Prodotto n. T2.2.1

Progetto - Projet

GEREMIA - Gestione dei reflui per il miglioramento delle acque portuali

PRODOTTO T2.2.1: PIANO DI MONITORAGGIO

LIVRABLE T2.2.1: PLAN DE SURVEILLANCE

Partner responsabile - Partner responsable : Université de Toulon

Partner contributori - Partenaires contributeurs : Università di Genova, Servizi Ecologici Porto di Genova, Autorità di Sistema Portuale del Mar Ligure Orientale, Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale, Istituto per lo studio degli impatti Antropici e Sostenibilità ambiente marino.

Nome del prodotto	Redatto da:	Verificato da:	Validato da:
T2.2.1 - Piano di monitoraggio	Anna Reboa (UNIGE), Silvia Giuliani, Valentina Vitiello, Isabella Buttino (ISPRA)	Maria Elena Piccione (ISPRA), Laura Cutroneo (UNIGE)	Véronique Lenoble (UTLN), Marco Capello (UNIGE)
Data :	18/01/2019	14/02/2019	27/02/2019

Prodotto n. T2.2.1

Descrizione del Prodotto: La formulazione di un piano di monitoraggio della qualità delle acque portuali congiunto e condiviso tra i Partner permetterà di ottenere dati e risultati confrontabili nei diversi porti coinvolti. In questo prodotto, sono descritti i porti coinvolti nelle attività, il processo che ha portato alla scelta delle linee di evidenza da indagare, i materiali ed i metodi impiegati per i campionamenti e le analisi che verranno applicati per lo studio della diffusione degli inquinanti negli ambienti portuali.

Description du livrable: La formulation d'un plan de surveillance de la qualité de l'eau des ports, commun aux Partenaires, permettra d'obtenir des données et des résultats comparables dans les différents ports concernés. Dans ce produit, sont décrits les ports impliqués dans les activités, le processus qui a conduit au choix des sources de données à étudier, les matériaux et les méthodes d'échantillonnage et d'analyse qui seront appliqués pour l'étude de la diffusion des polluants dans les environnements portuaires.

Sintesi

Al fine di ottenere un indice di valutazione delle acque portuali, operando tramite il software Sediqualsoft® basato sulla valutazione di diverse linee di evidenza (Weight of Evidence approach, WOE), è stato individuato un piano di monitoraggio che permetta di ricavare risultati quali-quantitativi dalle diverse matrici presenti negli ecosistemi marini portuali, quali acqua, sedimento e biota. L'indice che si verrà ad ottenere da questo progetto tiene conto non solo di parametri chimico-fisici, ma anche biologici ed ecotossicologici. All'interno dei porti in esame, quali quelli di Genova, La Spezia, Olbia e Tolone, verranno effettuate campagne di monitoraggio, selezionando stazioni di campionamento che siano rappresentative di un gradiente di impatto antropico. Sulla matrice sedimento, verranno effettuate analisi granulometriche e test ecotossicologici; questi ultimi si realizzano in una batteria di test comprendenti analisi con batteri *Vibrio fisheri* (end-point studio della bioluminescenza), alghe monocellulari della specie *Phaeodactilum tricornutum* (end-point inibizione della crescita) ed echinoidi della specie *Paracentrotus lividus* (end-point sviluppo larvale). Inoltre, verrà analizzato il contenuto del sedimento in relazione sia a metalli che a contaminanti organici, quali IPA, PCB, tributilstagno e pesticidi organoclorurati. L'analisi chimica per il contenuto di metalli nella colonna d'acqua verrà effettuata utilizzando campionatori passivi, quali i dispositivi DGT (Diffuse Gradient in Thin film). Inoltre, allo scopo di caratterizzare la biodisponibilità degli stessi contaminanti ambientali ricercati nel sedimento, verranno svolte analisi di bioaccumulo su mitili e, solamente riguardo a metalli e IPA, anche su esemplari di mugilidi. Sulla componente biotica verranno anche svolte indagini su diversi biomarcatori, allo scopo di indentificare lo stato di salute di organismi esposti agli eventuali contaminanti presenti nell'ambiente studiato. Ulteriori parametri complementari verranno presi in esame per ottenere una completa caratterizzazione delle aree osservate, attraverso l'utilizzo di strumenti quali: sonda multiparametrica CTD (Conductivity Temperature Depth), correntometro profilatore acustico ad Effetto Doppler ADCP, drifter per lo studio della circolazione delle acque, citometria a flusso per l'analisi ottica delle particelle sospese in acqua. In aggiunta, verranno analizzati i solidi sospesi totali (TSS), il carbonio e l'azoto totali (TOC). L'impiego di criteri di integrazione

ponderata fornirà in questo modo un utile strumento per la classificazione e gestioni degli ambienti portuali.

Synthèse

Afin d'obtenir un indice d'évaluation des eaux portuaires, opéré via le logiciel Sediqualsoft® basé sur l'évaluation de différentes lignes de preuve (Weight of Evidence approach, WOE), un plan de échantillonage a été défini qui permet d'obtenir des résultats qualitatifs et quantitatifs des différentes matrices présentes dans les écosystèmes des ports marins, tels que l'eau, les sédiments et le biote. L'indice qui sera obtenu dans le cadre de ce projet tient compte non seulement des paramètres physico-chimiques, mais également des paramètres biologiques et écotoxicologiques. Dans les ports à l'étude, tels que ceux de Gênes, La Spezia, Olbia et Toulon, des campagnes de échantillonage seront menées, sélectionnant des stations d'échantillonnage représentatives d'un gradient d'impact anthropique. Sur la matrice sédimentaire, des analyses granulométriques et des tests écotoxicologiques seront effectués; ces dernières sont effectuées dans une batterie de tests comprenant des analyses avec la bactérie *Vibrio Fisheri* (étude de bioluminescence en point final), des algues unicellulaires de l'espèce *Phaeodactilum tricornutum* (inhibition de la croissance terminale) et des échinoïdes de l'espèce *Paracentrotus lividus* (développement larvaire final)). En outre, la teneur en sédiments sera analysée par rapport aux métaux et aux contaminants organiques, tels que les HAP, les PCB, les tributylétains et les pesticides organochlorés. L'analyse chimique de la teneur en métal de la colonne d'eau sera effectuée à l'aide d'échantillonneurs passifs, tels que les dispositifs DGT (Diffuse Gradient in Thin film). En outre, afin de caractériser la biodisponibilité des mêmes contaminants environnementaux que ceux recherchés dans les sédiments, des analyses de bioaccumulation seront effectuées sur les moules et, uniquement en ce qui concerne les métaux et les HAP, également sur des échantillons de mugilidés. La composante biotique sera également étudiée sur différents biomarqueurs, afin d'identifier l'état de santé des organismes exposés aux contaminants présents dans l'environnement étudié. D'autres paramètres complémentaires seront pris en compte pour obtenir une caractérisation complète des zones observées, grâce à l'utilisation d'outils tels que: sonde multiparamètre CTD (Conductivity

Temperature Depth), courantomètre acoustique ADCP à effet Doppler, dériveurs pour l'étude de la circulation de l'eau, cytométrie en flux pour l'analyse optique de particules en suspension dans l'eau. En outre, le total des solides en suspension (TSS), le carbone total et l'azote (COT) seront analysés. L'utilisation de critères d'intégration pondérés constituera ainsi un outil utile pour la classification et la gestion des environnements portuaires.

Indice

1. Definizione del piano di monitoraggio 1
2. Porti pilota 4
2.1 Porto di Genova 4
2.2 Porto di La Spezia 4
2.3 Porto di Olbia 6
2.4 Porto di Tolone 7
3. Matrici monitorate 8
3.1 Sedimento 8
3.1.1 Analisi granulometrica 9
3.1.2 Analisi chimiche: ricerca dei metalli 10
3.1.3 Analisi chimiche: ricerca di IPA, PCB, TBT e pesticidi organoclorurati 11
3.1.4 Analisi ecotossicologiche 12
3.2 Acqua 19
3.2.1 Campionatori passivi 20
3.2.2 Analisi sul biota: bioaccumulo e biomarkers mitili 22
3.2.3 Analisi sul biota: bioaccumulo e biomarkers pesci 23
3.2.4 Parametri complementari 25
4. Bibliografia 32

1. Definizione del piano di monitoraggio

Allo scopo di definire la qualità delle acque marino-costiere è stato elaborato un indice dello stato trofico (TRIX) il cui valore numerico è dato dall'integrazione di variabili quali Ossigeno disciolto, Clorofilla "a", Fosforo totale e Azoto inorganico disciolto. Le indicazioni che scaturiscono dall'applicazione del TRIX, danno informazioni inerenti alla produzione primaria degli ecosistemi marini ed esprimono le condizioni trofiche e di produttività delle aree marine costiere. Dai dati viene elaborata una scala trofica a cui corrisponde uno stato qualitativo finale. Tuttavia, questo approccio non si è rivelato in grado di fornire un quadro esaustivo della qualità delle acque marino-costiere in quanto altri fattori, quali la biodiversità, l'inquinamento chimico e fisico e l'effetto degli inquinanti sul comparto biotico (approccio eco tossicologico) devono necessariamente essere considerati per formulare un giudizio di qualità ambientale integrato che tenga conto dei risultati ottenuti dalle analisi dei parametri biotici ed abiotici.

Un modello integrato e ponderato è attualmente previsto dalla normativa italiana per la valutazione della qualità dei sedimenti marini, ai fini della loro classificazione e gestione. Tale modello si fonda sull'impiego del software Sediqualsoft®, basato sulla valutazione di diverse linee di evidenza (Weight of Evidence approach WOE).

L'obiettivo del presente progetto è definire un indice per la valutazione della qualità delle acque portuali, superando i limiti di un approccio tabellare a favore dell'impiego di criteri di integrazione ponderata. Il TRIX e gli altri indici già individuati nelle normative nazionali potranno essere capitalizzati per elaborare un modello, basato sull'integrazione di differenti linee di evidenza, che tenga conto di parametri chimico-fisici, ecotossicologici e biologici e che sia in grado di definire un indice integrato per le aree portuali pilota.

Per il raggiungimento di tale obiettivo si è reso necessario elaborare un piano di monitoraggio da applicare in ciascuno dei 4 porti pilota individuati: Genova, La Spezia, Olbia e Tolone. Per ogni porto, si è proceduto valutando sia i dati pregressi disponibili, sia le caratteristiche dell'area marina ricompresa nell'ambito portuale, riservando particolare attenzione a quei porti dove vi è la coesistenza di pressioni di origine antropica (presenza di scarichi, traffico navale, cantieristica, attività militari, diporto) e di bersagli sensibili, quali gli organismi presenti negli impianti di acquacoltura.

Ad eccezione del porto di Genova, sia nella rada della Spezia che nei porti di Olbia e Tolone, sono presenti numerosi impianti di allevamento di bivalvi (in particolare mitili) che rappresentano potenziali bersagli di eventuali contaminazioni di origine antropica, sia proveniente da terra che legata al transito navale.

Successivamente, si è provveduto ad individuare le linee di evidenza necessarie alla costruzione del modello.

Tale processo ha comportato in una prima fase l'individuazione di numerose linee di evidenza che erano state ritenute utili per caratterizzare le diverse matrici ambientali. Successivamente si è provveduto a valutare la fattibilità delle analisi elencate, al fine di giungere alla definizione di un adeguato piano di monitoraggio che fosse un buon compromesso tra le esigenze legate al progetto a la replicabilità nei porti pilota e nell'area transfrontaliera.

In Tab.1 si riporta l'elenco completo delle analisi da effettuare, comprensivo del numero di stazioni e campagne da effettuare per ciascun porto pilota.

La tabella è stata suddivisa in due macrosezioni, la prima relativa alle analisi da effettuare sui sedimenti, la seconda dedicata alle indagini da effettuare sulla colonna d'acqua che prevedono anche il controllo degli organismi. Il piano di monitoraggio permetterà di acquisire informazioni sulla qualità fisico-chimica-biologica ed ecotossicologica dei sedimenti e della colonna d'acqua, incluso lo studio del bioaccumulo di contaminanti e analisi di biomarker in organismi indicatori (quali mitili e mugilidi).

Nei 4 porti pilota verranno realizzate indicativamente n. 2 campagne di misura, utili a valutare la variabilità dell'area. Le indagini verranno effettuate in media su 3 stazioni per porto la cui posizione verrà scelta secondo un principio di gradiente tra la zona maggiormente impatta e l'area meno influenzata dalle diverse pressioni che insistono sul sito pilota.

I risultati analitici verranno inseriti nel modello e verrà valutata la risposta di quest'ultimo alla combinazione delle diverse linee di evidenza, con l'obiettivo individuare i requisiti minimi per lo sviluppo di un nuovo Indice Integrato applicabile in tutti i porti.

Tab.1 – Linee di evidenza per la definizione del piano di monitoraggio

					CAMPAGNE DI MISURA			
	LINEE DI EVIDENZA	PARAMETRI	SPECIFICHE	N° STAZIONI	La Spezia	Olbia	Tolone	Genova
SEDIMENTI	Analisi chimico-fisiche	Granulometria	ghiaia (> 2 mm); sabbia (2 mm < x < 0,063 mm); pelite (silt: 0,063 mm < x < 0,004 mm + argilla: < 0,004 mm).	3	2	2	2	2
		Metalli	As, Cd, Cr tot, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn (Cr VI, V, Al, Fe parametri aggiuntivi da valutare caso per caso)	3	2	2	2	2
		Idrocarburi policlici aromatici	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 e loro sommatoria	3	2	2	2	2
		Policlorobifenili	Congeneri: PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, PCB 101, PCB 118, PCB 126, PCB 128, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180 e loro sommatoria	3	2	2	2	2
		Composti organostannici	Monobutil, Dibutil, Tributilstagno e loro Sommatoria	3	2	2	2	2
		Pesticidi organoclorurati	Aldrin, Dieldrin, Endrin, alfa–HCH, beta–HCH, gamma–HCH (Lindano), DDD, DDT, DDE (per ogni sostanza la somma degli isomeri 2,4 e 4,4), HCB, eptacloro epossido	3	2	2	2	2
	Saggi biologici ex situ	batteria di 3 saggi	Vibrio fishery su fase solida, crescita algale, paracentrotus lividus embriotossicità	3	2	2	2	2
COLONNA D'ACQUA	Analisi chimiche	Ricerca dei metalli nella frazione disciolta		3	2	2	2	2
		DGT - metalli		3				
	Bioaccumulo mitili	Metalli	As, Cd, Cr tot, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn (Cr VI, V, Al, Fe aggiuntivi)	3	2	2		2
		Idrocarburi policlici aromatici	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 e loro sommatoria	3	2	2		2
		Policlorobifenili	Congeneri: PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, PCB 101, PCB 118, PCB 126, PCB 128, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180 e loro sommatoria	3	2	2		2
		Composti organostannici	Monobutil, Dibutil, Tributilstagno e loro Sommatoria	3	2	2		2
		Pesticidi organoclorurati	Aldrin, Dieldrin, Endrin, alfa–HCH, beta–HCH, gamma–HCH (Lindano), DDD, DDT, DDE (per ogni sostanza la somma degli isomeri 2,4 e 4,4), HCB, eptacloro epossido	3	2	2		2
	Biomarker mitili		Metallo tioneine, sistema neurotossicità (acetilcolinesterasi), danno DNA (micronuclei), sistema lisosomiale, sistemi immunitari, in aggiunta sistemi ossidanti, proliferazione perossisomiale)	3	2	2		2
	Bioaccumulo pesci	metalli	As, Cd, Cr tot, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn (Cr VI, V, Al, Fe aggiuntivi)		2	2		2
		organici	IPA e forse Organostannici		2	2		2
	Biomarker pesci		Sistema di biotrasformazione citocromo P450, micronuclei e indici istopatologici di branchia e fegato		2	2		2
	Parametri complementari di supporto, specifici per singola area	nutrienti (DOC,TN,PO4)		3	2	2	2	2
		CTD		3	2	2	2	2
		TSS - torbiltà		3	2	2	2	2
		TOC		3	2	2	2	2
		flew cytometry		3	2	2	2	2
		ADCP (correntometro)		3	2	2	2	2

2. Porti pilota

2.1 Porto di Genova

Nel porto di Genova le stazioni verranno posizionate in tre aree (Fig.1): il bacino Porto Vecchio che è la parte più interna del porto e soggetta principalmente agli scarichi dei rii cittadini e al traffico dei traghetti; l'entrata di levante del porto, interessata dalle attività di cantieristica navale, dal diportismo e dall'ingresso delle acque del torrente Bisagno e l'entrata di Ponente, antistante la foce del torrente Polcevera e le acciaierie di Cornigliano.



Fig.1 – Inquadramento del porto di Genova

2.2 Porto di La Spezia

All'interno della rada della Spezia coesistono attività di vario tipo: oltre al porto mercantile ubicato nella parte più interna della rada, sono presenti un arsenale militare, diversi cantieri navali e porticcioli turistici. All'interno della rada sfociano circa una trentina di corsi d'acqua buona parte dei quali sono fonte di contaminazione ambientale. Come riportato in Fig.2 sono

inoltre presenti un impianto di itticoltura presso la località Le Grazie e diversi vivai adibiti alla molluschicoltura sia sul versante interno sia sul versante esterno della diga foranea. In tale contesto, poiché il sito è già oggetto di indagine nell'ambito del progetto Interreg Marittimo Italia-Francia 2014-2020 Se.D.Ri.Port., si è stabilito di effettuare le analisi nelle stesse tre stazioni individuate per Se.D.Ri.Port., di cui due posizionate in corrispondenza del Molo Fornelli e Molo Garibaldi rispettivamente ed una nell'insenatura di Cadimare. La quarta stazione verrà invece posizionata in prossimità dell'imboccatura di Levante e verrà utilizzata come punto di controllo in quanto risente in misura minore delle pressioni che insistono sull'intera rada.

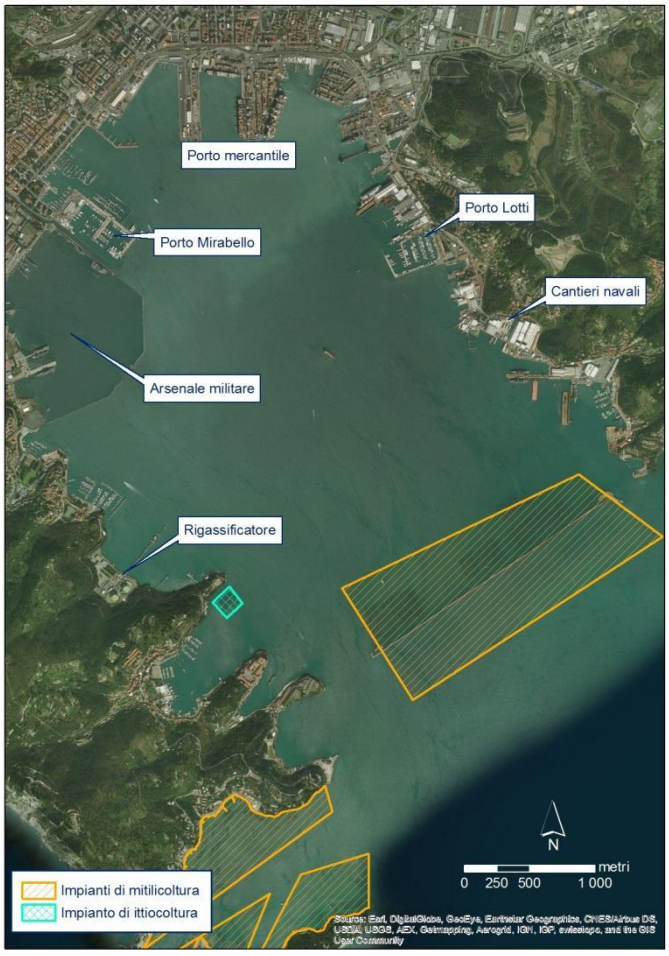


Fig.2 – Inquadramento della Rada di La Spezia

2.3 Porto di Olbia

Il porto di Olbia si sviluppa all'interno di una RIAS costiera (Fig.3), caratterizzata da insenature profonde. All'interno del golfo sono presenti due scali principali: il primo in corrispondenza di Isola Bianca, destinato alle attività commerciali ed all'attracco delle navi traghetto, il secondo, in area Scalo Cocciani avente funzione di porto industriale. Le acque del porto di Olbia sono, inoltre, influenzate dai numerosi fiumi e torrenti che sfociano all'interno della RIAS stessa, di cui il più importante è il fiume Padrongianus dove confluiscono anche le acque reflue di due impianti di depurazione. All'interno del golfo, inoltre, sono presenti diversi impianti di mitilicoltura. Analogamente a quanto stabilito per il porto di Tolone e la rada di La Spezia, anche per il porto di Olbia le stazioni di campionamento sono state posizionate nelle stesse aree indagate per il progetto Se.D.Ri.Port. Sono pertanto state selezionate tre aree di indagine: una antistante Isola Bianca, l'altra nell'area centrale del golfo al largo della foce del Padrongianus e per il controllo la zona più esterna, all'imboccatura del Golfo.



Fig.3 – Inquadramento del porto di Olbia

2.4 Porto di Tolone

Il porto di Tolone (Fig. 4) è per buona parte caratterizzato dalla presenza di aree militari, a cui si affiancano aree adibite al traffico passeggeri e, nella parte più esterna, zone in cui sono presenti impianti di acquacoltura. Anche per tale sito, come già specificato per La Spezia, in un'ottica di capitalizzazione dei risultati del progetto Se.D.Ri.Port., si è stabilito di identificare almeno tre aree soggette in vario modo alle pressioni antropiche e posizionare le stazioni di prelievo secondo un transetto di costa largo a partire dalla banchina adibita all'attracco dei traghetti. La parte più esterna, dove sono presenti gli impianti di mitilicoltura, può essere utilizzata come punto di controllo.

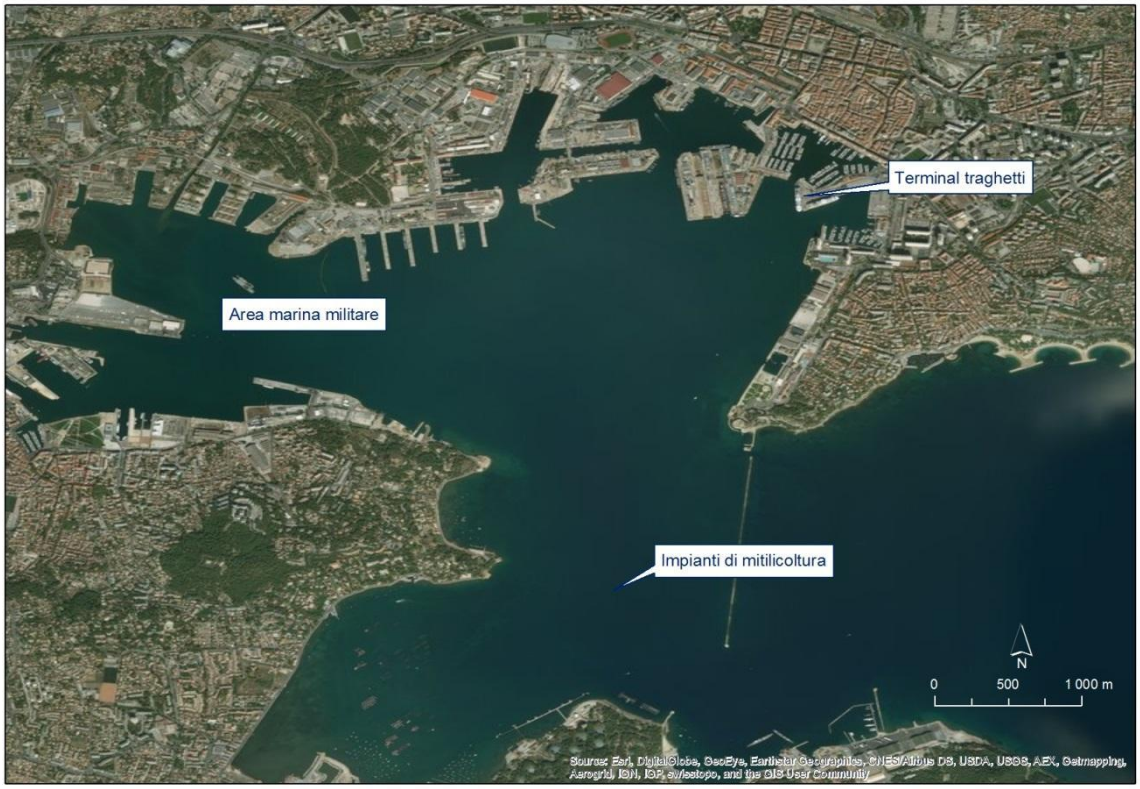


Fig.4 – Inquadramento del porto di Tolone

3. Matrici monitorate

3.1 Sedimento

Il sedimento è in grado di fornire importanti informazioni sullo stato ambientale di un sito, in quanto si tratta di una matrice conservativa capace di intercettare e trattenere parte degli inquinanti provenienti dalla colonna d'acqua. Nelle realtà portuali i sedimenti sono spesso caratterizzati dalla presenza di diversi contaminanti legati alle realtà antropiche che vi insistono, quali ad esempio cantieri navali, impianti industriali, terminal turistici, terminal commerciali, realtà di interesse militare, oltre alla presenza di vari scarichi e rii che sfociano all'interno del bacino.

La valutazione della qualità del sedimento in ambito portuale deve essere condotta attraverso l'esecuzione di una serie di analisi chimiche, fisiche ed ecotossicologiche scelte in base alla conoscenza delle attività antropiche che insistono sul bacino.

Per il progetto GEREMIA, in considerazione delle caratteristiche delle realtà portuali selezionate, dove coesistono molte delle suddette attività antropiche, si è stabilito di effettuare le seguenti indagini:

- analisi granulometrica
- ricerca di metalli (As, Cd, Cr tot, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn e Cr VI, V, Al, Fe aggiuntivi)
- ricerca di IPA (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 e loro sommatoria
- ricerca dei congeneri: PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, PCB 101, PCB 118, PCB 126, PCB 128, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180 e loro sommatoria
- ricerca del composto organostannico Tributilstagno
- ricerca di pesticidi organoclorurati (Aldrin, Dieldrin, Endrin, alfa–HCH, beta–HCH, gamma–HCH (Lindano), DDD, DDT, DDE (per ogni sostanza la somma degli isomeri 2,4 e 4,4), HCB, eptacloro epossido)
- test ecotossicologici: *Vibrio fischeri* su fase solida, crescita algale con *Phaeodactylum tricornutum*, embriotossicità sull'echinoide *Paracentrotus lividus*.

In ciascun porto verranno effettuate due campagne di misura, nel corso delle quali verranno eseguite indicativamente tre stazioni di campionamento dove verrà prelevato un quantitativo di sedimento superficiale sufficiente all'esecuzione di tutte le analisi.

Il prelievo del sedimento verrà eseguito mediante l'impiego di una benna Van Veen da 5 litri (Fig.5). Il sedimento recuperato dovrà essere miscelato al fine di rendere omogeneo il campione e successivamente trasferito in opportuni contenitori e conservato a -20°C per le analisi chimiche e a + 4 fino alla preparazione dell'elutriato o comunque fino all'esecuzione delle prove ecotossicologiche sul tal quale.



Fig.5 – Benna Van Veen

3.1.1 Analisi granulometrica

Le analisi granulometriche sul sedimento verranno condotte nei laboratori di ISPRA.

Lo studio delle caratteristiche tessiturali di un sedimento fornisce importanti informazioni circa la potenziale disponibilità di inquinanti. Numerosi contaminanti sia organici che inorganici tendono ad adsorbirsi sulle particelle a tessitura fine mentre, altre tipologie si distribuiscono nell'acqua interstiziale del sedimento. Le informazioni provenienti dalle analisi granulometriche permettono quindi di valutare in modo più corretto i differenti tenori di inquinanti.

Le analisi verranno condotte su campioni di circa 70 g che, per facilitare la separazione dei granuli dovranno essere preliminarmente trattati con una soluzione di perossido di idrogeno ed acqua distillata (1:8) per 48 h a temperatura ambiente. Per la separazione della frazione fine verrà utilizzato un setaccio di maglia da 63 µm ed acqua distillata. Le due frazioni così ottenute verranno essiccate in stufa a 60 °C e successivamente pesate.

Per vagliare la frazione più grossolana (> 63 µm) costituita da sabbia e ghiaia, verranno utilizzate pile di setacci da 2000, 1000, 500, 250, 125 e 63 µm della serie ASTM.

Al termine della vagliatura verranno pesate le singole frazioni e calcolate le diverse percentuali rispetto al totale.

3.1.2 Analisi chimiche: ricerca dei metalli

La ricerca dei metalli verrà eseguita nei laboratori di ISPRA.

I metalli pesanti quali arsenico, cadmio, cromo, mercurio, nichel, piombo, tallio, vanadio, che convenzionalmente hanno una densità maggiore di 4,5 grammi per centimetro cubo, sono presenti in ambiente sia per cause naturali quali erosione dei suoli, eruzioni vulcaniche, sia per cause antropiche principalmente legate al fallout di fonderie, raffinerie, inceneritori di rifiuti, attività minerarie e utilizzo di combustibili fossili. I metalli pesanti sono inquinanti che, anche in basse concentrazioni, possono indurre effetti negativi sull'ambiente e sull'uomo. I metalli, quali nichel, cadmio e piombo, tendono ad accumularsi nei tessuti inducendo effetti tossici di vario tipo. Inoltre, alcuni fattori quali pH, sostanza organica, potenziale di ossidoriduzione e salinità, possono influenzare la forma chimica del metallo variandone la biodisponibilità.

La quantificazione dei metalli pesanti e della loro forma chimica unitamente alla disponibilità nei confronti del biota, è quindi una delle linee di evidenza più importanti da considerare nella valutazione dello stato di un ambiente.

Un campione di circa 0.3 g di sedimento essiccato verrà 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_3 (65%) e di 1 mL di HCl (30%) e 2 mL di H_2O ultrapura. Il campione, dopo essere stato mineralizzato, dovrà essere portato a un volume finale di 25 mL mediante l'aggiunta di acqua ultrapura. La determinazione verrà 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 saranno condotte mediante l'utilizzo di Spettroscopia ad Assorbimento Atomico (metodo dei Vapori Freddi; Cetac M-7600). L'accuratezza della metodica verrà valutata impiegando il materiale standard di riferimento LGC 6137 (Promochem) processato con le stesse modalità dei campioni. In Tab.2 si riportano il limite di rilevabilità della metodica ed il limite di quantificazione per ogni metallo analizzato.

Tab.2 – Limiti di rilevabilità e di quantificazione per ciascun metallo ricercato

	Rilevabilità (mg/L)	Quantificazione (mg/kg)
Al	0.078	6.50
As	0.0005	0.0441
Cd	0.00004	0.0029
Cr	0.0061	0.512
Cu	0.0035	0.2951
Hg	0.0004	0.0001
Ni	0.0071	0.5907
Pb	0.0036	0.2998
V	0.027	2.2499
Zn	0.1672	13.93

3.1.3 Analisi chimiche: ricerca di IPA, PCB, TBT e pesticidi organoclorurati

Le indagini sono svolte da ISPRA con il supporto di ARPA Liguria.

Un fattore di disturbo antropico di rilievo è apportato dagli inquinanti organici persistenti (Persistent Organic Pollutants, POPs) ai quali appartengono IPA, PCB e pesticidi organo clorurati unitamente i composti organo stannici (OTS) quali i TBT. I POPs sono caratterizzati da emivite

ambientali molto lunghe dovute ad un'elevata stabilità chimica. La loro resistenza ai processi di degradazione ambientale e le loro caratteristiche lipofiliche, insieme a una notevole persistenza biologica, determina un elevato potenziale per il bioaccumulo e per la biomagnificazione lungo le catene trofiche.

Il tributilstagno (TBT), è oggi considerato come uno dei composti più tossici prodotti e diffusi in ambiente per un ampio range di organismi, inclusi gli esseri umani; uno degli effetti tossici più noti è il fenomeno della mascolinizzazione dei gasteropodi, ossia la comparsa di caratteri sessuali maschili nelle femmine dei molluschi, mentre nei vertebrati sono stati documentati effetti nocivi di vario tipo tra cui danni al sistema endocrino e interferenze nel metabolismo lipidico.

Il tributilstagno (TBT) presente nell'ambiente marino ed in particolare quello portuale, è un potente biocida impiegato nelle vernici antivegetative applicate ad imbarcazioni o sulle strutture sommerse. Recenti studi evidenziano che a tutt'oggi le concentrazioni maggiori sono generalmente presenti nelle zone ad alta densità di traffico marittimo, quali darsene, aree di rimessaggio e porti (Boscolo et al., 2004; Sousa et al., 2012).

I composti organostannici tendono ad accumularsi nel sedimento a causa dell'alta affinità per la frazione organica ed inorganica. La frazione argillosa riveste un ruolo fondamentale nell'adsorbimento degli organostannici ed è strettamente dipendente dalla disponibilità di potenziali siti leganti dell'argilla e dal pH: esso viene favorito da pH neutri, mentre valori di pH inferiori o superiori a 7 inducono un processo di desorbimento, con conseguente rilascio del contaminante nella matrice acquosa (Hoch and Schwesig, 2004).

L'analisi di composti organici persistenti nel sedimento è stata quindi giudicata fra le linee di evidenza di maggiore interesse nella strutturazione del progetto.

3.1.4 Analisi ecotossicologiche

I saggi ecotossicologici verranno eseguiti da ISPRA.

I saggi biologici sono prove di laboratorio o in situ, in cui un organismo o stadi vitali di esso vengono esposti ad una matrice da analizzare, per un periodo prestabilito, al fine di valutarne eventuali effetti tossici. I saggi vengono inseriti sempre più frequentemente nelle normative nazionali con l'ottica di colmare parte della lacuna dovuta all'assenza del comparto biologico

negli approcci metodologici precedenti. Le analisi ecotossicologiche danno importanti informazioni circa la biodisponibilità dei contaminanti analizzati, evidenziando effetti sinergici o antagonisti, oltre a rilevare la presenza di xenobiotici non analizzati. Inoltre, i risultati dei saggi possono essere facilmente integrati alle risultanze chimico-fisiche e biologiche fornendo una visione completa della qualità ambientale di un luogo.

Nell'ambiente marino i contaminanti si distribuiscono in diversi modi ed in relazione alle caratteristiche di polarità, solubilità etc. si possono fissare ai granuli di sedimento, nell'acqua interstiziale o nella colonna d'acqua. Nella progettazione di uno studio ambientale che include i saggi, l'approccio ottimale è quello multi-matrice, multi-specie, ovvero testare diverse matrici quali sedimento, elutriato, acqua etc. impiegando diversi organismi appartenenti a diversi livelli trofici, diverse vie di esposizione, diverso stadio vitale e diversi end-points di studio.

Tale approccio permette di coprire quanto possibile le variabili dovute alla differenza di uptake da parte degli organismi e del "*modus operandi*" dei diversi contaminanti. La batteria che viene utilizzata nel progetto GEREMIA è strutturata con batteri *Vibrio fisheri* (end-point studio della bioluminescenza), alghe monocellulari della specie *Phaeodactilum tricornutum* (end-point inibizione della crescita) ed echinoidi della specie *Paracentrotus lividus* (end-point sviluppo larvale).

Mentre il saggio con *V. fischeri* sarà condotto sul sedimento tal quale, i saggi con *P. tricornutum* e *P. lividus* verranno condotti sull'elutriato ottenuto da ciascun sedimento. 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 (USEPA/USACE, 1991) come nei dragaggi portuali, nei siti di discarica, ecc.

L'elutriato viene preparato in accordo con il protocollo standard USEPA/USACE (1991) combinando in peso quattro parti di acqua filtrata prelevata da una zona non contaminata con una parte di sedimento. Il tutto viene messo ad agitare per 1 h a 400 giri/min. La fase liquida viene quindi raccolta e centrifugata per 20 min a 3500 giri/min. Subcampioni di surnatante vengono 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 (NO_3 e PO_4) della fase liquida (Clementson e 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.

Vibrio fisheri

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

Il sistema Microtox® è un test biologico di tossicità acuta basato 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.

Nel progetto GEREMIA si è stabilito di applicare il saggio al sedimento tal quale (su fase solida). La fase solida da sottoporre ad analisi è preparata per semplice centrifugazione refrigerata (3500 rpm a 4°C per 30'), eliminando successivamente l'acqua interstiziale come sovranatante. L'emissione della bioluminescenza è misurata all'interno del luminometro termostatato M500, dotato di pozzetti termostatati a 15 °C per i controlli e i campioni e a 4°C per il reagente.

I metodi che verranno utilizzati sono riconducibili al protocollo standard ISO 11348 (2007), applicando il protocollo Solid Phase Test (SPT) con la procedura Large Sample Method (Azur Environmental, 1995), organizzato con 9-12 diluizioni e 3 controlli a seconda della granulometria del campione. Il test prevede una prima esposizione di 20 minuti durante i quali i batteri si trovano a diretto contatto con il sedimento ed una seconda fase di ulteriori 10 minuti in cui la risospensione batterica viene incubata nel luminometro.

La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, verrà elaborata mediante un software dedicato (Microtox OmniTM v. 1.16) e permetterà il calcolo del risultato espresso in EC50 (concentrazione del campione cui corrisponde una riduzione della bioluminescenza pari al 50%). La EC50 verrà ulteriormente elaborata, esprimendola come TU (Unità Tossiche = 100/EC50), che consentono di ottenere una relazione diretta fra tossicità e riduzione della bioluminescenza e come Sediment Toxicity Index (S.T.I.) e 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 inferiore ad 1 mm e poiché la componente naturale della tossicità è funzione della frazione pelitica, il valore di tale frazione, determinato mediante analisi granulometrica (condotta secondo la metodica riportata sopra) verrà utilizzato per esprimere il risultato del saggio nella scala S.T.I. (ICRAM-APAT, 2007).

Tab.3 – Scala di tossicità acuta utilizzata nel saggio biologico mediante V. fischeri

Indice S.T.I.	Tossicità
S.T.I. ≤ 3	**Assente/trascurabile**
3 < S.T.I. ≤ 6	**Presente**
6 < S.T.I. ≤ 12	**Elevata**
S.T.I. > 12	**Molto elevata**

Phaeodactylum tricornutum

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). 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 (USEPA, 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 sovranatante o interstiziale.

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 (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).

Il saggio di inibizione della crescita algale con *P. tricornutum* sarà applicato ad elutriati da sedimenti preparati secondo le modalità riportate sopra.

Il saggio biologico viene eseguito sull'elutriato non diluito (100%) seguendo i protocolli ARPAT (1998), Passarelli e Sbalchiero (2005) e ISO 10253 (2006), con alcune modifiche specifiche.

Un'aliquota della coltura di inoculo viene 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 x 10^3 e 1,2 x 10^4 cells/mL, viene quindi distribuita in piastre monouso sterili a 24 pozzetti (ARPAT, 1998; Passarelli and Sbalchiero 2005; ISO 10253, 2006) e posta per 72h in camera termostatica a 20 ± 2°C, con regime di illuminazione continua del tipo cool white e con una intensità compresa tra 7.000 e 8.000 lux.

In contemporanea, vengono effettuati un controllo negativo con acqua di mare e un controllo positivo con dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) per controllare la procedura e la sensibilità del test.

Al termine del prefissato periodo di incubazione viene determinata la densità algale di ogni replicato.

Le densità cellulari registrate al termine del test verranno comparate con la concentrazione cellulare iniziale.

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

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

Per esprimere il giudizio di tossicità viene utilizzata la scala di valutazione riportata nella tabella basata sulla percentuale di Inibizione registrata testando l'elutriato all'100%.

Tab.4 – Scala di tossicità utilizzata nel saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*.

Inibizione crescita algale	Tossicità
I ≤ -50%	**Biostimolazione**
-50% < I < 20%	**Assente/Trascurabile**
20% ≤ I ≤ 50%	**Moderata**
50% ≤ I≤ 80%	**Alta**
80% < I ≤ 100%	**Molto Alta**

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, 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 (Giuliani et al., 2004; Sartori et al., 2017). Recentemente è stato pubblicato un manuale ISPRA che illustra le metodologie per i saggi di embriotossicità e di spermiotossicità con *P. lividus* (Sartori et al., 2017).

La matrice ambientale soggetta alla valutazione ecotossicologica con questo saggio biologico è l'elutriato. L'elutriato viene testato sia non diluito (100%) che diluito, con acqua di mare filtrata a 0,45 µm alle concentrazioni finali del 50% e 25%.

Esemplari adulti sessualmente maturi di riccio di mare *P. lividus* saranno raccolti tra settembre e maggio (Fenaux, 1968) da fondali rocciosi del litorale di Livorno in una zona distante da fonti di inquinamento antropico (scarichi urbani e industriali) ad una profondità tra 1 e 3 m. L'emissione dei gameti sarà indotta tramite iniezione di 0,5 mL di KCl 0,5 M attraverso la membrana peristomale.

Poiché la fase vera e propria del test consiste nell'esporre gli zigoti ai campioni da testare, una fase preliminare prevederà l'unione di una aliquota di sospensione spermatica con la sospensione di uova in un rapporto spermatozoi:uova di 10:1 al fine di ottenere gli zigoti. Dopo 20 minuti, il saggio verrà condotto esponendo 1 mL di soluzione di zigoti a 9 mL della soluzione test (elutriato) in cella termostatica al buio a 18 °C±1 per 72h.

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

La stima della percentuale di plutei normali è effettuata al microscopio invertito contando 100 larve per replicato.

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:

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

in cui

X=% di plutei malformati campione da testare,

Y=% 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'EC20 e dell'EC50 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 nella tabella che segue, al fine di esprimere un giudizio sulla qualità del campione in esame (ICRAM-APAT, 2007).

Tab.4 – Scala di tossicità utilizzata nel saggio biologico con *Paracentrotus 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, i valori di EC50 vengono ottenuti utilizzando due metodi statistici differenti: il Trimmed Spearman-Karber (Hamilton et al.,1978) e la Probit Analysis (Finney, 1971). Il valore dell'EC50 indica la concentrazione della sostanza di prova ($Cu(NO_3)_2x3H_2O$, 1000 mg/L) che causa un' effetto tossico sul 50% degli embrioni rispetto al controllo negativo.

3.2 Acqua

L'acqua rappresenta un comparto che per la sua dinamicità risulta notevolmente complesso da studiare. Al fine di approcciarsi correttamente all'analisi di questa matrice, devono essere raccolte numerose informazioni che, appositamente elaborate, sono in grado di evidenziare fattori di stress che ne causano la perdita di qualità. A tal proposito nel progetto GEREMIA viene privilegiata l'analisi della chimica sulla colonna d'acqua tramite lo studio di campioni puntuali e di campionatori passivi ed il biota tramite lo studio di organismi sentinella quali bivalvi filtratori (mitili) e pesci.

Pesci e molluschi bivalvi costituiscono infatti degli ottimi bioindicatori in studi di bioaccumulo che, sfruttando la loro capacità di concentrare quantità di inquinanti relativamente elevate anche da soluzioni diluite, segnalano la presenza di inquinanti in ambienti nei quali la loro concentrazione nell'acqua è inferiore ai limiti di sensibilità dei metodi analitici comunemente usati (Beone e Ravera, 2003). Inoltre, su tali tipologie di bioindicatori, possono essere condotte indagini a livello molecolare, cellulare, istologico, morfologico e fisiologico allo scopo di verificare eventuali variazioni indotte da uno o più contaminanti; tali alterazioni (biomarkers) (Fossi, 2001; Bianchi e Morri, 2003) possono anticipare i cambiamenti nei più alti livelli dell'organizzazione biologica (popolazioni, comunità, ecosistemi) (Sandulli, 2004), di conseguenza, sono dei rapidi indicatori degli effetti biologici, dovuti ai contaminanti chimici, che si verificano più lentamente nel corso del tempo (Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville, 2006).

Per un quadro dettagliato delle metodiche di indagine che verranno applicate su pesci (mugillidi) e mitili (bioaccumulo e biomarkers) si veda il prodotto T2.2.2 - Metodologia di indagine da applicare ai bioindicatori e metalli.

Infine, all fine di completare il quadro conoscitivo del comparto acqua, sono stati inseriti nello studio anche parametri complementari quali nutrienti, conducibilità, temperatura e torbidità, solidi sospesi, TOC e oltre a citometria a flusso e VIPP.

3.2.1 Campionatori passivi

Nel campo ambientale, i cosiddetti sensori passivi sono di grande interesse perché consentono di studiare l'accumulo di un inquinante in un dato periodo, che può variare da poche ore a poche settimane. Il loro principio si basa su una prima fase di accumulazione attraverso una fase di riconoscimento degli elementi mirati, seguita da una fase di estrazione più una quantificazione in laboratorio. Un nuovo tipo di sensore passivo conosce una grande affinità per il dosaggio degli elementi metallici grazie alla sua flessibilità di implementazione e al suo basso costo: si tratta dei sistemi detti DGT (Diffuse Gradient in Thin film, dispositivi di gradiente di diffusione in strato sottile) (Davison and Zhang, 1994).

Un dispositivo DGT è composto da un supporto su cui è depositata una resina chelante, che consente l'adsorbimento delle specie bersaglio, associate ad un idrogel (Fig. 6). La diffusione, controllata dalle proprietà fisiche del gel e dalla concentrazione di metallo nel mezzo da

campionare, determina la cinetica dell'accumulo sulla resina. Ciò consente di collegare la quantità di metallo accumulato alla concentrazione dei cosiddetti metalli "labili" (frazione assimilabile) presenti nel campione da analizzare. Dopo un tempo di accumulo definito, i sistemi DGT vengono recuperati, aperti e solo la resina chelante viene conservata nell'acido al fine di estrarre i metalli in traccia per ulteriori analisi (Fig. 7) (Zhang and Davison, 1995). Queste diverse fasi possono introdurre un rischio non trascurabile di contaminazione, quindi è una manipolazione molto delicata.

Il successo dei DGT deriva in parte dal loro basso costo che consente loro di essere utilizzati come materiali di consumo. Inoltre, la parte accumulata è solitamente considerata correlata con la frazione biodisponibile dei metalli presenti nell'ecosistema considerato (Caillat et al., 2014, Han et al., 2014).

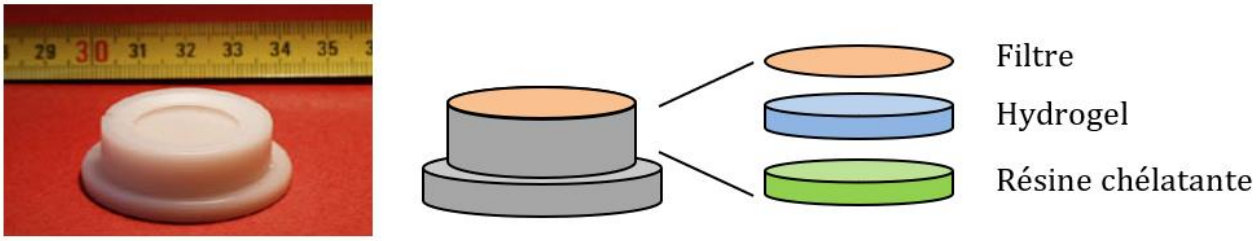


Figure 6. Schema di un dispositivo DGT.

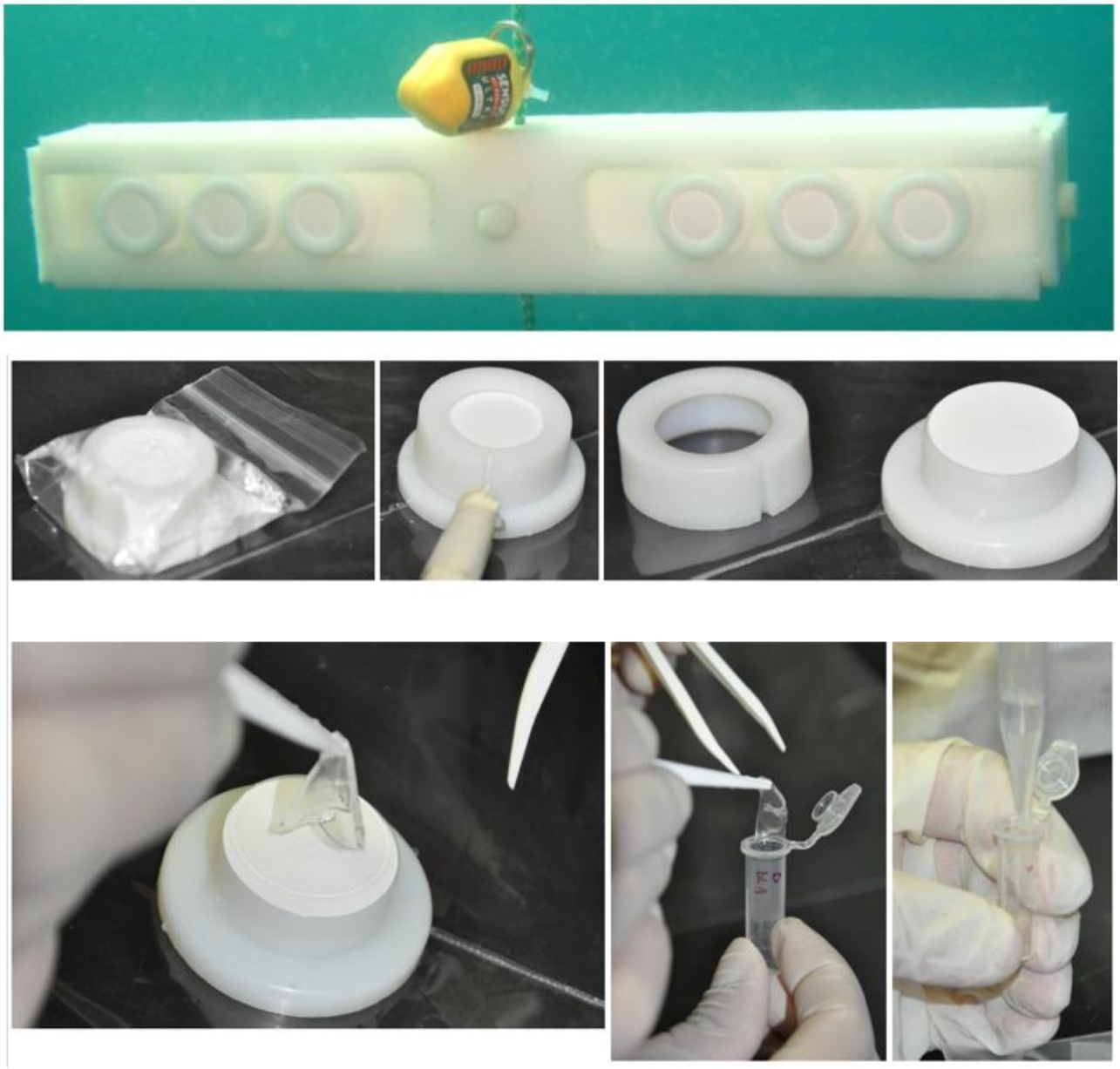


Figure 7. DGT installati nella colonna d'acqua e fasi del recupero prima dell'analisi.

3.2.2 Analisi sul biota: bioaccumulo e biomarkers mitili

I pesci possiedono molteplici caratteristiche che li rendono buoni bio-indicatori e fanno si che siano una scelta adeguata a uno studio di bio-monitoraggio. Tra queste caratteristiche si possono considerare: l'anatomia, la fisiologia e l'etologia tra le meglio conosciute e studiate in letteratura in ambiente acquatico; i cicli vitali lunghi; la facilità di campionamento; l'ampio range di tolleranza ai cambiamenti ambientali e capacità di bio-accumulo degli inquinanti; la facile identificazione e l'ampia distribuzione. Tra i pesci, i mugilidi rivestono un ruolo ecologico

importante negli ambienti marini costieri, in quanto mantengono un contatto molto stretto e frequente con il sedimento. In particolare, *Mugil cephalus* (cefalo comune o muggine) è particolarmente frequente negli ambienti portuali e si tratta di una specie molto utilizzata in studi di monitoraggio o studi tossicologici, e quindi ben documentata in letteratura, grazie al suo ampio range di tolleranza a variazioni dei parametri ambientali. Questi fattori rendono *Mugil cephalus* il candidato ideale per uno studio di monitoraggio sulla qualità delle acque portuali.

Le indagini sui pesci sono svolte da UNIGE con il supporto dell'Università Politecnica delle Marche (DISVA).

L'impiego dei molluschi bivalvi filtratori nel monitoraggio della contaminazione chimica degli ambienti costieri viene effettuato da decenni ed è molto diffuso. Tra i principali vantaggi relativi all'utilizzo di mitili nella valutazione del grado di contaminazione dell'area costiera mediante l'impiego del Mussel Watch c'è la possibilità di evidenziare gradienti di inquinamento sia in senso spaziale che temporale ed effettuare confronti tra aree geograficamente distanti". Il Mussel watch fornisce una stima della "biodisponibilità" delle sostanze tossiche presenti nell'ambiente marino e permette la valutazione del rischio legato al trasferimento di xenobiotici attraverso le reti trofiche. L'ampia applicazione e conoscenza delle metodiche di studio degli organismi filtratori, per l'investigazione di un sistema difficilmente monitorabile e poco conservativo quale la colonna d'acqua è stato quindi giudicato come una linea di evidenza fondamentali.

Le indagini sui mitili sono svolte da ISPRA con il supporto dell'Università Politecnica delle Marche (DISVA).

3.2.3 Analisi sul biota: bioaccumulo e biomarkers pesci

Questa parte dell'indagine utilizza come organismi bioindicatori specie ittiche locali e dove possibile stanziali. Le analisi di bioaccumulo e dei biomarkers in questi organismi aumentano la valenza ecologica dello studio evidenziando possibili impatti sul biota residente ed eventuali ripercussioni, anche a lungo termine, sullo stato di salute e la qualità di queste risorse biologiche che spesso non rimangono confinati nella sola area portuale, ma possono bensì fungere da carrier per una possibile "migrazione" della contaminazione.

La specie selezionata per il campionamento è *Mugil cephalus*, in quanto molto presente nelle aree portuali, facilmente campionabile formando banchi estesi e conosciuto in letteratura. I pesci verranno pescati tramite lenza o rete e sacrificati tramite dislocazione cervicale, come da linee guida della Comunità Europea (European Commission, 1997). Immediatamente dopo il decesso, verrà effettuato un prelievo di sangue per la produzione di uno striscio ematico e seguirà la dissezione dei campioni. I campioni di fegato necessari per le analisi chimiche verranno tenuti in ghiaccio e successivamente congelati. I campioni per l'istopatologia (fegato e branchia) verranno immediatamente fissati in una soluzione di Bouin e acido acetico (20:1). I campioni di fegato e bile per le analisi molecolari verranno immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

Durante il campionamento, sarà necessario mantenere i pesci vivi in mare all'interno di reti, fino al momento del sacrificio, per evitare anossia e variazioni di temperatura, che potrebbero alterare i tessuti. L'acido acetico dovrà essere conservato in un contenitore termicamente isolato fino al momento dell'utilizzo, in quanto congela a temperatura ambiente (17°). Utilizzare sempre gli appositi guanti per maneggiare: acido acetico, liquido di Bouin e azoto liquido.

I pesci verranno campionati nei porti di Genova, La Spezia e Olbia. Oltre ai siti pilota, è stato scelto di campionare i pesci anche in un sito "esterno", cioè un allevamento di "cefali", per avere un set di dati corrispondenti ad un "bianco", cioè dati di campioni provenienti da un ambiente non fortemente antropizzato come i porti. Pertanto, contemporaneamente ai pesci prelevati nel porto di Olbia, verranno campionati anche quelli della Laguna di Oristano o di Orbetello.

In laboratorio, i campioni ematici, previa asciugatura, saranno fissati in metanolo e colorati in soluzione di Giemsa, per essere poi analizzati al microscopio ottico per la determinazione della frequenza dei micronuclei. Trascorse 24 h dal campionamento, i campioni di fegato e branchia per l'istopatologia verranno portati in etanolo 70% e, dopo almeno 24 h, verranno inclusi in paraffina. Si procederà poi al taglio del materiale incluso, per produrre vetrini con sezioni da 4 µm che saranno colorati con Ematossilina e Eosina. I vetrini saranno successivamente analizzati e fotografati al microscopio ottico, e verrà prodotto un indice di salute degli organi (fegato e branchia) per ciascun pesce, secondo il protocollo descritto nel prodotto T2.2.2.

Un campione di fegato, prelevato per ciascun pesce e conservato a -20°C, verrà analizzato per quantificare il bio-accumulo di metalli e IPA. Inoltre, per ciascun pesce, verrà analizzato un campione di fegato per determinare l'attività enzimatica del citocromo P450, mentre la cistifellea verrà utilizzata per analizzare i metaboliti biliari.

Tutti i passaggi che richiedono l'utilizzo di etanolo, metanolo e Bio-Clear dovranno essere effettuati sotto cappa a flusso laminare. La paraffina da usare per le inclusioni dovrà essere mantenuta in una stufa a 50°C per poter rimanere allo stato liquido; sarà necessario non riempire completamente i contenitori con la paraffina solida, in quanto, nel passaggio allo stato liquido, l'espansione del materiale provocherebbe la fuoriuscita dal contenitore. Si consiglia di filtrare le soluzioni di Ematossilina e Eosina prima dell'utilizzo giornaliero.

3.2.4 Parametri complementari

Il carico di nutrienti che raggiunge la fascia costiera rappresenta l'elemento causale fondamentale che determina il livello di intensità e la distribuzione della biomassa microalgale. Il nitrato, che in ambiente marino costituisce la componente di gran lunga principale della frazione dell'azoto inorganico disciolto, gioca in ogni caso un ruolo importantissimo nel processo di eutrofizzazione, la sua presenza nelle acque costiere è fortemente correlata con le portate fluviali. Molti porti sono collocati in golfi spesso interessati dall'immissione di torrenti che raccolgono le acque di drenaggio di zone agricole trattate con prodotti fertilizzanti azotati. I porti, per la loro conformazione semichiusa, favoriscono l'accumulo di nutrienti (piuttosto che inquinanti di vario genere) che possono permanere in loco per più tempo rispetto ad altri tratti costieri. La frazione che non viene impiegata dal fitoplancton, raggiunge il fondale dove viene mineralizzata. L'azoto minerale potrà rientrare nel ciclo in caso di risospensione dovuta a movimenti idrodinamici, dragaggio dei sedimenti o altro.

Sonda multiparametrica CTD (Conductivity Temperature Depth)

Misure dei parametri chimico-fisici della colonna d'acqua verranno realizzate tramite sonda multiparametrica CTD (Fig. 6). Nello specifico, sarà utilizzata una sonda CTD che permetterà di ottenere i profili verticali dell'andamento di diversi parametri lungo la colonna d'acqua:

temperatura, salinità, conducibilità, densità, torbidità e clorofilla. Le calate verranno effettuate in tutte le stazioni di campionamento individuate all'interno dei porti pilota.

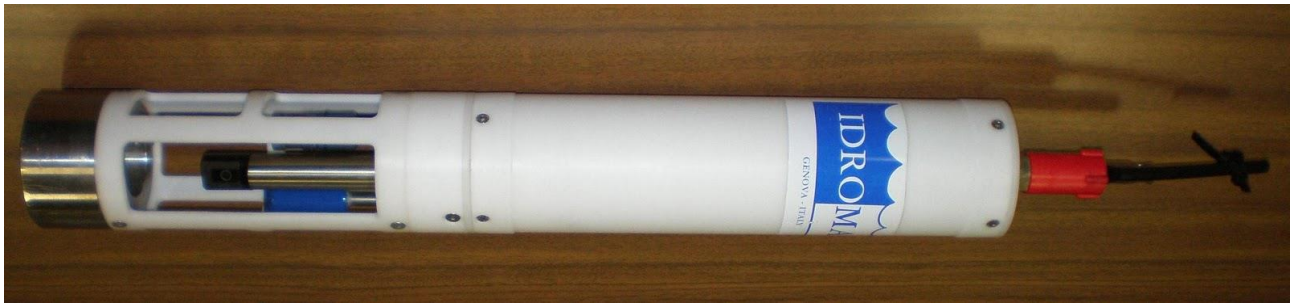


Fig. 6 – Esempio di sonda multiparametrica CTD.

Solidi sospesi totali (TSS)

In laboratorio, prima di iniziare le attività di filtrazione, i filtri di acetato di cellulosa sono pre-pesati, numerati e stoccati per le operazioni da svolgere successivamente alle campagne in mare.

Le operazioni di pesatura dei filtri "vergini" avvengono immettendo gli stessi in un apposito forno essiccatore a ventilazione forzata per 3 ore a 60-65°C e, successivamente, riportati a temperatura ambiente in essiccatori, quindi pesati; le operazioni di pesatura sono effettuate con una bilancia elettronica di precisione a cinque cifre decimali Scaltec SBC21 (precisione ± 1 µg).

I campioni di acqua prelevati lungo la colonna d'acqua nelle stazioni di misura sono conservati a 4 °C e successivamente in laboratorio, quantità note d'acqua campionata vengono filtrate attraverso filtri Millipore di acetato di cellulosa (Æ 47 mm e porosità 0.45 µm) allo scopo di concentrare i solidi sospesi (TSS) in essa contenuto.

Per evitare di introdurre errori di misura dovuti alle diverse condizioni atmosferiche-ambientali al momento della pesatura, si conservano a parte alcuni filtri "bianchi" (solitamente due, uno all'inizio e l'altro alla fine di ogni giornata di campionamento): la loro variazione di peso, rispetto a quello calcolato in partenza, serve a determinare la correzione (positiva o negativa) da apportare al peso dei filtri con campione nella determinazione dei TSS.

Tutti i filtri utilizzati per la filtrazione dei campioni d'acqua sono quindi trattati per la determinazione delle quantità (in peso) di materiale sospeso (nelle frazioni totale "TSS", inorganico "I" ed organico "O").

I filtri sono quindi asciugati, sempre con un forno, ad una temperatura di 60-65°C per 3 ore e quindi, per riportarli a temperatura ambiente, posti in un essiccatore per 30'. A questo punto i filtri sono pesati: la differenza tra il peso riscontrato ed il peso iniziale (filtri vergini) determina la quantità di TSS. I filtri, successivamente alla pesatura, sono poi inseriti in crogioli di ceramica precedentemente tarati con la seguente procedura. I crogioli vengono puliti con un pennellino per eliminare i residui di precedenti analisi presenti all'interno; successivamente i crogioli sono posti in muffola (forno termostatato) a 550°C e vi rimangono per 30' dal momento in cui è raggiunta tale temperatura; trascorsi i 30' la muffola viene spenta e aperta e dopo 15' i crogioli sono tolti e disposti in un essiccatore per circa 30-40'; trascorso tale lasso di tempo i crogioli vengono pesati con una bilancia elettronica di precisione a cinque cifre decimali Scaltec SBC21 (precisione ± 1 µg). Questa procedura è ripetuta almeno tre volte, fino ad ottenere per ciascun crogiolo variazioni di peso (tra una pesata e l'altra) inferiore a 0.00030 g: il peso medio delle 3 o più pesate viene quindi assunto come peso finale del crogiolo.

I filtri inseriti nei crogioli sono sciolti con alcune gocce di acetone e posti in muffola a 550°C per 3 h 30' al fine di eliminare per combustione la frazione organica (O). Infine, i crogioli, opportunamente raffreddati in essiccatore, sono pesati e, per differenza con il loro peso "a vuoto", è determinato il peso della frazione inorganica (I): una semplice differenza (TSS - I) permette poi di determinare il peso della parte organica bruciata (O).

TOC

Le analisi del carbonio e dell'azoto totale saranno eseguite su uno strumento TOC-VCSH (Shimadzu), dotato di un campionatore automatico ASI-V. Il contenuto di carbonio viene analizzato a 720 °C in presenza di un catalizzatore di ossidazione, perle di allumina rivestite di platino. Questo passaggio rende possibile la volatilizzazione di tutte le forme di carbonio contenute nel campione di CO2 e il flusso continuo di O2 porterà la CO2 formata verso un deumidificatore e una trappola alogena prima di raggiungere la cella di rilevamento a infrarossi. Per il TN, il campione viene analizzato mediante combustione catalitica ad alta temperatura

(720 °C). Il NO formato reagirà quindi con l'ozono per formare NO2 nello stato eccitato e verrà quindi rilevato dalla chemiluminescenza dopo la diseccitazione di NO2.



Fig. 7 – Apparecchio TOC-VCSH (Shimadzu).

Citometria a flusso

La citometria a flusso è un metodo di analisi ottica delle particelle, inclusa l'analisi dei microrganismi che vivono nell'acqua. Si basa sulla circolazione di un fluido che guida le particelle una ad una davanti a un raggio laser (λ = 488 nm). Il principio è studiare la diffusione e le proprietà di fluorescenza naturale o indotta dei microrganismi in modo che possano essere identificati e classificati. A tal fine, sono necessari diversi sensori: il primo è un sensore che rileva la luce a angoli piccoli chiamata FSC ed è un proxy della dimensione della particella. Il secondo chiamato SSC è un sensore di diffusione a angoli più grandi per comprendere la complessità interna di una particella. L'ultimo set di sensori viene utilizzato per particelle fluorescenti. Per discriminare i microorganismi marini, tre sensori sono utilizzati principalmente a seconda delle lunghezze d'onda rilevate: FL1 per fluorescenza verde (per

esempio batteri, dopo l'etichettatura), FL2 fluorescenza per giallo/arancione, e FL3 per fluorescenza rossa (per es. l'autofluorescenza dei pigmenti di fitoplancton).

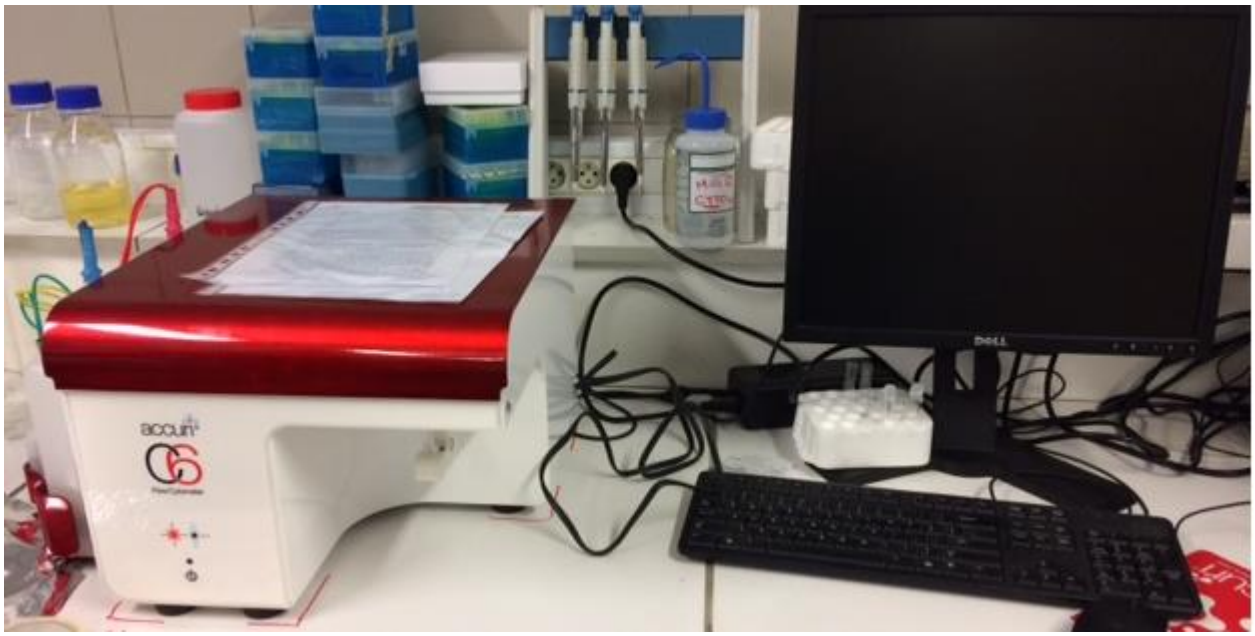


Fig. 8 – Apparecchio usato per l'analisi della citometria a flusso.

Correntometro profilatore acustico ad Effetto Doppler ADCP

La misurazione della corrente marina verrà effettuata tramite correntometro profilatore acustico di corrente ad Effetto Doppler (ADCP) 600 kHz della RD Instruments (Fig. 9). Lo strumento sarà mantenuto immerso subito sotto la superficie del mare (circa 0.5 m di profondità) per il tempo necessario (indicativamente 5 minuti) a registrare i dati di corrente (intensità, direzione e verso) in ogni stazione di misura. Ove possibile, lo strumento, dotato dell'applicazione Bottom Track, verrà fissato a scafo dell'imbarcazione utilizzata per i campionamenti (Fig. 9), e le misure verranno quindi effettuate in continuo lungo transetti a coprire tutta l'area di indagine. Il funzionamento dell'ADCP prevede la suddivisione della colonna d'acqua in celle di misura, in numero e dimensione variabile in base alla frequenza di funzionamento dello strumento ed alla profondità che si intende raggiungere con le misurazioni; all'interno di queste celle lo strumento effettua una serie di misure e ne restituisce il valore medio con la relativa deviazione standard. Per i porti in cui verrà effettuata la misura delle correnti tramite ADCP, verrà quindi definita l'impostazione della dimensione delle celle

più idonea in base alla morfologia del fondale e alle massime profondità raggiunte dai fondali all'interno dei bacini coinvolti.

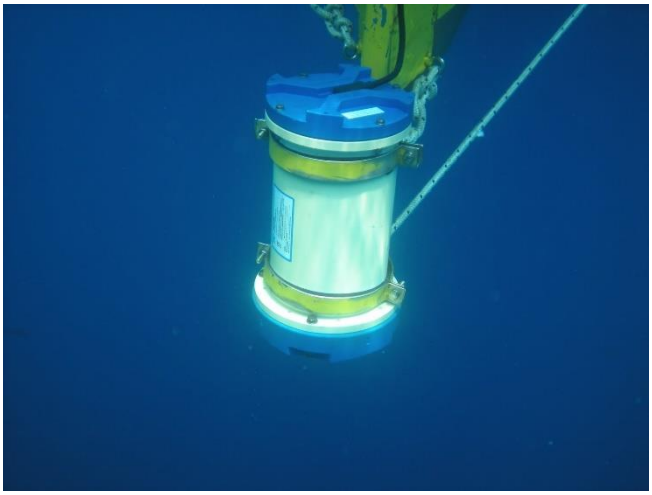


Fig. 9 – Correntometro ADCP a scafo.

Nei pressi dell'imboccatura della Rias del Porto di Olbia verrà posizionato un correntometro ADCP, per la misura della corrente lungo la colonna d'acqua. Tale strumento, farà parte della rete di monitoraggio del progetto. I dati rilevati dallo strumento potranno anche essere utilizzati per le calibrazioni e validazioni dei modelli.

Rilascio di Drifter per lo studio della circolazione delle acque e posizionamento ADCP in punto fisso

All'interno del porto di Olbia si rilasceranno dei correntometri lagrangiani, noti come Drifter, muniti di sistema di rilevamento posizione e trasmissione dati, che galleggiando in superficie misurano le correnti nei primi strati della colonna d'acqua (Fig. 10). Questi strumenti saranno recuperati dopo circa 5 ore dal momento del loro rilascio.

I Drifter sono di dimensioni ridotte, di materiale plastico galleggiante e del peso inferiore ai 3 kg.



Fig. 10 – Drifter.

4. Bibliografia

- Aizdaicher, N.A., Malynova, S.I., Khristoforova, N.K., 1999. Effect of detergents on microalgal growth. Russ. J. Mar. Biol., 25(3): 234-238.
- ARPAT, 1998. Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico. 191 pp.
- ASTM E1563, 1995. Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- ASTM E 1563, 2004. Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Azur Environmental, 1995. Microtox® Acute Toxicity Comparison & Inhibition Test, 30 pp.
- Beone, G.M., Ravera O., 2003. Vantaggi e limiti del monitoraggio ambientale mediante l'analisi chimica dei Lamellibranchi. Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol., 80: 79-84.
- Bianchi, C.N., Morri, C., 2003. Indicatori biologici ed ecologici nell'ambiente marino. In: Ferretti O. (ed), Studi per la creazione di strumenti di gestione costiera: Golfo del Tigullio. ENEA, Centro Ricerche Ambiente Marino, La Spezia: 111-120.
- Boscolo R., Cacciatore F., Berto D., Marin M.G., Giani M., 2004. Contamination of natural and cultured mussels (Mytilus galloprovincialis) from the northern Adriatic Sea by tributylin and dibutyltin compounds. App. Organometallic Chem., 18: 614-618.
- Caillat, A., Ciffroy, P., Grote, M., Rigaud S., Garnier, J-M., 2014. Bioavailability of copper in contaminated sediments assessed by a DGT approach and the uptake of copper by the aquatic plant Myriophyllum aquaticum. Environ. Toxicol. Chem., 33, 278–285.
- Carr, R.S., and Chapman D.C., 1995. Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests - Extraction, storage, and handling techniques. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 28: 69-77.
- CETAC M-7600 Mercury Analyzer Manual. https://www.environmental-expert.com/files/7782/download/456685/38-M7600_Op_Manual.pdf

- 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.
- Davison, W.; Zhang, H., 1994. In Situ Speciation Measurements of Trace Components in Natural Waters Using Thin-Film Gels. Nature, 367 (6463), 546. https://doi.org/10.1038/367546a0.
- Dos Santos, M.M., Moreno-Garrido, I., Gonsalves, F., 2002. An in situ bioassay for estuarine environments using the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Envir. Toxicol. Chem., 21: 567-574.
- Environment Canada, 1992. Biological test method: fertilization assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars). Environmental Protection Series, EPS 1/RM/27, Ottawa, Canada.
- Fenaux, L. 1968. Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *A. lixula*, *P. lividus* et *P. microtuberculatus* (Echinides) à Villefranche-Sur-Mer. Vie et Milieu, 19: 1–52.
- Finney, L., 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, London, UK.
- Fossi, M.C., 2001. Biomarkers: strumenti di diagnosi e prognosi ecotossicologica dell'ambiente marino costiero. Biol. Mar. Medit., 8 (2): 146-154.
- 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.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1978. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol., 12: 714-720.
- Han, S., Zhang Y., Masunaga S., Zhou S., Naito W. 2014. Relating metal bioavailability to risk assessment for aquatic species: Daliao River watershed, China. Environ. Poll., 189, 215-22.
- Hoch M., Schwesig D., 2004. Parameters controlling the partitioning of tributyltin. App. Geochem., 19: 323-334.

- ICES, 1997. International Council for the Exploitation of the Sea. Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment.
- ICRAM-APAT, 2007. Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini www.isprambiente.it
- 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 10253, 2006. Water quality – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. UNI-EN-ISO 10253. ISO, Genève, Switzerland.
- ISO 11348, 2007. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). ISO, Genève, Switzerland.
- Khristoforova, N.K., Zhuravel, E.V., Nedorostkova, I.G., 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: 108-121.
- Krainykova, A.N. 1988. Biotesting in the water preservation from pollution. In: The Methods of Water Biotesting. Tscernogolovka, 4-21 (In Russian).
- Lewis, M.A., 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. Envir. Pollut., 87: 319-336.
- Morelli, E., Marangi, M.L., 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, L.M., Blasco, J., 2007. Sediment toxicity tests involving immobilized microalgae (*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin). Envir. Int., 33: 481-495.
- Nash, S.M.B., Quayle, P.A., Schreiber, U., Müller, J.F., 2005. The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. Aquat. Toxicol., 72: 315-326.

- Okay, O.S., 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.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville M.P., 2006. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 50: 361–369.
- Sandulli, R., 2004. Il ruolo degli indicatori biologici nella valutazione dello stato dell'ambiente marino. Biol. Mar. Medit., 11 (2): 185-192.
- Sartori, D., Macchia, S., Vitiello, V., Morroni, L., Onorati, F., Pellegrini, D., 2017. ISPRA, Quaderni – Ricerca Marina n. 11/2017. A cura di Macchia S., Sartori D., Roma, pp 60.
- Sousa, A.C.A., Oliveira, I.B., Laranjero, F., Takahashi, S., Tanabe, S., Cunha, M.R., Barroso, C.M., 2012. Organotin levels in Nazaré canyon (west Iberian Margin, NE Atlantic) and adjacent coastal area. Mar. Pollut. Bull., 64: 422–426.
- Passarelli, P., Sbalchiero, A. 2005. Test di inibizione algale con *Selenastrum capricornutum* o *Pseudokirchneriella subcapitata*". IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici – ISSN : 1125-2464.
- USEPA/USACE, 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal: Testing manual. EPA-503/8-91/001, Office of Water, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS.
- USEPA, 1974. Marine algal assay procedure: bottle test. EPA-660/3-75-008, U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis.
- USEPA, 1988. Protocols for short-term toxicity screening of hazardous waste sites. Greene, J.C., Bartels, C.L., Warren-Hicks, W.J., Parkhurst, B.R., Linder, G.L.; S.A. Peterson and W.E. Miller (eds). Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/3-88/029 (NTIS PB88235510), 1988.
- USEPA, 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. Klemm, D.J., Morrison, G.E.,

Norberg-Ring, J.J., Peltier, W.H., Heber, M.A., U.S. Environmental Protection Agency. Report EPA-600/4-91/003, Cincinnati, OH: 483 pp.

- USEPA, 1995. QA/QC Guidance for Sampling and analysis of sediments, water, and tissues for dredged material evaluations (chemical evaluations). EPA 832-B-95-002. Office of Water, Washington, D.C.
- USEPA, 2000. "Method 6010C (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry," Revision 3. Washington, DC.
- Zhang, H.; Davison, W., 1995. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. Analyt. Chem., 67, 3391–3400.
- Zhuravel, E., Markina, Z., Aizdaicher, N., 2009. Growth and physiological state of the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyta) in the water taken from Peter the Great Bay. Ocean Sci. J., 44(3): 173-179.