

Progetto - Projet

GEREMIA - Gestione dei reflui per il miglioramento delle acque portuali - Gestion des eaux usées pour l'amélioration des eaux portuaires



PRODOTTO T2.2.1: PIANO DI MONITORAGGIO

LIVRABLE T2.2.1: PLAN DE SURVEILLANCE

Partner responsable : Université de Toulon

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 – Plan de surveillance	Anna Reboa (UNIGE), Silvia Giuliani, Valentina Vitiello, Isabella Buttino, (ISPRA)	Sara Dastoli, Maria Elena Piccione (ISPRA), Laura Cutroneo (UNIGE)	Véronique Lenoble (UTLN), Marco Capello (UNIGE)
Data:	18/01/2019	14/02/2019	27/02/2019

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.

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.

Synthèse

Afin d'obtenir un indice d'évaluation des eaux portuaires, opéré via le logiciel Sediqualssoft® basé sur l'évaluation de différentes sources de données (Weight of Evidence approach, WOE), un plan de échantillonnage 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 échantillonnage 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 *Phaeodactylum 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, instrument 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.

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 fischeri* (end-point studio della bioluminescenza), alghe monocellulari della specie *Phaeodactylum 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

Prodotto n. T2.2.1

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 gestione degli ambienti portuali.



Interreg



UNION EUROPEENNE
UNIONE EUROPEA



MARITTIMO-IT FR-MARITIME

Fonds européen de développement régional
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale

Produit n. T2.2.1

Index

1. Définition du plan de surveillance	1
2. Ports pilotes	5
2.1 Port de Gênes.....	5
2.2 Port de La Spezia.....	5
2.3 Port d'Olbia.....	7
2.4 Port de Toulon.....	8
3. Matrices monitorées	9
3.1 Sédiments	9
3.1.1 Analyse granulométrique.....	10
3.1.2 Analyse chimique : détection des métaux.....	11
3.1.3 Analyse chimique : détection des HAP, PCB, TBT et pesticides organochlorés.....	13
3.1.4 Tests écotoxicologiques	14
3.2 L'eau.....	21
3.2.1 Échantillonneurs passifs	22
3.2.2 Analyse du biote : bioaccumulation et biomarqueurs de moules	24
3.2.3 Analyse du biote : bioaccumulation et biomarqueurs de poissons	25
3.2.4 Paramètres supplémentaires	27
4. Bibliographie.....	35

1. Définition du plan de surveillance

Afin de définir la qualité des eaux marines et côtières, on a élaboré un indice d'état trophique (TRIX) dont la valeur numérique est donnée par l'intégration de variables telles que l'oxygène dissous, la chlorophylle- α , le phosphore total et l'azote inorganique dissous. Les indications qui résultent de l'application de TRIX, donnent des informations inhérentes à la production primaire des écosystèmes marins et expriment les conditions trophiques et la productivité des zones marines côtières. A partir de ces données, une échelle trophique est élaborée à laquelle correspond un état de qualité final. Toutefois, cette approche n'a pas permis de présenter une description exhaustive de la qualité des eaux marines côtières, car d'autres facteurs, tels que la biodiversité, la pollution chimique et physique et l'effet des polluants sur le compartiment biotique (approche éco-toxicologique) doivent nécessairement être pris en compte afin de formuler un jugement intégré sur la qualité de l'environnement qui tienne compte des résultats obtenus à partir de l'analyse des paramètres biotiques et abiotiques.

Un modèle intégré et pondéré est actuellement prévu par la législation italienne pour l'évaluation de la qualité des sédiments marins, pour leur classification et leur gestion. Ce modèle repose sur l'utilisation du logiciel Sediqualssoft®, basé sur l'évaluation de différentes sources de données (approche Weight of Evidence WOE).

L'objectif de ce projet est de définir un indice pour l'évaluation de la qualité des eaux portuaires, en dépassant les limites d'une approche tabulaire au profit de l'utilisation de critères d'intégration pondérés. Le TRIX et les autres indices déjà identifiés dans les réglementations nationales peuvent être capitalisés pour élaborer un modèle, basé sur l'intégration de différentes sources de données, qui prend en compte les paramètres chimiques-physiques, écotoxicologiques et biologiques et qui est capable de définir un indice intégré pour les zones portuaires pilotes.

Afin d'atteindre cet objectif, il était nécessaire de développer un plan de surveillance à appliquer dans chacun des 4 ports pilotes identifiés : Gênes, La Spezia, Olbia et Toulon. Pour chaque port, nous avons procédé à l'évaluation des données antérieures disponibles et des caractéristiques de la zone marine comprise dans la zone portuaire, en accordant une attention particulière aux

ports où coexistent des pressions anthropiques (présence de rejets, trafic maritime, construction navale, activités militaires, navigation de plaisance) et des cibles sensibles, telles que les organismes présents dans les installations d'aquaculture.

À l'exception du port de Gênes, dans la rade de La Spezia ainsi que dans les ports d'Olbia et de Toulon, il existe de nombreuses installations d'élevage de bivalves (en particulier de moules) qui représentent des destinations potentielles pour une éventuelle contamination d'origine anthropique, tant à partir de la terre que du transit naval.

Ensuite, les sources de données nécessaires à la construction du modèle ont été identifiées.

Ce processus a impliqué, dans une première phase, l'identification de plusieurs sources de données considérées comme utiles pour caractériser les différentes matrices environnementales. Ensuite, la faisabilité des analyses énumérées a été évaluée, afin de définir un plan de surveillance adéquat qui soit un bon compromis entre les besoins du projet et la reproductibilité dans les ports pilotes et dans la zone transfrontalière.

Le tableau 1 présente la liste complète des analyses à effectuer, y compris le nombre de stations et de campagnes à réaliser pour chaque port pilote.

Le tableau a été divisé en deux macro-sections, la première relative aux analyses à effectuer sur les sédiments, la seconde consacrée aux investigations à mener sur la colonne d'eau, qui prévoient également le contrôle des organismes. Le plan de surveillance permettra d'acquérir des informations sur la qualité physico-chimico-biologique et écotoxicologique des sédiments et de la colonne d'eau, y compris l'étude de la bioaccumulation des contaminants et l'analyse des biomarqueurs dans les organismes indicateurs (tels que les moules et les mugilidés).

Dans les 4 ports pilotes, environ 2 campagnes de mesures seront réalisées, utiles pour évaluer la variabilité de la zone. Les enquêtes seront réalisées sur une moyenne de 3 stations par port, dont la position sera choisie selon un principe de gradient entre la zone la plus impactée et la zone la moins influencée par les différentes pressions sur le site pilote.

Les résultats analytiques seront introduits dans le modèle et la réponse du modèle à la combinaison des différents sources de données sera évaluée, dans le but d'identifier les

exigences minimales pour le développement d'un nouvel indice intégré applicable à tous les ports.



Tab.1 - Sources de données pour la définition du plan de surveillance

	LIGNES DE PREUVE	PARAMÈTRES	SPÉCIFICATIONS	NOMBRE DE STATIONS	CAMPAGNES DE MESURE				
					La Spezia	Olbia	Toulon	Gênes	
SÉDIMENTS	Analyse physico-chimique	Granulométrie	gravier (> 2 mm);	3	2	2	2	2	
			sable (2 mm < x < 0,063 mm);						
			pélite (silt: 0,063 mm < x < 0,004 mm + argile: < 0,004 mm).						
		Métaux	As, Cd, Cr tot, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn (Cr VI, V, Al, Fe paramètres supplémentaires à évaluer au cas par cas)	3	2	2	2	2	
			Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Acénaphthylène, Benzo (a) anthracène, Fluoranthène, Naphtalène, Anthracène, Benzo (a) pyrène, Benzo (b) fluoranthène, Benzo (k) fluoranthène, Benzo (g, h, i) pérylène, Acénaphthène, Fluorène, Phénanthrène, Pyrène, Dibenzo (a, h) anthracène, Crisène, Indéno (1,2,3, c-d) pyrène et leur sommation	3	2	2	2	2
				Biphényles polychlorés	Congénères: 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 et leur sommation	3	2	2	2
	Composés organostanniques	Monobutil, Dibutil, Tributylétain et leur sommation	3	2	2	2	2		
Pesticides organochlorés		Aldrin, Dieldrin, Endrin, alpha - HCH, beta - HCH, gamma - HCH (Lindane), DDD, DDT, DDE (la somme des isomères 2,4 et 4,4 pour chaque substance), HCB, heptachlor époxyde	3	2	2	2	2		
Analyses biologiques ex situ	Batterie de trois tests écotoxicologiques	<i>Vibrio fischeri</i> en phase solide, croissance d'algues avec <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , embryotoxicité avec <i>Paracentrotus lividus</i>	3	2	2	2	2		
COLONNE D'EAU	Analyses chimiques	Recherche de métaux dans la fraction dissoute	3	2	2	2	2		
		DGT - métaux	3						
	Bioaccumulation des moules	Métaux	As, Cd, Cr tot, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn (Cr VI, V, Al, Fe paramètres supplémentaires)	3	2	2		2	
		Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Acénaphthylène, Benzo (a) anthracène, Fluoranthène, Naphtalène, Anthracène, Benzo (a) pyrène, Benzo (b) fluoranthène, Benzo (k) fluoranthène, Benzo (g, h, i) pérylène, Acénaphthène, Fluorène, Phénanthrène, Pyrène, Dibenzo (a, h) anthracène, Crisène, Indéno (1,2,3, c-d) pyrène et leur sommation	3	2	2		2	
			Biphényles polychlorés	Congénères: 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 et leur sommation	3	2	2		2
			Composés organostanniques	Monobutil, Dibutil, Tributylétain et leur sommation	3	2	2		2
		Pesticides organochlorés	Aldrin, Dieldrin, Endrin, alpha - HCH, beta - HCH, gamma - HCH (Lindane), DDD, DDT, DDE (la somme des isomères 2,4 et 4,4 pour chaque substance), HCB, heptachlor époxyde	3	2	2		2	
			Moules biomarqueurs	Métallothionéines, système neurotoxique (acétylcholinestérase), dommages à l'ADN (micronoyaux), système lysosomal, systèmes immunitaires, en plus des systèmes oxydants, prolifération peroxysomale	3	2	2		2
	Bioaccumulation des poissons	Métaux	As, Cd, Cr tot, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn (Cr VI, V, Al, paramètres supplémentaires)		2	2		2	
		Organiques	Hydrocarbures aromatiques polycycliques et éventuellement composés organostanniques		2	2		2	
	Poisson biomarqueur		Système de biotransformation du cytochrome P450, micronoyaux et indices histopathologiques des branchies et du foie		2	2		2	
	Paramètres de support complémentaires spécifiques à chaque zone	Nutriments (DOC, TN, PO4)		3	2	2	2	2	
		CTD		3	2	2	2	2	
TSS - Turbidité			3	2	2	2	2		
TOC			3	2	2	2	2		
Cytométrie en flux			3	2	2	2	2		
ADCP (étude du courantomètre)			3	2	2	2	2		

2. Ports pilotes

2.1 Port de Gênes

Dans le port de Gênes, les stations seront situées dans trois zones (Fig.1): le bassin de Porto Vecchio, qui est la partie la plus intérieure du port et qui est principalement soumis aux rejets des canaux de la ville et au trafic des ferries ; l'entrée orientale du port, qui est affectée par les activités de construction navale, la navigation de plaisance et l'arrivée d'eau du ruisseau Bisagno ; et l'entrée occidentale, devant l'embouchure du ruisseau Polcevera et l'aciérie de Cornigliano.



Fig.1 - Vue d'ensemble du port de Gênes

2.2 Port de La Spezia

Différents types d'activités coexistent dans le port de La Spezia : outre le port marchand situé dans la partie la plus intérieure du port, on trouve un arsenal militaire, divers chantiers navals

Prodotto n. T2.2.1

et des marinas. Une trentaine de cours d'eau se jettent dans la baie, dont la plupart sont des sources de contamination environnementale. Comme le montre la figure 2, il y a également une ferme piscicole à Le Grazie et plusieurs nurseries de coquillages sur les côtés intérieur et extérieur du brise-lames. Dans ce contexte, étant donné que le site fait déjà l'objet d'investigations dans le cadre du projet Interreg Maritime Italie-France 2014-2020 Se.D.Ri.Port., il a été décidé de réaliser l'analyse dans les mêmes trois stations identifiées pour Se.D.Ri.Port., dont deux sont situées respectivement à Molo Fornelli et Molo Garibaldi et une dans la crique de Cadimare. La quatrième station sera positionnée près de l'embouchure du Levante et sera utilisée comme point de contrôle car elle est moins affectée par les pressions qui s'exercent sur l'ensemble de la rade.

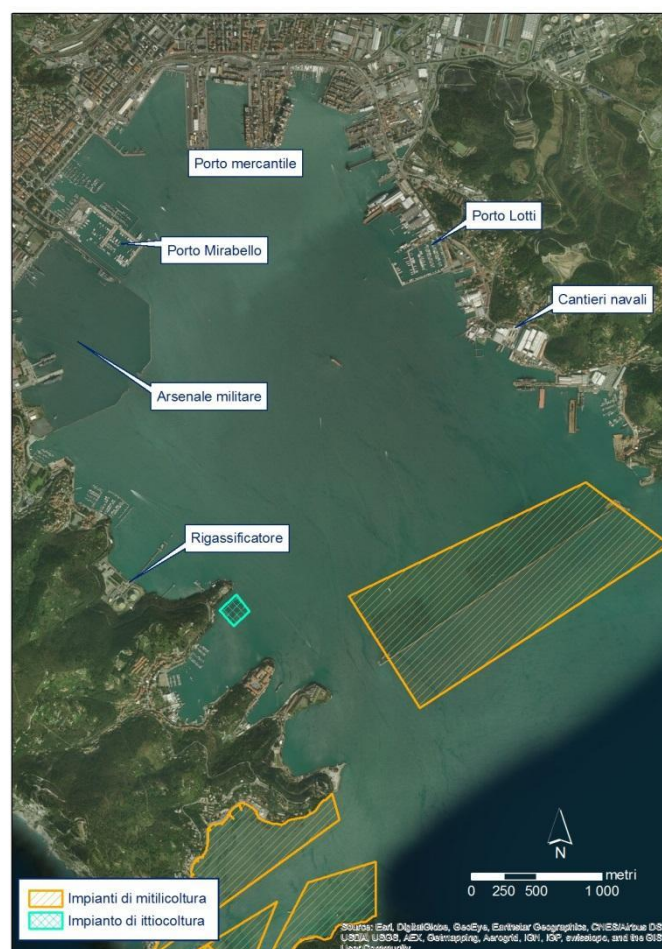


Fig.2 - Vue d'ensemble de la Rada de La Spezia

2.3 Port d'Olbia

Le port d'Olbia se développe au sein d'une crique « Rias » côtière (Fig.3), caractérisée par des bras de mer profonds. Il existe deux principaux ports d'escale dans le golfe : le premier, situé à Isola Bianca, est destiné aux activités commerciales et à l'accostage des ferries, tandis que le second, situé dans la zone de Scalo Cocciani, est un port industriel. Les eaux du port d'Olbia sont également influencées par les nombreux fleuves et torrents qui se jettent dans le Rias lui-même, dont le plus important est le fleuve Padrongianus où s'écoulent également les eaux usées de deux stations d'épuration. Il existe également plusieurs fermes de moules dans le golfe. De la même manière que pour le port de Toulon et la rade de La Spezia, pour le port d'Olbia les stations d'échantillonnage ont été positionnées dans les mêmes zones étudiées pour le projet Se.D.Ri.Port. Trois zones d'investigation ont donc été sélectionnées: l'une devant l'Isola Bianca, l'autre dans la zone centrale du golfe au large de l'embouchure du Padrongianus et pour le contrôle, la zone la plus externe, à l'embouchure du golfe.



Fig.3 - Vue d'ensemble du port d'Olbia

2.4 Port de Toulon

Le port de Toulon (Fig. 4) est caractérisé en grande partie par la présence de zones militaires, auxquelles se juxtaposent des zones utilisées pour le trafic de passagers et, dans la partie la plus externe, des zones où se trouvent des installations aquacoles. Aussi pour ce site, comme déjà spécifié pour La Spezia, dans une optique de capitalisation des résultats du projet Se.D.Ri.Port., il a été établi d'identifier au moins trois zones soumises de diverses manières aux pressions anthropiques et de positionner les stations d'échantillonnage selon un transect de côte large en partant du quai utilisé pour l'accostage des ferries. La partie la plus extérieure, où se trouvent les élevages de moules, peut être utilisée comme point de contrôle.

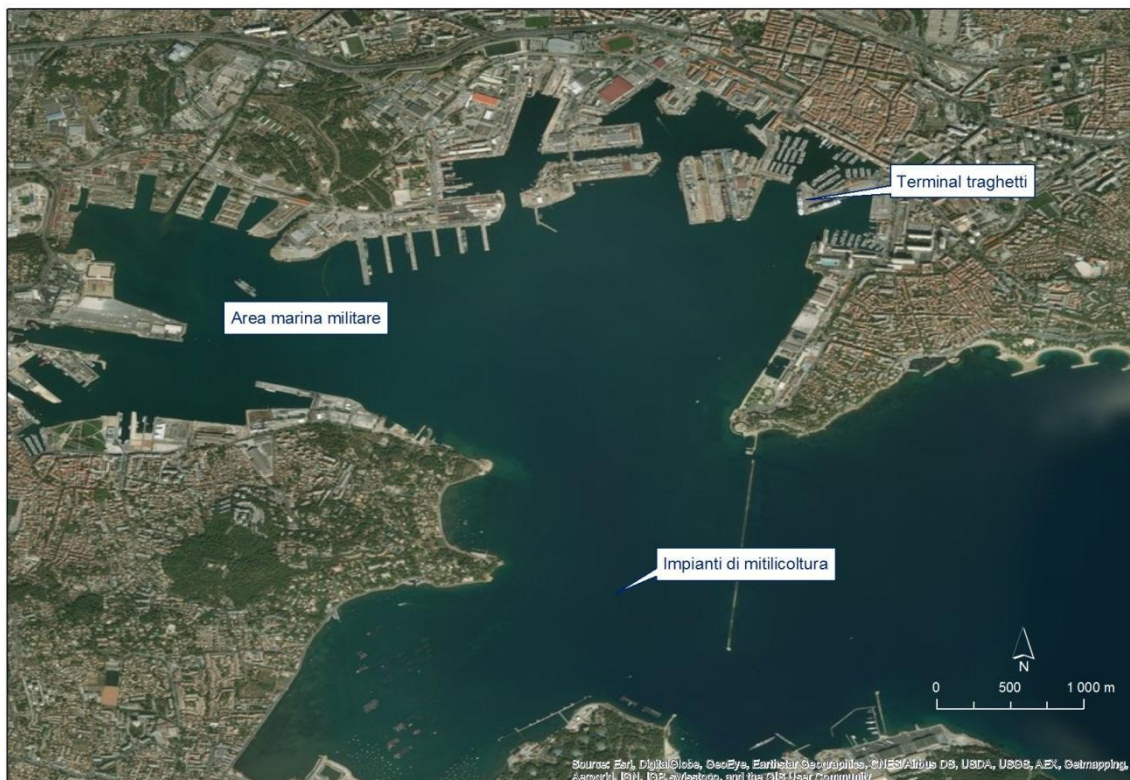


Fig.4 - Plan du port de Toulon

3. Matrices monitorées

3.1 Sédiments

Les sédiments sont en mesure de fournir des informations importantes sur l'état environnemental d'un site, car ils constituent une matrice conservatrice capable d'intercepter et de retenir une partie des polluants provenant de la colonne d'eau. Dans les zones portuaires, les sédiments sont souvent caractérisés par la présence de divers contaminants liés aux réalités anthropiques qui insistent, comme les chantiers navals, les installations industrielles, les terminaux touristiques, les terminaux commerciaux, les réalités d'intérêt militaire, ainsi que la présence de divers drains et ruisseaux qui se jettent dans le bassin.

L'évaluation de la qualité des sédiments dans la zone portuaire doit être réalisée par l'exécution d'une série d'analyses chimiques, physiques et écotoxicologiques choisies sur la base de la connaissance des activités anthropiques qui insistent sur le bassin.

Pour le projet GEREMIA, compte tenu des caractéristiques des réalités portuaires sélectionnées, où coexistent plusieurs des activités anthropiques susmentionnées, il a été décidé de réaliser les enquêtes suivantes :

- analyse granulométrique
- recherche de métaux (As, Cd, Cr tot, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn et Cr VI, V, Al, Fe supplémentaires)
- Recherche de HAP (Acénaphylène, Benzo(a)anthracène, Fluoranthène, Naphtalène, Anthracène, Benzo(a)pyrène, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(g,h,i)pérylène, Acénaphène, Fluorène, Phénanthrène, Pyrène, Dibenzo(a,h)anthracène, Chrysène, Indeno(1,2,3,c-d)pyrène et leur somme.
- Recherche des congénères : 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 et leur somme.
- Détection du composé organostannique Tributyltin.
- recherche de pesticides organochlorés (Aldrine, Dieldrine, Endrine, alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH (Lindane), DDD, DDT, DDE (pour chaque substance la somme des isomères 2,4 et 4,4), HCB, heptachlore époxyde)

- tests écotoxicologiques : *Vibrio fischeri* sur phase solide, croissance d'algues avec *Phaeodactylum tricornutum*, embryotoxicité sur l'échinide *Paracentrotus lividus*.

Dans chaque port, deux campagnes de mesure seront réalisées, au cours desquelles seront effectuées environ trois stations d'échantillonnage où une quantité suffisante de sédiments de surface sera prélevée pour toutes les analyses.

L'échantillonnage des sédiments sera effectué à l'aide d'un seau Van Veen de 5 litres (Fig.5). Les sédiments récupérés devront être mélangés afin de rendre l'échantillon homogène et ensuite transférés dans des récipients appropriés et conservés à -20°C pour les analyses chimiques et à +4 jusqu'à la préparation de l'élutriat ou, en tout cas, jusqu'à la réalisation des tests écotoxicologiques sur l'échantillon.



Fig.5 - Le seau Van Veen

3.1.1 Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique des sédiments sera effectuée dans les laboratoires de l'ISPRA.

L'étude des caractéristiques texturales d'un sédiment fournit des informations importantes sur la disponibilité potentielle des polluants. De nombreux contaminants, tant organiques qu'inorganiques, ont tendance à s'adsorber sur les particules à texture fine, tandis que d'autres types se répartissent dans l'eau interstitielle des sédiments. Les informations provenant de

l'analyse de la taille des particules permettent donc d'évaluer de manière plus correcte les différents niveaux de polluants.

L'analyse sera effectuée sur des échantillons d'environ 70 g qui, pour faciliter la séparation des granulés, doivent d'abord être traités avec une solution de peroxyde d'hydrogène et d'eau distillée (1:8) pendant 48 h à température ambiante. La fraction fine sera séparée à l'aide d'un tamis à maille de 63 µm et d'eau distillée. Les deux fractions ainsi obtenues seront séchées dans un four à 60 °C et ensuite pesées.

Pour cribler la fraction la plus grossière (> 63 µm) constituée de sable et de gravier, on utilisera des piles de tamis de 2000, 1000, 500, 250, 125 et 63 µm de la série ASTM.

A la fin du processus de tamisage, les différentes fractions seront pesées et les différents pourcentages du total seront calculés.

3.1.2 Analyse chimique : détection des métaux

Les recherches sur les métaux seront effectuées dans les laboratoires de l'ISPRA.

Les métaux lourds tels que l'arsenic, le cadmium, le chrome, le mercure, le nickel, le plomb, le thallium, le vanadium, qui ont conventionnellement une densité supérieure à 4,5 g par centimètre cube, sont présents dans l'environnement tant pour des causes naturelles telles que l'érosion des sols, les éruptions volcaniques, que pour des causes anthropiques principalement liées aux retombées des fonderies, des raffineries, des incinérateurs de déchets, des activités minières et de l'utilisation de combustibles fossiles. Les métaux lourds sont des polluants qui, même en faible concentration, peuvent avoir des effets négatifs sur l'environnement et l'homme. Les métaux, tels que le nickel, le cadmium et le plomb, ont tendance à s'accumuler dans les tissus en provoquant divers effets toxiques. En outre, certains facteurs tels que le pH, la matière organique, le potentiel redox et la salinité, peuvent influencer la forme chimique du métal en faisant varier sa biodisponibilité.

Produit n. T2.2.1

La quantification des métaux lourds et de leur forme chimique, ainsi que de leur disponibilité pour le biote, est donc l'un des éléments de preuve les plus importants à prendre en compte pour évaluer l'état d'un environnement.

Un échantillon d'environ 0,3 g de sédiment séché sera minéralisé dans des bombes en Teflon, à l'aide d'un four à micro-ondes convenablement programmé (Milestone 1200), par l'addition de 3 mL de HNO₃ (65%) et de 1 mL de HCl (30%) et de 2 mL de H₂O ultrapure. L'échantillon, après avoir été minéralisé, doit être porté à un volume final de 25 mL par l'ajout d'eau ultrapure. La détermination sera effectuée par spectrophotométrie d'émission optique (Varian Liberty AX Sequential ICP-OES 720) pour tous les métaux sauf le mercure. Pour le mercure, l'analyse sera effectuée par spectroscopie d'absorption atomique (méthode de la vapeur froide ; Cetac M-7600). La précision de la méthode sera évaluée en utilisant le matériau de référence standard LGC 6137 (Promochem) traité de la même manière que les échantillons. Dans le Tab.2 nous rapportons la limite de détection de la méthode et la limite de quantification pour chaque métal analysé.

Tab.2 - Limites de détection et de quantification pour chaque métal recherché

	Détectabilité (mg/L)	Quantification (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 Analyse chimique : détection des HAP, PCB, TBT et pesticides organochlorés

Les enquêtes sont menées par ISPRA avec le soutien de ARPA Liguria.

Les polluants organiques persistants (POP), parmi lesquels les HAP, les PCB et les pesticides organochlorés ainsi que les composés organostanniques (OTS) tels que le TBT, constituent un important facteur de perturbation anthropique. Les POP se caractérisent par une très longue demi-vie dans l'environnement en raison de leur grande stabilité chimique. Leur résistance aux processus de dégradation de l'environnement et leurs caractéristiques lipophiles, associées à une persistance biologique considérable, se traduisent par un potentiel élevé de bioaccumulation et de bioamplification le long des chaînes trophiques.

Le tributylétain (TBT) est aujourd'hui considéré comme l'un des composés les plus toxiques produits et distribués dans l'environnement pour un large éventail d'organismes, y compris l'homme ; l'un des effets toxiques les plus connus est le phénomène de masculinisation des gastéropodes, c'est-à-dire l'apparition de caractéristiques sexuelles mâles chez les mollusques femelles, tandis que chez les vertébrés, divers effets nocifs ont été documentés, notamment une perturbation endocrinienne et une interférence avec le métabolisme des lipides.

Le tributylétain (TBT), présent dans le milieu marin et en particulier dans les ports, est un puissant biocide utilisé dans les peintures antisalissures appliquées sur les bateaux ou les structures immergées. Des études récentes montrent qu'à ce jour, les concentrations les plus élevées sont généralement présentes dans les zones à forte densité de trafic maritime, comme les docks, les zones de stockage et les ports (Boscolo et al., 2004 ; Sousa et al., 2012).

Les composés organostanniques ont tendance à s'accumuler dans les sédiments en raison de leur forte affinité pour les fractions organiques et inorganiques. La fraction argileuse joue un rôle clé dans l'adsorption des organoétains et dépend strictement de la disponibilité de sites potentiels de liaison à l'argile et du pH : elle est favorisée par un pH neutre, tandis que les valeurs de pH inférieures ou supérieures à 7 induisent un processus de désorption, entraînant la libération du contaminant dans la matrice aqueuse (Hoch et Schwesig, 2004).

L'analyse des composés organiques persistants dans les sédiments a donc été jugée comme faisant partie des éléments de preuve les plus intéressants pour la structuration du projet.

3.1.4 Tests écotoxicologiques

Les tests écotoxicologiques seront effectués par ISPRA.

Les essais biologiques sont des tests en laboratoire ou in situ, dans lesquels un organisme ou ses stades vitaux sont exposés à une matrice à analyser, pendant une période prédéterminée, afin d'évaluer les effets toxiques éventuels. Ces tests sont de plus en plus souvent inclus dans les réglementations nationales dans le but de combler une partie du vide dû à l'absence du compartiment biologique dans les approches méthodologiques précédentes. Les tests écotoxicologiques donnent des informations importantes sur la biodisponibilité des contaminants analysés, en mettant en évidence les effets synergiques ou antagonistes, ainsi qu'en détectant la présence de xénobiotiques non analysés. En outre, les résultats des essais peuvent être facilement intégrés aux résultats chimiques, physiques et biologiques, ce qui permet d'avoir une vision complète de la qualité environnementale d'un lieu.

Dans le milieu marin, les contaminants se répartissent de différentes manières et, en fonction des caractéristiques de polarité, de solubilité, etc., peuvent se fixer sur les granules des sédiments, dans l'eau interstitielle ou dans la colonne d'eau. Dans la conception d'une étude environnementale comprenant des essais, l'approche optimale est l'approche multi-matrice et multi-espèces, c'est-à-dire qu'il faut tester différentes matrices telles que les sédiments, les éluviats, l'eau, etc. en utilisant différents organismes appartenant à différents niveaux trophiques, différentes voies d'exposition, différents stades de vie et différents points finaux de l'étude.

Cette approche permet de couvrir autant que possible les variables dues à la différence d'absorption par les organismes et le "modus operandi" des différents contaminants. La batterie utilisée dans le projet GEREMIA est structurée avec des bactéries *Vibrio fisheri* (étude de la bioluminescence au point final), des algues unicellulaires de l'espèce *Phaeodactylum tricorutum* (inhibition de la croissance au point final) et des échinides de l'espèce *Paracentrotus lividus* (développement larvaire au point final).

Alors que l'essai avec *V. fisheri* sera effectué sur le sédiment tel quel, les essais avec *P. tricorutum* et *P. lividus* seront effectués sur l'éluviat obtenu de chaque sédiment. L'éluviat

fournit des informations sur tous les composants extractibles dans l'eau. Cette dernière représente une des matrices les plus indicatives dans l'étude des effets des mouvements du fond marin (USEPA/USACE, 1991) comme dans le dragage des ports, les décharges, etc.

L'élutriat est préparé selon le protocole standard USEPA/USACE (1991) en combinant quatre parties en poids d'eau filtrée prélevée dans une zone non contaminée avec une partie de sédiment. Le tout est agité pendant 1 h à 400 rpm. La phase liquide est ensuite recueillie et centrifugée pendant 20 min à 3500 rpm. Des sous-échantillons de surnageant sont congelés et utilisés dans les différents tests, afin d'utiliser toujours le même échantillon lors des différentes expériences. En effet, la congélation ne semble pas modifier significativement les caractéristiques des nutriments (NO_3 et PO_4) de la phase liquide (Clementson et Wayte, 1992) et une étude menée par Carr et Chapman (1995) a vérifié l'absence de différences significatives entre la toxicité d'échantillons de matrices aqueuses fraîchement extraits et congelés. La congélation est donc une étape indispensable pour garantir la comparabilité des données expérimentales, car elle permet de stocker correctement les sous-échantillons et de les rendre disponibles pour des tests répétés à différents moments.

Vibrio fischeri

Vibrio fischeri est une bactérie marine hétérotrophe à Gram négatif, appartenant à la famille des Vibrionaceae. Il est cosmopolite, mais est plus répandu dans les zones tempérées et subtropicales.

Le système Microtox® est un test biologique de toxicité aiguë basé sur l'utilisation de la bioluminescence naturelle de cette espèce. Puisqu'en présence de contaminants l'émission de lumière par *V. fischeri* diminue, la mesure de toute inhibition de la bioluminescence suite à l'exposition de la bactérie à une substance connue ou à un échantillon naturel d'eau ou de sédiment, permet d'évaluer le degré de toxicité de la substance ou de la matrice testée. Le système de mesure est assez polyvalent car il est applicable aux matrices naturelles, notamment marines, aqueuses (eaux interstitielles, élutriats, etc.) et solides (boues, sédiments), ainsi qu'aux solutions aqueuses de substances toxiques pures, tant organiques qu'inorganiques.

Dans le projet GEREMIA, il a été décidé d'appliquer le test au sédiment en tant que tel (sur une phase solide).

La phase solide à analyser est préparée par simple centrifugation réfrigérée (3500 rpm à 4°C pendant 30'), en éliminant ensuite l'eau interstitielle comme surnageant.

L'émission de bioluminescence est mesurée à l'intérieur du luminomètre thermostaté M500, équipé de puits thermostatés à 15°C pour les contrôles et les échantillons et à 4°C pour le réactif.

Les méthodes qui seront utilisées remontent au protocole standard ISO 11348 (2007), appliquant le protocole SPT (Solid Phase Test) avec la procédure Large Sample Method (Azur Environmental, 1995), organisée avec 9-12 dilutions et 3 contrôles en fonction de la granulométrie de l'échantillon. Le test comprend une première exposition de 20 minutes pendant laquelle les bactéries sont en contact direct avec le sédiment et une seconde phase de 10 minutes supplémentaires pendant laquelle la remise en suspension des bactéries est incubée dans le luminomètre.

La relation dose-réponse, c'est-à-dire concentration de l'échantillon-inhibition de la bioluminescence, sera traitée à l'aide d'un logiciel dédié (Microtox OmniTM v. 1.16) et permettra de calculer le résultat exprimé en EC50 (concentration de l'échantillon correspondant à une réduction de 50% de la bioluminescence). La CE50 sera encore plus élaborée, en l'exprimant en UT (Unités Toxiques = 100/EC50), ce qui permet d'obtenir une relation directe entre la toxicité et la réduction de la bioluminescence et en tant qu'Indice de Toxicité des Sédiments (I.T.S.) et d'exprimer la toxicité aiguë réelle de l'échantillon par rapport à la toxicité "naturelle" d'un échantillon de référence ayant les mêmes caractéristiques granulométriques (Onorati et al., 1999). Afin d'exprimer le résultat de l'essai dans l'échelle S.T.I., étant donné que l'essai de phase solide est en fait appliqué sur la fraction granulométrique inférieure à 1 mm et que la composante de toxicité naturelle est fonction de la fraction pélique, la valeur de cette fraction, déterminée par l'analyse granulométrique (effectuée selon la méthode rapportée ci-dessus) sera utilisée pour exprimer le résultat de l'essai dans l'échelle S.T.I. (ICRAM-APAT, 2007).



Tab.3 - Échelle de toxicité aiguë utilisée dans l'essai biologique par *V. fischeri*

Indice S.T.I.	Toxicité
S.T.I. \leq 3	Absente/négligeable
3 < S.T.I. \leq 6	Présente
6 < S.T.I. \leq 12	Haute/Élevée
S.T.I. > 12	Très haute/Très élevée

Phaeodactylum tricornutum

Les essais sur les microalgues sont parmi les plus utilisés en raison de la facilité et de l'économie de leur maintien en laboratoire et de leur réaction rapide à la qualité de l'environnement (Kraynukova 1988 ; Lewis 1995). Les premières méthodes de référence internationales pour l'utilisation d'algues unicellulaires dans les tests d'inhibition de la croissance des algues pour l'étude de la contamination des eaux marines et côtières remontent aux années 1970 (EPA, 1974 ; IRSA, 1978). Plus tard, des méthodes de l'EPA ont également été publiées pour la surveillance des eaux usées (USEPA, 1988). La méthode de dosage des algues pour les organismes marins a été mise à jour avec la norme UNI ISO 10253 (2006), qui exige l'utilisation de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin et *Skeletonema costatum*. Les deux algues peuvent être utilisées, en utilisant ce protocole, pour des essais avec des éluutriats ou des extraits de sédiments entiers ou avec des eaux surnageantes ou interstitielles.

P. tricornutum est une diatomée Bacillariophyta largement distribuée dans les zones estuariennes et côtières et, dans le domaine écotoxicologique, son utilisation pour l'évaluation de la qualité de l'eau, des sédiments et des eaux usées industrielles a été rapportée par plusieurs auteurs (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).

Les principaux indices considérés dans ces travaux sont la densité cellulaire (Okay et al. 1994 ; Dos Santos et al. 2002 ; Morreno-Garrido et al. 2007 ; Zhuravel et al. 2009), mais aussi les réponses physiologiques et biochimiques, comme la teneur en chlorophylle- α et la taille des

cellules (Zhuravel et al. 2009), la concentration de phytochélatines et de peptides endocellulaires liant les métaux (Morelli et al. 2009), ainsi que la fluorescence retardée (Nash et al. 2005).

L'évaluation du taux de croissance est une procédure facile à réaliser et d'une bonne sensibilité, puisque l'augmentation ou la réduction de la croissance cellulaire des microalgues par rapport au contrôle peut être liée à des phénomènes de pollution des matrices aqueuses (Khristoforova et al. 2001 ; Aizdaicher et al. 1999).

L'essai d'inhibition de la croissance des algues avec *P. tricornutum* sera appliqué aux éluutriats des sédiments préparés comme décrit ci-dessus.

L'essai biologique est réalisé sur l'éluatriat non dilué (100%) selon les protocoles de l'ARPAT (1998), Passarelli et Sbalchiero (2005) et ISO 10253 (2006), avec quelques modifications spécifiques.

Une aliquote de la culture de l'inoculum est ajoutée à la solution de test et à une quantité appropriée de milieu de culture concentré. La solution ainsi obtenue, avec une densité cellulaire comprise entre 8×10^3 et $1,2 \times 10^4$ cellules/mL, est ensuite répartie dans des plaques de 24 puits stériles jetables (ARPAT, 1998 ; Passarelli et Sbalchiero 2005 ; ISO 10253, 2006) et placée pendant 72 heures dans une chambre thermostatique à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, avec un régime de lumière blanche froide continue et une intensité comprise entre 7 000 et 8 000 lux.

En même temps, un contrôle négatif avec de l'eau de mer et un contrôle positif avec du bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) sont effectués pour vérifier la procédure et la sensibilité du test.

A la fin de la période d'incubation prédéterminée, la densité d'algues de chaque réplique est déterminée.

Les densités cellulaires enregistrées à la fin du test seront comparées à la concentration cellulaire initiale.

Le pourcentage d'inhibition (I) est ensuite calculé pour chaque échantillon testé :

1. $I = (\text{TCCamplé X} - \text{TCControl}) / \text{TCControl} * 100.$

Pour exprimer le jugement de la toxicité on utilise l'échelle d'évaluation présentée dans le tableau basé sur le pourcentage d'inhibition enregistré en testant l'élutriat à 100%.

Tab.4 - Échelle de toxicité utilisée dans le bio-essai avec *Phaeodactylum tricornutum*.

Inhibition de la croissance des algues	Toxicité
$I \leq -50\%$	Biostimulation
$-50\% < I < 20\%$	Absente/négligeable
$20\% \leq I \leq 50\%$	Modérée
$50\% \leq I \leq 80\%$	Haute/Élevée
$80\% < I \leq 100\%$	Très haute/Très élevée

Paracentrotus lividus

La fiabilité de l'oursin en tant que bio-indicateur est reconnue dans le monde entier et, dès les années 1980, les tests de fécondation et de développement embryonnaire figuraient sur la liste du CIEM (1997) des tests biologiques les plus fiables pour la surveillance de la pollution marine. Des procédures normalisées pour les tests de fécondation et de développement embryonnaire ont été élaborées pour les espèces de la côte Est (*Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus droebachiensis*) et de la côte Ouest (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Dendraster excentricus*) aux États-Unis (USEPA, 1994, 1995, ASTM, 1995, 2004) et au Canada (Environnement Canada, 1992). En Italie, l'espèce autochtone *Paracentrotus lividus*, a été appliquée dans le domaine écotoxicologique en particulier pour l'étude des effets sur la fécondation et le développement embryonnaire (défauts de développement et aberrations mitotiques) des substances pures et des effluents. En effet, le test biologique avec *P. lividus* peut être utilisé à la fois dans l'évaluation de la qualité des matrices environnementales (eaux et sédiments marins) et dans l'estimation de la toxicité de substances ou préparations solubles dans l'eau de mer. En particulier, en ce qui concerne les sédiments marins, elle est compatible avec l'eau interstitielle et élutriative (Giuliani et al., 2004 ; Sartori et

al., 2017). Récemment, un manuel ISPRA a été publié qui illustre les méthodologies pour les essais d'embryotoxicité et de spermiotoxicité avec *P. lividus* (Sartori et al., 2017).

La matrice environnementale soumise à l'évaluation écotoxicologique avec ce test biologique est l'élutriate. Elutriate est testé à la fois non dilué (100%) et dilué, avec de l'eau de mer filtrée à 0,45 µm à des concentrations finales de 50% et 25%.

Des spécimens adultes sexuellement matures de l'oursin *P. lividus* seront collectés entre septembre et mai (Fenaux, 1968) sur les fonds rocheux du littoral de Livorno dans une zone éloignée des sources de pollution anthropique (rejets urbains et industriels) à une profondeur comprise entre 1 et 3 m. La libération des gamètes sera induite en mer. L'émission de gamètes sera induite par l'injection de 0,5 mL de KCl 0,5 M à travers la membrane péristomiale.

Comme la phase proprement dite de l'essai consiste à exposer les zygotes aux échantillons à tester, une étape préliminaire consistera à unir une aliquote de la suspension de spermatozoïdes avec la suspension d'ovules dans un rapport spermatozoïdes/ovules de 10/1 afin d'obtenir les zygotes. Après 20 minutes, le test sera effectué en exposant 1 mL de solution de zygote à 9 mL de la solution de test (élutriate) dans une cellule thermostatique dans l'obscurité à 18 °C±1 pendant 72h.

Le test est fixé avec quelques gouttes de solution de Lugol à 5% (Carlo Erba, Milan).

L'estimation du pourcentage de plutei normaux est effectuée sous un microscope inversé en comptant 100 larves par réplique.

L'effet de la substance testée, dont la toxicité doit être évaluée, est détecté par le pourcentage de plutei normoformés par rapport à un contrôle d'eau de mer (contrôle négatif). Le test est considéré comme acceptable si le pourcentage de plutei normoformés dans le contrôle négatif est supérieur à 80 %. En appliquant la formule d'Abbott (Finney, 1971), le pourcentage de plutei malformés dans chaque chambre d'essai est comparé et normalisé par rapport au contrôle :

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

où

X=% de l'échantillon de plutei malformé à tester,

Y=% de plutei malformés dans le contrôle.

Les valeurs ainsi obtenues sont utilisées dans deux élaborations différentes : en ce qui concerne les échantillons, leur toxicité éventuelle est évaluée par le calcul de la CE20 et de la CE50 obtenues avec le programme spécifique Tox Calc 5.0 au moyen de la méthode d'analyse Probit. Les valeurs obtenues sont comparées à l'échelle de toxicité indiquée dans le tableau suivant, afin d'exprimer un jugement sur la qualité de l'échantillon examiné (ICRAM-APAT, 2007).

Tab.4 - Échelle de toxicité utilisée dans le bio-essai avec Paracentrotus lividus.

EC20/EC50	Toxicité
EC20 \geq 90%	Absente/négligeable
EC20 < 90% et EC50 > 100%	Modérée
40% \leq EC50 \leq 100%	Haute/Élevée
EC50 < 40%	Très haute/Très élevée

Pour le toxique de référence, les valeurs de la CE50 sont obtenues à l'aide de deux méthodes statistiques différentes : l'analyse de Spearman-Kärber ajustée (Hamilton et al., 1978) et l'analyse Probit (Finney, 1971). La valeur EC50 indique la concentration de la substance testée ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1000 mg/L) qui provoque un effet toxique sur 50% des embryons par rapport au contrôle négatif.

3.2 L'eau

En raison de son dynamisme, l'eau est un domaine très complexe à étudier. Afin d'aborder correctement l'analyse de cette matrice, il faut collecter une grande quantité d'informations qui, lorsqu'elles sont correctement traitées, sont en mesure de mettre en évidence les facteurs de stress à l'origine de la perte de qualité. A cet égard, dans le projet GEREMIA, l'analyse de la

chimie de la colonne d'eau est privilégiée par l'étude d'échantillons ponctuels et d'échantillonneurs passifs et celle du biote par l'étude d'organismes sentinelles tels que les bivalves filtreurs (moules) et les poissons.

Les poissons et les mollusques bivalves sont en fait d'excellents bio-indicateurs dans les études de bioaccumulation qui, exploitant leur capacité à concentrer des quantités relativement élevées de polluants, même à partir de solutions diluées, signalent la présence de polluants dans des environnements où leur concentration dans l'eau est inférieure aux limites de sensibilité des méthodes analytiques couramment utilisées (Beone et Ravera, 2003). De plus, sur ces types de bio-indicateurs, des investigations peuvent être menées au niveau moléculaire, cellulaire, histologique, morphologique et physiologique afin de vérifier les éventuelles modifications induites par un ou plusieurs contaminants ; ces altérations (biomarqueurs) (Fossi, 2001 ; Bianchi et Morri, 2003) peuvent anticiper les changements dans les plus hauts niveaux d'organisation biologique (populations, communautés, écosystèmes) (Sandulli, 2004), par conséquent, ils sont des indicateurs rapides des effets biologiques, dus aux contaminants chimiques, qui se produisent plus lentement dans le temps (Ortiz-Zarragoitia et Cajaraville, 2006).

Pour un tableau détaillé des méthodes d'enquête qui seront appliquées aux poissons (moules) et aux moules (bioaccumulation et biomarqueurs), voir le produit T2.2.2 - Méthodologie d'enquête à appliquer aux bioindicateurs et aux métaux.

Enfin, afin de compléter l'image cognitive du compartiment eau, des paramètres complémentaires tels que les nutriments, la conductivité, la température et la turbidité, les solides en suspension, le COT et la cytométrie en flux et le VIPP ont également été inclus dans l'étude.

3.2.1 Échantillonneurs passifs

Dans le domaine de l'environnement, les capteurs dits passifs présentent un grand intérêt car ils permettent d'étudier l'accumulation d'un polluant sur une période donnée, qui peut varier de quelques heures à quelques semaines. Leur principe est basé sur une première phase

Produit n. T2.2.1

d'accumulation par une phase de reconnaissance d'éléments ciblés, suivie d'une phase d'extraction et d'une quantification en laboratoire. Un nouveau type de capteur passif connaît une grande affinité pour le dosage des éléments métalliques en raison de sa souplesse de mise en œuvre et de son faible coût : ce sont les systèmes appelés DGT (Diffuse Gradient in Thin film devices) (Davison et Zhang, 1994).

Un dispositif de DGT est composé d'un support sur lequel est déposée une résine chélatrice, qui permet l'adsorption des espèces cibles, associée à un hydrogel (Fig. 6). La diffusion, contrôlée par les propriétés physiques du gel et la concentration de métal dans le milieu à échantillonner, détermine la cinétique d'accumulation sur la résine. Cela permet de mettre en relation la quantité de métal accumulée avec la concentration de métaux dits " labiles " (fraction assimilable) présents dans l'échantillon à analyser. Après un temps d'accumulation défini, les systèmes DGT sont récupérés, ouverts et seule la résine chélatrice est stockée dans l'acide afin d'extraire les métaux à l'état de traces pour une analyse ultérieure (Fig. 7) (Zhang et Davison, 1995). Ces différentes étapes peuvent introduire un risque non négligeable de contamination, il s'agit donc d'une manipulation très délicate.

Le succès des DGT tient en partie à leur faible coût, qui leur permet d'être utilisés comme consommables. De plus, on considère généralement que la partie accumulée est corrélée à la fraction biodisponible des métaux présents dans l'écosystème considéré (Caillat et al., 2014, Han et al., 2014).

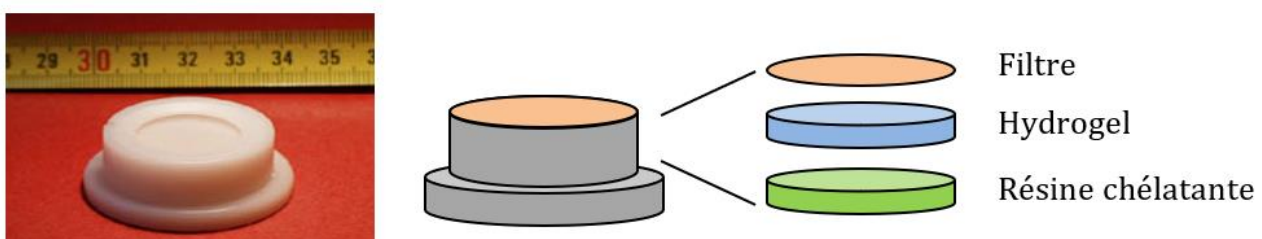


Fig. 6 - schéma d'un dispositif DGT.

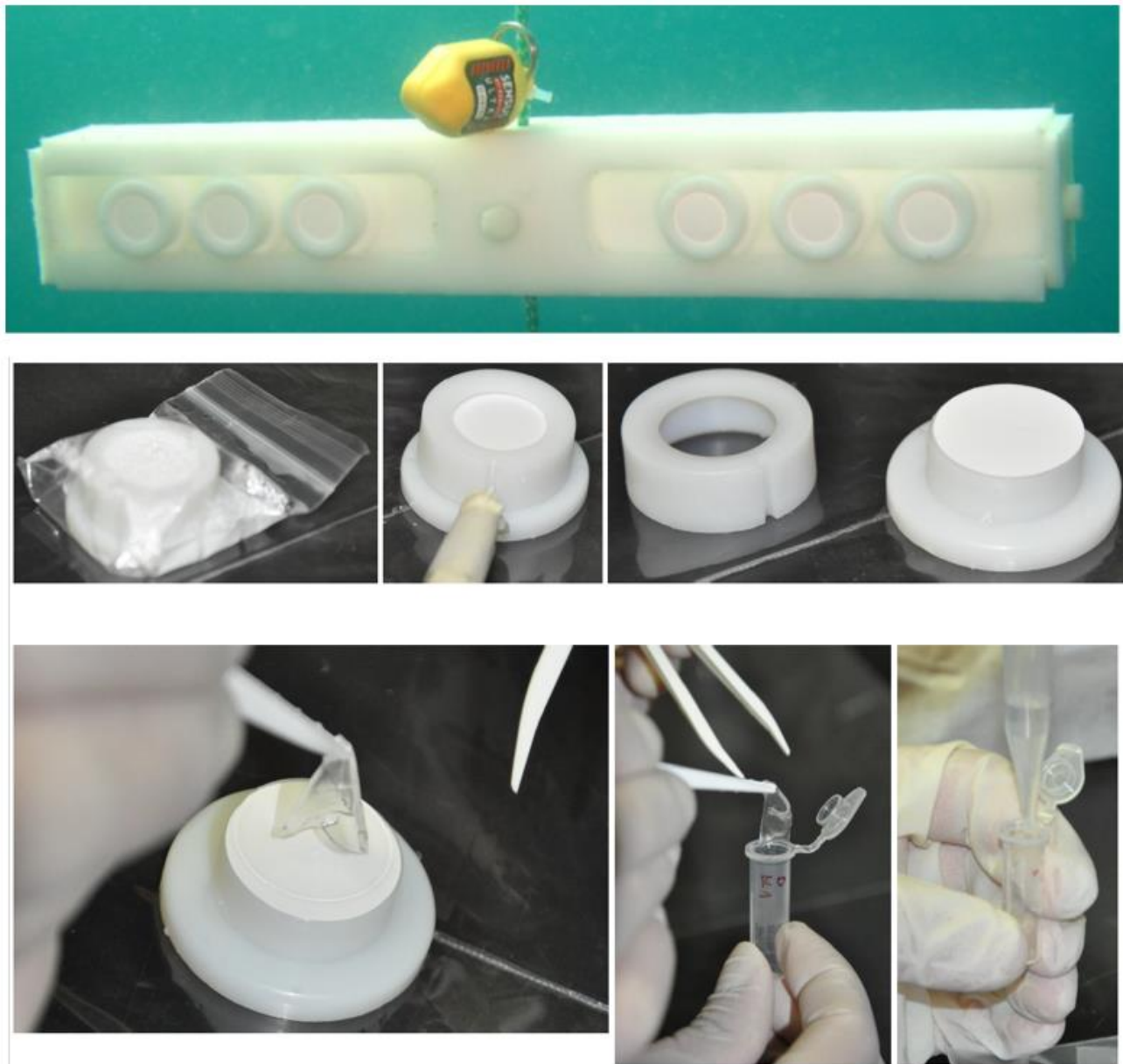


Fig. 7 - DGTs installés dans la colonne d'eau et étapes de récupération avant analyse.

3.2.2 Analyse du biote : bioaccumulation et biomarqueurs de moules

Les poissons possèdent de multiples caractéristiques qui en font de bons bio-indicateurs et en font un choix approprié pour une étude de biosurveillance. Parmi ces caractéristiques, nous pouvons citer : l'anatomie, la physiologie et l'éthologie parmi les mieux connues et étudiées dans la littérature en milieu aquatique ; les longs cycles de vie ; la facilité d'échantillonnage ; le large éventail de tolérance aux changements environnementaux et la capacité de bio-

Produit n. T2.2.1

accumulation des polluants ; l'identification facile et la large distribution. Parmi les poissons, les mugilidés jouent un rôle écologique important dans les environnements marins côtiers, car ils maintiennent un contact très étroit et fréquent avec les sédiments. En particulier, *Mugil cephalus* (mulet commun ou mulet), particulièrement fréquent dans les environnements portuaires, est une espèce largement utilisée dans les études de surveillance ou de toxicologie, et donc bien documentée dans la littérature, en raison de son large éventail de tolérance aux variations des paramètres environnementaux. Ces facteurs font de *Mugil cephalus* le candidat idéal pour une étude de surveillance de la qualité des eaux portuaires.

Les relevés de poissons sont effectués par l'UNIGE avec le soutien de l'Université polytechnique des Marches (DISVA).

L'utilisation de mollusques bivalves filtreurs pour surveiller la contamination chimique des environnements côtiers est pratiquée depuis des décennies et est très répandue. Parmi les principaux avantages liés à l'utilisation des moules dans l'évaluation du degré de contamination de la zone côtière grâce à l'utilisation de Mussel Watch, il y a la possibilité de mettre en évidence les gradients de pollution tant dans un sens spatial que temporel et de faire des comparaisons entre des zones géographiquement éloignées". Le Mussel Watch fournit une estimation de la "biodisponibilité" des substances toxiques dans l'environnement marin et permet d'évaluer le risque lié au transfert des xénobiotiques à travers les réseaux trophiques. La large application et la connaissance des méthodes utilisées pour étudier les organismes filtreurs, pour l'investigation d'un système difficile à surveiller et peu conservateur, tel que la colonne d'eau, a donc été jugée comme une ligne de preuve fondamentale.

Les relevés de moules sont effectués par ISPRA avec le soutien de l'Université polytechnique des Marches (DISVA).

3.2.3 Analyse du biote : bioaccumulation et biomarqueurs de poissons

Cette partie de l'enquête utilise les espèces de poissons locales et, si possible, résidentes, comme bio-indicateurs. Les analyses de la bioaccumulation et des biomarqueurs dans ces organismes augmentent la valeur écologique de l'étude en mettant en évidence les impacts

Produit n. T2.2.1

possibles sur le biote résident et les répercussions éventuelles, même à long terme, sur l'état de santé et la qualité de ces ressources biologiques, qui souvent ne restent pas confinées à la seule zone portuaire, mais peuvent au contraire servir de support à une éventuelle "migration" de la contamination.

L'espèce sélectionnée pour l'échantillonnage est *Mugil cephalus*, car elle est très présente dans les zones portuaires, facilement échantillonnée en formant de grands bancs et connue dans la littérature. Les poissons seront capturés à la ligne ou au filet et sacrifiés par dislocation cervicale, conformément aux directives de la Communauté européenne (Commission européenne, 1997). Immédiatement après le décès, des échantillons de sang seront prélevés afin de réaliser un frottis sanguin et la dissection des échantillons suivra. Les échantillons de foie nécessaires à l'analyse chimique seront conservés sur la glace et ensuite congelés. Les échantillons pour l'histopathologie (foie et branchies) seront immédiatement fixés dans une solution de Bouin et d'acide acétique (20:1). Les échantillons de foie et de bile destinés à l'analyse moléculaire seront immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Pendant l'échantillonnage, il sera nécessaire de maintenir les poissons vivants en mer dans des filets jusqu'au sacrifice afin d'éviter l'anoxie et les variations de température, qui pourraient altérer les tissus. L'acide acétique doit être conservé dans un récipient thermiquement isolé jusqu'à son utilisation, car il gèle à température ambiante (17°). Utilisez toujours des gants appropriés pour manipuler : l'acide acétique, le liquide de Bouin et l'azote liquide.

Les poissons seront échantillonnés dans les ports de Gênes, La Spezia et Olbia. En plus des sites pilotes, il a été décidé d'échantillonner les poissons également dans un site "externe", c'est-à-dire un élevage de "mulet", afin de disposer d'un ensemble de données correspondant à un "blanc", c'est-à-dire des données d'échantillonnage provenant d'un environnement non fortement anthropisé tel que les ports. Par conséquent, en même temps que les poissons capturés dans le port d'Olbia, les poissons des lagunes d'Oristano et d'Orbetello seront également échantillonnés.

Au laboratoire, les échantillons de sang, après séchage, seront fixés dans du méthanol et colorés dans une solution de Giemsa, pour être ensuite analysés au microscope optique afin

Produit n. T2.2.1

de déterminer la fréquence des micronoyaux. Après 24 heures d'échantillonnage, les échantillons de foie et de branchies destinés à l'histopathologie seront placés dans de l'éthanol à 70% et, après au moins 24 heures, seront inclus en paraffine. Le matériel inclus sera ensuite coupé pour produire des lames avec des sections de 4 µm qui seront colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les lames seront ensuite analysées et photographiées au microscope optique, et un indice de santé des organes (foie et branchies) sera produit pour chaque poisson, selon le protocole décrit dans le produit T2.2.2.

Un échantillon de foie, prélevé pour chaque poisson et conservé à -20°C, sera analysé pour quantifier la bio-accumulation des métaux et des HAP. En outre, pour chaque poisson, un échantillon de foie sera analysé pour déterminer l'activité enzymatique du cytochrome P450, tandis que la vésicule biliaire sera utilisée pour analyser les métabolites de la bile.

Toutes les étapes nécessitant l'utilisation d'éthanol, de méthanol et de Bio-Clear doivent être réalisées sous une hotte à flux laminaire. La paraffine à utiliser pour les inclusions doit être maintenue dans un four à 50°C afin de rester à l'état liquide ; il sera nécessaire de ne pas remplir complètement les récipients avec de la paraffine solide, car, lors du passage à l'état liquide, l'expansion du matériau provoquerait une fuite du récipient. Il est recommandé de filtrer les solutions d'hématoxyline et d'éosine avant leur utilisation quotidienne.

3.2.4 Paramètres supplémentaires

La charge en nutriments qui atteint la bande côtière représente l'élément causal fondamental qui détermine le niveau d'intensité et la distribution de la biomasse des microalgues. Le nitrate, qui dans le milieu marin constitue de loin le principal composant de la fraction d'azote inorganique dissoute, joue en tout cas un rôle très important dans le processus d'eutrophisation ; sa présence dans les eaux côtières est fortement corrélée aux débits des rivières. De nombreux ports sont situés dans des golfes souvent affectés par l'apport de cours d'eau qui recueillent les eaux de drainage des zones agricoles traitées avec des engrais azotés. Les ports, en raison de leur conformation semi-fermée, favorisent l'accumulation de nutriments (plutôt que de polluants de diverses natures) qui peuvent rester en place plus longtemps que

dans d'autres étendues côtières. La fraction qui n'est pas utilisée par le phytoplancton atteint le fond de la mer où elle est minéralisée. L'azote minéral peut réintégrer le cycle en cas de remise en suspension due à des mouvements hydrodynamiques, au dragage des sédiments ou autres.

Sonde multiparamétrique CTD (Conductivité Température Profondeur)

Les mesures des paramètres chimico-physiques de la colonne d'eau seront effectuées au moyen d'une sonde multiparamétrique CTD (Fig. 6). Plus précisément, une sonde CTD sera utilisée pour obtenir des profils verticaux de la tendance de divers paramètres le long de la colonne d'eau : température, salinité, conductivité, densité, turbidité et chlorophylle-a. Les rappels seront effectués dans toutes les stations d'échantillonnage identifiées dans les ports pilotes.



Fig. 6 - Exemple d'une sonde multiparamètre CTD.

Solides en suspension totaux (TSS)

Au laboratoire, avant de commencer les activités de filtration, les filtres en acétate de cellulose sont pré-pesés, numérotés et stockés pour les opérations à effectuer après les campagnes en mer.

Les filtres "vierges" sont pesés en les plaçant dans une étuve spéciale à ventilation forcée pendant 3 heures à 60-65°C, puis ramenés à température ambiante dans des séchoirs et pesés;

la pesée est effectuée à l'aide d'une balance électronique Scaltec SBC21 à cinq décimales (précision $\pm 1 \mu\text{g}$).

Les échantillons d'eau prélevés le long de la colonne d'eau dans les stations de mesure sont stockés à 4 °C puis, au laboratoire, des quantités connues d'eau échantillonnée sont filtrées à travers des filtres en acétate de cellulose Millipore (\varnothing 47 mm et porosité 0,45 μm) afin de concentrer les solides en suspension (TSS) qu'elle contient.

Afin d'éviter d'introduire des erreurs de mesure dues à des conditions atmosphériques et environnementales différentes au moment de la pesée, certains filtres "blancs" sont maintenus à part (généralement deux, l'un au début et l'autre à la fin de chaque journée d'échantillonnage) : leur variation de poids, comparée au poids calculé au début, est utilisée pour déterminer la correction (positive ou négative) à apporter au poids des filtres avec échantillon dans la détermination du TSS.

Tous les filtres utilisés pour filtrer les échantillons d'eau sont ensuite traités pour déterminer la quantité (en poids) de matières en suspension (dans les fractions totales "TSS", inorganiques "I" et organiques "O").

Les filtres sont ensuite séchés, toujours à l'aide d'un four, à une température de 60-65°C pendant 3 heures puis, pour les ramener à la température ambiante, placés dans un dessiccateur pendant 30'. À ce stade, les filtres sont pesés : la différence entre le poids constaté et le poids initial (filtres vierges) détermine la quantité de MES. Après la pesée, les filtres sont ensuite placés dans des creusets en céramique préalablement calibrés selon la procédure suivante. Les creusets sont nettoyés à l'aide d'une brosse afin d'éliminer les résidus d'analyses précédentes présents à l'intérieur ; ensuite les creusets sont placés dans un four à moufle (four thermostaté) à 550°C et y restent pendant 30' à partir du moment où cette température est atteinte ; Après 30 minutes, le four à moufle est éteint et ouvert et après 15 minutes, les creusets sont retirés et placés dans un séchoir pendant environ 30-40 minutes ; après ce temps, les creusets sont pesés à l'aide d'une balance électronique Scaltec SBC21 à cinq décimales (précision $\pm 1 \mu\text{g}$). Cette procédure est répétée au moins trois fois jusqu'à ce que le poids du

creuset varie (entre les pesées) de moins de 0,000-30 g : le poids moyen des trois pesées ou plus est alors considéré comme le poids final du creuset.

Les filtres dans les creusets sont dissous avec quelques gouttes d'acétone et placés dans le four à moufle à 550°C pendant 3 h 30 min pour éliminer la fraction organique (O) par combustion. Enfin, les creusets, convenablement refroidis dans le dessiccateur, sont pesés et, par différence avec leur poids "vide", le poids de la fraction inorganique (I) est déterminé : une simple différence (TSS - I) permet alors de déterminer le poids de la partie organique brûlée (O).

TOC

L'analyse du carbone et de l'azote total sera effectuée sur un instrument TOC-VCSH (Shimadzu), équipé d'un échantillonneur automatique ASI-V. La teneur en carbone est analysée à 720 °C en présence d'un catalyseur d'oxydation, des billes d'alumine recouvertes de platine. Cette étape permet à toutes les formes de carbone contenues dans l'échantillon de CO₂ de se volatiliser et le flux continu d'O₂ va transporter le CO₂ formé vers un déshumidificateur et un piège à halogène avant d'atteindre la cellule de détection infrarouge. Pour le TN, l'échantillon est analysé par combustion catalytique à haute température (720 °C). Le NO formé réagira ensuite avec l'ozone pour former du NO₂ à l'état excité et sera ensuite détecté par chimiluminescence après désexcitation du NO₂.



Fig. 7 - Dispositif TOC-VCSH (Shimadzu).

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse optique des particules, notamment l'analyse des micro-organismes vivant dans l'eau. Elle est basée sur la circulation d'un fluide qui guide les particules une à une devant un faisceau laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$). Le principe est d'étudier les propriétés de diffusion et de fluorescence naturelle ou induite des micro-organismes afin de pouvoir les identifier et les classer. Pour ce faire, plusieurs capteurs sont nécessaires : le premier est un capteur qui détecte la lumière à de petits angles appelé FSC et qui est un indicateur de la taille des particules ; le second, appelé SSC, est un capteur de diffusion à des angles plus importants pour comprendre la complexité interne d'une particule. La dernière série de capteurs est utilisée pour les particules fluorescentes. Pour discriminer les micro-organismes marins, trois capteurs sont principalement utilisés en fonction des longueurs d'onde détectées : FL1 pour la fluorescence verte (par exemple les bactéries, après marquage),

FL2 pour la fluorescence jaune/orange, et FL3 pour la fluorescence rouge (par exemple l'autofluorescence des pigments du phytoplancton).



Fig. 8 - Appareil utilisé pour l'analyse par cytométrie en flux.

ADCP Acoustic Doppler Current Profiler

La mesure du courant marin sera effectuée au moyen d'un courantomètre acoustique à effet Doppler (ADCP) 600 kHz de RD Instruments (Fig. 9). L'instrument sera maintenu immergé juste sous la surface de la mer (environ 0,5 m de profondeur) pendant le temps nécessaire (environ 5 minutes) pour enregistrer les données de courant (intensité, direction et sens) à chaque station de mesure. Dans la mesure du possible, l'instrument, équipé de l'application Bottom Track, sera fixé à la coque du bateau utilisé pour l'échantillonnage (Fig. 9), et les mesures seront alors effectuées en continu le long de transects couvrant toute la zone d'étude. Le fonctionnement de l'ADCP prévoit la subdivision de la colonne d'eau en cellules de mesure, dont le nombre et la taille varient en fonction de la fréquence de fonctionnement de l'instrument et de la profondeur que l'on souhaite atteindre avec les mesures ; à l'intérieur de ces cellules, l'instrument effectue une série de mesures et renvoie la valeur moyenne avec

l'écart-type relatif. Pour les ports dans lesquels les courants seront mesurés par ADCP, la taille de cellule la plus appropriée sera définie sur la base de la morphologie du fond marin et des profondeurs maximales atteintes par le fond marin dans les bassins concernés.

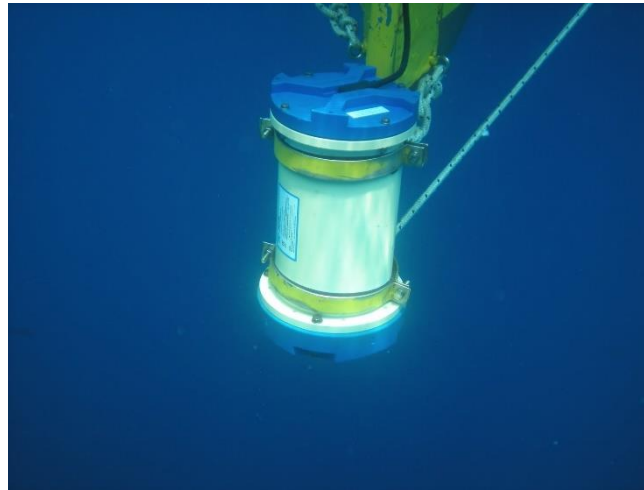


Fig. 9 - Correntomètre ADCP

Près de l'embouchure de la Rias du port d'Olbia sera placé un courantomètre ADCP, pour la mesure du courant le long de la colonne d'eau. Cet instrument fera partie du réseau de surveillance du projet. Les données recueillies par l'instrument seront également utilisées pour la calibration et la validation des modèles.

Remise d'un Drifter pour l'étude de la circulation de l'eau et le positionnement de l'ADCP à un point fixe

Des courantomètres lagrangiens, appelés drifters, seront lâchés dans le port d'Olbia. Ces instruments, équipés d'un système de détection de position et de transmission de données, flotteront en surface et mesureront les courants dans les premières couches de la colonne d'eau (Fig. 10). Ces instruments seront récupérés environ 5 heures après leur libération.

Les drifters sont de petite taille, fabriqués en matière plastique flottante et pèsent moins de 3 kg.



Interreg



UNION EUROPEENNE
UNIONE EUROPEA



MARITTIMO-IT FR-MARITIME

Fonds européen de développement régional
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale

Produit n. T2.2.1



Fig. 10 – Drifter.

4. Bibliographie

- 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 tributyltin 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-Kärber 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.