I-V/68/50-100	47	37	14	51	8.8	0.1	10	28	14264	0.1
I-V/69/0-50	19	12	17	25	11	0.1	4.2	16	5619	0.03
I-V/69/50-100	58	39	14	40	16	0.1	6.9	45	22331	0.03
I-V/69/100-200	83	64	18	63	15	0.1	10	75	33137	0.08
I-V/70/0-50	48	33	18	56	9	0.2	12	23	9824	0.08
I-V/71/0-50	51	38	14	47	11	0.1	10	27	12567	0.08
I-V/71/50-100	46	35	12	61	7.1	0.1	7.9	25	9703	0.07
I-V/71/100-200	28	18	6.7	19	14	0.1	4.4	19	5469	0.01
I-V/71/200-400	27	15	4.9	21	1	0.1	1.1	7.3	4293	0.09
I-V/71/400-500	34	16	5.5	26	2	0.1	0.7	8.2	4595	0.05
I-V/72/0-50	54	43	18	67	18	0.3	15	33	15810	0.1
I-V/72/50-100	53	40	33	276	14	5.5	122	33	15234	0.25
I-V/73/0-50	54	42	18	62	15	0.4	17	33	15847	0.07
I-V/74/0-50	55	44	27	90	13	0.4	34	34	16603	0.47

Campioni	CROMO	NICHEL	RAME	ZINCO	ARSENICO	CADMIO	PIOMBO	VANADIO	ALLUMINIO	MERCURIO
I-V/74/50-100	38	26	10	57	8.6	0.4	16	20	9029	0.06
I-V/74/100-200	49	38	19	81	10	0.5	24	25	11696	0.11
I-V/75/0-50	33	26	12	34	12	0.1	7.7	27	11035	0.03
I-V/75/50-100	32	20	11	27	21	0.2	5.6	27	10824	0.03
I-V/76/0-50	72	51	26	66	17	0.2	15	51	21414	0.07
I-V/76/50-100	52	44	19	59	20	0.2	9.5	47	17472	0.04
I-V/77/0-50	43	33	11	39	12	0.1	4	30	11375	0.01
I-V/78/0-50	36	26	11	32	9.3	0.1	6.3	28	10938	0.03
I-V/78/50-100	45	45	11	48	11	0.1	9.9	23	10183	0.04
I-V/79/0-50	47	33	14	36	18	0.1	27	32	11808	0.03
I-V/80/0-50	52	39	13	43	11	0.1	6.8	31	15434	0.04
I-V/81/0-50	31	31	26	35	31	0.1	8	20	8968	0.04
I-V/82/0-50	57	42	17	54	15	0.1	9.4	35	17351	0.07
I-V/83/0-50	44	31	12	37	19	0.1	8.2	29	11277	0.03
I-V/83/50-100	41	27	11	35	17	0.1	9.6	28	10057	0.07
I-V/84/0-50	33	20	7.9	31	17	0.1	7.7	20	7558	0.06
I-V/84/50-100	37	23	8.3	33	13	0.1	8.9	18	7924	0.08
I-V/84/100-200	43	33	19	212	7.9	0.7	32	25	11386	0.12
I-V/85/0-50	64	51	35	114	16	0.8	37	39	18995	0.27
I-V/85/50-100	76	59	21	69	12	0.1	12	40	19750	0.08
I-V/86/0-50	37	22	8.1	150	6.4	0.1	14	15	6210	0.21
I-V/86/50-100	40	27	6.9	33	27	0.1	7.4	26	7108	0.04

### 2.1.2 Metalli ed elementi in traccia analizzati da ISPRA

In Tabella 8 sono presentati i risultati delle analisi di metalli ed elementi in traccia effettuate da ISPRA durante le campagne di monitoraggio 2012-1017 presso le vasche di colmata.

*Tab. 8 - Risultati delle analisi dei metalli (mg/kg s.s.) nei sedimenti prelevati presso le Vasche di colmata negli anni sotto indicati*

<b>Campione</b>	<b>CROMO</b>	<b>NICHEL</b>	<b>RAME</b>	<b>ZINCO</b>	<b>ARSENICO</b>	<b>CADMIO</b>	<b>PIOMBO</b>	<b>ALLUMINIO</b>	<b>MERCURIO</b>
<b>Ve5 (2017)</b>	38.880	32.800	7.630	53.700	9.210	0.090	8.360	8681.000	0.514
<b>Ve4 (2012)</b>	29.490	30.795	12.670	54.910	30.860	0.195	9.470	6707.000	0.029
<b>Ve4 (2013)</b>	45.250	35.000	21.100	80.600	8.330	0.090	11.560	3935.000	0.163
<b>Ve4 (2015)</b>	40.800	34.500	5.800	59.300	6.500	0.013	11.600	7000.000	0.001
<b>Ve5 (2012)</b>	42.280	35.670	11.630	52.050	48.800	0.132	8.700	9557.000	0.039
<b>Ve5 (2013)</b>	73.520	54.140	9.170	81.500	13.900	0.080	7.780	6871.000	0.040
<b>Ve5 (2014)</b>	17.230	15.270	11.890	53.710	3.790	0.070	15.040	3064.000	0.160
<b>Ve5 (2015)</b>	39.200	38.200	7.600	79.700	7.600	0.013	13.800	7520.000	0.001
<b>Vn 1 (2017)</b>	32.460	27.650	4.980	36.400	9.930	0.140	6.470	6326.000	0.014
<b>Vn1 (2012)</b>	8.380	17.230	6.120	37.100	70.980	0.314	8.320	3016.000	0.035
<b>Vn1 (2013)</b>	40.550	24.080	3.660	55.500	10.240	0.070	5.400	3375.000	0.028
<b>Vn1 (2015)</b>	60.700	65.400	23.200	64.900	20.700	0.274	8.800	14888.000	0.001



## 2.2 Stagno Organico

In Tabella 9 sono presentati i risultati delle analisi dello stagno organico effettuate dall'ARPAT.

*Tab. 9 - Risultati delle analisi dello stagno Organico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.s.)  
nei sedimenti prelevati nella fase I*

Campioni	STAGNO ORGANICO
I-V/3/0-50	1.7
I-V/06/0-50	1
I-V/10/0-50	3.8
I-V/11/0-50	1
I-V/17/0-50	1.1
I-V/17/50-100	1
I-V/17/100-200	1
I-V/23/0-50	1
I-V/23/50-100	1
I-V/25/0-50	1
I-V/25/50-100	1
I-V/25/300-350	1
I-V/27/0-50	1
I-V/27/200-250	4.3
I-V/34/0-50	1
I-V/34/50-100	4.6
I-V/40/0-50	1
I-V/42/0-50	3
I-V/42/50-100	2.4
I-V/43/0-50	1.3
I-V/43/50-100	1
I-V/43/100-200	1.3
I-V/46/0-50	1.3
I-V/47/0-50	1
I-V/47/50-100	1
I-V/51/0-50	1
I-V/52/0-50	1
I-V/52/200-250	1
I-V/57/0-50	2.1
I-V/58/0-50	1
I-V/58/50-100	1.2
I-V/59/0-50	1.1
I-V/60/0-50	1.1
I-V/60/50-100	1
I-V/61/0-50	1
I-V/61/50-100	1
I-V/62/0-50	1.3
I-V/62/50-100	1
I-V/63/0-50	1.6
I-V/63/50-100	1
I-V/64/0-50	1.9
I-V/65/0-50	1
I-V/65/50-100	1
I-V/65/100-200	1
I-V/67/0-50	1.9
I-V/67/50-100	1.4
I-V/68/0-50	1
I-V/68/50-100	1.6

<b>Campioni</b>	<b>STAGNO ORGANICO</b>
I-V/69/0-50	1.2
I-V/69/50-100	1.5
I-V/69/100-200	6.8
I-V/70/0-50	1.6
I-V/71/0-50	1.1
I-V/71/50-100	1.3
I-V/71/100-200	2.7
I-V/71/200-400	1.5
I-V/71/400-500	1
I-V/72/0-50	8.3
I-V/72/50-100	1
I-V/73/0-50	6.6
I-V/74/0-50	1.6
I-V/74/50-100	4.4
I-V/74/100-200	1.3
I-V/75/0-50	1
I-V/75/50-100	5.7
I-V/76/0-50	2.5
I-V/76/50-100	1
I-V/77/0-50	1.2
I-V/78/0-50	1.6
I-V/78/50-100	2.5
I-V/79/0-50	1.2
I-V/80/0-50	2
I-V/81/0-50	2.2
I-V/82/0-50	2
I-V/83/0-50	1.8
I-V/83/50-100	2.1
I-V/84/0-50	4.4
I-V/84/50-100	1.7
I-V/84/100-200	1.3
I-V/85/0-50	1.1
I-V/85/50-100	1.2
I-V/86/0-50	1
I-V/86/50-100	1.8

## 2.3 IPA

### 2.3.1 IPA individuati da ARPAT

In Tabella 10 sono presentati i risultati delle analisi degli Idrocarburi Policiclici Aromatici effettuate dall'ARPAT.

Tab. 10 - Risultati delle analisi degli IPA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.s.) nei sedimenti prelevati nella fase I

Campione	NAFTALENE	FLUORENE	FENANTRENE	ANTRACENE	FLUORANTENE	PIRENE	BENZO [A] ANTRACENE	CRISENE	BENZO[B] FLUORANTENE	BENZO[K] FLUORANTENE	BENZO [A] PIRENE	INDENO [1,2,3-CD] PIRENE	BENZO[GHI]PERILENE	$\Sigma$ IPA
I-V/3/0-50	5	5	5	5	9	6	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/06/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/10/0-50	330	260	1200	570	8100	5200	1000	930	400	120	290	91	260	19000
I-V/11/0-50	780	220	2000	290	2100	1700	360	480	400	120	350	150	570	9800
I-V/17/0-50	5	5	6	5	21	25	7	7	9	5	7	5	5	100
I-V/17/50-100	5	5	12	7	80	36	24	26	26	18	27	10	5	270
I-V/17/100-200	28	15	220	38	390	470	140	180	210	61	200	89	360	2500
I-V/23/0-50	5	5	12	5	20	21	10	11	13	6	10	6	8	120
I-V/23/50-100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/25/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/25/50-100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/25/300-350	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/27/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/27/200-250	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/34/0-50	5	5	37	15	140	140	50	64	48	27	57	24	33	630
I-V/34/50-100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/40/0-50	7	6	62	13	73	45	20	22	12	7	13	5	6	290
I-V/42/0-50	5	8	44	16	73	60	37	44	57	26	44	14	20	450
I-V/42/50-100	5	5	12	5	10	8	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/43/0-50	5	5	7	5	19	19	7	8	16	8	7	14	5	110



Campione	NAFTALENE	FLUORENE	FENANTRENE	ANTRACENE	FLUORANTENE	PIRENE	BENZO [A] ANTRACENE	CRISENE	BENZO[B] FLUORANTENE	BENZO[K] FLUORANTENE	BENZO [A] PIRENE	INDENO [1,2,3-CD] PIRENE	BENZO[GHI]PERILENE	Σ IPA
I-V/70/0-50	5	5	5	5	13	10	6	9	12	6	11	5	7	100
I-V/71/0-50	5	5	5	5	5	7	10	5	5	5	5	5	5	100
I-V/71/50-100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/71/100-200	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/71/200-400	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/71/400-500	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/72/0-50	5	5	8	5	15	11	9	8	6	5	7	5	5	100
I-V/72/50-100	37	16	120	41	300	230	120	130	150	69	140	65	78	1600
I-V/73/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/74/0-50	5	5	23	6	51	81	21	24	26	14	25	10	13	300
I-V/74/50-100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/74/100-200	5	5	7	5	19	21	8	9	16	8	14	6	7	110
I-V/75/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/75/50-100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/76/0-50	6	5	5	5	19	23	10	10	9	5	8	5	5	100
I-V/76/50-100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/77/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/78/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/78/50-100	5	12	230	67	400	320	160	160	9	60	130	61	60	1700
I-V/79/0-50	5	5	5	5	8	14	9	19	40	21	45	23	26	220
I-V/80/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/81/0-50	5	5	14	6	24	23	15	18	28	15	25	18	22	210
I-V/82/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/83/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/83/50-100	5	5	5	5	19	19	14	11	12	6	12	6	6	110
I-V/84/0-50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/84/50-100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
I-V/84/100-200	5	5	10	5	35	35	18	22	23	11	18	10	9	190
I-V/85/0-50	5	5	7	5	17	50	9	10	19	10	16	7	9	150
I-V/85/50-100	5	5	5	5	6	13	9	11	14	11	12	10	9	100
I-V/86/0-50	17	12	100	51	310	300	140	190	280	150	270	140	170	2200

Campione	NAFTALENE	FLUORENE	FENANTRENE	ANTRACENE	FLUORANTENE	PIRENE	BENZO [A] ANTRACENE	CRISENE	BENZO[B] FLUORANTENE	BENZO[K] FLUORANTENE	BENZO [A] PIRENE	INDENO [1,2,3-CD] PIRENE	BENZO[GHI]PERILENE	Σ IPA
I-V/86/50-100	5	5	30	6	39	32	20	20	21	12	22	9	10	220

### 2.3.2 IPA analizzati da ISPRA

In Tabella 11 sono presentati i risultati delle analisi degli Idrocarburi Policiclici Aromatici effettuate da ISPRA durante le campagne di monitoraggio 2012-2017 presso le Vasche di colmata di Livorno.

Tab.11 - Risultati delle analisi degli IPA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.s.) nei sedimenti

Campione	NAFTALENE	FLUORENE	FENANTRENE	ANTRACENE	FLUORANTENE	PIRENE	BENZO [A] ANTRACENE	CRISENE	BENZO[B] FLUORANTENE	BENZO[K] FLUORANTENE	BENZO [A] PIRENE	INDENO [1,2,3-CD] PIRENE	BENZO[GHI]PERILENE	Σ IPA
Ve4 (2017)	0.500	0.050	0.050	6.550	4.150	60.660	0.050	3.460	15.710	13.050	7.880	0.005	0.508	278.400
Ve5 (2017)	9.810	0.439	1.400	0.050	0.534	0.144	0.108	0.050	0.304	0.198	0.113	0.005	0.059	16.400
Ve4 (2012)	40.518	17.011	21.715	0.050	0.050	1.409	0.025	0.025	2.519	1.798	0.025	0.508	0.025	195.200
Ve4 (2013)	1.990	0.568	2.260	0.250	0.050	1.390	0.050	0.144	4.010	2.920	0.005	0.055	0.005	24.100
Ve4 (2015)	24.404	2.606	7.490	0.254	5.850	2.091	0.050	0.380	0.137	0.217	0.050	0.025	0.025	88.240
Ve5 (2012)	41.934	22.961	28.657	0.050	0.050	1.210	0.025	0.025	0.179	1.254	0.025	0.025	0.025	143.970
Ve5 (2013)	59.800	6.230	2.080	0.250	0.050	0.338	0.050	0.005	0.605	0.335	0.005	0.005	0.005	250.700
Ve5 (2014)	23.988	0.050	0.050	0.050	0.945	2.945	0.050	0.050	0.025	1.340	0.906	0.025	0.025	69.206
Ve5 (2015)	21.989	1.477	6.506	0.177	3.207	0.736	0.050	0.050	0.059	0.072	0.025	0.025	0.025	73.420
Vn1 (2017)	31.230	0.871	1.350	1.540	9.998	0.250	0.250	0.050	0.345	0.653	0.443	0.287	0.234	149.900
Vn1 (2012)	25.133	11.449	14.847	0.343	1.106	0.414	0.025	0.262	0.466	0.182	0.025	0.025	0.025	117.580
Vn1 (2013)	18.600	9.170	11.360	0.250	0.050	0.267	0.050	0.050	0.248	0.157	0.005	0.005	0.005	106.100
Vn1 (2015)	29.388	2.528	0.972	0.050	1.386	0.775	0.050	0.050	0.086	0.085	0.025	0.025	0.025	83.430

## 2.4 PCB

Nelle Tabelle 12/a e 12/b sono presentati i risultati delle analisi dei PCB sui sedimenti analizzati dall'ARPAT.

*Tab. 12/a - Risultati delle analisi dei PCB ( $\mu\text{g}/\text{kg s.s.}$ ) nei sedimenti prelevati nella fase I*

Campione	PCB-81	PCB-77	PCB-123	PCB-118	PCB-114	PCB-105	PCB-126	PCB-167	PCB-156	PCB-157	PCB-169	PCB-189	$\Sigma\text{PCB}$ (WHO-TEQ)
I-V/3/0-50	0.0011	0.0011	0.0011	0.016	0.0011	0.0011	0.0022	0.0011	0.0025	0.0019	0.0011	0.0011	0.23
I-V/10/0-50	0.0012	0.0012	0.0012	0.8	0.019	0.3	0.0012	0.024	0.061	0.0012	0.0012	0.0012	0.036
I-V/23/50-100	0.0012	0.0022	0.0012	0.061	0.0012	0.011	0.0012	0.0036	0.0056	0.0012	0.0012	0.0012	0.0047
I-V/25/0-50	0.0011	0.033	0.0011	0.12	0.0011	0.024	0.0053	0.0061	0.0076	0.0011	0.0011	0.0011	0.53
I-V/25/50-100	0.0011	0.021	0.0011	0.085	0.0011	0.015	0.0032	0.0011	0.005	0.0011	0.0011	0.0011	0.33
I-V/27/0-50	0.0013	0.033	0.0013	0.14	0.0013	0.018	0.005	0.0058	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.51
I-V/42/0-50	0.0013	0.027	0.017	1.2	0.0089	0.24	0.0013	0.057	0.099	0.026	0.0013	0.0076	0.054
I-V/43/50-100	0.0013	0.0035	0.0013	0.043	0.0013	0.011	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.002
I-V/51/0-50	0.0011	0.0011	0.0011	0.016	0.0011	0.0011	0.0022	0.0011	0.0025	0.0019	0.0011	0.0011	0.23
I-V/61/50-100	0.0011	0.012	0.004	0.34	0.0036	0.097	0.0011	0.017	0.041	0.0043	0.0011	0.0011	0.017
I-V/62/50-100	0.0012	0.014	0.0012	0.066	0.0093	0.026	0.0012	0.074	0.17	0.03	0.0012	0.0091	0.037
I-V/63/50-100	0.0012	0.0012	0.0012	0.44	0.0012	0.1	0.0012	0.0012	0.061	0.0012	0.0012	0.0012	0.018
I-V/65/0-50	0.0022	0.037	0.047	3.6	0.045	1	0.0011	0.28	0.51	0.06	0.0011	0.0011	0.17
I-V/65/50-100	0.0013	0.0013	0.0024	0.43	0.0013	0.13	0.0013	0.0013	0.051	0.0013	0.0013	0.0013	0.019
I-V/68/0-50	0.0013	0.0013	0.0013	0.036	0.0013	0.01	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.0014
I-V/68/50-100	0.0012	0.003	0.0021	0.18	0.0012	0.028	0.0012	0.0059	0.0093	0.0012	0.0012	0.0012	0.0071
I-V/71/50-100	0.0012	0.0017	0.0012	0.052	0.0012	0.0069	0.0012	0.0016	0.0039	0.0012	0.0012	0.0012	0.0021
I-V/71/100-200	0.0012	0.0012	0.0012	0.012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0004
I-V/72/50-100	0.0012	0.01	0.0012	0.43	0.0012	0.084	0.0012	0.019	0.05	0.0066	0.0012	0.0012	0.019
I-V/73/0-50	0.0012	0.0067	0.0012	0.11	0.0012	0.022	0.0012	0.0042	0.0064	0.0012	0.0012	0.0012	0.0048
I-V/76/0-50	0.0013	0.002	0.0013	0.054	0.0013	0.0059	0.0013	0.0013	0.0051	0.0013	0.0013	0.0013	0.0021

Campione	PCB-81	PCB-77	PCB-123	PCB-118	PCB-114	PCB-105	PCB-126	PCB-167	PCB-156	PCB-157	PCB-169	PCB-189	ΣPCB (WHO- TEQ)
I-V/76/50-100	0.0012	0.0012	0.0012	0.0072	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0
I-V/82/0-50	0.0013	0.013	0.0024	0.21	0.0013	0.0067	0.0013	0.0064	0.017	0.0042	0.0013	0.0013	0.011
I-V/83/0-50	0.0013	0.016	0.0013	0.19	0.0013	0.024	0.0013	0.011	0.018	0.0027	0.0013	0.0013	0.009
I-V/84/100-200	0.0012	0.016	0.0012	0.19	0.0012	0.024	0.0012	0.011	0.018	0.0027	0.0012	0.0012	0.000009
I-V/85/0-50	0.0012	0.017	0.0012	1.1	0.0012	0.2	0.0012	0.055	0.11	0.025	0.0012	0.0012	0.047
I-V/85/50-100	0.0012	0.0012	0.0012	0.42	0.0012	0.089	0.0012	0.023	0.051	0.0012	0.0012	0.0012	0.018

Tab. 12/ b - Risultati delle analisi dei PCB ( $\mu\text{g}/\text{kg s.s.}$ ) nei sedimenti prelevati nella fase I

Campione	ΣPCB (Lower Bound)	PCB 28	PCB-52	PCB-101	PCB-128	PCB-138	PCB-153	PCB-180
I-V/3/0-50	0.16	0.017	0.02	0.025	0.031	0.037	0.01	0.0011
I-V/10/0-50	3.4	0.018	0.24	0.51	0.62	0.64	0.38	0.11
I-V/23/50-100	0.63	0.046	0.071	0.082	0.14	0.15	0.043	0.014
I-V/25/0-50	1.1	0.08	0.12	0.15	0.22	0.24	0.052	0.019
I-V/25/50-100	0.68	0.061	0.097	0.01	0.14	0.13	0.025	0.011
I-V/27/0-50	1.1	0.1	0.16	0.16	0.2	0.21	0.043	0.018
I-V/42/0-50	6.7	0.11	0.61	1.3	0.89	1.6	0.64	0.22
I-V/43/50-100	0.35	0.033	0.05	0.057	0.046	0.075	0.029	0.0074
I-V/51/0-50	0.16	0.017	0.02	0.025	0.031	0.037	0.01	0.0011
I-V/61/50-100	2	0.12	0.17	0.28	0.38	0.41	0.12	0.066
I-V/62/50-100	5.8	0.16	0.49	0.65	1.4	1.1	0.9	0.21
I-V/63/50-100	3.1	0.019	0.15	0.38	0.55	0.82	0.52	0.12
I-V/65/0-50	35	0.13	1.9	3.2	5.3	11	8.2	1.1
I-V/65/50-100	2.5	0.0099	0.27	0.33	0.48	0.53	0.35	0.066
I-V/68/0-50	0.28	0.022	0.03	0.042	0.049	0.064	0.029	0.0074
I-V/68/50-100	1.1	0.041	0.17	0.18	0.15	0.22	0.1	0.019



Campione	ΣPCB (Lower Bound)	PCB 28	PCB-52	PCB-101	PCB-128	PCB-138	PCB-153	PCB-180
I-V/71/50-100	0.33	0.0075	0.063	0.056	0.0047	0.041	0.085	0.019
I-V/71/100-200	0.075	0.0027	0.013	0.012	0.0012	0.0056	0.03	0.0012
I-V/72/50-100	3.1	0.038	0.17	0.52	0.44	0.88	0.46	0.08
I-V/73/0-50	0.68	0.039	0.14	0.13	0.084	0.11	0.036	0.012
I-V/76/0-50	0.34	0.011	0.037	0.049	0.053	0.092	0.026	0.012
I-V/76/50-100	0.036	0.0042	0.007	0.0079	0.0047	0.012	0.0012	0.0012
I-V/82/0-50	1.4	0.13	0.32	0.23	0.15	0.19	0.069	0.026
I-V/83/0-50	1.4	0.025	0.2	0.2	0.22	0.33	0.13	0.032
I-V/84/100-200	1.36	0.025	0.2	0.2	0.032	0.22	0.33	0.13
I-V/85/0-50	6.5	0.056	0.45	0.99	1	1.6	0.87	0.22
I-V/85/50-100	3.4	0.055	0.42	0.44	0.45	0.9	0.59	0.078

**Nota:** I PCB in tabella sono stati abbreviati. Per prendere visione della nomenclatura completa si veda la tabella al paragrafo 1.1.4

## 2.5 Organoclorurati (Pesticidi)

In Tabella 13 sono presentati i risultati delle analisi dei pesticidi organoclorurati sui sedimenti analizzati dall'ARPAT.

Tab. 13 - Risultati delle analisi dei pesticidi ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.s.) nei sedimenti prelevati nella fase I

Campione	ESACLOROBENZE (HCB)	ESACLOROCICLOESANO -ALFA	ESACLOROCICLOESANO-BETA	ESACLOROCICLOESANOGAMMA (LINDANO)	ALDRIN	DIELDRIN	DDD	DDE	DICLORODIFENILTRICLOROETANO (DDT)	ENDRIN	EPTACLORO EPOSSIDO	CLORDANO
I-V/10/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1.2	1.4	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/23/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.35	0.14	0.1	0.1	0.1
I-V/25/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.59	0.56	0.1	0.1	0.1
I-V/25/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.36	0.28	0.1	0.1	0.1
I-V/27/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.5	0.4	0.1	0.1	0.1
I-V/42/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/43/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/51/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/61/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/62/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/63/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.53	0.7	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/65/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.9	1.6	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/65/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	1.6	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/68/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/68/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/71/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1
I-V/71/100-200	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/72/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.84	0.53	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/73/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/76/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/76/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1

Campione	ESACLOROBENZE (HCB)	ESACLOROCICLOESANO -ALFA	ESACLOROCICLOESANO-BETA	ESACLOROCICLOESANOGAMMA (LINDANO)	ALDRIN	DIELDRIN	DDD	DDE	DICLORODIFENILTRICLOROE TANO (DDT)	ENDRIN	EPTACLORO EPOSSIDO	CLORDANO
I-V/82/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/83/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.13	0.1	0.1	0.1
I-V/84/100-200	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/85/0-50	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.7	0.9	0.2	0.1	0.1	0.1
I-V/85/50-100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.5	0.2	0.1	0.1	0.1



## NOTA TECNICA

### Sintesi delle indagini di bioaccumulo di metalli e IPA nei mitili trapiantati per le attività di monitoraggio della seconda vasca di colmata del Porto di Livorno negli anni 2012-2017

#### Premessa

Come contributo alla valutazione degli aspetti sanitari rispetto a quanto richiesto dal DD 08.06.2016, nella presente nota tecnica si riportano i risultati del bioaccumulo in popolazioni di mitili trapiantati secondo la tecnica del *Mussel Watch*, eseguita da ISPRA nell'ambito del monitoraggio ambientale 2012-2017 della seconda vasca di colmata del porto di Livorno.

Nella presente nota vengono riportati i risultati riguardanti le analisi eseguite nelle tre stazioni (su dieci previste dal piano di monitoraggio) localizzate all'interno del perimetro del SIN (Fig. 1).



Fig. 1 – Stazioni di allocazione Mussel Watch

Per le descrizioni di dettaglio della metodica del *Mussel Watch* e per i risultati completi del monitoraggio, si rimanda alla relazione finale del monitoraggio ambientale 2012-2017 già trasmessa all'AdSP-MTS (Prot. ISPRA n.2020/3950 del 29/01/20).

### *Risultati*

Nelle Tabelle 1-2 vengono riportati i risultati (espressi rispetto alla sostanza secca) riferiti ai parametri indicati nel Regolamento europeo 1881/2006/EC e i parametri risultati più critici nella fase di valutazione ambientale della procedura di individuazione dei nuovi valori di riferimento del SIN di Livorno.

I risultati mancanti in alcune stazioni sono dovuti alla perdita accidentale dei mitili, generalmente per condizioni meteo marine avverse o per atti vandalici.

**ISPRA**Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca AmbientaleSistema Nazionale  
per la Protezione  
dell'Ambiente

CAMPAGNA	STAZIONI	Cd (mg/kg s.s)	Hg (mg/kg s.s)	Pb (mg/kg s.s)	As (mg/kg s.s)
<b>2012</b> (febbraio-marzo)	<b>T0</b>	0,55	0,29	2,54	16,92
	<b>Vn1</b>	0,75	0,33	2,31	14,92
	<b>Ve4</b>	0,89	0,20	4,29	18,81
	<b>Ve5</b>	0,57	0,26	3,53	13,76
<b>2013</b> (giugno-luglio)	<b>T0</b>	0,24	0,07	0,96	12,46
	<b>Vn1</b>	0,30	0,14	0,97	11,34
	<b>Ve4</b>	0,20	0,15	0,77	11,44
	<b>Ve5</b>	0,41	0,13	0,80	12,82
<b>2013</b> (settembre-ottobre)	<b>T0</b>	0,18	0,06	0,80	10,82
	<b>Ve5</b>	0,32	0,09	1,73	11,81
<b>2013</b> (ottobre-novembre)	<b>T0</b>	0,75	0,12	1,70	15,21
	<b>Ve5</b>	0,72	0,12	1,83	15,49
<b>2014</b> (maggio)	<b>T0</b>	0,29	0,07	2,12	12,22
	<b>Ve5</b>	0,37	0,05	1,71	12,67
<b>2015</b> (maggio-giugno)	<b>T0</b>	0,83	0,05	1,05	13,29
	<b>Vn1</b>	0,41	0,07	0,96	14,33
	<b>Ve4</b>	0,43	0,08	0,77	15,41
	<b>Ve5</b>	0,35	< LdQ	1,18	14,75
<b>2015</b> (ottobre-novembre)	<b>T0</b>	0,36	0,04	2,40	19,80
	<b>Ve5</b>	0,43	0,04	2,00	17,30
<b>2016</b> (ottobre-novembre)	<b>T0</b>	0,400	0,070	1,740	15,220
	<b>Ve5</b>	0,506	0,091	2,430	16,780
<b>2017</b> (maggio-giugno)	<b>T0</b>	0,750	0,150	3,390	17,320
	<b>Vn1</b>	1,050	0,105	3,940	22,840
	<b>Ve4</b>	0,800	0,105	3,880	18,570
	<b>Ve5</b>	0,810	0,064	1,450	19,290

**Tabella 1** - Risultati del bioaccumulo di metalli nel mitilo (Anni 2012-2017). In corsivo sono indicati i valori di concentrazione risultati significativamente diversi dal T=0 (T-test), in grassetto corsivo i valori superiori al T=0 e significativamente diversi da esso

CAMPAGNA	STAZIONI	Benzo (A) Pirene ( ng/g s.s)	Benzo (GHI) Perilene ( ng/g peso s.s)	Antracene ( ng/g s.s)	Fenantrene ( ng/g s.s)	Naftalene ( ng/g s.s)	Fluorene ( ng/g s.s)
<b>2012</b> (febbraio-marzo)	<b>T0</b>	n.d.	n.d.	n.d.	53,56	128,36	47,02
	<b>Vn1</b>	0,89	n.d.	7,24	69,89	165,64	52,07
	<b>Ve4</b>	0,36	n.d.	9,85	65,37	166,09	71,02
	<b>Ve5</b>	1,89	0,66	1,60	89,08	186,61	70,90
<b>2013</b> (giugno-luglio)	<b>T0</b>	0,79	n.d.	1,97	105,44	154,12	73,19
	<b>Vn1</b>	0,60	n.d.	2,73	47,53	163,12	32,76
	<b>Ve4</b>	0,81	n.d.	47,39	47,65	136,85	63,48
	<b>Ve5</b>	n.d.	n.d.	1,96	39,42	78,47	30,85
<b>2013</b> (settembre-ottobre)	<b>T0</b>	0,32 ± 0,41	<0,01	0,5 ± 0,14	51,4 ± 32,4	99,6 ± 17,1	36,5 ± 18,5
	<b>Ve5</b>	0,96 ± 0,52	<0,01	4 ± 0,8	67 ± 4,2	118,2 ± 13,1	52,7 ± 3,2
<b>2013</b> (ottobre-novembre)	<b>T0</b>	0,21 ± 0,09	<0,01	0,67 ± 0,14	78,5 ± 16,8	92,3 ± 14,3	53,3 ± 12,1
	<b>Ve5</b>	0,7 ± 0,43	<0,01	2,6 ± 1,9	69,7 ± 25,10	111,9 ± 17	53 ± 16
<b>2014</b> (maggio)	<b>T0</b>	<0,1	<0,1	1,64 ± 0,08	21,24 ± 1,33	61,88 ± 38,07	5,50 ± 1,25
	<b>Ve5</b>	<0,1	<0,1	2,19 ± 1,05	3,23	243,72	4,48 ± 1,98
<b>2015</b> (maggio-giugno)	<b>T0</b>	0,34 ± 0,15	<0,05	0,24 ± 0,09	3,1 ± 0,6	63 ± 25	5,66 ± 0,83
	<b>Vn1</b>	1,146 ± 1,368	0,27 ± 0,14	0,47 ± 0,13	18,8 ± 12,8	105 ± 48	9,87 ± 6,35
	<b>Ve4</b>	0,479 ± 0,31	0,19 ± 0,03	0,7 ± 0,36	15,9 ± 11,8	87 ± 10	6,63 ± 2,58
	<b>Ve5</b>	0,279 ± 0,056	0,34 ± 0,08	0,67 ± 0,18	32,2 ± 8,1	125 ± 42	7,96 ± 2,08
<b>2015</b> (ottobre-novembre)	<b>T0</b>	<0,05	0,28 ± 0,11	<0,05	28,13 ± 1,81	<1	<1
	<b>Ve5</b>	0,71 ± 0,23	<0,05	0,41 ± 0,25	2,46 ± 0,76	<1	4,06 ± 3,14
<b>2016</b> (ottobre-novembre)	<b>T0</b>	< 0,01	0,178 ± 0,016	0,208 ± 0,083	1,22 ± 0,316	47,3 ± 18,3	< 0,5
	<b>Ve5</b>	0,236 ± 0,344	< 0,1	<0,05	< 0,5	71,5 ± 50	< 0,5
<b>2017</b> (maggio-giugno)	<b>T0</b>	0,090 ± 0,0369	0,099 ± 0,111	< 0,1	< 0,1	48,5 ± 7,07	6,31 ± 0,694
	<b>Vn1</b>	0,288 ± 0,275	0,373 ± 0,274	1,21 ± 1,76	7,84 ± 4,21	51,5 ± 9,4	4,12 ± 1,85
	<b>Ve4</b>	0,742 ± 0,431	0,273 ± 0,134	< 0,1	5,93 ± 2,04	42 ± 10,6	5,33 ± 1,95
	<b>Ve5</b>	0,329 ± 0,0358	0,229 ± 0,0591	0,903 ± 0,366	5,15 ± 2,01	25,2 ± 9,83	2,23 ± 0,687

**Tabella 2:** Risultati del bioaccumulo di Chimica Organica nel mitilo (media ± deviazioni standard solo nei casi in cui ero disponibili le tre repliche del campione) dal 2012 al 2017





# LA CITTADELLA SNC

Febbraio 2023

**MONITORAGGIO AMBIENTALE DELLE ATTIVITÀ  
DI DRAGAGGIO DEL CANALE DI ACCESSO DEL  
PORTO DI LIVORNO AI SENSI DEL D.M.173/2016**





**CLIENTE: LA CITTADELLA S.N.C. di Ferrara Andrea & C. - Via Vallona, 71/A - 35020 CODEVIGO (PD)**

**TITOLO: MONITORAGGIO AMBIENTALE DELLE ATTIVITÀ DI DRAGAGGIO DEL CANALE DI ACCESSO DEL  
 PORTO DI LIVORNO AI SENSI DEL D.M.173/2016**

23230_00	Rev. 0	21/02/2023	Emissione per osservazioni cliente	NB	GBP	CP
<b>N° report</b>	<b>Revisione</b>	<b>Data</b>	<b>Descrizione revisione</b>	<b>Preparato</b>	<b>Verificato</b>	<b>Approvato</b>

Tracciabilità interna CIBM

Codice commessa	23230
Rif. offerta	80/22 e 148/22
Nome file	23230 - Monit_Canale_Accesso Rev.00



## SOMMARIO

PREMESSA.....	4
CAPITOLO 1 - MATERIALI E METODI .....	5
1.1 – CAMPIONAMENTO.....	5
CAPITOLO 2 – RISULTATI ANALISI DELLE ACQUE .....	10
2.1 SOLIDI SOSPESI .....	10
2.2 SAGGI BIOLOGICI.....	12
2.3 SONDA MULTIPARAMETRICA – ANALISI DELLA TORBIDITÀ .....	19
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE .....	28



## PREMESSA

Il presente studio riguarda il monitoraggio per la valutazione della qualità delle acque portuali a seguito delle attività di dragaggio prevista in un'area del Canale di Accesso del Porto di Livorno in prossimità della Darsena Petroli, ai sensi del Decreto Ministeriale 173/2016 "Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini". L'obiettivo del monitoraggio è valutare se l'attività di dragaggio e lo spostamento del materiale in vasca di colmata possono causare effetti negativi, e in che misura, sull'ambiente marino. Nello specifico è stata valutata la risospensione dei materiali di escavo, la torbidità lungo la colonna d'acqua, l'eventuale mobilitazione dei contaminanti ed il loro grado di tossicità.

Le operazioni di dragaggio hanno riguardato due aree adiacenti in prossimità del Canale d'Accesso del Porto che sono state commissionate dall'ADSPMTS in due trincee distinte ma temporalmente si sono svolte consecutivamente.

Le operazioni di controllo sono state eseguite prima dell'inizio dei lavori di dragaggio (Fase *ante operam*), durante i lavori di dragaggio (Fase in corso d'opera) e dopo il termine dei lavori (Fase *post operam*).

Data la durata delle attività di movimentazione dei sedimenti, durante la fase in corso d'opera sono stati effettuati quattro campionamenti per un totale complessivo di 6 campionamenti.

## CAPITOLO 1 - MATERIALI E METODI

### 1.1 – Campionamento

Per il monitoraggio dell'area interessata dalle attività di dragaggio e refluito dei sedimenti del Canale d'Accesso antistanti la Darsena Petroli, sono state allocate 3 stazioni di campionamento poste lungo un transetto in direzione interno-esterno porto. Le stazioni individuate, riportate nella figura 1, sono le seguenti:

1. Stazione C1, collocata davanti alla Torre del Marzocco per il monitoraggio dell'area interessata dalle attività di spostamento e conferimento dei materiali in vasca di colmata;
2. Stazione C2, in prossimità dell'area di dragaggio (vecchia Darsena Petroli);
3. Stazione C3, alla fine della nuova Darsena Petroli utilizzata come stazione di controllo.



Figura 1 - Ubicazione delle 3 stazioni di campionamento (area di dragaggio in prossimità della Vecchia Darsena Petroli)

Le attività di dragaggio previste inizialmente nell'area sopra riportata, sono state successivamente effettuate anche in un'area più a sud, adiacente alla precedente; a tal fine per il monitoraggio ambientale si è provveduto a traslare le stazioni di campionamento come riportato nella figura 2 a pagina seguente.



Figura 2 - Ubicazione delle 3 stazioni di campionamento traslate (area di dragaggio Nuova Darsena Petrolii)

## Coordinate delle stazioni di campionamento

Area dragaggio vecchia Darsena Petrolii			Area dragaggio nuova Darsena Petrolii		
Stazione	Latitudine N	Longitudine E	Stazione	Latitudine N	Longitudine E
<b>C1</b>	43°33'57.42"N	10°18'16.36"E	<b>C1t</b>	43°33'57.42"N	10°18'16.36"E
<b>C2</b>	43°33'47.81"N	10°18'3.70"E	<b>C2t</b>	43°33'47.81"N	10°18'3.70"E
<b>C3</b>	43°33'25.97"N	10°17'35.64"E	<b>C3t</b>	43°33'25.97"N	10°17'35.64"E

Il campionamento in corso d'opera ha subito una battuta d'arresto nel periodo estivo per problemi legati alla draga e pertanto i prelievi d'acqua e le misure sono state effettuate nei momenti di effettiva attività della draga.

Le attività di monitoraggio sono state effettuate nei seguenti giorni:

Fase campionamento	Data esecuzione	Fase campionamento	Data esecuzione
<i>Ante operam</i>	13/05/2022	In corso d'opera 3	20/12/2022

In corso d'opera 1	24/06/2022	In corso d'opera 4	20/01/2023
In corso d'opera 2	27/07/2022	Post operam	03/02/2023

Per tutte le fasi di monitoraggio (*ante operam*, in corso d'opera e *post operam*) è stato effettuato nelle tre stazioni, il controllo delle caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua, la stima dei solidi sospesi e le analisi ecotossicologiche (saggi biologici).

Per rilevare i parametri chimico-fisici nelle stazioni campionate è stata usata una sonda multiparametrica modello Idromarambiente MAR-3 le cui specifiche tecniche sono riportate sotto. I parametri chimico-fisici rilevati lungo il profilo della colonna d'acqua includono la pressione, la temperatura, il pH, la salinità, il potenziale redox, l'ossigeno disciolto (in %) e la torbidità.

Specifiche tecniche dei sensori della sonda multiparametrica, Modello Idromarambiente MAR-3



PARAMETRO	CAMPO DI MISURA	ACCURATEZZA	RISOLUZIONE
Pressione	0÷100 dbar	0.1 dbar	0.002 dbar
Temperatura	-2÷38 °C	0.01 °C	0.0007 °C
Conducibilità	0÷70 mS/cm	0.02 mS/cm	0.0015 ms/cm
Ossigeno disciolto	0÷150 %sat	1.0 %sat	0.002 %sat
pH	2÷12	0.05	0.0002
Redox	-1÷1 V	1 mV	0.03 mV
Torbidità	0÷100 FTU	0.05 FTU	0.002 FTU
Clorofilla 'a'	0÷50 mg/m <sup>3</sup>	0.05 mg/m <sup>3</sup>	0.001 mg/m <sup>3</sup>

Sono stati prelevati anche campioni acquosi rappresentativi della colonna d'acqua sui quali sono state effettuate le seguenti determinazioni:

Attività	Metodica
Solidi sospesi	APAT CNR IRSA 2090 B Man. 29/2003
Test di embriotossicità con <i>Paracentrotus lividus</i>	EPA/600/R-95-136/Sezione 15
Test di inibizione della crescita algale con <i>Phaeodactylum tricorutum</i>	ISO 10253:2006
Test di inibizione della bioluminescenza col batterio <i>Vibrio fischeri</i>	ISO11348-3 (2007)

### Controllo qualità saggi biologici



Di seguito si riporta il riepilogo dei saggi biologici effettuati con l'indicazione delle principali caratteristiche di ciascun test:

Specie-test	End point	N° repliche	Tempo esposizione	Tossico di riferimento
<i>P. lividus</i>	Sviluppo larvale	3	24 h	Cu <sup>2+</sup>
<i>P. tricornutum</i>	Riduzione densità algale	3	72 h	Cr <sup>2+</sup>
<i>A. fischeri</i>	Inibizione bioluminescenza	2	15'	Zn <sup>2+</sup>

Nella tabella sottostante, si riportano i valori di EC50 di ciascun saggio biologico ottenuti con il rispettivo tossico di riferimento (fra parentesi sono riportati i limiti di confidenza al 95%) nelle varie fasi di monitoraggio. Tutti i valori di EC50 ottenuti rientrano nei limiti di accettabilità della carta di controllo del laboratorio.

Specie test	u.m.	Ante operam	Durante 1	Durante 2	Durante 3	Durante 4	Post operam
<i>Paracentrotus lividus</i>	µg/l	25,07 (23,49-28,77)	22,98 (20,87-25,31)	23,52 (21,79-25,40)	24,42 (23,42-26,46)	22,05 (20,68-23,53)	22,05 (20,68-23,53)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	mg/l	3,19 (2,54-4,14)	4,38 (4,14-4,59)	2,87 (2,50-3,25)	4,09 (3,65-4,46)	2,49 (2,42-2,62)	2,49 (2,42-2,62)
<i>Alivibrio fischeri</i>	mg/l	9,09 (7,83-10,55)	11,09 (7,89-15,61)	8,35 (7,59-9,18)	8,70 (7,96-9,51)	10,04 (7,61-13,25)	9,72 (7,41-12,75)

I prelievi di acqua sono stati effettuati mediante una bottiglia "Niskin" calata manualmente da un operatore; i prelievi sono stati eseguiti nel livello intermedio della colonna d'acqua. L'acqua raccolta è stata posta all'interno di contenitori in HDPE e trasportati al laboratorio di analisi mantenendoli ad una temperatura di 4-6 °C.





## Classificazione della tossicità delle acque

La stima della tossicità della batteria di saggi biologici impiegati è stata effettuata sulla base dei criteri riportati nel D.M. 173/2016 relativamente alla classificazione ecotossicologica secondo il “criterio tabellare” riportato nella tabella seguente che seppur sia specifico per la matrice sedimento, può essere applicato anche per le acque:

Criterio	Tossicità
Tutti i saggi hanno EC20>100% oppure effetto ormetico < 100%	Assente
Solo un saggio presenta EC20<100% ma EC50 >100% oppure effetto ormetico > 100%	Bassa
Due o più saggi con EC20<100% ma EC50>100%, oppure un solo saggio con EC50<100%	Media
Due o più saggi presentano EC50<100%	Alta

L'effetto ormetico è riferito esclusivamente alla biostimolazione nel saggio con *Phaeodactylum tricornutum*.

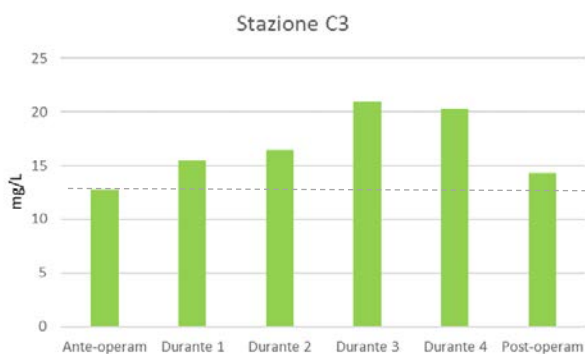
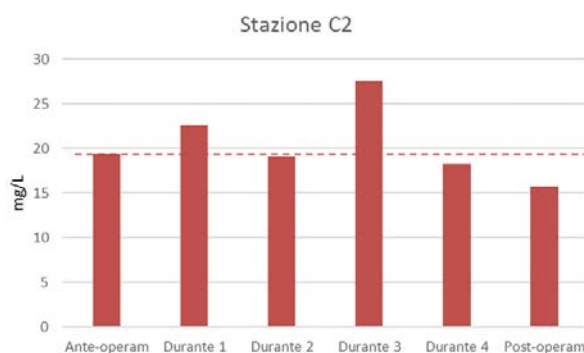
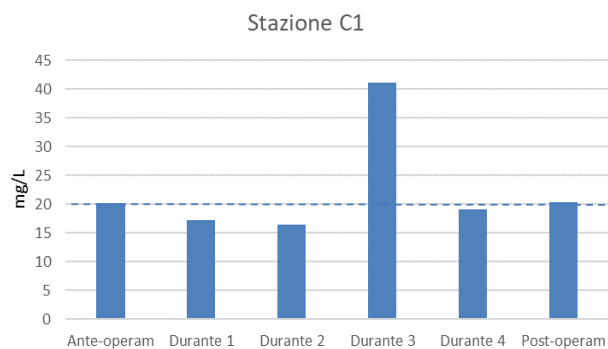
## CAPITOLO 2 – RISULTATI ANALISI DELLE ACQUE

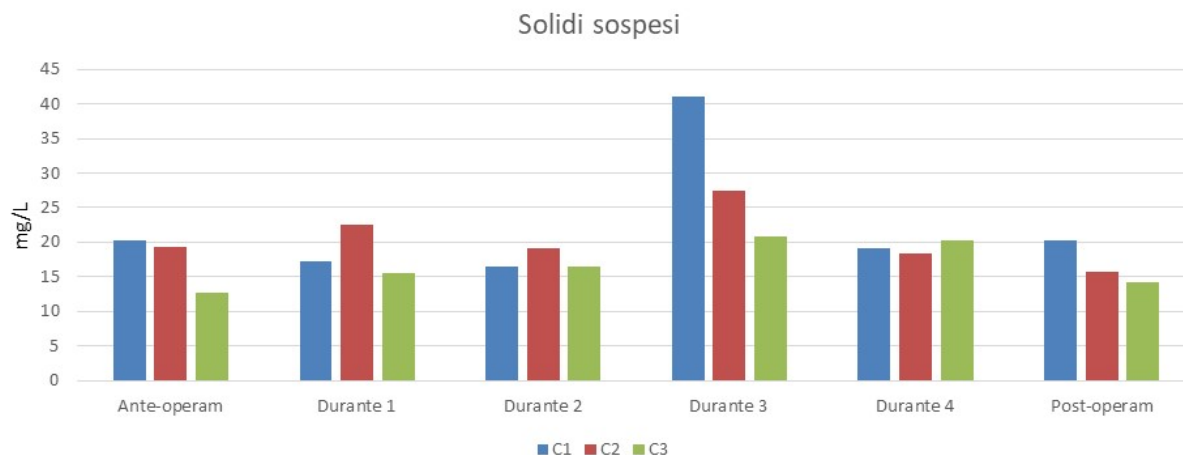
### 2.1 Solidi sospesi

Si riportano nelle tabelle seguenti le concentrazioni (espresse in mg/l) dei solidi sospesi determinati nelle varie stazioni di campionamento e una visualizzazione grafica per una più facile lettura:

Fase monitoraggio	C1	C2	C3
Ante-operam	20,2	19,4	12,8
In corso d'opera 1	17,3	22,6	15,5
In corso d'opera 2	16,4	19,1	16,5

Fase monitoraggio	C1t	C2t	C3t
In corso d'opera 3	41,1	27,5	20,9
In corso d'opera 4	19,1	18,3	20,3
Post-operam	20,3	15,8	14,3





Per l'intera campagna di monitoraggio la concentrazione di solidi sospesi risulta abbastanza costante nelle tre stazioni indagate ad eccezione di un significativo incremento nella terza campagna in corso d'opera (Durante 3), relativamente alle stazioni C1 e C2. Per quanto concerne la stazione C3 si osserva un leggero incremento di solidi sospesi nella fase in corso d'opera per poi ritornare al termine del dragaggio a livelli prossimi a quelli misurati nella fase ante-operam.



## 2.2 Saggi biologici

### Fase *ante operam*

#### Saggio biologico con *Paracentrotus lividus* – *ante-operam*

Campione	Conc. (%)	% plutei normali (± dev.st. %)	% media plutei malformate	ABBOTT (plutei malformati)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	90 ± 2,00	10	0	-	-
C1 ante	100	70 ± 1,53	30	22	88,5	>100
	50	79 ± 1,53	21	13		
	25	84 ± 1,53	16	6		
C2 ante	100	76 ± 1,53	24	15	>100	>100
	50	80 ± 1,53	20	11		
	25	86 ± 0,58	14	5		
C3 ante	100	66 ± 1,00	34	27	70,2	>100
	50	77 ± 2,00	23	14		
	25	83 ± 1,53	17	7		

#### Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum* – *ante-operam*

Campione	Densità algale media alla max. concentrazione (N° cellule ± DS)	ΔG 72 h %	EC20 %	EC50 %
Controllo metodologico	1130000 ± 45826		-	-
C1 ante	953333 ± 55076	-15,63	>100	>100
C2 ante	1023333 ± 51316	-9,44	>100	>100
C3 ante	1153333 ± 117189	2,06	>100	>100

#### Saggio biologico con *Alivbrio fischeri* – *ante-operam*

Campione	% Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (15')	EC20 (30')	EC50 (15')	EC50 (30')
C1 ante	-3,47	-4,05	≥90%	≥90%	≥90%	≥90%
C2 ante	-0,87	-1,03	≥90%	≥90%	≥90%	≥90%
C3 ante	0,91	1,17	≥90%	≥90%	≥90%	≥90%


**Fase in corso d'opera 1**

 Saggio biologico con *Paracentrotus lividus* – in corso d'opera 1

Campione	Conc. (%)	% plutei normali ( $\pm$ dev.st. %)	% media plutei malformate	ABBOTT (plutei malformati)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	90 $\pm$ 1,00	10	0	-	-
C1 durante	100	75 $\pm$ 1,73	25	17	>100	>100
	50	82 $\pm$ 1,53	18	9		
	25	87 $\pm$ 1,53	13	4		
C2 durante	100	82 $\pm$ 2,00	18	9	>100	>100
	50	85 $\pm$ 1,73	15	6		
	25	87 $\pm$ 1,53	13	3		
C3 durante	100	77 $\pm$ 1,73	23	14	>100	>100
	50	81 $\pm$ 1,53	19	10		
	25	87 $\pm$ 0,58	13	4		

 Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum* – in corso d'opera 1

Campione	Densità algale media alla max. concentrazione (N° cellule $\pm$ DS)	$\Delta$ G 72 h %	EC20 %	EC50 %
Controllo metodologico	950000 $\pm$ 30000		-	-
C1 durante	966667 $\pm$ 125831	1,75	>100	>100
C2 durante	1093333 $\pm$ 65064	15,09	>100	>100
C3 durante	1076667 $\pm$ 25166	13,33	>100	>100

 Saggio biologico con *Alivbrio fischeri* – in corso d'opera 1

Campione	% Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (15')	EC20 (30')	EC50 (15')	EC50 (30')
C1 durante	1,21	-1,38	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%
C2 durante	-1,49	-3,45	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%
C3 durante	3,60	1,16	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%



## Fase in corso d'opera 2

### Saggio biologico con *Paracentrotus lividus* – in corso d'opera 2

Campione	Conc. (%)	% plutei normali ( $\pm$ dev.st. %)	% media plutei malformate	Corr. ABBOTT (plutei malformati)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	89 $\pm$ 1,53	11	0	-	-
C1 durante 2	100	67 $\pm$ 1,53	33	24	86,5	>100
	50	77 $\pm$ 2,00	23	13		
	25	84 $\pm$ 2,00	16	5		
C2 durante 2	100	72 $\pm$ 2,08	28	18	>100	>100
	50	80 $\pm$ 1,53	20	10		
	25	84 $\pm$ 1,53	16	5		
C3 durante 2	100	69 $\pm$ 0,58	31	22	94,4	>100
	50	77 $\pm$ 2,08	23	13		
	25	85 $\pm$ 1,00	15	4		

### Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum* – in corso d'opera 2

Campione	Densità algale media alla max. concentrazione (N° cellule $\pm$ DS)	$\Delta$ G 72 h %	EC20 %	EC50 %
Controllo metodologico	738333 $\pm$ 65574		-	-
C1 durante 2	840000 $\pm$ 45826	13,77	>100	>100
C2 durante 2	806667 $\pm$ 68069	9,26	>100	>100
C3 durante 2	933333 $\pm$ 40415	26,41	>100	>100

### Saggio biologico con *Alivbrio fischeri* – in corso d'opera 2

Campione	% Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (15')	EC20 (30')	EC50 (15')	EC50 (30')
C1 durante 2	9,73	-9,73	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%
C2 durante 2	0,35	-7,86	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%
C3 durante 2	-2,66	-7,86	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%

**Fase in corso d'opera 3**Saggio biologico con *Paracentrotus lividus* – in corso d'opera 3

Campione	Conc. (%)	% plutei normali ( $\pm$ dev.st. %)	% media plutei malformati	Corr. ABBOTT (plutei malformati)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	88 $\pm$ 1,53	12	0	-	-
C1t/Durante3	100	49 $\pm$ 1,00	51	44	37,3	>100
	50	61 $\pm$ 1,73	39	30		
	25	79 $\pm$ 0,58	21	10		
C2t/ Durante3	100	51 $\pm$ 2,08	49	42	45,3	>100
	50	67 $\pm$ 2,00	33	24		
	25	81 $\pm$ 1,15	19	8		
C3t/ Durante3	100	60 $\pm$ 1,53	40	32	60,5	>100
	50	74 $\pm$ 2,08	26	16		
	25	81 $\pm$ 1,53	19	7		

Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum* – in corso d'opera 3

Campione	Densità algale media alla max. concentrazione (N° cellule $\pm$ DS)	$\Delta$ G 72 h %	EC20 %	EC50 %
Controllo metodologico	703333 $\pm$ 10000		-	-
C1t/Durante3	746667 $\pm$ 49329	6,16	>100	>100
C2t/ Durante3	680000 $\pm$ 30000	-3,32	>100	>100
C3t/ Durante3	590000 $\pm$ 30000	-16,11	>100	>100

Saggio biologico con *Alivbrio fischeri* – in corso d'opera 3

Campione	% Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (15')	EC20 (30')	EC50 (15')	EC50 (30')
C1t/Durante3	-36,52	-36,36	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%
C2t/ Durante3	-20,95	-29,29	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%
C3t/ Durante3	-18,99	-19,46	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%	$\geq$ 90%



## Fase in corso d'opera 4

### Saggio biologico con *Paracentrotus lividus* – in corso d'opera 4

Campione	Conc. (%)	% plutei normali (± dev.st. %)	% media plutei malformati	Corr. ABBOTT (plutei malformati)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	86 ± 1,00	14	0	-	-
C1t/Durante4	100	78 ± 1,53	22	9	>100	>100
	50	81 ± 1,73	19	6		
	25	84 ± 1,53	16	3		
C2t/ Durante4	100	71 ± 1,73	29	17	>100	>100
	50	78 ± 1,53	22	9		
	25	83 ± 1,53	17	4		
C3t/ Durante4	100	78 ± 2,89	22	9	>100	>100
	50	82 ± 2,08	18	4		
	25	85 ± 1,15	15	2		

### Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum* – in corso d'opera 4

Campione	Densità algale media alla max. concentrazione (N° cellule ± DS)	ΔG 72 h %	EC20 %	EC50 %
Controllo metodologico	736667 ± 62450		-	-
C1t/Durante4	666667 ± 20817	-5,21	>100	>100
C2t/ Durante4	740000 ± 81854	5,21	>100	>100
C3t/ Durante4	620000 ± 40000	-11,85	>100	>100

### Saggio biologico con *Alivbrio fischeri* – in corso d'opera 4

Campione	% Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (15')	EC20 (30')	EC50 (15')	EC50 (30')
C1t/Durante4	-3,35	-0,05	≥90%	≥90%	≥90%	≥90%
C2t/ Durante4	-0,87	1,13	≥90%	≥90%	≥90%	≥90%
C3t/ Durante4	-1,98	1,56	≥90%	≥90%	≥90%	≥90%



**Fase post operam**Saggio biologico con *Paracentrotus lividus* – post operam

Campione	Conc. (%)	% plutei normali (± dev.st. %)	% media plutei malformati	Corr. ABBOTT (plutei malformati)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	86 ± 1,00	14	0	-	-
C1t/post operam	100	66 ± 1,00	34	23	87,4	>100
	50	77 ± 2,08	23	10		
	25	82 ± 2,08	18	5		
C2t/ post operam	100	72 ± 2,00	28	16	>100	>100
	50	79 ± 2,00	21	8		
	25	84 ± 1,15	16	2		
C3t/ post operam	100	73 ± 2,08	27	15	≥90	>100
	50	80 ± 1,53	20	7		
	25	84 ± 2,00	16	2		

Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum* – post operam

Campione	Densità algale media alla max. concentrazione (N° cellule ± DS)	ΔG 72 h %	EC20 %	EC50 %
Controllo metodologico	736667 ± 62450		-	-
C1t/post operam	680000 ± 36056	-7,69	>100	>100
C2t/ post operam	1543333 ± 111505	109,50	>100	>100
C3t/ post operam	770000 ± 50000	4,52	>100	>100

Saggio biologico con *Alivbrio fischeri* – post operam

Campione	% Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (15')	EC20 (30')	EC50 (15')	EC50 (30')
C1t/ post operam	-19,10	-26,71	≥90%	≥90%	≥90%	≥90%
C2t post operam	-16,24	-24,22	≥90%	≥90%	≥90%	≥90%
C3t/ post operam	-13,39	-20,63	≥90%	≥90%	≥90%	≥90%

## Stima della tossicità delle acque

Si riportano di seguito i valori di EC20 e di EC50 espressi in % per ciascun saggio e i valori dell'effetto ormetico per il saggio algale (espresso in %) e la relativa classificazione della tossicità.

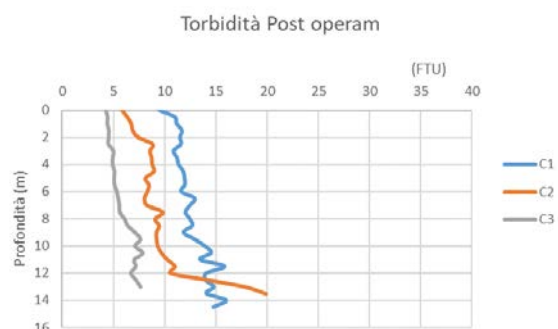
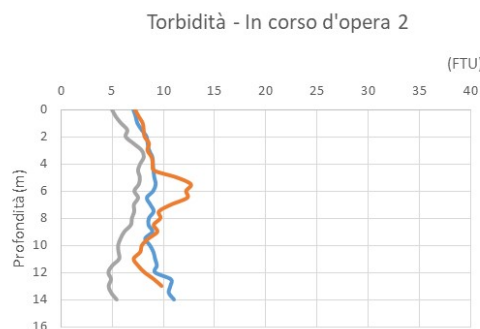
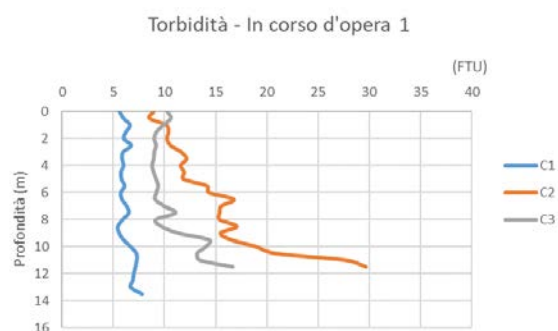
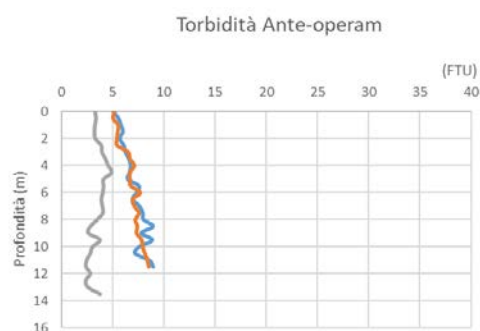
	Fase	<i>P. lividus</i>		<i>P. tricornutum</i>			<i>A. fischeri</i>		Tossicità
		EC20	EC50	EC20	EC50	<i>ormesi</i>	EC20	EC50	
Stazione C1	Ante operam	<b>88,5</b>	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Bassa
	Durante 1	>100	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Assente
	Durante 2	<b>86,5</b>	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Bassa
	Durante 3	<b>37,3</b>	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Bassa
	Durante 4	>100	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Assente
	Post operam	<b>87,4</b>	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Bassa
Stazione C2	Ante operam	>100	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Assente
	Durante 1	>100	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Assente
	Durante 2	>100	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Assente
	Durante 3	<b>45,3</b>	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Bassa
	Durante 4	>100	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Assente
	Post operam	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	>100	>100	Bassa
Stazione C3	Ante operam	<b>70,2</b>	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Bassa
	Durante 1	>100	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Assente
	Durante 2	<b>94,4</b>	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Bassa
	Durante 3	<b>60,5</b>	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Bassa
	Durante 4	>100	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Assente
	Post operam	>100	>100	>100	>100	<100	>100	>100	Assente

Per una migliore visualizzazione dell'andamento della tossicità si riporta il seguente schema sintetico:

STAZIONE	Ante operam	Durante 1	Durante 2	Durante 3	Durante 4	Post operam
C1	Bassa	Assente	Bassa	Bassa	Assente	Bassa
C2	Assente	Assente	Assente	Bassa	Assente	Bassa
C3	Bassa	Assente	Bassa	Bassa	Assente	Assente

## 2.3 Sonda multiparametrica – analisi della torbidità

Nelle pagine seguenti si riportano i dati di Temperatura, Conducibilità, Ossigeno, pH, Torbidità, Clorofilla A e Salinità in funzione della profondità, rilevati con la sonda multiparametrica per l'intero periodo di monitoraggio. Di seguito, per le tre stazioni analizzate e per le varie fasi di monitoraggio, si riporta una visualizzazione grafica del profilo della torbidità lungo la colonna d'acqua.




**Risultati sonda multiparametrica**

Fase Ante operam									
Stazione	Profondità (m)	Temp. (°C)	Conduc. (mS/cm)	Ossigeno (%)	pH (unità)	Torbidità (FTU)	Clorofilla A (µg/l)	Salinità (ppt)	Ossigeno disciolto (mg/l)
C1	0	18,28	48,98	88,39	7,99	5,08	0,43	37,4	6,65
C1	0,5	17,87	48,63	87,64	8	5,59	0,75	37,47	6,64
C1	1	17,71	48,59	87,54	8	5,83	0,82	37,58	6,65
C1	1,5	17,62	48,58	87,61	8,01	6,03	0,81	37,66	6,67
C1	2	17,57	48,58	87,49	8,01	5,72	0,79	37,7	6,66
C1	2,5	17,5	48,54	87,5	8,02	6,12	0,88	37,73	6,67
C1	3	17,45	48,54	87,57	8,02	6,28	0,86	37,78	6,68
C1	3,5	17,43	48,53	87,66	8,02	6,61	0,92	37,79	6,69
C1	4	17,39	48,53	87,81	8,02	6,79	0,96	37,83	6,7
C1	4,5	17,37	48,54	87,89	8,03	6,69	1,09	37,85	6,71
C1	5	17,34	48,53	87,98	8,03	6,51	1,15	37,87	6,72
C1	5,5	17,31	48,51	88,15	8,03	7,6	1,1	37,89	6,74
C1	6	17,28	48,5	88,18	8,03	7,37	1,16	37,9	6,74
C1	6,5	17,27	48,5	88,14	8,03	6,98	1,13	37,9	6,74
C1	7	17,27	48,51	88,27	8,03	7,64	1,1	37,92	6,75
C1	7,5	17,27	48,49	88,32	8,03	7,97	1,08	37,9	6,75
C1	8	17,23	48,47	88,06	8,03	8,06	0,98	37,93	6,74
C1	8,5	17,23	48,48	88,32	8,04	8,98	1,02	37,93	6,76
C1	9	17,22	48,47	88,41	8,04	7,83	1,14	37,93	6,77
C1	9,5	17,23	48,46	88	8,04	8,89	1,04	37,91	6,74
C1	10	17,21	48,46	88,19	8,04	7,63	1,15	37,93	6,75
C1	10,5	17,21	48,45	88,21	8,04	7,23	1,11	37,92	6,75
C1	11	17,21	48,45	88,07	8,04	8,61	1	37,93	6,74
C1	11,5	17,21	48,45	88,26	8,04	8,99	0,97	37,93	6,76
C2	0	17,78	48,72	88,09	8,02	5,22	0,47	37,63	6,68
C2	0,5	17,64	48,63	88,21	8,03	5,07	0,54	37,68	6,71
C2	1	17,56	48,63	88,01	8,03	5,56	0,65	37,76	6,7
C2	1,5	17,48	48,61	88,28	8,04	5,53	0,73	37,81	6,73
C2	2	17,44	48,6	88,29	8,04	5,46	0,82	37,84	6,73
C2	2,5	17,4	48,59	88,4	8,04	5,48	0,87	37,87	6,74
C2	3	17,31	48,54	88,45	8,04	6,53	1	37,91	6,76
C2	3,5	17,27	48,53	88,55	8,04	6,71	1,02	37,94	6,77
C2	4	17,22	48,5	88,64	8,05	7,13	0,99	37,96	6,78
C2	4,5	17,22	48,51	88,83	8,05	6,73	1,04	37,97	6,8
C2	5	17,16	48,47	88,85	8,05	6,71	1,14	38	6,81
C2	5,5	17,13	48,45	88,92	8,05	6,8	1,25	38,01	6,82
C2	6	17,12	48,45	89,01	8,06	7,72	1,15	38,01	6,82
C2	6,5	17,1	48,43	88,97	8,05	6,99	1,11	38	6,82
C2	7	17,09	48,43	89,04	8,05	7,14	1,19	38,02	6,83
C2	7,5	17,08	48,42	89,08	8,05	7,59	1,04	38,02	6,83
C2	8	17,05	48,4	89,09	8,06	7,24	1,06	38,03	6,84
C2	8,5	17,02	48,38	89,04	8,06	7,44	1,05	38,04	6,84
C2	9	17,01	48,4	89,17	8,06	7,36	1,11	38,07	6,85
C2	9,5	17,01	48,37	89,41	8,06	7,84	1,07	38,05	6,87
C2	10	17	48,37	89,42	8,06	7,94	1,05	38,05	6,87
C2	10,5	16,99	48,35	89,39	8,06	8,17	0,96	38,05	6,87
C2	11	16,97	48,36	89,47	8,06	8,4	1,07	38,07	6,88
C2	11,5	16,93	48,34	89,56	8,06	8,55	1,11	38,09	6,89
C3	0	17,72	48,55	88,45	8,06	3,26	0,35	37,54	6,72
C3	0,5	17,5	48,42	88,34	8,06	3,37	0,49	37,63	6,74
C3	1	17,37	48,34	88,81	8,07	3,27	0,67	37,68	6,79
C3	1,5	17,26	48,22	89,49	8,08	3,23	0,9	37,69	6,86
C3	2	17,19	48,22	89,7	8,08	3,3	1	37,74	6,88
C3	2,5	17,15	48,26	89,97	8,08	3,88	1,19	37,81	6,9
C3	3	17,14	48,28	90,17	8,08	3,95	1,22	37,84	6,92
C3	3,5	17,08	48,27	90,15	8,08	4,28	1,22	37,89	6,92
C3	4	17,03	48,25	90,06	8,08	4,54	1,23	37,91	6,92
C3	4,5	16,98	48,24	90,14	8,08	4,88	1,39	37,96	6,93
C3	5	16,96	48,22	90,26	8,08	4,1	1,45	37,96	6,94
C3	5,5	16,96	48,24	90,42	8,08	4,1	1,36	37,98	6,95
C3	6	16,95	48,23	90,09	8,08	4,03	1,49	37,98	6,93


 Monitoraggio ambientale delle attività di dragaggio del canale di accesso del  
 Porto di Livorno ai sensi del D.M. 173/2016


Fase Ante operam									
Stazione	Profondità (m)	Temp. (°C)	Conduc. (mS/cm)	Ossigeno (%)	pH (unità)	Torbidità (FTU)	Clorofilla A (µg/l)	Salinità (ppt)	Ossigeno disciolto (mg/l)
C3	6,5	16,93	48,22	89,89	8,08	3,89	1,47	37,99	6,92
C3	7	16,93	48,22	89,99	8,08	3,99	1,48	37,99	6,93
C3	7,5	16,91	48,22	90,08	8,08	4,03	1,45	38,01	6,93
C3	8	16,87	48,2	90,16	8,08	3,48	1,41	38,02	6,95
C3	8,5	16,85	48,2	90,22	8,08	2,83	1,66	38,05	6,95
C3	9	16,84	48,18	90,17	8,08	2,63	1,37	38,04	6,95
C3	9,5	16,82	48,2	90,28	8,08	3,74	1,39	38,07	6,96
C3	10	16,82	48,18	90,25	8,08	3,03	1,29	38,05	6,95
C3	10,5	16,8	48,19	90,35	8,08	2,82	1,37	38,08	6,97
C3	11	16,8	48,18	90,19	8,08	2,46	1,37	38,08	6,95
C3	11,5	16,77	48,17	90,24	8,08	2,41	1,4	38,09	6,96
C3	12	16,72	48,14	90,28	8,08	2,82	1,2	38,11	6,97
C3	12,5	16,64	48,12	90,24	8,08	2,37	1,04	38,17	6,97
C3	13	16,53	48,03	89,88	8,08	2,61	0,89	38,2	6,96
C3	13,5	16,49	48	89,74	8,08	3,76	1,03	38,21	6,96

Fase In corso d'opera 1									
Stazione	Profondità (m)	Temp. (°C)	Conduc. (mS/cm)	Ossigeno (%)	pH (unità)	Torbidità (FTU)	Clorofilla A (µg/l)	Salinità (ppt)	Ossigeno disciolto (mg/l)
C1	0	24,54	56,1	89,49	7,89	10,3	0,65	37,64	6,02
C1	0,5	24,55	56,11	89,87	7,89	10,64	0,65	37,64	6,04
C1	1	24,52	56,09	90,1	7,89	9,92	0,69	37,66	6,06
C1	1,5	24,44	56,03	90,37	7,89	9,26	0,72	37,68	6,09
C1	2	24,37	55,99	91,41	7,9	9,02	0,78	37,71	6,16
C1	2,5	24,37	56,01	91,87	7,9	9,2	0,75	37,72	6,19
C1	3	24,38	56,02	92,15	7,9	9,03	0,75	37,72	6,21
C1	3,5	24,39	56,04	92,04	7,89	8,98	0,72	37,73	6,2
C1	4	24,4	56,05	92,19	7,89	8,82	0,74	37,72	6,21
C1	4,5	24,39	56,05	92,7	7,89	8,97	0,75	37,74	6,25
C1	5	24,39	56,05	92,55	7,89	9,21	0,73	37,73	6,24
C1	5,5	24,36	56,02	92,77	7,89	9,41	0,74	37,74	6,25
C1	6	24,37	56,04	93	7,89	9,23	0,75	37,74	6,27
C1	6,5	24,37	56,03	92,85	7,89	9,11	0,75	37,73	6,26
C1	7	24,34	56,01	93,03	7,89	9,99	0,76	37,74	6,27
C1	7,5	24,34	56,01	93,04	7,89	11,1	0,75	37,74	6,27
C1	8	24,4	56,06	93,17	7,89	9,16	0,74	37,73	6,28
C1	8,5	24,37	56,03	93,11	7,89	9,74	0,74	37,74	6,27
C1	9	24,32	56	93,12	7,89	11,34	0,76	37,75	6,28
C1	9,5	24,25	55,95	93,26	7,89	14,4	0,76	37,77	6,3
C1	10	24,26	55,95	93,46	7,89	14,05	0,78	37,76	6,31
C1	10,5	24,26	55,96	93,53	7,89	13,21	0,76	37,78	6,31
C1	11	24,26	55,96	93,7	7,89	13,48	0,79	37,77	6,32
C1	11,5	24,28	55,97	93,88	7,89	16,68	0,82	37,77	6,34
C2	0	24,95	56,32	91,38	7,88	8,91	0,44	37,47	6,11
C2	0,5	24,74	56,21	91,82	7,88	8,51	0,65	37,56	6,16
C2	1	24,53	56,09	92,58	7,88	10,14	0,65	37,65	6,23
C2	1,5	24,44	56,03	92,96	7,89	10,36	0,72	37,68	6,26
C2	2	24,41	56,01	92,88	7,89	10,22	0,79	37,69	6,26
C2	2,5	24,35	55,99	93,16	7,89	10,56	0,73	37,72	6,28
C2	3	24,33	55,97	93,9	7,89	11,6	0,78	37,72	6,33
C2	3,5	24,32	55,96	93,7	7,89	12,13	0,77	37,73	6,32
C2	4	24,32	55,97	93,36	7,89	11,57	0,76	37,73	6,3
C2	4,5	24,31	55,97	93,28	7,89	11,89	0,76	37,74	6,3
C2	5	24,31	55,96	93,13	7,89	11,84	0,82	37,73	6,29
C2	5,5	24,29	55,94	93,23	7,89	14,13	0,83	37,73	6,29
C2	6	24,28	55,93	93,36	7,89	14,33	0,77	37,74	6,3
C2	6,5	24,27	55,91	93,5	7,89	16,75	0,78	37,73	6,32
C2	7	24,27	55,92	93,59	7,89	15,54	0,81	37,74	6,32
C2	7,5	24,25	55,92	93,6	7,89	15,36	0,8	37,75	6,32
C2	8	24,25	55,91	93,81	7,89	15,38	0,79	37,75	6,34
C2	8,5	24,25	55,92	94,06	7,89	17,05	0,82	37,75	6,36


 Monitoraggio ambientale delle attività di dragaggio del canale di accesso del  
 Porto di Livorno ai sensi del D.M. 173/2016


Fase In corso d'opera 1									
Stazione	Profondità (m)	Temp. (°C)	Conduc. (mS/cm)	Ossigeno (%)	pH (unità)	Torbidità (FTU)	Clorofilla A (µg/l)	Salinità (ppt)	Ossigeno disciolto (mg/l)
C2	9	24,24	55,91	94,16	7,89	15,47	0,83	37,76	6,36
C2	9,5	24,23	55,89	93,95	7,89	16,53	0,81	37,75	6,35
C2	10	24,22	55,9	94,12	7,89	18,96	0,79	37,77	6,36
C2	10,5	24,21	55,87	94,05	7,89	20,83	0,81	37,75	6,36
C2	11	24,19	55,86	94,07	7,89	27,75	0,78	37,76	6,36
C2	11,5	24,2	55,87	94,06	7,89	29,7	0,82	37,76	6,36
C3	0	25,39	57,56	91,55	7,92	5,59	0,67	38,03	6,05
C3	0,5	25,3	57,52	91,73	7,92	5,98	0,96	38,08	6,07
C3	1	25,26	57,49	91,68	7,92	6,6	1,04	38,09	6,07
C3	1,5	25,22	57,48	91,64	7,92	6,24	1,04	38,12	6,08
C3	2	25,21	57,48	91,38	7,92	6,01	1,09	38,13	6,06
C3	2,5	25,19	57,49	91,53	7,92	6,73	1,09	38,15	6,07
C3	3	25,19	57,5	91,85	7,92	5,94	1,16	38,16	6,09
C3	3,5	25,18	57,5	91,84	7,92	5,85	1,13	38,16	6,09
C3	4	25,17	57,5	91,91	7,92	5,98	1,06	38,17	6,1
C3	4,5	25,18	57,51	91,84	7,92	5,74	1,1	38,17	6,09
C3	5	25,2	57,5	91,73	7,92	5,79	1,1	38,14	6,08
C3	5,5	25,19	57,51	91,83	7,92	6,08	1,17	38,16	6,09
C3	6	25,18	57,52	91,86	7,92	5,72	1,04	38,18	6,09
C3	6,5	25,18	57,52	91,94	7,92	5,83	1,16	38,17	6,1
C3	7	25,17	57,52	91,74	7,92	6,28	1,11	38,18	6,08
C3	7,5	25,17	57,54	91,83	7,92	6,49	1,12	38,19	6,09
C3	8	25,17	57,53	92,02	7,92	5,89	1,16	38,19	6,1
C3	8,5	25,17	57,53	92,03	7,92	5,43	1,1	38,2	6,1
C3	9	25,17	57,54	91,83	7,92	5,55	1,11	38,2	6,09
C3	9,5	25,16	57,55	91,83	7,92	5,99	1,13	38,21	6,09
C3	10	25,16	57,54	92,05	7,92	6,69	1,13	38,21	6,11
C3	10,5	25,16	57,53	92,09	7,92	7,24	1,1	38,2	6,11
C3	11	25,16	57,53	92,09	7,92	7,27	1,12	38,2	6,11
C3	11,5	25,16	57,54	92,04	7,92	7,15	1,11	38,21	6,11
C3	12	25,16	57,52	91,94	7,92	6,98	1,09	38,19	6,1
C3	12,5	25,17	57,53	91,99	7,92	6,88	1,07	38,19	6,1
C3	13	25,16	57,53	91,96	7,92	6,69	1,06	38,2	6,1
C3	13,5	25,15	57,54	92	7,92	7,79	1,1	38,22	6,1

Fase In corso d'opera 2									
Stazione	Profondità (m)	Temperatura (°C)	Conducibilità (mS/cm)	Ossigeno % di Sat. (%)	pH (unità)	Torbidità (FTU)	Clorofilla A (µg/l)	Salinità (ppt)	Ossigeno disciolto (mg/l)
C1	0	25,7	57,9	100,04	8,13	7,07	2,73	38,02	6,58
C1	0,5	25,69	57,88	99,77	8,13	7,29	3,06	38,02	6,56
C1	1	25,61	57,76	99,66	8,12	7,46	3,71	38	6,56
C1	1,5	25,43	57,58	98,78	8,11	7,88	4,17	38,02	6,52
C1	2	25,18	57,25	97,26	8,09	8,36	3,84	37,98	6,45
C1	2,5	24,98	56,99	94,78	8,08	8,46	3,07	37,95	6,31
C1	3	24,88	56,9	92,68	8,07	8,61	2,84	37,97	6,18
C1	3,5	24,83	56,87	91,88	8,07	8,92	2,76	37,99	6,13
C1	4	24,77	56,84	91,53	8,06	8,98	2,65	38,01	6,11
C1	4,5	24,68	56,75	91,03	8,06	9,03	2,37	38,02	6,09
C1	5	24,55	56,63	90,81	8,06	9,11	2,32	38,04	6,08
C1	5,5	24,46	56,53	90,7	8,07	9,25	2,14	38,04	6,09
C1	6	24,28	56,3	90,61	8,07	9,01	2,13	38,02	6,1
C1	6,5	24,05	56,01	90,59	8,08	8,39	1,96	38	6,12
C1	7	23,85	55,8	90,13	8,08	8,73	1,81	38	6,11
C1	7,5	23,78	55,72	90,1	8,08	9,05	1,67	38	6,12
C1	8	23,74	55,69	89,62	8,08	8,59	1,75	38,01	6,09
C1	8,5	23,66	55,61	89,54	8,09	8,55	1,67	38,02	6,09
C1	9	23,61	55,56	89,67	8,09	8,93	1,72	38,02	6,11
C1	9,5	23,56	55,5	89,68	8,09	8,23	1,78	38,02	6,11
C1	10	23,47	55,43	89,87	8,09	8,68	1,78	38,04	6,13
C1	10,5	23,39	55,34	89,8	8,09	9,03	1,69	38,04	6,14
C1	11	23,24	55,21	89,49	8,09	9,19	1,6	38,07	6,13


 Monitoraggio ambientale delle attività di dragaggio del canale di accesso del  
 Porto di Livorno ai sensi del D.M. 173/2016


Fase In corso d'opera 2									
Stazione	Profondità (m)	Temperatura (°C)	Conducibilità (mS/cm)	Ossigeno % di Sat. (%)	pH (unità)	Torbidità (FTU)	Clorofilla A (µg/l)	Salinità (ppt)	Ossigeno disciolto (mg/l)
C1	11,5	23,14	55,09	88,95	8,09	9,36	1,38	38,06	6,11
C1	12	22,92	54,86	88,75	8,09	9,19	1,23	38,07	6,11
C1	12,5	22,77	54,69	88,57	8,1	10,72	1,19	38,07	6,12
C1	13	22,7	54,66	88,64	8,1	10,68	1,2	38,11	6,13
C1	13,5	22,68	54,64	88,72	8,1	10,53	1,19	38,12	6,14
C1	14	22,65	54,63	88,73	8,1	11,04	1,13	38,13	6,14
C2	0	25,41	57,17	99,17	8,11	7,18	2,27	37,73	6,56
C2	0,5	25,34	57,28	98,79	8,11	7,54	3,01	37,86	6,54
C2	1	25,22	57,19	98,34	8,11	7,94	3,88	37,89	6,52
C2	1,5	25,09	57,02	97,63	8,1	8,04	3,87	37,88	6,49
C2	2	25	56,99	96,25	8,09	8,13	4,09	37,93	6,4
C2	2,5	24,88	56,89	95,57	8,09	8,57	3,58	37,95	6,37
C2	3	24,82	56,87	94,93	8,09	8,41	3,67	37,99	6,33
C2	3,5	24,8	56,85	94,9	8,09	8,82	3,63	38	6,33
C2	4	24,74	56,81	94,78	8,09	8,94	3,75	38,01	6,33
C2	4,5	24,68	56,75	94,45	8,09	9,09	3,51	38,02	6,31
C2	5	24,61	56,69	93,87	8,08	11,28	2,87	38,03	6,28
C2	5,5	24,51	56,6	92,48	8,08	12,69	2,4	38,05	6,2
C2	6	24,37	56,42	91,59	8,08	12,23	2,21	38,03	6,15
C2	6,5	24,33	56,4	91,08	8,08	12,34	2,16	38,06	6,12
C2	7	24,31	56,35	90,89	8,08	10,76	2,3	38,04	6,12
C2	7,5	24,27	56,3	90,88	8,08	9,56	2,35	38,03	6,12
C2	8	24,18	56,23	90,67	8,08	9,69	2,25	38,05	6,11
C2	8,5	24,05	56,1	90,35	8,08	9,03	2,27	38,06	6,1
C2	9	23,96	55,99	89,78	8,08	9,39	2,09	38,05	6,08
C2	9,5	23,66	55,58	89,76	8,09	8,53	1,86	37,99	6,11
C2	10	23,32	55,22	89,9	8,1	7,87	1,57	38,01	6,15
C2	10,5	23,05	54,92	90,11	8,1	7,7	1,4	38,01	6,19
C2	11	22,7	54,62	90,38	8,11	7,06	1,3	38,08	6,25
C2	11,5	22,4	54,28	89,94	8,11	7,49	1,2	38,08	6,25
C2	12	22,24	54,13	89,5	8,11	8,13	1,19	38,09	6,24
C2	12,5	22,11	53,92	89,08	8,11	9,05	1,03	38,05	6,23
C2	13	21,97	53,77	88,92	8,11	9,81	0,91	38,04	6,23
C3	0	25,6	57,71	98,15	8,17	4,94	1,36	37,97	6,46
C3	0,5	25,57	57,68	97,92	8,17	5,3	1,53	37,97	6,45
C3	1	25,45	57,49	97,65	8,17	5,82	2,26	37,93	6,45
C3	1,5	25,21	57,12	97,52	8,16	6,43	3,14	37,85	6,47
C3	2	25,05	57	97,97	8,15	6,28	3,61	37,89	6,51
C3	2,5	24,81	56,77	97,79	8,14	7,04	3,88	37,93	6,53
C3	3	24,61	56,64	96,72	8,12	7,83	3,76	38	6,47
C3	3,5	24,45	56,52	95,06	8,1	8,04	3,51	38,04	6,38
C3	4	24,25	56,31	93,62	8,1	7,69	3,05	38,05	6,3
C3	4,5	24,06	56,11	92,38	8,11	7,48	2,85	38,06	6,24
C3	5	23,96	55,97	91,69	8,12	7,66	2,54	38,05	6,21
C3	5,5	23,76	55,76	91,17	8,12	7,56	2,01	38,05	6,19
C3	6	23,67	55,72	90,69	8,12	7,12	2,1	38,09	6,17
C3	6,5	23,61	55,64	90,12	8,12	7,49	2,02	38,09	6,13
C3	7	23,54	55,58	89,97	8,12	7,08	1,91	38,1	6,13
C3	7,5	23,4	55,46	89,72	8,12	7,11	1,63	38,12	6,13
C3	8	23,25	55,35	89,6	8,12	6,88	1,48	38,17	6,13
C3	8,5	23,12	55,18	89,72	8,13	6,78	1,43	38,15	6,16
C3	9	22,92	54,97	89,73	8,13	6,14	1,44	38,16	6,18
C3	9,5	22,81	54,85	89,92	8,13	5,78	1,35	38,16	6,2
C3	10	22,53	54,51	89,57	8,13	5,54	1,32	38,15	6,21
C3	10,5	22,27	54,25	89,54	8,13	5,58	1,19	38,16	6,23
C3	11	22,02	54,01	89,41	8,13	5,64	1,1	38,19	6,25
C3	11,5	21,55	53,4	88,77	8,14	4,97	1,02	38,12	6,26
C3	12	21,06	52,9	88,53	8,14	4,59	0,88	38,15	6,3
C3	12,5	20,77	52,58	88,02	8,14	4,85	0,77	38,15	6,3
C3	13	20,45	52,25	87,23	8,13	4,62	0,7	38,17	6,27
C3	13,5	20,35	52,17	87,12	8,14	4,86	0,65	38,2	6,28
C3	14	20,28	52,14	86,97	8,13	5,4	0,64	38,23	6,27



Monitoraggio ambientale delle attività di dragaggio del canale di accesso del  
Porto di Livorno ai sensi del D.M. 173/2016



Fase In corso d'opera 3									
Stazione	Profondità	Temperatura	Conducibilità	Ossigeno % di Sat.	pH	Torbidità	Clorofilla A	Salinità	Ossigeno disciolto
	(m)	(°C)	(mS/cm)	(%)	(unità)	(FTU)	(µg/l)	(ppt)	(mg/l)
C1	0	15,61	46,37	93,64	8,07	9,25	0,25	37,58	7,41
C1	0,5	15,63	46,37	93,51	8,07	9,88	0,25	37,57	7,4
C1	1	15,65	46,35	93,56	8,07	9,25	0,27	37,53	7,4
C1	1,5	15,66	46,36	93,72	8,07	9,35	0,26	37,53	7,41
C1	2	15,66	46,37	93,74	8,07	9,34	0,3	37,54	7,41
C1	2,5	15,67	46,4	93,69	8,07	9,66	0,33	37,56	7,41
C1	3	15,67	46,4	93,6	8,07	9,57	0,34	37,55	7,4
C1	3,5	15,68	46,42	93,59	8,07	9,6	0,34	37,56	7,4
C1	4	15,69	46,43	93,47	8,07	9,74	0,34	37,56	7,38
C1	4,5	15,68	46,45	93,33	8,07	10,06	0,34	37,59	7,37
C1	5	15,69	46,41	93,32	8,06	9,47	0,31	37,54	7,37
C1	5,5	15,69	46,41	93,42	8,06	9,08	0,31	37,53	7,38
C1	6	15,7	46,48	93,61	8,06	10,81	0,31	37,6	7,39
C1	6,5	15,69	46,55	93,63	8,07	12,91	0,33	37,68	7,39
C1	7	15,68	46,57	93,6	8,06	13,51	0,33	37,7	7,39
C1	7,5	15,68	46,59	93,55	8,07	13,72	0,31	37,71	7,39
C1	8	15,68	46,61	93,51	8,06	13,97	0,3	37,72	7,38
C1	8,5	15,7	46,61	93,44	8,06	14,16	0,33	37,71	7,37
C1	9	15,69	46,61	93,46	8,06	14,13	0,33	37,72	7,38
C1	9,5	15,69	46,62	93,4	8,06	14,1	0,34	37,73	7,37
C1	10	15,69	46,63	93,38	8,06	14,47	0,34	37,74	7,37
C1	10,5	15,68	46,63	93,34	8,06	13,81	0,33	37,75	7,37
C1	11	15,69	46,64	93,39	8,06	13,98	0,34	37,75	7,37
C1	11,5	15,68	46,65	93,33	8,06	14,35	0,35	37,77	7,37
C1	12	15,69	46,67	93,23	8,06	14,54	0,35	37,78	7,36
C1	12,5	15,69	46,68	93,17	8,06	15	0,37	37,79	7,35
C1	13	15,69	46,69	93,12	8,06	16,32	0,35	37,8	7,35
C1	13,5	15,7	46,72	93,08	8,06	20,39	0,35	37,81	7,34
C2	0	15,62	46,59	93,41	8,09	13,65	0,39	37,78	7,38
C2	0,5	15,62	46,62	93,3	8,09	14,24	0,43	37,8	7,37
C2	1	15,65	46,63	93,12	8,09	14,12	0,39	37,78	7,36
C2	1,5	15,65	46,64	93,08	8,09	14,73	0,41	37,8	7,35
C2	2	15,65	46,66	93,1	8,09	15,95	0,38	37,81	7,35
C2	2,5	15,66	46,67	93,24	8,08	15,73	0,41	37,81	7,36
C2	3	15,66	46,67	93,34	8,08	14,92	0,46	37,81	7,37
C2	3,5	15,66	46,68	93,31	8,08	14,18	0,43	37,82	7,36
C2	4	15,66	46,69	93,31	8,08	13,66	0,41	37,83	7,36
C2	4,5	15,66	46,69	93,33	8,08	14,45	0,41	37,83	7,37
C2	5	15,66	46,7	93,38	8,08	13,29	0,39	37,84	7,37
C2	5,5	15,66	46,69	93,51	8,08	13,19	0,38	37,83	7,38
C2	6	15,66	46,71	93,55	8,08	13,82	0,41	37,83	7,38
C2	6,5	15,66	46,7	93,58	8,08	13,89	0,39	37,83	7,39
C2	7	15,66	46,7	93,62	8,08	13,33	0,39	37,83	7,39
C2	7,5	15,67	46,69	93,6	8,08	13,51	0,38	37,82	7,39
C2	8	15,68	46,69	93,61	8,08	13,5	0,4	37,81	7,39
C2	8,5	15,68	46,7	93,58	8,07	13,5	0,37	37,82	7,38
C2	9	15,66	46,7	93,58	8,08	14,22	0,37	37,83	7,39
C2	9,5	15,68	46,71	93,54	8,08	14,77	0,38	37,82	7,38
C2	10	15,66	46,72	93,52	8,07	13,62	0,36	37,85	7,38
C2	10,5	15,68	46,75	93,67	8,07	14,23	0,39	37,86	7,39
C2	11	15,68	46,73	93,71	8,07	14,49	0,41	37,84	7,39
C2	11,5	15,68	46,73	93,69	8,07	16,11	0,4	37,84	7,39
C2	12	15,68	46,72	93,74	8,07	20,79	0,4	37,83	7,4
C2	12,5	15,67	46,73	93,73	8,07	24,5	0,49	37,85	7,4
C3	0	15,68	46,61	93,26	8,07	14,23	0,35	37,74	7,36
C3	0,5	15,68	46,62	93,5	8,07	15,6	0,41	37,75	7,38
C3	1	15,69	46,67	93,56	8,07	19,74	0,46	37,78	7,38
C3	1,5	15,69	46,72	93,5	8,07	18,79	0,46	37,83	7,37
C3	2	15,69	46,74	93,49	8,07	16,48	0,43	37,84	7,37
C3	2,5	15,69	46,79	93,66	8,07	16,53	0,44	37,89	7,38
C3	3	15,69	46,82	93,7	8,07	17,99	0,46	37,92	7,39
C3	3,5	15,69	46,84	93,68	8,07	19,23	0,47	37,93	7,38
C3	4	15,69	46,84	93,6	8,07	21,04	0,49	37,93	7,38




 Monitoraggio ambientale delle attività di dragaggio del canale di accesso del  
 Porto di Livorno ai sensi del D.M. 173/2016


Fase In corso d'opera 3									
Stazione	Profondità	Temperatura	Conducibilità	Ossigeno % di Sat.	pH	Torbidità	Clorofilla A	Salinità	Ossigeno disciolto
C3	4,5	15,69	46,84	93,58	8,07	22,04	0,48	37,94	7,38
C3	5	15,69	46,85	93,62	8,07	23,17	0,48	37,94	7,38
C3	5,5	15,68	46,84	93,65	8,06	25,13	0,5	37,94	7,38
C3	6	15,68	46,86	93,66	8,07	25,23	0,51	37,95	7,38
C3	6,5	15,68	46,87	93,64	8,07	27,86	0,55	37,97	7,38
C3	7	15,69	46,87	93,64	8,06	27,36	0,53	37,97	7,38
C3	7,5	15,69	46,87	93,63	8,06	26,69	0,53	37,96	7,38
C3	8	15,68	46,88	93,62	8,06	26,23	0,52	37,98	7,38
C3	8,5	15,69	46,88	93,66	8,06	29,98	0,54	37,97	7,38
C3	9	15,68	46,88	93,68	8,06	29,9	0,6	37,98	7,39
C3	9,5	15,67	46,89	93,75	8,06	34,69	0,55	38	7,39
C3	10	15,69	46,89	93,76	8,06	30,6	0,55	37,99	7,39
C3	10,5	15,69	46,89	93,78	8,06	31,92	0,58	37,99	7,39
C3	11	15,68	46,9	93,68	8,06	34,68	0,6	38	7,38
C3	11,5	15,69	46,9	93,54	8,06	40	0,63	37,99	7,37

Fase In corso d'opera 4									
Stazione	Profondità	Temperatura	Conducibilità	Ossigeno % di Sat.	pH	Torbidità	Clorofilla A	Salinità	Ossigeno disciolto
	(m)	(°C)	(mS/cm)	(%)	(unità)	(FTU)	(µg/l)	(ppt)	(mg/l)
C1	0	15,39	46,36	93,93	8,07	11,19	0,23	37,79	7,46
C1	0,5	15,39	46,35	93,76	8,07	11,87	0,29	37,78	7,44
C1	1	15,44	46,37	93,64	8,07	12,24	0,28	37,75	7,43
C1	1,5	15,43	46,38	93,6	8,07	12,2	0,31	37,77	7,42
C1	2	15,44	46,42	93,58	8,07	12,93	0,33	37,78	7,42
C1	2,5	15,47	46,44	93,49	8,07	12,77	0,35	37,78	7,41
C1	3	15,46	46,45	93,44	8,07	12,33	0,36	37,8	7,41
C1	3,5	15,47	46,42	93,42	8,07	12,09	0,33	37,76	7,41
C1	4	15,47	46,44	93,43	8,07	12,7	0,32	37,78	7,4
C1	4,5	15,47	46,44	93,42	8,07	13,35	0,31	37,78	7,4
C1	5	15,48	46,46	93,39	8,07	13,31	0,34	37,79	7,4
C1	5,5	15,48	46,47	93,34	8,06	13,94	0,32	37,8	7,39
C1	6	15,48	46,46	93,32	8,07	13,39	0,31	37,79	7,39
C1	6,5	15,49	46,47	93,37	8,06	14,62	0,34	37,8	7,4
C1	7	15,48	46,49	93,42	8,06	15,27	0,32	37,82	7,4
C1	7,5	15,49	46,5	93,48	8,06	15,94	0,33	37,82	7,4
C1	8	15,48	46,5	93,49	8,06	14,74	0,33	37,82	7,41
C1	8,5	15,49	46,49	93,46	8,06	15,31	0,36	37,82	7,4
C1	9	15,49	46,51	93,42	8,06	15,7	0,35	37,83	7,4
C1	9,5	15,5	46,52	93,37	8,06	15,25	0,35	37,82	7,39
C1	10	15,5	46,55	93,39	8,06	16,84	0,35	37,86	7,39
C1	10,5	15,5	46,56	93,38	8,06	17,48	0,33	37,86	7,39
C1	11	15,49	46,54	93,34	8,06	16,13	0,34	37,85	7,39
C1	11,5	15,49	46,55	93,3	8,06	17,53	0,36	37,86	7,39
C1	12	15,49	46,55	93,26	8,06	16,03	0,35	37,86	7,39
C1	12,5	15,49	46,56	93,19	8,06	16,78	0,38	37,88	7,38
C1	13	15,5	46,56	93,14	8,06	16,69	0,36	37,87	7,38
C1	13,5	15,49	46,63	93,1	8,06	16,58	0,35	37,93	7,37
C2	0	15,48	46,64	95,18	8,08	19,8	0,45	37,96	7,53
C2	0,5	15,5	46,64	94,73	8,08	20,11	0,42	37,94	7,5
C2	1	15,49	46,64	94,48	8,08	21,81	0,44	37,95	7,48
C2	1,5	15,48	46,66	94,31	8,08	22,21	0,42	37,97	7,46
C2	2	15,48	46,66	94,35	8,08	20,37	0,43	37,97	7,47
C2	2,5	15,49	46,68	94,57	8,08	22,06	0,43	37,98	7,48
C2	3	15,5	46,67	94,64	8,08	21,49	0,45	37,96	7,49
C2	3,5	15,49	46,68	94,71	8,08	21,47	0,44	37,98	7,49
C2	4	15,48	46,69	95,02	8,08	22,03	0,43	38	7,52
C2	4,5	15,49	46,69	95,22	8,08	21,77	0,45	37,99	7,53
C2	5	15,48	46,69	95,43	8,08	21,52	0,46	38	7,55
C2	5,5	15,48	46,7	95,65	8,07	20,35	0,49	38,01	7,57
C2	6	15,49	46,71	95,94	8,08	20,89	0,45	38,01	7,59
C2	6,5	15,49	46,71	96,09	8,07	21,27	0,47	38,01	7,6
C2	7	15,49	46,71	96,27	8,07	21,6	0,45	38,01	7,61



Fase In corso d'opera 4									
Stazione	Profondità	Temperatura	Conducibilità	Ossigeno % di Sat.	pH	Torbidità	Clorofilla A	Salinità	Ossigeno disciolto
C2	7,5	15,48	46,71	96,41	8,07	22,63	0,5	38,02	7,63
C2	8	15,49	46,73	96,22	8,07	27,8	0,47	38,02	7,61
C2	8,5	15,49	46,73	96,19	8,08	31,55	0,49	38,03	7,61
C2	9	15,49	46,72	96,21	8,07	29,1	0,48	38,02	7,61
C2	9,5	15,49	46,74	96,45	8,07	30,57	0,51	38,03	7,63
C2	10	15,49	46,73	96,46	8,07	28,39	0,46	38,02	7,63
C2	10,5	15,5	46,72	96,27	8,07	30,15	0,46	38,01	7,61
C2	11	15,49	46,74	96,12	8,07	28,56	0,46	38,03	7,6
C2	11,5	15,49	46,73	95,76	8,07	32,6	0,45	38,03	7,58
C2	12	15,49	46,73	95,41	8,07	33,69	0,46	38,03	7,55
C2	12,5	15,5	46,74	95,42	8,07	35,7	0,48	38,02	7,55
C2	13	15,5	46,75	95,42	8,07	37,66	0,49	38,03	7,55
C3	0	15,48	46,74	92,74	8,06	10,78	0,4	38,05	7,34
C3	0,5	15,48	46,72	92,79	8,06	12,08	0,41	38,03	7,34
C3	1	15,48	46,72	92,82	8,07	13,29	0,4	38,03	7,34
C3	1,5	15,47	46,73	92,83	8,07	12,98	0,38	38,05	7,34
C3	2	15,48	46,75	92,85	8,07	13,07	0,4	38,06	7,34
C3	2,5	15,47	46,76	92,86	8,07	12,73	0,43	38,08	7,35
C3	3	15,47	46,78	92,87	8,07	11,97	0,4	38,09	7,35
C3	3,5	15,48	46,78	92,88	8,06	12,09	0,42	38,08	7,35
C3	4	15,48	46,77	92,87	8,06	12,49	0,42	38,07	7,35
C3	4,5	15,47	46,78	92,86	8,07	12,75	0,45	38,09	7,34
C3	5	15,48	46,79	92,83	8,07	13,49	0,43	38,09	7,34
C3	5,5	15,48	46,78	92,82	8,06	13,69	0,44	38,09	7,34
C3	6	15,48	46,79	92,89	8,06	13,52	0,41	38,09	7,35
C3	6,5	15,48	46,8	92,94	8,06	13,98	0,42	38,1	7,35
C3	7	15,48	46,8	92,96	8,06	13,85	0,44	38,1	7,35
C3	7,5	15,48	46,8	92,95	8,06	13,47	0,44	38,11	7,35
C3	8	15,48	46,8	92,88	8,06	14,36	0,45	38,1	7,34
C3	8,5	15,48	46,8	92,9	8,06	15,4	0,43	38,1	7,35
C3	9	15,48	46,81	92,93	8,06	15,93	0,45	38,12	7,35
C3	9,5	15,48	46,82	92,93	8,06	16,61	0,48	38,13	7,35
C3	10	15,47	46,83	92,96	8,06	17,01	0,46	38,14	7,35
C3	10,5	15,47	46,83	92,96	8,06	17,23	0,46	38,14	7,35
C3	11	15,47	46,83	92,98	8,06	17,75	0,44	38,14	7,35
C3	11,5	15,47	46,84	92,98	8,06	18,64	0,48	38,14	7,35

Fase Post operam									
Stazione	Profondità	Temperatura	Conducibilità	Ossigeno % di Sat.	pH	Torbidità	Clorofilla A	Salinità	Ossigeno disciolto
	(m)	(°C)	(mS/cm)	(%)	(unità)	(FTU)	(µg/l)	(ppt)	(mg/l)
C1	0	12,95	43,57	90,77	8,18	9,45	0,31	37,55	7,57
C1	0,5	12,98	43,57	90,78	8,17	10,97	0,4	37,53	7,57
C1	1	12,98	43,59	90,65	8,15	11,16	0,47	37,54	7,56
C1	1,5	12,98	43,61	90,41	8,13	11,67	0,49	37,56	7,54
C1	2	12,99	43,64	90,15	8,12	11,49	0,52	37,58	7,51
C1	2,5	12,99	43,62	90,04	8,11	11,57	0,57	37,56	7,51
C1	3	13	43,65	90	8,11	10,85	0,56	37,58	7,5
C1	3,5	13,01	43,67	90,1	8,1	11,19	0,54	37,59	7,51
C1	4	13,02	43,68	89,98	8,1	11,34	0,52	37,59	7,5
C1	4,5	13,01	43,7	89,95	8,09	11,79	0,6	37,62	7,49
C1	5	13,02	43,71	90,03	8,09	11,93	0,57	37,62	7,5
C1	5,5	13,01	43,69	89,96	8,09	11,95	0,59	37,6	7,49
C1	6	13	43,69	89,87	8,08	11,61	0,63	37,62	7,49
C1	6,5	13	43,7	89,87	8,08	12,92	0,61	37,62	7,49
C1	7	13	43,7	89,95	8,08	12,46	0,65	37,63	7,5
C1	7,5	13	43,7	89,87	8,08	12,01	0,62	37,62	7,49
C1	8	13	43,71	89,96	8,08	12,44	0,67	37,63	7,5
C1	8,5	13,02	43,72	90,13	8,07	12,67	0,66	37,62	7,51
C1	9	13,01	43,71	90,06	8,07	11,83	0,62	37,62	7,5
C1	9,5	13,01	43,72	90,02	8,07	12,88	0,63	37,64	7,5
C1	10	12,99	43,71	89,81	8,07	13,89	0,64	37,64	7,48
C1	10,5	13	43,69	89,82	8,07	14,51	0,59	37,63	7,49


 Monitoraggio ambientale delle attività di dragaggio del canale di accesso del  
 Porto di Livorno ai sensi del D.M. 173/2016


Fase Post operam									
Stazione	Profondità	Temperatura	Conducibilità	Ossigeno % di Sat.	pH	Torbidità	Clorofilla A	Salinità	Ossigeno disciolto
C1	11	13	43,71	89,93	8,07	13,44	0,6	37,64	7,49
C1	11,5	12,99	43,72	90,06	8,07	15,81	0,61	37,65	7,5
C1	12	13	43,72	90,05	8,06	14,04	0,6	37,65	7,5
C1	12,5	13	43,72	90,11	8,07	13,96	0,62	37,64	7,51
C1	13	13,01	43,73	90,12	8,06	14,76	0,6	37,65	7,51
C1	13,5	13	43,74	90,03	8,06	14,06	0,59	37,66	7,5
C1	14	13,01	43,76	89,96	8,06	15,97	0,63	37,67	7,49
C1	14,5	13,02	43,79	89,92	8,07	14,74	0,64	37,69	7,49
C2	0	13,43	43,48	90,03	8,1	5,8	0,34	37	7,47
C2	0,5	13,38	43,75	89,84	8,1	6,31	0,42	37,3	7,44
C2	1	13,34	43,85	89,65	8,1	6,71	0,48	37,44	7,43
C2	1,5	13,31	43,89	89,76	8,09	6,85	0,52	37,5	7,44
C2	2	13,3	43,99	89,73	8,09	7,39	0,62	37,61	7,43
C2	2,5	13,31	44,08	89,76	8,1	8,8	0,65	37,69	7,43
C2	3	13,31	44,14	89,78	8,09	8,54	0,69	37,74	7,43
C2	3,5	13,32	44,18	89,72	8,09	8,7	0,71	37,77	7,42
C2	4	13,32	44,21	89,8	8,09	8,76	0,67	37,79	7,43
C2	4,5	13,33	44,23	89,86	8,08	8,94	0,69	37,81	7,43
C2	5	13,34	44,25	89,87	8,08	8,1	0,78	37,82	7,43
C2	5,5	13,35	44,27	89,62	8,08	8,45	0,73	37,83	7,41
C2	6	13,36	44,28	89,54	8,08	8,28	0,7	37,83	7,4
C2	6,5	13,37	44,32	89,63	8,08	8,01	0,76	37,85	7,4
C2	7	13,39	44,37	89,78	8,08	8,25	0,74	37,89	7,41
C2	7,5	13,4	44,35	89,82	8,08	9,8	0,77	37,85	7,41
C2	8	13,4	44,36	89,94	8,08	9,05	0,74	37,87	7,42
C2	8,5	13,41	44,36	89,99	8,08	9,45	0,65	37,85	7,43
C2	9	13,39	44,37	89,94	8,08	9,18	0,7	37,88	7,42
C2	9,5	13,42	44,44	90	8,08	9,2	0,68	37,91	7,42
C2	10	13,46	44,5	90,1	8,08	9,31	0,68	37,94	7,42
C2	10,5	13,47	44,51	90,12	8,08	9,68	0,7	37,94	7,42
C2	11	13,47	44,52	90,15	8,08	10,26	0,63	37,94	7,43
C2	11,5	13,48	44,52	90,14	8,08	10,99	0,68	37,94	7,43
C2	12	13,49	44,54	90,09	8,08	10,59	0,71	37,94	7,42
C2	12,5	13,49	44,56	90,06	8,08	14,35	0,7	37,96	7,42
C2	13	13,5	44,6	90,02	8,08	17,91	0,75	37,98	7,41
C2	13,5	13,51	44,61	90,02	8,08	19,9	0,65	37,99	7,41
C3	0	13,47	44,28	89,75	8,11	4,21	0,32	37,72	7,41
C3	0,5	13,47	44,27	89,74	8,11	4,4	0,38	37,71	7,4
C3	1	13,47	44,3	89,62	8,1	4,38	0,52	37,74	7,39
C3	1,5	13,46	44,32	89,66	8,1	4,52	0,63	37,77	7,4
C3	2	13,46	44,34	89,68	8,1	4,51	0,72	37,77	7,4
C3	2,5	13,48	44,35	89,76	8,1	4,48	0,77	37,78	7,4
C3	3	13,48	44,38	89,85	8,1	4,97	0,86	37,81	7,41
C3	3,5	13,48	44,41	89,86	8,09	4,91	0,83	37,83	7,41
C3	4	13,49	44,44	89,9	8,09	4,89	0,79	37,86	7,41
C3	4,5	13,5	44,48	89,95	8,1	5,06	0,77	37,88	7,41
C3	5	13,51	44,5	89,99	8,09	5,03	0,71	37,89	7,41
C3	5,5	13,51	44,51	89,97	8,09	5,07	0,73	37,9	7,41
C3	6	13,51	44,52	89,94	8,09	5,3	0,7	37,91	7,4
C3	6,5	13,52	44,53	89,88	8,09	5,44	0,7	37,91	7,4
C3	7	13,51	44,54	89,89	8,09	5,54	0,74	37,92	7,4
C3	7,5	13,52	44,56	89,95	8,09	5,58	0,67	37,94	7,4
C3	8	13,53	44,56	90	8,09	6,05	0,7	37,92	7,41
C3	8,5	13,53	44,57	90	8,09	6,36	0,67	37,93	7,4
C3	9	13,55	44,63	90	8,09	7,06	0,64	37,97	7,4
C3	9,5	13,55	44,63	89,97	8,09	7,6	0,69	37,97	7,4
C3	10	13,55	44,62	89,87	8,09	7,08	0,69	37,97	7,39
C3	10,5	13,56	44,64	89,82	8,09	7,82	0,65	37,96	7,38
C3	11	13,57	44,64	89,8	8,09	7	0,68	37,97	7,38
C3	11,5	13,56	44,65	89,81	8,09	7,14	0,75	37,97	7,38
C3	12	13,56	44,65	89,8	8,09	6,68	0,68	37,98	7,38
C3	12,5	13,58	44,66	89,67	8,09	7,17	0,65	37,96	7,37
C3	13	13,58	44,66	89,57	8,09	7,61	0,68	37,97	7,36



## Considerazioni conclusive

Le concentrazioni dei solidi sospesi mostrano dei valori abbastanza uniformi nelle tre stazioni indagate e nelle varie campagne d'indagine ad eccezione di un significativo incremento nella terza campagna in corso d'opera nella stazione C1 e, in misura minore, nella stazione C2. Nella campagna post-operam le concentrazioni dei solidi sospesi misurate nelle tre stazioni risultano paragonabili a quelle registrate nella fase ante-operam.

Dal punto di vista ecotossicologico la qualità delle acque non risulta compromessa poiché i vari campioni analizzati sia quello in prossimità dell'area di dragaggio sia quelli di controllo mostrano una tossicità Assente o Bassa. In particolare si osserva una bassa tossicità nelle stazioni C1 e C3 nella fase ante-operam e nelle fasi in corso d'opera 2 e 3; nella stazione C2 ubicata in prossimità dell'area di dragaggio si osserva una bassa tossicità nella fase in corso d'opera 3 e nella fase post-operam. Nella fase post-operam anche la stazione C1 mostra una bassa tossicità. Sulla base di questi risultati pertanto, non è possibile imputare un effetto ecotossicologico anche minimo alle attività di dragaggio.

I parametri chimico-fisici delle acque rilevati con la sonda multiparametrica mostrano dei valori tipici di acque portuali in sintonia con la stagione in cui sono stati rilevati. I dati misurati non mostrano particolari differenze fra le varie stazioni indagate in quanto presentano dei valori paragonabili e relativamente costanti nel corso delle varie campagne. Per quanto concerne la torbidità, nella fase ante operam, i valori rilevati risultano compresi tra 2,4 FTU della stazione C3 e 8,99 FTU della stazione C1. Durante i lavori di dragaggio si nota un leggero incremento di torbidità nella stazione C2 in prossimità dell'area di dragaggio che diventa decisamente più elevato nella campagna in corso d'opera 4 in cui raggiunge nei livelli profondi il valore di 37,66 FTU. Anche nella stazione di controllo C3 durante la campagna in corso d'opera 3 si osserva un anomalo incremento di torbidità che negli strati profondi raggiunge il valore di 40 FTU. Nella fase post operam comunque i valori di torbidità si riducono rispetto alla precedente fase in corso d'opera mostrando dei valori compresi tra 4,2 FTU nella stazione C3 e 19,9 FTU nella stazione C2.