

## PRODOTTO T2.3.5

# "APPLICAZIONI PRATICHE"

**Descrizione:** *pubblicazione di una sintesi delle analisi realizzate e dei risultati della caratterizzazione ottenuti nei porti italiani e francesi (UNICA, ISPRA, UNTLN).*

## **SE.D.Ri.Port – Sedimenti, Dragaggi, Rischi Portuali**

<http://interreg-maritime.eu/web/se.d.ri.port>

**Responsabile azione T2.3. “Raccolta ed implementazione dei dati relativi alla qualità ambientale dei sedimenti di accumulo e delle possibili aree di destinazione dei materiali dragati nei porti oggetto di studio-caratterizzazioni”**

**UNICA** -Università degli Studi di Cagliari- Via Università 1, 09142 Cagliari

[www.unica.it/](http://www.unica.it/)

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

Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma

[www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)

**UTLN**- Università di Tolone, CS 60584, 83041 Toulon cedex 9

<http://www.univ-tln.fr/>

**Coordinatore UNICA:** Marco Schintu

**Coordinatore ISPRA:** Davide Sartori

**Coordinatore UNITLN:** Benjamin Misson

**Estensori del Report:** Natalia Montero, Barbara Marras, Marco Schintu, Simona Macchia, Alice Scuderi, Davide Sartori, Véronique Lenoble, Benjamin Misson

**Ringraziamenti:** Alessandra Mannai, Maria Elena Piccione, Silvia Giuliani, Stefano Ferrari, Fabiano Pilato, David Pellegrini, Valentina Vitiello, Nicolas Layglon, Nicolas Gallois, Aurélie Portas, Alexis Canino, Nezli Doumandji, Louis Longo

<b>1. Introduzione</b> .....	6
<b>2. Area di studio e campagne di campionamento</b> .....	8
<b>3. Caratterizzazione della colonna d'acqua</b> .....	20
<b>3.1. Campionamento passivo</b> .....	20
<b>3.1.1. Metalli: deposizione, trattamento e analisi dei DGT</b> .....	20
<b>3.1.2. Composti organici apolari: deposizione, trattamento e analisi del SR</b> .....	22
<b>3.1.3. Composti organici polari: deposizione, trattamento e analisi dei POCIS</b> .....	24
<b>3.2. Mussel Watch</b> .....	27
<b>3.2.1. Descrizione delle strutture utilizzate per le attività di traslocazione dei mitili</b> .....	27
<b>3.2.2. Bioaccumulo di metalli</b> .....	27
<b>3.2.3. Bioaccumulo di Idrocarburi Policiclici Aromatici</b> .....	28
<b>3.2.4. Bioaccumulo di PCB</b> .....	28
<b>4. Caraterizzazione dei sedimenti superficiali</b> .....	30
<b>4.1. Caratteristiche granulometriche</b> .....	30
<b>4.2. Carbonio organico totale</b> .....	30
<b>4.3. Analisi chimiche</b> .....	30
<b>4.3.1. Metalli</b> .....	30
<b>4.3.2. Idrocarburi Policiclici Aromatici</b> .....	31
<b>4.3.3. PCB</b> .....	32
<b>4.4. Ecotossicologia</b> .....	32
<b>4.4.1. Preparazione delle matrici da testare</b> .....	32
<b>4.4.2. Saggio biologico con <i>Vibrio fischeri</i></b> .....	33
<b>4.4.3. Saggio biologico con <i>Paracentrotus lividus</i></b> .....	34
<b>4.4.4. Saggio biologico con <i>Phaeodactylum tricornutum</i></b> .....	36
<b>4.5. Valutazione della contaminazione dei sedimenti e del rischio ambientale</b> .....	39
<b>4.5.1. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti</b> .....	39
<b>4.5.2. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale</b> .....	40
<b>5. Caraterizzazione dei sedimenti ad alta risoluzione</b> .....	41
<b>5.1. Caraterizzazione verticale ad alta risoluzione</b> .....	41
<b>5.1.1. Determinazione dei profili verticali di Eh e pH</b> .....	41
<b>5.1.2. Sottocampionamento di sedimenti ad alta risoluzione verticale</b> .....	42
<b>5.1.3. Misurazione delle concentrazioni di nutrienti e e marcatori diagenetici</b> .....	43
<b>5.1.4. Misurazione delle concentrazioni di metalli in traccia</b> .....	43
<b>5.1.5. Misurazione delle concentrazioni di metalli in traccia</b> .....	43
<b>5.1.6. Analisi della diversità microbica</b> .....	44
<b>5.2. Caraterizzazione spaziale ad alta risoluzione</b> .....	44
<b>6. Risultati</b> .....	46

<b>6.1. Caratterizzazione della colonna d'acqua</b> .....	46
<b>6.1.1. Campionamento passivo</b> .....	46
6.1.1.1. Diffusive Gradients in Thin-films (DGT): metalli .....	46
6.1.1.2. Silicon Rubber (SR): composti organici non polari.....	50
6.1.1.3. POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler): composti organici polari.....	56
<b>6.1.2. Mussel Watch</b> .....	63
6.1.2.1. Bioaccumulo metalli .....	63
6.1.2.2. Bioaccumulo IPA .....	66
6.1.2.3. Bioaccumulo PCB .....	68
<b>6.2. Caraterizzazione dei sedimenti superficiali</b> .....	70
6.2.1. Caratteristiche granulometriche.....	70
6.2.2. Carbonio Organico Totale (TOC) .....	71
6.2.3. Concentrazioni di metalli nei sedimenti .....	71
6.2.4. Concentrazioni di IPA nei sedimenti .....	73
6.2.5. Concentrazioni di PCB nei sedimenti .....	75
<b>6.2.6. Saggi biologici</b> .....	77
<b>6.2.7. Valutazione della contaminazione dei sedimenti e del rischio ambientale</b> .....	80
6.2.7.1. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti: Metalli .....	80
6.2.7.2. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti: IPA e PCB.....	82
6.2.7.3. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale: livelli soglia (SQG).....	84
6.2.7.4. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale: MERMQ e MPELQ .....	84
<b>6.2.8. Matrice tabulare</b> .....	85
<b>6.3. Caraterizzazione delle carote di sedimenti</b> .....	89
<b>6.3.1. Caraterizzazione verticale ad alta risoluzione</b> .....	89
6.3.1.1. Sequenze diagenetiche .....	89
6.3.1.2. Contenuto di metalli in traccia, fasi del trasporto e mobilità.....	90
6.3.1.3. Profili verticali della diversità microbica nei sedimenti.....	92
<b>6.3.2. Caraterizzazione spaziale ad alta risoluzione</b> .....	93
6.3.2.1. Classificazione del pericolo chimico .....	94
6.3.2.2. Classificazione del pericolo ecotossicologico .....	96
6.3.2.3. Classi di qualità dei sedimenti .....	97
<b>7. Discussione</b> .....	99
<b>7.1. Caratterizzazione della colonna d'acqua</b> .....	99
<b>7.1.1. Campionamento passivo</b> .....	99
7.1.1.1. DGT: metalli .....	99
7.1.1.2. SR: composti non polari .....	103
7.1.1.3. POCIS: composti polari .....	107

<b>7.1.2. Mussel Watch</b> .....	109
7.1.2.1. Bioaccumulo metalli, IPA e PCB.....	109
<b>7.1.3. Campionamento passivo vs Mussel Watch</b> .....	110
<b>7.2. Caraterizzazione dei sedimenti superficiali</b> .....	111
7.2.1. Caraterizzazione fisico-chimica dei sedimenti .....	111
7.2.2. Concentrazioni totali di metalli nei sedimenti .....	112
7.2.3. Concentrazioni di IPA nei sedimenti.....	115
7.2.4. Concentrazioni di PCB nei sedimenti .....	116
7.2.5. Saggi biologici.....	116
<b>7.2.6. Valutazione della contaminazione dei sedimenti e del rischio ambientale</b> .....	117
7.2.6.1. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti: metalli .....	117
7.2.6.2. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti: IPA e PCB.....	118
7.2.6.3. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale: livelli soglia (SQG).....	119
7.2.6.4. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale: MERMQ e MPELQ .....	119
7.2.7. <b>Matrice tabulare</b> .....	120
<b>7.3. Caraterizzazione delle carote di sedimenti</b> .....	122
7.3.1. Caraterizzazione verticale ad alta risoluzione.....	122
7.3.2. Caraterizzazione spaziale ad alta risoluzione .....	122
<b>7.4. Valutazione integrata del rischio ambientale nei porti italiani e francesi</b> .....	124
<b>8. Bibliografia</b> .....	127

## 1. Introduzione

I porti svolgono un'ampia varietà di attività economiche e commerciali che influiscono sulla qualità dell'acqua all'interno del dominio portuale. Inoltre, le attività di dragaggio, per mantenere l'adeguatezza dei canali di navigazione e la costruzione di infrastrutture portuali, comportano cambiamenti fisici e idromorfologici dell'ambiente naturale, che incidono sull'inquinamento e sulla distribuzione delle sostanze inquinanti.

I porti sono stati storicamente ubicati in luoghi strategici, per favorire il facile trasporto delle merci. Pertanto, molti nuclei urbani importanti si sono sviluppati intorno ai porti, aumentando il problema di contaminazione già esistente nelle aree portuali, con la conseguente immissione di contaminanti di origine urbana e industriale. Tutte queste attività possono portare ad un aumento dei livelli di metalli e composti organici nell'acqua e nei sedimenti. Pertanto, per garantire uno sviluppo sostenibile delle attività portuali e per minimizzare il potenziale rischio per l'ambiente circostante, è essenziale ottenere una precisa caratterizzazione della contaminazione e dei suoi effetti potenziali.

Diversi approcci possono essere utilizzati per l'analisi del deterioramento della qualità dell'acqua all'interno di un'area portuale, come la misura delle concentrazioni chimiche nell'acqua e nei sedimenti. In questo senso, i limiti dei programmi di monitoraggio tradizionali sono stati già discussi in maniera esaustiva a livello internazionale (OSPAR 2000; ICES 2012), ed è stata evidenziata la necessità di nuove tecniche e metodologie per valutare la contaminazione marina e per sviluppare e implementare criteri che proteggano le aree di potenziale rischio ambientale.

Per quanto riguarda la valutazione della qualità dell'acqua, la Direttiva Quadro sulle Acque (DQA) e la Direttiva Quadro sulla Strategia per l'Ambiente Marino (DQSAM) stabiliscono solo standard di qualità ambientale (SQA) delle sostanze prioritarie nelle frazioni disciolta e totale. Tuttavia, è stato suggerito che le linee guida sulla qualità dell'acqua dovrebbero essere definite in termini di forme biodisponibili, come migliore approssimazione della tossicità, piuttosto che come concentrazioni totali o filtrate (Meyer 2002; Garofalo et al. 2004; Sherwood et al. 2009). In questo senso, i mitili sono stati ampiamente utilizzati per evitare le limitazioni del campionamento puntuale dell'acqua, in quanto gli inquinanti

accumulati nei loro tessuti riflettono la concentrazione nell'acqua, essendo indicatori diretti della biodisponibilità dei contaminanti. L'uso dei mitili ha anche qualche limitazione, in quanto il bioaccumulo è influenzato da fattori biotici e abiotici (Schintu et al. 2008) ed è stata precisata la loro capacità di regolare la concentrazione dei metalli essenziali (Rainbow 1995). Di conseguenza, in SEDRIPORT si è deciso di integrare le informazioni ottenute dai mitili trapiantati con quelle del campionamento passivo, per ottenere una valutazione integrata della qualità dell'acqua all'interno dei porti studiati. Una descrizione più dettagliata dei campionatori passivi utilizzati e dei loro vantaggi rispetto al campionamento tradizionale si può trovare nel prodotto SEDRIPORT T2.3.6. Brevemente, le concentrazioni dei contaminanti misurati dai campionatori passivi rappresentano la frazione potenzialmente biodisponibile e pertanto possono essere più facilmente relazionati ai potenziali effetti biologici nel biota (Berho et al. 2009; Dèvier et al. 2011). Inoltre, i campionatori passivi accumulano continuamente i contaminanti durante il tempo di esposizione nell'acqua, permettendo la misurazione di concentrazioni molto basse e fornendo una concentrazione di contaminanti integrata nel tempo, che rappresenta l'intero tempo di esposizione, invece di una singola misura che non è rappresentativa della contaminazione reale (Dunn et al. 2003; Warnken et al. 2007; Schintu et al. 2008).

Attualmente, la valutazione dei sedimenti non è direttamente richiesta dalle direttive europee, ma i sedimenti sono un buon indicatore degli impatti antropogenici sui porti e sull'ambiente costiero (Viguri et al. 2007; Schintu et al. 2016). Tuttavia, a livello nazionale in Italia (Allegato Tecnico al D.M. 173/2016) e in Francia (Circulaire no 2000-62 du 14 juin 2000), esistono leggi specifiche per la valutazione e la gestione dei sedimenti. I sedimenti forniscono un'informazione storica sulla contaminazione e rappresentano un potenziale rischio ecologico, in quanto possono agire come fonte di contaminanti per la colonna d'acqua (Belzunce et al. 2004; Macken et al. 2008). E' stato dimostrato che l'analisi chimica dei sedimenti da sola non fornisce una valutazione realistica della qualità dei sedimenti, quindi il monitoraggio dovrebbe integrare parametri chimici e biologici (Burton 2002; Chapman 2007; Macken et al. 2008). Inoltre, i saggi biologici sono accettati come strumenti appropriati per la valutazione dei sedimenti in quanto forniscono informazioni dirette sulla tossicità dei contaminanti (Macken et al. 2008; Cesar et al. 2009). Pertanto, in SEDRIPORT, le informazioni ottenute dall'analisi chimica dei contaminanti presenti nel sedimento sono state integrate con la tossicità misurata da una batteria di saggi biologici. Per completare lo studio dei sedimenti, è stato effettuato lo studio verticale dei gradienti di ossido-riduzione e della sequenza diagenetica nelle carote dei sedimenti, nonché lo studio

dei metalli associati alla frazione scambiabile dei sedimenti superficiali, per determinare la speciazione e la mobilità dei composti metallici.

È stato suggerito che sia le matrici dell'acqua che quelle dei sedimenti dovrebbero essere incluse nei programmi di monitoraggio, al fine di ottenere una caratterizzazione più precisa dello stato di un corpo idrico (Tueros et al. 2009). Inoltre, in Italia e Francia esiste una normativa specifica per la movimentazione dei sedimenti nei porti. Pertanto, gli obiettivi di SEDRIPORT, per quanto riguarda la caratterizzazione ambientale dei porti studiati, sono i seguenti: (i) applicare un approccio multidisciplinare per ottenere una valutazione integrata della qualità delle acque e dei sedimenti nei porti italiani (Olbia, Cagliari e La Spezia) e francesi (Tolone), (ii) valutare il rischio associato alla risospensione/rimobilizzazione dei sedimenti nei porti e (ii) dimostrare l'utilità di questi strumenti per la valutazione del rischio e per un'efficace gestione ambientale portuale.

## 2. Area di studio e campagne di campionamento

Nell'ambito del progetto Interreg Italia-Francia Marittimo SEDRIPORT (2017-2020), sono state effettuate diverse campagne di campionamento in quattro porti (Tolone, La Spezia, Olbia e Cagliari) situati nell'area transfrontaliera (Figura 1). Nel periodo 2017-2019 sono state effettuate almeno due campagne di campionamento in ogni porto, per rappresentare le condizioni durante i periodi di basso e alto traffico marittimo.

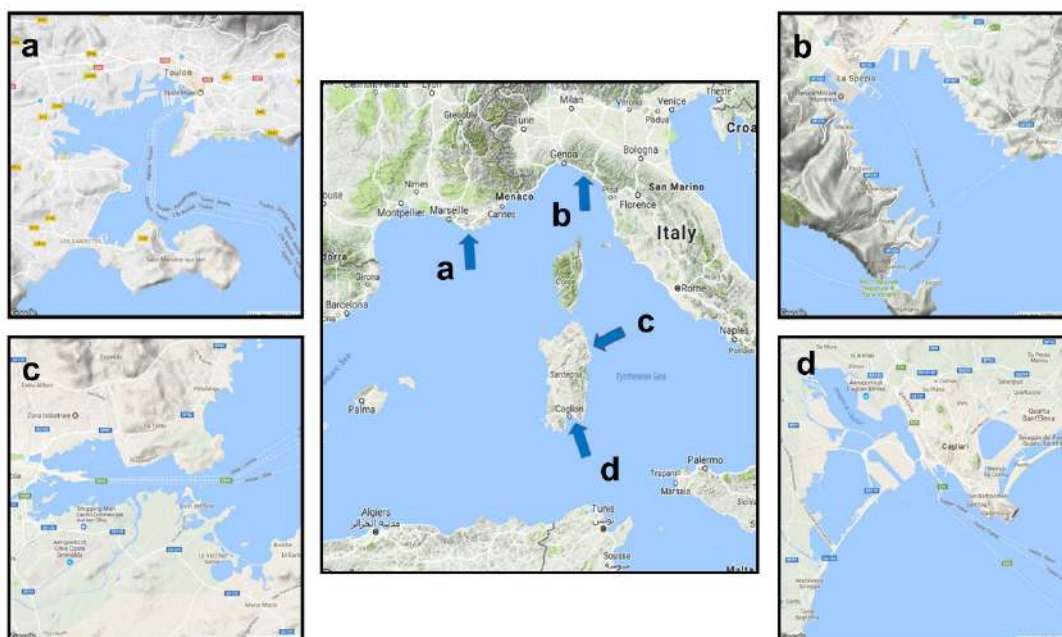


Figura 1. Mappa che presenta i quattro siti pilota campionati: a) Tolone, b) La Spezia, c) Olbia e d) Cagliari



## *Tolone*

Il porto di Tolone è una baia naturalmente semi-chiusa, relativamente riparata dalla corrente principale. Nella baia scorrono due piccolissimi fiumi costieri: il Las e l'Eygoutier, con una portata media annuale di circa  $0,1 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ . La baia di Tolone è divisa in due bacini da una diga artificiale: il bacino occidentale (Petite Rade); profondità massima 12 m,  $9,8 \text{ km}^2$ ) e il bacino orientale (Grande Rade); profondità massima 17 m,  $42,2 \text{ km}^2$ ), lasciando solo due canali di comunicazione e di scambio tra le masse d'acqua: il canale piccolo a nord, largo circa 15 metri, permette il passaggio delle imbarcazioni ricreative, mentre il canale grande a sud, largo diverse centinaia di metri e profondo quasi 30 metri, permette la maggior parte del rinnovo dell'acqua del porto piccolo e il passaggio di tutte le grandi navi (Figura 2).

La Petite Rade presenta il maggior numero di pressioni, ospitando un nucleo urbano altamente popolato (Tolone e dintorni, 400.000 abitanti), quattro porti turistici, due terminali per crociere (circa 140.000 passeggeri per il 2019), un piccolo terminal cargo, il più grande porto militare francese, alcune industrie nautiche, linee di trasporto marittimo e acquacoltura (cozze, ostriche e pesce). Queste attività attuali, insieme a quelle storiche, hanno causato la presenza di livelli molto elevati di varie sostanze chimiche nell'acqua e soprattutto nei sedimenti del porto. È stata oggetto di studio soprattutto la contaminazione da metalli, con fattori di arricchimento che coprono diversi ordini di grandezza per sostanze come il mercurio o il piombo (Tessier et al. 2011). I sedimenti sono inoltre fortemente contaminati da sostanze organiche (IPA, PCB) e organometalliche (TBT, MMHg) (Pougnat et al. 2014; Misson et al. 2016; Wafo et al. 2016). È stata studiata anche la contaminazione da fosforo (Dang et al. 2018). Questa contaminazione dei sedimenti è particolarmente evidente a nord della Petite Rade, e si disperde gradualmente lungo la principale via di scambio verso il mare aperto (attraverso il canale grande e lungo la penisola di Saint Mandrier). Nella colonna d'acqua, nonostante un tempo di rinnovamento relativamente breve nella Petite Rade (stimato tra 1 e 7 giorni a seconda del vento, Dufresne et al. 2014), sono stati rivelati anche gradienti di contaminazione metallica, seguendo lo stesso schema dei sedimenti, rivelando sia fonti puntuali di inquinanti (ad es. per il rame) sia la rimobilizzazione della contaminazione storica nei sedimenti (ad es. per il piombo) (Dang et al. 2015; Coclet et al. 2018, 2019). La Grande Rade è meno colpita dalla contaminazione in quanto presenta un più rapido rinnovamento delle acque a causa della sua vicinanza alla zona costiera (Tessier et al. 2011).



*Figura 2. Localizzazione delle stazioni di campionamento nella Baia di Tolone*

A Tolone sono state effettuate tre campagne di campionamento (Tabella 1). La prima si è svolta nell'estate del 2018 e tre siti (P1, P2 e P3; Fig. 2) sono stati selezionati nell'estremità nord-occidentale del Porto di Tolone, situati ad una distanza opportuna dal punto scelto per la simulazione di un'attività di dragaggio. I campionatori passivi sono stati posizionati nella colonna d'acqua, nelle 3 stazioni, per il periodo luglio-agosto 2018 (DGT, 7 giorni; SR e POCIS, 50 giorni) e due carote (30 cm) di sedimento (profondità 1,5 m) sono state raccolte nella stazione P1 utilizzando un corer Uwitec in settembre 2018. A causa della presenza di materiale esplosivo nei sedimenti di questa zona, non è stato possibile effettuare una seconda campagna di campionamento in questo sito. Pertanto, è stato necessario modificare il programma di campionamento iniziale e selezionare nuove stazioni nella Petite Rade.

Sono state scelte quattro stazioni di campionamento (Fig. 2), per rappresentare un presunto gradiente di contaminazione all'interno della Petite Rade: (1) Suffren (solo per la raccolta di sedimenti superficiali), situata in un'area altamente contaminata e chiusa, soggetta ad un'elevata risospensione dei sedimenti, (2) Corsica Ferries, situata vicino al terminal crociere, (3) Tour Royale, che rappresenta un punto intermedio all'interno della rada e (4) Lazaret, che si trova nella parte più esterna della Petite Rade, vicino agli impianti di acquacoltura. La profondità a Corsica Ferries e Lazaret è di circa 10-15 m, mentre a Suffren e Tour Royale è di circa 7 m.

Nella rada di Tolone sono state effettuate due campagne di campionamento, in inverno e nell'estate del 2019 (Tabella 1). I campionatori passivi sono stati posizionati nella colonna d'acqua in tre stazioni (Corsica Ferries, Tour Royale e Lazaret) a febbraio-marzo 2019 (DGT, 7 giorni; SR e POCIS, 30 giorni) e a luglio-agosto 2019 (DGT, 8 giorni; SR e POCIS, 39 giorni). Inoltre, a febbraio 2019, nelle 4 stazioni sono stati raccolti campioni di sedimenti superficiali e di acqua, utilizzando una benna Van Been e una bottiglia Niskin, rispettivamente. I parametri chimico-fisici sono stati misurati ad ogni campagna di campionamento utilizzando una sonda multiparametrica.

*Tabella 1. Localizzazione delle stazioni di campionamento, date di esposizione dei campionatori passivi (PS) e dei mitili (MW), campionamento di sedimenti e parametri chimico-fisici misurati in ogni campagna*

St	Lat	Long	Data	PS	Carote Sed	Sed Superf	MW	T (°C)	Sal (ppt)	pH
<b>P1</b>	43.113798	5.885362	Estate 2018	DGTs:	X			23.4		
				11/07/2018-						
				18/07/2018						
<b>P2</b>	43.113909	5.886707		DGTs:				23.1		
				11/07/2018-						
<b>P3</b>	43.114336	5.892842		DGTs:				22.8		
				11/07/2018-						
<b>Suffren</b>	43.119206	5.916865	Inverno 2019	ND		X				
<b>Corsica Ferries</b>	43.114434	5.925543		DGTs:		X		12.3	37.9	7.6
				04/02/2019-						
<b>Tour Royal</b>	43.102745	5.923702		DGTs:		X		12.4	37.9	7.7
				04/02/2019-						
<b>Lazaret</b>	43.092693	5.91285		DGTs:		X		12.5	37.9	7.7
				04/02/2019-						
<b>Corsica Ferries</b>	43.114434	5.925543	Estate 2019	DGTs:				24.0	38.1	7.8
				19/08/2019-						
<b>Tour</b>	43.102745	5.923702		DGTs:				24.3	38.1	7.8
				26/08/2019						
<b>Tour</b>	43.102745	5.923702		SR:				24.3	38.1	7.8

<b>Royal</b>			18/07/2019- 26/08/2019			
			POCIS:			
<b>Lazaret</b>	43.092693	5.91285	18/07/2019- 26/08/2019	24.4	38.1	7.8

---

Le informazioni specifiche sul trattamento dei campionatori passivi (vedi sezione 3.1.), sulle carote di sedimenti (vedi sezione 5.1.) e dei sedimenti superficiali (vedi sezione 4.) sono riportate di seguito.

### *La Spezia*

L'area marina della rada di La Spezia si estende da punta Pezzino a ponente, a Punta Calandrello a levante, su una superficie di circa 1564 ettari, delimitata a sud-est da una diga foranea, di circa 2,8 Km (Figura 3). La profondità media della rada è di circa 10 metri, con un canale di profondità media di 15 m per il passaggio delle navi, ed una profondità massima intorno ai 17 m. L'intera area marina è interessata da una importante antropizzazione legata alla presenza di diverse attività, come la presenza di un porto commerciale adibito a traffico mercantile e passeggeri, diversi porti turistici, un Arsenale Militare, aree interessate da cantieristica navale, aree interessate da attività di carico e scarico (gasdotto, etc.) ed impianti di mitilicoltura ed itticoltura. All'interno della rada confluiscono inoltre numerosi scarichi sia industriali che civili. Nell'area a terra sono presenti numerose attività di tipo commerciale e industriale, con impianti attivi (centrale termoelettrica ENEL, etc.) o dismessi (ex fonderia di Piombo Pertusola, etc.), attività di cantieristica navale, presidi militari ed impianti di gestione rifiuti, tra cui aree dismesse, che in passato sono state sede di impianti di smaltimento, ed aree utilizzate in maniera discontinua come discariche. Le attività che hanno insistito ed insistono sull'area sono responsabili di una contaminazione diffusa dei fondali marini (Prodotto T1.6.6. SEDRIPORT; ARPAL-ISPRA 2019).

Il Porto di La Spezia, grazie alla strategica posizione geografica, è uno dei più importanti scali mercantili del Mediterraneo ed uno dei nodi strategici all'interno della TENT-T Core network, la rete centrale di trasporto trans-europea, quale porto core del Corridoio prioritario Scandinavia-Mediterraneo ([www.adspmarligureorientale.it](http://www.adspmarligureorientale.it)). Dal 2005 al 2015, l'Autorità Portuale della Spezia, con la duplice finalità di realizzare la messa in sicurezza/bonifica dei sedimenti di alcune aree individuate e di consentire l'accesso alle banchine portuali di navi di dimensioni e pescaggio sempre maggiori, ha effettuato diverse

progetti di bonifica dei fondali, con un volume totale di circa 490.000 m<sup>3</sup> di sedimenti asportati. Dalla fine del 2015 l'Autorità Portuale non ha più effettuato attività di dragaggio, tranne un'operazione di livellamento dei fondali nell'area ad Est del Molo Fornelli a marzo 2019. Tale intervento si è reso necessario al fine di garantire la navigabilità delle navi portacontainer di nuova generazione nella zona di attracco e manovre. L'intervento di livellamento è consistito nello spostamento in loco di circa 3600 m<sup>3</sup> di sedimenti marini da un'area di circa 4250 m<sup>2</sup> ubicata ad un centinaio di metri dal molo stesso (vedi Prodotto T1.6.6. SEDRIPORT; ARPAL-ISPRA 2019).



*Figura 3. Localizzazione delle stazioni di campionamento nella rada di La Spezia*

A La Spezia sono state effettuate due campagne di campionamento, in autunno 2017 e in primavera 2019 (Tabella 2). In autunno 2017 sono state selezionate tre stazioni di campionamento, situate all'interno della rada di La Spezia: (1) Molo Fornelli, situata in un'area che è stata soggetta a numerose operazioni di bonifica e livellamento dei fondali in passato e durante il progetto SEDRIPORT in marzo 2019, (2) Molo Garibaldi, situata in un'area multiuso gestita da La Spezia Container Terminal (Contship Italia group), Italcementi e Sepor e (3) Cadimare, che si trova nelle immediate vicinanze dell'aeronautica militare. La profondità è di circa 14 m a Molo Fornelli, 12 m a Molo Garibaldi e 5 m a Cadimare. I campionatori passivi sono stati depositati nella colonna d'acqua, nelle 3 stazioni, in novembre-dicembre 2017 (DGT, 6 giorni; SR e POCIS, 30 giorni), mentre i mitili sono stati immersi nelle stesse stazioni per un mese (20/11/2017-

21/12/2017). Inoltre, a novembre 2017, sono stati raccolti 4 campioni di sedimenti superficiali (benna Van Been), nelle vicinanze del Molo Fornelli, in previsione di un potenziale intervento di dragaggio in quella zona, e anche due carote (30 cm) di sedimento (profondità 7 m), utilizzando un corer Uwitec.

La campagna di campionamento del 2019 è stata programmata in concomitanza con il livellamento dei fondali ad est del Molo Fornelli, al fine di poter valutare eventuali effetti delle operazioni di dragaggio. In questo caso è stata aggiunta una stazione supplementare, posizionata nella darsena della scuola di vela di Santa Teresa, vicina all'impianto di mitilicoltura. I campionatori passivi sono stati depositati nella colonna d'acqua, nelle 4 stazioni, in marzo-aprile 2019 (DGT, 19 giorni; SR e POCIS, 32 giorni), mentre i mitili sono stati immersi, solo in 3 stazioni (Molo Fornelli, Molo Garibaldi e Cadimare), per un mese (08/03/2019-09/04/2019). I parametri chimico-fisici sono stati misurati ad ogni campagna di campionamento utilizzando una sonda multiparametrica.

*Tabella 2. Localizzazione delle stazioni di campionamento, date di esposizione dei campionatori passivi (PS) e dei mitili (MW), campionamento di sedimenti e parametri chimico-fisici misurati in ogni campagna*

St	Lat	Long	Data	PS	Carote Sed	Sed Superf	MW	T (°C)	Sal (ppt)	pH
<b>Molo Fornelli</b>	44.104638	9.845780	Autunno 2017	DGTs:	X	X	X	16.6	38.0	8.3
				21/11/2017-						
				27/11/2017						
<b>Molo Garibaldi</b>	44.103593	9.840331		SR:			X	16.5		8.3
				21/11/2017-						
				21/12/2017						
<b>Cadimare</b>	44.083152	9.824972		POCIS:			X	15.5		8.4
				21/11/2017-						
				21/12/2017						
<b>Molo Fornelli</b>	44.104638	9.845780	Primavera 2019	DGTs:			X	13.8	36.5	8.5
				08/03/2019-						
				27/03/2019						
<b>Molo Garibaldi</b>	44.103593	9.840331		SR:			X	13.7	36.6	8.6
				08/03/2019-						
				09/04/2019						
<b>Cadimare</b>	44.083152	9.824972		POCIS:			X	13.2	36.3	8.5
				08/03/2019-						
				09/04/2019						

Le informazioni specifiche sul trattamento dei campionatori passivi (vedi sezione 3.1.), carote di sedimenti (vedi sezione 5.1.), sedimenti superficiali (vedi sezione 4) e mitili (vedi sezione 3.2.) sono riportate di seguito.

### *Olbia*

Il Golfo di Olbia è situato sulla costa orientale della Sardegna. Le pressioni antropiche più evidenti in questo corpo idrico sono: la presenza del porto di Olbia, il potenziale apporto di contaminanti provenienti dal fiume Padrongianus (15 km) nella parte meridionale e gli impianti d'acquacoltura, che rappresentano la più grande area di allevamento di cozze e vongole della Sardegna (5000 t<sup>-1</sup>) (Luglio 2019; <https://deims.org>).

Il porto di Olbia, primo in Sardegna per traffico passeggeri e per quello merci ro-ro, rappresenta uno dei più importanti scali passeggeri del Mediterraneo, con quattro milioni di presenze ogni anno, ed è anche un importante scalo commerciale con quasi sei milioni di tonnellate di merci. Il porto di Olbia è suddiviso in tre aree (vedi Prodotto T1.3. SEDRIPORT 2019; [www.adspmaredisardegna.it](http://www.adspmaredisardegna.it)):

1. il porto interno, che si trova a sud della radice del Pontile Isola Bianca e vi si accede attraverso un canale, ampio circa 100 m, attualmente praticabile da navi con pescaggio non superiore a 6 m,
2. il Pontile Isola Bianca con 10 banchine dedicati al traffico commerciale, passeggeri e crocieristico,
3. il Porto Cocciani, che comprende il porto industriale, che è destinato alle merci, ed è inserito nel tessuto industriale della città.



*Figura 4. Localizzazione delle stazioni di campionamento nel Golfo di Olbia*

Ad Olbia sono state individuate tre stazioni di monitoraggio dentro il golfo: (1) Porto, posizionata in prossimità dei filari di allevamento di mitili più interni al porto di Olbia e prossimi alla zona di manovre delle navi che attraccano sulle banchine del porto, (2) Foce, situata sui filari di allevamento di mitili prossimi alla foce del fiume Padrongianus e (3) Controllo, che è una stazione di controllo posizionata in prossimità dei filari di mitili ubicati all'imbocatura del Golfo di Olbia (Figura 4).

A Olbia sono state effettuate due campagne di campionamento, in estate 2018 e in inverno 2019 (Tabella 3). Nel 2018, i mitili (26/06/2018-26/07/2018) e i campionatori passivi sono stati depositati nella colonna d'acqua, nelle 3 stazioni, in giugno-luglio (DGT, 8 giorni; SR e POCIS, 30 giorni). Inoltre, a giugno 2018, sono stati raccolti campioni di sedimenti superficiali (benna Van Been) nelle stesse 3 stazioni e anche due carote (30 cm) di sedimento (profondità 4 m), utilizzando un corer Uwitec, nella stazione Porto. Nel 2019, i campionatori passivi sono stati depositati nella colonna d'acqua, nelle 3 stazioni, a gennaio-marzo 2019 (DGT, 7 giorni; SR e POCIS, 65 giorni), mentre i mitili sono stati immersi nelle stesse stazioni per un mese (15/01/2019-20/02/2019). I parametri chimico-fisici sono stati misurati ad ogni campagna di campionamento utilizzando una sonda multiparametrica.



Tabella 3. Localizzazione delle stazioni di campionamento, date di esposizione dei campionatori passivi (PS) e dei mitili (MW), campionamento di sedimenti e parametri chimico-fisici misurati in ogni campagna:

St	Lat	Long	Data	PS	Carote Sed	Sed Superf	MW	T (°C)	Sal (ppt)	pH
<b>Porto</b>	40.92681	9.528115	Estate 2018	DGTs:	X	X	X	25.5	35.6	9.0
				26/06/2018- 04/07/2018						
				SR:						
<b>Foce</b>	40.920407	9.539361		DGTs:		X	X	25.4	35.6	9.0
				26/06/2018- 26/07/2018						
				POCIS:						
<b>Controllo</b>	40.923312	9.558777		DGTs:		X	X	25.2	35.7	9.0
				26/06/2018- 26/07/2018						
<b>Porto</b>	40.92681	9.528115	Inverno 2019	DGTs:			X	12.9	35.2	8.3
				15/01/2019- 22/01/2019						
				SR:						
<b>Foce</b>	40.920407	9.539361		DGTs:			X	11.6	35.4	8.3
				15/01/2019- 21/03/2019						
				POCIS:						
<b>Controllo</b>	40.923312	9.558777		DGTs:			X	11.6	35.5	8.3
				15/01/2019- 21/03/2019						

Le informazioni specifiche sul trattamento dei campionatori passivi (vedi sezione 3.1.), carote di sedimenti (vedi sezione 5.1.), sedimenti superficiali (vedi sezione 4.) e mitili (vedi sezione 3.2.) sono riportate di seguito.

### Cagliari

Il Porto di Cagliari è localizzato nella costa meridionale della Sardegna e classificato, ai sensi della Legge 84/94 e s.m.i. di categoria II, classe I “porti di rilevanza economica internazionale” e si estende fino a 30 km lungo la costa. Esso si compone di due ambiti: il Porto Vecchio ed il Porto Canale. Il Porto Vecchio è delimitato da due opere foranee esterne, la diga foranea di ponente e la diga foranea di levante. Si sviluppa su 5.800 metri di banchina e ha una vocazione per traffico commerciale, Ro-Ro, navi passeggeri e crocieristico (con un terminal dedicato). Lo specchio d’acqua si estende per 2.065.000 m<sup>2</sup> complessivi, con fondali fino a 12 metri. Il Porto Canale è delimitato da due moli foranei

convergenti, della lunghezza di 2.020 metri ciascuno. Si estende per oltre 1.600 metri e offre cinque accosti per traffico transhipment e Ro-Ro. Gli specchi acquei sono complessivamente pari a circa 3.000.000 m<sup>2</sup>. Sono ricompresi, inoltre, nel Porto di Cagliari gli accosti petrochimici-petroliiferi con attracchi per diciassette navi, a servizio di una delle più importanti raffinerie nazionali situati in zona Sarroch-Porto Foxi, nonché La Maddalena Spiagge (vedi Prodotto T1.3. SEDRIPORT 2019; [www.adspmaredisardegna.it](http://www.adspmaredisardegna.it)). Oltre a queste attività, il Porto di Cagliari si caratterizza per la presenza di un'area urbana fortemente popolata (Cagliari e dintorni, 500.000 abitanti).



*Figura 5. Localizzazione delle stazioni di campionamento nel Porto di Cagliari*

A Cagliari sono state effettuate tre campagne di campionamento, in primavera, estate e autunno del 2018 (Tabella 4). Sono state individuate tre stazioni di monitoraggio (Figura 5): (1) Molo Rinascita, posizionata in prossimità delle banchine di attracco delle navi da crociera, (2) Darsena Pescherecci, situata nella darsena del nuovo porto e vicino alla foce dei fiumi Flumini Mannu e Cixerri e (3) Sant'Elmo, posizionata nel porto turistico e in prossimità della foce del canale Palma (Mammarranca). I campionatori passivi sono stati collocati nella colonna d'acqua, nelle 3 stazioni, a marzo-giugno 2018 (DGT, 6 giorni; SR e POCIS, 53 giorni), giugno-luglio 2018 (DGT, 8 giorni; SR e POCIS, 30 giorni) e luglio-settembre 2018 (DGT, 5 giorni; SR e POCIS, 63 giorni). A dicembre 2018, sono stati

raccolti campioni di sedimenti superficiali (benna Van Been) nelle stesse 3 stazioni. Inoltre, per il grande interesse della zona in cui si trova la stazione di Molo Rinascita, in quanto è il punto di attracco delle navi da crociera, a settembre-novembre 2019 è stato effettuato il campionamento ad alta risoluzione spaziale di sedimenti nello specchio acqueo compreso tra i Moli Sabaudò e Rinascita (31 carote; con una lunghezza variabile tra 0 e 480 cm).

*Tabella 4. Localizzazione delle stazioni di campionamento, date di esposizione dei campionatori passivi (PS) e dei mitili (MW), campionamento di sedimenti e parametri chimico-fisici misurati in ogni campagna*

St	Lat	Long	Data	PS	Carote Sed	Sed Sup	MW	T (°C)	Sal (ppt)	pH
<b>Molo Rinascita</b>	39.211338	9.104132	Primavera 2018	DGTs:				14.2	37.0	8.4
				14/03/2018-						
				19/03/2018						
<b>Darsena Pescherecci</b>	39.212335	9.101160		DGTs:				14.4	36.1	8.6
				19/04/2018-						
				11/06/2018						
<b>Sant'Elmo</b>	39.200633	9.126854		POCIS:				14.4	36.8	8.5
				19/04/2018-						
				11/06/2018						
<b>Molo Rinascita</b>	39.211338	9.104132	Estate 2018	DGTs:				20.4	35.6	8.9
				11/06/2018-						
				19/06/2018						
<b>Darsena Pescherecci</b>	39.212335	9.101160		DGTs:				20.5	35.7	8.8
				11/06/2018-						
				11/07/2018						
<b>Sant'Elmo</b>	39.200633	9.126854		DGTs:				20.6	36.6	9.0
				11/06/2018-						
				19/06/2018						
<b>Molo Rinascita</b>	39.211338	9.104132	Autunno 2018	DGTs:	X (Set-	X		26.1	36.1	9.2
				12/09/2018-	nov	(Dec				
				17/09/2018	2019)	2018)				
<b>Darsena Pescherecci</b>	39.212335	9.101160		DGTs:				26.2	35.6	9.2
				11/07/2018-						
				12/09/2018						
<b>Sant'Elmo</b>	39.200633	9.126854		DGTs:				26.1	35.6	9.1
				11/07/2018-						
				12/09/2018						

Le informazioni specifiche sul trattamento dei campionatori passivi (vedi sezione 3.1.), carote di sedimenti (vedi sezione 5.1.) e sedimenti superficiali (vedi sezione 4.) sono riportate di seguito.

### 3. Caratterizzazione della colonna d'acqua

#### 3.1. Campionamento passivo

##### 3.1.1. Metalli in traccia : deposizione, trattamento e analisi dei DGT

Il campionamento passivo per i metalli in traccia e i composti organici polari e apolari è stato realizzato da UNICA.

Tutta la vetreria e i supporti in plexiglass, utilizzati in laboratorio e per l'esposizione dei DGT, rispettivamente, sono stati immersi in un bagno acido  $\text{HNO}_3$  al 10% per una notte e poi risciacquati con acqua Milli-Q prima dell'uso.

I DGT sono stati forniti dalla DGT Research Ltd. (Università di Lancaster, Regno Unito). I DGT utilizzati in questo progetto per la determinazione di Cd, Cr, Cu, Ni, e Pb sono composti da un gel di diffusione di poliacrilammide, di spessore 0.8 mm, e una resina Chelex-100 impregnata in poliacrilammide. I supporti in plexiglass, ognuno con tre dispositivi DGT, sono stati immersi nella colonna d'acqua delle stazioni di campionamento per tempi che vanno dai 5 ai 19 giorni (Fig. 6). Le temperature sono state misurate al momento della deposizione e del recupero, utilizzando una sonda multiparametrica e i tempi di immersione sono stati registrati al minuto più prossimo. Quando sono stati recuperati, le finestre di esposizione dei DGT sono state pulite con acqua deionizzata e ogni DGT è stato conservato in un sacchetto di plastica individuale. I DGT sono stati trasportati in laboratorio e conservati a 4°C fino all'analisi. Non è stato osservato alcun biofouling visibile sulle superfici dei dispositivi DGT, anche per il periodo più lungo (19 giorni) di esposizione. Pertanto, non sono previsti effetti di biofouling sui metalli accumulati. Questo è in accordo con le osservazioni di altri studi condotti su lunghi periodi (14-30 giorni) nel Mar Mediterraneo (Schintu et al. 2008, 2018; Baeyens et al. 2018).



Figura 6. Supporti in plexiglass e rete di protezione utilizzati per l'esposizione dei DGT.

In laboratorio, i DGT sono stati smontati e i metalli accumulati sono stati estratti dalle resine Chelex-100 con una soluzione di acido 1 M HNO<sub>3</sub> (>24 h; Ultrapur 60%, Merck Millipore, Germania). Gli estratti acidi risultanti sono stati analizzati, in accordo con il metodo USEPA (1994), mediante spettroscopia ad assorbimento atomico in fornello di grafite (GFAAS Varian GTA120-AA240Z), utilizzando la correzione di fondo Zeeman, per cadmio (Cd), piombo (Pb), rame (Cu) e nichel (Ni). Le calibrazioni sono state effettuate per mezzo di soluzioni mono-elemento (1.000 ppm) che sono state diluite alle concentrazioni dei campioni. Il controllo di qualità è stato assicurato per mezzo di soluzioni multi-elementi che sono state preparate in modo analogo ai campioni di calibrazione. I limiti di rilevazione strumentale sono stati i seguenti: 0,05 µg L<sup>-1</sup> per Cd, 0,2 µg L<sup>-1</sup> per Cu, 1 µg L<sup>-1</sup> per Ni e 0,5 µg L<sup>-1</sup> per Pb.

Le concentrazioni medie dei metalli nell'acqua ( $C_{acqua}$ ) durante il tempo di esposizione sono state calcolate seguendo la procedura di Zhang e Davison (1995). La concentrazione ( $C_e$ ) misurata negli estratti acidi è utilizzata per calcolare la massa ( $M$ ) dei metalli accumulati nella resina Chelex-100, usando l'equazione seguente:

$$M = \frac{C_e(V_g + V_e)}{f_e}$$

dove  $V_g$  e  $V_e$  sono il volume di gel e il volume di nitrico utilizzato, rispettivamente, e  $f_e$  è il fattore di eluizione (frazione dei metalli accumulati che è stata estratta dalla resina).

La concentrazione dei metalli nell'acqua ( $C_{acqua}$ ) misurata dai DGT è stata calcolata con la seguente equazione:

$$C_{acqua} = \frac{M\Delta g}{DtA}$$

dove  $\Delta g$  è lo spessore del gel diffusivo più quello del filtro,  $D$  è il coefficiente di diffusione del metallo nell'idrogel alla temperatura misurata nella colonna d'acqua,  $t$  è il tempo di esposizione in secondi e  $A$  è l'area di esposizione dei DGT (3.14 cm<sup>2</sup>). I coefficienti di diffusione forniti dalla DGT Research (2003) sono stati corretti in base alla temperatura, usando l'equazione seguente, dove  $Dt$  e  $D25$  rappresentano il coefficiente di diffusione del metallo a qualsiasi temperatura e a 25 gradi, rispettivamente:

$$\log D_t = \frac{1.37023(t - 25) + 8.36 \times 10^{-4}(t - 25)^2}{109 + t} + \log \frac{D_{25}(273 + t)}{298}$$

### 3.1.2. Composti organici apolari: deposizione, trattamento e analisi del SR

Tutto il materiale utilizzato in laboratorio e per l'esposizione del SR, è stato bonificato con acetone ed esano. È stata utilizzata acqua deionizzata, doppiamente distillata in laboratorio e purificata con un sistema di purificazione dell'acqua Zeener Power I (Human Corporation, Corea del Sud), durante tutte le procedure sul campo e in laboratorio.

I fogli di SR (Laboratorio Altesil, 60 x 60 cm, 0.5 mm spessore) sono stati forniti dall'Altec Products LTD (Bude, Regno Unito). Tutti i solventi utilizzati (etilacetato, metanolo, esano e diclorometano) sono di purezza analitica e sono stati acquistati da VWR International PBI - Milano. I fogli di silicone sono stati tagliati in strisce di dimensioni 30x600 mm (con una massa di circa 12 gr ciascuna). Ad ogni estremità delle strisce di silicone sono stati fatti due buchi (5 mm). Gruppi di venti strisce di silicone sono state bonificate in Soxhlet per 100 ore con etilacetato e 24 ore con metanolo. Successivamente i seguenti composti di riferimento (PRC) sono stati aggiunti, come descritto da Booij et al. (2003) e Booij e Smedes (2010): PCB-1, PCB-2, PCB-3, PCB-10, PCB-14, PCB-50, PCB-21, PCB-104, PCB-55, PCB-78, PCB-145, PCB-204 (100 ng ciascuno). Le strisce sono state conservate a -20 °C in recipienti di metallo bonificati e sigillati fino al momento della deposizione.

L'esposizione è avvenuta mediante montaggio su supporti metallici (spiders) che permettono la massimizzazione della superficie esposta (Fig. 7). I supporti vengono inseriti in appositi cesti metallici (canister) in gruppi da tre (Fig. 7). Il trasporto del materiale è stato effettuato utilizzando recipienti metallici riempiti di gas inerte. Al momento della deposizione i canister sono stati sospesi nei corpi idrici tramite un galleggiante ad almeno 2 m dalla superficie. Durante le operazioni di assemblaggio, trasporto, deposizione e recupero, una o più strisce di SR sono state esposte all'ambiente ed analizzate per verificare eventuali contaminazioni accidentali (Bianchi trasporto). I canister, ognuno con tre strisce di silicone, sono stati immersi nella colonna d'acqua delle stazioni di campionamento per tempi che vanno dai 30 ai 65 giorni (Fig. 7). Dopo il recupero, i canister sono stati trasportati a terra utilizzando recipienti metallici riempiti di gas inerte. Quando sono stati smontati, la superficie di ogni striscia di silicone è stata pulita con carta da laboratorio e acqua bidistillata. Ogni campionario passivo è stato sigillato nel suo recipiente di metallo corrispondente e trasportato in laboratorio refrigerato a 4 °C.



*Figura 7. Spiders e canister utilizzati per l'esposizione dei SR*

In laboratorio, i contaminanti concentrati negli SR sono stati recuperati, mediante estrazione ad ultrasuoni, seguendo la metodica di Bustamante et al. (2013). In breve, le strisce sono state inserite in bottiglie di vetro con metanolo e sono stati aggiunti gli standard interni prima dell'estrazione. Si è trasferito il metanolo in un pallone e si è ripetuto il procedimento. I due estratti sono stati combinati e ridotti mediante evaporazione sotto vuoto. Il volume del solvente è stato ridotto successivamente a 2 ml e scambiato con esano mediante il Kuderna-Danish. La purificazione è stata effettuata in GPC con un sistema Agilent 1100 HPLC con una colonna Phenogel 10 micron 100 A 250 mm x 21,5 mm i.d. (Phenomenex) munita di precolonna e con rivelatore UV impostato a 254 nm. Dopo la purificazione i campioni sono stati ridotti a piccolo volume (circa 100 µl di nonano) e sono stati aggiunti gli standard di recupero. La determinazione analitica è stata effettuata utilizzando la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa in trappola ionica utilizzando la tecnica massa/massa (GC/ITD/MS/MS). Lo strumento è stato calibrato utilizzando i fattori di risposta relativi agli standard interni in funzione della concentrazione su 8 punti nel range di concentrazione tra 1 e 200 ng per campione per IPA, su 7 punti nel range di concentrazione tra 1 e 100 ng per campione per PCB ed emergenti. Tutte le calibrazioni sono risultate lineari con un fattore di correlazione  $R^2$  migliore di 0,99. L'elenco degli analiti che sono stati misurati è riportato di seguito.

**Elenco IPA ricercati:** Naftalene (Naph), Acenaftilene (Aceph), Acenaftene (Ace), Fluorene (Fl), Fenantrene (Phen), Antracene (Ant), Fluorantene (Flu), Pirene (Pyr), Benzo[a]antracene (BaA), Crisene (Chr), Trifenilene (Tri), Benzo[b]fluorantene (BbF), Benzo[j]fluorantene (BjF), Benzo[k]fluorantene (BkF), Benzo[a]pirene (BaP), Benzo[e]pirene (BeP), Perilene (Per), Indeno[1,2,3-cd]pirene (Inp), Dibenzo[a,h]antracene (DBA), Benzo[ghi]perilene (BgP).

**Elenco PCB ricercati:** PCB18, PCB31+PCB28, PCB44, PCB58, PCB95, PCB101, PCB99, PCB81, PCB110, PCB77, PCB151, PCB149, PCB123, PCB118, PCB114, PCB146, PCB153, PCB105, PCB138, PCB126, PCB187, PCB183, PCB167, PCB 128, PCB177, PCB156, PCB157, PCB180, PCB169, PCB170, PCB189.

**Elenco emergenti ricercati:** Galaxolide (HHCB), Tonalide (AHTN), Cashmeran (DPMI), Phantolide (AHMI), Traseolide (ATII), Tetramethyl acetyloctahydronaphthalene (OTNE) e irgarol.

Le concentrazioni nell'acqua ( $C_{acqua}$ ) degli analiti sono state calcolate applicando l'equazione del modello di reazione chimica cinetica (CRK) descritto da Huckins et al. (1993, 2006) e Booij et al. (1998). Questa equazione descrive l'assorbimento degli analiti durante ogni fase del campionamento:

$$C_{acqua} = \frac{N}{mK_{pw} \left( 1 - \left( \frac{-R_s t}{k_{pw} m} \right) \right)}$$

dove  $N$  è la quantità totale della sostanza determinata in ogni striscia di silicone,  $m$  è la massa del campionatore,  $K_{pw}$  è il coefficiente di ripartizione degli analiti tra acqua e SR,  $t$  è il tempo di esposizione delle strisce nell'acqua e  $R_s$  è la velocità specifica di campionamento dell'analita nel luogo di esposizione. I  $R_s$  sono stati calcolati secondo i modelli semiempirici  $R_s = \beta_M M^{-0.47}$  per gli IPA e PCB (Rusina et al. 2010) e  $R_s = \beta_{sil} K_{pw}^{-0.08}$  per gli emergenti (Pintado-Herrera et al. 2016).

### **3.1.3. Composti organici polari: deposizione, trattamento e analisi dei POCIS**

POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) con 200 mg di sorbente Oasis HLB tra due membrane polimeriche microporose PES (polietersulfone) e una superficie esposta di 46 cm<sup>2</sup> sono stati acquistati da ExposMeter (AB, Taveljö, Svezia). I POCIS, coperti da fogli di alluminio, sono stati conservati a -20 °C fino al momento dell'installazione.

L'esposizione è avvenuta mediante montaggio su supporti metallici che permettono la massimizzazione della superficie esposta (Fig. 8). I supporti vengono inseriti in appositi cesti metallici (canister) in gruppi da tre, insieme alle strisce di silicone (Fig. 8). Il trasporto del materiale dal laboratorio al sito di deposizione è stato effettuato utilizzando recipienti



metallici riempiti di gas inerte. Al momento della deposizione i canister sono stati sospesi nei corpi idrici tramite un galleggiante a almeno 2 m dalla superficie. Durante le operazioni di assemblaggio, trasporto, deposizione e recupero, uno o più POCIS sono stati esposti all'ambiente ed analizzati per verificare eventuali contaminazioni accidentali. I canister, ognuno con tre POCIS, sono stati immersi nella colonna d'acqua delle stazioni di campionamento per tempi che vanno dai 30 ai 65 giorni (Fig. 8). Dopo il recupero, i canister sono stati trasportati a terra utilizzando recipienti metallici riempiti di gas inerte. Quando sono stati smontati, le superfici di ogni POCIS sono state pulite con acqua bidistillata. Ogni POCIS è stato trasportato in laboratorio refrigerato a 4 °C.



*Figura 8. Supporti e canister utilizzati per l'esposizione dei POCIS.*

In laboratorio, la resina contenuta nei POCIS è stata trasferita in cartuccia per SPE da 6 mL utilizzando 10 mL di acqua ultrapura ed asciugata sotto flusso di azoto. Dopo pesatura ed aggiunta di 100 ng di bisfenoloA-d6 come standard interno, gli analiti sono stati eluiti con 40 mL di metanolo (grado di purezza per pesticidi). L'estratto organico è stato portato a secco sotto flusso di azoto e gli analiti sono stati derivatizzati con 100  $\mu$ L di MSTFA attivato con etantiolo e ioduro di ammonio (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide I - Fluka - Cod. 1011036551) per 60 minuti a 70°C. Dopo trasferimento in vial cromatografica munita di conetto da 200  $\mu$ L ed aggiunta di 100 ng di 5- $\alpha$ -androstano come standard di iniezione, i campioni sono stati analizzati in GC/MS/MS. La quantificazione è stata effettuata tramite calibrazione con standard interni su sei livelli, da 10 ng campione<sup>-1</sup> (50 pg  $\mu$ L<sup>-1</sup>) a 400 ng campione<sup>-1</sup> (2 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>). Tutte le calibrazioni sono risultate lineari con un fattore di correlazione R<sup>2</sup> migliore di 0,99. L'elenco degli interferenti endocrini misurati è il seguente: alchilfenoli (4-tert-Ottilfenolo, 4-n-Ottilfenolo, 4-n-Nonilfenolo, 4-Ottilfenolo-

monoetossilato, 4-Nonilfenolo-etossilato, 4-Ottilfenolo-di-etossilato, 4-Nonilfenolo-di-etossilato), bisfenolo A e steroidi (17- $\alpha$ -Estradiolo, Estrone, 17- $\beta$ -Estradiolo, Mestranolo, 17- $\alpha$ -Etinilestradiolo, Estriolo).

Le concentrazioni nell'acqua ( $C_{acqua}$ ) degli analiti sono state calcolate applicando la equazione seguente:

$$C_{acqua} = \frac{(C_{POCIS} \times M_s)}{(R_s \times t)}$$

dove  $C_{POCIS}$  è la concentrazione di analita nel sorbente,  $M_s$  è la massa del sorbente all'interno del POCIS,  $R_s$  è la velocità specifica di campionamento dell'analita ottenuta nelle condizioni sperimentali e  $t$  è il tempo di esposizione dei POCIS nell'acqua.

Oltre alle analisi chimiche, i POCIS sono stati utilizzati per testare la potenziale tossicità con il saggio biologico del riccio di mare *Paracentrotus lividus*. In particolare, uno dei tre replicati di ogni stazione di campionamento è stato estratto in metanolo senza l'aggiunta dello standard interno, e testato con questo saggio biologico (vedi sezione 4.4.3.).

La tossicità di ciascun campione è funzione della concentrazione ambientale dei contaminati presenti catturati dalla resina del POCIS e per tale motivo è stato determinato un fattore di arricchimento ambientale (EF) mediante la seguente formula:

$$EF = \frac{R_s t / (\frac{V_{extr}}{V_{spike}})}{V_{bioassay}}$$

dove  $R_s$  esprime la velocità di uptake delle resine ( $L \text{ day}^{-1}$ ) ed è direttamente correlato alle proprietà fisiche e chimiche degli analiti disciolti nell'ambiente,  $t$  è il tempo di esposizione del campionatore in giorni,  $V_{extr}$  è il volume finale di estratto,  $V_{spike}$  è il volume dell'aliquota prelevata dall'estratto e aggiunto al biotest e  $V_{bioassay}$  è il volume finale in cui è stato condotto il biotest.

In letteratura, i valori di  $R_s$  per campionatori con due superfici esposte variavano tra 0,5 e 1  $L \text{ day}^{-1}$  (Stephens et al. 2003); per questo studio, è stato utilizzato un valore medio di  $R_s$  pari a 0,8  $L \text{ day}^{-1}$  così come riportato da Shaw and Mueller (2005).

Per il saggio di embriotossicità con *P. lividus* ogni estratto è stato testato ad un fattore di arricchimento massimo (EF) di 100 e alle sue successive diluizioni seriali di 50, 25 e 12,5.

## 3.2. Mussel Watch

### 3.2.1. Descrizione delle strutture utilizzate per le attività di traslocazione dei mitili

Il Mussel Watch è stato realizzato dall'ISPRA in collaborazione con ARPAL. L'indagine di monitoraggio è stata effettuata secondo la tecnica degli organismi trapiantati. I mitili sono stati presi della Cooperativa Miticoltori di Lerici e traslocati, senza alcuna stabulazione, per un periodo di 4-5 settimane nelle aree da monitorare. Sono stati trapiantati circa 200-300 individui di taglia omogenea (5-7 cm) approssimativamente compresa tra il 70 ed il 90% delle dimensioni massime della popolazione da cui sono stati raccolti. Il trapianto è stato effettuato mantenendo gli organismi in reti di nylon o strutture plastiche fissate nella stazione da monitorare, ad una profondità compresa tra 1 e 5 m e ad almeno un metro dal fondo.

Trascorso il periodo in situ, i mitili sono stati recuperati, se necessario mantenuti refrigerati a circa 4°C in ambiente umido (ma non immersi in acqua) fino ad un massimo di 24 ore, e rapidamente dissezionati e preparati per le successive analisi chimiche. Per ogni punto di campionamento sono stati immediatamente preparati 7 pool, ciascuno costituito generalmente dalle intere parti molli di circa 10 organismi, da destinare alle analisi chimiche di idrocarburi policiclici aromatici (3 pool per ARPAL), alle analisi chimiche dei metalli in traccia (3 pool per ISPRA STS Livorno) e per riserva (1 pool). I tessuti molli dei mitili selezionati sono stati prelevati, lavati con acqua deionizzata (MilliQ) e congelati a – 20°C fino al momento dell'analisi.

### 3.2.2. Bioaccumulo di metalli

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

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

I metalli in traccia determinati sui tessuti molli di *Mytilus galloprovincialis* sono stati As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni Pb e Zn. Le analisi sono state condotte mediante l'impiego di

Spettrofotometria ad Emissione Ottica (Agilent AX Sequential ICP-OES 720). Per il mercurio le analisi sono state condotte mediante l'utilizzo di Spettroscopia ad Assorbimento Atomico (metodo dei Vapori Freddi; Cetac M-7600). L'accuratezza è stata verificata impiegando il materiale standard di riferimento SRM NIST 2976 Mussel Tissue (National Institute of Standards & Technology, USA), che è stato processato con le stesse modalità dei campioni.

### **3.2.3. Bioaccumulo di Idrocarburi Policiclici Aromatici**

Ai fini della determinazione nella matrice biota dei 16 Idrocarburi policiclici Aromatici (IPA) definiti Inquinanti Prioritari dall'agenzia americana EPA (Environmental Protection Agency, US-EPA), si procede secondo il metodo QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe). Gli'IPA misurati sono stati i seguenti: Acenaftene, Acenaftilene, Antracene, Benzo(a)antracene, Benzo(a)pirene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(g,h,i)perilene, Benzo(k)fluorantene, Crisene, Dibenzo(a,h)antracene, Fenantrene, Fluorantene, Fluorene, Indeno(1,2,3-c,d)pirene, Naftalene, Pirene, Sommatoria IPA.

Si trasferiscono 10 g di campione umido omogeneizzato in una provetta monouso da 50 ml, unendo una barretta di ceramica per rompere gli agglomerati e mantenere omogeneo il campione. Si aggiungono, quindi 12 ml di acetonitrile e si pone la provetta su un agitatore orizzontale per 15 minuti. Si aggiungono 6 g MgSO<sub>4</sub> e 1.5 g di NaCl, si agita per 1 minuto e si procede a centrifugare per 10 minuti a 5000 giri. Per la procedura di estrazione in fase solida dispersiva (d-SPE, dispersive solid phase extraction), si trasferiscono 4 ml del surnatante (acetonitrile) in provetta monouso da 15 ml contenente 400 mg di PSA, 400 mg di C18 end capped, 1200 mg MgSO<sub>4</sub>, si agita per 1 minuto e si centrifuga 10 minuti per 3200 giri. Circa 1.5 ml del surnatante purificato viene filtrato su membrane in PVDF con porosità 0.45 µm e trasferito in vial di vetro. A questo punto si procede con l'analisi strumentale in cromatografia liquida ad ultra prestazione con rivelatore a fluorescenza (UPLC/FLD Waters Acquity). La determinazione viene condotta, quindi, in HPLC/FLD con taratura a cinque punti da 0.1 ng/ml a 100 ng/ml (corrispondenti a 0.12 e 120 µg/kg p.u. nel campione di biota).

### **3.2.4. Bioaccumulo di PCB**

Il metodo di riferimento per la determinazione dei PCB è il metodo EPA 1668C 2010. I PCB misurati sono stati i seguenti: PCB 101, PCB 118, PCB 126, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180, PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, Sommatoria PCB (28+52+77+81+101+118+126+138+ 153+156+169+180).

Il metodo è basato sull'utilizzo della gas cromatografia ad alta risoluzione abbinata alla spettrometria ad alta risoluzione (HRGC/HRMS) per la separazione, l'identificazione e la quantificazione, mediante diluizione isotopica dei PCB, in particolare è applicato alla determinazione dei 12 congeneri diossina-simili (77, 81, 105, 114, 118, 123, 125, 156, 157, 167, 169, 189) e dei 6 congeneri dei PCB indicatori (28, 52, 101, 138, 153, 180) in matrici di varia natura, compreso il biota. Per diluizione isotopica si intende la tecnica di calcolo dei congeneri d'interesse nativi rispetto ai loro analoghi marcati C13.

La procedura di analisi si articola in diverse fasi: preparazione dell'aliquota e aggiunta di standard marcati, estrazione della parte lipidica, purificazione, evaporazione degli estratti e trasferimento in vial di iniezione, analisi strumentale. L'analisi dei campioni è abbinata da un bianco procedurale che deve seguire le stesse procedure a cui sono sottoposti i campioni. I risultati della determinazione del bianco vengono utilizzati per correggere le misure dei campioni o per rilevare errori dovuti all'interferenza di contaminanti presenti nei reagenti. La preparazione prevede che il campione da analizzare sia liofilizzato prima di essere estratto, per eliminare l'umidità ed aumentare l'efficienza dell'estrazione. Viene pesata un'aliquota di campione omogeneizzato alla quale viene aggiunta la quantità nota dello standard di estrazione contenente i congeneri marcati ed essa viene sottoposta alla liofilizzazione. Il campione liofilizzato viene trasferito in una cella per l'estrazione con solvente mediante l'ASE200 (accelerated solvent extractor) DIONEX. L'estratto ottenuto viene filtrato su solfato di sodio anidro in un pallone da rotavapor, il solvente concentrato a pochi millilitri e portato successivamente a secco sotto il flusso dell'azoto per cambio solvente per proseguire con la fase di purificazione.

La purificazione prevede due trattamenti: distruzione della matrice organica/lipidica mediante colonna multistrato, di cui componente principale è la celite impregnata da acido solforico concentrato che agisce da agente che "brucia" la matrice e purificazione su sistema di colonnine di silice e di allumina ai fini di eliminare/separare l'analita d'interesse da sostanze interferenti. Prima di iniziare il trattamento di purificazione all'estratto viene aggiunto lo standard marcato di cleanup, per poter valutare eventuali perdite di analiti in questa fase. Nella fase finale l'estratto purificato viene microconcentrato: dopo la purificazione il solvente del campione viene evaporato su rotavapor a pochi ml, trasferito nella vial e portato a secco con il flusso di azoto. Prima dell'iniezione viene aggiunto lo standard di siringa e il campione viene iniettato nel sistema HRGC/HRMS.

## 4. Caraterizzazione dei sedimenti superficiali

### 4.1. Caratteristiche granulometriche

Per la determinazione delle caratteristiche granulometriche dei sedimenti marini si tratta ogni campione (circa 70 g) con una soluzione di perossido di idrogeno ed acqua distillata (1:8) per 48 h a temperatura ambiente, per facilitare la separazione dei granuli. In seguito, si separa il sedimento su maglia da 63 µm in umido con acqua distillata; le due frazioni così ottenute vengono essiccate in stufa a 60 °C e successivamente pesate. Si procede poi a vagliare la frazione > 63 µm (sabbia e ghiaia) con pile di setacci da 2000, 1000, 500, 250, 125 e 63 µm della serie ASTM; si pesa il sedimento corrispondente a ciascun intervallo e al termine delle operazioni si calcola in quale percentuale le varie frazioni sono presenti all'interno del campione.

### 4.2. Carbonio organico totale

La determinazione del carbonio organico totale è stata effettuata con il metodo *Loss on Ignition* (LOI) (Luckzak et al. 1997) che prevede l'incenerimento dei campioni di sedimento come riportato di seguito.

Un crogiolo contenente 7 g di sedimento è stato posto in stufa a 105°C per 24 ore e successivamente pesato su bilancia a quattro cifre decimali. Il campione è stato a questo punto messo di nuovo in muffola prima a 160 °C per 6 ore e successivamente a 400 °C per 4 ore. Al termine di ogni passaggio in stufa il campione è stato pesato e il contenuto di carbonio organico è stato determinato mediante la seguente formula:

$$TOC (g kg^{-1}) = ((Net\ weight_{160^{\circ}C} - Net\ weight_{400^{\circ}C}) / (Net\ weight_{105^{\circ}C}) * 100)$$

### 4.3. Analisi chimiche

#### 4.3.1. Metalli

Il campione (circa 0.3 g s.s.) è stato mineralizzato in bombe in teflon, con l'impiego di un forno a microonde opportunamente programmato (Milestone 1200), mediante l'aggiunta di 3 ml di HNO<sub>3</sub> (65%) e di 1 ml di HCl (30%) ultrapuri. Alla soluzione ottenuta è stata aggiunta una quantità di acqua ultrapura tale da raggiungere il volume finale di 25 ml. La determinazione analitica è stata effettuata mediante l'impiego di Spettrofotometria ad Emissione Ottica (Varian Liberty AX Sequential ICP-OES 720) per tutti i metalli ad eccezione del mercurio. Per quest'ultimo le analisi sono state condotte mediante l'utilizzo di Spettroscopia ad Assorbimento Atomico (metodo dei Vapori Freddi; Cetac M-7600). L'accuratezza della metodica è stata valutata impiegando il materiale standard di

riferimento LGC 6137 (Promochem), che è stato processato con le stesse modalità dei campioni. Il limite di rilevabilità della metodica e il limite di quantificazione per ogni metallo analizzato è riportato in Tabella 5.

*Tabella 5. Limiti di rilevabilità e di quantificazione*

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

Inoltre, è stata effettuata la procedura di estrazione sequenziale (Metodo BCR - Rauret et al. 1999) ai campioni di sedimenti raccolti a La Spezia (novembre 2017), Olbia (giugno 2018) e Cagliari (dicembre 2018). I sedimenti sono stati seccati in stufa a 40°C fino a peso costante, setacciati a 2 mm e omogeneizzati. La prima frazione (F1 - frazione scambiabile) è stata estratta da aliquote di 1 gr di sedimento, con una soluzione di acido acetico 0,11 M. I seguenti metalli sono stati determinati mediante spettroscopia ad assorbimento atomico in fornetto di grafite (GFAAS Varian GTA120-AA240Z): Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn.

#### **4.3.2. Idrocarburi Policiclici Aromatici**

I metodi EPA (EPA 3540 + EPA 8270D) prevedono che la separazione degli analiti dalla matrice venga effettuata mediante estrazione con solvente con estrattore Soxhlet. Per l'estrazione viene utilizzata miscela acetone:esano 1:1, previa anidrifazione con solfato di sodio. L'IPA misurati sono stati i seguenti: Acenaftene, Acenaftilene, Antracene, Benzo(a)antracene, Benzo(a)pirene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(g,h,i)perilene, Benzo(k)fluorantene, Crisene, Dibenzo(a,h)antracene, Fenantrene, Fluorantene, Fluorene, Indeno(1,2,3-c,d)pirene, Naftalene, Pirene, Sommatoria IPA.

Si procede quindi a determinazione strumentale in gascromatografia-spettrometria di massa GC/MS. Il gascromatografo separa i composti presenti nel campione mentre lo spettrometro di massa funziona da rivelatore. Tale tecnica costituisce uno dei metodi analitici più avanzati e consente l'identificazione e la quantificazione di sostanze organiche in una varietà di matrici. Il cromatografo consiste di un iniettore (auto-campionatore), un sistema per il controllo della temperatura della colonna e una linea di trasferimento che consente all'effluente della colonna di entrare nello spettrometro di massa. Lo spettrometro di massa consiste di una camera di ionizzazione (sorgente di ioni), di un analizzatore di masse (analizzatore a quadrupolo) e di un rivelatore di ioni; il tutto tenuto sotto alto vuoto mediante pompe a diffusione supportate da pompe molecolari.

### **4.3.3. PCB**

Per la ricerca di questi parametri viene utilizzato un metodo interno denominato C590. I PCB misurati sono stati i seguenti: PCB 101, PCB 118, PCB 126, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180, PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, Sommatoria PCB (28+52+77+81+101+118+126+138+ 153+156+169+180).

La separazione degli analiti dalla matrice viene effettuata mediante estrazione con solvente con estrattore Soxhlet. Una volta caricato nell'estrattore il campione non ha più bisogno di manipolazione e il Soxhlet provvede ad un'efficiente estrazione richiedendo però tempi abbastanza lunghi (16-24 h) e una quantità di solvente piuttosto elevata. Per l'estrazione si utilizza una miscela acetone:esano 1:1, previa anidificazione con solfato di sodio. Lo zolfo elementare è un componente di molti terreni, sedimenti e di molti rifiuti industriali. Col metodo EPA 3660b, la desolforazione viene effettuata trattando il campione con rame e l'estratto è poi rimosso dalla miscela di reazione. Si procede quindi a purificazione su colonna di celite acida (UNI CEN 16190), e a determinazione strumentale in gascromatografia+spettrometria di massa/massa (non disponibili metodi ufficiali in MS/MS).

## **4.4. Ecotossicologia**

### **4.4.1. Preparazione delle matrici da testare**

Per la valutazione dei possibili effetti dei contaminanti presenti nei sedimenti e rilasciati nella colonna d'acqua a seguito di interventi di dragaggio, movimentazione e risospensione causati dal traffico marittimo, l'ISPRA ha eseguito, sugli elutriati ottenuti dai sedimenti prelevati dai porti di Tolone, Cagliari, La Spezia e Olbia, una batteria di saggi composta da *Vibrio fischeri*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Paracentrotus lividus*.

L'elutriato è la matrice acquosa nella quale è presente la porzione solubile delle sostanze estraibili dal sedimento (ASTM 1994) e che meglio simula gli effetti legati alle movimentazioni dei fondali e ai dragaggi (USEPA/USACE 1991; Onorati and Volpi Ghirardini 2001), attività recentemente normate in Italia nell'ambito dell'Allegato Tecnico al DM 173/2016.

In letteratura sono presenti differenti metodologie per la preparazione dell'elutriato (USEPA/USACE 1991; USEPA 2001) in funzione della natura degli ambienti (Volpi Ghirardini et al. 2005; Arizzi Novelli et al. 2006, 2007) e della finalità dell'impiego (USACE 2003; Allegato Tecnico al DM 173/2016). Nel presente studio gli elutriati sono stati



preparati secondo la metodica riportata nel protocollo ASTM E1367 – 03 (2014) combinando quattro volumi di acqua di mare filtrata (o acqua marina artificiale) con una parte in peso di sedimento (peso secco). La sospensione così ottenuta è stata posta in agitazione per 1 h a 400 giri/min; la fase liquida è stata quindi raccolta e centrifugata a 4 °C per 20 min a 1200 x g.

#### **4.4.2. Saggio biologico con *Vibrio fischeri***

*Vibrio fischeri* è un batterio marino Gram-negativo ed eterotrofo, appartenente alla famiglia delle Vibrionaceae. E' cosmopolita, ma con maggior diffusione nelle fasce temperate e subtropicali. Il sistema Microtox® è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di questa specie. Poiché in presenza di contaminanti l'emissione di luce da parte di *V. fischeri* diminuisce, la misura dell'eventuale inibizione della bioluminescenza a seguito dell'esposizione del batterio ad una sostanza nota o ad un campione naturale di acqua o sedimento, consente di valutare il grado di tossicità della sostanza o della matrice testata. Il sistema di misura risulta piuttosto versatile in quanto è applicabile a matrici naturali, in particolare marine, acquose (acqua interstiziale, elutriato, ecc.) e solide (fanghi, sedimenti), nonché a soluzioni acquose di sostanze tossiche pure sia organiche che inorganiche.

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

L'emissione della bioluminescenza è stata misurata all'interno del luminometro termostato M500, dotato di pozzetti termostatati a 15 °C per i controlli e i campioni e a 4°C per il reagente. I metodi utilizzati sono riconducibili al protocollo standard ISO 11348-3 (2007). In particolare, per i campioni di elutriato è stata applicato il protocollo Comparison al 90% (Azur Environmental 1995) organizzato con 5 repliche del controllo e del campione al 90% di concentrazione, effettuando le letture dopo esposizione di 5, 15 e 30 minuti.

La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, è stata elaborata mediante un software dedicato (Microtox Omni™ v. 1.16) che, nel caso degli elutriati, ha consentito di individuare la variazione media percentuale di emissione di luce rispetto al controllo. La scala adottata per la quantificazione della tossicità è riportata in Tabella 6 (ICRAM-APAT 2007). L'elutriato è stato considerato tossico quando il campione ha mostrato una inibizione media della bioluminescenza statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) e maggiore o uguale al 10%.

Tabella 6. Scale di tossicità acuta utilizzate nel saggio biologico mediante *V. fischeri*

Matrice	Tossicità assente/trascurabile	Tossicità presente	Tossicità elevata	Tossicità molto elevata
Elutriato	EC <sub>20</sub> ≥ 90% % Effetto ≤ 20%	EC <sub>20</sub> < 90% e EC <sub>50</sub> ≥ 90% 20 < % Effetto ≤ 50%	20% ≤ EC <sub>50</sub> < 90% Effetto > 50%	EC <sub>50</sub> < 20%

#### 4.4.3. Saggio biologico con *Paracentrotus lividus*

L'affidabilità del riccio di mare come bioindicatore è riconosciuta a livello mondiale e già a partire dagli 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; ASTM 1995) 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 tuttavia, il saggio biologico con *P. lividus*, può essere impiegato sia nella stima della tossicità di sostanze o preparati solubili in acqua di mare sia nella valutazione della qualità di matrici ambientali marine salmastre quali l'acqua interstiziale e l'elutriato.

#### Modalità di esecuzione del test di embriotossicità

Il saggio biologico di sviluppo embrionale con il riccio di mare ha come endpoints lo sviluppo della larva di *P. lividus* a pluteo quattro braccia (P4). Il saggio di sviluppo embrionale con *P. lividus* è stato eseguito sulla base delle metodiche riportate nel quaderno di ecotossicologia ISPRA n. 11/2017 (Sartori et al. 2017 - ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 11/2017) e riportate brevemente di seguito.

Gli organismi impiegati per questo lavoro sono stati prelevati dall'impianto a circuito chiuso (RAS) presente presso i laboratori ISPRA di Livorno dove gli organismi sono allevati e mantenuti in condizioni di maturità sessuale mediante l'impiego di diete ad hoc (Sartori et al. 2016). Una volta recuperati dalle vasche di allevamento, gli organismi sono stati indotti all'emissione dei gameti mediante iniezione, effettuata con una siringa da insulina, di 0,5 ml di KCl 0,5 M attraverso la membrana peristomale. Le uova sono state recuperate in

beakers di vetro da 100 ml riempiti con acqua di mare, posizionando la femmina con il poro genitale rivolto verso l'acqua (Fig. 9a). Lo sperma è stato recuperato "a secco" direttamente dai gonopori dell'animale (Fig. 9b) tramite aspirazione con una pipetta Pasteur di vetro e conservato a 4 °C in un tubo da 1,5 ml (tipo Eppendorf®).



Figura 9: Recupero dei gameti di *P. lividus*: emissione delle uova (a) e dello sperma (b)

Le uova sono state preliminarmente osservate al microscopio per valutarne la qualità (obiettivi 4x e 10x) scartando le uova che si presentavano vacuolate, irregolari o piccole. Le uova risultate idonee sono state trasferite in beaker di vetro da 500 mL contenente FSW mediante pipette Pasteur in plastica. La sospensione di uova è stata diluita fino a raggiungere una densità di 1000 uova/mL e successivamente fecondate aggiungendo pochi  $\mu$ l di sperma. Trascorsi 20 min è stato verificato che la totalità delle uova fosse effettivamente fecondate. Il saggio di embriotossicità è stato eseguito esponendo 1 mL di soluzione di uova fecondate per 72 h in 10 mL dell'elutriato da testare. L'elutriato è stato testato tal quale (100%) e diluito con acqua di mare filtrata a 0,45  $\mu$ m alle concentrazioni finali del 25% e 50%. In parallelo sono stati allestiti un controllo negativo, consistente nell'esposizione delle uova fecondate, ad acqua di mare filtrata a 0.45  $\mu$ m (FSW) e un controllo positivo mediante l'esposizione al tossico di riferimento Nitrato di Rame ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) per valutare la sensibilità dei gameti.

Normalmente, a 18 °C, gli zigoti si sviluppano e raggiungono lo stadio larvale in 48h, ma il tempo di esposizione scelto per il test (72h), garantisce che tutti gli zigoti raggiungano lo stadio di larva (pluteo) nel controllo negativo. Il test è stato fissato con poche gocce di soluzione di Lugol forte. Al termine del saggio sono state determinate le % di larve che si sono sviluppate normalmente.

Per ottenere una stima più accurata degli effetti embriotossici, si distinguono le anomalie dello sviluppo distinguendo tra plutei malformati, cioè larve sviluppate ma che presentano malformazioni scheletriche e/o all'apparato digerente, e fasi pre-larvali di blastula, gastrula, prisma e pluteo precoce, che si sono bloccate prima del raggiungimento del completo sviluppo. Le percentuali di embrioni malformati rilevati nei campioni di elutriato testato e nel controllo positivo sono state impiegate per il calcolo dell' EC<sub>20</sub> e dell' EC<sub>50</sub> rispettivamente mediante il programma Tox Calc 5.0 (Probit Analysis) e Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1978). La scala adottata per la quantificazione della tossicità è riportata in Tabella 7 (ICRAM-APAT, 2007)

Tabella 7. Scala di tossicità del saggio con *P. lividus*

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

#### 4.4.4. Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

I primi metodi internazionali di riferimento per l'utilizzo di alghe monocellulari in prove di inibizione della crescita algale per lo studio della contaminazione di acque marine e costiere risalgono agli anni '70 (IRSA 1978). La metodica del saggio algale per organismi marini è stata aggiornata con la norma UNI ISO 10253 (2016) 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. I saggi con microalghe sono tra i più comunemente utilizzati per la facilità ed economicità del loro mantenimento in laboratorio e per la loro risposta rapida alla qualità dell'ambiente (Kraynukova 1988; Lewis 1995).

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

I principali indici presi in considerazione in questi lavori sono stati la densità cellulare (Okay et al. 1994; dos Santos et al. 2002; Moreno-Garrido et al. 2007; Zhuravel et al. 2009), ma anche risposte fisiologiche e biochimiche, come il contenuto di clorofilla *a* e la taglia cellulare (Zhuravel et al. 2009), la concentrazione di fitochelatine e peptidi

endocellulari che legano i metalli (Morelli et al. 2009), nonché la fluorescenza ritardata (Nash et al. 2005). La valutazione del tasso di crescita costituisce una procedura di facile esecuzione nonché di buona sensibilità, poiché l'aumento o la riduzione della crescita cellulare delle microalghe rispetto al controllo può essere connessa con fenomeni di inquinamento di matrici acquose (Khristoforova et al. 2001; Aizdaicher et al. 1999).

#### *Caratteristiche generali del test*

Il principio del test consiste nell'esporre una coltura algale pura in fase di crescita esponenziale per diverse generazioni a concentrazioni note di campione, in condizioni fisico-chimiche standardizzate e con un definito ed omogeneo apporto di nutrienti. Al termine del periodo d'incubazione viene confrontata la crescita algale nel campione con quella del controllo. Il saggio biologico è stato eseguito seguendo i protocolli ISO 10253 (2016) e ARPAT (1998; Draft 2003), con alcune modifiche specifiche.

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

Le colture cellulari madri sono state mantenute in opportuno mezzo di crescita a salinità di  $35 \pm 3$  g/Kg, con periodici rinnovi per mantenerle nella fase di crescita esponenziale. A partire dalla coltura madre, una pre-coltura con una densità cellulare compresa tra  $2 \times 10^3$  e  $10^4$  cells/mL è stata preparata 2-4 giorni prima dell'inizio del test ed incubata alle stesse condizioni previste per il test.

La densità cellulare raggiunta dalla pre-coltura è stata poi valutata immediatamente prima dell'utilizzo, per la preparazione della coltura di inoculo a densità cellulare definita.

#### *Metodologia di esecuzione del test*

Un'aliquota della coltura di inoculo è stata addizionata alla soluzione test e ad una appropriata quantità di mezzo di coltura concentrato. La soluzione così ottenuta, con una densità cellulare compresa tra  $8 \times 10^3$  e  $1,2 \times 10^4$  cells/mL, è stata quindi distribuita in triplice replica in piastre monouso sterili a 24 pozzetti (ARPAT IRSA-CNR 2003; ISO 10253 2016) e posta per 72h in camera termostatica a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , con regime di illuminazione continua del tipo *cool white* e con una intensità compresa tra 7.000 e 8.000 lux. Acqua di mare filtrata, sterilizzata e portata salinità 30‰ con aggiunta della medesima quantità di mezzo di coltura ed inoculo usato per i campioni, è stata considerata come controllo negativo. In contemporanea, un controllo positivo è stato effettuato utilizzando dicromato di potassio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) come tossico di riferimento per controllare la procedura e

la sensibilità del test. Al termine del prefissato periodo di incubazione è stata determinata la densità algale di ogni replicato, previa risospensione della soluzione contenuta in ciascun pozzetto. Tutte le valutazioni della densità algale sono state effettuate tramite conta al microscopio invertito utilizzando una camera di conta cellulare Thoma.

### *Analisi dei risultati*

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

$$\text{Fattore di Crescita (FC)} = \text{Cf/Ci},$$

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

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

in cui risulta:

Cf = concentrazione finale (cells/mL)

Ci = concentrazione iniziale (cells/mL).

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

Un ulteriore criterio di validazione del test è stata la determinazione del valore di EC50 registrato con il dicromato di potassio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), valore poi comparato all'intervallo preso come riferimento dal Protocollo ISO 10253 (2016) ( $\text{EC}_{50} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 = 14.8 - 25.4 \text{ mg/L}$ ,  $n = 7$ ).

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

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

Per esprimere il giudizio di tossicità è stata utilizzata la scala di valutazione riportata in Tabella 8 basata sulla percentuale di Inibizione registrata testando l'elutriato all'100%.

*Tabella 8. Scala di tossicità utilizzata nel saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum**

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

## 4.5. Valutazione della contaminazione dei sedimenti e del rischio ambientale

### 4.5.1. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti

In questo studio sono stati utilizzati diversi indici per valutare la contaminazione dei sedimenti:

#### - Fattore di Contaminazione (FC)

Questo indice è il rapporto tra la concentrazione dell'elemento nel sedimento della stazione di prelievo ( $C_{stazione}$ ) e la concentrazione dello stesso elemento a un livello di fondo o di riferimento ( $C_{riferimento}$ ).

$$FC = \frac{C_{stazione}}{C_{riferimento}}$$

La classificazione in base a questo indice è la seguente:  $FC < 1$  contaminazione bassa,  $1 \leq FC < 3$  contaminazione moderata,  $3 \leq FC < 6$  contaminazione significativa e  $FC \geq 6$  contaminazione alta.

#### - Indice di Geoaccumulazione (Igeo)

L'indice di geoaccumulazione è stato proposto da Muller (1969) per determinare e definire la contaminazione dei contaminanti nei sedimenti. *Igeo* permette di valutare la contaminazione confrontando le concentrazioni attuali e quelle preindustriali. È calcolato con la seguente equazione:

$$Igeo = \log_2 \left( \frac{C_i}{1,5 \times C_b} \right)$$

dove  $C_i$  è la concentrazione misurata dell'elemento  $i$  nel sedimento e  $C_b$  è il valore di riferimento dell'elemento  $i$ . Questo indice classifica i sedimenti in sette classi:  $< 0$  praticamente non inquinato,  $0-1$  non inquinato a moderatamente inquinato,  $1-2$  moderatamente inquinato,  $2-3$  moderatamente a fortemente inquinato,  $3-4$  altamente inquinato,  $4-5$  fortemente inquinato e  $> 6$  molto fortemente inquinato.

Per permettere un confronto, entrambi gli indici sono stati integrati in un 'sistema comune di qualificazione dei sedimenti', utilizzando le equivalenze di Qingjie et al. (2008) (vedi Martínez-Guijarro et al. 2019).

Inoltre, nel caso dei metalli, sulla base della percentuale presente nella frazione scambiabile F1, è stato utilizzato il Codice di Valutazione del Rischio (RAC; Perin et al. 1985) per valutare il rischio ambientale associato alla rimobilizzazione:

$$RAC = \frac{\text{Concentrazione metalli in F1}}{\text{Concentrazione totale metalli}}$$

In base al RAC, i sedimenti sono stati suddivisi nelle seguenti classi: Classe I, nessun rischio,  $RAC < 1$ ; Classe II, rischio basso,  $1 < RAC < 10$ ; Classe III, rischio medio,  $11 < RAC < 30$ ; Classe IV, rischio alto,  $31 < RAC < 50$  e Classe V, rischio molto alto,  $RAC > 50$ .

#### 4.5.2. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale

- Livelli soglia

La qualità ambientale dei sedimenti è stata discussa rispetto ai livelli soglia N1 e N2 e ai livelli L1 e L2 definiti dalla legislazione francese (Circulaire no 2000-62 du 14 juin 2000; Arrêté du 9 août 2006; Arrêté du 17 juillet 2014) e italiana (Allegato Tecnico al D.M. 173/2016), rispettivamente, per il dragaggio dei sedimenti marini (per la norma italiana in aree portuali escluse dai siti di interesse nazionale di bonifica).

- Mean Effects Range Median Quotient (MERMQ)

$$MERMQ = \frac{\sum_{i=1}^n C_i / ERM_i}{n}$$

dove  $C_i$  è la concentrazione del metallo  $i$  nei sedimenti analizzati,  $ERM_i$  è il valore guida riportato da Long et al. (1995) per i contaminanti  $i$  e  $n$  è il numero di contaminanti.

Sono definiti quattro livelli di rischio:  $MERMQ \leq 0,1$  rischio basso e 9% di probabilità di essere tossico,  $0,1 < MERMQ \leq 0,5$  rischio basso-medio e 21% di probabilità di essere tossico,  $0,5 < MERMQ \leq 1,5$  rischio medio-alto e 49% di probabilità di essere tossico e  $MERMQ > 0,5$  rischio alto e 76% di probabilità di essere tossico.

- Mean Probable Effect Level Quotient (MPELQ)

$$MPELQ = \frac{\sum_{i=1}^n C_i / PEL_i}{n}$$

dove  $C_i$  è la concentrazione del metallo  $i$  nei sedimenti analizzati,  $PEL_i$  è il valore guida riportato da Buchman (2008) per i contaminanti  $i$  e  $n$  è il numero di contaminanti.

Sono definiti quattro livelli di rischio:  $MPELQ \leq 0,1$  rischio basso e 8% di probabilità di essere tossico,  $0,11 \leq MPELQ \leq 1,5$  rischio basso-medio e 21% di probabilità di essere tossico,  $1,51 \leq MPELQ < 2,3$  rischio medio-alto e 49% di probabilità di essere tossico e  $MPELQ \geq 2,3$  rischio alto e 73% di probabilità di essere tossico.



## 5. Caraterizzazione dei sedimenti ad alta risoluzione

### 5.1. Caraterizzazione verticale ad alta risoluzione

Nei porti di Tolone, La Spezia ed Olbia, UNTLN ha raccolto 2 carote di sedimento di circa 30 cm ciascuna, utilizzando un corer Uwitec dotato di tubi di plastica di 10 cm di diametro. Ogni carota è stata utilizzata per diverse analisi che richiedevano diversi tempi di condizionamento/riposo dopo il campionamento. La prima carota è stata raccolta utilizzando un tubo perforato ogni 1 cm, per misurare il potenziale redox (Eh) e il pH in sedimenti a diverse profondità. La seconda carota è stata tagliata in fette da 2 cm per caratterizzare la sequenza diagenetica e la distribuzione dei contaminanti metallici nelle fasi liquida e solida. Il trattamento delle carote è stato strettamente identico per ogni porto.

#### 5.1.1. Determinazione dei profili verticali di Eh e pH

Questi due parametri sono stati misurati direttamente nelle carote di sedimento, utilizzando sonde dotate di elettrodi di perforazione. Questi elettrodi sono stati inseriti nei buchi del tubo perforato utilizzato per il campionamento (Figura 10). Poichè il Eh è molto sensibile alla minima penetrazione di ossigeno, questo parametro è stato il primo ad essere misurato ad ogni profondità.



Figura 10. Misura di Eh nei sedimenti utilizzando un elettrodo di perforazione inseriti nei buchi del tubo perforato e con l'elettrodo di riferimento immerso nell'acqua supernatante

### 5.1.2. Sottocampionamento di sedimenti ad alta risoluzione verticale

Tutta l'attrezzatura utilizzata per tagliare, trasferire, omogeneizzare, filtrare e per la conservazione è stata pre-pulita con acqua ultrapura, acido nitrico al 10% (v/v) e risciacquato di nuovo con acqua ultrapura, prima del contatto con i campioni per evitare contaminazioni accidentali.

Il nucleo di sedimento più lungo prelevato in ogni sito è stato tagliato sotto un'atmosfera inerte (arricchita con  $N_2$ ) in una camera ermetica con guanti per la manipolazione dei campioni (Figura 11). Questa precauzione è necessaria per evitare l'ossidazione dei sedimenti profondi, un fenomeno spontaneo molto rapido che induce un cambiamento significativo nella speciazione degli elementi metallici. Anche se logisticamente impegnativo, questo taglio in atmosfera inerte garantisce una maggiore accuratezza scientifica delle interpretazioni. È stata utilizzata una sagoma in plastica per tagliare fette regolari di 2 cm di spessore per evitare di contaminare i campioni. Ogni fetta di 2 cm è stata poi omogeneizzata e due aliquote da 50 mL sono state trasferite in provette da centrifuga ermeticamente sigillate. Questi tubi sono stati poi rimossi dalla camera ermetica per essere centrifugati. Di nuovo nella camera chiusa ermeticamente, sotto un'atmosfera arricchita di  $N_2$ , il surnatante è stato filtrato utilizzando filtri a siringa con una porosità di 0,2  $\mu m$ . Sono stati presi sottocampioni di quest'acqua interstiziale per l'analisi di metalli in traccia, DOC, DIC e nutrienti disciolti. Il pellet di particolato è stato suddiviso per l'analisi chimica e microbiologica e poi congelato. Sono state liofilizzate delle aliquote dedicate alle future analisi del carbonio organico particolato (POC) e del contenuto di metalli in traccia.



Figura 11. Taglio e sottocampionamento di sedimenti anossici in camera ermetica con guanti per la manipolazione dei campioni, sotto atmosfera arricchita in N<sub>2</sub> per evitare l'ossidazione dei sedimenti

### **5.1.3. Misurazione delle concentrazioni di nutrienti e e marcatori diagenetici**

Le concentrazioni di nitrati, fosfati, ammonio, solfati e solfuri sono state misurate mediante spettroscopia di assorbimento utilizzando kit commerciali, cuvette di polistirene lunghe 1 cm e uno spettrofotometro UV/visibile (UV-1800, Shimadzu).

### **5.1.4. Misurazione delle concentrazioni di metalli in traccia**

Le misurazioni delle concentrazioni o dei contenuti disciolti nella fase solida di Al, As, Ba, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sb, Sr, Ti, Tl, U, V e Zn sono state effettuate con HR-ICP-MS (High Resolution-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry). I contenuti di Hg nella fase solida sono stati determinati mediante CV-AAS (Cold Vapor Atomic Absorption Spettroscopia).

La speciazione delle metalli in traccia (tranne Hg) in fase solida è stata analizzata mediante estrazioni selettive. Diversi agenti estrattori possono essere utilizzati per dissociare le metalli in traccia più o meno fortemente legate a diverse fasi dei sedimenti. Così, è stata effettuata un'estrazione di ascorbato a pH= 8,2 per determinare le concentrazioni di metalli in traccia debolmente legato, principalmente co-precipitato con ossi-idrossidi di ferro. L'estrazione con acido cloridrico 1M è stata effettuata per separare gli metalli in traccia più fortemente legati alle particelle (idrossidi, carbonati, fosfati, solfuri acidi volatili). È stata effettuata un'estrazione con soda (0,1 M, pH=13) per separare gli metalli in traccia dalla materia organica del particolato. Infine, un'estrazione semi-totale degli metalli in traccia legati a tutte le fasi, ad eccezione delle fasi minerali come la silice, è stata effettuata con acqua regia, in un mineralizzatore UltraWAVE (Milestone) portato a 240 °C e 35 bar.

Queste diverse misurazioni hanno permesso di valutare lo stock totale di metalli in traccia nei sedimenti, la frazione associata ad ogni tipo di fase e il loro possibile trasferimento all'acqua interstiziale.

### **5.1.5. Misurazione delle concentrazioni di metalli in traccia**

Il DNA dei microrganismi è stato estratto utilizzando un kit commerciale (NucleoSpin Soil, Macherey-Nagel). Una frazione del gene 16S rRNA di batteri e archaea è stata amplificata dalla PRC e poi sequenziata su un Illumina MiSeq (servizi eseguiti da Eurofins e Microsynth).

Le sequenze di DNA ottenute sono state sottoposte a trattamento bioinformatico per assemblarli, filtrarli in base alla loro qualità e associarli a gruppi tassonomici ('specie' microbiche). Le abbondanze relative di questi gruppi sono state utilizzate per valutare la struttura comunitaria in ciascun campione (gruppi dominanti) e per effettuare un'analisi di similarità tra i campioni.

#### **5.1.6. Analisi della diversità microbica**

Il DNA dei microrganismi è stato estratto utilizzando un kit commerciale (NucleoSpin Soil, Macherey-Nagel). Una frazione del gene 16S rRNA dei batteri e dell'archaea è stata amplificata mediante PCR e sequenziata su un Illumina MiSeq (servizi eseguiti da Eurofins e Microsynth). Le sequenze di DNA ottenute sono state poi elaborate utilizzando la bioinformatica per assemblarle, filtrarle in base alla loro qualità e assegnarle a gruppi tassonomici (specie "microbiche"). Le abbondanze relative di questi gruppi sono state utilizzate per valutare la struttura della comunità in ogni campione (gruppi dominanti) e per eseguire un'analisi di somiglianza tra i campioni.

#### **5.2. Caratterizzazione spaziale ad alta risoluzione**

La caratterizzazione spaziale ad alta risoluzione dei sedimenti è stato realizzato dall'ADSP del Mare di Sardegna.

La zona oggetto della presente indagine è ubicata tra il Molo Sabauda e il Molo Rinascita nel Porto di Cagliari, in tale area sono state individuate 31 "aree unitarie" di 50 m di lato per l'esecuzione dei carotaggi (Figura 12). In ciascuna area unitaria è stato effettuato un carotaggio di spessore 50 cm ad eccezione di alcune aree dove sono stati effettuati dei carotaggi di differente spessore (150-480 cm). Si è provveduto a formare dei campioni composti miscelando i campioni singoli provenienti da aree unitarie contigue. I campioni ottenuti dalla miscelazione delle varie aliquote e destinati alle analisi sono risultati 22.

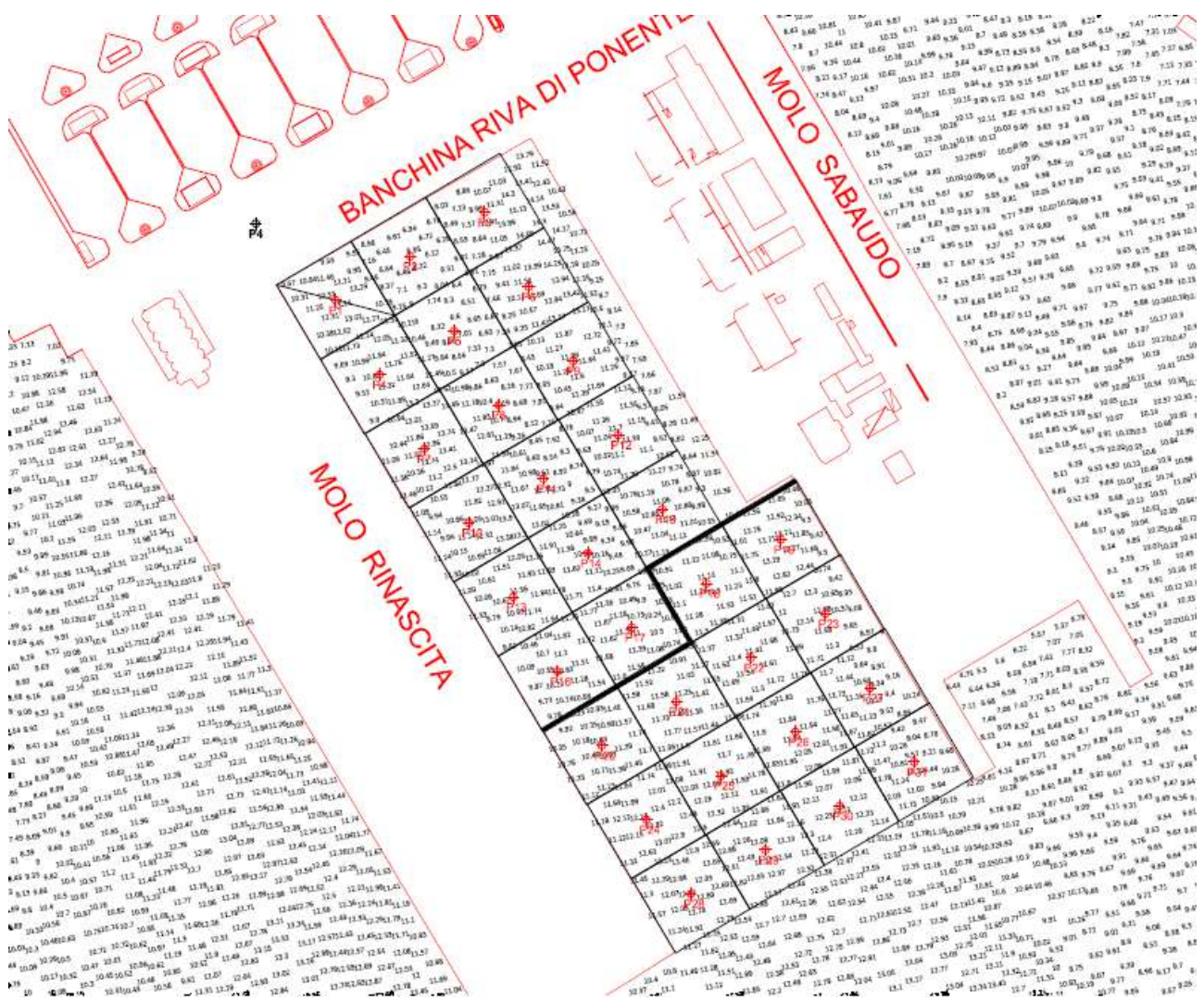


Figura 12. Mappatura dei carotaggi effettuati dall'Autorità Portuale di Cagliari tra Molo Rinascita e Molo Sabauo.

Il materiale raccolto è stato opportunamente omogeneizzato all'interno di bacinelle di vetro e suddiviso per le diverse analisi. Dal materiale raccolto sono state rimosse manualmente le componenti grossolane maggiori di 5 mm ed eventuali residui antropici. I campioni prelevati sono stati conservati a 4 °C fino all'arrivo in laboratorio.

Sulla base del D.M. 15/07/2016 n° 173 su ciascun campione sono state effettuate le seguenti determinazioni analitiche:

- Analisi Fisiche: granulometria (scala Wentworth), % umidità, secondo la metodologia MATTM-ICRAM 2001.
- Analisi Chimiche:
  - Metalli (Al, As, Cd, Cr totale, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Zn), secondo le metodologie EPA 3051A (2007), EPA 7473 (2007), EPA 7010 (2007) ed EPA 6010D (2014).

- Idrocarburi C>12, Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), Policlorobifenili (PBC), Pesticidi organo clorurati, Sostanza organica totale, Organostannici, secondo le metodologie EPA 8015D (2003), EPA 3545A (2007), UNI EN ISO 23161 (2011) ed EPA 8270E (2017).
- Analisi ecotossicologiche:
  - Saggio biologico su sedimento con *Corophium orientale*, secondo la metodologia ISO 16712 (2005).
  - Saggio biologico con l'alga *Phaeodactylum tricornutum*, secondo la metodologia ISO 10253 (2016)
  - Saggio di embriotossicità con *Paracentrotus lividus*, secondo la metodologia ISO 17244 (2015).

## 6. Risultati

### 6.1. Caratterizzazione della colonna d'acqua

#### 6.1.1. Campionamento passivo

##### 6.1.1.1. Diffusive Gradients in Thin-films (DGT): metalli

###### *Tolone*

I DGT sono stati installati in tre stazioni a Tolone in inverno (febbraio) e in estate (agosto) del 2019. I range di concentrazione dei metalli labili misurati a Tolone sono stati i seguenti: 1,8-12,0 ng L<sup>-1</sup> di Cd, 219-733 ng L<sup>-1</sup> di Cu, 177-252 ng L<sup>-1</sup> di Ni e 104-299 ng L<sup>-1</sup> di Pb (Figura 13). Una diminuzione della concentrazione è stata osservata per il Cu, Ni e Pb, dall'interno alla parte esterna della Petite Rade, in entrambe le stagioni. D'altra parte, il Cd ha mostrato una maggiore variabilità e non è stata osservata una chiara tendenza. In generale, le concentrazioni misurate sono state più alte in inverno (febbraio) che in estate (agosto), soprattutto per il Cd. L'eccezione è stata Corsica Ferries, dove le concentrazioni più alte di Ni e Pb sono state misurate in estate.

Le concentrazioni misurate con i DGT sono state confrontate con i valori di soglia DGT calcolati da Marras et al. (2020; DGT\*) per le zone costiere. Questi valori sono stati calcolati sulla base dei risultati DGT provenienti da aree relativamente indisturbate nel Mediterraneo occidentale e hanno lo scopo di identificare le aree che potrebbero essere potenzialmente a rischio di inquinamento ambientale. Inoltre, nel caso di Cu, sono stati utilizzati anche i valori di soglia DGT proposti da Montero et al. (2012; DGT\*\*) nell'Atlantico, perché sono stati calcolati per gli estuari che risentono della presenza di

porti. Si può notare che tutte le concentrazioni di Cu e Pb misurate a Tolone sono notevolmente superiori ai valori di soglia (DGT\*) calcolati per il Mediterraneo. Tuttavia, le concentrazioni di Cu sono più simili ai valori di Montero et al. (2012) per i sistemi acquatici colpiti da pressioni antropiche. Per il Ni, le concentrazioni misurate a Tolone sono abbastanza simili al valore soglia, mentre le concentrazioni di Cd nella seconda campagna sono inferiori.

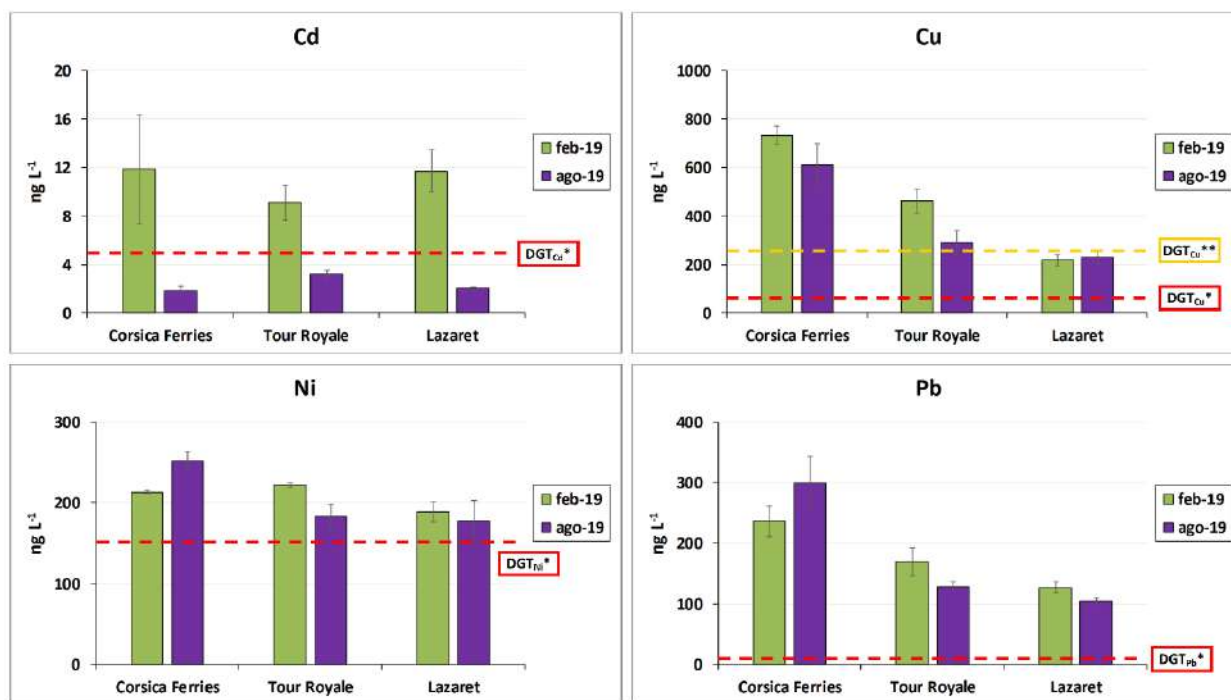


Figura 13. Range di concentrazioni dei metalli labili misurati a Tolone, confrontati con i diversi valori di soglia DGT\* e DGT\*\*

### La Spezia

I DGT sono stati depositati in tre stazioni a La Spezia in autunno (novembre 2017) e in quattro stazioni in primavera (marzo 2019). I range di concentrazione dei metalli labili misurati a La Spezia sono stati i seguenti: 5,6-13,4 ng L<sup>-1</sup> di Cd, 824-3387 ng L<sup>-1</sup> di Cu, 357-4868 ng L<sup>-1</sup> di Ni e 57,9-571 ng L<sup>-1</sup> di Pb (Figura 14). In generale, M. Fornelli e M. Garibaldi hanno presentato concentrazioni simili per tutti i metalli analizzati, mentre le concentrazioni più alte sono state misurate nella stazione di Cadimare, indipendentemente dalla campagna di campionamento. L'unica eccezione è stata per il Ni nella prima campagna, dove è stata misurata una concentrazione di Ni molto alta a M. Garibaldi, arrivando fino a 4800 ng L<sup>-1</sup>. In ogni stazione, sono state misurate concentrazioni di metalli simili in entrambe le campagne di campionamento, tranne per il Ni a novembre (in tutte le stazioni), che è stato 3-13 volte superiore a quello di marzo, e Cu e Pb in marzo alla

stazione di Cadimare che è stato 3-4 volte superiore a novembre. La stazione S. Teresa scuola di vela, situata all'esterno della baia, ha mostrato concentrazioni di metalli intermedie tra Cadimare e le stazioni interne (M. Fornelli e M. Garibaldi).

Le concentrazioni misurate con i DGT sono state confrontate con i valori di soglia DGT calcolati da Marras et al. (2020; DGT\*) per le zone costiere nel Mediterraneo occidentale e quelli calcolati da Montero et al. (2012; DGT\*\*) per i sistemi acquatici, nell'Atlantico, colpiti da pressioni antropiche. Ad eccezione del Cd, il resto dei metalli hanno presentato concentrazioni molto superiori ai valori di soglia.

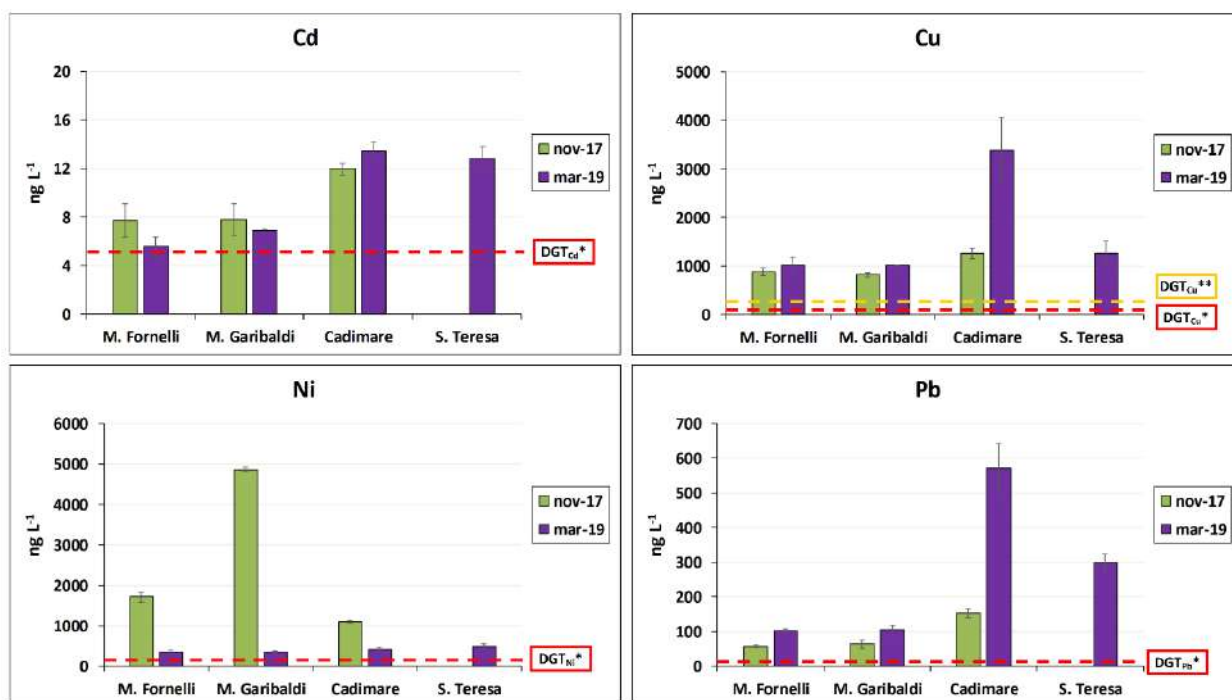


Figura 14. Range di concentrazioni di metalli labili misurati a La Spezia, confrontati con i diversi valori di soglia DGT\* e DGT\*\*

### Olbia

I DGT sono stati installati in tre stazioni ad Olbia in estate (giugno 2018) e in inverno (gennaio 2019). I range di concentrazione dei metalli labili misurati a Olbia sono stati i seguenti: 3,1-8,9 ng L<sup>-1</sup> di Cd, 116-528 ng L<sup>-1</sup> di Cu, 182-825 ng L<sup>-1</sup> di Ni e 24,3-64,7 ng L<sup>-1</sup> di Pb (Figura 15). Le concentrazioni di metalli più elevate sono state misurate in tutte le stazioni in estate, cosa particolarmente evidente nella stazione Porto (concentrazioni da 2 a 5 volte più elevate rispetto all'inverno). È stato osservato un gradiente dalla stazione interna alla bocca del golfo solo per Cd e Cu. Nella stazione Porto sono state misurate le concentrazioni più alte di Ni e Pb, mentre Foce e Controllo hanno presentato



concentrazioni molto simili. Va evidenziato che in tutte le stazioni sono state misurate concentrazioni di Cu tre volte superiori in estate rispetto all'inverno.

Ad eccezione del Cd, le concentrazioni di tutti i metalli sono superiori ai valori di soglia calcolati da Marras et al. (2020). Tuttavia, se confrontati con quelli forniti da Montero et al. (2012), le concentrazioni di Cu misurate in inverno sono risultate inferiori al valore soglia.

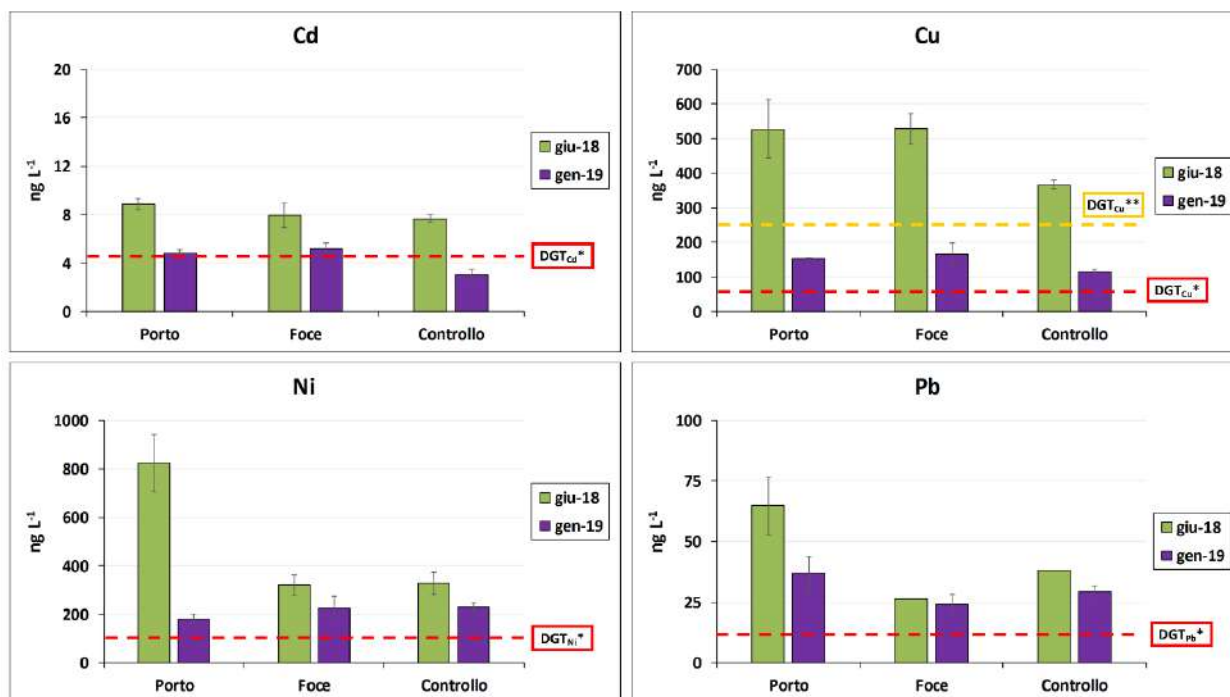


Figura 15. Range di concentrazioni di metalli labili misurati a Olbia, confrontati con i diversi valori di soglia DGT\* e DGT\*\*

### Cagliari

I DGT sono stati depositati in tre stazioni a Cagliari in inverno (marzo), estate (giugno) e autunno (settembre) del 2018. I range di concentrazione dei metalli labili misurati a Cagliari sono stati i seguenti: 6,1-18,3 ng L<sup>-1</sup> di Cd, 131-377 ng L<sup>-1</sup> di Cu, 178-805 ng L<sup>-1</sup> di Ni e 85-704 ng L<sup>-1</sup> di Pb (Figura 16). Purtroppo i DGT di D. Pescherecci a settembre sono scomparsi, quindi i dati di quella stagione non possono essere riportati. Le più alte concentrazioni di Cd e Cu sono state misurate in D. Pescherecci, mentre M. Rinascita ha presentato le più alte concentrazioni di Ni e Pb. In S. Elmo, le concentrazioni più elevate di Cd, Cu e Pb sono state misurate in giugno e settembre rispetto a marzo. Similmente, in M. Rinascita (per Cu, Ni e Pb) e D. Pescherecci (per Cd, Cu, Ni e Pb), le concentrazioni più alte sono state misurate in giugno.

Le concentrazioni di tutti i metalli sono superiori ai valori di soglia calcolati da Marras et al. (2020). Tuttavia, se confrontate con quelli forniti da Montero et al. (2012), le concentrazioni di Cu misurate in inverno sono risultate inferiori al valore soglia, mentre quelli di giugno e settembre sono simili.

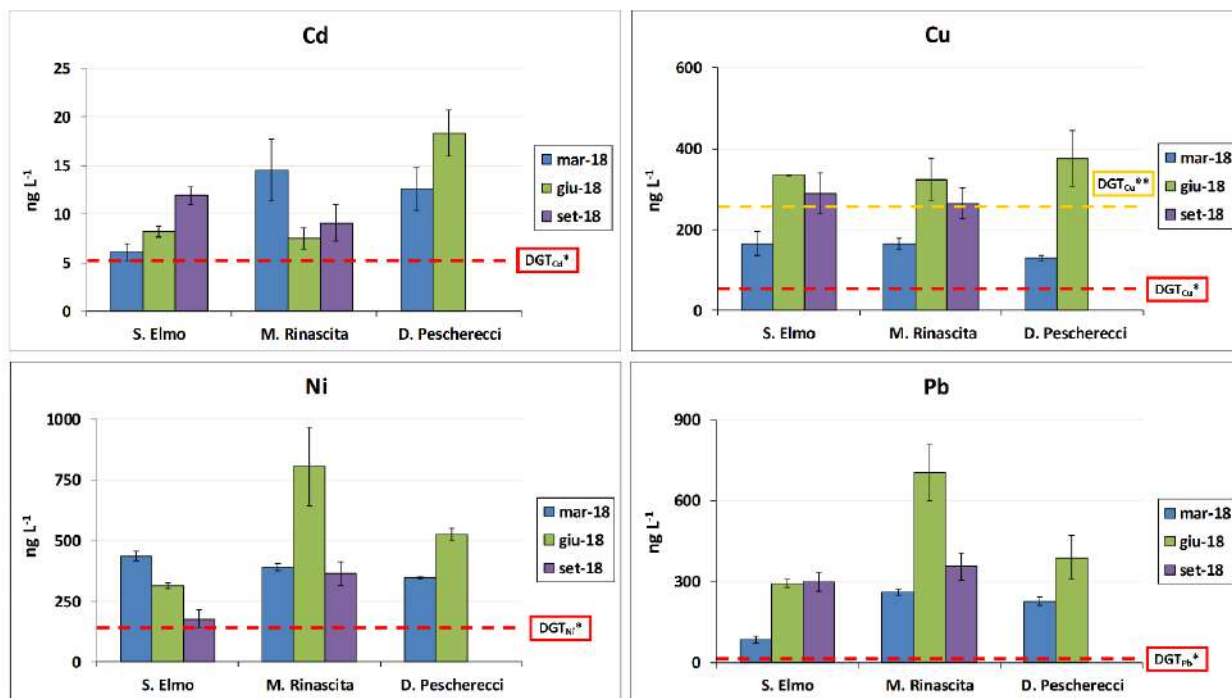


Figura 16. Range di concentrazioni di metalli labili misurati a Cagliari, confrontati con i diversi valori di soglia DGT\* e DGT\*\*

### 6.1.1.2. Silicon Rubber (SR): composti organici non polari

#### Tolone

I SR sono stati installati in tre stazioni a Tolone in inverno (febbraio) e in estate (agosto) del 2019. Le concentrazioni misurate di  $\Sigma 18$  IPA sono comprese nell'intervallo da 4,7 a 21,3 ng L<sup>-1</sup>, mentre i  $\Sigma 32$  PCB sono variati da 0,46 a 1,55 ng L<sup>-1</sup> (Figura 17).

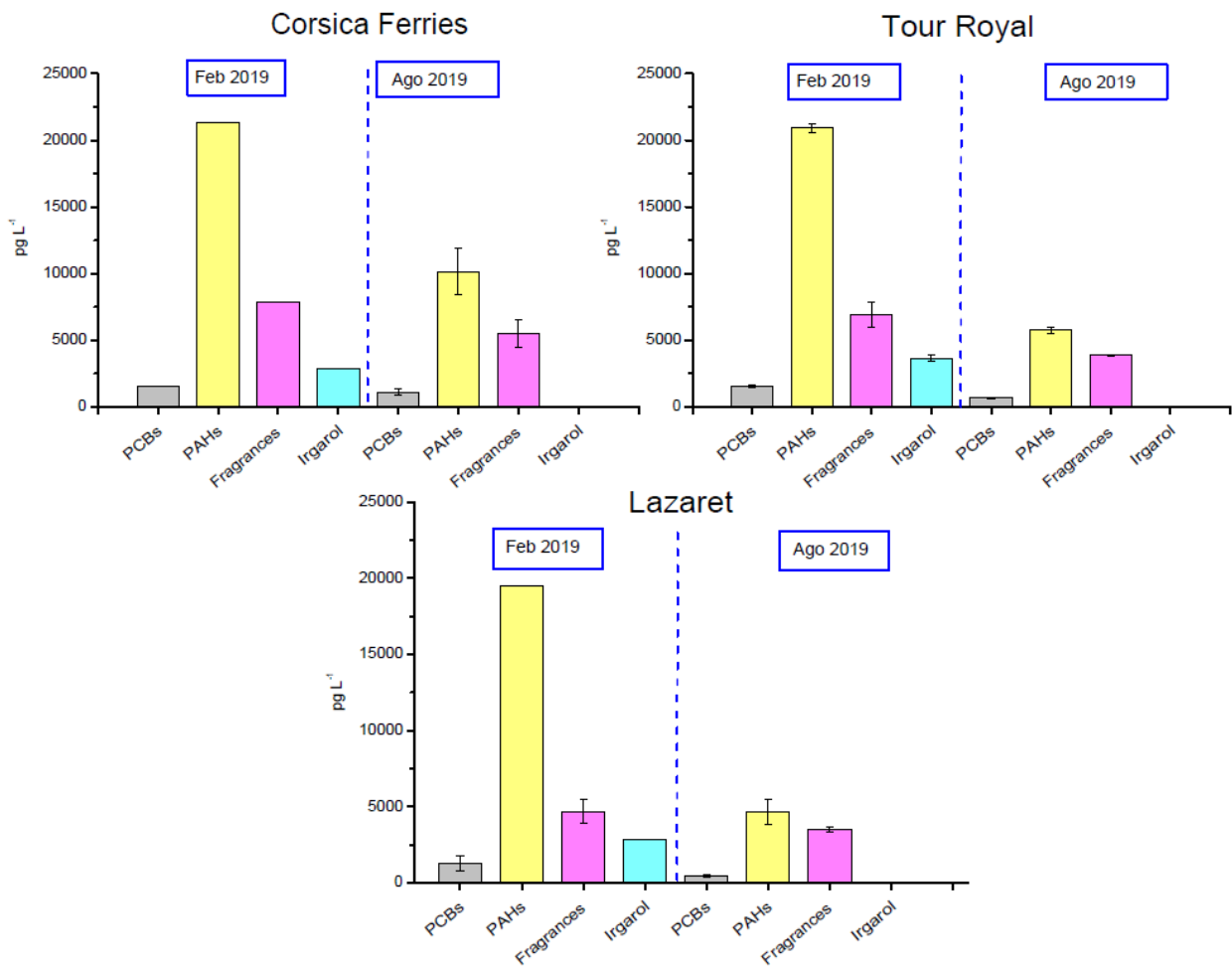


Figura 17. Concentrazioni di  $\Sigma 18$  IPA,  $\Sigma 32$  PCB,  $\Sigma 6$  Fragranze e Irgarol misurate nel porto di Tolone

Per gli IPA, in entrambe le campagne, la concentrazione più alta è stata misurata in Corsica Ferries, mentre la più bassa è stata registrata in Lazaret. Nel caso dei PCB, anche Lazaret ha mostrato la concentrazione più bassa in entrambe le campagne di campionamento, ma Tour Royale ha presentato la concentrazione più alta a febbraio, mentre lo stesso andamento si è verificato per Corsica Ferries ad agosto. Inoltre, è stato notato che mentre in febbraio tutte le stazioni hanno mostrato concentrazioni simili di IPA e PCB, in agosto Corsica Ferries ha mostrato circa la metà della concentrazione misurata in febbraio, con valori ancora più bassi a Tour Royale e Lazaret.

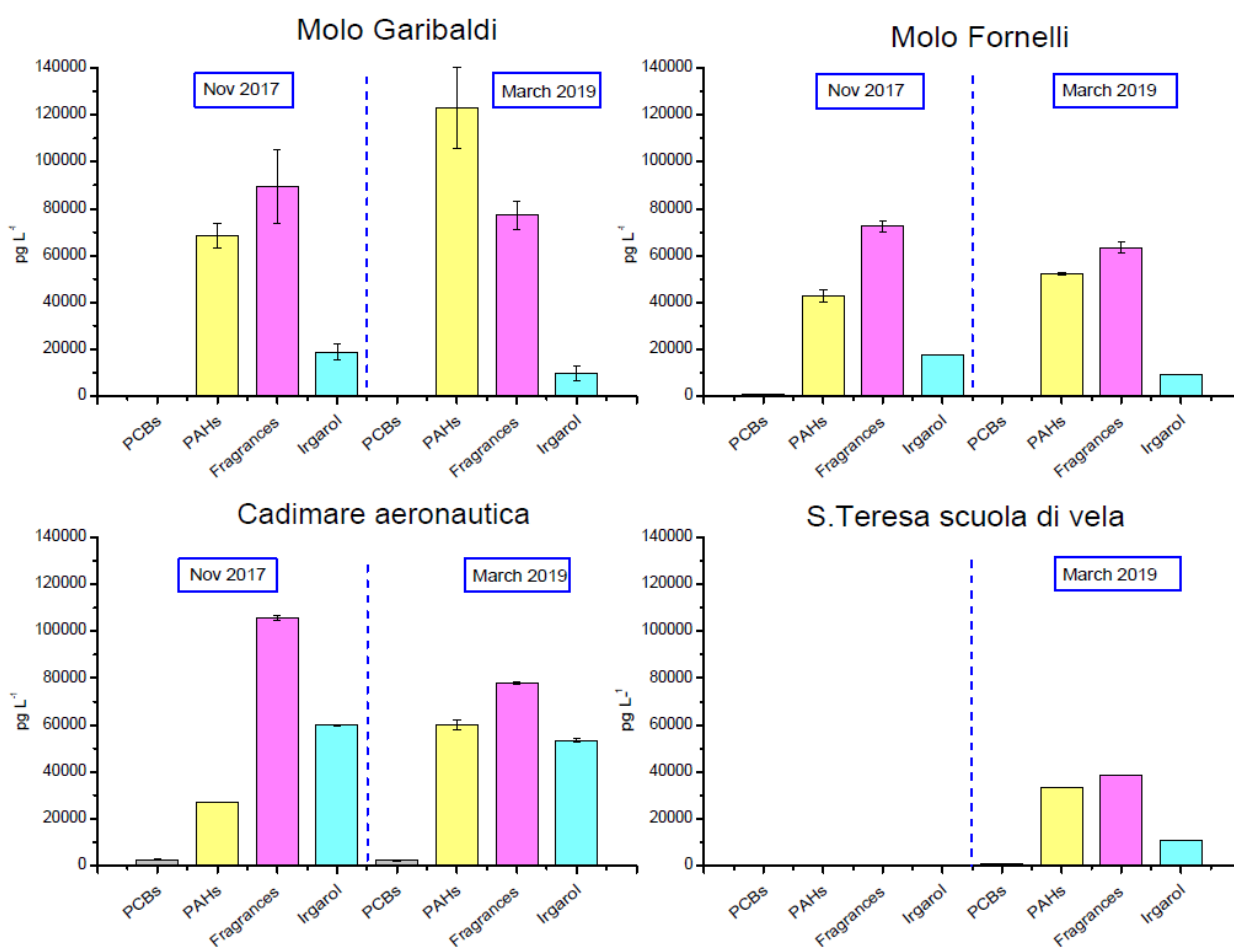
È stato osservato lo stesso andamento per i singoli IPA in tutte le stazioni campionate contemporaneamente, ma mentre nella prima campagna c'è stata una predominanza di IPA di 3 anelli (fenantrene, fluorene e acenafilene), nella seconda campagna c'è stato uno spostamento verso gli IPA di 3-5 anelli (fluorene, benzo(bj)fluorantene e fluorantene). Nel

caso dei PCB i congeneri predominanti, in tutte le stazioni e stagioni, sono stati CB153, CB149, CB138 e CB101.

Le concentrazioni misurate di  $\Sigma 6$  Fragranze sono state nell'intervallo da 3,5 a 7,8 ng L<sup>-1</sup>, mentre l'irgarol è variato da 2,8 a 3,7 ng L<sup>-1</sup>. Come osservato per gli IPA e i PCB, la concentrazione più alta di fragranze è stata misurata a Corsica Ferries e la più bassa a Lazaret, sia a febbraio che ad agosto. Galaxolide e OTNE hanno rappresentato il 86-91% delle fragranze misurate. Per Irgarol, in questo momento sono disponibili solo i risultati di febbraio, ma la concentrazione più alta è stata misurata a Tour Royale e la più bassa nella stazione Corsica Ferries.

### La Spezia

I SR sono stati esposti in tre stazioni a La Spezia in autunno (novembre 2017) e in quattro stazioni in primavera (marzo 2019). Le concentrazioni di  $\Sigma 18$  IPA e  $\Sigma 32$  PCB misurate con i SR sono variate nell'intervallo 26,8-122,8 ng L<sup>-1</sup> e 0,29-2,53 ng L<sup>-1</sup>, rispettivamente (Figura 18).



*Figura 18. Concentrazioni di  $\Sigma 18$  IPA,  $\Sigma 32$  PCB,  $\Sigma 6$  Fragranze e Irgarol misurate nel porto di La Spezia.*

Molo Garibaldi ha presentato la concentrazione di IPA più alta in entrambe le campagne di campionamento, mentre le concentrazioni più basse sono state misurate a Cadimare a novembre e a S. Teresa scuola di vela a marzo e Molo Fornelli ha mostrato una situazione intermedia. Al contrario, Molo Garibaldi ha presentato le più basse concentrazioni di PCB in entrambe le campagne, mentre Cadimare ha presentato le più alte. Molo Fornelli e S. Teresa scuola di vela hanno presentato concentrazioni intermedie.

Per gli IPA, le concentrazioni più alte sono state misurate a marzo, in tutte le stazioni, risultate il doppio di quelle misurate a novembre per Molo Garibaldi e Cadimare. A novembre c'è stata una predominanza di IPA con 2-3 anelli (naftalene, fluorene e acenafilene), mentre nella seconda campagna, a marzo, la sommatoria di IPA è stata caratterizzata da IPA con 3-4 anelli (fluorene, fluorantene e fenantrene). Per i PCB, la differenza tra novembre e marzo è stata insignificante e i PCB predominanti sono variati dai congeneri più pesanti (CB153, CB149, CB101) a quelli più leggeri (CB18, CB95, CB52, CB44).

Le concentrazioni misurate di  $\Sigma 6$  Fragranze sono comprese nell'intervallo da 39 a 106 ng L<sup>-1</sup>, mentre l'irgarol è variato da 9,2 a 60 ng L<sup>-1</sup>. Le concentrazioni più alte di fragranze e irgarol sono state misurate a Cadimare, mentre che le concentrazioni più basse di fragranze e irgarol sono state misurate a Molo Fornelli a novembre e a S. Teresa e Molo Fornelli nella campagna di marzo, rispettivamente. Molo Garibaldi ha mostrato una situazione intermedia per le due classi di composti. Galaxolide e OTNE hanno rappresentato il 93-96% delle fragranze misurate, ad eccezione di Molo Garibaldi ad agosto, dove le fragranze predominanti sono state Galaxolide (48%), Cashmeran (29%) e OTNE (21%).

### *Olbia*

I SR sono stati installati in tre stazioni ad Olbia in estate (giugno 2018) e in inverno (gennaio 2019). Le concentrazioni di  $\Sigma 18$  IPA e  $\Sigma 32$  PCB misurate con i SR sono comprese negli intervalli 8,2-14,6 ng L<sup>-1</sup> e 0,043-0,14 ng L<sup>-1</sup>, rispettivamente (Figura 19).

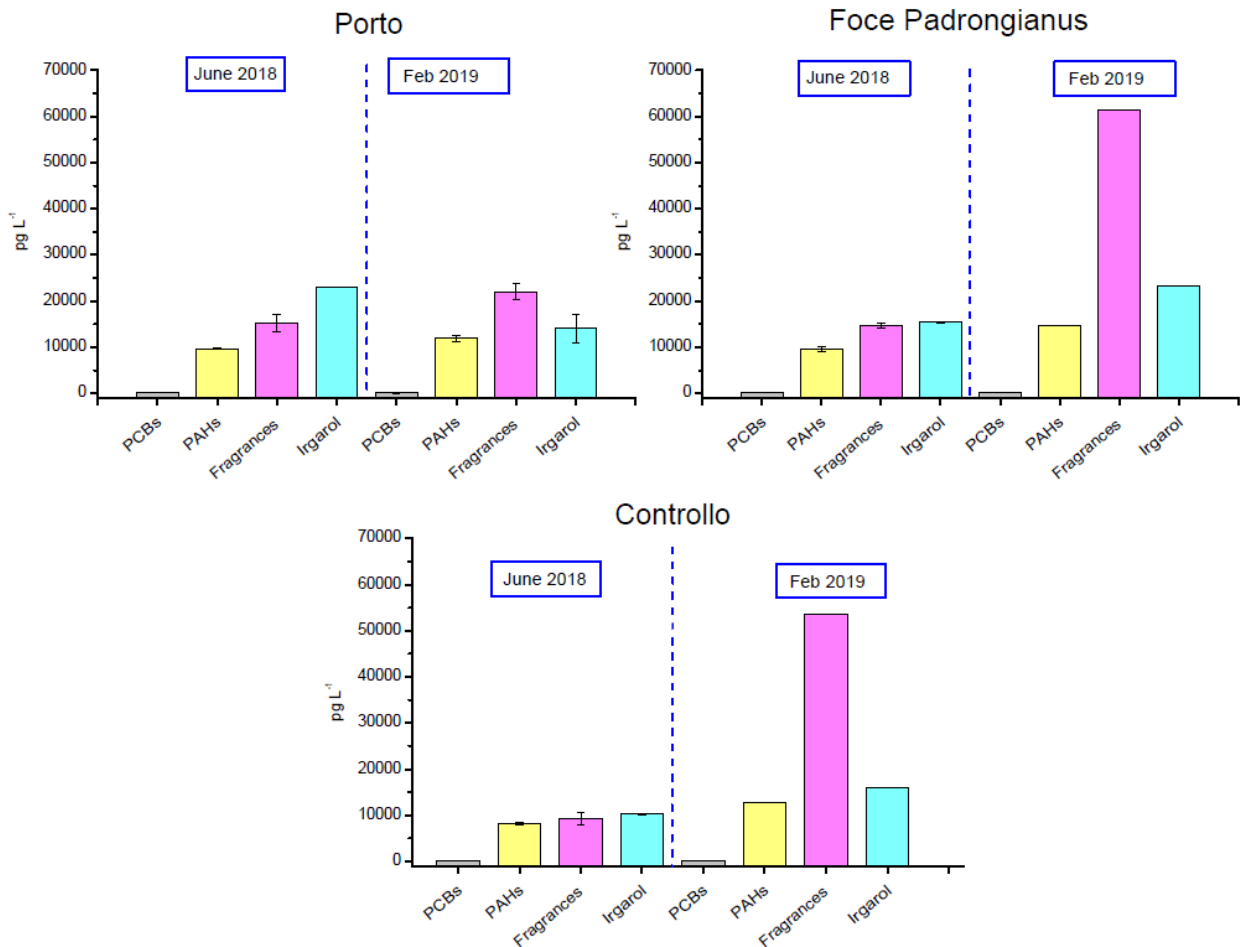


Figura 19. Concentrazioni di  $\Sigma 18$  IPA,  $\Sigma 32$  PCB,  $\Sigma 6$  Fragranze e Irgarol misurate nel porto di Olbia

Ad Olbia, a febbraio sono state misurate concentrazioni di IPA più elevate rispetto a giugno, specialmente nelle stazioni Foce e Controllo. Al contrario, a giugno sono state misurate concentrazioni di PCB più elevate rispetto a febbraio.

A giugno, la stazione Porto ha presentato i livelli più alti di IPA e PCB e c'è stata una diminuzione della concentrazione verso l'esterno, mentre a febbraio Foce ha presentato le concentrazioni più alte. C'è stata una predominanza degli stessi IPA con 2-3 anelli (naftalene, fluorene, acenaftilene e fenantrene) in tutte le stazioni, indipendentemente dalla stagione. Tuttavia, a giugno il naftalene ha mostrato la concentrazione più alta in tutte le stazioni, mentre lo stesso andamento si è verificato per il fenantrene a febbraio. Per quanto riguarda i PCB, le concentrazioni misurate sono state molto basse, e il congenere predominante è stato il CB153.

Le concentrazioni misurate di  $\Sigma 6$  Fragranze sono comprese nell'intervallo da 9,3 a 61 ng L<sup>-1</sup>, mentre l'irgarol varia da 10,2 a 23,3 ng L<sup>-1</sup>. La concentrazione più alta di fragranze e irgarol è stata misurata nella stazione Porto a giugno e a Foce nella campagna di febbraio, mentre le concentrazioni più basse sono state misurate nella stazione Controllo a giugno e Porto a febbraio. La concentrazione delle fragranze è aumentata di 5 volte da giugno a febbraio. Galaxolide e OTNE hanno rappresentato il 90-93% delle fragranze misurate.

### Cagliari

I SR sono stati installati in tre stazioni a Cagliari in inverno (marzo), estate (giugno) e autunno (settembre) del 2018. Il SR di S. Elmo a giugno è scomparso, quindi non è stato possibile riportarne i dati. Le concentrazioni di  $\Sigma 18$  IPA e  $\Sigma 32$  PCB misurate con i SR sono comprese negli intervalli 9,1-26,3 ng L<sup>-1</sup> e 0,26-1,57 ng L<sup>-1</sup>, rispettivamente (Figura 20).

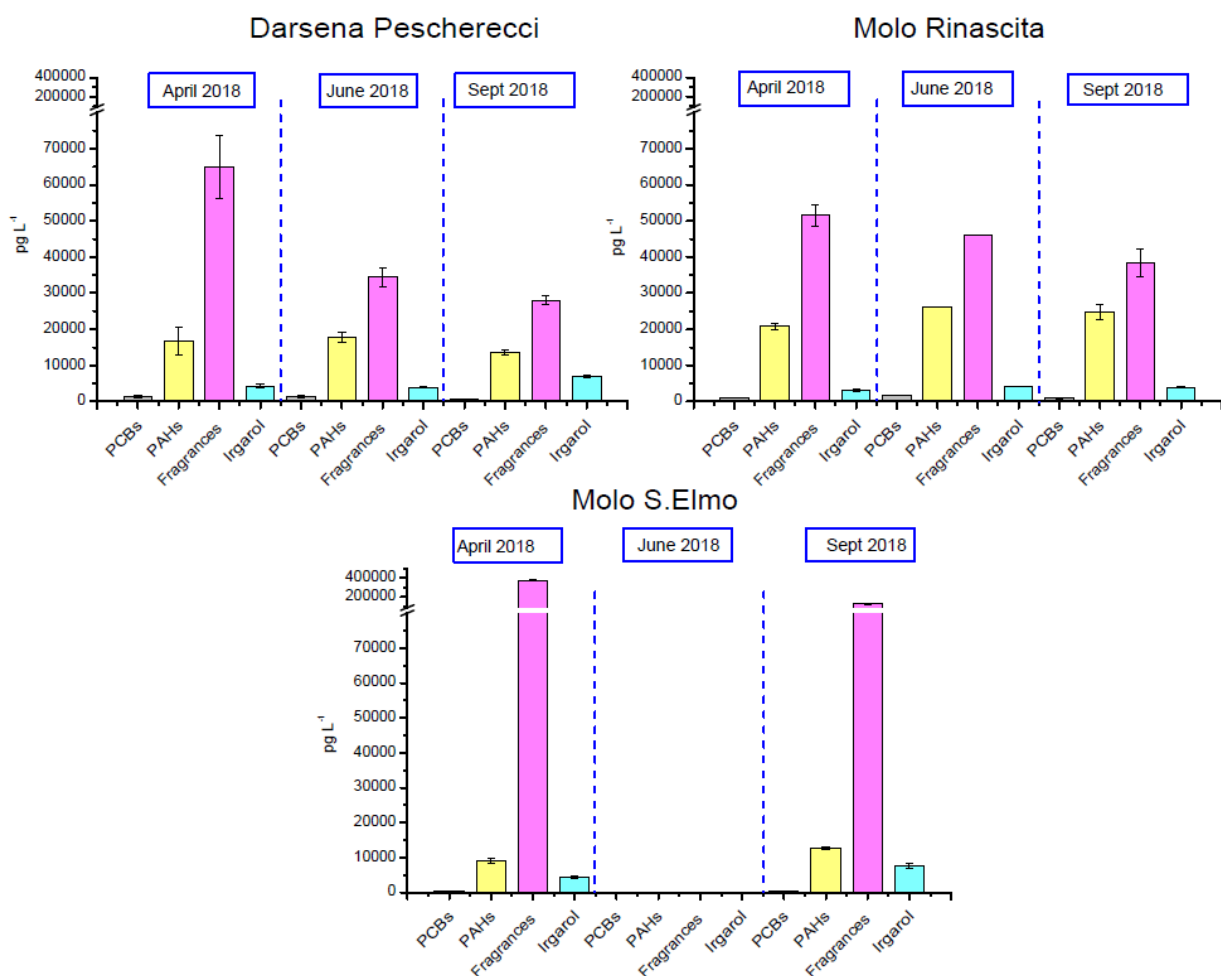


Figura 20. Concentrazioni di  $\Sigma 18$  IPA,  $\Sigma 32$  PCB,  $\Sigma 6$  Fragranze e Irgarol misurate nel porto di Cagliari

Nelle tre campagne Molo Rinascita ha presentato le più alte concentrazioni di  $\Sigma 18$  IPA, mentre le più basse sono state misurate a S. Elmo. Darsena Pescherecci ha mostrato una situazione intermedia per gli IPA. Per i PCB, D. Pescherecci ha mostrato le concentrazioni più alte in aprile e Molo Rinascita in giugno e settembre, mentre le più basse sono state misurate a S. Elmo, come osservato per gli IPA.

A Cagliari, i singoli IPA predominanti sono cambiati nelle diverse stagioni, anche se è stato osservato lo stesso andamento, con poche variazioni, in tutte le stazioni campionate contemporaneamente. In aprile si è osservata una predominanza di IPA con 3-4 anelli (fenantrene, pirene, fluorene e fluorantene), per poi passare a IPA con 3-5 anelli in giugno (fenantrene, pirene, fluorantene, benzo(bj)fluorantene) e tornare a IPA con 3-4 anelli (fenantrene, fluorantene, fluorene e acenaftilene) a settembre. Invece, per i PCB, i congeneri predominanti sono stati CB153, CB110 e CB52, in tutti i casi.

Le concentrazioni misurate di  $\Sigma 6$  Fragranze sono comprese nell'intervallo da 28 a 375 ng L<sup>-1</sup>, mentre l'irgarol è variato da 3,0 a 7,6 ng L<sup>-1</sup>. Le concentrazioni più alte di fragranze e irgarol sono state trovate a S. Elmo in aprile, a Molo Rinascita a giugno e di nuovo a S. Elmo in settembre. Le concentrazioni più basse sono state trovate a Molo Rinascita in aprile, a D. Pescherecci a giugno e a D. Pescherecci e Molo Rinascita in settembre. Galaxolide e OTNE hanno rappresentato il 90-95% delle fragranze misurate.

#### **6.1.1.3. POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler): composti organici polari**

Gli interferenti endocrini (IE: alchilfenoli, bisfenolo A e steroidi) determinati nei POCIS sono riportati di seguito. In questo caso, per facilitare il confronto con i saggi tossicologici eseguiti con gli estratti POCIS, i valori riportati nelle figure corrispondono alla massa accumulata nel POCIS (ng/POCIS).

##### *Tolone*

I POCIS sono stati esposti in tre stazioni a Tolone in inverno (febbraio) e in estate (agosto) del 2019. Al momento sono disponibili solo i risultati della prima campagna di campionamento. I range di concentrazione di  $\Sigma 7$  Alchilfenoli,  $\Sigma 6$  Steroidi e BPA misurati a Tolone sono stati i seguenti: 3,5-27,3 ng/POCIS, 4,9-5,5 ng L<sup>-1</sup> ng/POCIS e 3,2-4,6 ng/POCIS, rispettivamente (Figura 21).



La stazione Tour Royale ha presentato la più alta concentrazione di  $\Sigma$ ED, dominata principalmente dagli alchilfenoli, seguita da Corsica Ferries e Lazaret. Le concentrazioni di steroidi e BPA sono relativamente piccole e molto simili in tutte le stazioni.

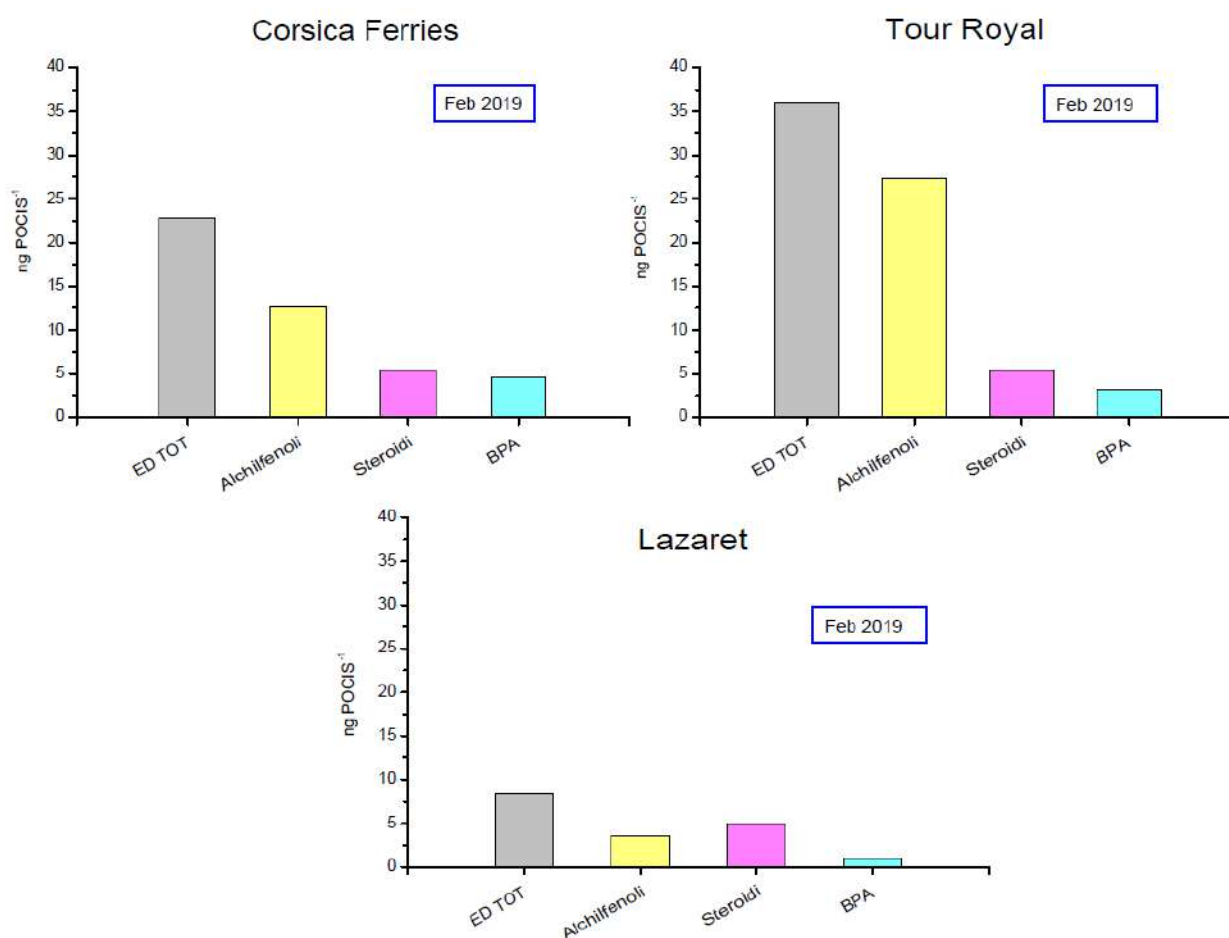


Figura 21. Concentrazione di interferenti endocrini ( $\Sigma$  ED totale,  $\Sigma$ 7 Alchilfenoli,  $\Sigma$ 6 Steroidi e BPA) in ng/POCIS misurati nel porto di Tolone

### La Spezia

I POCIS sono stati installati in tre stazioni a La Spezia in autunno (novembre 2017) e in quattro stazioni in primavera (marzo 2019). Al momento sono disponibili solo i risultati della prima campagna di campionamento. Il campione di Molo Fornelli non è stato determinato per un problema analitico. I range di concentrazione di  $\Sigma$ 7 Alchilfenoli,  $\Sigma$ 6 Steroidi e BPA misurati a La Spezia sono stati i seguenti: 4,9-26,4 ng/POCIS, 57,3-70,8 ng/POCIS e 62,9-117,6 ng/POCIS, rispettivamente (Figura 22).

Molo Garibaldi ha presentato la più alta concentrazione di  $\Sigma$ ED, dominata principalmente dal BPA e degli steroidi, e lo stesso andamento si è visto a Cadimare.

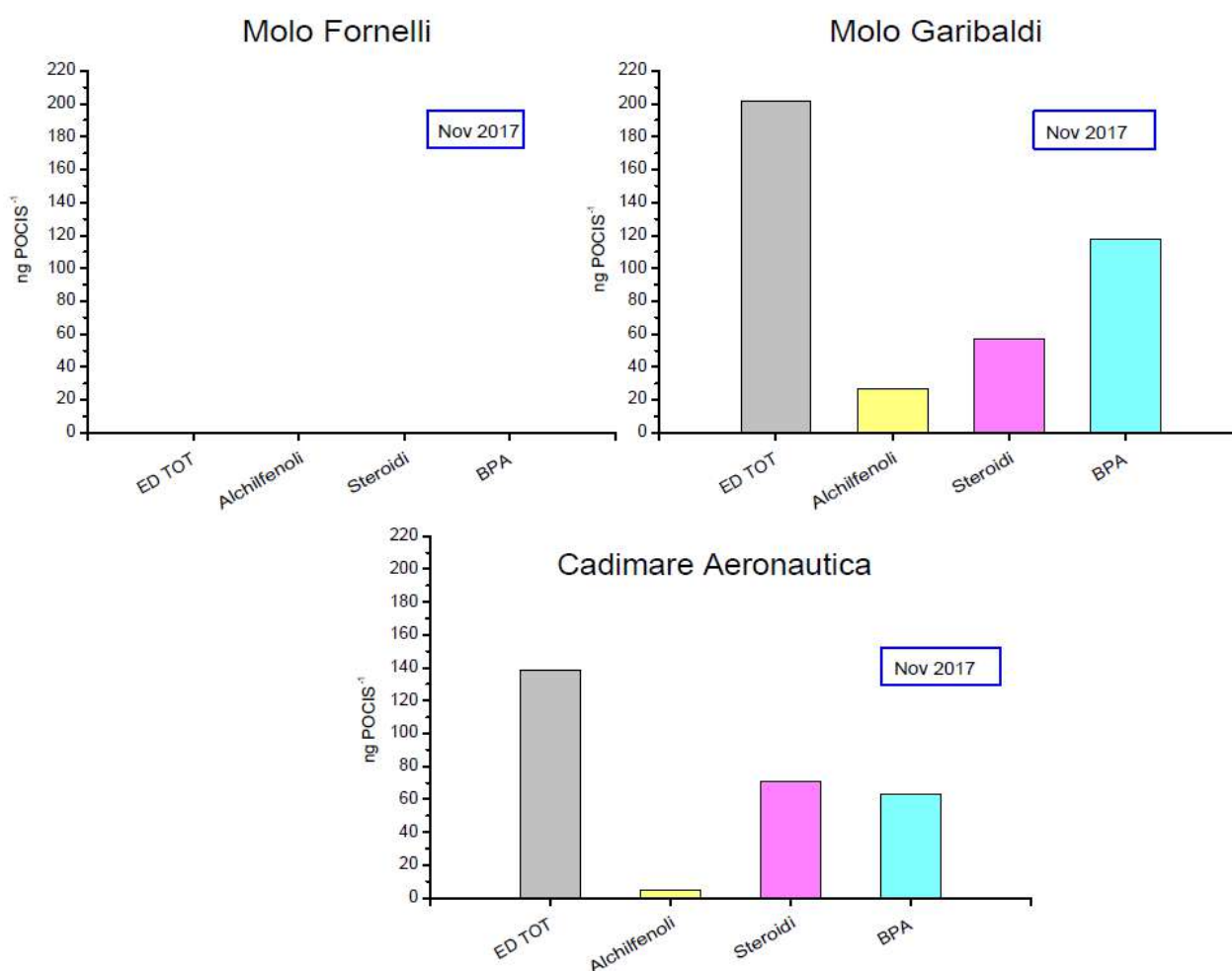


Figura 22. Concentrazione di interferenti endocrini ( $\Sigma$  ED totale,  $\Sigma$ 7 Alchilfenoli,  $\Sigma$ 6 Steroidi e BPA) in ng/POCIS misurati nel porto di La Spezia

### Olbia

I POCIS sono stati depositati in tre stazioni a Olbia in estate (giugno 2018) e in inverno (gennaio 2019). Al momento sono disponibili solo i risultati della prima campagna di campionamento. I range di concentrazione di  $\Sigma$ 7 Alchilfenoli,  $\Sigma$ 6 Steroidi e BPA misurati ad Olbia sono stati i seguenti: 9,5-15,2 ng/POCIS, 6,0-9,3 ng L-1 ng/POCIS e <LOD ng/POCIS, rispettivamente (Figura 23).

La stazione Controllo ha presentato la più alta concentrazione di  $\Sigma$ ED, seguito da Foce e Porto e in tutti i casi gli alchilfenoli sono stati i composti più abbondanti. Va notato che mentre Porto e Controllo presentavano concentrazioni simili di  $\Sigma$ 6 Steroidi, Foce presentava una concentrazione relativamente più alta.

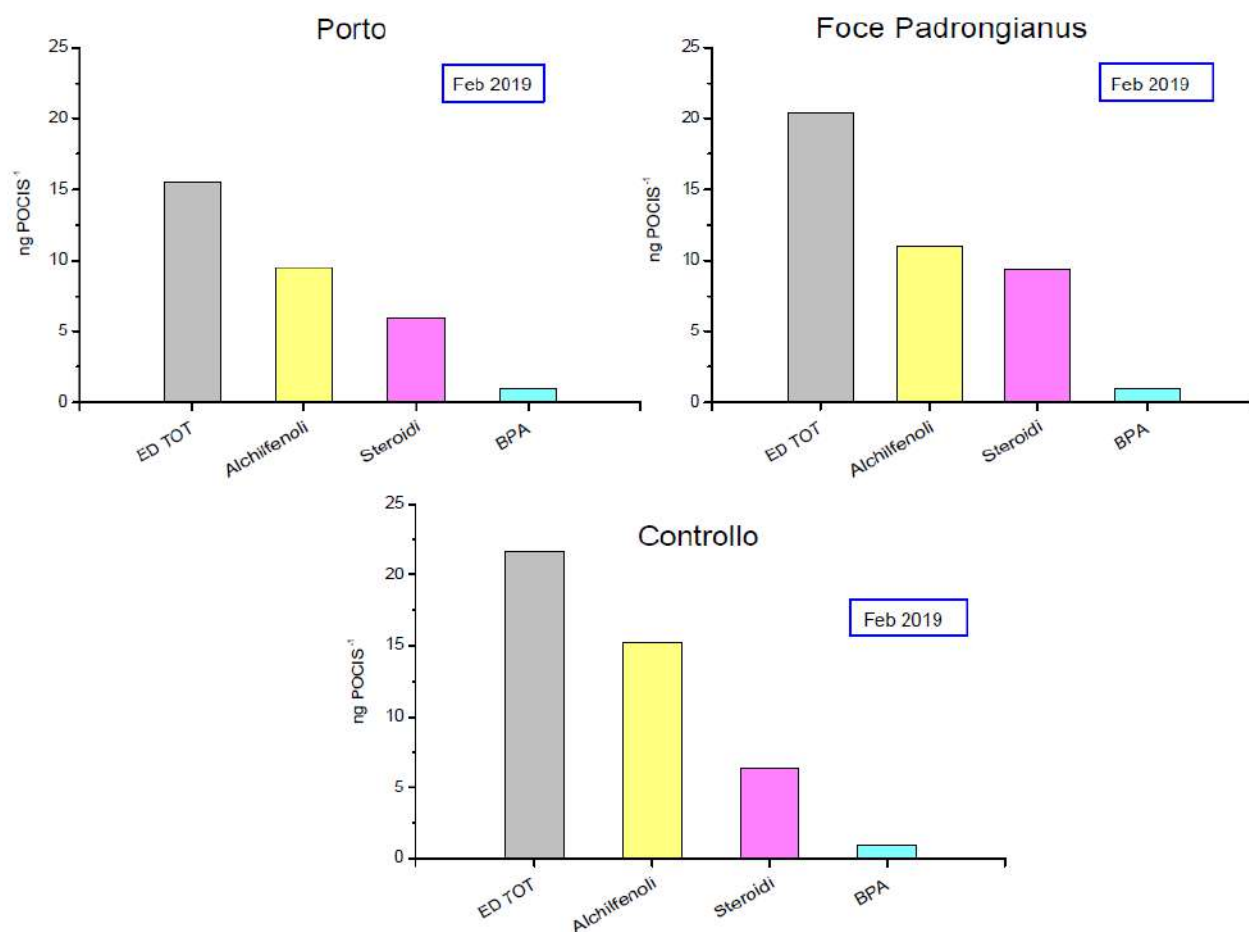


Figura 23. Concentrazione di interferenti endocrini ( $\Sigma$  ED totale,  $\Sigma$ 7 Alchilfenoli,  $\Sigma$ 6 Steroidi e BPA) in ng/POCIS misurati nel porto di Olbia

### Cagliari

I POCIS sono stati installati in tre stazioni a Cagliari in aprile, ottobre e dicembre del 2018 e in gennaio del 2019. I range di concentrazione di  $\Sigma$ 7 Alchilfenoli,  $\Sigma$ 6 Steroidi e BPA misurati a Cagliari sono stati i seguenti: <LOD-186 ng/POCIS, 4,7-11,7 ng/POCIS e <LOD-10,7 ng/POCIS, rispettivamente (Figura 24).

La stazione Darsena Pescherecci ( $\Sigma$ ED: 24,1-202,7 ng/POCIS) ha presentato la concentrazione più alta di  $\Sigma$ ED in aprile, dicembre e gennaio, osservandosi lo stesso per S. Elmo in ottobre. In generale, gli alchilfenoli sono stati i composti più abbondanti, mentre per gli steroidi sono state osservate concentrazioni simili, e a livelli inferiori, in tutte le stazioni. Le concentrazioni di BPA sono state generalmente basse, ed in alcuni casi sotto il limite di rilevabilità..

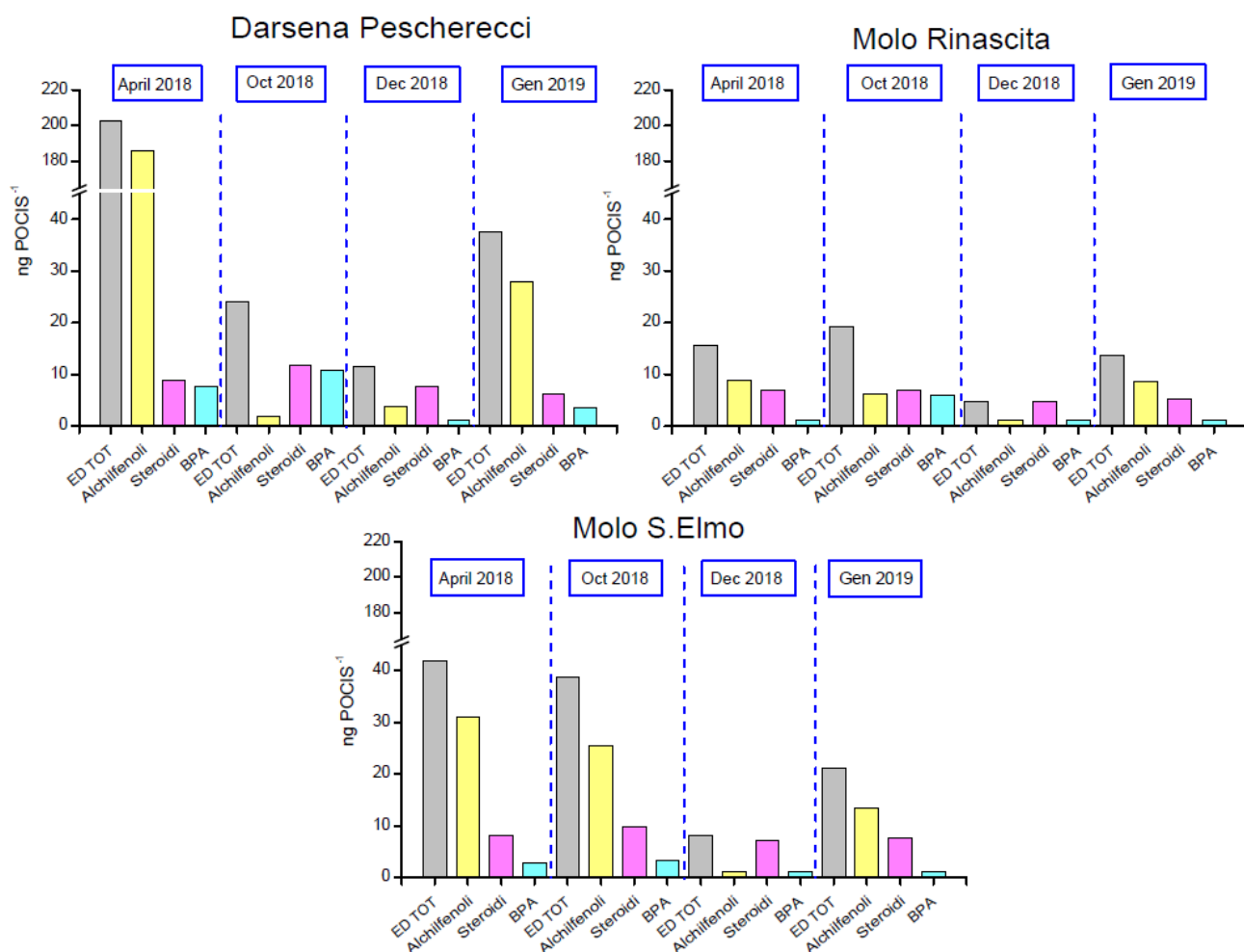


Figura 24. Concentrazione di Interferenti endocrini ( $\Sigma$  ED totale,  $\Sigma$ 7 Alchilfenoli,  $\Sigma$ 6 Steroidi e BPA) in ng/POCIS misurati nel porto di Cagliari

### Saggi su estratti di POCIS

Gli estratti dei POCIS esposti nei porti pilota sono stati impiegati per effettuare alcuni approfondimenti ecotossicologici mediante il saggio di embriotossicità con il riccio di mare *P. lividus*. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 9.

Tabella 9. Risultati del saggio di embriotossicità con *P. lividus*. Nella tabella è riportata la media ( $\mu$ ) dei plutei malformati, la deviazione standard e il valore di  $EC_{20}/EC_{50}$  determinato mediante Probit Analysis.

Campione	Diluizione (EF)	P4 Normoformati (repliche)			Media Maloformati ( $\mu$ )	$\sigma$	$EC_{20}/EC_{50}$ (%)	Tossicità
		50	49	49				
Tolone Corsica 04-02-2019	100	50	49	49	50,67	0,58	$EC_{20}=74,94$ (nc-nc); $EC_{50}>100$	Media
	50	80	81	82	19,00	1,00		
	25	81	82	82	18,33	0,58		
	12,5	82	80	83	18,33	1,53		

	<b>Tour Royale</b> <b>04-02-2019</b>	100	83	84	85	16,00	1,00	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	82	85	86	15,67	2,08		
		25	84	85	87	14,67	1,53		
		12,5	86	86	85	14,33	0,58		
	<b>Lazaret 04-02-2019</b>	100	84	82	85	16,33	1,53	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	84	86	84	15,33	1,15		
		25	83	85	85	15,67	1,15		
		12,5	84	86	85	15,00	1,00		
<b>Olbia</b>	<b>Porto</b> <b>26-6-2018</b>	100	60	56	58	42,00	2,00	EC <sub>20</sub> =80.18 (74.06-86.84) EC <sub>50</sub> >100	<b>Media</b>
		50	79	80	77	21,33	1,53		
		25	81	82	83	18,00	1,00		
		12,5	80	82	83	18,33	1,53		
	<b>Foce</b> <b>26-6-2018</b>	100	1	3	3	97,67	1,15	EC <sub>50</sub> =47.20 (40.83-52.59)	<b>Alta</b>
		50	40	37	36	62,33	2,08		
		25	76	73	76	25,00	1,73		
		12,5	80	76	77	22,33	2,08		
	<b>Controllo</b> <b>26-6-2018</b>	100	3	5	3	96,33	1,15	EC <sub>50</sub> =53.92 (47.53-59.55)	<b>Alta</b>
		50	49	48	49	51,33	0,58		
		25	80	81	81	19,33	0,58		
		12,5	82	79	82	19,00	1,73		
	<b>Porto</b> <b>15-1-2019</b>	100	82	83	83	17,33	0,58	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	84	83	83	16,67	0,58		
		25	85	83	83	16,33	1,15		
		12,5	85	82	86	15,67	2,08		
	<b>Foce</b> <b>15-1-2019</b>	100	2	3	4	97,00	1,00	EC <sub>50</sub> = 48.03 (41.79-53.44)	<b>Alta</b>
		50	35	39	43	61,00	4,00		
		25	79	79	80	20,67	0,58		
		12,5	80	81	80	19,67	0,58		
	<b>Controllo</b> <b>15-1-2019</b>	100	82	81	83	18,00	1,00	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	82	82	83	17,67	0,58		
		25	83	84	82	17,00	1,00		
		12,5	83	84	83	16,67	0,58		
<b>Cagliari</b>	<b>Darsena</b> <b>19-04-2018</b>	100	2	4	5	96,33	1,53	EC <sub>50</sub> =49,75 (43,11-55,53)	<b>Alta</b>
		50	41	43	41	58,33	1,15		
		25	77	79	79	21,67	1,15		
		12,5	79	80	81	20,00	1,00		
	<b>Rinascita</b> <b>19-04-2018</b>	100	1	0	3	98,67	1,53	EC <sub>50</sub> =47.17 (41.19-51,99)	<b>Alta</b>
		50	40	35	37	62,67	2,52		
		25	78	77	79	22,00	1,00		
		12,5	80	79	80	20,33	0,58		
	<b>S. Elmo</b> <b>19-04-2018</b>	100	31	30	32	69,00	1,00	EC <sub>50</sub> =89,01 (76,02-98,99)	<b>Alta</b>
		50	80	79	78	21,00	1,00		
		25	80	78	81	20,33	1,53		
		12,5	81	81	80	19,33	0,58		
	<b>Darsena</b> <b>17-10-2018</b>	100	50	50	54	48,67	2,31	EC <sub>20</sub> =74,19 (66,34-83,15) EC <sub>50</sub> >100	<b>Media</b>
		50	80	76	76	22,67	2,31		
		25	81	82	81	18,67	0,58		
		12,5	80	81	82	19,00	1,00		
	<b>Rinascita</b> <b>17-10-2018</b>	100	1	3	1	98,33	1,15	EC <sub>50</sub> =44,86 (38,67-50,26)	<b>Alta</b>
		50	35	35	36	64,67	0,58		
		25	74	71	74	27,00	1,73		
		12,5	77	79	79	21,67	1,15		

	<b>S. Elmo 17-10-2018</b>	100	20	18	17	81,67	1,53	EC <sub>50</sub> =65,81 (56.21- 74,81)	<b>Alta</b>
		50	60	55	61	41,33	3,21		
		25	80	79	82	19,67	1,53		
		12,5	80	80	81	19,67	0,58		
	<b>Darsena 05-12-2018</b>	100	22	26	20	77,33	3,06	EC <sub>50</sub> =74.33 (63.96- 84.51)	<b>Alta</b>
		50	69	65	64	34,00	2,65		
		25	80	79	82	19,67	1,53		
		12,5	79	82	80	19,67	1,53		
	<b>Rinascita 05-12-2018</b>	100	81	82	84	17,67	1,53	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	83	82	85	16,67	1,53		
		25	85	85	86	14,67	0,58		
		12,5	86	86	86	14,00	0,00		
	<b>S. Elmo 05-12-2018</b>	100	81	80	80	19,67	0,58	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	84	83	84	16,33	0,58		
		25	85	85	86	14,67	0,58		
		12,5	85	86	85	14,67	0,58		
<b>Darsena 23-01-2019</b>	100	26	22	27	75,00	2,65	EC <sub>50</sub> =71.97 (60.98- 83.45)	<b>Alta</b>	
	50	60	61	64	38,33	2,08			
	25	80	83	81	18,67	1,53			
	12,5	84	82	84	16,67	1,15			
<b>Rinascita 23-01-2019</b>	100	80	80	81	19,67	0,58	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>	
	50	83	84	82	17,00	1,00			
	25	84	82	84	16,67	1,15			
	12,5	85	83	83	16,33	1,15			
<b>S. Elmo 23-01-2019</b>	100	78	77	80	21,67	1,53	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>	
	50	81	81	84	18,00	1,73			
	25	85	83	84	16,00	1,00			
	12,5	85	84	84	15,67	0,58			
<b>La Spezia</b>	<b>Molo Fornelli</b>	100	83	78	83	18,67	2,89	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	82	83	83	17,33	0,58		
		25	83	84	84	16,33	0,58		
		12,5	83	85	84	16,00	1,00		
	<b>Molo Garibaldi</b>	100	84	82	84	16,67	1,15	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	82	83	83	17,33	0,58		
		25	83	84	85	16,00	1,00		
		12,5	84	84	85	15,67	0,58		
	<b>Aeronautic a Militare</b>	100	74	76	76	24,67	1,15	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	78	79	78	21,67	0,58		
		25	80	81	81	19,33	0,58		
		12,5	82	82	83	17,67	0,58		
<b>Controllo</b>	<b>Bianco trasporto</b>	100	79	78	78	21,67	0,58	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	80	80	79	20,33	0,58		
		25	81	82	81	18,67	0,58		
		12,5	82	81	82	18,33	0,58		
	<b>Bianco laboratorio</b>	100	81	82	80	19,00	1,00	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	82	82	81	18,33	0,58		
		25	82	79	82	19,00	1,73		
		12,5	81	82	82	18,33	0,58		
	<b>Bianco fabbrica</b>	100	80	81	82	19,00	1,00	EC <sub>20</sub> >90	<b>Assente</b>
		50	82	81	82	18,33	0,58		
		25	82	82	83	17,67	0,58		
		12,5	82	84	83	17,00	1,00		

Validazione del test:

	Parametro	Risultato richiesto	Risultato ottenuto
Controllo negativo (FSW)	% plutei (P4) normoformati	> 80 %	87 %
Controllo Positivo Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *3H <sub>2</sub> O	EC <sub>50</sub> (µg L <sup>-1</sup> )	22,60 - 68,34	29,90 (27.31-32.20)

I risultati ottenuti evidenziano una forte criticità per i Porti di Olbia e Cagliari, in particolare nel porto di Cagliari gli estratti dei POCIS esposti ad aprile ed ottobre hanno mostrato una tossicità rilevante in tutte le stazioni indagate. La tossicità per la stazione Darsena Pescherecci è rimasta elevata anche nei successivi campionamenti di dicembre e gennaio.

Gli estratti dei POCIS posizionati nel porto di La Spezia non hanno evidenziato alcuna tossicità mentre per il porto di Tolone l'unica stazione che ha presentato una tossicità considerevole è stata Corsica Ferries, dato peraltro in accordo con quanto evidenziato dal saggio di embriotossicità con il riccio di mare sugli elutriati ottenuti dai sedimenti prelevati nella medesima stazione.

### 6.1.2. Mussel Watch

Nei porti pilota sono state effettuate 2 campagne di Mussel Watch:

- nel porto di la Spezia: prima (deposizione 20/11/17) e dopo (deposizione 08/03/19) le attività di livellamento dei fondali che hanno interessato l'area antistante il Molo Fornelli;
- nel porto di Olbia: una campagna nel periodo di più intenso traffico (deposizione 26/06/18) e una nel periodo di minor traffico navale (deposizione 15/01/19), in modo da evidenziare possibili effetti dovuti alla risospensione dei sedimenti a causa del passaggio delle navi.

#### 6.1.2.1. Bioaccumulo metalli

Nella tabella 10 sono riportati i risultati dell'analisi dei metalli condotta sui mitili trapiantati nelle aree d'indagine nei 2 porti pilota individuati dal progetto (La Spezia e Olbia). In generale non c'era un chiaro gradiente ripetitivo per il bioaccumulo dei metalli. In diversi casi, i mitili di riferimento (Ref<sub>M</sub>), al tempo zero (T<sub>0</sub>), presentavano concentrazioni di metalli più elevate rispetto ai mitili trapiantati nelle stazioni di campionamento dopo un mese di immersione nella colonna d'acqua. Questo è avvenuto per le cozze trapiantate nella seconda campagna di campionamento a La Spezia (marzo-aprile 2019), per tutti i metalli

oggetto di studio, e a Olbia nella prima campagna (giugno-luglio 2018) per l'As e il Pb e nella seconda (gennaio-febbraio 2019) per il Cd. Quindi, questi risultati non sono stati presi in considerazione per la discussione.

I range di concentrazione dei metalli misurati a La Spezia (novembre-dicembre 2017) sono stati i seguenti: 7,4-17,6 mg kg<sup>-1</sup> per l'As, 0,6-0,7 mg kg<sup>-1</sup> per il Cd, 3,3-6,3 mg kg<sup>-1</sup> per il Cr, 7,5-12,7 mg kg<sup>-1</sup> per il Cu, 2,4-2,9 mg kg<sup>-1</sup> per il Ni, 5,6-6,4 mg kg<sup>-1</sup> per il Pb e 24-42 mg kg<sup>-1</sup> per il Zn. Cadimare ha presentato le più alte concentrazioni di As, Cd e Cr, Molo Fornelli le più alte concentrazioni di Cu, Ni e Pb e Molo Garibaldi le più alte concentrazioni di Zn.

Per quanto riguarda Olbia, nella prima campagna (giugno-luglio 2018) sono stati misurati 0,3-0,6 mg kg<sup>-1</sup> di Cd, 0,5-3,0 mg kg<sup>-1</sup> di Cr, 1,9-4,8 mg kg<sup>-1</sup> di Cu, 0,8-2,8 mg kg<sup>-1</sup> di Ni e 83-141 mg kg<sup>-1</sup> di Zn e nella seconda 16-20 mg kg<sup>-1</sup> di As, 0,7-0,8 mg kg<sup>-1</sup> di Cr, 6,0-7,3 mg kg<sup>-1</sup> di Cu, 0,7-0,8 mg kg<sup>-1</sup> di Ni, 1,2-1,4 mg kg<sup>-1</sup> di Pb e 110-327 mg kg<sup>-1</sup> di Zn. In generale, i mitili trapiantati nelle stazioni di Porto e Foce hanno presentato le più alte concentrazioni di metalli. Concentrazioni più elevate di Cu e Zn sono state misurate durante la campagna effettuata in inverno, mentre concentrazioni più elevate di Cr e Ni sono state misurate in estate.

Se si confrontano i risultati ottenuti a La Spezia e Olbia, concentrazioni simili di As, Cd e Ni sono state misurate in entrambe le aree studiate. D'altra parte, concentrazioni più elevate di Cr, Cu e Pb sono state misurate a La Spezia, mentre concentrazioni più elevate di Zn sono state misurate a Olbia.

*Tabella 10: Contenuto di metalli (mg kg<sup>-1</sup>) nei mitili trapiantati nel Porto di Olbia e La Spezia e valore del p-value calcolato con il test t di Student per la significatività della differenza dal Bianco.*



Sito	Data	Stazione	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
La Spezia	20/11/17	REF <sub>M</sub>	9,8	0,4	2,2	7,2	2,0	5,2	6,0
	21/12/17	Molo Fornelli	7,4	0,58	3,3	12,7	2,9	6,4	37
		<i>p-value</i>	<0,05	<0,01	<0,01	/	<0,05	<0,01	<0,01
		Molo Garibaldi	16,9	0,62	5,1	7,5	2,4	5,6	42
		<i>p-value</i>	<0,05	<0,01	<0,05	/	<0,05	/	<0,01
		Cadimare	17,6	0,70	6,3	10,5	2,8	6,1	24
		<i>p-value</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	/	/	<0,01
	08/03/19	REF <sub>M</sub>	22	0,45	3,4	7,2	2,4	5,5	329
	09/04/19	Molo Fornelli	16,1	0,27	1,7	7,4	1,1	3,1	371
		<i>p-value</i>	/	/	/	/	/	/	/
		Molo Garibaldi	0,64	0,01	0,06	0,26	0,05	0,12	13,1
		<i>p-value</i>	/	/	/	/	/	/	/
		Cadimare	0,72	0,02	0,06	0,45	0,05	0,26	15,3
		<i>p-value</i>	/	/	/	/	/	/	/
Olbia	26/06/18	REF <sub>M</sub>	10,7	0,47	0,43	3,6	0,74	0,37	86
	26/07/18	Porto	5,9	0,33	0,47	2,2	0,71	0,12	102
		<i>p-value</i>	/	/	/	<0,01	/	/	/
		Foce	5,4	0,51	3,0	4,8	2,8	0,26	83
		<i>p-value</i>	/	/	<0,01	/	<0,01	/	/
		Controllo	6,2	0,62	0,54	1,9	0,99	0,16	141
		<i>p-value</i>	/	/	<0,05	<0,01	<0,01	/	<0,01
	15/01/19	REF <sub>M</sub>	12,8	2,1	0,46	4,6	0,36	0,83	88

	20/02/19	<b>Porto</b>	19,7	1,9	0,76	7,3	0,73	1,4	110
		<b>p-value</b>	<0,05	/	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05
		<b>Foce</b>	16,3	1,9	0,82	6,6	0,83	1,2	327
		<b>p-value</b>	<0,05	/	<0,01	<0,01	<0,01	/	<0,01
		<b>Controllo</b>	19,2	1,9	0,67	6,0	0,66	1,4	250
		<b>p-value</b>	<0,05	/	<0,01	<0,05	<0,01	/	<0,01

### 6.1.2.2. Bioaccumulo IPA

Nella tabella 11 sono riportati i risultati delle analisi degli IPA condotte sui mitili trapiantati nelle aree di studio (La Spezia e Olbia).

Come è stato osservato per i metalli, nel caso della seconda campagna a La Spezia (marzo-aprile 2019), i mitili di riferimento (Ref<sub>M</sub>), al tempo zero (T<sub>0</sub>), presentavano concentrazioni di IPA più elevate, rispetto ai mitili trapiantati in Molo Fornelli e Cadimare. Questo è dovuto al fatto che i mitili di riferimento (Ref<sub>M</sub>) della seconda campagna avevano livelli di IPA da 2 a 20 volte superiori a quelli osservati nei Ref<sub>M</sub> nella prima campagna. In marzo-aprile 2019 la concentrazione di quasi tutti gli IPA a Molo Garibaldi è stata superiore ai Ref<sub>M</sub> e le concentrazioni sono state simili a quelle misurate a Molo Garibaldi nella campagna precedente (novembre 2017). Per quanto riguarda la prima campagna di campionamento a La Spezia, tutte le stazioni hanno mostrato concentrazioni simili per tutti gli IPA determinati, anche se Cadimare ha presentato la ΣIPA più alta (ΣIPA: Molo Fornelli 152 µg kg<sup>-1</sup>, Molo Garibaldi 148 µg kg<sup>-1</sup>, Cadimare 173 µg kg<sup>-1</sup>). Gli IPA più predominanti sono stati il crisene, il fenantrene e il pirene.

Ad Olbia, le concentrazioni di IPA nei mitili nella seconda campagna (gennaio) erano inferiori al Ref<sub>M</sub> e quindi non sono stati presi in considerazione. A giugno, tutte le concentrazioni di IPA erano molto basse (ΣIPA giugno-luglio 2018: Porto 8,6 µg kg<sup>-1</sup>, Foce 7,4 µg kg<sup>-1</sup>, Controllo 7,4 µg kg<sup>-1</sup>), a livello dei mitili di riferimento, ma in questo caso può essere spiegato dalle basse concentrazioni di IPA presenti in quest'area di studio. Ad Olbia sono state misurate concentrazioni di IPA circa venti volte inferiori rispetto a La Spezia.

Tabella 11: Contenuto di IPA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nei mitili trapiantati nel Porto di Olbia e La Spezia.

	La Spezia							
	20/11/17	21/12/17			08/03/19	09/04/19		
	REF <sub>M</sub>	Molo Fornelli	Molo Garibaldi	Cadimare	REF <sub>M</sub>	Molo Fornelli	Molo Garibaldi	Cadimare
Acenaftene	<LOD	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2
Acenaftilene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Antracene	0,2	2,0	2,0	2,6	0,7	0,5	1,5	0,3
Benzo_a_antracene	1,9	14,4	13,7	15,3	6,4	7,4	18,4	0,9
Benzo_a_pirene	1,2	11,2	11,4	12,9	1,8	3,4	13,1	0,8
Benzo_b_fluorante	1,4	11,1	16,1	12,6	9,1	5,8	18,2	1,0
Benzo_g_h_i_perilene	1,0	10,8	10,8	12,4	3,9	1,8	5,6	1,0
Benzo_k_fluorante	1,0	2,9	2,7	3,3	6,6	3,5	9,6	0,7
Crisene	3,5	32,6	22,4	27,7	29,8	9,8	28,8	2,3
Dibenzo_a_h_antracene	<LOD	1,6	1,9	1,8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fenantrene	2,3	19,5	17,9	26,6	6,2	3,1	8,3	2,2
Fluorantene	2,9	7,9	8,6	9,7	44,1	14,6	26,5	4,3
Fluorene	<LOD	1,7	1,5	2,7	<LOD	0,2	1,0	<LOD
Indeno_1_2_3_c_d_pirene	1,6	2,2	2,3	2,1	3,5	2,8	3,3	1,6
Naftalene	0,9	0,8	1,6	1,2	9,5	6,3	7,1	6,0
Pirene	2,7	32,5	34,7	41,3	11,7	11,9	31,6	2,3
<b>Sommatoria_IPA</b>	<b>20,6</b>	<b>151,6</b>	<b>147,9</b>	<b>172,6</b>	<b>133,7</b>	<b>71,4</b>	<b>173,3</b>	<b>23,6</b>
	Olbia							
	26/06/18	26/07/18			15/01/19	20/02/19		
	REF <sub>M</sub>	Porto	Foce	Controllo	REF <sub>M</sub>	Porto	Foce	Controllo
Acenaftene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Acenaftilene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Antracene	0,3	0,4	0,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3
Benzo_a_antracene	0,3	0,3	0,3	0,3	0,9	0,3	0,3	0,2
Benzo_a_pirene	<LOD	0,2	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	<LOD	<LOD
Benzo_b_fluorante	0,3	0,4	0,3	0,3	1,0	0,3	0,2	0,3
Benzo_g_h_i_perilene	0,3	0,4	0,3	0,4	0,5	0,3	0,2	0,3
Benzo_k_fluorante	0,2	0,3	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2
Crisene	0,5	0,7	0,5	0,5	1,8	0,7	0,7	0,8
Dibenzo_a_h_antracene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fenantrene	3	3,2	3,2	2,8	6,8	3,8	3,6	3,6
Fluorantene	0,4	0,5	0,3	0,3	3,2	1,4	1,3	1,5

<b>Fluorene</b>	<LOD	0,2	<LOD	<LOD	0,5	0,2	0,2	0,2
<b>Indeno_1_2_3_c_d_pirene</b>	<LOD	<LOD	<LOD	0,2	0,2	0,3	<LOD	0,3
<b>Naftalene</b>	1,1	0,9	1,1	1,5	1,4	7,1	1,3	0,9
<b>Pirene</b>	0,6	1,1	0,8	0,6	3,1	0,9	0,7	0,7
<b>Sommatoria_IPA</b>	7,0	8,6	7,4	7,4	20,3	15,8	9,0	9,3

### 6.1.2.3. Bioaccumulo PCB

In tabella 12 sono riportati i risultati dell'analisi dei PCB condotta sui mitili trapiantati nei porti di La Spezia ed Olbia. Come osservato per i metalli e gli IPA, i REF<sub>M</sub> della seconda campagna di La Spezia hanno presentato concentrazioni di PCB due volte superiori a quelle trovate nei REF<sub>M</sub> della prima campagna. Tuttavia, in questo caso quasi tutti i PCB misurati nei mitili trapiantati presentavano concentrazioni superiori a quelle dei REF<sub>M</sub>. Nella prima campagna tutte le stazioni hanno mostrato concentrazioni simili ( $\Sigma$ PCB: Molo Fornelli 22,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , Molo Garibaldi 22,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , Cadimare 22,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), mentre nella seconda campagna le concentrazioni di PCB sono aumentate nell'ordine di Cadimare ( $\Sigma$ PCB 14,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), Molo Garibaldi ( $\Sigma$ PCB 15,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e Molo Fornelli ( $\Sigma$ PCB 19,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), anche se le concentrazioni sono state inferiori a quelle di novembre. I congeneri più predominanti in entrambe le campagne sono stati CB153, CB138 e CB101.

Ad Olbia, quasi tutte le concentrazioni dei PCB sono state a livello dei REF<sub>M</sub>, ad eccezione della stazione Controllo ( $\Sigma$ PCB 10,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nella seconda campagna (gennaio-febbraio 2019). Come osservato a La Spezia, i congeneri predominanti ad Olbia sono stati CB153, CB138 e CB101, ma la loro concentrazione è stata la metà di quella trovata a La Spezia.

Tabella 12: Contenuto di PCB ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nei mitili trapiantati nel Porto di Olbia e La Spezia

	La Spezia							
	20/11/17	21/12/17			08/03/19	09/04/19		
	REF <sub>M</sub>	Molo Fornelli	Molo Garibaldi	Cadimare	REF <sub>M</sub>	Molo Fornelli	Molo Garibaldi	Cadimare
<b>PCB_101</b>	0,82	2,98	3,04	3,03	1,53	3,40	2,43	2,0
<b>PCB_118</b>	0,58	2,52	2,50	2,62	1,10	1,92	1,36	1,35
<b>PCB_126</b>	0,003	0,007	0,006	0,007	0,005	0,010	0,008	0,006
<b>PCB_138</b>	1,46	4,50	6,19	5,71	2,10	3,40	2,40	2,83
<b>PCB_153</b>	2,92	8,12	8,04	7,49	4,62	6,66	4,53	6,01

<b>PCB_156</b>	0,06	0,24	0,23	0,26	0,11	0,17	0,15	0,14
<b>PCB_169</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>PCB_180</b>	0,18	1,10	1,08	1,28	0,43	0,67	0,44	0,41
<b>PCB_28</b>	0,06	0,25	0,16	0,14	0,29	0,68	1,15	0,19
<b>PCB_52</b>	0,35	2,31	1,49	1,50	0,84	2,30	2,66	1,01
<b>PCB_77</b>	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03	0,08	0,09	0,03
<b>PCB_81</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>Sommatoria _PCB</b>	6,44	22,06	22,77	22,08	11,07	19,29	15,22	13,98
<b>Olbia</b>								
	<b>26/06/18</b>	<b>26/07/18</b>			<b>15/01/19</b>	<b>20/02/19</b>		
	<b>REF<sub>M</sub></b>	<b>Porto</b>	<b>Foce</b>	<b>Contro llo</b>	<b>REF<sub>M</sub></b>	<b>Porto</b>	<b>Foce</b>	<b>Controll o</b>
<b>PCB_101</b>	0,85	0,65	0,70	0,68	0,57	0,41	0,48	1,60
<b>PCB_118</b>	0,70	0,45	0,60	0,56	0,28	0,30	0,34	0,28
<b>PCB_126</b>	0,004	0,003	0,004	0,003	0,003	0,002	0,002	0,005
<b>PCB_138</b>	1,04	0,73	1,05	0,98	1,19	0,75	0,88	2,45
<b>PCB_153</b>	2,12	1,25	2,11	1,76	2,57	1,55	1,81	4,94
<b>PCB_156</b>	0,06	0,04	0,05	0,04	0,04	0,03	0,04	0,10
<b>PCB_169</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>PCB_180</b>	0,13	0,11	0,08	0,07	0,23	0,09	0,12	0,29
<b>PCB_28</b>	0,13	0,25	0,07	0,06	0,10	0,04	0,05	0,07
<b>PCB_52</b>	0,62	0,72	0,31	0,33	0,24	0,22	0,22	0,75
<b>PCB_77</b>	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
<b>PCB_81</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>Sommatoria _PCB</b>	5,66	4,22	4,98	4,51	5,22	3,40	3,94	10,51

## 6.2. Caratterizzazione dei sedimenti superficiali

### 6.2.1. Caratteristiche granulometriche

Nella Tabella 13 sono riportati i risultati delle analisi granulometriche dei sedimenti campionati nel porto di Tolone, Olbia, Cagliari e La Spezia.

Tabella 13. Granulometria (composizione percentuale) dei sedimenti campionati nel porto di Tolone, Olbia, Cagliari e La Spezia

		GHIAIE	SABBIE						PELITI
Campione		2000µm	1000µm	500µm	250µm	125µm	63µm	TOT	< 63µm
Tolone	Lazaret	0,00	0,00	1,75	4,08	6,84	3,64	16,30	83,70
	Tour Royale	0,00	0,71	2,70	6,53	28,27	9,94	48,15	51,85
	Corsica Ferries	0,00	0,29	0,43	1,01	2,44	3,88	8,05	91,95
	Suffren	0,00	0,00	0,14	0,43	1,57	2,42	4,56	95,44
Olbia	Porto	5,08	1,94	7,55	5,67	16,86	20,36	52,39	42,53
	Foce	1,17	1,33	3,20	18,62	50,65	11,21	85,02	13,81
	Controllo	13,22	17,88	14,74	15,58	27,54	6,08	81,81	4,96
Cagliari	Rinascita	0,00	0,29	1,29	4,59	39,17	9,04	54,38	45,62
	D. Pescherecci	0,00	0,28	1,00	2,71	9,54	4,99	18,52	81,48
	S. Elmo	0,00	0,43	1,57	1,43	1,71	0,86	5,99	94,01
La Spezia	MF1	0,73	1,45	3,27	6,91	10,18	8,00	29,82	69,45
	MF2	0,00	1,45	4,00	7,50	10,25	7,90	31,10	68,90
	MF3	0,00	1,90	3,5,	6,80	10,00	8,60	30,80	69,20
	MF4	0,80	1,45	3,27	7,60	9,60	8,00	30,72	69,28

Per quanto riguarda la composizione granulometrica, i sedimenti di Tolone, Cagliari e La Spezia presentano una forte componente pelitica, generalmente superiore al 45%, che in taluni casi arriva a superare il 90% (vedasi le stazioni Corsica Ferries e Suffren per il porto di Tolone e la stazione S. Elmo per il porto di Cagliari).

Per il porto di Olbia, ad esclusione della stazione Porto, dove le peliti costituiscono il 43% delle frazioni granulometriche, i campioni presentano una composizione prevalentemente sabbiosa e comunque superiore al 80%.

### 6.2.2. Carbonio Organico Totale (TOC)

Nella Tabella 14 sono riportati i risultati dell'analisi del Carbonio Organico Totale (TOC) nei sedimenti prelevati nelle aree d'indagine. Le concentrazioni di TOC più elevate sono state rilevate a Lazaret (10,2 g kg<sup>-1</sup>) nel porto di Tolone e a S. Elmo (14,7 g kg<sup>-1</sup>) nel porto di Cagliari.

Tabella 14: Contenuto di Carbonio Organico Totale nei sedimenti del Porto di Tolone, Olbia, Cagliari e La Spezia.

	Campione	TOC (g kg <sup>-1</sup> )
Tolone	Lazaret	10,16
	Tour Royale	2,14
	Corsica Ferries	6,11
	Suffren	2,81
Olbia	Porto	4,56
	Foce	1,78
	Controllo	0,94
Cagliari	Rinascita	1,69
	D. Pescherecci	4,60
	S. Elmo	14,73
La Spezia	MF1	2,15
	MF2	3,40
	MF3	2,15
	MF4	1,49

### 6.2.3. Concentrazioni di metalli nei sedimenti

Nella Tabella 15 sono riportati i risultati delle analisi dei metalli condotte sui sedimenti prelevati nelle aree d'indagine. Nei quattro porti sono stati misurati i seguenti range di concentrazione dei metalli: 4,6- 39,2 mg kg<sup>-1</sup> per As, 0,013-2,2 mg kg<sup>-1</sup> per Cd, 9,1-57,3 mg kg<sup>-1</sup> per Cr, 6,0-463 mg kg<sup>-1</sup> per Cu, 0,022-9,9 mg kg<sup>-1</sup> per Hg, 5,1-53,5 mg kg<sup>-1</sup> per Ni, 10,3-304,5 mg kg<sup>-1</sup> per Pb e 47,7-462 mg kg<sup>-1</sup> per Zn. La stazione Corsica Ferries, situata nella rada di Tolone, è stata caratterizzata dalle più alte concentrazioni di As, Cu e Hg, mentre a Cagliari, Darsena Pescherecci ha presentato le più alte concentrazioni di Cd e Pb e S. Elmo di Zn. I sedimenti di La Spezia hanno presentato le più alte concentrazioni di Cr (St. MF2) e Ni (St. MF1).

Tabella 15. Contenuto di metalli ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nei sedimenti del Porto di Tolone, Olbia, Cagliari e La Spezia

	Campione	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Tolone	Lazaret	21,5	0,052	27,6	34,6	0,706	15,7	48,6	121,5
	Tour Royale	5,6	0,013	13,6	20,1	0,775	10,5	25,0	58,6
	Corsica	<b>39,2</b>	0,190	52,2	<b>462,9</b>	<b>9,847</b>	25,5	195,1	415,4
	Suffren	16,1	0,406	42,7	136,8	2,135	25,5	133,3	396,4
Olbia	Porto	5,55	0,078	17,4	27,0	0,058	10,4	21,7	119,2
	Foce	4,61	0,068	9,1	11,1	0,031	5,1	11,8	65,9
	Controllo	6,01	0,031	13,2	6,0	0,022	7,5	10,3	47,7
Cagliari	Rinascita	9,3	0,386	15,2	20,9	0,219	7,7	61,9	94,2
	Darsena	19,4	<b>2,204</b>	32,6	117,2	0,641	20,0	<b>304,5</b>	422,6
	S. Elmo	5,4	1,084	30,1	141,9	0,260	21,1	120,7	<b>461,4</b>
La Spezia	MF1	11,4	0,19	56,6	40,8	0,180	<b>53,5</b>	48,4	201,9
	MF2	10,6	0,17	<b>57,2</b>	37,6	0,162	48,0	48,9	199,4
	MF3	8,5	0,231	54,9	33,9	0,148	41,8	45,4	195,9
	MF4	9,0	0,245	55,0	31,6	0,140	38,9	40,0	158,2

Nel presente studio è stata determinata la frazione scambiabile (F1) di Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn nei sedimenti raccolti a Olbia, Cagliari e La Spezia, per valutare l'associazione di questi metalli ai sedimenti e stabilire il potenziale rischio ambientale dovuto ai processi di rimobilizzazione. La percentuale di metalli associata alla frazione scambiabile (F1) in ogni area studiata si ritrova nella Tabella 16. Tra i metalli studiati, il Cd e lo Zn sono quelli più fortemente associati alla frazione scambiabile, con una percentuale del 18-57% e del 13-45%, rispettivamente. Invece, solo il 0-2% del Cr è associato alla F1. Va sottolineato che nel caso del Cu si è osservata una grande differenza tra i sedimenti raccolti a Olbia e Cagliari e quelli di La Spezia. I primi presentavano una percentuale di Cu associato alla F1 pari allo 0-4%, mentre quelli della Spezia presentavano una percentuale 14-22%. Gli altri metalli hanno mostrato una condizione intermedia (Ni 5-14%; Pb 0-11%).

Tabella 16. Contenuto di metalli (in %) nella frazione scambiabile (F1) nei sedimenti del Porto di Olbia, Cagliari e La Spezia



	Campione	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Olbia	Porto	30,3	0,2	0,8	8,4	0,3	20,6
	Foce	57,2	0,8	4,4	14,4	2,0	36,8
	Controllo	34,3	0,3	0,1	6,6	0,6	12,6
Cagliari	Rinascita	35,8	0,5	1,3	6,0	6,0	29,9
	D. Pescherecci	37,6	0,0	0,4	6,8	1,4	23,1
	S. Elmo	29,0	0,1	0,9	10,8	1,7	44,5
La Spezia	MF1	21,8	2,3	14,7	5,2	10,6	34,2
	MF2	24,2	2,1	14,1	5,5	8,6	34,1
	MF3	18,6	2,0	18,0	5,9	7,9	31,1
	MF4	17,6	2,1	21,9	6,5	8,5	39,6

#### 6.2.4. Concentrazioni di IPA nei sedimenti

Nella Tabella 17 sono riportati i risultati delle analisi degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) condotta sui sedimenti prelevati nelle aree d'indagine. A Tolone, la concentrazione totale di IPA, misurata come sommatoria di 16 IPA, è stata di 19800  $\mu\text{g kg}^{-1}$  alla stazione Corsica Ferries, 1200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  alla stazione Tour Royale e 4000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  alla stazione Lazaret. La stessa tendenza è stata osservata in tutte le stazioni, con una predominanza di BbF (120-2390  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), BghiP (190-2590  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), FI (150-2410  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), IP (150-2510  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e Py (130-2130  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). A La Spezia, i quattro sedimenti raccolti a Molo Fornelli hanno mostrato più o meno le stesse concentrazioni di IPA, con valori di  $\Sigma 16$  IPA nel range 400-500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Sebbene le concentrazioni di tutti i singoli IPA fossero abbastanza simili, BaP (valore medio 53  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e BbF (valore medio 58  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) presentavano le concentrazioni più elevate. Per quanto riguarda i sedimenti raccolti ad Olbia, le concentrazioni di tutti i singoli IPA erano inferiori al limite di rilevazione della tecnica analitica. Attualmente non sono disponibili i risultati delle concentrazioni di IPA nei sedimenti raccolti a Cagliari.

Tabella 17. Contenuto di IPA ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nei sedimenti del Porto di Tolone, Olbia, Cagliari e La Spezia

	Tolone			Olbia		
	Lazaret	Tour Royale	Corsica	Porto	Foce	Controllo
Acenaftene	0,02	<0,01	0,11	<0,01	<0,01	<0,01
Acenaftilene	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Antracene*	0,04	0,01	0,23	<0,01	<0,01	<0,01
Benzo_a_antracene*	0,15	0,04	1,21	<0,01	<0,01	<0,01
Benzo_a_pirene*	0,28	0,08	1,97	<0,01	<0,01	<0,01
Benzo_b_fluorantene*	0,43	0,12	2,39	<0,01	<0,01	<0,01
Benzo_g_h_i_perilene*	0,51	0,19	2,59	<0,01	<0,01	<0,01
Benzo_k_fluorantene*	0,33	0,09	0,91	<0,01	<0,01	<0,01
Crisene*	0,36	0,11	1,26	<0,01	<0,01	<0,01
Dibenzo_a_h_antracene	0,12	0,04	0,60	<0,01	<0,01	<0,01
Fenantrene*	0,19	0,07	1,27	<0,01	<0,01	<0,01
Fluorantene*	0,49	0,15	2,41	<0,01	<0,01	<0,01
Fluorene*	0,03	<0,01	0,11	<0,01	<0,01	<0,01
Indeno_1_2_3_c_d_pirene*	0,60	0,15	2,51	<0,01	<0,01	<0,01
Naftalene	0,02	<0,01	0,11	<0,01	<0,01	<0,01
Pirene*	0,43	0,13	2,13	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Sommatoria_IPA*</b>	<b>4,00</b>	<b>1,20</b>	<b>19,80</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>

	La Spezia			
	MF1	MF2	MF3	MF4
<b>Acenaftene</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Acenaftilene</b>	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>Antracene*</b>	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>Benzo_a_antracene*</b>	0,04	0,04	0,03	0,04
<b>Benzo_a_pirene*</b>	0,05	0,06	0,04	0,06
<b>Benzo_b_fluorantene*</b>	0,06	0,06	0,05	0,06
<b>Benzo_g_h_i_perilene*</b>	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>Benzo_k_fluorantene*</b>	0,04	0,04	0,03	0,04
<b>Crisene*</b>	0,01	0,02	<0,01	0,02
<b>Dibenzo_a_h_antracene</b>	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>Fenantrene*</b>	0,02	0,01	0,01	0,02
<b>Fluorantene*</b>	0,04	0,03	0,03	0,04
<b>Fluorene*</b>	0,02	0,01	0,02	0,02
<b>Indeno_1_2_3_c_d_pirene*</b>	0,04	0,05	0,04	0,04
<b>Naftalene</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Pirene*</b>	0,04	0,04	0,03	0,04
<b>Sommatoria_IPA*</b>	<b>0,40</b>	<b>0,40</b>	<b>0,40</b>	<b>0,40</b>

### 6.2.5. Concentrazioni di PCB nei sedimenti

Nella Tabella 18 sono riportati i risultati delle analisi dei PCB condotte sui sedimenti prelevati nelle aree d'indagine. A Tolone, la  $\Sigma 13$  PCB è stata di circa  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  a Lazaret e alla Tour Royale, mentre la concentrazione è stata dieci volte maggiore a Corsica Ferries ( $261 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Alla stazione Corsica Ferries, i congeneri predominanti sono diminuiti nell'ordine PCB 153>PCB101>PCB 180>PCB 138>PCB 118. Questa tendenza è stata riscontrata, a concentrazioni più basse, nelle altre due stazioni. Per quanto riguarda Olbia, la somma dei PCB era nell'intervallo  $0,40-0,60 \mu\text{g kg}^{-1}$ . La somma media dei PCB trovati a La Spezia è stata di  $16 \mu\text{g kg}^{-1}$ , con i congeneri predominanti in diminuzione nell'ordine PCB 153>PCB180>PCB 138>PCB 118>PCB 101. Attualmente non sono disponibili i risultati delle concentrazioni di PCB nei sedimenti raccolti a Cagliari.

Tabella 18. Contenuto dei PCB ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nei sedimenti del Porto di Tolone, Olbia e La Spezia.

	Tolone			Olbia		
	Lazaret	Tour Royale	Corsica	P1	P2	P3
PCB_28	0,10	0,10	1,00	0,04	0,02	0,04
PCB_52	0,70	0,80	16,60	<0.1	0,02	<0.1
PCB_77	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0,01	<0.1
PCB_81	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
PCB_101	1,90	2,70	44,60	0,13	0,08	0,06
PCB_118	2,00	3,20	16,90	0,10	0,06	0,11
PCB_126	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
PCB_128	0,40	0,40	9,00	0,01	<0.1	0,02
PCB_138	3,10	3,40	43,00	0,13	0,17	0,08
PCB_153	5,60	7,90	80,90	0,17	0,14	0,07
PCB_156	0,20	0,30	5,30	<0.1	<0.1	<0.1
PCB_169	<0,1	<0,1	<0,1	<0.1	<0.1	<0.1
PCB_180	2,50	3,00	43,20	0,03	0,02	0,02
<b>Sommatoria_PCB*</b>	<b>17,00</b>	<b>22,00</b>	<b>261,00</b>	<b>0,60</b>	<b>0,51</b>	<b>0,40</b>
	La Spezia					
	MF1	MF2	MF3	MF4		
PCB_28	0,23	0,16	0,15	0,13		
PCB_52	0,81	0,69	0,92	1,08		
PCB_77	1,17	0,14	0,14	0,19		
PCB_81	0,04	0,03	0,03	0,06		
PCB_101	1,78	1,39	1,71	2,29		
PCB_118	1,63	1,48	1,68	2,69		
PCB_126	0,01	0,02	0,02	0,01		
PCB_128	0,40	0,36	0,40	0,54		
PCB_138	2,46	1,91	2,36	2,54		
PCB_153	5,53	4,88	4,99	5,11		
PCB_156	0,28	0,24	0,28	0,36		
PCB_169	0,02	<0.1	<0.1	<0.1		
PCB_180	3,03	2,66	3,15	2,81		
<b>Sommatoria_PCB*</b>	<b>16,38</b>	<b>13,94</b>	<b>15,82</b>	<b>17,81</b>		

### 6.2.6. Saggi biologici

Nelle Tabelle seguenti sono riportati i risultati dei saggi con *P. tricornutum* (Tab. 19), *P. lividus* (Tab. 20) e *V. fischeri* (Tab. 21) condotti sugli elutriati dei campioni di sedimento prelevati nei Porti di Tolone, Olbia, Cagliari e La Spezia.

#### *Phaeodactylum tricornutum*

Tabella 19. Risultati del saggio con *P. tricornutum* espresso come Inibizione (%) della crescita algale, media ( ) e deviazione standard ( $\sigma$ )

	Campione	Inibizione Crescita Algale I (%)					Tossicità
		1	2	3	$\bar{x}$	$\sigma$	
Tolone	Lazaret	-2,55	-0,47	-3,51	-2,18	1,55	Assente
	Tour Royale	1,72	2,28	-0,82	1,06	1,65	Assente
	Corsica	-6,43	-3,68	-5,37	-5,16	1,39	Assente
	Suffren	-4,30	-4,24	-7,39	-5,31	1,80	Assente
Olbia	P1	-0,49	-3,04	0,51	-1,01	1,83	Assente
	P2	-7,96	-8,37	-7,42	-7,91	0,48	Assente
	P3	-9,11	-9,61	-9,22	-9,31	0,26	Assente
Cagliari	Rinascita	-11,07	-11,95	-13,74	-12,26	1,36	Assente
	Darsena	-10,55	-10,81	-13,51	-11,63	1,64	Assente
	S. Elmo	-19,76	-21,11	-20,77	-20,54	0,70	Assente
La Spezia	MF1	-12,69	-11,83	-10,94	-11,82	0,87	Assente
	MF2	-7,98	-7,58	-6,09	-7,22	0,99	Assente
	MF3	-14,08	-14,08	-11,08	-13,08	1,73	Assente
	MF4	-12,56	-11,29	-10,23	-11,36	1,17	Assente

Validazione del test:

	Parametro	Risultato richiesto	Risultato ottenuto
Controllo negativo (SW)	FC (fattore di crescita dopo 72h)	> 16	97,12
	TC (tasso di crescita dopo 72h) (d-1)	> 0,9 d-1	1,52
	CV del TC (coefficiente di variazione del TC) (%)	< 5%	1,47
K2Cr2O7	EC50 (mg L <sup>-1</sup> )	20,1 ± 5,1 (14,8 - 25,4)	15,754 (14,685 - 16,823)

**Paracentrotus lividus**

Tabella 20. Risultati del saggio di embriotossicità con *P. lividus*. Nella tabella è riportata la media ( ) dei plutei malfornati, la deviazione standard e il valore di EC<sub>20</sub>/EC<sub>50</sub> determinato mediante Probit Analysis.

	Campione	Diluizione (%)	P4 Normoformati (repliche)			Media Maloformati (Π)	σ	EC <sub>20</sub> /EC <sub>50</sub> (%)	Tossicità
Tolone	Lazaret	100	75	73	76	25,33	1,53	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	79	77	80	21,33	1,53		
		25	80	81	80	19,67	0,58		
	Tour Royale	100	80	81	81	19,33	0,58	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	82	81	81	18,67	0,58		
		25	82	82	83	17,67	0,58		
	Corsica	100	55	51	54	46,67	2,08	EC <sub>20</sub> =40,9 4 (nc-nc); EC <sub>50</sub> >100	Alta
		50	73	71	72	28,00	1,00		
		25	75	76	77	24,00	1,00		
	Suffren	100	76	78	76	23,33	1,15	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	80	81	81	19,33	0,58		
		25	80	82	82	18,67	1,15		
Olbia	P1	100	71	74	73	27,33	1,53	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	80	81	82	19,00	1,00		
		25	82	83	82	17,67	0,58		
	P2	100	64	62	62	37,33	1,15	EC <sub>20</sub> =76,2 9 (nc-nc); EC <sub>50</sub> >100	Media
		50	80	80	78	20,67	1,15		
		25	81	82	83	18,00	1,00		
	P3	100	82	83	81	18,00	1,00	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	82	83	83	17,33	0,58		
		25	83	83	84	16,67	0,58		
Cagliari	Rinascita	100	4	2	4	96,67	1,15	EC <sub>50</sub> =58.9 7 (54.32- 63.53)	Alta
		50	64	63	63	36,67	0,58		
		25	78	78	76	22,67	1,15		
	Darsena	100	7	3	8	94,00	2,65	EC <sub>50</sub> =61.3 0 (56.24- 66.08)	Alta
		50	69	64	68	33,00	2,65		
		25	82	83	82	17,67	0,58		
	S. Elmo	100	0	0	0	100,00	0,00	EC <sub>50</sub> <40	Molto Alta
		50	0	0	0	100,00	0,00		
		25	0	0	0	100,00	0,00		
La Spezia	MF1	100	80	81	81	19,33	0,58	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	81	83	81	18,33	1,15		
		25	84	84	84	16,00	0,00		
	MF2	100	80	79	80	20,33	0,58	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	81	80	81	19,33	0,58		
		25	82	83	81	18,00	1,00		
	MF3	100	80	78	78	21,33	1,15	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	83	83	82	17,33	0,58		
		25	84	82	81	17,67	1,53		
	MF4	100	6	11	11	91,67	2,89	EC <sub>20</sub> =39,1 5 (nd-nd) EC <sub>50</sub> =55,9 1(nd-nd)	Alta
		50	21	20	21	79,33	0,58		
		25	60	54	54	44,00	3,46		

Validazione del test:

	Parametro	Risultato richiesto	Risultato ottenuto
Controllo negativo (FSW)	% plutei (P4) normoformati	> 80 %	89 %
Controllo Positivo Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *3H <sub>2</sub> O	EC <sub>50</sub> (µg L <sup>-1</sup> )	22,60 - 68,34	29,13 (26.57- 31.28)

### Vibrio fischeri

Tabella 21. Risultati del saggio con batterio bioluminescente V. fischeri

	Campione	Tempo Incubazione	EC <sub>20</sub> (%)	Effetto (%)	Tossicità
Tolone	Lazaret	5'	>90	8,70	Assente
		15'	>90	8,51	
		30'	>90	8,95	
	Tour Royale	5'	>90	10,64	Assente
		15'	>90	10,51	
		30'	>90	10,88	
	Corsica	5'	>90	14,28	Assente
		15'	>90	12,68	
		30'	>90	15,62	
Suffren	5'	>90	19,90	Presente	
	15'	>90	22,05		
	30'	EC <sub>20</sub> = 75,24 (43,42-130,4)	23,87		
Olbia	P1	5'	>90	2,18	Assente
		15'	>90	0,64	
		30'	>90	3,00	
	P2	5'	>90	-8,77	Assente
		15'	>90	-7,15	
		30'	>90	-8,41	
	P3	5'	>90	0,33	Assente
		15'	>90	6,04	
		30'	>90	6,35	
Cagliari	Rinascita	5'	>90	16,40	Assente
		15'	>90	17,09	
		30'	>90	17,19	
	Darsena	5'	EC <sub>20</sub> = 78,80 (44,19-140,5)	23,96	Presente
		15'	EC <sub>20</sub> = 84,56 (50,42-141,8)	22,94	
		30'	EC <sub>20</sub> = 78,36 (55,41-110,8)	24,01	

La Spezia	S. Elmo	5'	EC <sub>20</sub> = 17,15 (14,58-20,17)	36,14	Presente	
		15'	EC <sub>20</sub> = 13,79 (12,13-15,67)	36,63		
		30'	EC <sub>20</sub> = 12,44 (10,92-14,17)	38,03		
	La Spezia	MF1	5'	>90	-4,247	Assente
			15'	>90	-4,169	
			30'	>90	1,791	
		MF2	5'	>90	1,656	Assente
			15'	>90	1,82	
			30'	>90	0,9274	
MF3		5'	>90	-5,34	Assente	
		15'	>90	-6,267		
		30'	>90	-7,199		
MF4		5'	>90	1,643	Assente	
		15'	>90	-5,317		
		30'	>90	-6,143		

I risultati del saggio con l'alga *P. tricornutum* non hanno mostrato alcuna tossicità nei campioni saggiati mentre il saggio di embriotossicità con il riccio di mare *P. lividus* ha evidenziato una elevata tossicità in tutte le stazioni indagate all'interno del porto di Cagliari e per la stazione denominata Corsica Ferries nel porto di Tolone, mentre la stazione P2 (Foce) nel porto di Olbia ha mostrato una tossicità media. I risultati del saggio con *P. lividus* sono in accordo con quanto evidenziato dai risultati ottenuti mediante saggio con il batterio luminescente *V. fischeri*, il quale ha evidenziato la presenza di tossicità nei sedimenti delle stazioni S. Elmo e Darsena Pescherecci all'interno del Porto di Cagliari e per la stazione Suffren nel Porto di Tolone. I restanti campioni saggiati mediante *V. fischeri* sono risultati non tossici.

## 6.2.7. Valutazione della contaminazione dei sedimenti e del rischio ambientale

### 6.2.7.1. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti: Metalli

In questo studio sono stati utilizzati diversi indici per valutare la contaminazione dei sedimenti.

Secondo il Fattore di Contaminazione (FC), il 62% dei campioni ha presentato una contaminazione da bassa a moderata, mentre il 21% dei campioni è stato classificato come altamente contaminato. Per identificare le stazioni più a rischio, è stato calcolato un fattore di contaminazione medio (FC<sub>media</sub>) come valore medio di tutti gli FC presenti in ogni stazione. Di conseguenza, Corsica Ferries (Cu, Hg, Pb e Zn) e Suffren (Cu, Hg, Pb e



Zn) nella rada di Tolone e D. Pescherecci (Cd, Cu, Hg, Pb e Zn) e S. Elmo (Cu, Pb, Zn) a Cagliari sono state identificate come stazioni altamente contaminate.

Invece, in base all'Indice di Geoaccumulazione (Igeo), il 86% dei campioni è stato classificato come praticamente non inquinato o moderatamente inquinato, mentre solo Corsica per il Cu, Hg e Pb, Tour Royale per il Hg, Suffren, per il Hg e il Pb, e D. Pescherecci e S. Elmo per il Pb, sono stati classificati come altamente e fortemente inquinati.

Per permettere un confronto, entrambi gli indici sono stati integrati in un 'sistema comune di qualificazione dei sedimenti' (Tabella 22), utilizzando le equivalenze di Qingjie et al. (2008). Entrambi gli indici hanno classificato i sedimenti nello stesso livello di contaminazione, con l'eccezione del Cu. Secondo questa classificazione, Corsica Ferries è altamente inquinato da Pb e fortemente inquinato da Cu (classificazione FC) e Hg, Suffren è altamente inquinato da Cu (classificazione FC) ed fortemente inquinato da Hg, D. Pescherecci è altamente inquinato da Cu (classificazione FC) ed fortemente inquinato da Pb e S. Elmo è altamente inquinato da Cu (classificazione FC). È stata osservata una discrepanza tra il fattore di contaminazione (FC) e l'indice di geoaccumulo (Igeo), solo per il Cu. Nel caso di Igeo, per il Cu, tutte le stazioni sono state classificate da non contaminate a moderatamente contaminate, mentre con la FC alcune stazioni sono state classificate come altamente o fortemente contaminate.

Tabella 22. Gli indici FC e Igeo integrati in un 'sistema comune di qualificazione dei sedimenti', utilizzando le equivalenze di Qingjie et al. (2008).

	Campione	As	Cd	Cr	Cu FC	Cu Igeo	Hg	Ni	Pb	Zn
Tolone	Lazaret	NI	NI	NI	MI	NI	MI	NI	MI	BI
	Tour Royale	NI	NI	NI	BI	NI	MI	NI	BI	NI
	Corsica	NI	NI	BI	FI	MI	FI	NI	AI	MI
	Suffren	NI	NI	NI	AI	BI	FI	NI	MI	MI
Olbia	P1	NI	NI	NI	MI	NI	NI	NI	BI	BI
	P2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	P3	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cagliari	Rinascita	NI	NI	NI	BI	NI	BI	NI	MI	NI
	Darsena	NI	MI	NI	AI	BI	MI	NI	FI	MI
	S. Elmo	NI	MI	NI	AI	MI	MI	NI	MI	MI
S p e	MF1	NI	NI	BI	MI	NI	BI	MI	MI	MI

	MF2	NI	NI	BI	MI	NI	BI	BI	MI	BI
	MF3	NI	NI	BI	MI	NI	BI	BI	MI	BI
	MF4	NI	NI	BI	MI	NI	BI	BI	MI	BI

NI: Non inquinato; BI: Basso inquinamento; MI: Moderatamente inquinato; AI: Altamente inquinato; FI: Fortemente inquinato

Inoltre, nel caso dei metalli, sulla base della percentuale presente nella frazione scambiabile F1, è stato utilizzato il Codice di Valutazione del Rischio (RAC; Perin et al. 1985) per valutare il rischio ambientale associato alla rimobilizzazione. Sulla base di questo codice, i sedimenti sono stati classificati nel seguente modo: da nessun rischio a basso rischio per Cr (tutte le stazioni), Cu (Molo Fornelli ha presentato un rischio medio), Ni (Foce e S. Elmo hanno presentato un rischio medio) e Pb (MF1 ha presentato un rischio medio), rischio da medio ad alto per Zn (13-45% in F1) e rischio da medio a molto alto per Cd (19-57% in F1).

#### 6.2.7.2. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti: IPA e PCB

Seguendo l'approccio utilizzato per i metalli, gli indici Fattore di Contaminazione (FC) e l'indice di geoaccumulo (Igeo) sono stati calcolati, per i IPA e PCB, utilizzando i valori di fondo per il Mediterraneo forniti da OSPAR (2009). Per permettere un confronto, entrambi gli indici sono stati integrati in un 'sistema comune di qualificazione dei sedimenti' (Tabelle 23 e 24), utilizzando le equivalenze di Qingjie et al. (2008).

Nel caso degli IPA, ci sono solo valori di fondo per 10 singoli IPA. Inoltre, tutti gli IPA di Olbia sono sotto il limite di rilevazione della tecnica analitica, mentre quelli di Cagliari non sono ancora disponibili. Pertanto, sono riportati solo i dati relativi a Tolone e La Spezia (Tabella 23). Si può notare che tutti i sedimenti raccolti nel Molo Fornelli sono stati classificati da non inquinati a moderatamente inquinati. I sedimenti di Lazaret e Corsica Ferries a Tolone, invece, sono fortemente contaminati per la maggior parte degli IPA.

*Tabella 23. Gli indici FC e Igeo integrati in un 'sistema comune di qualificazione dei sedimenti', utilizzando le equivalenze di Qingjie et al. (2008).*

	Tolone			La Spezia			
	Lazaret	Tour Royale	Corsica	MF1	MF2	MF3	MF4
Antracene	AI	MI	FI	MI	MI	MI	MI
Benzo_a_antracene	AI	MI	FI	MI	MI	MI	MI
Benzo_a_pirene	FI	MI	FI	MI	MI	MI	MI
Benzo_g_h_i_perilene	FI	AI	FI	BI	BI	BI	BI
Crisene	FI	MI	FI	NI	BI	NI	BI
Fenantrene	AI	MI		BI	NI	NI	BI
Fluorantene	FI	MI	FI	BI	BI	BI	BI
Indeno_1_2_3_c_d_pirene	FI	AI	FI	MI	MI	MI	MI
Naftalene	BI	NI	MI	NI	NI	NI	NI
Pirene	FI	MI	FI	BI	BI	BI	BI

NI: Non inquinato; BI: Basso inquinamento; MI: Moderatamente inquinato; AI: Altamente inquinato; FI: Fortemente inquinato

Nel caso dei PCB, ci sono solo valori di fondo per 7 congeneri e i risultati di Cagliari non sono ancora disponibili. Pertanto, sono riportati solo i dati relativi a Tolone, Olbia e La Spezia (Tabella 24). Si può notare che tutti i sedimenti di Olbia sono stati classificati come non inquinati. I sedimenti raccolti nel Molo Fornelli sono stati classificati come altamente inquinati per diversi congeneri, come il caso dei sedimenti di Lazaret e Tour Royale a Tolone. Invece i sedimenti di Corsica Ferries sono fortemente inquinati per quasi tutti i PCB.

Tabella 24. Gli indici FC e Igeo integrati in un 'sistema comune di qualificazione dei sedimenti', utilizzando le equivalenze di Qingjie et al. (2008).

	Tolone			Olbia			La Spezia			
	Lazaret	Tour Royale	Corsica	P1	P2	P3	MF1	MF2	MF3	MF4
PCB_28	NI	NI	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
PCB_52	MI	MI	FI	NI	NI	NI	MI	MI	MI	MI
PCB_101	AI	AI	FI	NI	NI	NI	MI	MI	MI	AI
PCB_118	AI	AI	FI	NI	NI	NI	MI	MI	MI	MI
PCB_138	AI	AI	FI	NI	NI	NI	AI	MI	MI	AI
PCB_153	AI	FI	FI	NI	NI	NI	AI	AI	AI	AI
PCB_180	AI	AI	FI	NI	NI	NI	AI	AI	AI	AI

NI: Non inquinato; BI: Basso inquinamento; MI: Moderatamente inquinato; AI: Altamente inquinato; FI: Fortemente inquinato

### **6.2.7.3. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale: livelli soglia (SQG)**

La qualità ambientale dei sedimenti è stata discussa rispetto ai livelli soglia N1 e N2 e ai livelli L1 e L2 definiti dalla legislazione francese e italiana, rispettivamente, per il dragaggio dei sedimenti marini. Questi sono definiti nella legislazione ambientale per un serie di contaminanti. Il confronto delle concentrazioni misurate nei sedimenti con i valori soglia determinerà il possibile effetto che questi sedimenti avranno sull'ambiente e faciliterà il processo per decidere se i sedimenti dragati potranno essere gestiti in mare o sulla terraferma.

Le stazioni che hanno mostrato più metalli sopra L2 sono state Corsica Ferries (5 metalli), Suffren (4 metalli), D. Pescherecci (4 metalli) e S. Elmo (4 metalli). I sedimenti di Lazaret e di Molo Fornelli hanno presentato 1 metallo sopra L2, mentre il resto delle stazioni non ha presentato nessun metallo su questo valore soglia. Invece, quando le concentrazioni di metalli sono state confrontate con N2 della legislazione francese, le stesse stazioni sono state identificate come le più contaminate, ma hanno presentato solo 1 (S. Elmo) o 2 (Corsica Ferries, Suffren e D. Pescherecci) metalli a livello di N2, mentre il resto delle stazioni non ha presentato alcun metallo su questo valore soglia.

Nel caso degli IPA occorre precisare che sono disponibili solo i valori soglia L2 per 13 singoli IPA e per la  $\Sigma 16$  IPA, mentre nel caso di N2 sono disponibili solo i valori per 16 singoli IPA. Quando le concentrazioni di IPA nei sedimenti sono state confrontate con L2, si è osservato che Lazaret (3 IPA e  $\Sigma 16$  IPA), Tour Royale (2 IPA) e Corsica Ferries (10 IPA e  $\Sigma 16$  IPA) presentavano diversi IPA sopra questo valore soglia, mentre nelle altre stazioni di Olbia e La Spezia tutte le concentrazioni erano al di sotto di L2. Gli stessi risultati sono stati osservati per le stazioni di Olbia e La Spezia, nel confronto tra le concentrazioni di IPA con i valori di N2. Tuttavia, in questo caso, solo la stazione Corsica Ferries ha presentato 6 singoli IPA sopra N2.

Nel caso dei PCB, esiste solo L2 per  $\Sigma 13$  PCB, mentre nel caso della legislazione francese esistono valori N2 per 7 singoli PCB. In entrambi i casi Corsica Ferries è stata l'unica stazione a presentare concentrazioni di PCB superiori ai livelli soglia:  $\Sigma 13$  PCB superiori a L2 (più di 3 volte il valore soglia), seguendo la legislazione italiana, e 5 singoli PCB superiori a N2 se si segue la legislazione francese.

### **6.2.7.4. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale: MERMQ e MPELQ**

Per determinare i possibili effetti sugli organismi acquatici sono stati utilizzati due indici, il 'Mean Effects Range Median Quotient' (MERMQ) e il 'Mean Probable Effect Level Quotient' (MPELQ), basati sulle concentrazioni di contaminanti misurate. Questi due indici

sono stati applicati perché si basano sulle 'Sediment Quality Guidelines' (SQG) più utilizzate per la valutazione dei sedimenti, ERM (Long et al. 1995) e PEL (Buchman 2008), che rappresentano le concentrazioni sopra le quali si possono prevedere effetti biologici negativi. Questi indici non si basano su singoli contaminanti, ma integrano tutte le concentrazioni di metalli, IPA e PCB misurate in ogni stazione e forniscono un unico valore per ogni gruppo di inquinanti. Successivamente, questi valori sono stati confrontati con i diversi livelli di rischio dei MERMQ e MPELQ.

Secondo la classificazione stabilita per MERMQ, solo Suffren e D. Pescherecci per i metalli e Corsica Ferries per gli IPA e i PCB avevano un indice compreso tra 0,5 e 1,5, indicando un livello di rischio medio-alto e il 49% di probabilità di essere tossici. Inoltre, Corsica Ferries aveva un indice superiore a 1,5 per i metalli, indicando un livello alto di rischio e il 76% di probabilità di essere tossico. In base alla classificazione stabilita per MPELQ, solo Corsica Ferries aveva un indice compreso tra 1,51 e 2,3 per gli IPA, indicando un livello di rischio medio-alto e il 49% di probabilità di essere tossici, e un indice superiore a 2,3 per i metalli, indicando un livello alto di rischio e il 73% di probabilità di essere tossico (vedi Paches et al. 2019).

#### **6.2.8. Matrice tabulare**

Sulla base della matrice tabulare originale proposta da Chapman (1990) e Chapman et al. (1996) e successivamente modificata da DelValls e Chapman (1998), sono stati raccolti dati sulla contaminazione dei sedimenti e sulla tossicità (Tabella 25). La contaminazione dei sedimenti è stata determinata mediante il confronto con il 'sistema di qualificazione dei sedimenti' (indice chimico) proposto da Qingjie et al. (2008). Inoltre, il potenziale rischio ambientale dei sedimenti è stato valutato in base al confronto con le linee guida sulla qualità dei sedimenti (SQG; L2 e N2) fornite dalle autorità italiane e francesi per la valutazione dei sedimenti dragati e dagli indici ecologici MERMQ e MPELQ. Inoltre, sono stati inclusi i risultati della batteria di saggi biologici (*P. tricornutum*, *V. fischeri* e *P. lividus*) e seguendo l'approccio di Montero et al. (2013), la tossicità globale dei sedimenti è stata derivata in base al punteggio di tossicità (PT; numero di saggi biologici che sono risultati tossici): non tossico (NT;  $PT=0$ ), bassa tossicità (BT;  $0 < PT \leq 1$ ), moderatamente tossico (MT;  $1 < PT \leq 2$ ) e altamente tossico (AT;  $2 < PT \leq 3$ ).

Lazaret e Tour Royale a Tolone, Porto e Controllo ad Olbia, e i sedimenti MF1, MF2 e MF3 a La Spezia sono stati classificati come non tossici (NT), perché nessuno dei saggi biologici ha mostrato tossicità. Corsica Ferries e Suffren a Tolone, Foce ad Olbia, Molo Rinascita a Cagliari e il sedimento MF4 di La Spezia hanno mostrato una bassa tossicità

(BT). Questi sedimenti sono stati tossici per un saggio biologico e quindi hanno ricevuto un punteggio di tossicità (PT) di 1, ad eccezione del sedimento della stazione Foce, che ha mostrato una tossicità media nel saggio del riccio di mare e quindi ha ricevuto un PT=0,5. Il sedimento di D. Pescherecci era moderatamente tossico (MT) in quanto era tossico per i test Microtox e per le larve di riccio di mare (PT=2). Infine, il sedimento di S. Elmo è stato classificato come altamente tossico (AT), dovuto alla tossicità causata nel test Microtox ma anche dall'altissima tossicità mostrata nel test del riccio di mare (è stato dato un PT=1,5 al saggio del riccio di mare, perché era l'unico campione che mostrava una 'tossicità molto alta' invece di una 'tossicità alta').

Tabella 25. Matrice tabulare che racolle dati sulla contaminazione dei sedimenti e sulla tossicità

Station	Indice chimico			SQG						MERMQ			MPELQ			Biotest			Tossicità	
	FI: M	FI: IPA	FI: PCB	M> L2/N2		IPA> L2/N2		PCB> L2/N2		M	IPA	PCB	M	IPA	PCB	A	M	R	PT	Tossicità globale
Lazaret	0	6	0	1	2	3	0	0	0	R- BM	R- BM	RB	R- BM	R- BM	RB	-	-	-	0	NT
Tour Royale	0	0	1	4	0	2	0	0	0	R- BM	RB	R- BM	R- BM	RB	R- BM	-	-	-	0	NT
Corsica	2	9	6	5	0	10	6	ΣPCB	5	RA	R- MA	R- MA	RA	R- MA	R- BM	-	-	+	1	BT
Suffren	1	ND	ND	4	2	ND	ND	ND	ND	R- MA	ND	ND	R- BM	ND	ND	-	+	-	1	BT
Porto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R- BM	RB	RB	R- BM	RB	RB	-	-	-	0	NT
Foce	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RB	RB	RB	RB	RB	RB	-	-	±	0,5	BT
Controllo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RB	RB	RB	RB	RB	RB	-	-	-	0	NT
Rinascita	0	ND	ND	0	0	ND	ND	ND	ND	R- BM	ND	ND	R- BM	ND	ND	-	-	+	1	BT
D. Pescherec ci	1	ND	ND	4	2	ND	ND	ND	ND	R- MA	ND	ND	R- BM	ND	ND	-	+	+	2	MT
S. Elmo	0	ND	ND	4	1	ND	ND	ND	ND	R- BM	ND	ND	R- BM	ND	ND	-	+	±	2,5	AT
MF1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	R- BM	RB	RB	R- BM	RB	RB	-	-	-	0	NT
MF2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	R- BM	RB	RB	R- BM	RB	RB	-	-	-	0	NT
MF3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	R- BM	RB	RB	R- BM	RB	RB	-	-	-	0	NT
MF4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	R- BM	RB	RB	R- BM	RB	RB	-	-	+	1	BT

Indice chimico (Qingjie et al. 2008): fortemente inquinato (FI), metalli (M); SQG (linee guida sulla qualità dei sedimenti): L2 (italiani), N2 (francesi); MERMQ/MPELQ: Rischio Basso (RB), Rischio Basso-Medio (R-BM), Rischio Medio-Alto (R-MA), Rischio Alto (RA); Tossicità globale: non tossico (NT; PT=0),

bassa tossicità (BT;  $0 < PT \leq 1$ ), moderatamente tossico (MT;  $1 < PT \leq 2$ ), altamente tossico (AT;  $2 < PT \leq 3$ ) ; Punteggio di tossicità (PT): numero di saggi biologici che sono risultati tossici; Saggi biologici: algae (A), Microtox (M), riccio di mare (R); ND, Non disponibile.



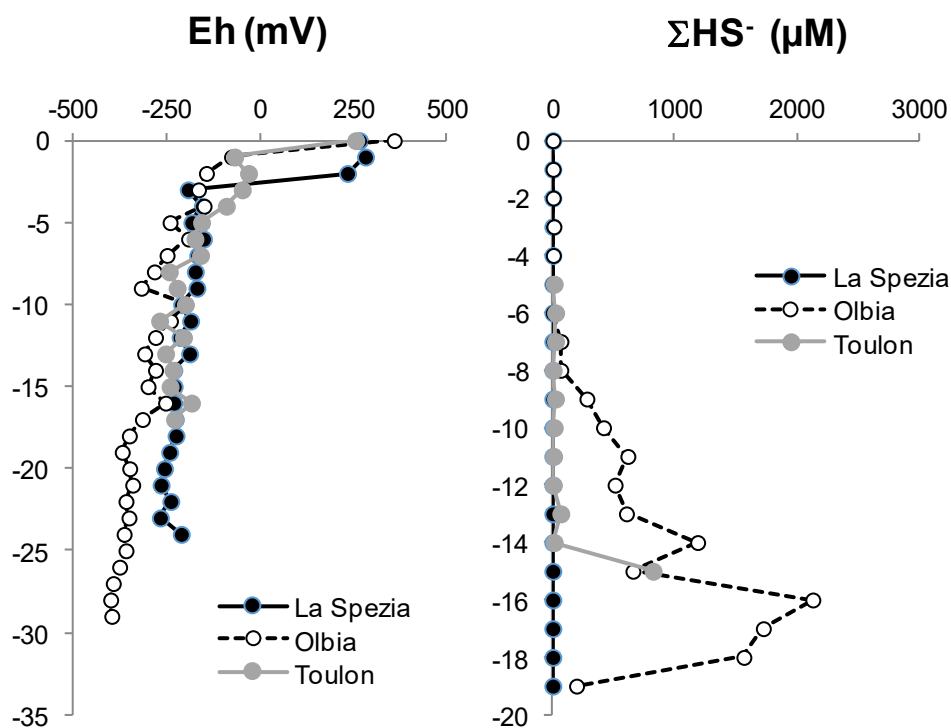
## 6.3. Caraterizzazione delle carote di sedimenti

### 6.3.1. Caraterizzazione verticale ad alta risoluzione

Nei porti di Tolone, La Spezia ed Olbia, UNTL ha prelevato 2 carote di sedimento di circa 30 cm ciascuna, una per misurare il potenziale redox (Eh) e il pH in sedimenti a diverse profondità e l'altra per caratterizzare la sequenza diagenetica e la distribuzione dei contaminanti metallici nelle fasi liquida e solida.

#### 6.3.1.1. Sequenze diagenetiche

In tutti i siti, i marcatori dei primi stadi della diagenesi hanno mostrato profili verticali simili: forte diminuzione di Eh dai primi cm di sedimento rispetto alla colonna d'acqua che indica un ambiente subossico e diminuzione del pH in profondità a causa del consumo di ossigeno e della produzione di CO<sub>2</sub> da parte dei microrganismi che mineralizzano la materia organica (Figura 25). Come risultato della mineralizzazione, l'ammonio viene prodotto rapidamente e si accumula nell'acqua interstiziale. Tuttavia, le concentrazioni di ammonio in profondità a Olbia erano molto più alte che a La Spezia. A causa di un problema di reagenti non è stato possibile determinare le concentrazioni di ammonio a Tolone.



*Figura 25. Profili verticali di potenziale di ossido-riduzione (Eh) e concentrazione di solfuri liberi ( $\Sigma HS^-$ ) in funzione della profondità del sedimento in ciascuno dei porti pilota.*

Una volta esaurito l'ossigeno (di solito dai primi millimetri di sedimento), i microrganismi riducono i nitrati e poi Mn e Fe per la loro respirazione anaerobica. L'intervento di questi metabolismi induce un trasferimento di Fe e/o Mn nell'acqua interstiziale. È nella carota di La Spezia, in superficie, che sono state osservate le più alte concentrazioni di Mn, che diminuiscono rapidamente in profondità. A Olbia e Tolone sono stati osservati leggeri gradienti che dimostrano un bassissimo accumulo di queste sostanze nell'acqua interstiziale. Dopo un prolungato periodo di intensa mineralizzazione microbica, una volta esaurito lo stock di Mn e Fe ossidato, i microrganismi utilizzano i solfati per la loro respirazione (riduzione dei solfati). Questa solfatoriduzione produce solfuri anionici che precipitano con cationi metallici (Fe, Mn e altri) o protoni per formare particelle insolubili. L'intervento di questa solfatoriduzione intrappola poi una parte significativa delle metalli in traccia cationiche nella fase solida. Una volta utilizzati tutti i cationi disponibili, i solfuri ionici si accumulano nell'acqua interstiziale, indicando un significativo stato di avanzamento nella sequenza diagenetica. Solfuri disciolti sono stati rilevati nelle acque interstiziali di Olbia e Tolone, ma non a La Spezia. Questa osservazione è coerente con le minori concentrazioni di Fe e Mn osservate a Tolone e Olbia rispetto a La Spezia, e suggerisce una precipitazione di Fe e Mn con i solfuri prodotti. Tutte queste osservazioni indicano una sequenza diagenetica molto più avanzata a Tolone e Olbia che a La Spezia. Essi suggeriscono un forte impatto del movimento dei sedimenti durante l'operazione di dragaggio effettuata 2 anni prima del campionamento: i sedimenti sono stati riossidati e non hanno ancora trovato, 2 anni dopo, un abituale stato di avanzamento della sequenza diagenetica per una profondità di diverse decine di cm.

### **6.3.1.2. Contenuto di metalli in traccia, fasi del trasporto e mobilità**

L'analisi del contenuto semi-totale di metalli in traccia ha rivelato un'influenza terrigena più marcata (rappresentata dal contenuto di Al, Fe, Li e Rb in particolare) a Olbia e La Spezia che a Tolone. D'altra parte, i sedimenti di Tolone hanno mostrato una maggiore contaminazione metallica di origine antropica, in particolare in Cd, Cu, Hg, Pb, Pb, Sb, Sn e Zn. Qualunque sia l'elemento o il sito considerato, non è stata osservata alcuna particolare tendenza verticale. (Figura 26).

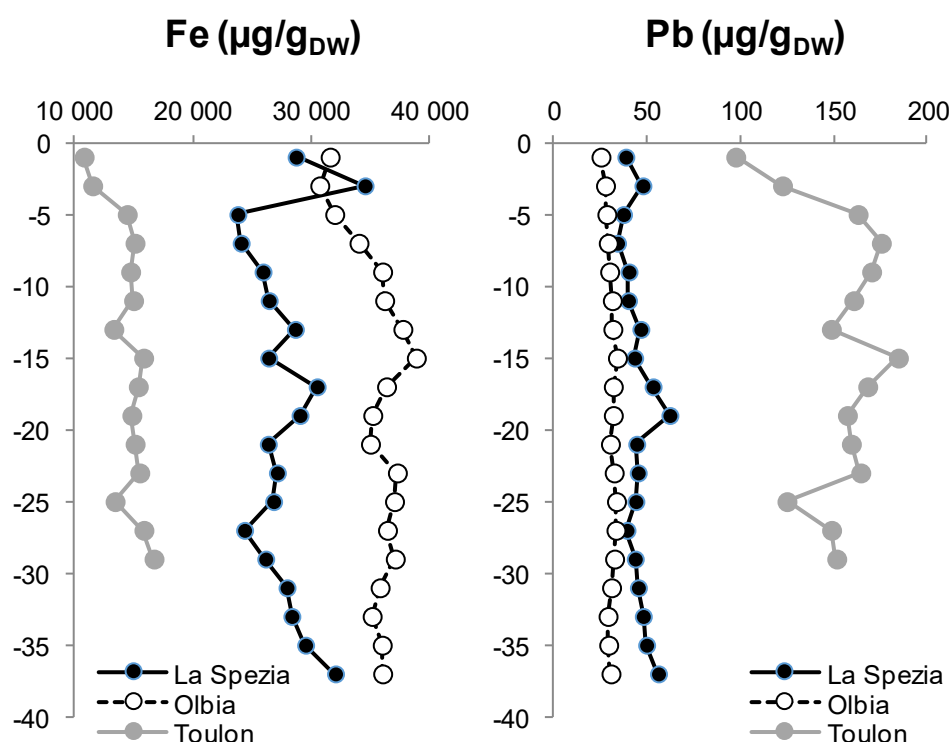


Figura 26. Profili verticali di Fe (tenore sotto l'influenza terrestre attraverso l'erosione dei bacini) e Pb (tenore sotto la forte influenza delle attività umane) nella frazione solida dei sedimenti di ogni porto studiato.

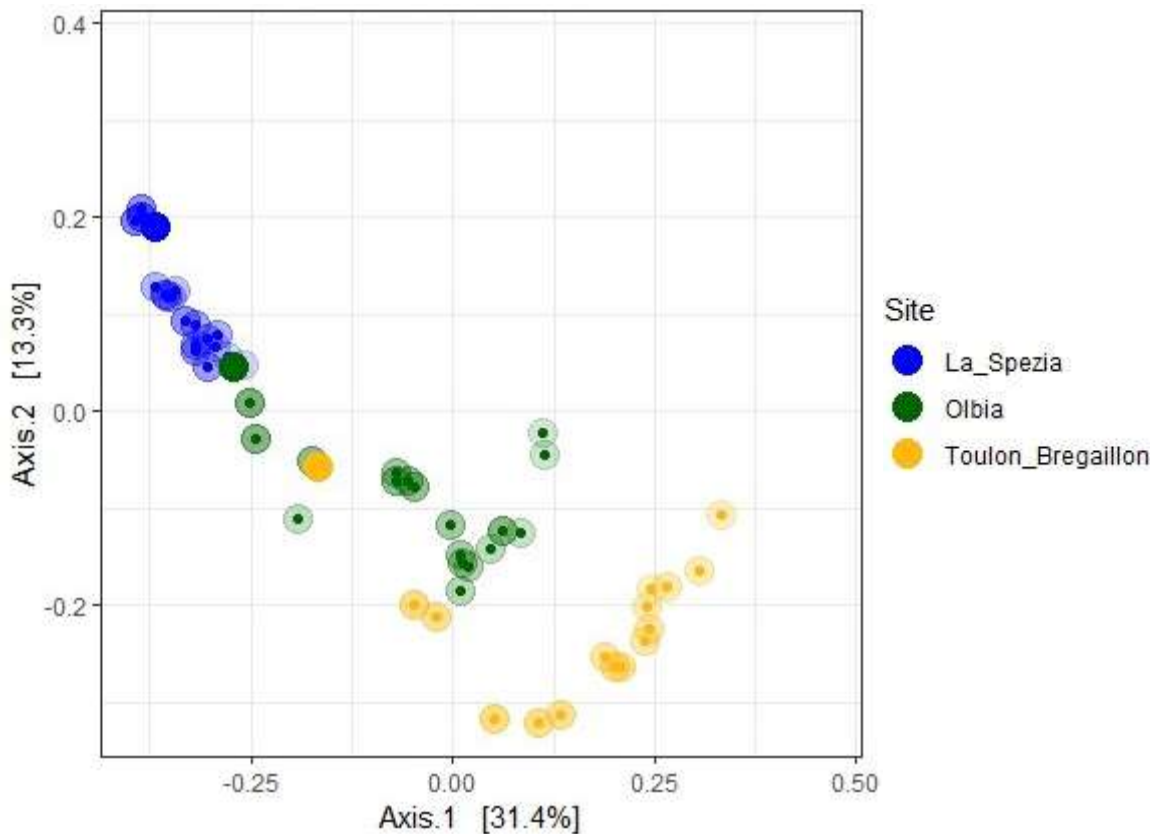
Contaminanti metallici di origine antropica (ad eccezione di Hg, che non è stato incluso nelle estrazioni selettive) erano presenti in concentrazioni più elevate nella frazione di acido cloridrico estraibile in tutti e 3 i siti. La frazione estraibile dell'ascorbato era in minoranza. La frazione di Cd e Cu estraibile in soda era più alta a Olbia che negli altri siti, il che suggerisce una maggiore complessazione con la materia organica. Queste osservazioni non suggeriscono alcuna particolare influenza del movimento dei sedimenti osservato a Molo Fornelli (La Spezia), ma indicano una potenziale influenza dell'apporto di materia organica fresca proveniente dalla mitilicoltura di Olbia.

La mobilità dei metalli in traccia nei sedimenti è rappresentata dal loro trasferimento tra la fase solida e l'acqua interstiziale. Dei 7 contaminanti metallici antropogenici studiati, solo 3 hanno potuto essere misurati nell'acqua interstiziale: Cu, Pb e Zn. Gli altri avevano concentrazioni inferiori ai limiti di quantificazione. La frazione disciolta di questi 3 elementi è stata poi calcolata. Anche in questo caso, non c'è stata una

chiara tendenza verticale per nessuno degli elementi. D'altra parte, il confronto tra i 3 siti ha mostrato una frazione media disciolta più alta a La Spezia rispetto agli altri due siti. Questa osservazione è da mettere in relazione al minore avanzamento della sequenza diagenetica a La Spezia (assenza di accumulo di solfuri liberi nell'acqua interstiziale).

### **6.3.1.3. Profili verticali della diversità microbica nei sedimenti**

La struttura tassonomica di una comunità microbica varia verticalmente nei sedimenti, principalmente in risposta alle variazioni della disponibilità di ossigeno. Nei sedimenti di La Spezia, la struttura della comunità è apparsa estremamente stabile dalla superficie al fondo della carota. La comunità era dominata dai Gammaproteobatteri, un gruppo di opportunisti il cui predominio attesta l'abbondanza di risorse e di condizioni favorevoli al loro degrado. Nelle carote di Olbia e di Tolone i profili verticali variano di più, e molto gradualmente con la profondità. Queste variazioni sono state legate alla diminuzione della proporzione relativa di gamma-proteobatteri a favore di gruppi noti per svilupparsi in condizioni di completa anaerobiosi (ad es. Cloroflexi). Sembrava che le comunità microbiche che vivono sulla superficie dei sedimenti dei 3 porti fossero molto simili tra loro, nonostante fossero distanti diverse centinaia di chilometri l'una dall'altra, mentre differenze molto maggiori potevano essere osservate tra la superficie e il fondo della carota di Tolone o di Olbia (Figura 27). Queste osservazioni della diversità microbica sono molto coerenti con le differenze nella sequenza diagenetica: i sedimenti più ossidati e verticalmente omogenei ospitano una comunità verticalmente omogenea dominata da un gruppo di batteri che si sviluppano fortemente prima dell'instaurarsi di condizioni anaerobiche marcate. Così, lo spostamento dei sedimenti a La Spezia e la conseguente riossidazione dei sedimenti avrebbe disturbato in modo significativo la diversità microbica, un disturbo che è ancora efficace 2 anni dopo il completamento dei lavori portuali. Essendo l'attività dei microrganismi dei sedimenti la causa dell'instaurarsi della sequenza diagenetica, è ipotizzabile attribuire a questo disturbo la maggiore mobilità degli metalli in traccia nei sedimenti di La Spezia rispetto agli altri siti di studio, in quanto l'attività dei microrganismi solfato-riducenti non è ancora sufficiente per intrappolare fortemente questi contaminanti sotto forma di solfuri.



*Figura 27. PCoA che rappresenta l'analisi a distanza Bray-Curtis eseguita a partire dai dati di sequenziamento del DNA. Ogni porta è rappresentata da un colore diverso. I punti corrispondenti alla superficie del sedimento sono opachi. Più il sedimento è stato campionato in profondità, più trasparenti sono i punti corrispondenti sul grafico. Su questo grafico, i punti ravvicinati mostrano un'elevata somiglianza nella diversità microbica. Più i due punti sono distanti l'uno dall'altro, più le loro diversità microbiche sono diverse.*

### **6.3.2. Caratterizzazione spaziale ad alta risoluzione**

La zona oggetto della caratterizzazione spaziale ad alta risoluzione è ubicata tra il Molo Sabaudò e il Molo Rinascita nel Porto di Cagliari e è stato effettuato un carotaggio di spessore 50 cm ad eccezione di alcune aree dove sono stati effettuati dei carotaggi di differente spessore (150-480 cm). I campioni ottenuti dalla miscelazione delle varie aliquote e destinati alle analisi sono risultati 22.

Le tabelle con tutti i valori fisici, chimici ed ecotossicologici misurati non sono state incluse per rendere il documento più dinamico. Tuttavia, i parametri misurati nei 22 campioni di sedimento analizzati sono stati i seguenti:

- Analisi fisiche: granulometria generale (%; ghiaie, sabbie e peliti) e suddivisione della frazione sabbiosa (%)

- Analisi chimiche: metalli ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.; Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V e Zn), IPA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  s.s.; acenaftene, acenaftilene, antracene, benzo(a)antracene, benzo(a)pirene, benzo(b)fluorantene, benzo(ghi)perilene, benzo(k)fluorantene, crisene, dibenzo(a,h)antracene, fluorantene, fluorene, indeno(1,2,3-cd)pirene, naftalene, fenantrene, pirene), PCB ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  s.s.; 28+31, 52, 77, 81, 101, 118, 126, 128, 138, 153, 156, 169, 180), pesticidi ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  s.s.; 2,4'-DDD, 2,4'-DDE, 2,4'-DDT, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, Aldrin, Alfa-HCH, Beta-HCH, Cis-clordano, Dieldrin, Endrin, Gamma-HCH, Eptaclor epossido, Esaclorobenzene, Trans-clordano), organostannici ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.; monobutil stagno, di-n-butilstagno, tributilstagno), sostanza organica (%) e idrocarburi C>12 ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.).

- Analisi ecotossicologiche: saggio biologico con *Corophium orientale* (%; mortalità media corretta con la formula di Abbot), saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum* (densità algale media alla massima concentrazione, tasso di crescita dopo 72 ore di esposizione, e percentuale di EC20 e EC50), saggio biologico con *Crassostrea Gigas* (percentuale di embrioni malformati corretta con la formula di Abbot, EC20 e EC50).

#### **6.3.2.1. Classificazione del pericolo chimico**

L'integrazione ponderata dei dati chimici effettuata mediante il software Sediqualssoft per la definizione della classe di pericolo chimico di ciascun campione si riporta nella tabella 27.

*Tabella 27: Classificazione del pericolo chimico*

Codice_campione	RTR_L1	RTR_L2	L1_max_%_contr_HQc	L2_max_%_contr_HQc	L1_classe	L2_classe
R1/0-50	3,1	0,1	51,3% (Pb)	0% ( )	MEDIO	ASSENTE
R2/0-50	7,8	0,2	24,5% (Benzo(a)pirene)	0% ( )	ALTO	ASSENTE
R2/50-100	15,9	0,2	18,5% (Benzo(a)pirene)	0% ( )	MOLTO ALTO	ASSENTE
R2/100-200	45,4	2,1	15,8% (Somma PCB)	100% (Benzo(a)pirene)	MOLTO ALTO	BASSO
R2/200-400	57,8	6,6	42,8% (Somma PCB)	51% (Somma PCB)	MOLTO ALTO	ALTO
R2/400-480	33,8	0,3	22,1% (Somma PCB)	0% ( )	MOLTO ALTO	ASSENTE
R3/0-50	8,5	0,2	26,7% (Pb)	0% ( )	ALTO	ASSENTE
R3/50-100	21,1	0,3	19% (Benzo(a)pirene)	0% ( )	MOLTO ALTO	ASSENTE
R3/100-200	30,3	8,3	31,5% (Pb)	49,8% (Pb)	MOLTO ALTO	ALTO
R4/0-50	5,2	0,2	41% (Benzo(a)pirene)	0% ( )	MEDIO	ASSENTE
R5/0-50	7,4	0,2	28,2% (Somma DDE)	0% ( )	ALTO	ASSENTE
R6/0-50	10,5	0,2	23,7% (Pb)	0% ( )	ALTO	ASSENTE
R6/50-100	44,1	2,5	17,2% (Benzo(a)pirene)	100% (Benzo(a)pirene)	MOLTO ALTO	BASSO
R6/100-200	6,8	0,2	36,7% (Pb)	0% ( )	ALTO	ASSENTE
R7/0-50	11,6	0,2	19,8% (Benzo(a)pirene)	0% ( )	ALTO	ASSENTE
R8/0-50	26,8	4,9	18% (Pb)	44% (Pb)	MOLTO ALTO	MEDIO
R9/0-50	21,8	5,2	26,8% (Pb)	49,5% (Pb)	MOLTO ALTO	MEDIO

Codice_campione	RTR_L1	RTR_L2	L1_max_%_contr_HQc	L2_max_%_contr_HQc	L1_classe	L2_classe
R10/0-50	31,7	7,1	19,9% (Pb)	38,9% (Pb)	MOLTO ALTO	ALTO
R11/0-50	9,2	0,2	27,2% (Pb)	0% ( )	ALTO	ASSENTE
R12/0-50	47,0	12,2	17,4% (Pb)	29% (Pb)	MOLTO ALTO	ALTO
R12/50-100	45,8	10,2	20,4% (Pb)	39,9% (Pb)	MOLTO ALTO	ALTO
R12/100-150	56,7	12,6	17,2% (Pb)	33,4% (Pb)	MOLTO ALTO	ALTO

### 6.3.2.2. Classificazione del pericolo ecotossicologico

L'integrazione ponderata dei dati ecotossicologici effettuata mediante il software SediquaSoft per la definizione della classe di pericolo ecotossicologico di ciascun campione si riporta nella tabella 28.

Tabella 28: Classificazione del pericolo ecotossicologico

Codice_campione	Specie	HQ_specifico	HQ_batteria	Classe_ecotox
R1/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	1,20		BASSO
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	1,28	
	<i>Crassostrea_gigas</i>	3,44		
R2/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	4,59		ALTO
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	3,03	
	<i>Crassostrea_gigas</i>	6,21		
R2/100-200	<i>Corophium_orientale</i>	3,39		MEDIO
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,54	2,76	
	<i>Crassostrea_gigas</i>	6,21		
R2/200-400	<i>Corophium_orientale</i>	0,09		MEDIO
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,54	1,82	
	<i>Crassostrea_gigas</i>	6,21		
R2/400-480	<i>Corophium_orientale</i>	3,00		MEDIO
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,54	2,65	
	<i>Crassostrea_gigas</i>	6,21		
R2/50-100	<i>Corophium_orientale</i>	0,81		MEDIO
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,54	2,03	
	<i>Crassostrea_gigas</i>	6,21		
R3/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	1,59		ASSENTE
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	0,77	
	<i>Crassostrea_gigas</i>	0,95		
R3/100-200	<i>Corophium_orientale</i>	3,00		BASSO
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	1,45	
	<i>Crassostrea_gigas</i>	2,26		
R3/50-100	<i>Corophium_orientale</i>	2,19		MEDIO
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	1,56	
	<i>Crassostrea_gigas</i>	3,44		
R4/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	1,41		BASSO
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	1,29	



Codice_campione	Specie	HQ_specifico	HQ_batteria	Classe_ecotox
	<i>Crassostrea_gigas</i>	3,29		
R5/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	0,15		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	0,00	0,66	ASSENTE
	<i>Crassostrea_gigas</i>	3,14		
R6/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	1,20		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	1,08	BASSO
	<i>Crassostrea_gigas</i>	2,77		
R6/100-200	<i>Corophium_orientale</i>	4,20		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	0,00	1,14	BASSO
	<i>Crassostrea_gigas</i>	1,24		
R6/50-100	<i>Corophium_orientale</i>	0,15		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	0,79	ASSENTE
	<i>Crassostrea_gigas</i>	2,49		
R7/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	1,80		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	1,26	BASSO
	<i>Crassostrea_gigas</i>	2,77		
R8/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	3,39		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	0,00	1,24	BASSO
	<i>Crassostrea_gigas</i>	2,41		
R9/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	0,12		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	0,00	0,54	ASSENTE
	<i>Crassostrea_gigas</i>	2,56		
R10/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	4,59		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	1,80	MEDIO
	<i>Crassostrea_gigas</i>	1,90		
R11/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	3,00		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	1,35	BASSO
	<i>Crassostrea_gigas</i>	1,90		
R12/0-50	<i>Corophium_orientale</i>	0,15		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	1,29	0,76	ASSENTE
	<i>Crassostrea_gigas</i>	2,34		
R12/100-150	<i>Corophium_orientale</i>	3,00		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	0,00	1,23	BASSO
	<i>Crassostrea_gigas</i>	2,77		
R12/50-100	<i>Corophium_orientale</i>	2,79		
	<i>Phaeodactylum_tricornutum</i>	0,00	1,03	BASSO
	<i>Crassostrea_gigas</i>	2,26		

### 6.3.2.3. Classi di qualità dei sedimenti

Nella Tabella 29 si riporta l'integrazione della classificazione chimica e della classificazione ecotossicologica con la definizione della classe di qualità dei sedimenti.

Tabella 29: Integrazione della classificazione chimica e della classificazione ecotossicologica

Campione	Classificazione ecotossicologica	Classificazione chimica	Classe qualità
R1/0-50	BASSO	$HQc(L1) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Basso}$	B
R2/0-50	ALTO	$HQc(L2) \leq \text{Basso}$	D
R2/50-100	MEDIO	$HQc(L2) \leq \text{Basso}$	C
R2/100-200	MEDIO	$HQc(L2) \leq \text{Basso}$	C
R2/200-400	MEDIO	$HQc(L2) \geq \text{Medio}$	D
R2/400-480	MEDIO	$HQc(L2) \leq \text{Basso}$	C
R3/0-50	ASSENTE	$HQc(L2) \leq \text{Trascurabile}$	A
R3/50-100	MEDIO	$HQc(L2) \leq \text{Basso}$	C
R3/100-200	BASSO	$HQc(L2) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Alto}$	C
R4/0-50	BASSO	$HQc(L1) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Basso}$	B
R5/0-50	ASSENTE	$HQc(L2) \leq \text{Trascurabile}$	A
R6/0-50	BASSO	$HQc(L1) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Basso}$	B
R6/50-100	ASSENTE	$HQc(L2) \geq \text{Basso}$ e $HQc(L2) \leq \text{Medio}$	B
R6/100-200	BASSO	$HQc(L1) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Basso}$	B
R7/0-50	BASSO	$HQc(L1) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Basso}$	B
R8/0-50	BASSO	$HQc(L2) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Alto}$	C
R9/0-50	ASSENTE	$HQc(L2) \geq \text{Basso}$ e $HQc(L2) \leq \text{Medio}$	B
R10/0-50	MEDIO	$HQc(L2) \geq \text{Medio}$	D
R11/0-50	BASSO	$HQc(L1) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Basso}$	B
R12/0-50	ASSENTE	$HQc(L2) = \text{Alto}$	C
R12/50-100	BASSO	$HQc(L2) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Alto}$	C
R12/100-150	BASSO	$HQc(L2) \geq \text{Medio}$ e $HQc(L2) \leq \text{Alto}$	C

## 7. Discussione

### 7.1. Caratterizzazione della colonna d'acqua

#### 7.1.1. Campionamento passivo

##### 7.1.1.1. DGT: metalli

L'intervallo delle concentrazioni di metallo misurate con i DGT in ogni area di studio è stato riportato nella Tabella 30. Queste concentrazioni rientrano nell'intervallo di valori riportati da altri studi che hanno utilizzato i DGT nel Mediterraneo. L'unica eccezione è stata la concentrazione di Ni a La Spezia ( $4868 \text{ ng L}^{-1}$ ), superiore ai valori riportati nel Mediterraneo. Tuttavia, concentrazioni di Ni simili sono state misurate nei fiumi (Roig et al. 2011;  $5260 \text{ ng L}^{-1}$ ), negli estuari in Spagna (Montero et al. 2012;  $3650 \text{ ng L}^{-1}$ ) e nei fiumi in Ucraina (Vystavna et al. 2012;  $4850 \text{ ng L}^{-1}$ ).

Anche se Cagliari ha presentato la concentrazione più alta di Cd, valori molto simili sono stati misurati in tutte le aree di studio. Inoltre, le concentrazioni di Cd determinati in tutti i porti sono state sostanzialmente simili ai valori soglia ( $\text{DGT}_{\text{Cd}}$ :  $5,1 \text{ ng L}^{-1}$ ) calcolati da Marras et al. (2020) per il Mediterraneo, basati su concentrazioni misurate con i DGT in aree costiere relativamente indisturbate. Pertanto, il Cd non sembra essere un metallo problematico in nessuno dei porti studiati.

Il resto dei metalli presentava concentrazioni molto superiori ai valori calcolati da Marras et al. (2020), ma variava da un porto all'altro. Nel caso del Cu, sono state misurate concentrazioni molto elevate, soprattutto a La Spezia. In precedenza sono state segnalate elevate concentrazioni di DGT-Cu associate ai porti (Montero et al. 2012; Costa e Wallner-Kersanach 2013) e questi valori sono stati spiegati dal dilavamento del Cu dalle vernici antifouling utilizzate sugli scafi delle imbarcazioni (Daehne et al. 2017). La Spezia ha presentato anche la più alta concentrazione di Ni rispetto a tutte le aree studiate. Il traffico marittimo è stato precedentemente identificato come fonte di emissione di nichel nei sistemi acquatici (Becagli et al. 2011; Tornero e Hanke 2016). La Spezia è uno dei più importanti scali mercantili del Mediterraneo, pertanto il potenziale apporto di Ni dal traffico marittimo dovrebbe essere ulteriormente valutato. Per il Pb, le concentrazioni più alte sono state misurate a Cagliari. Il Pb è un metallo associato alle attività portuali, il che spiega la distribuzione maggiormente omogenea in tutte le stazioni di questa zona. L'alta

concentrazione di Pb misurata in M. Rinascita nel mese di giugno, potrebbe essere spiegata da un'attività specifica a questa zona in quel periodo dell'anno, come l'aumento del traffico marittimo.

*Tabella 30: Range di concentrazioni dei metalli misurati con i DGT (in ng L<sup>-1</sup>) nelle aree di studio e confronto con i dati riportati in letteratura.*

	<b>Cd</b>	<b>Cu</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	
<b>Tolone</b>	1,8-12,0	219-733	177-252	104-299	<b>Questo studio</b>
<b>La Spezia</b>	5,6-13,4	<b>829-3387</b>	<b>357-4868</b>	58-571	<b>Questo studio</b>
<b>Olbia</b>	3,1-8,9	116-528	182-825	24,3-64,7	<b>Questo studio</b>
<b>Cagliari</b>	<b>6,1-18,3</b>	131-377	178-805	<b>85-704</b>	<b>Questo studio</b>
<b>Mare Egeo</b>	5,4-9,2	51-280	-	-	<b>Scoullou et al. (2006)</b>
<b>Mediterraneo nord-occidentale</b>	6-16	-	197-1380	38-75	<b>Lafabrie et al. (2007)</b>
<b>Mediterraneo occidentale</b>	1-35	5-80	33-120	4-147	<b>Schintu et al. (2008)</b>
<b>Mediterraneo occidentale</b>	90-600	1450-2230		820-3130	<b>Schintu et al. (2010)</b>
<b>Mare Egeo</b>	6,4-9,8	64-311	-	-	<b>Sakellari et al. (2013)</b>
<b>Mediterraneo occidentale</b>	-	1060-12550	-	-	<b>Caro et al. (2015)</b>
<b>Mare Adriatico</b>	7,4-94	122-278	262-293	27-47	<b>Cindric et al. (2017)</b>
<b>Mediterraneo nord-occidentale</b>	7	60	188	-	<b>Baeyens et al. (2018)</b>
<b>Mare Tirreno</b>	2,8-10	33-330	48-263	1-8,3	<b>Schintu et al. (2018)</b>
<b>Mediterraneo occidentale</b>	0,5-24	40-876	91-525	14,5-81	<b>Marras et al. (2020)</b>

Se guardiamo ad ogni porto separatamente, a Tolone si è osservata una diminuzione delle concentrazioni di Cu, Ni e Pb dalla stazione interna (Corsica Ferries) alla parte esterna (Lazaret) della Petite Rade, seguendo un gradiente, come osservato da Clotet et al. (2018, 2019) nello studio della concentrazione di metalli disciolti nell'acqua superficiale della rada di Tolone. Inoltre, non c'era un chiaro gradiente di concentrazione per il Cd, che è in accordo con le osservazioni di Clotet et al. (2018).

I precedenti risultati con i DGT (2013-2017) nella rada di Tolone (vedi SEDRIPO T.2.4.7), hanno indicato concentrazioni di Pb nelle stazioni vicino a Corsica Ferries (media 300 ng L<sup>-1</sup>) e Lazaret (media 160 ng L<sup>-1</sup>) che sono simili alle concentrazioni

DGT misurate in questo studio (104-299 ng L<sup>-1</sup>). Non ci sono precedenti concentrazioni di DGT per gli altri metalli nella rada di Tolone, pertanto le concentrazioni di metallo disciolto misurate nell'acqua superficiale della baia (Clotet et al. 2018; SEDRIPORT T2.4.7.) saranno utilizzate per interpretare i risultati ottenuti con i DGT. Questi studi hanno riportato concentrazioni medie di Cu disciolto di 592 ng L<sup>-1</sup> e 974 ng L<sup>-1</sup> e di Cd disciolto di 11 ng L<sup>-1</sup> e 14 ng L<sup>-1</sup> nelle stazioni situate vicino a Lazaret e Corsica Ferries, rispettivamente. Considerando che i DGT misurano solo la frazione labile dei metalli, quindi le concentrazioni DGT saranno inferiori alle concentrazioni disciolte, i valori DGT riportati in questo studio (Cu 219-733 ng L<sup>-1</sup>; Cd 1,8-12,0 ng L<sup>-1</sup>) sembrano rappresentare adeguatamente la concentrazione del metallo presente nella Baia di Tolone. In inverno sono state misurate concentrazioni più elevate rispetto all'estate, probabilmente spiegate dall'aumento dell'apporto di metalli provenienti dalle acque di scolo urbane. Le eccezioni sono state le maggiori concentrazioni di Ni e Pb misurate ad agosto presso Corsica Ferries, che potrebbero essere legate alla risospensione dei sedimenti associata ad un aumento del traffico marittimo in quel periodo dell'anno (Tessier et al. 2011; Dang et al. 2015).

Per quanto riguarda La Spezia, le concentrazioni di Cu, Ni e Pb erano molto più alte dei valori soglia forniti da Marras et al. (2020). Gnecco et al. (2019) hanno riportato concentrazioni di Cu e Pb di 20 µg L<sup>-1</sup> nella frazione disciolta, e di 30 µg L<sup>-1</sup> e 200 µg L<sup>-1</sup> nella frazione di particolato nell'acqua prelevata a La Spezia. In questo studio sono state misurate, con i DGT, concentrazioni più basse di Cu (0,8-3,4 µg L<sup>-1</sup>) e Pb (0,06-0,6 µg L<sup>-1</sup>), perché questi metalli sono di solito associati alla materia organica e alle particelle, rispettivamente, riducendo la loro labilità, e quindi, non essendo accumulati in quantità elevate dai DGTs (Allan et al. 2008; Belzunce et al. 2012). La differenza osservata tra le concentrazioni di Pb e Cu misurate dai DGT, che erano di un ordine di grandezza inferiore, potrebbe essere spiegata quindi con la ridotta labilità dei metalli associati alle particelle, mentre una parte del Cu presente nei leganti organici sarà misurata dai DGT a seconda della capacità di dissociazione del legante (Zhang and Davison 1995). Le concentrazioni più alte di questi metalli sono state misurate a Cadimare, che si trova in prossimità dell'arsenale militare. In passato quest'area era utilizzata come cantiere navale per la costruzione di navi militari e riceve alcuni scarichi di natura sia industriale che civile, come gli scarichi fognari del Canale Lagora, collettore della parte settentrionale del centro città

(ICRAM 2005). Considerando che a marzo sono state misurate concentrazioni più elevate di Cu e Pb, i metalli potrebbero avere un'origine nei diversi scarichi che arrivano in questa stazione o che sia dovuto ad un aumento dell'attività del porto turistico presente in questa stazione (Cu dalle vernici antifouling e Pb dalle fuoriuscite di olio dalle piccole imbarcazioni). Per quanto riguarda il Ni, sono state precedentemente misurate alte concentrazioni di questo metallo in sedimenti della rada di La Spezia (ARPAL 2005), quindi l'alta concentrazione di Ni misurata in M. Garibaldi, in novembre, potrebbe essere spiegata da un processo di risospensione dai sedimenti. Questa osservazione è supportata dall'aumento di Ni a novembre in tutte le stazioni (concentrazione di Ni 3-13 volte superiore a quella di marzo), che potrebbe essere dovuto ai processi idrodinamici che avranno influenzato l'intera rada di La Spezia (ad. es. tempeste, aumento della portata dell'acqua). Inoltre, il Ni si trova solitamente in forma labile nell'acqua di mare e pertanto misurabile dai DGT (Belzunce et al. 2012), e questo spiegherebbe gli alti livelli misurati.

Nel Golfo di Olbia, Marras et al. (2020) hanno misurato concentrazioni di metalli DGT nell'intervallo 7,4-24 ng L<sup>-1</sup>, 176-876 ng L<sup>-1</sup>, 153-321 ng L<sup>-1</sup> e 13,2-71 ng L<sup>-1</sup> per il Cd, Cu, Ni e Pb, rispettivamente, che sono simili alle concentrazioni misurate in questo studio (Cd 3,1-8,9 ng L<sup>-1</sup>; Cu 116-528 ng L<sup>-1</sup>; Ni 182-825 ng L<sup>-1</sup>; Pb 24,3-64,7 ng L<sup>-1</sup>). Sono state misurate concentrazioni più elevate in estate che in inverno, per tutti i metalli studiati. Considerando che questa zona non è caratterizzata da una grande varietà di fonti contaminanti, la maggiore concentrazione osservata in estate potrebbe essere spiegata dai cambiamenti che subisce questo corpo idrico in questa stagione, dovuta all'aumento del traffico marittimo. Questo è ulteriormente supportato dal fatto che le concentrazioni più alte sono state misurate nella stazione di Porto, che si trova in prossimità alla zona di manovre delle navi che attraccano sulle banchine del porto. Inoltre, la concentrazione di Cu misurata dai DGT, è stata tre volte superiore in tutte le stazioni in estate. L'effetto del traffico marittimo sull'aumento della concentrazione di Cu misurata dai DGT, soprattutto nei porti, è stato osservato anche da altri autori (Montero et al. 2012; Wallner-Kersanach et al. 2013).

A Cagliari, Marras et al. (2020) hanno misurato coi DGT concentrazioni di metalli (Cd 5,3-5,6 ng L<sup>-1</sup>; Cu 40-43 ng L<sup>-1</sup>; Ni 165-246 ng L<sup>-1</sup>; Pb 20-23 ng L<sup>-1</sup>) molto inferiori a quelle riportate in questo studio. Tuttavia, in quello studio i DGT sono stati installati in un'area molto più aperta del golfo e non all'interno del porto, come in questo caso.

Le concentrazioni relativamente elevate di Cd e Cu misurate in D. Pescherecci, potrebbero essere spiegate dall'apporto di questi metalli dal porto nuovo, soprattutto nel caso del Cu, o dall'apporto dei fiumi Flumini Mannu e Cixerri, la cui foce è vicina a questa stazione di campionamento. Invece, le più alte concentrazioni di Ni e Pb sono state misurate a M. Rinascita nel mese di giugno. Questa stazione si trova in prossimità delle banchine di attracco delle navi da crociera, la cui frequenza aumenta in estate, quindi non può essere scartata l'ipotesi dell'influenza del traffico marittimo nell'aumento delle concentrazioni dei metalli misurate in questa stazione. Inoltre, in generale, le concentrazioni dei metalli sono state più elevate nei mesi di giugno e settembre in tutte le stazioni esaminate, periodi che sono noti avere un maggiore traffico marittimo nel porto di Cagliari.

#### **7.1.1.2. SR: composti non polari**

I range delle concentrazioni di  $\Sigma 18$  IPA,  $\Sigma 31$  PCB,  $\Sigma 6$  Fraganze e Irgarol misurati con i SR in ogni area di studio sono stati riportati nella Tabella 31. Le più alte concentrazioni di IPA, PCB e Irgarol sono state riscontrate a La Spezia, mentre Cagliari ha presentato la più alta concentrazione di fraganze.

Non ci sono dati precedenti ottenuti con SR nelle aree studiate. Pertanto, i risultati sono stati confrontati con i valori misurati da altri autori con SR in acque costiere. In generale, nelle zone costiere con SR sono state rilevate concentrazioni di IPA e PCB inferiori a quelle misurate nel presente studio: ad. es. Schaanning et al. (2011) hanno misurato concentrazioni di  $\Sigma 16$  IPA e  $\Sigma 7$  PCB nell'intervallo 2,3-13,6 ng L<sup>-1</sup> e <0,01-0,20 ng L<sup>-1</sup> nell'interno di Oslofjord in Norvegia; Emelogu et al. (2013) concentrazioni di  $\Sigma 16$  IPA e  $\Sigma 32$  PCB nell'intervallo 20,4-26,1 ng L<sup>-1</sup> e 0,19-0,30 ng L<sup>-1</sup> nell'estuario di Forth e Firth of Forth in Scozia; Apostolopoulou et al. (2014) concentrazioni di  $\Sigma 21$  IPA nel range di 55,1-61,5 ng L<sup>-1</sup> nel Golfo di Alexandroupolis nel Mare Egeo nord-orientale. Tuttavia, altri studi che sono stati effettuati in porti soggetti ad attività antropiche, simili alle nostre aree di studio, hanno mostrato concentrazioni di IPA e PCB nel range dei livelli misurati in questo studio o superiori: ad. es. Monteyne et al. (2013) hanno misurato concentrazioni di  $\Sigma 15$  IPA e  $\Sigma 14$  PCB nel range 3,9-170 ng L<sup>-1</sup> e 0,03-3,1 ng L<sup>-1</sup>, rispettivamente, in tre porti costieri belgi; Evaraert et al. (2016) concentrazioni di 6,5 ng L<sup>-1</sup> di  $\Sigma 7$  PCB nella costa belga.

Esiste un numero limitato di studi che si occupano della misurazione di fragance e irgarol per mezzo di SR: Herrera-Pintado et al. (2016) hanno misurato 1800 ng L<sup>-1</sup> e 1,4 ng L<sup>-1</sup> di Σ4 Fragance e irgarol, rispettivamente, nel fiume Alna in Norvegia; Bayen et al. (2019) Σ4 Fragance nell'intervallo 0,11-3,25 ng L<sup>-1</sup> in sei mangrovie a Singapour. Va evidenziato che da gennaio 2017 l'uso di Irgarol in Europa è vietato e non può più essere utilizzato come principio attivo nei prodotti antivegetativi (Decisione UE 2016/107 del 27 gennaio 2016).

*Tabella 31. Range delle concentrazioni di Σ18 IPA, Σ31 PCB, Σ6 Fraganze e Irgarol (ng L<sup>-1</sup>) misurati con i SR in ogni area di studio*

	<b>Σ18 IPA</b>	<b>Σ31 PCB</b>	<b>Σ6 Fraganze</b>	<b>Irgarol</b>
<b>Tolone</b>	4,7-21,3	0,46-1,55	3,5-7,8	2,8-3,7
<b>La Spezia</b>	<b>26,8-122,8</b>	<b>0,29-2,53</b>	38,5-105,7	<b>9,2-59,8</b>
<b>Olbia</b>	8,2-14,6	0,043-0,14	9,3-61,4	10,2-23,3
<b>Cagliari</b>	9,1-26,3	0,26-1,57	<b>28,1-375,0</b>	3,0-7,6

A Tolone, come osservato per i metalli, c'è stata una diminuzione verso l'esterno delle concentrazioni di ΣIPA, ΣPCB e ΣFragance nei mesi di febbraio e agosto. Così, Corsica Ferries, situata nella parte interna del porto, ha presentato le concentrazioni più alte e Lazaret, posizionata nella parte esterna della Petite Rade, le più basse. Inoltre, come per i metalli, a febbraio sono state misurate concentrazioni più elevate dei tre gruppi di composti rispetto ad agosto, che potrebbe essere spiegato dal maggior apporto di acque di scolo urbane ed industriali o dalla potenziale perturbazione dei sedimenti causata da forti condizioni idrodinamiche associate alle tempeste.

A La Spezia, come osservato per i metalli, le più alte concentrazioni di ΣPCB, ΣFragance e irgarol sono state misurate a Cadimare, sia a novembre che a marzo. Invece, Molo Garibaldi ha presentato la più alta concentrazione di ΣIPA in entrambe le stagioni. In tutte le stazioni le concentrazioni di IPA erano più elevate a marzo, mentre le concentrazioni delle fragranze e di irgarol erano più elevate a novembre.

A Olbia, come osservato per i metalli, a giugno sono state misurate nella stazione Porto le più alte concentrazioni di ΣIPA, ΣPCB, ΣFragances e Irgarol e si è osservata una diminuzione delle concentrazioni verso l'esterno per tutti i composti. D'altra



parte, a febbraio, le concentrazioni più alte di tutti questi composti sono state misurate nella stazione Foce, mentre Porto ha mostrato le concentrazioni più basse. Inoltre, le concentrazioni più alte di IPA, fragance e irgarol sono state misurate in inverno e soprattutto in Foce e Controllo, invece che a Porto. Nel caso di IPA e fragance, il ruolo del fiume Padrongianus, che arriva vicino alla stazione Foce, come potenziale fonte di questi contaminanti nel Golfo di Olbia non può essere scartato (vedasi Marras et al. 2020). Per l'irgarol, utilizzato come antifouling, l'aumento di concentrazione osservato a febbraio in Foce e Controllo, che si trovava ai livelli riscontrati a Porto nel mese di giugno, potrebbe essere il risultato del trasporto di questo inquinante dall'interno del porto verso queste stazioni a causa dell'aumento del flusso. La concentrazione dei PCB misurata ad Olbia era bassa, tuttavia, contrariamente a quello osservato per gli IPA, le concentrazioni più alte sono state misurate in estate.

A Cagliari, come osservato per i metalli, le più alte concentrazioni di  $\Sigma$ IPA e  $\Sigma$ PCB sono state rilevate a Molo Rinascita e Darsena Pescherecci, che presentano la più alta pressione dovuta al traffico marittimo (porto di pesca e navi da crociera). D'altra parte, S. Elmo, che si trova nel porto turistico e riceve l'acqua dal Canale Palma, ha presentato le più alte concentrazioni di  $\Sigma$ Fragance e di irgarol.

Alcune osservazioni comuni sono state riscontrate in tutti i porti. Il profilo degli IPA è stato, in generale, dominato da IPA con 2-4 anelli (naftalene, fluorene, fenantrene, acenaftalene e fluorantene), ad eccezione della seconda campagna a Tolone (agosto 2019) e Cagliari (giugno 2018), dove si è vista una marcata presenza di IPA a 4 e 5 anelli (fluorantene, pirene e benzo(b)fluorantene). Mentre gli IPA leggeri sono di solito di origine petrogenica, gli IPA pesanti sono generalmente associati a sorgenti pirolitiche. Possibili fonti di IPA leggeri nell'area di studio sono gli scarichi di rifiuti urbani e industriali e gli scarichi di acque di sentina dalle navi. Considerando che il naftalene si degrada facilmente nell'ambiente marino, la presenza di questo IPA come predominante nella prima campagna di La Spezia (novembre 2017) e Olbia (giugno 2018) potrebbe indicare un input petrogenico recente o continuo (Emelogu et al. 2013).

D'altra parte, gli apporti pirolitici potrebbero essere il risultato dei fumi di scarico delle navi e di altre attività di combustione (Emelogu et al. 2013). Quest'ultima

osservazione è in accordo con la predominanza degli IPA con 4-5 anelli (fluorantene, pirene e benzo(bj)fluorantene) a Tolone e a Cagliari nei mesi estivi, quando c'è un aumento del traffico marittimo. Di conseguenza, gli IPA con 4-5 anelli rappresentavano il 32% (Lazaret)-42% (Corsica Ferries) del totale delle concentrazioni IPA a Tolone in agosto e il 38% (Molo Rinascita)-40% (D. Pescherecci) a Cagliari in giugno.

I valori di PCB misurati nei porti d'indagine sono stati bassi, questo dovuto alla loro bassa solubilità nell'acqua. Nel caso dei PCB, con piccole variazioni tra i porti, i congeneri predominanti sono stati CB153, CB149, CB101 e CB110. A La Spezia, tuttavia, va segnalata la presenza di congeneri di PCB più leggeri (CB18, CB95, CB52 e CB44), come anche a Cagliari per il CB52. Piccole variazioni nella composizione dei congeneri all'interno dei porti, dovute al risultato di equilibri locali, stabiliti da un movimento d'acqua abbastanza lento e che riflettono i contributi delle fonti locali, sono state segnalate precedentemente (Roach et al. 2009; Monteyne et al. 2013). La predominanza dei PCB meno clorurati può essere dovuta alla deposizione di PCB di origine atmosferica, allo scolo urbano e allo scarico di rifiuti urbani e industriali, mentre, la predominanza di PCB pesanti, più clorurati, suggeriscono un ingresso vicino alla sorgente dovuto alla rimobilizzazione dei sedimenti e del particolato (Emelogu et al. 2013).

Le concentrazioni misurate di fragranze erano piuttosto elevate se confrontate con gli IPA e i PCB. Questo può essere spiegato dall'utilizzo diffuso di prodotti per la cura della persona, come le fragranze, e dal rilascio continuo nell'ambiente acquatico principalmente attraverso le acque reflue trattate e non trattate, nonché le attività ricreative (Pintado-Herrera et al. 2016). In tutti i porti le fragranze predominanti erano galaxolide e OTNE, che rappresentavano, a seconda del porto, il 86-96% della concentrazione totale di fragranze misurate. L'unica eccezione è stata Molo Garibaldi in agosto, dove le fragranze predominanti sono state Galaxolide (48%), Cashmeran (29%) e OTNE (21%). La presenza in grande quantità di galaxolide e OTNE, che dominano la concentrazione totale delle fragranze misurate, è stata osservata da altri autori e spiegata dall'ampio utilizzo di questi composti in Europa e per l'input continuo nell'ambiente (Pintado-Herrera et al. 2016).

### 7.1.1.3. POCIS: composti polari

I risultati dei POCIS ottenuti nei diversi porti d'indagine sono riportati nella Tabella 32. Nella tabella sono inclusi  $\Sigma$ ED, che corrispondono alla somma di tutti gli alchilfenoli, steroidi e bisfenolo A misurati, e i valori di  $\Sigma$ 7 Alchilfenoli,  $\Sigma$ 6 Steroidi e Bisfenolo A (BPA) separatamente. Inoltre, sono state incluse le informazioni relative all'E1, steroide presente in maggiore concentrazione nei porti studiati.

Le più alte concentrazioni di steroidi e BPA sono state riscontrate a La Spezia, mentre Cagliari ha presentato le più alte concentrazioni di alchilfenoli e di  $\Sigma$ ED. Si può notare che, ad eccezione del caso di La Spezia, che presentava concentrazioni relativamente elevate di steroidi ( $\Sigma$ 6 Steroidi 57-71 ng/POCIS) e BPA (63-118 ng/POCIS), le concentrazioni più elevate in tutti i porti corrispondevano ad alchilfenoli, e in particolare a Cagliari (5-203 ng/POCIS). L'uso di alchilfenoli è molto diffuso, perchè sono utilizzati per produrre ritardanti di fiamma, tensioattivi per uso domestico, formulazioni di pesticidi e prodotti industriali, per cui è normale ritrovarli nelle acque che arrivano al porto attraverso gli scarichi urbani e industriali (Liscio et al. 2009). In questo senso, le concentrazioni più elevate di alchilfenoli sono state misurate a Darsena Pescherecci e S. Elmo a Cagliari, che si trovano rispettivamente alla foce dei fiumi Flumini Mannu e Cixerri e alla foce del Canale Palma. Le concentrazioni relativamente elevate di BPA e di steroidi che si trovano a La Spezia indicano una fonte domestica, in quanto il BPA è usato nei contenitori per la conservazione degli alimenti e gli steroidi derivano principalmente dai residui fisiologici umani.

Non ci sono dati precedenti ottenuti con POCIS nelle aree studiate. Pertanto, i risultati sono stati confrontati con i valori misurati da altri autori. Liscio et al. (2009) hanno misurato concentrazioni più elevate, nell'intervallo 72-218 ng/POCIS, 83-3180 ng/POCIS e 9-70 ng/POCIS per nonilfenolo (incluso all'interno di  $\Sigma$ 7 Alchilfenoli in questo studio), BPA ed E1, rispettivamente, ma quei valori sono stati misurati a all'ingresso e all'uscita di un impianto di trattamento delle acque reflue a Genova (Italia). Invece, Munaron et al. (2012) hanno misurato concentrazioni di nonilfenolo e BPA nell'intervallo 5,8-78,6 ng/POCIS e <LOD-30 ng/POCIS, rispettivamente, nelle acque costiere del Mediterraneo francese (dal confine italiano al spagnolo), che erano più simili a quelle misurate in questo studio. Sulla stessa linea, Miège et al. (2012) hanno misurato livelli di E1 (3-32 ng/POCIS), simili a quelli osservati in questo

studio, in un fiume in Francia, prima e dopo l'impianto di trattamento delle acque reflue.

Tabella 32. Range di interferenti endocrini (ng/POCIS) misurati con i POCIS nei porti studiati.

	<b>ΣED</b>	<b>Σ7 Alchilfenoli</b>	<b>Σ6 Steroidi</b>	<b>E1</b>	<b>BPA</b>
<b>Tolone</b>	8,4-36,0	3,5-27,3	4,9-5,5	4-9-5,5	<LOD-4,6
<b>La Spezia</b>	18,5-201,3	4,9-26,4	<b>57,3-70,8</b>	<b>6,0-19,1</b>	<b>62,9-117,6</b>
<b>Olbia</b>	15,5-21,6	9,5-15,2	6,0-9,3	6,0-6,4	<LOD
<b>Cagliari</b>	<b>4,7-202,7</b>	<b>&lt;LOD-186</b>	4,7-11,7	4,7-11,7	<LOD-10,7

Recentemente, alcuni studi hanno proposto di accoppiare il campionamento passivo con i saggi biologici, esponendo gli organismi del biotest alle miscele di contaminanti estratte con il campionamento passivo (ad esempio Pesce et al. 2011; Booij et al. 2013; Claessens et al. 2015; Pickford et al. 2015). Questo approccio può contribuire alle procedure di valutazione del rischio, fornendo carichi di inquinanti ambientali che permettono di vedere risposte ecotossicologiche significative (Schintu et al. 2018).

In questo senso, la potenziale tossicità degli estratti dei POCIS esposti nei diversi porti è stata testata con il saggio biologico delle larve di riccio. È interessante discutere i risultati ottenuti con i campioni di Cagliari, visto che abbiamo quattro campagne di campionamento consecutive effettuate durante l'anno (aprile, settembre, ottobre e dicembre 2018 e gennaio 2019). È stato osservato uno spostamento della tossicità dalla primavera all'autunno-inverno. In aprile tutte le stazioni sono risultate altamente tossiche con il biotest di ricci di mare, mentre in ottobre solo Molo Rinascita e S. Elmo sono stati classificati come tossici. Poi c'è stato un cambiamento e in dicembre e gennaio solo Darsena Pescherecci è risultata tossica per il biotest. Molo Rinascita si trova in prossimità delle banchine di attracco delle navi da crociera e S. Elmo nel porto turistico e quindi soggetti ad un aumento del traffico marittimo nei mesi primaverili ed estivi. D. Pescherecci è invece nelle vicinanze della foce dei fiumi Flumini Mannu e Cixerri e pertanto più esposto alle alluvioni d'acqua di origine urbano, che avvengono specialmente in autunno-inverno, e che possono portare inquinanti. Questo potrebbe spiegare la stagionalità della tossicità osservata. Considerate le concentrazioni dei contaminanti misurate negli

estratti POCIS, la tossicità potrebbe essere spiegata dagli alchilfenoli, che sono conosciuti come composti che causano tossicità ai primi stadi di vita degli organismi marini (vedi Tato et al. 2018). Tuttavia, deve essere considerato l'effetto potenziale causato da altri contaminanti che non sono stati analizzati nel presente studio e che richiedono ulteriori ricerche. Pertanto, siamo ancora in attesa di ulteriori analisi che contribuiscano a interpretare meglio i risultati ottenuti.

## **7.1.2. Mussel Watch**

### **7.1.2.1. Bioaccumulo metalli, IPA e PCB**

I livelli di bioaccumulo dei metalli, IPA e PCB, in generale, non hanno seguito un chiaro gradiente in ogni area studiata. Questo rende difficile l'interpretazione dei dati ottenuti dai mitili.

Mentre concentrazioni simili di As, Cd e Ni sono state trovate a La Spezia (As 7-18 mg kg<sup>-1</sup>, Cd 0,6-0,7 mg kg<sup>-1</sup>, Ni 2,4-2,9 mg kg<sup>-1</sup>) e Olbia (As 16-20 mg kg<sup>-1</sup>, Cd 0,3-0,6 mg kg<sup>-1</sup>, Ni 0,7-2,8 mg kg<sup>-1</sup>), La Spezia ha presentato concentrazioni più elevate di Cr (3,3-6,3 mg kg<sup>-1</sup>), Cu (7,5-12,7 mg kg<sup>-1</sup>) e Pb (5,6-6,4 mg kg<sup>-1</sup>) e Olbia di Zn (83-327 mg kg<sup>-1</sup>). Le concentrazioni di metalli erano nell'intervallo dei livelli trovati in altri studi nel Mediterraneo, svolti in aree caratterizzate da diverse attività antropiche: Schintu et al. et al. (2008) nel Mediterraneo occidentale (Cd 0,2-2,8 mg kg<sup>-1</sup>, Cu 3,5-17 mg kg<sup>-1</sup>, Ni 2-15 mg kg<sup>-1</sup>, Pb 2-18 mg kg<sup>-1</sup>), Fernández et al. (2010) lungo la costa mediterranea spagnola (As 13-83 mg kg<sup>-1</sup>, Cd 0,3-1,7 mg kg<sup>-1</sup>, Cu 6-11 mg kg<sup>-1</sup>, Pb 2-58 mg kg<sup>-1</sup>, Zn 91-431 mg kg<sup>-1</sup>), Stanković et al. (2011) nell'Adriatico sudorientale (As 0,4-24,8 mg kg<sup>-1</sup>, Cd 0,2-3,5 mg kg<sup>-1</sup>, Cu 0,6-17 mg kg<sup>-1</sup>, Pb 0,2-15,8 mg kg<sup>-1</sup>, Zn 10-4,33 mg kg<sup>-1</sup>) e Spada et al. (2013) nella costa pugliese nell'Adriatico (As 6-76 mg kg<sup>-1</sup>, Cd 0,4-2,5 mg kg<sup>-1</sup>, Cr 1,0-9,5 mg kg<sup>-1</sup>, Cu 5-19 mg kg<sup>-1</sup>, Ni 1-15 mg kg<sup>-1</sup>, Pb 0,4-3,3 mg kg<sup>-1</sup>).

A La Spezia le concentrazioni  $\Sigma 16\text{IPA}$  e  $\Sigma 12\text{PCB}$  erano comprese nell'intervallo 148-173  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 14,0-22,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , rispettivamente, con la predominanza del crisene, fenantrene e pirene tra gli IPA e dei CB101, CB138 e CB 153 tra i PCB. A Olbia, le concentrazioni di IPA ( $\Sigma 16\text{IPA}$  7,4-8,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e PCB ( $\Sigma 12\text{PCB}$  10,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) erano a livello dei mitili di riferimento. Come osservato a La Spezia, i congeneri predominanti a Olbia sono stati CB101, CB138 e CB153, ma la loro concentrazione è stata la metà di quella trovata a La Spezia. Questi PCB congeneri sono comuni negli

ambienti marini a causa del loro utilizzo prolungato in molti paesi europei nelle miscele chimiche Aroclor 1254 e 1260 (vedasi Olenycz et al. 2015).

Per quanto riguarda i composti organici, Fernández et al. (2010) hanno misurato le concentrazioni  $\Sigma 16\text{IPA}$  ( $180\text{-}246 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) simili a quelle osservate a La Spezia, nei mitili raccolti nei porti (Barcellona, Tarragona e Algeciras), mentre le concentrazioni misurate a Olbia corrisponderanno a quelle trovate nelle riserve marine protette. Sulla stessa linea, Galgani et al. (2010) hanno valutato le concentrazioni di IPA lungo le coste del bacino occidentale del Mar Mediterraneo (Spagna, Francia, Italia, Tunisia settentrionale, Algeria e Marocco) con mitili trapiantati e hanno trovato livelli di  $\Sigma 16\text{IPA}$  nell'intervallo  $22\text{-}106 \mu\text{g kg}^{-1}$ , dove i valori più alti corrispondevano alle aree soggette a contaminazione. Olenycz et al. (2015) hanno anche riportato concentrazioni di IPA ( $\Sigma 16\text{IPA}$   $95\text{-}224 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) nel Mar Mediterraneo simili a quelle misurate nel presente studio. D'altra parte, Fernández et al. (2010) hanno misurato concentrazioni molto più elevate di PCB ( $\Sigma 9\text{PCB}$   $7\text{-}254 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) lungo la costa mediterranea spagnola e le concentrazioni riscontrate a La Spezia e Olbia corrisponderanno ad aree marine relativamente indisturbate. Inoltre, Scarpato et al. (2010) hanno evidenziato che nei mitili trapiantati lungo tutto il bacino del Mediterraneo occidentale (Italia, Francia, Spagna, Marocco, Algeria e Tunisia), il contributo maggiore all'accumulo totale dei PCB è stato dato dai congeneri CB138 e CB153, come è stato osservato in questo studio. Scarpato et al. (2010) hanno riportato livelli più alti di CB153 e CB 138 (La Spezia: CB153  $4,5\text{-}8,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ , CB138  $2,1\text{-}5,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; Olbia: CB153  $1,6\text{-}4,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ , CB138  $0,8\text{-}2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) lungo la costa italiana e in Sardegna (Napoli: CB153  $28,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ , CB138  $19,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; Bagnoli: CB153  $16,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ , CB138  $12,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; La Maddalena: PCB 153  $26,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; PCB 138:  $12,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Secondo il criterio dell'Agenzia Europea dell'Ambiente, adattato da Scarpato et al. (2010), in base alle concentrazioni dei PCB, i mitili di Olbia rientrerebbero nella classe bassa di contaminazione ( $\Sigma \text{PCB} < 15 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), mentre quelle di La Spezia rientrerebbero nella classe moderata ( $\Sigma \text{PCB}$   $15\text{-}150 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

### **7.1.3. Campionamento passivo vs Mussel Watch**

I risultati ottenuti per i metalli, IPA e PCB con il campionamento passivo e mitili sono stati confrontati nel tentativo di valutare la qualità ambientale della colonna d'acqua. Come osservato da diversi autori, il campionamento passivo e i mitili hanno fornito informazioni diverse, cosa che rende difficile il confronto delle tecniche (ad esempio

Schintu et al. 2008; Harman et al. 2009; Kim et al. 2016). Va tenuto presente che le concentrazioni di contaminanti misurate nei mitili rappresentano l'esposizione all'acqua e alle particelle, mentre i campionatori passivi misurano la concentrazione liberamente disciolta. In generale, la stessa tendenza è stata osservata tra le due tecniche, il che ha permesso di valutare i diversi processi che si producono in ciascuna delle aree di studio. Pertanto, le informazioni ottenute con entrambe le tecniche potrebbero essere integrate, consentendo di ottenere informazioni diverse e complementari sulla qualità dell'acqua.

Per quanto riguarda i mitili, in diversi casi i mitili di riferimento ( $Ref_M$ ) presentavano concentrazioni di contaminanti superiori ai valori misurati nei mitili trapiantati per un mese, complicando l'interpretazione dei risultati. Questo sottolinea la necessità di trovare mitili che provengano da posti relativamente puliti con il fine di utilizzarli per la valutazione ambientale dei corpi idrici. Inoltre, l'aumento del tempo di esposizione consentirebbe una maggiore concentrazione dei contaminanti nei tessuti e quindi aumenterebbe la sensibilità della tecnica. Pertanto, negli studi futuri, si prenderà in considerazione la possibilità di allungare il tempo di esposizione e di organizzare il campionamento in periodi che non siano di elevata attività riproduttiva, per raggiungere concentrazioni più elevate dei contaminanti nei tessuti e ridurre l'effetto dei parametri biologici sulle concentrazioni misurate (evitare la diluizione per aumento dei lipidi nel tessuto gonadico).

## **7.2. Caratterizzazione dei sedimenti superficiali**

### **7.2.1. Caratterizzazione fisico-chimica dei sedimenti**

Nel porto di Tolone sono stati trovati alti livelli di peliti nelle stazioni interne (Corsica Ferries e Suffren >90%), che si spiega probabilmente con la ridotta corrente in quella parte della baia e la sedimentazione di particelle fini. Di conseguenza, la percentuale di peliti trovata nella stazione Tour Royale (52%), che è una stazione intermedia, è quasi la metà di quella trovata nelle stazioni di Suffren e Corsica Ferries. Sorprendentemente, Lazaret ha presentato un'alta percentuale di sedimenti fini (84%), anche se si trova nella parte più esterna della Petite Rade, che corrisponde anche ad un relativamente alto livello di carbonio organico totale (TOC  $10,2 \text{ g kg}^{-1}$ ). Ciò potrebbe essere spiegato da particolari fenomeni di correnti in quella parte della

baia o da un aumento dell'apporto di particelle fini in quell'area specifica (ad esempio, l'apporto dei siti di acquacoltura).

Nel porto di Olbia è stato osservato un gradiente dalla stazione interna verso l'imboccatura della baia, evidenziando la transizione da un'area di deposito di materiale fine (St. Porto; ghiaie 5%, sabbie 52%, peliti 43%) alla stazione più esterna che presenta più caratteristiche marine, con una predominanza di sabbie e ghiaie (St. Controllo; ghiaie 13%, sabbie 82%, peliti 5%). Questo stesso gradiente è stato visto nella quantità di TOC (Porto, 4,6 g kg<sup>-1</sup>; Foce 1,8 g kg<sup>-1</sup>; Controllo 0,9 g kg<sup>-1</sup>).

Per quanto riguarda il Porto di Cagliari, il contenuto di ghiaie in tutte le stazioni è pari allo 0%. Inoltre, il contenuto di peliti nelle stazioni di D. Pescherecchi (82%) e S. Elmo (94%) è stato superiore all'80%, indicando che si tratta di aree di deposito di sedimenti. Inoltre, queste due stazioni hanno presentato alti livelli di TOC, in particolare la stazione di S. Elmo (14,7 g kg<sup>-1</sup>), che ha presentato il livello di TOC più alto di tutte le stazioni studiate.

I quattro campioni di sedimenti prelevati nel Porto di La Spezia, a Molo Fornelli, presentavano un contenuto di peliti più basso (70%) rispetto a quello osservato nelle stazioni interne del porto di Tolone (92-95%) e Cagliari (82-94%).

### **7.2.2. Concentrazioni totali di metalli nei sedimenti**

Gli intervalli di concentrazione dei metalli trovati in questo studio sono simili a quelli misurati da Montero et al. (2013) nei porti situati nel nord della Spagna (Vigo, Bilbao e Pasajes): Cd 0,12-3,0 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 16,3-751 mg kg<sup>-1</sup>; Hg 0,08-1,9 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 51,7-279 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 80-1252 mg kg<sup>-1</sup>) e da Mamindy-Pajany et al. (2013) nella marina dell'Estaque in Marseille (As 165-221 mg kg<sup>-1</sup>; Cd 0,3 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 278 mg kg<sup>-1</sup>; Ni 20 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 329-396 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 375-538 mg kg<sup>-1</sup>), ma superiori a quelli misurati da Smuc et al. (2018) nei sedimenti (As 1,2-5,0 mg kg<sup>-1</sup>; Cd 0,1-0,4 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 17,6-37,8 mg kg<sup>-1</sup>; Ni 61,3-109,4 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 10,7-30,2 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 54-99 mg kg<sup>-1</sup>) del Porto di Koper (Adriatico settentrionale) e da Martínez-Guijarro et al. (2019) nei porti spagnoli del Mediterraneo (As 2,0-51 mg kg<sup>-1</sup>; Cd 0,08-0,23 mg kg<sup>-1</sup>; Cr 2,8-23,6 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 1,2-12 mg kg<sup>-1</sup>; Hg 0,01-0,34 mg kg<sup>-1</sup>; Ni 1,8-21,6 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 2,3-11,4 mg kg<sup>-1</sup> e Zn 47,7-462 mg kg<sup>-1</sup>).

Considerando separatamente ogni area di studio, le concentrazioni dei metalli ritrovate nella rada di Tolone (As 5,6-39,2 mg kg<sup>-1</sup>; Cd 0,013-0,19 mg kg<sup>-1</sup>; Cr 13,6-



52,2 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 20,2-463 mg kg<sup>-1</sup>; Hg 0,7-9,9 mg kg<sup>-1</sup>; Ni 10,3-25,5 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 25,0-195 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 58,6-415 mg kg<sup>-1</sup>) sono in accordo con i risultati trovati da Tessier et al. (2011), dove sono stati raccolti 55 campioni di sedimenti superficiali (As 6,7-61 mg kg<sup>-1</sup>; Cd 0,05-2,9 mg kg<sup>-1</sup>; Cr 8,5-121 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 5,8-846 mg kg<sup>-1</sup>; Hg 0,03-27,3 mg kg<sup>-1</sup>; Ni 8,8-37,6 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 14,9-469 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 24,3-1340 mg kg<sup>-1</sup>) che ricoprono tutta la baia. È importante evidenziare l'elevata concentrazione di Hg misurata a Suffren (2,1 mg kg<sup>-1</sup>), e soprattutto a Corsica Ferries (9,9 mg kg<sup>-1</sup>), situate all'interno della Petite Rade. Questi risultati sono in accordo con le elevate concentrazioni di Hg (fino a 27 mg kg<sup>-1</sup>) rilevate da Tessier et al. (2011) nei sedimenti della Petite Rade. La relativamente alta concentrazione di Cu trovata in Corsica Ferries, che è la più alta di tutte le aree studiate, potrebbe essere spiegata dalle attività che si svolgono nelle vicinanze di quella stazione.

Le stazioni di Olbia hanno presentato le più basse concentrazioni di metalli (As 4,6-6,0 mg kg<sup>-1</sup>; Cd 0,03-0,08 mg kg<sup>-1</sup>; Cr 9,1-17,4 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 6,0-27 mg kg<sup>-1</sup>; Hg 0,02-0,06 mg kg<sup>-1</sup>; Ni 5,1-10,4 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 10,3-21,7 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 47,7-119 mg kg<sup>-1</sup>) di tutte le aree studiate, che sono nei range di concentrazioni misurati da Schintu et al. (1991) nei sedimenti del Golfo di Olbia (Cd 0,2-10,5 mg kg<sup>-1</sup>; Cr 3-27 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 2-38 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 0,5-56 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 14-153 mg kg<sup>-1</sup>). Come osservato da Schintu et al. (1991), i livelli di metalli diminuiscono verso l'esterno, dalla stazione Porto verso il Controllo, indicando un contributo antropogenico nella parte interna dell'area di studio.

Per quanto riguarda le concentrazioni dei metalli misurate a Cagliari (As 5,5-19,4 mg kg<sup>-1</sup>; Cd 0,4-2,2 mg kg<sup>-1</sup>; Cr 15,2-32,6 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 20,9-142 mg kg<sup>-1</sup>; Hg 0,2-0,6 mg kg<sup>-1</sup>; Ni 7,7-21,1 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 62-305 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 94-462 mg kg<sup>-1</sup>), sono nel range di quelle misurate da Schintu et al. (2016) nei sedimenti del porto storico di Cagliari (As 6,0-18,9 mg kg<sup>-1</sup>; Cd 0,07-6,4 mg kg<sup>-1</sup>; Cr 9,9-30 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 6,1-61,6 mg kg<sup>-1</sup>; Hg 0,09-0,8 mg kg<sup>-1</sup>; Ni 5,3-14,1 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 22,3-456 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 29-807 mg kg<sup>-1</sup>). Molo Rinascita ha mostrato le più basse concentrazioni di metalli, che si spiega con il livello più basso di peliti in questa stazione rispetto a D. Pescherecci e S. Elmo. Come osservato in questo studio, Schintu et al. (2016) hanno anche evidenziato la presenza di elevate concentrazioni di Cd, Pb e Zn nelle stazioni situate all'interno del porto di Cagliari e hanno concluso che potrebbero essere correlate alle diverse

attività antropiche che colpiscono quest'area, come il traffico marittimo commerciale, i dragaggi, gli scarichi di acque reflue e l'inquinamento industriale.

Le concentrazioni dei metalli misurate nei sedimenti raccolti a Molo Fornelli nel porto di La Spezia (As 8,5-11,4 mg kg<sup>-1</sup>; Cd 0,2-0,3 mg kg<sup>-1</sup>; Cr 55-57 mg kg<sup>-1</sup>; Cu 32-41 mg kg<sup>-1</sup>; Hg 0,14-0,18 mg kg<sup>-1</sup>; Ni 39-54 mg kg<sup>-1</sup>; Pb 40-49 mg kg<sup>-1</sup>; Zn 158-202 mg kg<sup>-1</sup>) sono in accordo con le concentrazioni misurate da ARPAL (2005) e ICRAM (2005) nei sedimenti (As <45 mg kg<sup>-1</sup>; Cd <1 mg kg<sup>-1</sup>; Cr <90 mg kg<sup>-1</sup>; Cu <65 mg kg<sup>-1</sup>; Hg <0,8 mg kg<sup>-1</sup>; Ni <80 mg kg<sup>-1</sup>; Pb <130 mg kg<sup>-1</sup>; Zn <230 mg kg<sup>-1</sup>). Nella rada di La Spezia la contaminazione è diffusa prevalentemente lungo tutta la fascia costiera, a causa delle attività commerciali, industriali e canteristiche e diversi scarichi, mentre l'area più interna, come Molo Fornelli, appare meno contaminata (ICRAM 2005).

Nel presente studio è stata determinata la frazione scambiabile (F1) nei sedimenti raccolti a Olbia, Cagliari e La Spezia, per determinare la loro biodisponibilità e la potenziale tossicità. Come osservato da Schintu et al. (2016) nei sedimenti raccolti nel Golfo di Cagliari, nel presente studio il Cd (18-57%) era principalmente legato alla frazione scambiabile F1. Questo è stato riscontrato anche, in percentuale minore, per lo Zn. Tiquio et al. (2017) hanno osservato, nei sedimenti raccolti nella Baia di Golfe-Juan nel Mediterraneo nord-occidentale, che il Cd e lo Zn hanno la più alta mobilità tra i metalli studiati. La frazione F1 comprende metalli debolmente adsorbiti sulla superficie delle particelle tramite interazioni elettrostatiche relativamente deboli. Pertanto, i cambiamenti nella composizione ionica, che influenzano le reazioni di adsorbimento-desorbimento potrebbero causare la rimobilizzazione di questi metalli da questa frazione (Rao et al. 2008). Nel caso del Cr, Schintu et al. (2016) hanno osservato che la maggior parte del metallo (51%) era presente nella frazione residua, mentre solo una piccola frazione del metallo era presente nella F1. Ciò è in accordo con la bassa percentuale (0-2%) di Cr misurata in F1 in questo studio. Il resto dei metalli ha mostrato una situazione intermedia, poichè i metalli nei sedimenti sono legati a diverse frazioni con diversa intensità, in base ai parametri chimico-fisici dei sedimenti e alle caratteristiche specifiche dei metalli (Jain et al. 2004). Ad esempio, il Cu si trova solitamente complessato con la materia organica (F3), mentre il Pb è per lo più legato agli idrossidi di Fe e Mn (F2).

Pertanto questi metalli presentano una frazione più piccola, rispetto al Cd e allo Zn, associata a F1 (Jain et al. 2004; Schintu et al. 2016; Mondal et al. 2020).

### **7.2.3. Concentrazioni di IPA nei sedimenti**

Gli intervalli di concentrazioni degli IPA trovati in questo studio ( $\Sigma 16$  IPA,  $<LD-19800 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), coincidono con quelli misurati da altri autori nel Mediterraneo: Baumard et al. (1998) in Port Vendres (France) ( $145-6900 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), Salvo et al. (2005) nel Porto di Genoa-Voltri ( $4500-20800 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e Cannarsa et al. (2014) nella costa di Liguria, tra Recco e Sestri Levante ( $1100-17000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

A Tolone, il range di concentrazione  $\Sigma 16$  IPA misurato in questo studio è stato  $1200-19800 \mu\text{g kg}^{-1}$ , che è in accordo con le osservazioni di Wafo et al. (2017), che hanno misurato concentrazioni di  $\Sigma 16$  IPA nell'intervallo  $300-34100 \mu\text{g kg}^{-1}$  in sedimenti raccolti lungo tutta la rada di Tolone. La più alta concentrazione di IPA è stata misurata alla stazione Corsica Ferries ( $19800 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), che si spiega con la presenza di numerose attività antropiche nella parte interna della baia e con l'affinità degli inquinanti organici per i materiali fini ( $<63 \mu\text{m}$ ) che sono presenti in larga misura in quella stazione (peliti, 92%) (Wafo et al. 2017). Come osservato per i metalli, Lazaret ha presentato concentrazioni di IPA più alte rispetto a quelle misurate in Tour Royale, che è più vicino alla parte interna del porto. Ciò si spiega probabilmente con il modello di studio delle correnti in quella zona della Petite Rade e con l'aumento dei processi di sedimentazione (peliti: Lazaret 84%, Tour Royale 52%) in Lazaret (Wafo et al. 2017). Tra gli IPA misurati, in tutte le stazioni c'è stata una predominanza di IPA di elevato peso molecolare (4-6 anelli aromatici; FI, Py, BbF, IP e BghiP), rivelando una tipica impronta pirogenica, che indica la presenza di fonti urbane e industriali (Legorburu et al. 2014).

Nei sedimenti raccolti ad Olbia, le concentrazioni di tutti i singoli IPA erano inferiori al limite di rilevazione della tecnica analitica. Ciò è in accordo con le basse concentrazioni di IPA ( $160-770 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) misurate da De Luca et al. (2005) nella parte interna del porto di Olbia, dove molte stazioni di campionamento mostravano livelli di IPA inferiori al limite di rilevazione.

A La Spezia, i quattro sedimenti raccolti a Molo Fornelli hanno mostrato più o meno le stesse concentrazioni di IPA, con valori di  $\Sigma 16$  IPA nel range  $400-500 \mu\text{g kg}^{-1}$ , che corrispondono ai valori misurati da ARPAL (2005).

#### **7.2.4. Concentrazioni di PCB nei sedimenti**

Gli intervalli di concentrazioni dei PCB misurati in questo studio ( $\Sigma 13$  PCB, 0,4-261  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) sono nell'intervallo di concentrazioni misurate da altri autori nel Mediterraneo: Galanopoulou et al. (2005) in sedimenti del porto di Keratsini in Grecia (48-352  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), Sprovieri et al. (2007) nei sedimenti superficiali del porto di Napoli ( $\Sigma 38$  PCB, 1-899  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), Renzi et al. (2009) nei sedimenti raccolti in dieci porti dell'Italia meridionale (Arochlor 1260, 0,1-58,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), Salem et al. (2013) nei sedimenti della costa mediterranea egiziana ( $\Sigma 10$  PCB, 7-75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

A Tolone, la  $\Sigma 13$  PCB è stata di circa 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  a Lazaret e nella stazione Tour Royale, mentre la concentrazione è stata dieci volte maggiore a Corsica Ferries (261  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Wafo et al. (2016) hanno osservato concentrazioni di PCB più elevate ( $\Sigma 9$  PCB, 1,8-1869  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nei sedimenti raccolti nella rada di Tolone, nella parte interna della Petite Rade. A parte questi valori elevati, Wafo et al. (2016) hanno riportato concentrazioni di PCB superiori a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in zone di attività portuale (ad esempio Corsica Ferries), mentre concentrazioni di PCB nell'intervallo 34-74  $\mu\text{g kg}^{-1}$  sono state riportate a Lazaret, che è in accordo con i risultati osservati in questo studio.

Per quanto riguarda Olbia, la concentrazione di  $\Sigma 13$  PCB è stata la più bassa tra tutte le aree di studio, in linea con i risultati osservati dalla Regione Autonoma della Sardegna (2017), dove la concentrazione di tutti i PCB studiati (13 congeneri) nei sedimenti di Olbia è risultata inferiore al limite di rilevazione.

La sommatoria media dei PCB trovati a La Spezia è stata di 16  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , che corrisponde con i valori (valore medio  $\Sigma$ PCB, 22,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) misurati da ARPAL (2005).

Sia a Tolone che ad Olbia, i congeneri che hanno dominato la composizione dei PCB sono stati CB 101, CB 118, CB 138, CB 153 e CB 180. Questi congeneri sono molto abbondanti nelle formulazioni Arochlor 1254 e 1260, che sono state ampiamente utilizzate come fluidi dielettrici nei trasformatori (Gedik et al. 2011). Pertanto, l'origine di questi composti è probabilmente il porto in entrambe le aree di studio (ad esempio Fouial-Djebbar et al. 2010).

#### **7.2.5. Saggi biologici**

Sono state osservate differenze tra i tre tipi di saggi biologici utilizzati, suggerendo che i contaminanti influiscono in modo diverso a seconda del tipo di biotest, che si

spiega probabilmente con le diverse vie di esposizione di ciascun organismo ai contaminanti (Macken et al. 2008). Mentre il saggio con l'alga *P. tricornutum* non ha mostrato alcuna tossicità nei campioni testati, il saggio di embriotossicità con il riccio di mare *P. lividus* ha evidenziato una elevata tossicità in tutte le stazioni indagate all'interno del porto di Cagliari e per la stazione denominata Corsica Ferries nel porto di Tolone, e una tossicità media nella stazione P2 (Foce) del porto di Olbia. Il batterio luminescente *V. fischeri*, ha evidenziato la presenza di tossicità nei sedimenti delle stazioni S. Elmo e D. Pescherecci, all'interno del Porto di Cagliari, e per la stazione Suffren nel Porto di Tolone.

Nel caso dei sedimenti di Cagliari, i risultati del Microtox sconcertano con quelli di *P. lividus*, che hanno evidenziato una tossicità elevata e molto elevata nei sedimenti di D. Pescherecci e S. Elmo, rispettivamente. Tuttavia, nel caso di Suffren, a Tolone, c'è stata una discrepanza tra i risultati del Microtox, che ha evidenziato una tossicità in quella stazione, e gli altri due saggi biologici che non hanno mostrato tossicità. La stazione di Suffren era caratterizzata da un'alta percentuale di sedimenti fini (95%), che sono noti per essere associati all'inibizione della bioluminescenza nel test Microtox (Ringwood et al. 1997; Montero et al. 2013). Pertanto, la tossicità osservata in questa stazione da parte del Microtox potrebbe essere correlata alla granulometria dei sedimenti.

## **7.2.6. Valutazione della contaminazione dei sedimenti e del rischio ambientale**

### **7.2.6.1. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti: metalli**

È stata osservata una discrepanza tra il fattore di contaminazione (FC) e l'indice di geoaccumulo (Igeo) solo per il Cu. Questo può essere dovuto al fatto che il FC non considera i contributi litogenici e sedimentari e l'Igeo riduce la sua sensibilità a basse concentrazioni, essendo più accurato quando c'è un arricchimento significativo dovuto ad una più intensa attività antropica (Brady et al. 2015). Comunque, l'uso del 'sistema comune di qualificazione dei sedimenti' ha attenuato le differenze tra i due indici e ha identificato Corsica Ferries (Pb, Cu, Hg), Suffren (Cu, Hg), D. Pescherecci (Cu, Pb) e S. Elmo (Cu), come le stazioni con maggiore contaminazione da metalli.

Inoltre, sulla base della percentuale di metallo associata a F1, il rischio potenziale dei sedimenti come fonte di contaminanti per la colonna d'acqua è stato valutato utilizzando il Codice di Valutazione del Rischio (RAC). Sulla base di questi risultati, i

sedimenti di Olbia (Porto, Foce, Controllo) e Cagliari (Molo Rinascita, D. Pescherecci) hanno mostrato un rischio da alto a molto alto per il Cd, mentre la stazione Foce di Olbia, S. Elmo di Cagliari e Molo Fornelli di La Spezia hanno mostrato un rischio elevato per lo Zn. Tuttavia, se incrociamo questi dati con quelli ottenuti con 'il sistema comune di classificazione dei sedimenti', possiamo vedere che tutte le stazioni sono classificate come non contaminate o moderatamente contaminate rispetto a questi metalli. Pertanto, sebbene la biodisponibilità di Cd e Zn nei sedimenti studiati sia elevata, non si prevede un impatto rilevante sulla colonna d'acqua. Il caso opposto è stato osservato nei sedimenti di Cagliari, dove D. Pescherecci e S. Elmo hanno mostrato concentrazioni molto elevate di Cu e Pb, ma con un rischio di rimobilizzazione molto basso (RAC: Cu <1 Classe 1, nessun rischio; Pb<2, rischio basso). Pertanto, non sono previsti problemi associati a Cu e Pb in queste stazioni.

I risultati della F1 misurati nei sedimenti di Tolone non sono al momento disponibili. Tuttavia, essi contribuiranno a chiarire il potenziale impatto ambientale delle elevate concentrazioni di Cu, Hg e Pb misurate in Lazaret e Suffren.

**7.2.6.2. Indici per la valutazione della contaminazione dei sedimenti: IPA e PCB**  
Entrambi gli indici, FC e Igeo, sono stati in accordo sulla classificazione dei sedimenti in base alle concentrazioni di IPA e PCB. Come si è osservato nel caso dei metalli, l'uso di indici individuali può comportare una classificazione diversa a seconda dell'indice utilizzato. Comunque, l'uso del 'sistema comune di qualificazione dei sedimenti' ha garantito che i sedimenti possano essere classificati nella stessa categoria indipendentemente dall'indice utilizzato.

I sedimenti raccolti ad Olbia sono stati classificati come non inquinati per quanto riguarda la concentrazione di IPA e PCB. Quelli di La Spezia mostrano una situazione intermedia, dove i sedimenti presentano una contaminazione da bassa a moderata rispetto agli IPA, ma sono altamente inquinati se consideriamo i PCB, specialmente i congeneri altamente clorurati (CB 138, CB 153 e CB 180). Nel caso dei sedimenti di Tolone, la stazione Tour Royale è moderatamente contaminata rispetto agli IPA, mentre è stata classificata come altamente o fortemente contaminata rispetto ai PCB ( 5 dei 7 PCB). Nel caso di Lazaret, i sedimenti sono stati classificati come altamente o fortemente contaminati a causa degli IPA (9 su 10

IPA) e dei PCB (5 su 7 PCB). Corsica Ferries è stata classificata come la stazione più contaminata per quanto riguarda gli IPA (fortemente inquinati: 9 su 10 IPA) e i PCB (fortemente inquinati: 6 su 7 PCB).

#### **7.2.6.3. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale: livelli soglia (SQG)**

Sono stati utilizzati diversi approcci per collegare la tossicità alle concentrazioni dei contaminanti nei sedimenti. L'approccio più applicato si basa sulla valutazione della potenziale tossicità in base al confronto con valori numerici, come L2 e N2, forniti dalle autorità italiane e francesi, rispettivamente, per la valutazione dei sedimenti dragati. Al di sopra di queste soglie, un contaminante sarebbe sospettato potenzialmente di causare un rischio ambientale (Buchman 2008; DeValls et al. 2004; Morales-Caselles et al. 2007).

Si è osservato che i valori soglie riportati dalle autorità italiane e francesi erano in alcuni casi abbastanza diversi e che L2 e N2 sono stati riportati per diversi composti, il che complica l'interpretazione dei risultati ottenuti. Inoltre, sono state osservate differenze nella classificazione dei sedimenti in base all'uso di L2 o N2. I valori di L2 sono più restrittivi e quindi le stazioni hanno mostrato un numero maggiore di inquinanti sopra questi valori soglia rispetto a N2. Il disequilibrio tra L2 e N2 è stato più marcato a concentrazioni moderate (ad es. Lazaret, Tour Royale e Corsica Ferries hanno presentato diversi IPA sopra L2, mentre solo Corsica Ferries ha presentato 6 IPA sopra N2), mentre a concentrazioni più elevate entrambi i valori limite sono arrivati alle stesse conclusioni (ad es. solo Corsica Ferries ha presentato concentrazioni di PCB sia sopra L2 che sopra N2). Ciò evidenzia che gli stessi sedimenti sarebbero stati classificati in modo differente a seconda dei valori soglia francesi o italiani utilizzati.

#### **7.2.6.4. Indici per la valutazione del potenziale rischio ambientale: MERMQ e MPELQ**

È stato suggerito che gli SQG empirici non affrontano in modo efficiente il concetto di biodisponibilità (ad esempio Burton et al. 2002; DeValls et al. 2004) in quanto tengono conto solo di singole sostanze chimiche senza considerare l'interazione tra i contaminanti (Choueri et al. 2010). Per questo motivo sono stati utilizzati gli indici MERMQ e MPELQ, perché integrano insieme le concentrazioni misurate di ciascun

gruppo di contaminanti, che rappresenta una migliore approssimazione dell'effettiva esposizione degli organismi nell'ambiente acquatico.

Risultati simili sono stati ottenuti con entrambi gli indici. Secondo la classificazione stabilita per MERMQ e MPELQ, Corsica Ferries ha presentato un livello di rischio alto per i metalli (76% di probabilità di essere tossico) e un livello di rischio medio-alto per IPA e PCB (49% di probabilità di essere tossico).

### **7.2.7. Matrice tabulare**

Nel presente studio sono state studiate due linee di evidenza nei sedimenti, la concentrazione dei contaminanti e la tossicità. Le informazioni relative alle concentrazioni chimiche, alla tossicità potenziale basata sul confronto con SQG, ai risultati degli indici ecologici (MERMQ e MPELQ) e ai saggi biologici sono state integrate in una matrice tabulare.

Lazaret e Tour Royale a Tolone, Porto e Controllo a Olbia, e i sedimenti MF1, MF2 e MF3 a La Spezia sono stati classificati come non tossici (NT). Nel caso di Olbia e La Spezia, ciò è in accordo con il basso livello di contaminanti nei sedimenti: (1) nessun sedimento era fortemente inquinato da metalli, IPA o PCB (indice chimico; FI), (2) le concentrazioni di tutti i composti erano inferiori a L2 (MF1, MF2 e MF3 presentavano un metallo sopra questo valore) e N2, e (3) sulla base di MERMQ e MPELQ, questi sedimenti presentavano un rischio basso (RB) a basso-medio (R-BM), con una probabilità del 9-21% di essere tossici. Nel caso di Lazaret e Tour Royale, la classificazione dei sedimenti, in base ai risultati di MERMQ e MPELQ (RB o R-BM), è conforme alla mancanza di tossicità. Tuttavia, questi sedimenti erano fortemente inquinati (FI) da metalli e IPA, che erano sopra il valore soglia L2 (2 metalli erano sopra N2 in Lazaret). Considerando che quest'ultimo sedimento non presentava alcuna tossicità, sembrerebbe che i valori di L2 previsti dalla legislazione italiana siano troppo restrittivi e che, in questo caso, i valori di N2 possano rappresentare in modo più realistico il potenziale rischio ambientale.

Corsica Ferries e Suffren a Tolone, Foce ad Olbia, Molo Rinascita a Cagliari e il sedimento MF4 di La Spezia hanno mostrato una bassa tossicità (BT). I sedimenti di Foce hanno mostrato una tossicità media nel saggio del riccio di mare, ma nessun composto era al di sopra dei limiti e il sedimento presentava un rischio basso (RB) in base al MERMQ e MPELQ. Pertanto, la tossicità osservata in questo sedimento potrebbe essere dovuta a (i) processi di sinergismo tra i composti presenti, (2)



composti non misurati o (3) parametri legati alle caratteristiche chimico-fisiche del sedimento (ad es., contenuto di peliti, materia organica). Queste spiegazioni valgono anche per il sedimento della stazione MF4, in quanto presentava un rischio da basso (RB) a basso-medio (R-BM), con concentrazioni di metalli e composti organici che non superavano i limiti, ed è risultato comunque tossico nel saggio dei ricci di mare. Questo è in linea con le osservazioni di Montero et al. (2013), che hanno concluso che, a livelli chimici bassi, nel valutare la potenziale tossicità dei sedimenti si deve tener conto dell'importanza dei fattori di confusione (concentrazione d'ammoniaca, peliti, ecc.).

Il sedimento di Corsica Ferries è stato tossico per il saggio di riccio, che si spiega probabilmente con le alte concentrazioni di metalli (MERMQ/MPELQ: RA, 76% probabilità di essere tossico), IPA e PCB (MERMQ/MPELQ: R-MA, 49% probabilità di essere tossico). Per quanto riguarda Suffren, la tossicità potrebbe essere dovuta ai metalli (MERMQ: R-MA), ma non avendo i risultati dei composti organici (IPA e PCB), l'influenza di questi elementi sulla tossicità osservata non può essere esclusa. Quest'ultimo caso assume particolare importanza nel caso di M. Rinascita, in quanto i livelli di metallo sono troppo bassi per spiegare la tossicità.

Il sedimento di D. Pescherecci era moderatamente tossico (MT), mentre quello di S. Elmo è stato classificato come altamente tossico (AT). In entrambi i casi i livelli dei metalli non erano sufficientemente elevati (MERQ/MPELQ: R-BM e R-MA) per spiegare la tossicità osservata. Pertanto, i composti organici (IPA e PCB) potrebbero potenzialmente essere responsabili della tossicità riscontrata. Questo sarà verificato una volta che questi dati saranno disponibili.

Sulla base dei risultati ottenuti nel presente studio, si può concludere che stabilire la potenziale tossicità dei sedimenti in base al confronto dei singoli inquinanti con gli SQG o gli indici chimici è un approccio semplicistico, poiché non tiene conto dell'interazione tra inquinanti (ad esempio antagonismo, sinergismo ed effetti additivi) e della biodisponibilità, che possono essere le cause principali della tossicità. Ciò potrebbe spiegare la differenza osservata in questo studio tra i risultati ottenuti con gli indici chimici e gli SQG e la tossicità globale basata sui risultati dei saggi biologici. Inoltre, l'uso degli indici ecologici (MERMQ e MPELQ) si è dimostrato molto utile per comprendere la potenziale tossicità dei sedimenti. Pertanto, la sua inclusione come linea di evidenza nel processo decisionale per la valutazione del

rischio dei sedimenti portuali, in combinazione con i saggi tossicologici, potrebbe essere utile.

### **7.3. Caraterizzazione delle carote di sedimenti**

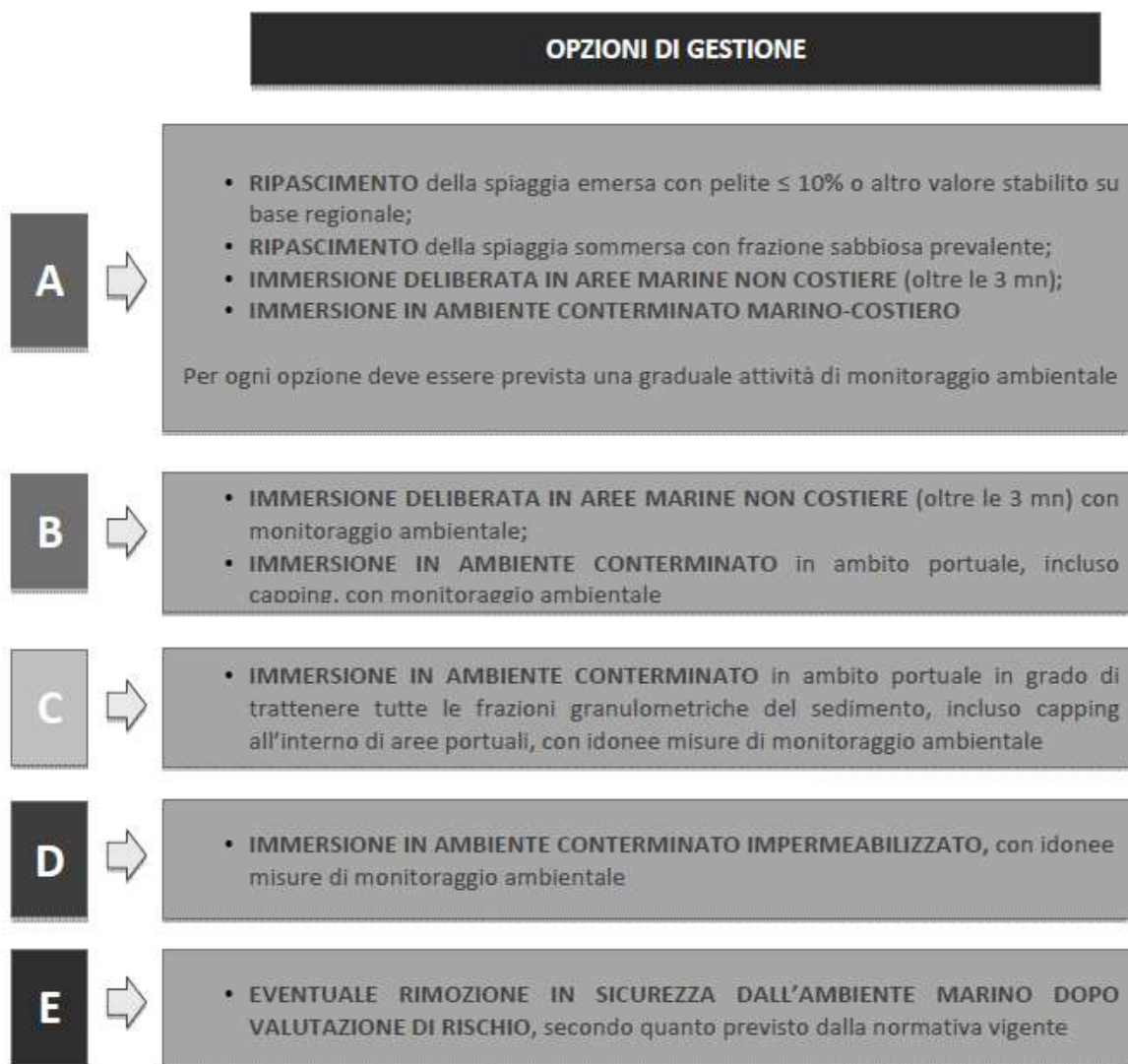
#### **7.3.1. Caraterizzazione verticale ad alta risoluzione**

Questo studio ha rivelato diverse caratteristiche dei sedimenti nei porti pilota del progetto e l'impatto di un'attività di gestione in mare sui sedimenti dragati. I sedimenti del porto di La Spezia e della Baia di Olbia sono sotto una maggiore influenza terrigena rispetto al porto di Tolone. Il porto di Tolone è più contaminato dai metalli rispetto agli altri due siti. La fonte di questa contaminazione è nota per essere antropogenica, legata alle attività umane attuali e storiche. La sequenza diagenetica ha mostrato diversi gradi di avanzamento tra i 3 siti, con in particolare l'assenza di solfuri ionici rilevabili nell'acqua interstiziale di La Spezia che attesta una sequenza diagenetica più giovane rispetto agli altri due porti a seguito di un'operazione di dragaggio. La speciazione dei principali contaminanti metallici variava tra i porti. La complessazione è apparsa più forte nei sedimenti più anossici (ricchi di solfuri) e più debole nei sedimenti interessati dal dragaggio di La Spezia. La diversità microbica ha rivelato l'assenza di strutturazione verticale nei sedimenti di La Spezia, a differenza degli altri due siti. A La Spezia, gruppi sensibili all'invecchiamento dei sedimenti (anossia pronunciata, materia organica meno labile) dominano ancora la comunità a più di 30 cm di profondità. L'attività microbica di riduzione dei solfati è quindi probabilmente meno intensa in questi sedimenti che negli altri due porti. I sedimenti campionati a La Spezia sono stati sottoposti a una forte riossidazione 2 anni prima del campionamento, nell'ambito di un'operazione di dragaggio che ha portato al movimento sottomarino dei sedimenti. Questa pratica perturbava permanentemente l'equilibrio chimico e biologico, portando ad una maggiore mobilità dei contaminanti metallici (frazione disciolta più alta) e ad un aumento del rischio di diffusione verso la colonna d'acqua.

#### **7.3.2. Caraterizzazione spaziale ad alta risoluzione**

L'integrazione ponderata dei dati chimici e ecotossicologici effettuata col software SediquaSoft, evidenzia un'elevata variabilità delle classi di qualità ritrovate.

L'opzioni di gestione dei sedimenti compatibili con la classificazione di qualità del materiale da dragare come previsto dal D.M. 173/2016, si riportano nella Figura 28.



*Figura 28. Opzioni di gestione compatibili con la classificazione di qualità dei materiali da dragare*

La classificazione di qualità evidenzia che solamente due campioni (R3/0-50 e R5/0-50) risultano di Classe A mentre la maggior parte dei sedimenti risulta appartenere alle classi B e C per le quali è previsto l'immersione in ambiente conterminato in ambito portuale e, nel caso dei sedimenti di classe C, l'ambiente conterminato deve essere in grado di trattenere tutte le frazioni granulometriche del sedimento. Relativamente ai campioni di classe A e B non è possibile scegliere come opzione di gestione l'immersione deliberata in mare oltre le 3 miglia nautiche poiché in fase di campionamento dei sedimenti si è provveduto all'accorpamento dei campioni. Sono inoltre dei campioni appartenenti alla classe D (R2/0-50, R2/200-400 e R10/0-50) che devono essere destinati in un ambiente conterminato impermeabilizzato.

Relativamente a questi sedimenti non è possibile trattarli come se fossero di classe C (opzione prevista dal D.M. 173/2016) poiché presentano un pericolo ecotossicologico Medio/Alto.

#### **7.4. Valutazione integrata del rischio ambientale nei porti italiani e francesi**

Ogni porto presentava un'impronta di contaminazione caratteristica che viene definita dalle attività antropiche presenti nell'area. Pertanto, analizzeremo separatamente il potenziale rischio ambientale cui è soggetta ciascuna area di studio.

A La Spezia, Cadimare ha presentato le più alte concentrazioni di metalli con i DGT, perché si trova vicino ad un arsenale militare ed è influenzato da diversi scarichi di origine urbana e industriale. Ciò è supportato dal riscontro di elevate concentrazioni di As, Cd e Cr nelle cozze trapiantate a Cadimare, che indicano la presenza di diverse fonti di contaminazione in questa stazione. Nel mese di novembre sono state misurate elevate concentrazioni di Ni da parte dei DGT nella stazione Molo Garibaldi, che potrebbero essere spiegate da un processo di risospensione dovuto a forti condizioni idrodinamiche (ad. es. tempeste, aumento della portata dell'acqua). Purtroppo non abbiamo risultati di concentrazione dei metalli nei sedimenti di Molo Garibaldi, ma i sedimenti di Molo Fornelli hanno presentato le più alte concentrazioni di Ni rispetto a tutte le aree studiate. Pertanto, ipotizzando che, per la loro vicinanza e per le attività portuali simili che caratterizzano entrambi i moli, i sedimenti delle due stazioni potrebbero essere confrontabili, l'alta concentrazione di Ni misurata potrebbe essere dovuta alla potenziale risospensione dei sedimenti a La Spezia in condizioni climatiche estreme. In questo senso, lo studio diagenetico dei sedimenti ha dimostrato che i sedimenti della Spezia presentano una maggiore mobilità dei contaminanti metallici (frazione disciolta più alta) e un aumento del rischio di diffusione verso la colonna d'acqua. Tuttavia, i sedimenti di Molo Fornelli sono stati classificati come basso o medio rischio per quanto riguarda i metalli e non hanno mostrato alcuna o scarsa tossicità con i saggi biologici. Pertanto, anche nel caso di un processo di risospensione dei sedimenti, non è previsto un rischio importante per la colonna d'acqua a causa dei metalli. Per quanto riguarda gli IPA e i PCB, i campionatori passivi e i mitili non hanno mostrato lo stesso andamento, indicando probabilmente la diversa via di esposizione di entrambe le tecniche (liberamente

disciolto contro disciolto e particolato). Tuttavia, con entrambe le tecniche i composti predominanti erano IPA con 3-4 anelli e i congeneri CB153, CB138 e CB101. Gli IPA leggeri hanno di solito un'origine petrogenica, quindi la loro presenza potrebbe essere dovuta agli scarichi di rifiuti urbani e industriali e agli scarichi di acque di sentina dalle navi. Ciò è in accordo con le basse concentrazioni di IPA misurate nei sedimenti di La Spezia, indicando che probabilmente non agiscono come fonte di IPA nella colonna d'acqua. Nel caso dei PCB, i congeneri osservati nell'acqua erano predominanti anche nei sedimenti, indicando che entrambi i compartimenti sono correlati tra loro. Come osservato per i metalli, i sedimenti di La Spezia sono stati classificati come basso o medio rischio per quanto riguarda gli IPA e i PCB e non hanno mostrato alcuna o scarsa tossicità con i saggi biologici.

Pertanto, i sedimenti non sembrano essere un rischio per la qualità ambientale della rada di La Spezia e la potenziale contaminazione osservata nella colonna d'acqua sembra essere più legata alla fonte puntuale di scarichi urbani e industriali.

A Olbia sono state misurate con i campionatori passivi basse concentrazioni di metalli, IPA e PCB, inferiori rispetto agli altri porti studiati. I DGT hanno misurato concentrazioni di metalli più elevate nella stazione Porto (specialmente per il Cu) in estate, indicando una potenziale influenza dell'aumento del traffico marittimo in quel periodo dell'anno. Come osservato per La Spezia, sulla base dei campionatori passivi IPA con 2-3 anelli e CB 153 hanno dominato le concentrazioni dei composti organici. In accordo, concentrazioni molto basse di metalli, IPA e PCB sono state anche misurate per mezzo dei mitili, e anche il CB 153 risulta essere il PCB più abbondante. Nei sedimenti, lo stesso andamento è stato osservato, presentando basse concentrazioni di metalli, IPA e PCB (basso o medio rischio), con predominanza di CB 153, e da nessuna a bassa tossicità nei biotest. Pertanto, il porto di Olbia non sembra essere a rischio di inquinamento ambientale. La pressione principale su questi sistemi sembra essere rappresentata dal traffico marittimo, per cui si dovrebbe esaminare in modo più approfondito il possibile ingresso di inquinanti provenienti da tali attività.

A Tolone sono state misurate con i campionatori passivi le concentrazioni più alte di metalli, IPA e PCB nella Corsica Ferries. Nei sedimenti si è osservata la stessa tendenza, presentando Corsica Ferries le concentrazioni più alte. Va notato che si è

visto un cambiamento nella predominanza dei singoli IPA, passando da IPA con 2-3 anelli a febbraio (indicando un'origine petrogenica proveniente da scarichi) a IPA con 4-5 anelli ad agosto, che indicano un processo di rimobilizzazione. Ciò è confermato dalla predominanza di questi stessi IPA con 4-5 anelli nei sedimenti di Tolone (fluorantene e benzo(b+j)fluorantene). Lo stesso andamento si osserva per i PCB, poiché i congeneri più abbondanti nella colonna d'acqua (misurati mediante campionatori passivi) e nel sedimento sono stati i congeneri CB153, CB138 e CB101, presenti nella formulazione di Aroclor. I sedimenti di Corsica Ferries hanno evidenziato un rischio alto per i metalli e basso-moderato per IPA e PCB e una tossicità positiva per il saggio delle larve di riccio. Considerando che in questa stazione si trova il terminal delle navi da crociera, che possono disturbare l'equilibrio nei sedimenti, e che i sedimenti di Corsica Ferries presentano un'alta percentuale di peliti (92%), sembra evidente il rischio potenziale di risospensione del sedimento in questa zona. Ciò comporterebbe la necessità di approfondire i potenziali effetti del traffico marittimo in questa parte del porto.

Nel caso di Cagliari, Molo Rinascita e Darsena Pescherecci hanno presentato le più alte concentrazioni di metalli, IPA e PCB con i campionatori passivi. Queste stazioni sono caratterizzate dalla presenza del terminal delle navi da crociera e del porto dei pescatori, rispettivamente. Come si osserva a Tolone, la predominanza dei singoli IPA è cambiata da IPA con 3-4 anelli a IPA con 4-5 anelli (pirene, fluorantene e benzo(b+j)fluorantene) in giugno, sicuramente dovuto ad un processo di risospensione dei sedimenti. Tuttavia non possiamo provare questa ipotesi perché i risultati dei composti organici nei sedimenti non sono ancora disponibili. Per quanto riguarda i PCB, hanno dominato i congeneri CB153, CB110 e CB52. La stazione Molo Rinascita ha mostrato una bassa tossicità, in accordo con il basso-medio rischio dei sedimenti rispetto ai metalli e con i risultati delle carote raccolte in quest'area (vedi sezione 6.3.2.3., campione R3 0-50). Invece, le stazioni Darsena Pescherecci e S. Elmo sono state classificate come moderate e altamente tossiche, rispettivamente, in base ai risultati della batteria di saggi biologici. Poiché per quanto riguarda i metalli, i sedimenti hanno mostrato un rischio da basso a moderato, possiamo prevedere l'importanza dei composti organici nella tossicità osservata. In mancanza dei risultati dei sedimenti, possiamo dire che le attività che si svolgono in prossimità delle stazioni D. Pescherecci e S. Elmo potrebbero causare la

risospensione dei sedimenti e quindi comportare un rischio per la qualità ambientale della zona.

L'integrazione delle informazioni ottenute attraverso le diverse linee di evidenza ha permesso la valutazione del rischio ambientale dei porti studiati. Le conclusioni in base a un unico indicatore potrebbero comportare un processo decisionale inadeguato. È pertanto necessario utilizzare tecniche efficaci in grado di individuare le aree potenzialmente a rischio di impatto ambientale e di fornire informazioni sulle fonti di inquinamento e sui potenziali effetti sul biota. Pertanto, le tecniche impiegate sembrano soddisfare tutti i requisiti per il loro utilizzo, in modo integrato, per valutare il rischio ambientale nei porti. Inoltre, le informazioni ottenute potrebbero essere utilizzate dai gestori portuali per adottare misure specifiche che riducano l'impatto ambientale delle attività portuali.

## 8. Bibliografia

Aizdaicher, N.A., Malynova, S.I., Khristoforova, N.K. (1999). Effect of Detergents on Microalgal Growth. *Russian Journal of Marine Biology*, 25(3), 234–238

Allan, I.J., Knutsson, J., Guigues, N., Mills, G.A., Fouillac, A-M., Greenwood, R. (2008). Chemcatcher and DGT passive sampling devices for regulatory monitoring of trace metals in surface water. *Journal of Environmental Monitoring*, (10), 821-829

Apostolopoulou, M.-V., Monteyne, E., Krikonis, K., Pavlopoulos, K., Roose, P., Dehairs, F. (2014). Monitoring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Northeast Aegean Sea Using *Posidonia Oceanica* Seagrass and Synthetic Passive Samplers. *Marine Pollution Bulletin*, 87, 338–344

Arizzi Novelli, A., Losso, C., Libralato, G., Tagliapietra, D., Pantani, C., Volpi Ghirardini, A. (2006). Is the 1:4 elutriation ratio reliable? Ecotoxicological comparison of four different sediment:water proportions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 306-313

Arizzi Novelli, A., Losso, C., Libralato, G., Volpi Ghirardini, A. (2007). Valutazione delle metodologie di elutriazione mediante saggi di tossicità. *Biologia Marina Mediterranea*, 14(1), 87-89

ARPAL (2005). Relazione finale della caratterizzazione dell'area marina compresa nella perimetrazione del sito di interesse nazionale di Pitelli. pp. 92

ARPAT (1998). Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico, pp. 191

APAT IRSA-CNR (2003). Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida, 29/2003, Vol. Terzo. Metodo 8060: 1043-1049.

Arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux relevant respectivement des rubriques 2.2.3.0, 4.1.3.0 et 3.2.1.0 de la nomenclature annexée à l'article R. 214-1 du code de l'environnement, NOR: DEVO0650505A

Arrêté du 17 juillet 2014 modifiant l'arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux relevant respectivement des rubriques 2.2.3.0, 3.2.1.0 et 4.1.3.0 de la nomenclature annexée à l'article R. 214-1 du code de l'environnement. JORF n°0173, 2 pp

ASTM (1994). Standard Guide for Designing Biological Tests With Sediments. ASTM E1525, pp. 22

ASTM (1995). Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests With Echinoid Embryos. ASTM E1563, pp. 20

ASTM (2014). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Estuarine and Marine Invertebrates. ASTM E1367-03, pp. 62

Baeyens, W., Gao, Y., Davison, W., Galceran, J., Leermakers, M., Puy, J., Superville, P.-J., Begery, L. (2018). In situ measurements of micronutrient dynamics in open seawater show that complex dissociation rates may limit diatom growth. *Sci. Rep.* 8, 16125

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J. (1998). Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in Various Marine Organisms in Relation to those in Sediments and to Trophic Level. *Marine Pollution Bulletin*, 36(12), 951-960

Bayen, S., Estrada, E.S., Zhang, H., Lee, W.K., Juhel, G., Smedes, F., Kelly, B.C. (2019). Partitioning and Bioaccumulation of Legacy and Emerging Hydrophobic Organic Chemicals in Mangrove Ecosystems. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 2549-2558

Becagli, S., Sferlazzo, D.M., Pace, G., di Sarra, A., Bommarito, C., Calzolari, G., Ghedini, C., Lucarelli, F., Meloni, D., Monteleone, F., Severi, M., Traversi, R., Udisti, R. (2011). Evidence for ships emissions in the Central Mediterranean Sea from aerosol chemical analyses at the island of Lampedusa. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, 11, 29915–29947

Belzunce, M.J., Solaun, O., Oreja, J.A.G., Millán, E., Pérez, V. (2004). Contaminants in sediments. In: Borja, Á., Collins, M. (Eds.), *Oceanography and Marine Environment of the Basque Country*. Elsevier Oceanography Series 70, Elsevier, Amsterdam, pp. 283-315

Belzunce, M.J., Montero, N., Gonzalez, J-L., Larreta, J., Franco, J., Borja, A. (2012). Advantages of using passive samplers in comparison with spot sampling for metal



evaluation in estuarine waters: an example from the Bay of Biscay (North-eastern Spain). In: Nriagu, J., Pacyna, J., Szefer, P., Markert, B., Wuenschmann, S., Namiesnik, J. (Eds.), *Heavy metals in the environment*. Maralte B.V., Voorschoten, 77-90

Berho, C., Guigues, N., Togola, A., Roy, S., Fouillac, A-M., Allan, I., Mills, G.A., Greenwood, R., Roig, B., Valat, C., Ulitzur, N. (2009). Evaluation of the field performance of emerging water quality monitoring tools. In: Gonzalez, C., Greenwood, R., Quevauviller, P. (Eds.) *Rapid chemical and biological techniques for water monitoring*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 287-301

Booij, K., Hofmans, H. E., Fischer, C.V., Van Weerlee, E. M. (2003). Temperature-Dependent Uptake Rates of Nonpolar Organic Compounds by Semipermeable Membrane Devices and Low-Density Polyethylene Membranes. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 361

Booij, K., Smedes, F. (2010). An Improved Method for Estimating In Situ Sampling Rates of Nonpolar Passive Samplers. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 6789–6794

Booij, P., Sjollem, S.B., Leonards, P.E.G., de Voogt, P., Stroomberg, G.J., Vethaak, A. D., Lamoree, M.H. (2013). Extraction Tools for Identification of Chemical Contaminants in Estuarine and Coastal Waters to Determine Toxic Pressure on Primary Producers. *Chemosphere*, 93, 107–114

Brady, J.P., Ayoko, G.A., Martens, W.N., Goonetilleke, A. (2015). Development of a hybrid pollution index for heavy metals in marine and estuarine sediments. *Environ. Monit. Assess.*, 187(5), 306.

Buchman, M.F. (2008). NOAA Screening Quick Reference Tables. NOAA OR&R Report 08-1

Burton Jr., G.A. (2002). Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology*, 3, 65-75

Bustamante, J., Navarro, P., Arana, G., de Diego, A., Madariaga, J.M. (2013). Ultrasound assisted dialysis of semi-permeable membrane devices for the simultaneous analysis of a wide number of persistent organic pollutants. *Talanta*, 114, 32–37

Cannarsa, S., Abete, M.C., Zanardi, M., Squadrone, S. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in marine sediment of the northwestern Mediterranean Sea (Italy). *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, 20(2), 137-141

Caro, A., Chereau, G., Briant, N., Roques, C., Freydier, R., Delpoux, S., Escalas, A., Elbaz-Poulichet, F. (2015). Contrasted responses of *Ruditapes decussatus* (filter and deposit feeding) and *Loripes lacteus* (symbiotic) exposed to polymetallic contamination. *Sci. Total Environ.*, 505, 526–534.

Cesar, A., Marín, A., Marin-Guirao, L., Vita, R., Lloret, J., DelValls, T.A. (2009). Integrative ecotoxicological assessment of sediment in Portmán Bay (southeast Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), 1832-1841

Chapman, P.M. (1990). The Sediment Quality Triad approach to determining pollution-induced degradation. *Sci Total Environ*, 97-8, 815-825

Chapman, P.M. (1996). Presentation and interpretation of Sediment Quality Triad data. *Ecotoxicology*, 5, 327-339

Chapman, P.M. (1998). New and emerging issues in ecotoxicology — The shape of testing to come? *Aust J Ecotoxicol*, 4, 1–7

Chapman, P.M. (2007). Determining when contamination is pollution — Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International*, 33(4), 492-501

Choueri, R.B., Cesar, A., Abessa, D.M.S., Torres, R.J., Riba, I., Pereira, C.D.S., Nascimento, M.R.L., Morais, R.D., Mozeto, A.A., DelValls, T.A. (2010). Harmonised framework for ecological risk assessment of sediments from ports and estuarine zones of North and South Atlantic. *Ecotoxicology* 19, 678-696

Cindrić, A.-M., Cukrov, N., Durrieu, G., Garnier, C., Pižeta, I., Omanović, D. (2017). Evaluation of discrete and passive sampling (Diffusive Gradients in Thin-films – DGT) approach for the assessment of trace metal dynamics in marine waters – a case study in a small harbor. *Croat. Chem. Acta*, 90 (2), 177–185.

Circulaire n° 2000-62 du 14 juin 2000 relative aux conditions d'utilisation du référentiel de qualité des sédiments marins ou estuariens présents en milieu naturel ou portuaire défini par l'arrêté interministériel (texte non paru au Journal officiel), 12 pp.

Claessens M., Monteyne E., Wille K., Vanhaecke L., Roose P. and Janssen C. (2015). Passive sampling reversed: coupling passive field sampling with passive lab dosing to assess the ecotoxicity of mixtures present in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 93 (1-2), 9-19

Coclet, C., Garnier, C., Delpy, F., Jamet, D., Durrieu, G., Le Poupon, C., Mayer, M., Misson, B. (2018). Trace metal contamination as a toxic and structuring factor impacting ultraphytoplankton communities in a multicontaminated Mediterranean coastal area. *Progress in Oceanography* 163, 196–213

Coclet, C., Garnier, C., Durrieu, G., Omanović, D., D'onofrio, S., Poupon, C. Le, Jean-Ulrich, M., Briand, J.-F., Misson, B. (2019). Changes in bacterioplankton communities resulting from direct and indirect interactions with trace metal gradients in an urbanized marine coastal area. *Front. Microbiol.* 10, 1–14

Costa, L.D.F., Wallner-Kersanach, M. (2013). Assessment of the labile fractions of copper and zinc in marinas and port areas in Southern Brazil. *Environ. Monit. Assess*, 185, 6767–6781.

Daehne, D., Fürle, C., Thomsen, A., Watermann, B., Feibicke, M. (2017). Antifouling biocides in German marinas: exposure assessment and calculation of national consumption and emission. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 13 (5), 892–905

Dang, D.H., Evans, R.D., Durrieu, G., Layglon, N., El Houssainy, A., Mullot, J.-U., Lenoble, V., Mounier, S., Garnier, C. (2018). Quantitative model of carbon and nitrogen isotope composition to highlight phosphorus cycling and sources in coastal sediments (Toulon Bay, France). *Chemosphere*, 195, 683–692

Dang, D.H., Schaefer, J., Brach-Papa, C., Lenoble, V., Durrieu, G., Dutruch, L., Chiffolleau, J.-F., Gonzalez, J.-L., Blanc, G., Mullot, J.U., Mounier, S., Garnier, C., (2015). Evidencing the impact of coastal contaminated sediments on mussels through Pb stable isotopes composition. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11438–11448

De Luca, G., Furesi, A., Micera, G., Panzanelli, A., Piu, P.C., Pilo, M.I., Spano, N., Sanna, G. (2005). Nature, distribution and origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments of Olbia harbor (Northern Sardinia, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 50, 1223–1232

DeValls, T.A., Forja, J.M., Gómez-Parra, A. (1998). The use of multivariate analysis in linking sediment contamination and toxicity data to establish sediment quality guidelines: An example in the Gulf of Cádiz (Spain). *Cienc. Mar.*, 24, 127-154

DeValls, T.A., Andres, A., Belzunce, M.J., Buceta, J.L., Casado-Martínez, M.C., Castro, R., Riba, I., Viguri, J.R., Blasco, J. (2004). Chemical and ecotoxicological guidelines used for managing disposal of dredged material. *Trends in Analytical Chemistry*, 23(10-11), 819-828

Dévier, M-H., Mazellier, P., Aït-Aïssa, S., Budzinski, H. (2011). New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chimie*, 14, 766-779

DM (2016). Decreto Ministeriale 173/2016 – Regolamento recante modalita' e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini. Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale n. 208

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

Dufresne, C., Duffa, C., Rey, V. (2014). Wind-forced circulation model and water exchanges through the channel in the Bay of Toulon. *Ocean Dyn.* 64, 209–224.

Dunn, R.J.K., Teasdale, P.R., Warnken, J., Schleich, R.R. (2003). Evaluation of the Diffusive Gradient in a Thin Film Technique for monitoring trace metal concentrations in estuarine waters. *Environmental Science & Technology*, 37, 2794-2800

EC (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. Off. J. of the Eur. Comm. L327, 1-72

Emelogu, E.S., Pollard, P., Dymond, P., Robinson, C.D., Webster, L., McKenzie, C., Dobson, J., Bresnan, E., Moffat, C.F. (2013). Occurrence and Potential Combined Toxicity of Dissolved Organic Contaminants in the Forth Estuary and Firth of Forth, Scotland Assessed Using Passive Samplers and an Algal Toxicity Test. *Sci. Total Environ.*, 461–462, 230–239

Emelogu, E.S., Pollard, P., Robinson, C.D., Smedes, F., Webster, L., Oliver, I.W., McKenzie, C., Seiler, T.B., Hollert, H., Moffat, C.F. (2013). Investigating the Significance of Dissolved Organic Contaminants in Aquatic Environments: Coupling Passive Sampling with in Vitro Bioassays. *Chemosphere*, 90, 210–219

Everaert, G., De Laender, F., Claessens, M., Baert, J., Monteyne, E., Roose, P., Goethals, P.L.M., Janssen, C.R. (2016). Realistic environmental mixtures of hydrophobic compounds do not alter growth of a marine diatom. *Marine Pollution Bulletin*, 102, 58–64

Fernández B., Campillo J.A., Martínez-Gómez C., Benedicto J. (2010) Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquatic Toxicology*, 99, 186-197

Fouial-Djebbar D., Ahmed A.Y.B., Budzinski H. (2010). Determination of organochlorine compounds in coastal marine sediments from the southern west of the Mediterranean Sea. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 7, 271–280

Galanopoulou, S., Vgenopoulos, A., Conispoliatis, N. (2005). DDTs and other chlorinated organic pesticides and polychlorinated biphenyls pollution in the surface sediments of Keratsini harbour, Saronikos gulf, Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 50(5), 520-525

Galgani, F., Martínez-Gómez, C., Giovanardi, F., Romanelli, G., Caixach, J., Cento, A., Scarpato, A., BenBrahim, S., Messaoudi, S., Deudero, S., Boulahdid, M., Benedicto, J., Andral, B. (2011). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Western basin of the Mediterranean Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 172(1-4), 301-317

Garofalo, E., Ceradini, S., Winter, M. (2004). The use of Diffusive Gradients in Thin-Film (DGT) passive samplers for the measurement of bioavailable metals in river water. *Annali di Chimica*, 94, 515–520

Gedik K., İmamoğlu İ. (2011). Assessment of temporal variation and sources of PCBs in the sediments of Mediterranean Sea, Mersin Bay, Turkey. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 173-177

Gnecco, I., Palla, A., Sansalone, J.J. (2019). Partitioning of zinc, copper and lead in urban drainage from paved source area catchments. *Journal of Hydrology*, 578, 124128

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

Harman, C., Brooks, S., Sundt, R.C., Meier, S., Grung, M. (2011). Field comparison of passive sampling and biological approaches for measuring exposure to PAH and alkylphenols from offshore produced water discharges. *Marine Pollution Bulletin*, 63(5–12), 141-148

ICES, 1997. Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment

ICES (2012). Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report No. 315, pp. 277

ICRAM (2005). Progetto preliminare di bonifica dell'area marina inclusa nella perimetrazione del sito di bonifica di interesse nazionale di Pitelli. Bol-Pr-LI-P-02.16, pp. 216

ICRAM-APAT (2007). Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini. (consultabile sul web all'indirizzo [www.isprambiente.it](http://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 (2016). Water quality — Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*.

ISO 11348-3 (2007). Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria

Kim, M.S., Choi, M.S., Kim, C. (2016). Monitoring trace metals in seawater using a diffusive gradient in thin film probe in Ulsan Bay, East Sea, Korea: Comparison with transplanted mussels. *Ocean Sci. J.*, 51, 169–182

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

Khriforova 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, pp 108–121

Jain, C.K. (2004). Metal fractionation study on bed sediments of River Yamuna, India. *Water Research*, 38(3), 569-578

Lafabrie, C., Pergent, G., Kantin, R., Pergent-Martini, C., Gonzalez, J.-L. (2007). Trace metals assessment in water, sediment, mussel and seagrass species – validation of the use of *Posidonia oceanica* as a metal biomonitor. *Chemosphere*, 68, 2033–2039

Legorburu, I., Rodríguez, J.G., Borja, Á., Menchaca, I., Solaun, O., Valencia, V., Galparsoro, I., Larreta, J. (2013). Source characterization and spatio-temporal evolution of the metal pollution in the sediments of the Basque estuaries (Bay of Biscay). *Marine Pollution Bulletin*, 66(1–2), 25-38.

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

Liscio, C., Magi, E., Di Carro, M., Suter, M.J.-F., Vermeirssen, E.L.M. (2009). Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting

compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses. *Environmental Pollution*, 157, 2716-2721

Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D. (1995). Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Manag.*, 19 (1), 81–97

Lugliè 2019; <https://deims.org>

Macken, A., Giltrap, M., Foley, B., McGovern, E., McHugh, B., Davoren, M. (2008). An integrated approach to the toxicity assessment of Irish marine sediments: Validation of established marine bioassays for the monitoring of Irish marine sediments. *Environment International*, 34(7), 1023-1032

Macken, A., Giltrap, M., Foley, B., McGovern, E., McHugh, B., Davoren, M. (2009). An integrated approach to the toxicity assessment of Irish marine sediments: Application of porewater Toxicity Identification Evaluation (TIE) to Irish marine sediments. *Environment International*, 35(1), 98-106

Mamindy-Pajany, Y., Bataillard, P., Séby, F., Crouzet, C., Moulin, A., Guezennec, A.-G., Hurel, C., Marmier, N., Battaglia-Brunet, F. (2013). Arsenic in Marina Sediments from the Mediterranean Coast: Speciation in the Solid Phase and Occurrence of Thioarsenates, *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22(8), 984-1002

Marras, B., Montero, N., Marrucci, A., Bettoschi, A., Atzori, M., Schintu, M. (2020). Operational DGT threshold values for metals in seawater from protected coastal areas in Sardinia (Western Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110692

Martínez-Guijarro, R., Paches, M., Romero, I., Aguado, D. (2019). Enrichment and contamination level of trace metals in the Mediterranean marine sediments of Spain. *Science of The Total Environment*, 693, 133566

Meyer, J.S. (2002). The utility of the terms ‘bioavailability’ and ‘bioavailable fraction’ for metals. *Marine Environmental Research*, 53, 417-423

Miège, C., Schiavone, S., Dabrin, A., Coquery, M., Mazzella, N., Berho, C., Ghestem, J.-P., Togola, A., Gonzalez, C., Gonzalez, J.-L., Lalere, B., Lardy-Fontan, S., Lepot, B., Munaron, D., Tixier, C. (2012). An In Situ Intercomparison Exercise on Passive Samplers for Monitoring Metals, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Pesticides in Surface Waters. *Trends Anal. Chem.*, 36, 128–143

Misson, M., Garnier, C., Lauga, B., Dang, D.H., Ghiglione, J.-F., Mullet j.-U., Duranb, R., Pringault, O. (2016). Chemical multi-contamination drives benthic prokaryotic diversity in the anthropized Toulon Bay. *Science of the Total Environment*, 556, 319–329

Mondal, P., Schintu, M., Marras, B., Bettoschi, A., Marrucci, A., Sarkar, S.K., Chowdhury, R., Jonathan, M.P. Biswas, J.K. (2020). Geochemical fractionation and risk assessment of trace elements in sediments from tide-dominated Hooghly (Ganges) River Estuary, India. *Chemical Geology*, 532, 119373

- Montero, N., Belzunce-Segarra, M.J., Gonzalez, J.-L., Larreta, J., Franco, J. (2012). Evaluation of diffusive gradients in thin-films (DGTs) as a monitoring tool for the assessment of the chemical status of transitional waters within the Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 31-39
- Montero, N., Belzunce-Segarra, M.J., Del Campo, A., Garmendia, J.M., Ferrer, L., Larreta, J., Gonzalez, M., Maidana, M.A., Espino, M. (2013). Integrative environmental assessment of the impact of Pasaia harbour activities on the Oiartzun estuary (southeastern Bay of Biscay). *Journal of Marine Systems*, 109–110, S252-S260
- Monteyne, E., Roose, P., Janssen, C. (2013). Application of a silicone rubber passive sampling technique for monitoring PAHs and PCBs at three Belgian coastal harbours. *Chemosphere*, 91, 390–398
- Morales-Caselles, C., Kalman, J., Riba, I., DelValls, T.A. (2007). Comparing sediment quality in Spanish littoral areas affected by acute (Prestige, 2002) and chronic (Bay of Algeciras) oil spills. *Environmental Pollution*, 146, 233-240
- Morelli, E., Marangi, M.L., Fantozzi, L. (2009). A phytochelatin-based 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). *Environ Int*, 33, 481-495
- Muller, G. (1969). Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine. *Geojournal*, 2, 108-118
- Munaron D., Tapie N., Budzinski H., Andral B., Gonzalez J.-L. (2012). Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuarine Coastal And Shelf Science*, 114, 82-92
- 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
- Olenycz, M., Sokołowski, A., Niewińska, A., Wołowicz, M., Namieśnik, J., Hummel, H., Jansen J. (2015). Comparison of PCBs and PAHs levels in European coastal waters using mussels from the *Mytilus edulis* complex as biomonitors. *Oceanologia*, 57, 196-211
- Onorati, F., Volpi Ghirardini, A. (2001). Informazioni fornite dalle diverse matrici da testare con i saggi biologici: applicabilità di *Vibrio fischeri*. *Biol. Mar. Medit.*, 8(2): 31-40.
- OSPAR commission (2000). Quality Status Report 2000

OSPAR Commission (2009). [www.ospar.org/](http://www.ospar.org/) (accessed 07 January, 2009)

Paches, M., Martínez-Guijarro, R., Aguado, D., Ferrer, J. (2019). Assessment of the impact of heavy metals in sediments along the Spanish Mediterranean coastline: pollution indices. *Environ. Sci. Pollut. R.* 26, 10887–10901

Perin, G., Craboledda, L., Lucchese, M., Cirillo, R., Dotta, L., Zanette, M.L., Orio, A.A. (1985). Heavy metal speciation in the sediments Northern Adriatic Sea, a new approach for environmental toxicity determination. *Heavy Metals in the Environment*, 2(1), 454–456

Pesce, S., Morin, S., Lissalde, S., Montuelle, B., Mazzella, N. (2011). Combining polar organic chemical integrative samplers (POCIS) with toxicity testing to evaluate pesticide mixture effects on natural phototrophic biofilms. *Environ. Pollut.*, 159, 735–741

Pickford, D.B., Jones, A., Velez-Pelez, A., Iguchi, T., Mitsui, N., Tooi, O. (2015). Screening Breeding Sites of the Common Toad (*Bufo bufo*) in England and Wales for Evidence of Endocrine Disrupting Activity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 117, 7–19

Pintado-Herrera, M.G., Lara-Martín, P.A., González-Mazo, E., Allan, I.J. (2016). Determination of Silicone Rubber and Low-Density Polyethylene Diffusion and Polymer/Water Partition Coefficients for Emerging Contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 35, 2162–2172.

Pouget, F., Schäfer, J., Dutruch, L., Garnier, C., Tessier, E., Dang, D.H., Lancelot, L., Mullot, J.-U., Lenoble, V., Blanc, G. (2014). Sources and historical record of tin and butyl-tin species in a Mediterranean bay (Toulon Bay, France). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 21(10), 6640–51

Qingjie, G., Jun, D., Yunchuan, X., Qingfeib, W., Liqiang, Y. (2008). Calculating pollution indices by heavy metals in ecological geochemistry assessment and a case study in parks of Beijing. *J. China Univ. Geosci.*, 19 (3), 230–241

Rainbow, P.S. (1995). Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 183–192

Rao, C.R.M., Sahuquillo, A., López Sánchez, J.F. (2008). A review of the different methods applied in environmental geochemistry for single and sequential extraction of trace elements in soils and related materials. *Water Air Soil Pollut.*, 189, 291–333

RAS, 2017. Caratterizzazione dei sedimenti marini ai fini della reimmissione in una vasca di colmata in relazione al “Progetto per la realizzazione di una darsena pescherecci a servizio dell’impianto di stoccaggio e trasformazione del pescato” all’interno del Porto di Olbia. Regione Autonoma della Sardegna – Esiti della caratterizzazione chimico-fisica dei sedimenti, pp.12

Rauret, G., López-Sánchez, J.F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., Quevauviller, P. (1999). Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *J. Environ. Monit.*, 1(1), 57–61



- Renzi, M., Perra, G., Guerranti, C., Mariottini, M., Baroni, D., Volterrani, M., Graziosi, M., Specchiulli, A., Focardi, S. (2009). Assessment of environmental pollutants in ten southern Italy harbor sediments. *Toxicology and Industrial Health*, 25:351–363
- Ringwood, A.H., DeLorenzo, M.E., Ross, P.E., Holland, A.F.(1997). Interpretation of Microtox® solid-phase toxicity tests: The effects of sediment composition. *Environmental Chemistry*, 16, 1135-1140
- Roach, A.C.; Muller, R., Komarova, T., Symons, R., Stevenson, G.J., Mueller, J.F. (2009). Using SPMDs to Monitor Water Column Concentrations of PCDDs, PCDFs and Dioxin-Like PCBs in Port Jackson (Sydney Harbour), Australia. *Chemosphere*, 75, 1243–1251
- Roig, N., Nadal, M., Sierra, J., Ginebreda, A., Schuhmacher, M., Domingo, J.L. (2011). Novel approach for assessing heavy metal pollution and ecotoxicological status of rivers by means of passive sampling methods. *Environment International*. 37(4), 671-677
- Rusina, T.P., Smedes, F., Klanova, J. (2010). Diffusion coefficients of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in polydimethylsiloxane and low-density polyethylene polymers. *J Appl Polym Sci*, 116, 1803–1810
- Sakellari, A., Karavoltos, S., Scoullou, M. (2013). Bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn) by the marine bivalves *M. galloprovincialis*, *P. radiata*, *V. verrucosa* and *C. chione* in Mediterranean coastal microenvironments: association with metal bioavailability. *Environ. Monit. Assess.*, 185, 3383–3395
- Salem, D.M.S.A., Khaled, A., El Nemr, A. (2013). Assessment of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments of the Egyptian Mediterranean Coast. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39, 141-152
- Salvo, V.S., Gallizia, I., Moreno, M., Fabiano, M. (2005). Fungal communities in PAH-impacted sediments of Genoa-Voltri Harbour (NW Mediterranean, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 50, 553–559
- Sartori, D., Pellegrini, D., Macchia, S., Gaion, A. (2016). Can echinoculture be a feasible and effective activity? Analysis of fast reliable breeding conditions to promote gonadal growth and sexual maturation in *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 451, 39-46
- Sartori, D., Macchia, S., Vitiello, V., Morroni, L., Onorati, F., Pellegrini, D. (2017). ISPRA, Quaderni–RicercaMarinara. 11/2017. A cura di Macchia S., Sartori D., Roma, pp. 60
- Scarpato, A., Romanelli, G., Galgani, F., Andral, B., Amici, M., Giordano, P., Caixach, J., Calvo, M., Campillo, J.A., Albadalejo, J.B., Cento, A., BenBrahim, S., Sammari, C., Deudero S., Boulahdid, M., Giovanardi, F. (2010). Western Mediterranean coastal waters. Monitoring PCBs and pesticides accumulation in *Mytilus galloprovincialis* by active mussel watching: the Mytilos project. *J. Environ. Monit.*, 12, 924-935

- Schaanning, M.T., Harman, C., Staalstrøm, A. (2011). Release of dissolved trace metals and organic contaminants during deep water disposal of contaminated sediments from Oslo harbour, Norway. *J Soils Sediments*, 11, 1477–1489
- Schintu, M., Kudo, A., Sarritzu, G., Contu, A. (1991). Heavy metal distribution and mobilization in sediments from a drinking water reservoir near a mining area. *Water Air Soil Pollut.*, 57–58, 329–338
- Schintu, M., Durante, L., Maccioni, A., Meloni, P., Degetto, S., Contu, A. (2008). Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 832–837
- Schintu, M., Marras, B., Durante, L., Meloni, P., Contu, A. (2010). Macroalgae and DGT as indicators of available trace metals in marine coastal waters near a lead-zinc smelter. *Environ. Monit. Assess.*, 167(1-4), 653-661
- Schintu, M., Marrucci, A., Marras, B., Galgani, F., Buosi, C., Ibba, A., Cherchi, A. (2016). Heavy metal accumulation in surface sediments at the port of Cagliari (Sardinia, western Mediterranean): Environmental assessment using sequential extractions and benthic foraminifera. *Marine Pollution Bulletin*, 111, 45-56
- Schintu, M., Marrucci, A., Marras, B., Atzori, M., Pellegrini, D. (2018). Passive sampling monitoring of PAHs and trace metals in seawater during the salvaging of the Costa Concordia wreck (Parbuckling Project). *Mar. Pollut. Bull.* 135, 819–827
- Scoullou, M., Plavšić, M., Karavoltsos, S., Sakellari, A. (2006). Partitioning and distribution of dissolved copper, cadmium and organic matter in Mediterranean marine coastal areas: the case of a mucilage event. *Estuar. Coast Shelf Sci.*, 67, 484–490.
- Shaw, M., Müller, J.F. (2005). Preliminary Evaluation of the Occurrence of Herbicides and PAHs in the Wet Tropics Region of the Great Barrier Reef, Australia, Using Passive Samplers. *Mar. Pollut. Bull.*, 51, 876–881.
- Sherwood, J.E., Barnett, D., Barnett, N.W., Dover, K., Howitt, J., Li, H., Kew, P., Mondon, J. (2009). Deployment of DGT units in marine waters to assess the environmental risk from a deep sea tailings outfall. *Analytica Chimica Acta*, 652, 215-223
- Smedes, F., Booij, K. (2012). Guidelines for Passive Sampling of Hydrophobic Contaminants in Water Using Silicone Rubber Samplers.; *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 52, pp. 20
- Šmuc, R.N., Dolenc, M., Kramar, S., Mladenović, A. (2018). Heavy Metal Signature and Environmental Assessment of Nearshore Sediments: Port of Koper (Northern Adriatic Sea). *Geosciences*, 8(11), 398
- Spada, L., Annicchiarico, C., Cardellicchio, N., Giandomenico, S., Di Leo, A. (2013). Heavy metals monitoring in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Apulian coast (Southern Italy). *Medit. Mar. Sci.*, 14/1, 99-108

Sprovieri, M., Feo, M.L., Prevedello, L., Manta, D.S., Sammartino, S., Tamburrino, S., Marsella, E. (2007). Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy). *Chemosphere*. 67, 998-1009

Stanković, S., Jović, M.D., Milanov, R., Joksimović, D. (2011). Trace elements concentrations (Zn, Cu, Pb, Cd, As and Hg) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and evaluation of mussel quality and possible human health risk from cultivated and wild sites of the southeastern Adriatic Sea, Montenegro. *J. Serb. Chem. Soc.*, 76 (12), 1725–1737

Stephens, B.S., Mueller, J.F., Kapernick, A., Eaglesham, G. (2003). Pesticide and pharmaceutical monitoring of polar organic pollutants using solid phase extraction disks in novel aquatic passive samplers. In: 19 CRC: 19th Conference of Residue Chemists, Brisbane

Tato, T., Salgueiro-Gonzalez, N., Leon, V. M., Gonzalez, S., Beiras, R. (2018). Ecotoxicological evaluation of the risk posed by bisphenol A, triclosan, and 4-nonylphenol in coastal waters using early life stages of marine organisms (*Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Acartia clausi*). *Environmental Pollution*, 232, 173-182

Tessier, E., Garnier, C., Mullot, J.-U., Lenoble, V., Arnaud, M., Raynaud, M., Mounier, S. (2011). Study of the spatial and historical distribution of sediment inorganic contamination in the Toulon bay (France). *Marine Pollution Bulletin*, 62, 2075-2086

Tiquio, M.G.J., Hurel, C., Marmier, N., Taneez, M., Andral, B., Jordan, N., Francour, P. (2017). Sediment-bound trace metals in Golfe-Juan Bay, northwestern Mediterranean: Distribution, availability and toxicity. *Marine Pollution Bulletin* 118(1-2)

Tornero, V., Hanke, G. (2016). Chemical contaminants entering the marine environment from sea-based sources: a review with a focus on European seas. *Mar. Pollut. Bull.*, 112, 17–38.

Tueros, I., Borja, A., Larreta, J., Rodríguez, J.G., Valencia, V., Millán, E. (2009). Integrating long-term water and sediment pollution data, in assessing chemical status within the European Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 1389-1400

UNEP, 2016. Agenda item 5. Review of proposed Background Concentrations (BC)/Background Assessment Criteria (BACs)/Environmental Assessment Criteria (EACs) for contaminants and biomarkers at Mediterranean and regional scale. Proposal of assessment criteria for hazardous substances and biological markers in the Mediterranean Sea basin and its regional scale. *Meeting of the ecosystem approach correspondence group on pollution monitoring*, Marseille, France, 19-21 October 2016. UNEP(DEPI)/MED WG.427/7

UNI EN ISO 11348-3 (2019). Qualità dell'acqua - Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti) - Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati.

USACE (2003). Evaluation of dredged material proposed for disposal at island, nearshore, or upland confined disposal facilities -Testing Manual, Technical Report ERDC/EL TR-03-1, U.S. Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS

USEPA (1994). Method 200.9, Revision 2.2: Determination of trace elements by stabilized temperature graphic furnace atomic absorption. *US Environmental Protection Agency*, pp. 43

USEPA (1994). Klemm, D.J., Morrison, G.E., Norberg-Ring, J.J., Peltier, W.H., Heber, M.A. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. *U.S. Environmental Protection Agency*. Report EPA-600/4-91/003, Cincinnati, OH, pp. 483

USEPA (2001). Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. EPA 823-B-01-002. *U.S. Environmental Protection Agency*, Office of Water, Washington, DC

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

Viguri, J.R., Irabien, M.J., Yusta, I., Soto, J., Gómez, J., Rodríguez, P., Martínez-Madrid, M., Irabien, J.A., Coz, A. (2007). Physico-chemical and toxicological characterization of the historic estuarine sediments: A multidisciplinary approach. *Environmental Toxicology*, 33, 436-444

Volpi Ghirardini, A., Arizzi Novelli, A., Losso, C., Ghetti, P.F. (2005). Sperm cell and embryo toxicity tests using the sea urchin *Paracentrotus lividus*(Lmk) In: Techniques in Aquatic Toxicology, vol.II, Cap. 8, G.Ostrander (Ed) CRC press. pp. 147-168

Vystavna, Y., Huneau, F., Motelica-Heino, M., Coustumer, P., Vergeles, Y., Stolberg, F. (2012). Monitoring and flux determination of trace metals in rivers of the Seversky Donets basin (Ukraine) using DGT passive samplers. *Environmental Earth Sciences*, 65(6), 1715-1725

Wafo, E., Abou, L., Nicolay, A. Boissery, P., Perez, T., Abondo, R.N., Garnier, C., Chacha, M., Portugal, H. (2016). A chronicle of the changes undergone by a maritime territory, the Bay of Toulon (Var Coast, France), and their consequences on PCB contamination. *SpringerPlus* 5, 1230

Wafo, E., Abou, L., Nicolay, A., Boissery, P., Garnier, C., Portugal, H. (2017). Historical Trends of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Sediments of Toulon Bay (South of France). *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis*, 5(6), 150-158.

Warnken, K.W., Zhang, H., Davison, W. (2007). In situ monitoring and dynamic speciation measurements in solution using DGT. In: Greenwood, R., Mills, G., Vrana,

B. (Eds.) *Passive sampling techniques in environmental monitoring*. Elsevier, Amsterdam, 251-278

Zhang, H., Davison, W. (1995). Performance characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. *Analytical Chemistry* 67, 3391-3400

Zorita, I., Joana, Larreta, J., Montero, N., Rodríguez, J.-G., Franco, J., Borja Á. (2015). Evaluation of the use of bioaccumulation and biological effects tools in caged mussels, within the European Water Framework Directive. *Chemistry and Ecology*, 31:5, 432-445

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, 173–179

## PRODOTTO T2.3.6

# ***RIMOBILIZZAZIONE/RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI E AMBIENTE COSTIERO***

**Descrizione:** *report sull'applicazione del campionamento passivo in sostituzione delle tecniche tradizionali per la valutazione dei processi di rimobilizzazione/risospensione dei sedimenti nei porti (UNICA, UNTLN, ISPRA).*

**SE.D.Ri.Port – Sedimenti, Dragaggi, Rischi Portuali**

<http://interreg-maritime.eu/web/se.d.ri.port>

**Responsabile azione T2.3. “Raccolta ed implementazione dei dati relativi alla qualità ambientale dei sedimenti di accumulo e delle possibili aree di destinazione dei materiali dragati nei porti oggetto di studio-caratterizzazioni”**

**UNICA** -Università degli Studi di Cagliari- Via Università 1, 09142 Cagliari

[www.unica.it/](http://www.unica.it/)

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

Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma

[www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)

**UTLN**- Università di Tolone, CS 60584, 83041 Toulon cedex 9

<http://www.univ-tln.fr/>

**Coordinatore UNICA:** Marco Schintu

**Coordinatore ISPRA:** Davide Sartori

**Coordinatore UNITLN:** Benjamin Misson

**Estensori del Report:** Natalia Montero, Barbara Marras, Marco Schintu, Simona Macchia, Alice Scuderi, Davide Sartori, Véronique Lenoble, Benjamin Misson

**Ringraziamenti:** Alessandra Mannai, Maria Elena Piccione, Silvia Giuliani, Stefano Ferrari, Fabiano Pilato, David Pellegrini, Valentina Vitiello, Nicolas Layglon, Nicolas Gallois, Aurélie Portas, Alexis Canino, Nezli Doumandji, Louis Longo

<b>1. Il campionamento passivo dei contaminanti nelle acque marine .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Campionatori passivi utilizzati nel Progetto SEDRIPORT per il monitoraggio di composti organici .....</b>	<b>8</b>
2.1. Silicone Rubber (SR).....	8
2.2. Polar Organic Compounds Integrative Sampler (POCIS) .....	8
2.3. Stima delle concentrazioni acquose.....	9
<b>3. I campionatori passivi per i metalli in traccia .....</b>	<b>11</b>
3.1. Diffusive Gradients in Thin-films (DGT).....	11
3.2. Calcolo della concentrazione misurata con i DGT.....	12
<b>4. Confronto tra campionamento passivo e utilizzo dei mitili per il biomonitoraggio.....</b>	<b>13</b>
<b>5. Test di tossicità su estratti da SPMD, SR e POCIS.....</b>	<b>15</b>
<b>6. Vantaggi del monitoraggio con campionamento passivo rispetto all'uso di mitili o altri biomonitor .....</b>	<b>16</b>



## 1. Il campionamento passivo dei contaminanti nelle acque marine

Negli ambienti acquatici il monitoraggio degli agenti inquinanti è necessario per ottemperare a quadri legislativi e direttive, in quanto molti di essi rappresentano una minaccia sia per la salute degli esseri umani che degli ecosistemi (EEA 2011). Un certo numero di composti tossici sono considerati inquinanti prioritari e la direttiva quadro in materia di acque della Unione Europea (Direttiva 2000/60/CE; EC 2000) richiede la loro misurazione per garantire che le concentrazioni degli inquinanti siano sotto gli standard di qualità ambientali (SQA) per l'acqua (es. Allan et al. 2006a, 2006b). Tuttavia il campionamento e l'analisi di un'ampia gamma di sostanze, sia organiche (ad esempio, clorofenoli, organo-cloro pesticidi, poliaromatici, idrocarburi, policlorobifenili) che inorganiche (metalli pesanti) in acqua di mare rappresenta una sfida per i chimici ambientali (Cocquery et al. 2005; Lepom et al. 2009). Il Progetto SEDRIPORT ha come obiettivo la valutazione e gestione dei rischi ambientali legati alla movimentazione dei sedimenti nei porti. Uno studio comparato delle normative in materia di dragaggi per la gestione dei sedimenti in vigore in Italia, Francia e in ambito internazionale per l'individuazione delle criticità (ambientali e tecnico/logistiche) relative alla gestione della filera marino-costiera (gestione acquatica) è stato esposto in dettaglio nel prodotto SEDRIPORT T1.2.2. La maggior parte dei programmi di monitoraggio acquatico si basa sul prelievo di campioni d'acqua in un preciso momento (*spot sampling*). Spesso, quando le sostanze inquinanti sono presenti solo a livello di tracce, è necessario prelevare grandi volumi d'acqua, mentre le successive analisi di laboratorio forniscono solo un'istantanea dei livelli di inquinanti al momento del campionamento. In molti ambienti le concentrazioni di contaminanti variano nel tempo (es. alta/bassa marea, acque estuarine, fiumi), ed eventuali inquinamenti episodici potrebbero non essere rilevati. Una soluzione sarebbe quella di aumentare la frequenza del campionamento e/o di installare sistemi di campionamento automatico che possano prelevare numerosi campioni d'acqua in un determinato intervallo di tempo. Queste procedure sono tuttavia costose e in molti casi impraticabili, e sono difficilmente utilizzabili in campagne di monitoraggio su vasta scala. Il campionamento *spot* fornisce inoltre concentrazioni degli inquinanti diverse a seconda del tipo di pretrattamento applicato (ad esempio filtraggio) e non fornisce informazioni sulla vera e propria frazione disciolta e biodisponibile dei contaminanti.

L'approccio più comune per ottenere informazioni sulle concentrazioni biodisponibili di inquinanti in acque marine è l'utilizzo del biota, ed in particolare dei mitili. Gli organismi possono essere esposti per periodi di tempo prolungati, durante i quali accumulano le sostanze inquinanti presenti nell'acqua circostante. Le analisi dei tessuti o degli estratti lipidici dell'organismo utilizzato per i test possono dare un'indicazione del livello di contaminazione dell'acqua. Una serie di fattori biotici e abiotici può tuttavia influenzare i risultati - metabolismo, tassi di depurazione, escrezione, stress, vitalità e condizione dell'organismo di prova. Inoltre, l'estrazione degli analiti dal tessuto prima dell'analisi strumentale è complessa.

Negli ultimi due decenni sono state cercate alternative per superare le difficoltà esposte. Tra queste, i metodi di campionamento passivo si sono rivelati promettenti strumenti per la misurazione delle concentrazioni nell'acqua di mare di una vasta gamma di inquinanti prioritari (es. Montero et al. 2012; Schintu et al. 2014). In questo senso l'utilizzo del campionamento passivo per la valutazione della qualità ambientale nelle aree portuali è stato precedentemente raccomandato (Montero et al. 2013; Monteyne et al. 2013). In Italia l'utilizzo dei campionatori passivi è stato inserito nell'Allegato Tecnico del DM 173/2016 (DM 2016) "Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini".

Nei campionatori passivi, gli analiti sono intrappolati o trattiene in un mezzo adatto (*fase ricevente*), esposto nella *fase acquosa* e accumulano gli inquinanti *in situ* senza influire sulla soluzione acquosa (Figura 1). Dall'analisi della massa dell'inquinante accumulata è possibile ricavare la concentrazione media nel tempo (Time Weighted Average, TWA) durante il quale il campionatore è stato esposto. Nell'acqua i contaminanti presenti si ripartiscono tra la fase disciolta e la fase particolata in base alla loro proprietà fisico-chimiche. Per i prodotti organici, molti coefficienti di ripartizione sono stati stabiliti sperimentalmente in base a determinate condizioni e sono di uso comune, in particolare il coefficiente ottanolo-acqua ( $K_{OW}$ ). Il  $\log_{KOW}$  definisce contaminanti non polari con valori tipicamente compresi tra il 3 e 8; i contaminanti polari hanno valori  $<3$ . Inquinanti non polari (ad esempio PCB, PCDD e PCDF) si adsorbono al particolato sospeso e quindi vengono rimossi per sedimentazione più velocemente dalla colonna d'acqua. Con l'aumento della polarità degli inquinanti, aumenta la frazione che si solubilizza nella fase acquatica.

Il campionamento passivo può essere definito in senso più ampio come qualsiasi tecnica

di campionamento basata sul flusso libero delle molecole dell'analita dal mezzo campionato a una fase ricevente in un dispositivo di campionamento, come risultato di una differenza tra i potenziali chimici dell'analita nei due media. Il flusso netto delle molecole dell'analita continua finché non si stabilisce l'equilibrio nel sistema, o fino a quando il periodo di campionamento viene interrotto. Il campionamento avviene senza la necessità di qualsiasi fonte di energia diversa da questo potenziale chimico.

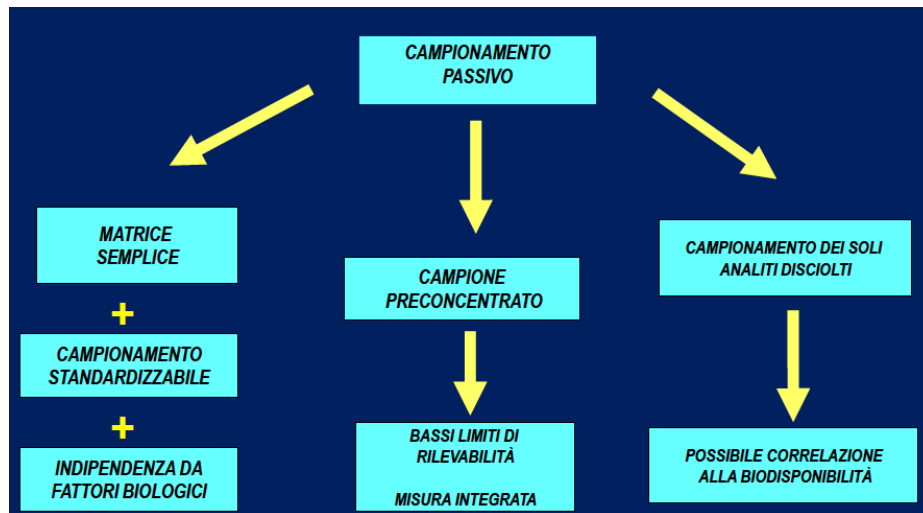


Figura 1. Vantaggi del campionamento passivo.

Lo scambio tra un campionatore e la fase acquosa segue una cinetica del primo ordine e può essere descritto come segue:

$$C_s(t) = C_w \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad (1)$$

dove  $C_s(t)$  è la concentrazione dell'analita nel campionatore al tempo di esposizione  $t$ ,  $C_w$  è la concentrazione dell'analita nell'ambiente acquoso, e  $k_1$  e  $k_2$  sono, rispettivamente, le costanti di velocità di assorbimento e di rilascio. Durante il periodo di esposizione sul campo del campionatore passivo si possono distinguere due modalità di accumulo, cinetico (o integrativo) e all'equilibrio (Figura 2).

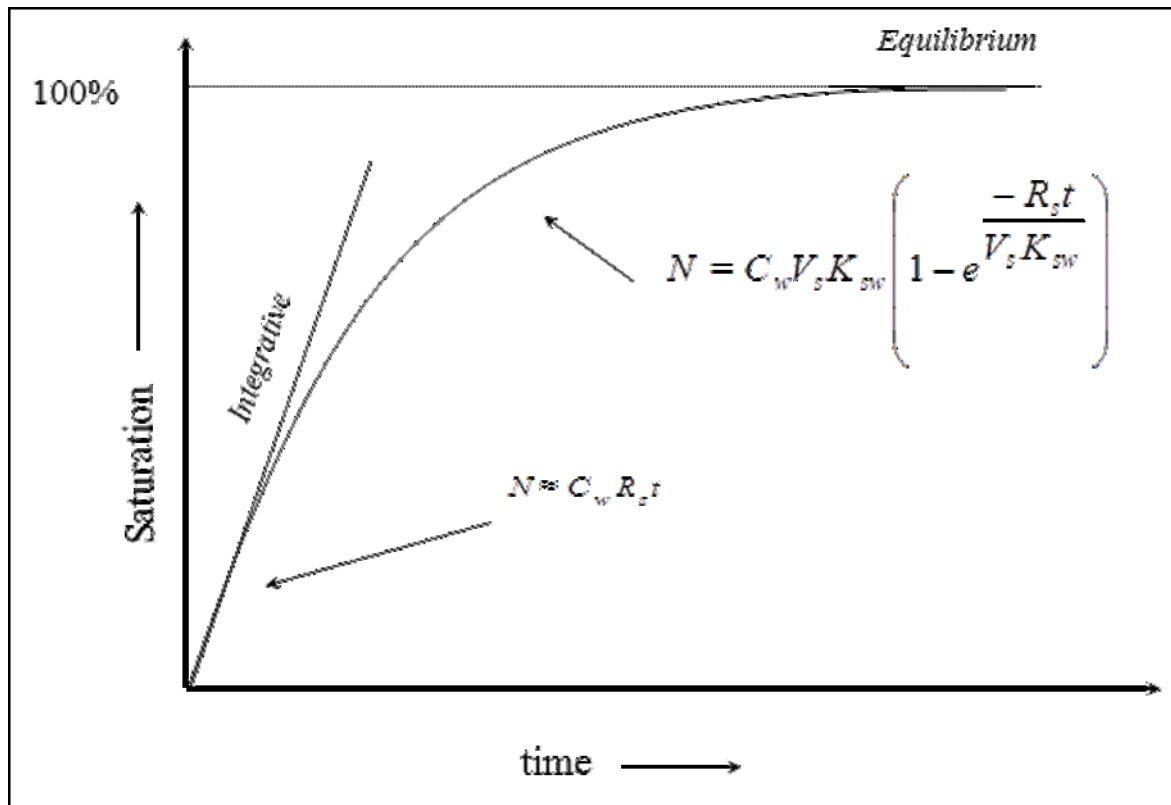


Figura 2. Cinetica di uptake dei contaminanti in un campionatore passivo (da Schintu et al. 2014).

Sono stati sviluppati diversi modelli di campionatori passivi per monitorare una vasta gamma di inquinanti (organici non polari, organici polari e metalli in traccia):

- 1) I campionatori per organici non polari consistono in un polimero amorfo o resina per la quale gli analiti hanno un'elevata affinità. Possono avere un elevato assorbimento (fino a diversi litri al giorno) per i composti presenti nell'intervallo di  $\log_{KOW}$  tra 3.5-8. Quelli più comunemente usati sono: Silicone Rubber (Smedes et al. 2009; Rusina et al. 2010), SPMD (Semipermeable Membrane Devices) (Huckins et al. 1990) e Chemcatcher (Mills et al. 2011).
- 2) Per i composti polari si utilizzano i POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler) (Alvarez et al. 2004) e i Chemcatcher (Allan et al. 2008).
- 3) Per quanto riguarda i metalli, i DGT (Diffusive Gradients in Thin-films) (Davison e Zhang 1994) sono la tecnica di campionamento più diffusa.

## 2. Campionatori passivi utilizzati nel Progetto SEDRIPORT per il monitoraggio di composti organici

### 2.1. Silicone Rubber (SR)

I campionatori passivi SR sono costituiti da strisce o fogli di elastomeri silicici, come il polidimetilsilossano (PDMS). I polimeri SR si sono dimostrati idonei sia al campionamento che all'estrazione con solvente e all'analisi in GC/MS di contaminanti non polari. Prima del loro utilizzo è necessaria una fase di pulizia per la rimozione di eventuali oligomeri che, se non accuratamente rimossi, possono causare interferenza strumentale durante l'analisi (Figura 3).

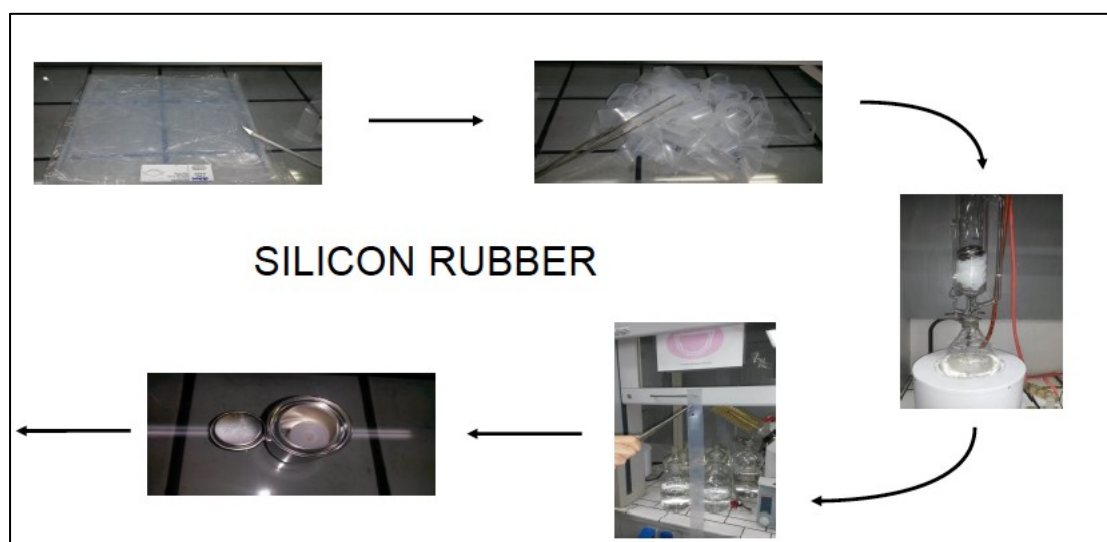


Figura 3 . Preparazione in laboratorio del Silicone Rubber da utilizzare nel campionamento delle sostanze organiche non polari.

### 2.2. Polar Organic Compounds Integrative Sampler (POCIS)

I POCIS permettono di campionare prodotti chimici organici con  $\log K_{OW} < 3$ , vale a dire la maggior parte di prodotti farmaceutici, droghe illecite, pesticidi polari, ritardanti di fiamma, tensioattivi, metaboliti e prodotti di degradazione. Tuttavia, anche composti con  $\log K_{OW} > 3$  come ormoni steroidei, profumi, triclosan e altre sostanze chimiche presenti nelle acque reflue vengono campionati preferibilmente con i POCIS. Rispetto a molti dei campionatori per gli inquinanti non polari, i POCIS hanno una superficie di campionamento relativamente piccola. Il POCIS è costituito da due membrane microporose (di solito con pori di 0,1 micron) in polietersulfone che avvolgono una resina di estrazione in fase solida.

Le membrane permettono il passaggio di acqua e sostanze chimiche disciolte fino all'assorbente dove le sostanze chimiche sono intrappolate (Figura 4).

Il campionatore viene generalmente compresso utilizzando due anelli in acciaio inossidabile, che hanno una superficie di esposizione di 41-46 cm<sup>2</sup>. Sono disponibili in commercio due configurazioni del POCIS, denominate *farmaceutical* e *pesticide*. Questa seconda configurazione è più efficace per l'assorbimento e il recupero di alcune classi di composti polari, compresi i pesticidi e gli ormoni (Alvarez et al. 2004). Prima dell'analisi chimica o del test di tossicità, i campioni sono sottoposti a pulizia esterna, estrazione con solventi e recupero chimico, arricchimento e frazionamento.

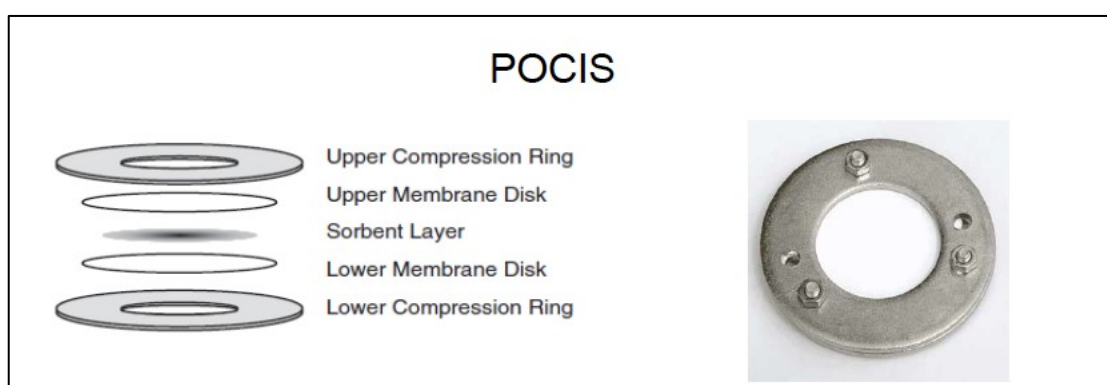


Figura 4. Un campionatore POCIS.

### 2.3. Stima delle concentrazioni acquose

La teoria dell'assorbimento e della modellazione applicabile al campionamento passivo (PS) è trattata in dettaglio altrove (ad es. Huckins et al. 2006; Booij et al. 2007). In sintesi, l'assorbimento di sostanze chimiche nei campionatori passivi segue le fasi lineari, curvilinee e di equilibrio durante il periodo di esposizione. Nella fase iniziale il flusso verso la fase ricevente è linearmente proporzionale alla concentrazione libera dell'analita nella colonna d'acqua. L'assorbimento lineare (o integrativo) è la fase predominante per i composti con valori di  $\log K_{ow} \geq 5.0$  e per periodi di esposizione fino a un mese. Durante questa fase la concentrazione ( $C_w$ ) è determinata da:

$$C_w = \frac{N}{R_s t} \quad (2)$$

dove N è la quantità di sostanza chimica accumulata dal campionatore (generalmente in nanogrammi), t è il tempo di esposizione (d, giorni) e  $R_s$  è la frequenza di campionamento dell'acqua (litri/giorno,  $L d^{-1}$ ) misurata in laboratorio. Il prodotto  $R_s t$  può essere interpretato come il volume d'acqua estratto. I valori  $R_s$  devono essere misurati per ogni analita di interesse, e possono variare in base alla temperatura dell'acqua, alla turbolenza dell'acqua e al grado di biofouling sulla superficie di diffusione di un campionatore.

Per lunghi tempi di esposizione, il flusso al campionatore può diminuire, perché l'analita si avvicina alla sua concentrazione di equilibrio nel campionatore. Nel caso di campionatori non polari, le condizioni di equilibrio sono ben caratterizzate da coefficienti di ripartizione. Questa fase di campionamento è quindi nota come campionamento di equilibrio. Il tempo per raggiungere l'equilibrio è una funzione della struttura del composto e spesso può essere previsto sulla base dei valori di  $K_{ow}$ . L'equazione generalizzata che regola l'assorbimento di un analita non polare con il tempo è data da Huckins et al. (2006):

$$N = C_w V_s K_{sw} \left[ 1 - \exp\left(\frac{-R_s t}{V_s K_{sw}}\right) \right] \quad (3)$$

dove N è la quantità di analita accumulata,  $C_w$  è la concentrazione acquosa,  $V_s$  è il volume del campionatore,  $K_{sw}$  è il coefficiente di partizione del campionatore-acqua (unità di volume/volume) e t è il tempo di esposizione. Valori accurati di  $K_{sw}$  dovrebbero essere disponibili dagli studi di calibrazione. Dovrebbero essere note anche le frequenze di campionamento in situ; tuttavia, l' $R_s$  di molti composti non polari dipende dal flusso dell'acqua e dalla temperatura dell'acqua nel sito di esposizione (Figura 2).

Alcuni fattori ambientali (e.g. turbolenza dell'acqua, luce solare, biofouling) possono influenzare i meccanismi dei processi di scambio. Per compensarne l'effetto sulla prestazione del campionatore sono stati messi a punto diversi metodi, il più importante dei quali (Booij et al. 2002), utilizzato nel campionamento di sostanze organiche non polari (con i campionatori SR e SPMD), prevede l'aggiunta in laboratorio, prima della deposizione del campionatore, di PRC (Performance Reference Compounds), composti non presenti nell'ambiente. I PRC sono sostanze analoghe agli analiti in esame, cogeneri o marcate con deuterio o  $C^{13}$ . I valori misurati dei tassi di perdita di PRC sono utilizzati per tener conto di qualsiasi fattore che influisce sulle differenze tra le condizioni di esposizione dello studio di campo e di calibrazione.

I campionatori per gli analiti polari sono quasi esclusivamente utilizzati nella fase di assorbimento lineare. La stima delle concentrazioni in acqua dai dati POCIS è attualmente limitata dalla indisponibilità di dati  $R_s$  di derivazione sperimentale. I dati precedenti indicano che molte sostanze chimiche di interesse campionate dal POCIS rimangono nella fase integrativa di campionamento per almeno 56 giorni (Alvarez et al. 2004, 2010); pertanto è giustificato l'uso del modello di assorbimento integrativo (eq. 1) per il calcolo delle concentrazioni. Tuttavia è fondamentale determinare quando un contaminante ha raggiunto l'equilibrio tra la fase disciolta e il campionatore. Una delle maggiori sfide che l'uso quantitativo di POCIS deve affrontare è la mancanza di un metodo (come l'utilizzo di *performance reference compound* nei campionatori non polari) per correggere le condizioni di esposizione in situ che notoriamente influenzano i tassi di assorbimento.

### **3. I campionatori passivi per i metalli in traccia**

#### **3.1. Diffusive Gradients in Thin-films (DGT)**

Le specie metalliche sono presenti nell'acqua marina in differenti forme chimiche, come ioni liberi, complessi inorganici, specie organometalliche o grandi complessi organici. Il destino finale dei metalli nei diversi compartimenti ambientali e l'impatto sugli organismi biologici dipendono principalmente dalla loro forma chimica. È noto che la tossicità dei metalli può essere correlata alla loro labilità e mobilità nell'ambiente marino, che determina la loro disponibilità per il biota. In questo senso, diversi studi hanno mostrato che l'assorbimento è legato solo all'attività degli ioni liberi del metallo o alle forme metalliche labili piuttosto che alla sua concentrazione totale.

I DGT (Diffusive Gradients in Thin-films) sono stati sviluppati da Davison e Zhang (1994) presso l'Università di Lancaster, UK (Figura 5). I DGT sono uno strumento di monitoraggio delle specie metalliche labile nelle acque naturali, e sono stati utilizzati per misurare una vasta gamma di analiti inorganici (e recentemente analiti organici non polari) in acque naturali e sedimenti. Informazioni dettagliate sui principi del funzionamento del DGT sono state pubblicate altrove (ad esempio Davison e Zhang 2012).



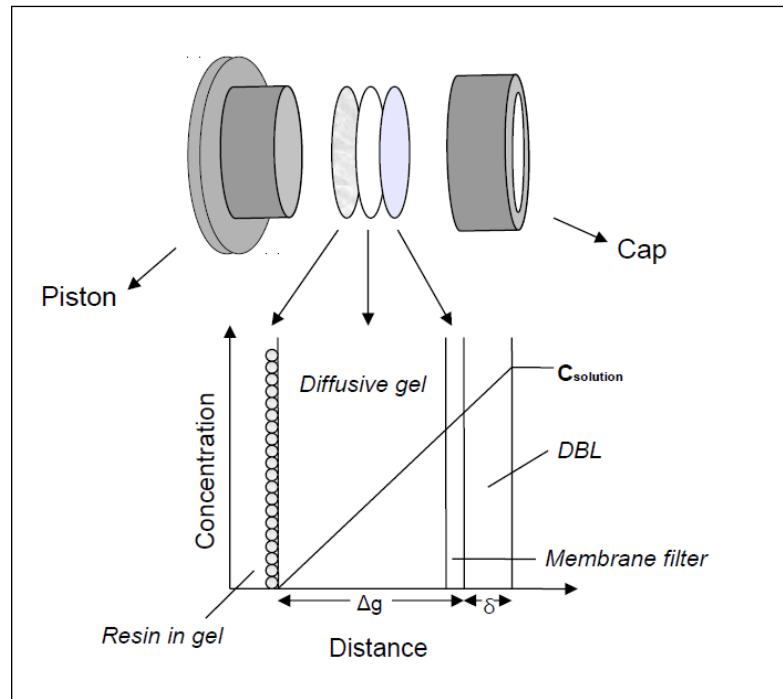


Figura 5. Struttura schematica di un campionatore DGT (da Schintu et al. 2014).

Un campionatore DGT è un semplice dispositivo che accumula i soluti su un legante dopo il passaggio attraverso un gel diffusivo. La tecnica si basa sulla creazione di un gradiente di concentrazione costante dalla soluzione al legante (Zhang e Davison 1995). I metalli in traccia sono solitamente misurati utilizzando uno strato di resina chelante Chelex 100. Secondo la prima legge di diffusione di Fick, la concentrazione nella soluzione ( $C_{DGT}$ ) può essere calcolata dalla massa di metallo ( $M$ ) accumulata nello strato di resina dopo un tempo di distribuzione noto ( $t$ ). Al termine dell'esposizione gli ioni chelati dalla resina sono eluiti con  $HNO_3$  1M e determinati analiticamente. Per misurare specie anioniche come As, Se, P, Al e U si utilizzano DGT a base di biossido di titanio (Metsorb-DGT) (Panther et al. 2013). Per misurare il mercurio, Docekalova e Divis (2005) hanno utilizzato uno strato di gel diffusivo di agarosio e una resina Spheron-Thiol al posto del Chelex 100.

### 3.2. Calcolo della concentrazione misurata con i DGT.

La massa del metallo nella resina gel ( $M$ ) può essere ottenuta usando l'equazione

$$M = C_e (V_{HNO_3} + V_{gel})/f_e \quad (4)$$

dove  $C_e$  è la concentrazione del metallo eluito nella soluzione 1M  $HNO_3$  (in ng/L),  $V_{HNO_3}$  è

il volume di  $\text{HNO}_3$  aggiunto alla resina gel,  $V_{\text{gel}}$  è il volume della resina gel (in genere 0.16 ml) e  $f_e$  è il fattore di eluizione per ogni metallo, in genere 0.8.

La concentrazione del metallo misurato dal DGT ( $C_{\text{DGT}}$ ) può essere calcolata usando l'equazione:

$$C_{\text{DGT}} = MDg/(DtA) \quad (5)$$

dove  $Dg$  è lo spessore del gel diffusivo (0.8 mm) più lo spessore della membrana filtrante (in genere 0.14 mm),  $D$  è il coefficiente di diffusione del metallo nel gel,  $t$  è il tempo di esposizione e  $A$  è l'area di esposizione ( $A=3.14 \text{ cm}^2$ ).

#### **4. Confronto tra campionamento passivo e utilizzo dei mitili per il biomonitoraggio**

Le strategie per monitorare i livelli e il trend della concentrazione di metalli in tracce e di altri inquinanti, come gli IPA e i PCB, nelle acque costiere si sono ampiamente basate sull'uso dei mitili, da quando il concetto di Mussel Watch è stato proposto da Goldberg (1975). Il bioaccumulo da parte di questi organismi fornisce dati biologicamente rilevanti sulle concentrazioni disponibili di inquinanti nell'acqua, poiché può essere di diversi ordini di grandezza superiore a quello trovato nell'acqua di mare, riducendo la frequenza di campionamento e i costi delle analisi. Tuttavia, l'interpretazione dei dati di biomonitoraggio rivela difficoltà legate a numerosi fattori biotici e abiotici che possono influenzare i risultati. I problemi includono le interferenze sull'assorbimento di sostanze tossiche da parte di fattori biotici come l'età, le dimensioni, il sesso, l'attività di alimentazione e lo stato riproduttivo, e di fattori abiotici come i livelli di carbonio organico, la temperatura, il pH, i livelli di ossigeno disciolto e l'idrologia e le interazioni dei metalli disciolti.

È importante notare che tutte le specie di biomonitor hanno una distribuzione biogeografica ristretta, quindi diverse specie di biomonitor con diverse strategie di accumulo degli inquinanti devono essere utilizzate in diversi regimi geografici o idrografici, rendendo difficile, se non impossibile, il confronto dei livelli di contaminanti metallici e organici tra le regioni. Non esiste una singola specie che possa essere utilizzata in tutto il mondo.

Analogamente ai mitili, i campionatori passivi sono in grado di preconcentrare i contaminanti in tracce e presenti in forma disciolta fornendo una misura integrata nel tempo dei loro livelli in acqua. Tuttavia è ampiamente dimostrato che i mitili possono accumulare contaminanti in due modi: l'assorbimento di sostanze chimiche disciolte nell'acqua e l'alimentazione con particelle sospese a cui sono legati gli inquinanti.

Gli SPMD sono stati originariamente progettati come strumenti di monitoraggio per imitare l'assorbimento di sostanze chimiche idrofobiche da parte di un organismo biologico (Hutchins et al. 1990). Un certo numero di studi ha confrontato l'assorbimento di composti non polari come IPA, PCB, OCP e PBDE da parte degli SPMD con quello delle cozze (ad esempio Richardson et al. 2001; Boehm et al. 2005; Booij et al. 2006; Smedes 2007; Harman et al. 2011; Bourgeault e Gourlay-Francé 2013). È stata suggerita cautela nell'interpretare direttamente i risultati dei due approcci di monitoraggio, in quanto, come già detto, gli SPMD misurano solo la frazione idrosolubile degli inquinanti, mentre le cozze possono sequestrare gli inquinanti presenti sia nella frazione idrosolubile che in quella legata alle particelle. Tuttavia, entrambi i metodi possono fornire informazioni complementari sulla biodisponibilità dei *Persistent Organic Pollutants* (POPs) agli organismi marini superiori e sul trasferimento di queste sostanze chimiche attraverso la catena alimentare. Gli accumuli di IPA e PCB in *Mytilus edulis* e in Silicone Rubber (SR) sono stati confrontati da Smedes (2007). Sono state utilizzate otto stazioni di campionamento nel Mare di Wadden, Schelda orientale e occidentale al largo delle coste dei Paesi Bassi. Nel complesso, c'è stata una stretta relazione tra le concentrazioni riscontrate nelle cozze e quelle derivate dalle esposizioni dei campionatori passivi. Le variazioni stagionali dei profili e delle concentrazioni di inquinanti si sono riflesse in entrambi i metodi di monitoraggio.

I DGT sono stati postulati come possibile alternativa chimica ai bivalvi per fornire registrazioni integrate dell'inquinamento da tracce di metalli (Davison e Zhang 1994). Solo le specie labili, come le forme ioniche e i complessi facilmente dissociabili, sono assorbite dai DGT e queste specie hanno maggiori probabilità di rappresentare una frazione biodisponibile rispetto al metallo totale. Schintu et al. (2008) valutarono l'utilità di una combinazione di tecniche di biomonitoraggio e DGT per una migliore comprensione della disponibilità di metalli in traccia nelle acque costiere. Allo stesso modo nel progetto SEDRIPORT si è deciso di integrare le informazioni ottenute dai mitili trapiantati con quelle del campionamento passivo, per ottenere una valutazione integrata della qualità dell'acqua all'interno dei porti studiati (Olbia e La Spezia). Una descrizione più dettagliata

delle campagne di campionamento effettuate e dei risultati ottenuti si può trovare nel prodotto SEDRIPORT T2.3.5. Sulla base di quanto su esposto, le due tecniche forniscono informazioni complementari. I campionatori passivi misurano solo i contaminanti in fase disciolta, i mitili accumulano sia dalla soluzione che dal particolato. Pertanto l'utilizzo di entrambe le tecniche consente di ottenere un quadro più completo per la valutazione della presenza di contaminanti nelle aree di studio.

## **5. Test di tossicità su estratti da SPMD, SR e POCIS**

Nella maggior parte dei casi, gli organismi acquatici non sono esposti a una singola sostanza, ma a una miscela di sostanze chimiche. È ormai comunemente riconosciuto che i set di dati acquisiti nell'ambito dei programmi di monitoraggio ambientale degli ecosistemi costieri attraverso le analisi chimiche convenzionali, pur essendo efficaci nel descrivere tipi e livelli dei più comuni inquinanti potenziali, non sono utili per dedurre i loro effetti biologici sugli organismi che vivono nell'ambiente circostante, né quelli specifici né quelli interattivi che ci si aspetta derivino dall'effettiva miscela di contaminanti (rilevati o addirittura non rilevati). L'accoppiamento di analisi chimiche con saggi biologici di estratti di campionatori passivi può fornire informazioni rappresentative sulle esposizioni medie agli inquinanti biologicamente attivi sequestrati. Questo approccio può informare coloro che sono coinvolti nella valutazione del rischio del significato tossicologico dei carichi di inquinanti ambientali. Gli estratti di SR, SPMD e POCIS possono essere combinati con una serie di test di tossicità per determinare il potenziale effetto sul biota dell'esposizione alle complesse miscele di sostanze chimiche presenti in un sito. I test biologici utilizzati hanno incluso, ma non solo, Microtox, Mutatox, l'attività di induzione della funzione mista ossigenasi (MFO), il test EROD, l'induzione della vitellogenina, il saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), Daphtoxkit F, i test di mutagenicità di Ames, lo Yeast Estrogen Screen (YES) (ad esempio Alvarez et al. 2007, 2008; Liscio et al. 2009; Shaw et al. 2009). Altri studi che hanno proposto di esporre gli organismi del biotest alle miscele di contaminanti estratte dai campionatori passivi sono quelli di Pesce et al. 2011; Booij et al. 2013; Claessens et al. 2015; Pickford et al. 2015). Questo approccio può contribuire alle procedure di valutazione del rischio, dando informazioni sul livello di inquinanti ambientali che forniscono risposte ecotossicologiche significative (Schintu et al. 2018). Nel progetto SEDRIPORT la potenziale tossicità degli estratti dei POCIS esposti nei diversi porti è stata testata con saggi biologici. I risultati ottenuti sono riportati nel prodotto SEDRIPORT T2.3.5.

## 6. Vantaggi del monitoraggio con campionamento passivo rispetto all'uso di mitili o altri biomonitor

1. A differenza dei campionatori passivi, i biomonitor contengono spesso livelli di contaminazione di fondo e sono naturalmente variabili nella composizione. Di conseguenza, la variabilità dell'analisi chimica del biota è nella maggior parte dei casi superiore a quella associata all'analisi dei campionatori passivi.
2. I campionatori passivi forniscono estratti che contengono meno interferenze della matrice rispetto agli estratti del biota e dei sedimenti.
3. Il campionamento passivo può essere applicato in quasi tutti gli ambienti con una vasta gamma di proprietà di qualità dell'acqua e anche in siti in cui gli organismi di biomonitoraggio possono non sopravvivere (ad esempio temperatura, ossigeno, pH, inquinamento e salinità).
4. Il processo di assorbimento degli inquinanti nei campionatori passivi è semplice (per diffusione e assorbimento), mentre è più complesso negli organismi.
5. Gli estratti di SR, SPMD e POCIS possono essere utilizzati per saggi di tossicità.

## BIBLIOGRAFIA

- Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A., Knutsson, J., Holmberg, A., Guigues, N., Fouillac, A.M., Laschi, S. (2006a). Strategic monitoring for the European Water Framework Directive. *TrAC* 25(7), 704–715.
- Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A., Roig, B., Gonzalez, C. (2006b). A 'toolbox' for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69 (2), 302–322.
- Allan, I.J., Knutsson, J., Guigues, N., Mills, G.A., Fouillac, A.M., Greenwood, R. (2008). Chemcatcher and DGT passive sampling devices for regulatory monitoring of trace metals in surface water. *J. Environ. Monit.* 10 (7) 821–829.
- Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P., Manahan, S.E. (2004). Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1640–1648.
- Alvarez, D.A., Huckins, J.N., Pelly, J.D., Jones-Lepp, T., SLUerLauridsen, F., GWing, D.T.,

- Goddard, J.P., Gravell, A. (2007). Chapter 8. Tool for monitoring hydrophilic comaminants in waler: polar organic chemical integrative sampler (POCIS). *Compr. Anal. Chem.* 16 May 2013. 48, 171-197
- Alvarez, D.A., Cranor, W.L., Perkins, S.D., Clark, R.C., Smilh, S.B. (2008). Chemical and loxicologic assessmem of organic contaminants in surface waler using passive samplers. *J. Environ. Qual.* 37(3). 1024-1033
- Alvarez, D.A. (2010). Guidelines for the Use of the Semipermeable Membrane Device (SPMD) and the Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) in Environmental Monitoring Studies. *Techniques and Methods 1–D4. U.S. Department of the Interior-U.S. Geological Survey.*
- Boehm, P.D., Page, D.S., Brown, J S., Neff, J.M., Bence, A.E. (2005). Comparison of mussels and semi-permeable membrane devices as intertidal monitors of polycyclic aromatic hydrocarbons at oil spill sites. *Mar. Pollut. Bull.*, 50(7), 740-750.
- Booij, K., Smedes, F., Van Weerlee, E.M. (2002). Spiking of Performance Reference Compounds in low density polyethylene and silicone passive water samplers. *Chemosphere* 46, 1157–1161.
- Booij, K., Smedes, F., Van Weerlee, E.M., Honkoop, P.J.C. (2006). Environmental monitoring of hydrophobic organic contaminants: The case of mussels versus semipermeable membrane devices. *Environ. Sci. Technol.* 40(12), 3893-3900.
- Booij, K., Vrana, B., Huckins, J.N. (2007). Theory, Modeling and Calibration of Passive Samplers Used in Water Monitoring. In: Greenwood, R., Mills, G., Vrana, B. (eds) *Passive Sampling Techniques in Environmental Monitoring. Comprehensive Analytical Chemistry*, 48, pp. 141–169. Elsevier.
- Booij, P., Sjollema, S.B., Leonards, P.E.G., de Voogt, P., Stroomberg, G.J., Vethaak, A.D., Lamoree, M.H. (2013). Extraction tools for identification of chemical contaminants in estuarine and coastal waters to determine toxic pressure on primary producers. *Chemosphere* 93, 107-114.
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C. (2013). Monitoring PAH contamination in water: Comparison of biological and physico-chemical tools. *Sci. Total Environ.* 454-455, 328–336.
- Claessens M., Monteyne E., Wille K., Vanhaecke L., Roose P. and Janssen C. (2015). Passive sampling reversed: coupling passive field sampling with passive lab dosing to assess the ecotoxicity of mixtures present in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.*, 93 (1-2), 9-19

- Coquery, M., Morin, A., Becue, A., Lepot, B. (2005). Priority substances of the European Water Framework Directive: analytical challenges in monitoring water quality. *TrAC* 24,117–127.
- Davison, W., Zhang, H. (1994). In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367, 546.
- Davison, W., and Zhang, H. (2012). Progress in understanding the use of diffusive gradients in thin films (DGT) back to basics. *Environ. Chem.* 9(1), 1-13.
- DM (2016). Decreto Ministeriale 173/2016 – Regolamento recante modalita' e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini. Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale n. 208.
- Docekalova, H., Divis, P. (2005). Application of diffusive gradient in thin films technique (DGT) to measurement of mercury in aquatic systems. *Talanta* 65, 1174–1178.
- EC (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. *Off. J. of the Eur. Comm.* L327, 1-72.
- EEA (2011). Hazardous substances in Europe's fresh and marine waters. A review. Technical Report No. 8, Copenhagen
- Goldberg, E.D. (1975). The mussel watch – A first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 6, 111.
- Harman, C., Brooks, S., Sundt, R.C., Meier, S., Grung, M. (2011). Field comparison of passive sampling and biological approaches for measuring exposure to PAH and alkylphenols from offshore produced water discharges. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 141–148.
- Huckins, J.N., Tubergen, M.W., Manuweera, G.K. (1990). Semipermeable membrane devices containing model lipid: A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere* 20, 533–552.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Booij, K. (2006). Monitors of organic chemicals in the environment with Semipermeable Membrane Devices. Springer, New York.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Almeida, F.V., Booij, K., Alvarez, D. Cranor, W.L., Clark, R.C., Betty B Mogensen, B.B. (2012). Development of the Permeability/Performance Reference Compound approach for in situ calibration of Semipermeable Membrane Devices. *Environ. Sci. Technol.* 36, 85–91.
- Lepom, P., Brown, B., Hanke, G., Loos, R., Quevauviller, P., Wollgast, J. (2009). Needs

- for reliable analytical methods for monitoring chemical pollutants in surface water under the European Water Framework Directive. *J Chromatogr A* 16;1216(3): 302-15.
- Liscio C., Magi E., Di Carro M., Suter M.J.-F., Vermeirssen E.L.M. (2009). Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses. *Enviro. Pollut.* 157, 2716–2721.
- Mills, G.A., Fones, G.R., Booij, K., Greenwood, R. (2011). Passive sampling technologies. In: Quevauviller, P., Roose, P., Verreet, G. (Eds.), *Chemical Marine Monitoring: Policy Framework and Analytical Trends*. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, pp. 397–432.
- Montero, N., Belzunce-Segarra M.J., Gonzalez J.L, Larreta J., Franco J. (2012). Evaluation of Diffusive Gradients in Thin-films (DGTs) as a Monitoring Tool for the Assessment of the Chemical Status of Transitional Waters Within the Water Framework Directive. *Mar. Poll. Bull.* 64, 1: 31–39.
- Montero, N., Belzunce-Segarra M.J., Menchaca I., Garmendia J.M., Franco J., Nieto O., N. Etxebarria N. (2013). Integrative sediment assessment at Atlantic Spanish harbours by means of chemical and ecotoxicological tools. *Environ. Monit. Assess.* 185, 2, 1305-1318.
- Monteyne, E., Roose, P., Janssen, C.R. (2013). Application of a silicone rubber passive sampling technique for monitoring PAHs and PCBs at three Belgian coastal harbours. *Chemosphere*, 91, 3, 390-398.
- Panther, J.G., Stewart, R.R., Teasdale, P.R., Bennett, W.W., Welsh, D.T., Zhao, H. (2013). Titanium dioxide-based DGT for measuring dissolved As(V), V(V), Sb(V), Mo(VI) and W(VI) in water. *Talanta* 105, 80–86
- Pesce, S., Morin, S., Lissalde, S., Montuelle, B., Mazzella, N. (2011). Combining polar organic chemical integrative samplers (POCIS) with toxicity testing to evaluate pesticide mixture effects on natural phototrophic biofilms. *Enviro. Pollut.*, 159, 735-741
- Pickford, D.B.; Jones, A.; Velez-Pelez, A.; Iguchi, T.; Mitsui, N.; Tooi, O. (2015). Screening Breeding Sites of the Common Toad (*Bufo bufo*) in England and Wales for Evidence of Endocrine Disrupting Activity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 117, 7–19
- Richardson, B.J., Zheng, G.J., Tse, E.S.C, Lam, P.K.S. (2001). A comparison of mussels (*Perna Viridis*) and semi-permeable membrane devices (SPMDs) for monitoring



- chlorinated trace organic contaminants in Hong Kong coastal waters. *Chemosphere* 45, 8, 1201–1208.
- Rusina, T.P., Smedes, F., Klanova, J., Booij, K., Holoubek, I. (2007). Polymer selection for passive sampling: A comparison of critical properties. *Chemosphere* 68, 1344–1351
- Rusina, T.P., Smedes, F., Koblizkova, M., Klanova, J. (2010). Calibration of silicone rubber passive samplers: experimental and modeled relations between sampling rate and compound properties. *Environ. Sci. Technol.* 44, 362–367
- Schintu, M., Durante, L., Maccioni, A., Meloni, P., Degetto, S., Contu, A. (2008). Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 6–12: 832–837.
- Schintu, M., Marrucci, A., Marras, B. (2014). Passive sampling technologies for the monitoring of organic and inorganic contaminants in seawater. In: Cao G., Orrù R. (eds) *Current Environmental Issues and Challenges*. Springer, Dordrecht, pp. 217–237
- Schintu, M., Marrucci, A., Marras, B., Atzori, M., Pellegrini, D. (2018). Passive sampling monitoring of PAHs and trace metals in seawater during the salvaging of the Costa Concordia wreck (Parbuckling Project). *Mar. Pollut. Bull.*, 135, 819–827.
- Shaw, M., Negri, A., Fabricius, K., Mueller, J.F. (2009). Predicting water toxicity: Pairing passive sampling with bioassays on the Great Barrier Reef. *Aquat. Toxicol.* 95, 108–116.
- Smedes, F. (2007). Monitoring of chlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons by passive sampling in concert with deployed mussels. In: Greenwood, R., Mills, G.A., Vrana, B. (Eds.) *Passive Sampling Techniques in Environmental Monitoring*, Elsevier, Amsterdam, pp. 407–448
- Smedes, F., Geertsma, R.W., Van der Zande, T., Booij, K. (2009). Polymer-water partition coefficients of hydrophobic compounds for passive sampling: application of cosolvent models for validation. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7047–7054.
- Vrana, B., Vermeirssen E.L.M., Allan I.J., Kohoutek, J., Kennedy, K., Mills, G.A., Greenwood, R. (2009). Passive sampling of emerging pollutants in the aquatic environment: state of the art and perspectives. NORMAN Position Paper.
- Zhang, H., and Davison, W. (1995). Performance characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. *Anal. Chem.* 67(19) 3391–3400.

## ATTIVITÀ T.2.4

# **PRODOTTO T.2.4.8 VALUTAZIONE DEI RISCHI PER L'AMBIENTE LEGATI ALLE OPERAZIONI DI DRAGAGGIO E ALLA RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI PORTUALI MEDIANTE STUDI SUL CAMPO ED ESPERIMENTI IN CONDIZIONI CONTROLLATE**

**Applicazioni pratiche**

## SOMMARIO

INTRODUZIONE .....	4
<b>I. APPROCCIO SUL CAMPO : MONITORAGGIO DI UN'OPERAZIONE DI DRAGAGGIO NEL PORTO DI TOLONE .....</b>	<b>6</b>
<b>A. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>7</b>
1. <i>Siti di campionamento</i> .....	7
2. <i>Prelievi d'acqua ed elaborazione dei campioni</i> .....	8
3. <i>Campionamento passivo integrativo</i> .....	10
4. <i>Analisi chimiche</i> .....	10
5. <i>Caratterizzazione e quantificazione dell'ultra-plancton</i> .....	10
6. <i>Dati meteorologici</i> .....	11
<b>B. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>12</b>
1. <i>Concentrazioni di metalli durante il periodo di riferimento</i> .....	12
2. <i>Distribuzione e struttura dell'ultra-plancton durante il periodo di riferimento</i> .....	16
3. <i>Il dragaggio ha influenzato significativamente la contaminazione di Cu e Pb nella colonna d'acqua su larga scala spaziale</i> .....	17
4. <i>Il dragaggio ha accentuato le variazioni spaziali nella struttura dell'ultrafitoplancton</i> .....	21
<b>C. CONCLUSIONI .....</b>	<b>22</b>
<b>II. APPROCCI SPERIMENTALI CHE SIMULANO LA RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI.....</b>	<b>24</b>
<b>A. VALUTAZIONE DELLA MOBILITÀ DEI CONTAMINANTI METALLICI DURANTE LA RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI .....</b>	<b>25</b>
1. <b>Materiali e metodi</b> .....	25
a - Siti di studio, prelievi sul campo e trattamento dei campioni .....	25
b - Dispositivi e condizioni sperimentali .....	27
c - Analisi chimiche .....	29
2. <b>Risultati e discussione</b> .....	30
a - Caratterizzazione dei campioni iniziali.....	30
b - Variazioni dei parametri fisico-chimici durante la miscelazione .....	30
c - Variazioni di contaminazione del rame disciolto durante la miscelazione .....	32
d - Variazioni di contaminazione del piombo disciolto durante la miscelazione.....	34
3. <b>Conclusioni</b> .....	36
<b>B . RISPOSTE MICROBICHE ALLA RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI .....</b>	<b>37</b>
1. <b>Materiali e metodi</b> .....	38
a - Sito di studio, prelievi sul campo e trattamento dei campioni.....	38

b - Dispositivi e condizioni sperimentali .....	38
c - Estratti di DNA.....	39
d - Analisi della diversità genetica delle comunità .....	40
<b>2. Risultati e discussione.....</b>	<b>41</b>
a - Variazioni temporali della diversità microbica durante la risospensione dei sedimenti .....	41
b - Influenza della quantità di sedimento risospeso sulle risposte microbiche .....	46
<b>3. Conclusioni.....</b>	<b>49</b>
<b>C . VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ DEI SEDIMENTI MEDIANTE APPROCCI ECOTOSSICOLOGICI .....</b>	<b>51</b>
<b>1. Introduzione.....</b>	<b>51</b>
<b>2. Materiali e metodi .....</b>	<b>52</b>
a - Campionamento di sedimenti .....	52
b - Analisi della dimensione delle particelle .....	53
c - Carbonio organico totale .....	54
c - Analisi di metalli pesanti .....	54
d - Preparazione di elutriati .....	55
e - Test di embriotossicità con <i>Paracentrotus lividus</i> .....	56
<b>3. Risultati.....</b>	<b>58</b>
a - Caratteristiche granulometriche.....	58
b - Carbonio organico totale.....	59
c - Metalli pesanti .....	60
d - Test biologici.....	61
<b>4. Discussione.....</b>	<b>69</b>
<b>5. Conclusioni.....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>75</b>

## INTRODUZIONE

I sedimenti portuali costituiscono un'importante massa di contaminanti chimici, l'importante presenza di particelle fini offre infatti una grande superficie di scambio. Una volta intrappolati nei sedimenti, i contaminanti sono esposti a forti variazioni ambientali, sotto l'effetto di progressivi infossamenti e diagenesi. Queste condizioni ambientali limitano lo scadimento di alcuni contaminanti organici, che così persistono a lungo termine. Altri, in particolare i metalli, possono essere intrappolati in una forma insolubile in sedimenti profondi sotto l'influenza dell'attività microbica anaerobica. Nella pellicola superficiale dei sedimenti, altre attività microbiche possono comportare una solubilizzazione dei metalli in acqua interstiziale, da dove si possono poi diffondere nella colonna d'acqua. In questo caso, i sedimenti agiscono come una fonte passiva di contaminanti per la colonna d'acqua. Le operazioni di dragaggio e altre attività portuali umane che inducono la risospensione dei sedimenti rappresentano una delle principali fonti puntuali di contaminazione chimica della colonna d'acqua da parte dei sedimenti. Durante la risospensione, le particelle di sedimento passano da un ambiente anossico a un ambiente con presenza di ossigeno, questo improvviso cambiamento inverte completamente l'effetto dell'invecchiamento naturale dei sedimenti e può causare trasferimenti significativi di contaminanti dalle particelle all'acqua di mare. Questo processo può potenzialmente portare a una persistenza più a lungo termine e ad un trasporto a maggiore distanza della contaminazione disciolta nella colonna d'acqua.

Al fine di promuovere una gestione mirata ed efficiente dei sedimenti nelle aree portuali e nelle zone limitrofe, è necessario padroneggiare i processi che influenzano il trasferimento e la tossicità dei contaminanti chimici. Al fine di ottimizzare le restrizioni e non creare vincoli inutili, è anche importante conoscere l'impatto ecologico della risospensione dei sedimenti. L'impatto deve essere valutato mediante test di tossicità standardizzati, su organismi modello adattati alle matrici studiate, consentendo un solido confronto di un'ampia gamma di campioni, nonché mediante approcci più integrativi che tengano conto delle comunità naturali complesse e di tutte le loro interazioni. Attraverso questo abbinamento di studi sui modelli e sulle comunità naturali, è quindi possibile sia valutare i rischi per le risorse marine di interesse alimentare o socio-economico, che determinare e dare priorità alle principali conseguenze della risospensione per l'ecosistema.

Nell'ambito del progetto SEDRI PORT, la valutazione del rischio ambientale è stata trattata attraverso una combinazione di approcci sul campo e sperimentali. Questo documento riporta i principali risultati e le conclusioni del monitoraggio di un'operazione di dragaggio effettuata in uno dei porti pilota del progetto e di esperimenti che simulano la risospensione dei sedimenti per analizzare i rischi di contaminazione chimica dell'acqua, d'impatto sulla comunità microbica marina e per migliorare i protocolli di valutazione della tossicità dei sedimenti su un modello di organismo marino.

Queste diverse operazioni forniscono sia elementi conoscitivi specifici per i porti pilota del progetto sia elementi scientifici teorici essenziali per comprendere i fenomeni indotti dalla risospensione dei sedimenti.

## I. APPROCCIO SUL CAMPO : MONITORAGGIO DI UN'OPERAZIONE DI DRAGAGGIO NEL PORTO DI TOLONE

La rada di Tolone è una baia naturalmente semi chiusa, relativamente riparata dalla principale corrente marina. Due fiumi costieri molto piccoli sfociano nella rada: il Las e l'Eygoutier, il loro flusso medio annuo è di circa  $0,1 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Un grande agglomerato (Tolone e la sua periferia) si è sviluppato attorno a questa baia (~400.000 abitanti). Sono state costruite varie strutture portuali, principalmente nella parte nord-ovest più riparata che ha sempre ospitato la parte principale delle attività umane. Una base navale militare fa parte delle costruzioni storiche. Al fine di proteggere queste installazioni dalle mareggiate e dalle minacce militari, nel XIX secolo furono costruite varie opere. Fu infine una lunga diga che collegava la Torre Reale alla penisola di St Mandrier, l'ultima opera conservata. Questa diga separa così la grande baia (parte Est, molto aperta verso il mare al largo) dalla piccola baia (parte Ovest, concentrante la maggior parte delle opere portuali), lasciando solo due canali di comunicazione e scambi di masse d'acqua: il piccolo passaggio a nord, largo circa 15 metri, consente il passaggio di imbarcazioni da diporto, mentre il grande passaggio a sud, largo diverse centinaia di metri e profondo quasi 30 metri, consente la maggior parte del rinnovamento di acqua della piccola rada e il passaggio di tutte le grandi navi. La piccola rada ospita 4 porti turistici, due terminal crociere (circa 140.000 passeggeri nel 2019), un piccolo terminal merci, il più grande porto militare francese, alcune industrie navali, linee di trasporto marittimo pubblico e un'attività di acquacoltura (mitili, ostriche e pesci). Oltre a queste attuali pressioni, c'è una pressione storica, che sta ancora degradando la qualità chimica dell'acqua del porto: durante la seconda guerra mondiale, la rada di Tolone subì numerosi bombardamenti e la flotta francese vi è affondata colando a picco e/o dando fuoco a circa 120 navi di tutte le dimensioni.

Queste varie attività attuali e storiche hanno portato all'accumulo di un'altissima contaminazione di varie sostanze chimiche nell'acqua e in particolare nei sedimenti della baia. La contaminazione metallica è la più rappresentata, con fattori di crescita che coprono diversi ordini di grandezza per sostanze come mercurio o piombo (Tessier e altri, 2011) . I sedimenti sono anche fortemente contaminati da sostanze organiche (PAH, PCB) e organometalliche (TBT, MMHg) (Pougnat e altri, 2014; Wafo e altri, 2016; Misson e altri, 2016). È stata anche studiata la contaminazione da fosforo (Dang e altri, 2018). Questa contaminazione chimica dei sedimenti è massima a nord della piccola rada e si disperde gradualmente lungo la principale via di scambio verso il mare aperto (lungo la penisola di Saint Mandrier). Nella colonna d'acqua, nonostante un tempo di rinnovo relativamente breve per la piccola rada (stimato tra 1 e 7 giorni a seconda del vento; Dufresne, Duffa e Rey, 2014), sono stati rivelati gradienti di contaminazione metallica, secondo lo stesso

modello valido per i sedimenti, rivelando sia fonti attuali (ad esempio per il rame) sia una rimobilizzazione della contaminazione storica dei sedimenti (ad esempio per il piombo) (Dang e altri, 2015; Coclet e altri, 2018, 2019).

In questo contesto generale, è stata effettuata un'operazione di dragaggio per abbassare il livello del fondale nel porto militare. A causa di un significativo rischio di esplosioni, la tecnica di dragaggio selezionata consisteva nell'aspirazione di sedimenti assistita da subacquei, senza l'impiego di griglie anti-dispersione. Questa operazione di dragaggio si è quindi estesa per un lungo periodo, da settembre 2014 a gennaio 2016. Data la contaminazione chimica dei sedimenti dragati, questi sono stati immagazzinati in acqua, in un bacino confinato, all'interno di un geotessuto semipermeabile che, una volta riempito, è stato rimosso dall'acqua. Una volta essiccati, i sedimenti sono stati quindi rimossi.

Nell'ambito di una collaborazione con il laboratorio di analisi e monitoraggio della Marina (LASEM) di Tolone, il laboratorio MIO ha partecipato all'operazione di valutazione dei parametri di qualità chimica e biologica del acqua dal porto di Tolone che copre il periodo di pre-dragaggio, l'intera operazione di dragaggio e il periodo post-dragaggio. Durante questo monitoraggio, le misurazioni puntuali dei parametri fisici, chimici e biologici sono state abbinate a misurazioni integrative della frazione potenzialmente disponibile della contaminazione da piombo (Pb) da parte di sensori passivi di tipo DGT (Diffusive Gradients in Thin film). L'analisi dei campioni e dei dati raccolti è stata effettuata da uno studente finanziato dal progetto SEDRI PORT (Nicolas Layglon, dottorando). Questi dati sono in corso di pubblicazione in una rivista scientifica internazionale peer-reviewed (articolo in esame nel *Marine Pollution Bulletin*).

## A. Materiali e metodi

### 1. Siti di campionamento

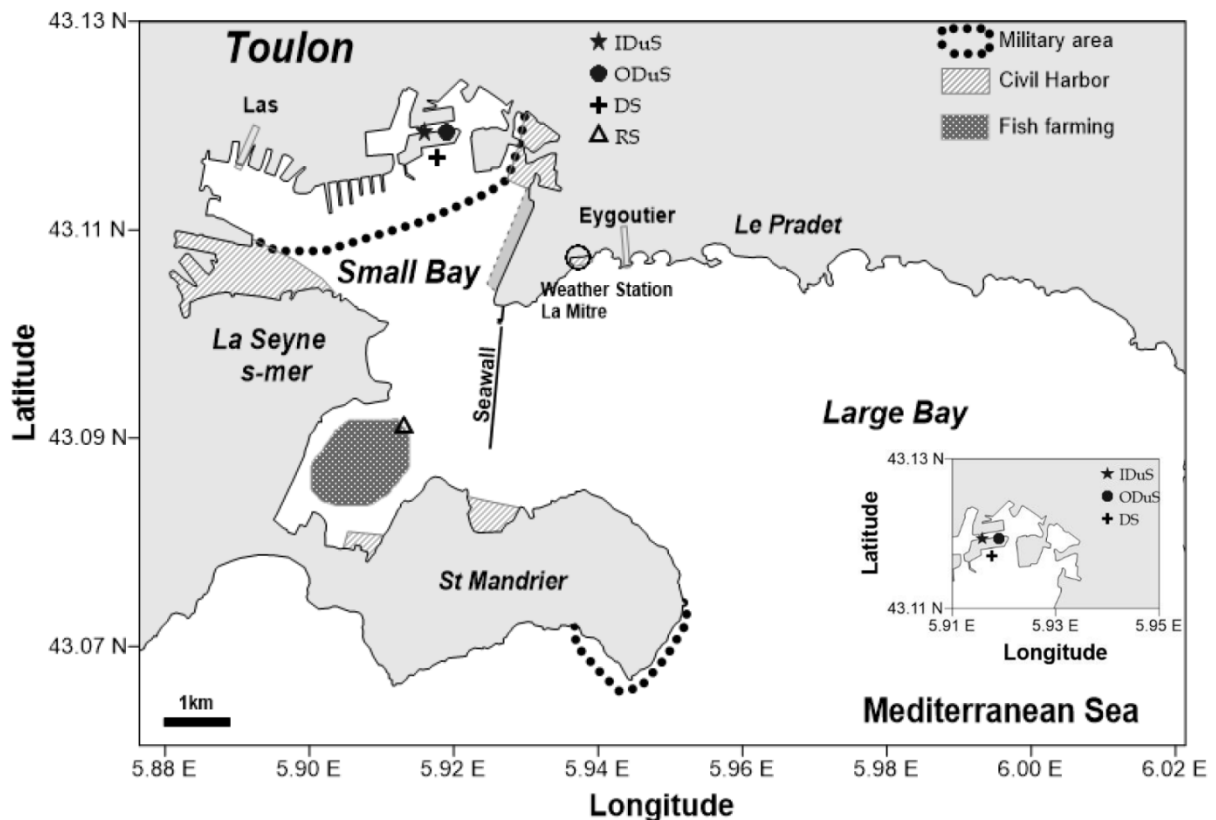
I sedimenti sono stati dragati attraverso aspirazione, assistita da subacquei, in un sito chiamato DS (Dredging Site), nella parte nord-ovest della rada di Tolone. Questo sito è relativamente ben esposto alla circolazione delle correnti. I sedimenti dragati sono stati immagazzinati sott'acqua in un sacco di circa 20 x 60 m fatto di geotessuto semipermeabile (trattiene le particelle ma non l'acqua) in un sito chiamato IDuS (Inside Dumping Site). IDuS era distante circa 800 m dall'acqua di DS e situato più a nord (Figura 1). Questa operazione di dragaggio è iniziata a settembre 2014 e si è conclusa a gennaio 2016. La cronologia precisa dell'operazione (ad esempio periodi di attività di dragaggio elevati o scarsi) non è nota.

Per valutare l'influenza di questa attività di dragaggio sulla colonna d'acqua, sono stati scelti 4 siti di studio (Figura 1) :

- un sito di riferimento RS (reference site), situato 3 km a sud della zona di aspirazione, vicino alla zona di acquacoltura



- DS, per valutare diversi parametri in una zona vicina al luogo di aspirazione dei sedimenti
- IDuS, per valutare le modifiche indotte dalla re-immersione delle particelle aspirate
- un quarto sito, situato nello stesso bacino di IDuS ma al di fuori della sacca di geotessuto, chiamato ODuS (outside of the dumping site). Dato che IDuS esisteva solo durante il periodo di dragaggio, questo sito ODuS è stato importante per lo studio di quest'area al di fuori di qualsiasi attività di dragaggio, al fine di identificare veramente ciò che è cambiato durante il dragaggio.



**Figura 1.** Ubicazione dei siti di campionamento e principali aree di attività antropica nel porto di Tolone. ODuS viene deliberatamente spostato a destra per facilitare la lettura della mappa, ma in realtà è stato separato da IDuS solo di pochi metri.

## **2. Prelievi d'acqua ed elaborazione dei campioni**

L'acqua di mare è stata campionata a DS e RS da settembre 2013 a novembre 2017 con frequenza mensile. Il monitoraggio presso il sito ODuS è iniziato solo a luglio 2014, poiché la posizione del sito per il deposito del sedimento aspirato non era nota precedentemente. I campioni di acqua sono stati raccolti a una profondità di 5 m (circa a metà della colonna d'acqua) usando una bottiglia a chiusura orizzontale di tipo Van Dorn (Wildco, modello Beta) precedentemente pulita con acido nitrico 10% (v/v) e sciacquata accuratamente con acqua MilliQ in laboratorio. Al momento del campionamento in mare, la bottiglia è stata sciacquata

con acqua MilliQ leggermente acidificata (HCl 0,1% v/v), quindi abbondantemente sciacquata con acqua dal sito di campionamento. Un litro di acqua di mare campionato è stato quindi conservato in una bottiglia FEP (fluorinated ethylene propylene), precedentemente ben pulita (con HNO<sub>3</sub> 10% v/v, quindi sciacquata tre volte con acqua MilliQ, riempita con HCl 0,1 % v/v e infine risciacquata tre volte con acqua dal sito di campionamento prima del riempimento). In laboratorio i campioni sono stati immediatamente trattati in una vasca a flusso laminare adatta alla manipolazione in condizioni di tracce per metalli come segue: un sottocampione è stato conservato in un pallone FEP e acidificato (HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v), un altro è stato filtrato usando un filtro a siringa con porosità di 0,2µm (in acetato di cellulosa precedentemente sciacquato con acido e quindi con acqua) quindi conservato in un flacone FEP e acidificato (HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v). Questi due tipi di campioni sono stati successivamente irradiati con UV (lampada al mercurio da 150W) per almeno 24 ore al fine di decomporre completamente la sostanza organica disciolta (Omanović e altri, 2006) e quindi conservati al buio in attesa delle analisi di concentrazione di metalli.

Inoltre, da gennaio 2015 a novembre 2017, 10 ml di ciascun campione d'acqua sono stati filtrati sull'imbarcazione utilizzando un supporto dotato di un panno di assorbimento della porosità di 90 µm. Il filtrato è stato immediatamente fissato con glutaraldeide allo 0,25% (concentrazione finale). In laboratorio, i campioni sono stati rapidamente congelati a -80 ° C in attesa di analisi biologiche mediante citometria a flusso.

A causa dell'eterogeneità del periodo di monitoraggio per analisi biologiche e chimiche e per l'assenza di dati biologici prima dell'inizio dell'operazione di dragaggio, i risultati di questo monitoraggio non possono essere presentati in 3 periodi che rappresentano la situazione prima, durante e dopo il dragaggio. Sono quindi presentati in 2 periodi che rappresentano da un lato il periodo di dragaggio e dall'altro il cosiddetto periodo di riferimento, che comprende tutti i campioni prima e dopo il dragaggio.

Il numero di campioni analizzati e l'inizio e la fine di ciascun tipo di campionamento e misurazione sono riassunti nella Tabella 1.

Analysis	Sampling period				Number of sampling dates	Number of analyses	Number of replicates
	RS	DS	ODuS	IDuS			
Voltammetry	sept.13 - nov.17	sept.13 - nov.17	aug.14 - nov.17	sept.14 - jan.16	45	280	1
AAS (DGT)	sept.13 - nov.17	sept.13 - nov.17	sept.14 - apr.17	NA	231	523	3
Cytometry	janv.15 - nov.17	janv.15 - nov.17	janv.15 - nov.17	janv.15 - janv.16	32	108	1

**Tabella 1.** Campionamenti e analisi effettuate. NA: non applicabile.

### **3. Campionamento passivo integrativo**

Oltre al campionamento puntuale della colonna d'acqua, sono stati utilizzati sensori passivi per contaminanti metallici del tipo DGT (resina chelex ) in 3 siti (DS, ODuS e RS) al fine di monitorare continuamente la concentrazione di Pb labile, che rappresenta potenzialmente la frazione biodisponibile. Poiché l'utilizzo di questi DGT era dedicato al monitoraggio regolamentare della concentrazione di piombo, questi sono stati impiegati, registrati e analizzati da LASEM (Marina nazionale francese). Non è stato possibile utilizzare DGT sul sito IDuS a causa dell'impossibilità di sospendere una cima che non fosse in contatto con il geotessuto (troppi rischi di incrostazioni). Tre DGT sono stati immersi in ciascun sito, quindi esaminati e sostituiti ogni settimana con dei nuovi. Una volta sollevati, sono stati sciacquati con acqua MilliQ sulla barca, immagazzinati in singoli sacchetti di plastica e poi riportati in laboratorio. Le resine sono state quindi recuperate con pinze in teflon sotto una cappa a flusso laminare in condizioni di tracce per metalli, quindi immerse in una soluzione acida (HNO<sub>3</sub>, 1M) per 24 ore.

### **4. Analisi chimiche**

La determinazione delle concentrazioni di Pb DGT-labile nei DGT è stata effettuata utilizzando uno spettrometro ad assorbimento atomico accoppiato ad una fornace di grafite. Le concentrazioni sono state calcolate utilizzando i coefficienti di diffusione (corretti dalla temperatura media durante il periodo di utilizzo) resi disponibili dal fornitore dei DGT (DGT Research, Lancaster University, UK). Le misurazioni dei bianchi (DGT non immersi) sono state eseguite ad ogni data di lettura, le concentrazioni di questi bianchi sono state sottratte dalle concentrazioni misurate dai DGT immersi. Le concentrazioni di Pb nei bianchi sono sempre state inferiori al 10% delle concentrazioni misurate nei DGT sommersi.

Le concentrazioni totali (campioni di acqua non filtrata) e disciolte (campioni filtrati) di rame (Cu) e Pb sono state determinate mediante elettrochimica (DPASV). Le misurazioni sono state eseguite utilizzando un potenziostato dotato di uno scambiatore di campioni. La quantificazione dei metalli è stata effettuata con il metodo delle aggiunte misurato utilizzando soluzioni standard (Louis e altri, 2009; Oursel e altri, 2013; Cindrić e altri, 2015) .

### **5. Caratterizzazione e quantificazione dell'ultra-plancton**

L'ultra-plancton designa tutti gli organismi planctonici con una dimensione <20 µm. Microrganismi fotosintetici (autotrofi) e procarioti eterotrofi sono stati caratterizzati e quantificati utilizzando un citometro a flusso di tipo Accuri C6 secondo un metodo precedentemente descritto (Marie, Rigaut-Jalabert & Vaultot, 2014; Cabrol, Quéméneur & Misson, 2017; Coclet e altri, 2018). Tra gli autotrofi (ultrafitoplancton), dei cianobatteri di tipo *Synechococcus* (SYN) e degli eucarioti fotosintetici sono stati identificati grazie alle loro proprietà di fluorescenza, alle loro

dimensioni e alla loro complessità intracellulare. I SYN sono stati identificati sulla base della loro bassa complessità intracellulare e della loro fluorescenza che emette una luce arancione. Tra gli eucarioti autotrofi, sono stati identificati 3 gruppi: piceoeucarioti fotosintetici (PPE), nanoeucarioti fotosintetici con forte fluorescenza rossa (HR PNE) e nanoeucarioti fotosintetici con fluorescenza arancione (HO PNE). I procarioti eterotrofi sono stati identificati e quantificati dopo marcatura con un intercalante di DNA (SYBR Green), questi erano caratterizzati da piccole dimensioni, bassa complessità intracellulare e assenza di fluorescenza rossa o arancione.

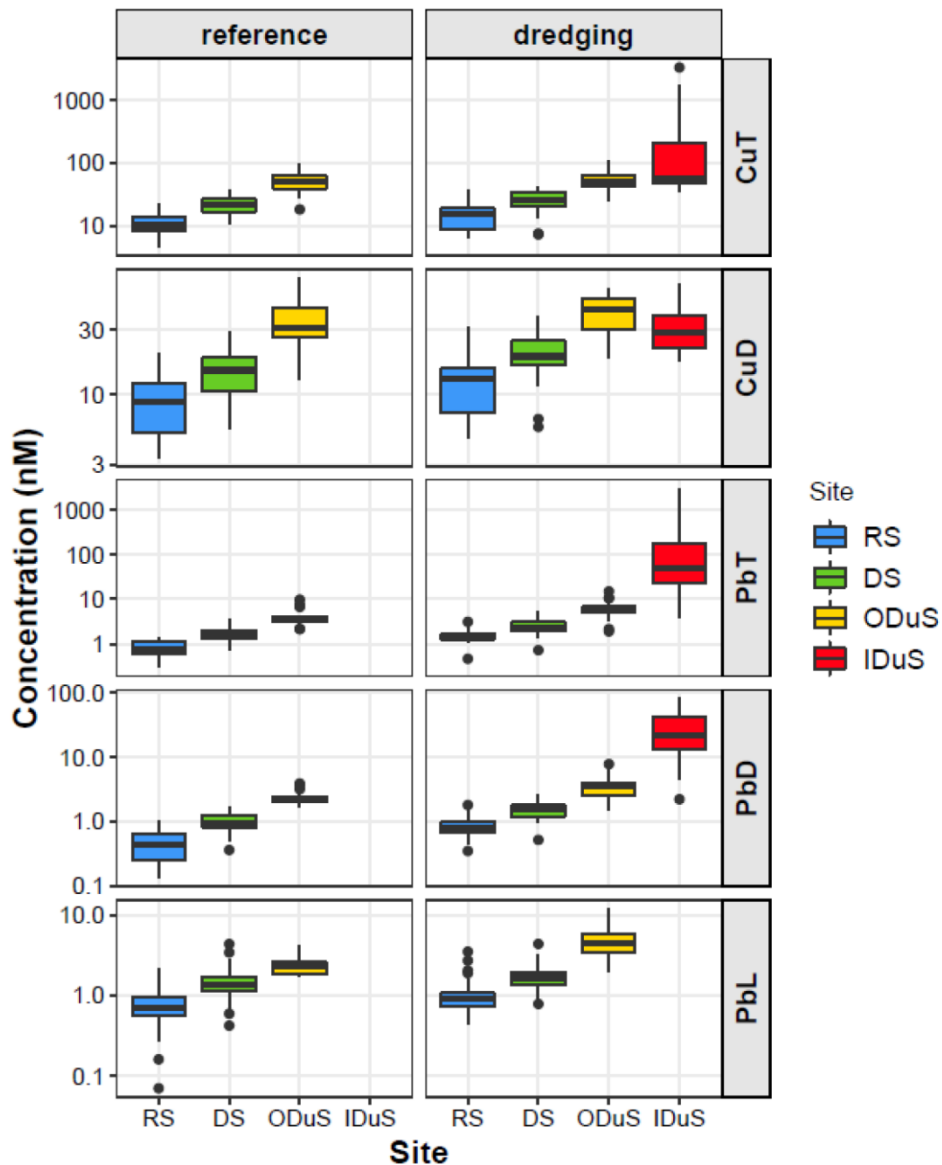
## **6. Dati meteorologici**

Per tenere conto dell'influenza del vento sulle concentrazioni di metallo determinate durante questo monitoraggio, sono stati utilizzati i dati meteorologici registrati da una stazione meteorologica vicina (Tolone - La Mitre, situata tra i siti DS e RS, 43.104065N, 5.931631E). Météo France ha fornito intensità media giornaliera e direzione del vento.

## B. Risultati e discussione

### 1. Concentrazioni di metalli durante il periodo di riferimento

È stato osservato un andamento decrescente delle concentrazioni totali e disciolte di Pb e Cu da nord a sud (ovvero ODuS>DS>RS) (Figura 2).



**Figura 2.** Variabilità spaziale delle concentrazioni di Cu e Pb (nM) per sito e per periodo. T, D e L rappresentano le concentrazioni totali, disciolte e DGT-labili, rispettivamente. Non è stato possibile utilizzare DGT su IDuS. Il sito IDuS esisteva solo durante l'operazione di dragaggio. Le estremità delle caselle rappresentano il 1° e il 3° quartile, la linea interna rappresenta il valore mediano, le barre verticali alle estremità rappresentano i valori minimo e massimo, i punti rappresentano i valori considerati come valori anomali.

Questa osservazione è in accordo con precedenti osservazioni relative a prelievi annuali o settimanali (Coclet e altri, 2018, 2019). Le concentrazioni medie di

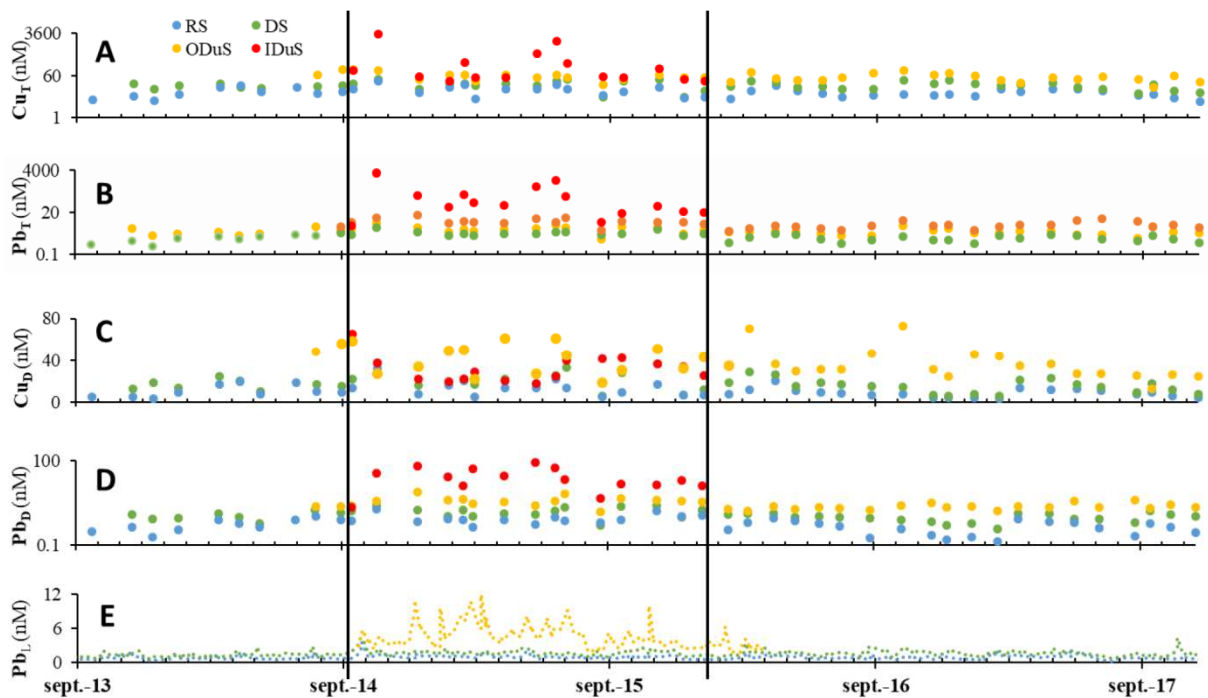
Cu e Pb totali e disciolte erano da 4 a 5 volte superiori a ODuS rispetto a RS (Tabella 2).

Element	Site	Min	Average	Max
Cu <sub>D</sub>	RS	3.40	9.35 (a)	19.97
	DS	5.50	15.33 (b)	28.88
	ODuS	12.93	36.20 (c)	73.16
Cu <sub>T</sub>	RS	4.52	11.57 (a)	22.16
	DS	10.43	22.58 (b)	37.83
	ODuS	18.11	51.83 (c)	95.14
Pb <sub>D</sub>	RS	0.13	0.48 (a)	1.05
	DS	0.36	0.98 (b)	1.66
	ODuS	1.65	2.37 (c)	3.90
Pb <sub>T</sub>	RS	0.30	0.82 (a)	1.42
	DS	0.75	1.83 (b)	3.70
	ODuS	2.15	4.27 (c)	9.74
Pb <sub>L</sub>	RS	0.12	0.77 (a)	1.71
	DrS	0.65	1.44 (b)	3.47
	ODuS	2.22	2.75 (c)	3.98

**Tabella 2.** Valori minimi, medi e massimi delle concentrazioni disciolte e totali di Cu e Pb (in nM) nei tre siti di studio durante il periodo di riferimento. Per ogni variabile, lettere diverse tra parentesi indicano una differenza significativa nei valori medi.

In tutte le date di campionamento, il Pb disciolto era più concentrato su ODuS che su DS e la sua concentrazione su RS era la più bassa. Per quanto riguarda le concentrazioni di Pb totale, Cu totale e Cu disciolto, questa osservazione è stata vera in 20 date di campionamento su 21. Questo studio dimostra la stabilità pluriennale di questa tendenza spaziale di contaminazione dell'acqua nel porto di Tolone (Figura 3). La tendenza spaziale riflette chiaramente la pressione antropica esercitata sul nord della rada, un'area in cui sono concentrate diverse fonti industriali, urbane e portuali (Tessier e altri, 2011; Dang e altri, 2015; Coclet e altri, 2018). Va notato che le concentrazioni a RS erano sempre più alte di quelle del rumore di fondo geochimico del Mar Mediterraneo, dimostrando che anche al di fuori del periodo di dragaggio il sito di riferimento non era privo di contaminazione metallica. Le differenze osservate tra DS e ODuS potrebbero essere collegate alla rispettiva idrodinamica, poiché DS si trovava in un'area relativamente aperta ed esposta alle correnti mentre ODuS si trovava sul fondo di un bacino molto chiuso ed esposto a un basso rinnovamento della massa d'acqua. Inoltre, la banchina del sito ODuS è soggetta a un intenso traffico marittimo. Pertanto, la più alta contaminazione osservata in questo sito di campionamento potrebbe essere collegata a una più forte risospensione dei sedimenti e si accumulerebbe in questo bacino a causa del basso

rinnovamento dell'acqua. Gradienti di contaminazione simili sono stati osservati in altre baie semichiuse e sono stati spiegati da una combinazione di fonti puntuali di contaminazione, di specifiche idrodinamiche, di flussi diffusivi da sedimenti e di episodi di risospensione dei sedimenti (Sañudo-Wilhelmy & Flegal, 1996; Lares e altri, 2009; Cindrić e altri, 2015) .



**Figura 3.** Variabilità spaziale e temporale delle concentrazioni di Cu e Pb per l'intera durata del monitoraggio. Il periodo di dragaggio corrisponde all'intervallo tra le due barre nere verticali.

Nell'area di studio, la frazione di Pb disciolta era stabile ( $56 \pm 3\%$  in media), dimostrando l'assenza di qualsiasi tendenza spaziale di partizionamento di Pb tra le fasi disciolta e particellare. Al contrario, la frazione disciolta di Cu ha mostrato variazioni tra i siti, con valori più bassi nei siti a nord (68% a DS e 70% a ODuS ) rispetto al sito RS (81%). Le concentrazioni disciolte dei due metalli rientravano in un intervallo classico di valori per le aree costiere antropizzate (Oursel e altri, 2013, 2014; Cindrić e altri, 2015) . Inoltre, il rapporto Cu disciolto/Pb disciolto era superiore a RS (20) rispetto a DS (16) e ODuS (15). Anche il rapporto Cu totale/Pb totale era più alto a RS (14) che a DS e ODuS (12). Queste diminuzioni nella zona nord erano dovute al maggiore aumento delle concentrazioni di Pb. Essendo la risospensione dei sedimenti la principale fonte attuale di Pb nella colonna d'acqua del porto di Tolone (Dang, 2015), queste osservazioni dimostrano l'influenza di questo processo sulla contaminazione chimica a lungo termine dell'acqua della baia, in tutti i siti studiati, anche al di fuori del periodo di dragaggio. I diversi livelli di contaminazione da Pb sembrano quindi riflettere i diversi livelli di contaminazione misurati nei sedimenti del porto di Tolone (Tessier e altri, 2011) e/o la dimensione delle particelle dei sedimenti (Wafo e altri, 2016) che influenza la loro risospensione. Resta da determinare il contributo del traffico marittimo più denso nella zona nord del porto di

Tolone alla frequenza della risospensione dei sedimenti. Inoltre, è possibile prevedere una probabile maggiore diluizione delle particelle risospese e del flusso diffusivo per RS rispetto a DS e per DS rispetto a ODuS a causa delle differenze idrodinamiche in questi 3 siti. In effetti, ODuS si trova in un molo molto riparato, mentre RS è vicino all'apertura principale del molo che separa il porto di Tolone dall'apertura sul mare aperto.

Anche le concentrazioni di Pb DGT-labile hanno mostrato una tendenza decrescente da ODuS a RS (Figura 2). La frazione DGT-labile è considerata la frazione potenzialmente biodisponibile, secondo studi che hanno dimostrato che le concentrazioni di metallo accumulate negli organismi viventi erano meglio correlate con la frazione DGT-labile che con la frazione disciolta (Kim e altri, 2016).

Il vantaggio principale dell'utilizzo di sensori passivi di tipo DGT era di fornire misurazioni della concentrazione di Pb continuamente durante tutto il monitoraggio e integrate per diversi giorni. Nessuna correlazione significativa è stata dimostrata tra le concentrazioni DGT-labili e disciolte di Pb, per ciascun sito considerato separatamente. Tuttavia, queste due frazioni sono state significativamente correlate considerando tutti i siti insieme (test di correlazione di Spearman,  $\rho=0,565$ ,  $p<0,05$ ). Inoltre, la concentrazione di Pb DGT-labile era talvolta superiore alla concentrazione disciolta misurata puntualmente durante il periodo coperto da DGT. Nel loro insieme, queste osservazioni dimostrano che un tempo di campionamento mensile non è sufficiente a coprire l'effettiva variabilità delle concentrazioni. Tale discrepanza è già stata osservata in passato per un altro ecosistema dinamico (Cindrić e altri, 2017). Ciò suggerisce una forte variabilità a breve termine della concentrazione di Pb nel porto di Tolone, un'ipotesi confermata dalle variazioni temporali delle concentrazioni di Pb DGT-labili (Figura 3). Considerato che una delle principali fonti attuali di Pb per la colonna d'acqua in questo porto sembra essere la risospensione dei sedimenti (Dang e altri, 2015), questa elevata variabilità a breve termine potrebbe riflettere la natura molto puntuale della risospensione dei sedimenti (sia nel tempo che nello spazio).

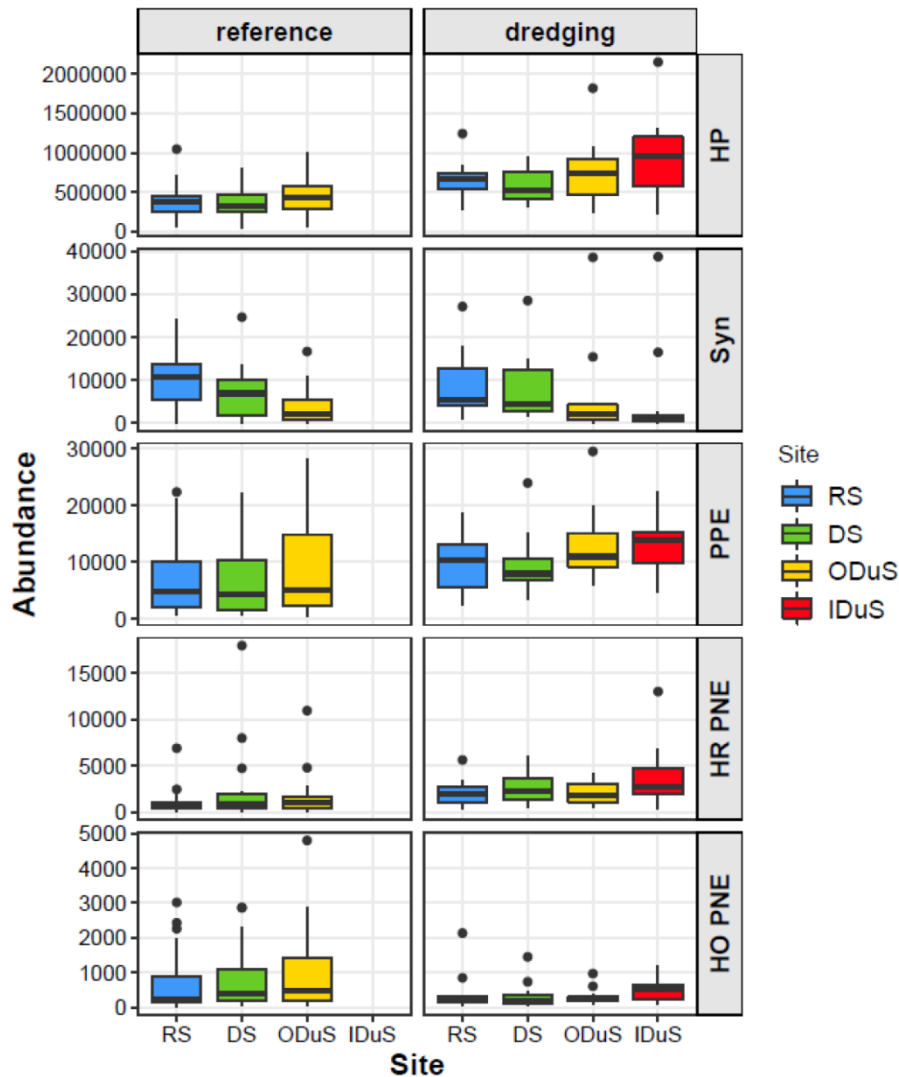
Nessun legame tra l'aumento della concentrazione di Pb e i dati meteorologici ha potuto essere evidenziato durante questo studio e l'influenza degli apporti dai fiumi può essere trascurata secondo uno studio precedente che ha rivelato il loro flusso molto basso ( $0.1 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  in media, Nicolau e altri, 2012). Di conseguenza, possiamo ipotizzare che nel porto di Tolone gli eventi di contaminazione da Pb nella colonna d'acqua si verificano a seguito di episodi di risospensione di sedimenti legati alle attività umane più che ad eventi climatici naturali, anche in assenza di operazioni di dragaggio. Il presente lavoro non ci consente di formulare alcuna ipotesi sulla principale attività umana responsabile, tuttavia il collegamento con la concentrazione della maggior parte del traffico marittimo nella parte nord del porto sembra essere una pista privilegiata.



## 2. Distribuzione e struttura dell'ultra-plancton durante il periodo di riferimento

L'abbondanza di procarioti eterotrofi (HP) variava tra  $0.9 \times 10^5$  e  $2.1 \times 10^6$  cellule per millilitro ( $\text{cell.mL}^{-1}$ ). Questi valori sono classici per i siti costieri del Mediterraneo (Grégori e altri, 2001; Šantić e altri, 2012; Suffridge e altri, 2018) e corrispondono ai valori osservati in precedenza per il porto di Tolone (Coclet e altri, 2019). Non è stato possibile osservare né una tendenza stagionale evidente, né una differenza stabile nel tempo tra i siti di studio come dimostrato per la contaminazione metallica. In effetti, sebbene l'abbondanza di HP a volte sia apparsa più elevata nelle zone più riparate a nord (ODuS) rispetto ai siti più aperti della parte meridionale (RS), come osservato in precedenza durante uno studio a breve termine (Coclet e altri, 2019), sono state osservate delle quantità simili in tutti i siti nel nostro monitoraggio a lungo termine. Di conseguenza, l'abbondanza media di HP non è apparsa come significativamente diversa tra i siti di studio. Poiché questa situazione è molto diversa dalla tendenza spaziale osservata per i metalli, la contaminazione metallica del porto di Tolone non può essere considerata come il principale fattore che controlla l'abbondanza di HP nella rada. Processi a lungo termine come variazioni di temperatura stagionali (Fuhrman e altri, 2008; Gilbert e altri, 2012), disponibilità di risorse nutritive (Gilbert e altri, 2012; Chow et al., 2013) o interazioni biotiche con fitoplancton e zooplancton (Gilbert e altri, 2012; Goñi-Urriza e altri, 2018) potrebbero rappresentare fattori di controllo più importanti per l'abbondanza di HP nel porto di Tolone.

Analogamente, la gamma di valori di abbondanza degli organismi ultrafitoplanctonici (tra  $4.5 \times 10^3$  e  $6.8 \times 10^4$   $\text{cell.mL}^{-1}$ ) era simile a quella di altre osservazioni in siti costieri del Mediterraneo (Grégori e altri, 2001; Thyssen e altri, 2014) o di precedenti osservazioni nel porto di Tolone (Coclet e altri, 2018). Nessuna tendenza spaziale o temporale è stata dimostrata per questi valori di abbondanza totale. Per quanto riguarda i diversi gruppi di fitoplancton identificati, SYN e PPE erano i più abbondanti, rappresentando almeno il 70% della comunità nel 95% dei campioni. L'abbondanza di SYN tende a diminuire progressivamente verso ODuS mentre l'abbondanza di PPE appare stabile tra i siti (Figura 4). Risulta quindi una notevole variazione nella struttura della comunità da una dominazione di SYN (49,1% in media) in RS a una dominazione di PPE (56,3% in media) in ODuS. La proporzione di questi due gruppi principali è ampiamente variabile nel tempo. Tuttavia, la percentuale di SYN era più alta a RS che a ODuS per 13 delle 16 date di campionamento. Allo stesso modo, la percentuale di PPE era inferiore a RS rispetto a ODuS per il 75% delle date di campionamento. Per quanto riguarda i gruppi nanofitoplanctonici, HR PNE rappresentava in media il 10% dell'abbondanza della comunità e appariva leggermente più abbondante in ODuS che in RS. Infine, HO PNE era il gruppo meno abbondante (6% in media) e non mostrava alcuna tendenza spaziale.



**Figura 4.** Variabilità spaziale dell'abbondanza (cell.mL<sup>-1</sup>) dei diversi gruppi microbici caratterizzati da citometria a flusso durante i due periodi. Le estremità delle caselle rappresentano il 1° e il 3° quartile, la linea interna rappresenta il valore mediano, le barre verticali alle estremità rappresentano i valori minimo e massimo, i punti rappresentano i valori considerati come valori anomali.

Le variazioni spaziali di struttura osservate per questa comunità di ultrafitoplancton sono in accordo con precedenti osservazioni fatte sia con elevata copertura spaziale ma bassa frequenza temporale (Coclet e altri, 2018) sia con bassa copertura spaziale e frequenza temporale simile (Delpy e altri, 2018) nel porto di Tolone.

### **3. Il dragaggio ha influenzato significativamente la contaminazione di Cu e Pb nella colonna d'acqua su larga scala spaziale**

Durante il periodo di dragaggio, l'andamento spaziale delle concentrazioni di Pb e Cu era simile a quello del periodo di riferimento (Figura 2). È stato osservato un aumento significativo delle concentrazioni di Pb totali, disciolte e DGT-labili durante il

periodo di dragaggio in tutti i siti (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Il sito RS era il sito con il più grande aumento relativo delle concentrazioni di Pb (Tabella 3).

Fraction	Site	Min	Average	Max
Cu <sub>D</sub>	RS	4.78	12.74 (36%; 3.39)	31.98
	DS	5.75	20.72 (35%; 5.39) *	37.52
	ODuS	18.63	41.17 (14%; 4.97)	60.70
	IDuS	17.63	31.84	65.60
Cu <sub>T</sub>	RS	6.24	15.25 (32%; 3.68)	36.24
	DS	7.19	25.23 (12%; 2.65)	41.54
	ODuS	25.54	59.34 (14%; 7.51)	109.85
	IDuS	34.01	440.00	3362.34
Pb <sub>D</sub>	RS	0.35	0.86 (80%; 0.38) *	1.81
	DS	0.52	1.58 (61%; 0.6) *	2.60
	ODuS	1.49	3.66 (54%; 1.29) *	7.79
	IDuS	2.22	29.32	81.31
Pb <sub>T</sub>	RS	0.47	1.49 (82%; 0.67) *	3.12
	DS	0.73	2.59 (42%; 0.76) *	5.38
	ODuS	1.91	6.55 (53%; 2.28) *	14.86
	IDuS	3.99	362.39	2978.76
Pb <sub>L</sub>	RS	0.45	0.97 (26%; 0.20) *	3.09
	DS	0.79	1.65 (15%; 0.21) *	3.09
	ODuS	2.00	4.63 (68%; 1.88) *	10.45
	IDuS	ND	ND	ND

**Tabella 3.** Valori minimi, medi e massimi delle concentrazioni disciolte e totali di Cu e Pb (in nM) nei quattro siti di studio durante il periodo di dragaggio. I valori tra parentesi corrispondono alla percentuale e al valore assoluto di aumento (in nM) delle concentrazioni rispetto al periodo di riferimento. Le stelle indicano una differenza significativa tra i due periodi. ND: non determinato.

(Slotton & Reuter (1995) e van den Berg e altri (2001) non hanno osservato un aumento del Pb disciolto durante il loro monitoraggio delle operazioni di dragaggio, hanno quindi avanzato l'ipotesi di una relativamente lenta ossidazione dei solfuri metallici e una ri-ossidazione rapida di ferro e manganese, che co-precipitano Cu e Pb in forma di ossido-idrossido particolato. Sulla base di questa ipotesi, durante il nostro studio, si può supporre sia che i solfuri metallici hanno subito una rapida ossidazione che non è stata controbilanciata dalla ossidazione di ferro e manganese, oppure che la quantità di ossidi-idrossidi formate non era sufficiente a co-precipitare tutto il Pb rimobilizzato. Resta da determinare il contributo della materia organica in questa rimobilizzazione.

Confrontando il periodo di dragaggio con il periodo di riferimento, gli aumenti delle concentrazioni di Pb disciolti e totali erano compresi tra 0,2 e 2,28 nM per RS, DS e ODuS (Tabella 3). Durante il periodo di dragaggio, gli aumenti delle concentrazioni di Pb tra ODuS e IDuS erano molto maggiori, circa 26 nM per Pb disciolto e 356 nM per Pb totale. Poiché è stato osservato un aumento delle concentrazioni di Pb tra il periodo di riferimento e il periodo di dragaggio e

accompagnato da un grande aumento di IDuS rispetto a ODuS, possiamo dedurre che la risospensione legata all'operazione di dragaggio ha provocato una contaminazione da Pb nella colonna d'acqua nell'intera area di studio. Tuttavia, la dispersione di Pb causata dal dragaggio sembra essere stata fortemente limitata dall'uso del sacchetto di geotessuto. Ciò supporta l'ipotesi che la risospensione sia la principale fonte di contaminazione da Pb nella colonna d'acqua del porto di Tolone, proposta da Dang e altri (2015).

La frazione disciolta di Pb era generalmente omogenea durante il periodo di dragaggio a RS, DS e ODuS ( $58 \pm 3\%$  in media). È stata simile a quella determinata durante il periodo di riferimento ( $56 \pm 3\%$  in media). Tuttavia, in IDuS, la frazione di Pb disciolto è scesa all'8,1%. Ciò può essere spiegato da una concentrazione molto più elevata di particelle all'interno della sacca di geotessuto, particelle per le quali Pb ha una forte affinità. Inoltre, l'aumento delle concentrazioni di Pb disciolto in ODuS e in altri siti suggerisce una diffusione di Pb disciolto al di fuori della sacca di geotessuto. Questa distribuzione a lunga distanza (quasi 4 km) non sorprende se si considerano le principali caratteristiche idrodinamiche del porto di Tolone descritte sopra, poiché RS si trova nell'area dei principali scambi di masse d'acqua tra l'area urbana più riparata e l'area costiera più aperta e scarsamente urbanizzata (Dufresne e altri, 2018).

Nessuna differenza significativa è stata osservata per le concentrazioni di Cu disciolto e totale tra il periodo di riferimento e il periodo di dragaggio (Tabella 3). Le concentrazioni totali di Cu sono apparse leggermente più elevate in IDuS rispetto a ODuS durante il dragaggio. Nel loro insieme, queste osservazioni indicano che la risospensione dei sedimenti può essere una fonte di contaminazione da Cu per la colonna d'acqua del porto di Tolone, ma la contaminazione indotta è inferiore a quella in Pb e l'uso del sacco di geotessuto sembra efficace nel limitare qualsiasi dispersione di Cu mobilizzato dal dragaggio.

Come osservato per Pb, la frazione disciolta di Cu era omogenea in RS, DS e ODuS ( $77 \pm 6\%$  in media) durante il periodo di dragaggio e vicina a quella determinata per il periodo di riferimento (vicino al 70%). Tuttavia, in IDuS, la frazione disciolta di Cu è scesa al 7,2%. Inoltre, le concentrazioni di Cu disciolto e totale in IDuS non erano correlate, mentre lo erano negli altri siti ( $r^2$  di 0.961, 0.939 e 0.718 in RS, DS et ODuS rispettivamente) sia durante il periodo di riferimento che durante il periodo di dragaggio. Infine, la concentrazione di Cu disciolto durante il dragaggio era inferiore in IDuS rispetto a ODuS mentre la concentrazione di Cu totale era più alta in IDuS (Figura 2 e Tabella 3). Ciò potrebbe corrispondere a quantità molto elevate di materiale sospeso presso IDuS ma, contrariamente a quanto osservato per Pb, non è stata rilevata alcuna diffusione di Cu disciolto al di fuori della sacca di geotessuto. La maggiore affinità del Cu per i composti organici, rispetto a quella del Pb, potrebbe spiegare questa differenza causata da una maggiore disponibilità di siti organici attivi per complessazione e assorbimento sulla superficie del Cu.

Il rapporto tra le concentrazioni di Cu/Pb disciolte era maggiore in RS (15) rispetto a DS (13) e ODuS (11) (Tabella 3). Il rapporto di concentrazione totale era simile nei tre siti ( $10 \pm 0,5$ ). Questi due rapporti erano più bassi durante il dragaggio

rispetto al periodo di riferimento, il che è spiegato dall'aumento delle concentrazioni di Pb durante il dragaggio. Questa osservazione conferma le diverse conseguenze della risospensione dei sedimenti per la contaminazione da Pb e Cu nella colonna d'acqua, per le fasi disciolta e particellare.

Nonostante l'omogeneità del rapporto tra le concentrazioni totali di Cu/Pb, queste concentrazioni totali erano molto variabili nello spazio durante il periodo studiato. Potrebbero variare di un fattore 90 per Cu e 1600 per Pb tra i siti RS e IDuS (Figura 3). Sebbene i materiali in sospensione non siano stati studiati, un simile aumento era molto probabilmente correlato ad un aumento della loro concentrazione poiché la differenza tra IDuS e ODuS ha raggiunto un fattore medio rispettivamente di 7,5 per Cu e 55 per Pb, nonostante questi due siti fossero distanti solo pochi metri. Inoltre, le concentrazioni di Cu e Pb totali e le concentrazioni di Pb disciolto sono apparse molto variabili nel tempo (Figura 3). Ad esempio, le variazioni più estreme in IDuS consistevano in aumenti tra due campionamenti consecutivi di un fattore di 35, 16 o 645 per Cu totale, Pb disciolto e Pb totale, rispettivamente. Questi aumenti erano talvolta sincronizzati per tutti i siti, suggerendo possibili scambi di masse d'acqua a breve termine tra i siti sotto l'influenza dell'idrodinamica. Tuttavia, questi periodi di variazione sincronizzata erano piuttosto rari, suggerendo la predominanza di impatti locali a breve termine. Il significativo aumento di tutte le concentrazioni di Pb durante il dragaggio suggerisce tuttavia un effetto cumulativo dell'operazione a lungo termine.

Va notato che durante il periodo di dragaggio sono stati registrati periodi di vento forte più frequenti (in media 7 al mese) rispetto al periodo di riferimento (in media 3 al mese). Nonostante ciò, non è stata osservata alcuna correlazione tra la direzione o l'intensità del vento e le concentrazioni di Cu o Pb, suggerendo che il vento non fosse responsabile dell'alta variabilità di queste concentrazioni nel porto di Tolone durante il periodo d'osservazione e ponendo in primo piano l'influenza del dragaggio sulla contaminazione chimica della colonna d'acqua.

Pertanto, sebbene siano state prese precauzioni per limitare la dispersione di particelle su larga scala durante questo dragaggio, lo stoccaggio sott'acqua dei sedimenti in un compartimento semipermeabile ha comunque comportato un impatto ambientale significativo, in particolare a causa del rilascio in acqua di Pb DGT-labile e quindi potenzialmente biodisponibile.

#### 4. Il dragaggio ha accentuato le variazioni spaziali nella struttura dell'ultrafitoplancton

Le maggiori quantità di HP osservate durante l'intero monitoraggio sono state registrate all'interno della sacca di geotessuto, presso IduS. Inoltre, in tutti i siti, è stato osservato un leggero ma significativo aumento di HP durante il periodo di dragaggio rispetto al periodo di riferimento (Figura 4). L'arricchimento in HP era già stato osservato durante una precedente risospensione sperimentale di sedimenti (Goñi-Urriza e altri, 2018). Il nostro studio traspone questa osservazione *in situ* e mostra che sebbene siano state prese precauzioni, il metodo di dragaggio usato non ha evitato un impatto sul biota .

Per quanto riguarda la comunità ultrafitoplanctonica, non è stata osservata alcuna differenza nell'abbondanza totale e nessuno dei 4 gruppi considerati ha mostrato alcuna variazione significativa tra i due periodi di monitoraggio. In IduS, mentre l'abbondanza totale media non era diversa da quella degli altri siti durante il dragaggio, l'abbondanza media di PPE era la più alta di tutti i siti e l'abbondanza media di SYN era la più bassa ( Figura 4). Di conseguenza, il cambiamento nella struttura osservato tra RS e OduS durante il periodo di riferimento è stato sempre osservato anche durante il dragaggio e persino accentuato all'interno del sacco di geotessuto, dove la percentuale più alta di PPE è stata osservata nel 65% delle date di campionamento. Ciò suggerisce che la risospensione dei sedimenti in IduS ha accentuato il cambiamento nella struttura rispetto alla situazione di riferimento in RS. Coclet e altri (2018) hanno dimostrato con approcci sperimentali che un tale cambiamento nella struttura potrebbe essere collegato alla contaminazione dei metalli tanto quanto alla risospensione dei sedimenti. Mentre l'aggiunta di metalli nel loro lavoro ha portato a un forte declino nella comunità ultrafitoplanctonica, l'esposizione a un elutriato di sedimenti ha temporaneamente favorito la crescita del fitoplancton. Lafabrie e altri (2013) hanno anche notato una stimolazione temporanea simile dei gruppi pico e nano fitoplanctonici mediante la risospensione dei sedimenti. Così, si può supporre che la variazione spaziale nella struttura della comunità ultrafitoplanctonica osservata durante questo monitoraggio a lungo termine della rada di Tolone, poco profonda e semi-chiusa, potrebbe essere collegata alla risospensione dei sedimenti dovuta a diverse attività umane, anche al di fuori del periodo di dragaggio.

Sebbene non sia stato determinato durante questo studio, il biovolume ultrafitoplanctonico era probabilmente più importante nell'area riparata della zona nord e in particolare all'interno della sacca geotessile poiché il dominio di piccole cellule SYN ( $\leq 1\mu\text{m}$ ) era sostituito da una predominanza di cellule PPE più grandi ( $\geq 2,5\mu\text{m}$  durante questo monitoraggio) senza alcuna variazione nel numero totale di cellule di ultrafitoplancton. Di conseguenza, una maggiore produzione primaria potrebbe spiegare la maggiore abbondanza di HP, che sono noti per fare molto affidamento sulle risorse di fitoplancton nell'ambiente marino (Williams e altri, 2013; Buchan e altri, 2014; Luria e altri, 2017). Il ruolo della risospensione dei sedimenti nella fornitura di risorse organiche per la comunità HP non può tuttavia essere

escluso poiché la risospensione dei sedimenti può rilasciare quantità significative di carbonio organico (Guigue e altri, 2017), alimentando la crescita di HP in tempi brevi (Goñi - Urriza e altri, 2018). Inoltre, il potenziale mixotrofico dei PPE (Hartmann e altri, 2013) potrebbe anche contribuire al loro successo in caso di crescita di HP indotta dalla risospensione dei sedimenti, come quella osservata nel porto di Tolone. Le rispettive influenze dei cambiamenti nella struttura dell'ultrafitoplancton e di rilascio di carbonio organico dato dalla risospensione dei sedimenti richiedono ulteriori indagini per valutare una potenziale alterazione del funzionamento della rete trofica planctonica specifica alle attività di dragaggio, come osservato in altri contesti costieri (Jonsson e altri, 2017).

## C. Conclusioni

Il monitoraggio a lungo termine di un periodo senza attività di dragaggio ha rafforzato le osservazioni precedenti e ha dimostrato la persistenza di un gradiente spaziale di contaminazione metallica nelle acque del porto di Tolone. Inoltre, sebbene studiato qui in un'area più piccola, anche il predominio dei PPE sui SYN nei siti più contaminati sembra essere ricorrente nel lungo termine. Le dinamiche temporali degli ultrafitoplancton e degli HP, tuttavia, sembrano essere controllate da parametri diversi rispetto alla contaminazione metallica.

Durante un'operazione di dragaggio piuttosto lunga, l'aspirazione dei sedimenti unita alla loro conservazione sott'acqua in un sacchetto di geotessuto semipermeabile ha permesso di limitare notevolmente la dispersione dei sedimenti dragati e la contaminazione da particelle nella colonna di acqua su larga scala spaziale. Tuttavia, nonostante questo protocollo, durante il periodo di dragaggio sono stati osservati aumenti significativi delle concentrazioni di Pb su larga scala (a diversi km dai siti di dragaggio e di conservazione dei sedimenti in mare), a causa della probabile influenza della circolazione idrodinamica nella zona. Sono stati osservati degli impatti dovuti al dragaggio sul biota microbico, consistenti principalmente nella stimolazione della crescita degli HP su larga scala e in un aumento del dominio dei PPE sui SYN localizzato nell'area di stoccaggio dei sedimenti in mare. I processi ecologici indotti dalla risospensione e che portano a questi impatti rimangono ancora da determinare.

Le più alte concentrazioni di metallo, le più alte abbondanze di HP e le più alte proporzioni di PPE sono state osservate nel sito di stoccaggio in mare creato per questa operazione di dragaggio. Questo sito sembrava quindi estendere i limiti dei gradienti spaziali chimici e biologici osservati durante il periodo di riferimento. Nel loro insieme, queste osservazioni ci indicano un'influenza potenzialmente forte della risospensione nel funzionamento ecologico del porto di Tolone.

Una caratterizzazione simultanea delle risorse necessarie ai metabolismi energetico (luce, O<sub>2</sub>) e nutritivo (nutrienti organici e inorganici), nonché una migliore caratterizzazione della speciazione di Pb (controllando la sua lability) rappresentano

direzioni future di ricerca per valutare meglio i processi ecologici alla base di queste osservazioni. Inoltre, valutare la quantità, la mineralogia, la granulometria e la contaminazione delle particelle in parallelo con misurazioni delle caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua (come il potenziale redox, il pH e la disponibilità di ossigeno) con una risoluzione temporale più fine sono attività necessarie per una migliore comprensione dei processi che controllano la rimobilizzazione dei metalli.

Questo studio ha rivelato la necessità di prendere precauzioni significative quando si intraprendono attività di dragaggio al fine di ridurre al minimo la contaminazione della fase disciolta, che è molto spesso trascurata. In effetti, se l'impatto delle particelle rimesse in sospensione sembra essere stato controllato, la fase disciolta è stata invece influenzata dalla diffusione di Pb attraverso la sacca di geotessuto utilizzata. Queste osservazioni dovranno essere completate per altri tipi di contaminanti e potranno servire da base per lo sviluppo di future tecniche per ridurre l'impatto ambientale delle attività portuali.



## **II. APPROCCI SPERIMENTALI CHE SIMULANO LA RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI**

Data la difficoltà di monitorare in modo completo i vari parametri di qualità chimica dell'acqua e dei sedimenti durante un'operazione di dragaggio, o più in generale in un'area portuale soggetta a risospensione antropica, ma anche spesso naturale, dei sedimenti, la valutazione dei rischi chimici, biologici ed ecotossici richiede approcci sperimentali in condizioni (semi) controllate in laboratorio.

I partner del progetto SEDRIPORT hanno svolto vari lavori sperimentali volti a (A) caratterizzare i trasferimenti di contaminanti metallici tra particelle risospese e acqua di mare al fine di specificare il rischio chimico in diverse condizioni ambientali e diverse intensità di risospensione, (B) valutare le risposte in termini di diversità della comunità microbica nell'ambiente portuale al fine di valutare il rischio ecologico e identificare le principali conseguenze della risospensione dei sedimenti contaminati e (C) beneficiare dello studio di diversi contesti portuali per confrontare diversi protocolli di test ecotossicologici volti a valutare la tossicità dei sedimenti utilizzando larve di ricci di mare nell'area transfrontaliera.

Il lavoro descritto di seguito rappresenta una base interessante per orientare le future ricerche teoriche e applicate, ma anche le scelte future per la gestione delle operazioni portuali che implicano un dragaggio.

## A. Valutazione della mobilità dei contaminanti metallici durante la risospensione dei sedimenti

Il trasferimento di metallo tra le fasi di particolato e disciolto può essere all'origine della contaminazione chimica della colonna d'acqua, come mostrato dai dati del monitoraggio *in situ* riportati nella prima parte di questo documento. Queste contaminazioni disciolte sono attualmente molto poco monitorate e, se gli strumenti di monitoraggio progrediscono, manca però la conoscenza dei processi indotti e dei loro fattori di controllo per gestirli. La comunità scientifica sta attualmente lavorando su modelli biogeochimici, basati su prove sperimentali, per cercare di prevedere questi trasferimenti in caso di risospensione di sedimenti contaminati. Tuttavia, i dati sperimentali necessari per alimentare tali modelli sono scarsi e rappresentano solo pochi contesti portuali isolati.

Nell'ambito del progetto SEDRI PORT, è stato effettuato un lavoro sperimentale con campioni provenienti da contesti portuali altamente contrastanti, utilizzando sedimenti di un'area commerciale di recente livellamento, sedimenti di un'area di acquacoltura e sedimenti di un'area militare storicamente contaminata. L'obiettivo di questo approccio sperimentale era (1) valutare la cinetica del trasferimento di metalli tra acqua e sedimenti durante la risospensione artificiale e (2) valutare l'influenza della quantità di sedimento risospeso per confrontare l'influenza simulata di fenomeni naturali e antropici.

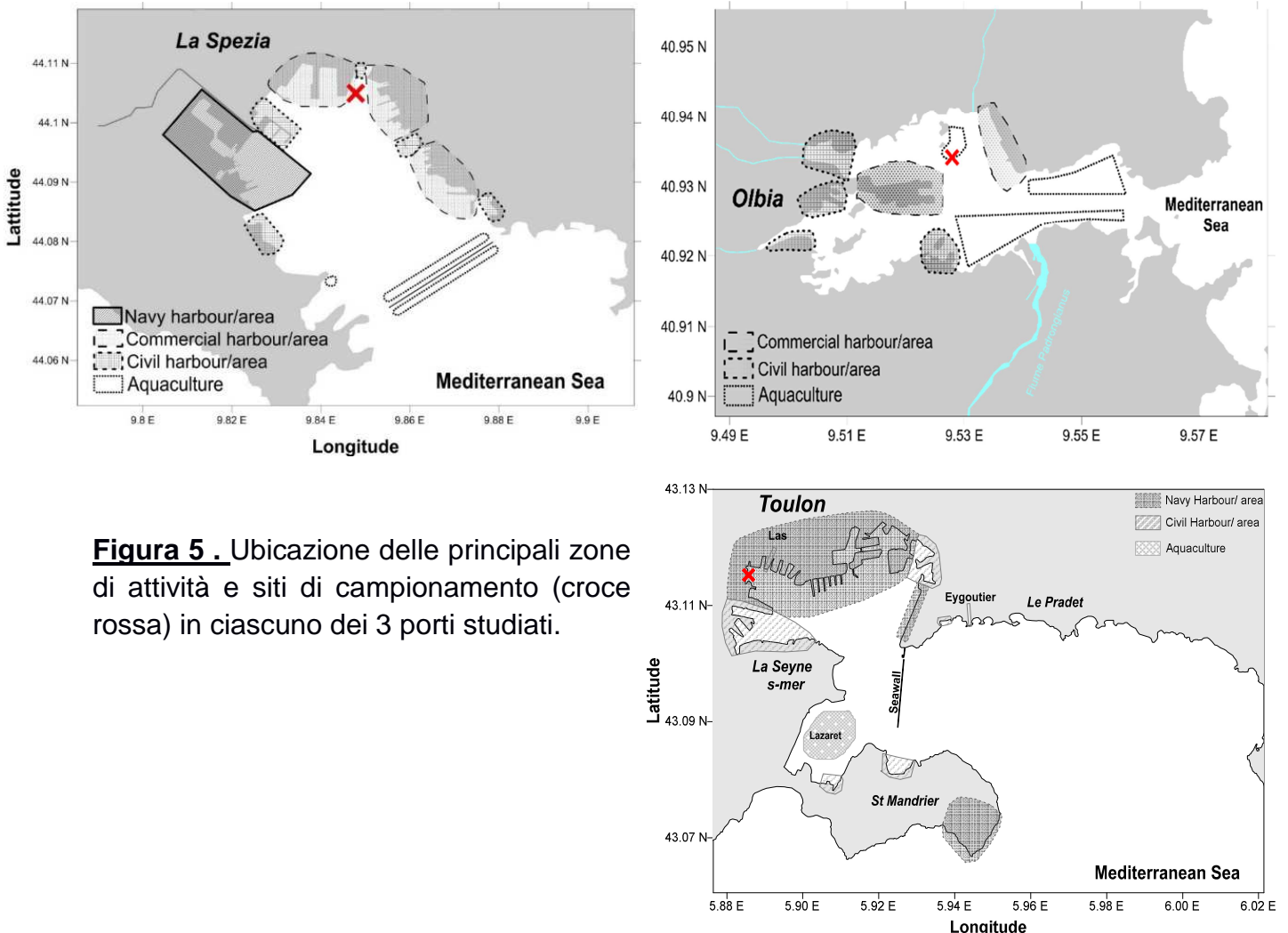
### 1. Materiali e metodi

#### *a - Siti di studio, prelievi sul campo e trattamento dei campioni*

Sedimenti e acqua sono stati raccolti in 1 sito di ciascuno dei porti di La Spezia, Olbia e Tolone (Figura 5). Il porto di La Spezia è stato campionato a novembre 2017, a 7 m di profondità, nei pressi del Molo Fornelli, un'area portuale dedicata al trasporto merci. Il sito campionato era molto specifico, poiché si trattava di un accumulo di sedimento formatosi 2 anni prima a seguito di un'operazione di livellamento. Come dettagliato nel documento T.2.3.5, questa operazione di livellamento ha influenzato profondamente le caratteristiche di questi sedimenti. Il porto di Olbia è stato campionato a giugno 2018, a 4 m di profondità, in una zona di mitilicoltura. Il porto di Tolone è stato campionato a gennaio 2019, a 1,5 m di profondità, nella zona militare con accesso limitato situato nella parte più antropizzata del porto.

In ogni sito è stata utilizzata una barca leggera messa a disposizione dal personale locale per prelevare 25 litri d'acqua utilizzando una bottiglia a chiusura orizzontale di tipo van Dorn (Wildco, modello Beta) precedentemente pulita con acido nitrico al 10% (v/v) e sciacquata accuratamente con acqua MilliQ in laboratorio. Al momento del prelievo in mare, la bottiglia è stata sciacquata con acqua MilliQ leggermente acidificata (HCl 0,1% v/v), quindi abbondantemente sciacquata con acqua del sito di campionamento. L'acqua di mare campionata è stata quindi immagazzinata in un cilindro di HDPE (polietilene ad alta densità), precedentemente

ben pulita (con HNO<sub>3</sub> 10% v/v, quindi sciacquata tre volte con acqua MilliQ e infine sciacquata tre volte con acqua del sito di campionamento prima del riempimento). Una volta completato il prelievo dell'acqua, è stato raccolto un nucleo di sedimenti di almeno 30 cm utilizzando un carotiere di superficie Uwitec dotato di un tubo di plastica di 10 cm di diametro .



**Figura 5.** Ubicazione delle principali zone di attività e siti di campionamento (croce rossa) in ciascuno dei 3 porti studiati.

Entro 24 ore dalla raccolta, la carota di sedimento è stato trattato in laboratorio in atmosfera inerte (arricchito in N<sub>2</sub> per evitare l'ossidazione). L'acqua galleggiante è stata rimossa mediante una leggera aspirazione per disturbare il meno possibile l'interfaccia acqua-sedimento. La carota di sedimento è stata quindi tagliata in 6 fette di 5 cm di spessore per considerare lo stesso spessore di sedimento (30 cm) per tutti i porti studiati. Ogni fetta è stata omogeneizzata in una bottiglia di HDPE da 2 L precedentemente pulita con acido nitrico al 10% (v/v) e sciacquata accuratamente con acqua MilliQ.

La stessa massa di sedimenti di ciascuna fetta è stata quindi sottocampionata e questi 6 sottocampioni sono stati miscelati in un nuovo flacone HDPE di 2L precedentemente pulito, per formare un campione composito che rappresenta un'integrazione dei 30 cm di sedimenti superficiali da ciascun sito. Tutti questi campioni di sedimenti sono stati quindi conservati in sacchetti di plastica ermetici riempiti con N<sub>2</sub> per un massimo di 48 ore prima dell'uso per gli esperimenti.

### *b - Dispositivi e condizioni sperimentali*

Tutti gli esperimenti di miscelazione acqua/sedimento sono cominciati entro 72 ore dalla raccolta dei campioni, effettuati per un periodo di 2 settimane, al buio, a temperatura ambiente, in flaconi in Teflon pre-puliti come descritto sopra, con agitazione a rotazione costante (utilizzando un agitatore impostato a 12 giri al minuto, Figura 6A). Al fine di valutare la cinetica del trasferimento di elementi metallici tra acqua e sedimenti, sono stati condotti due esperimenti separati per ciascun sito: un cosiddetto esperimento "cinetico" che consente di valutare i trasferimenti di metalli tra acqua e sedimenti nel tempo, e un esperimento chiamato "ratio" per valutare l'impatto finale, dopo due settimane di miscelazione, dei diversi rapporti sedimento/acqua sulla contaminazione dei metalli nell'acqua (Figura 6B). L'agitazione è stata brevemente interrotta una volta al giorno per aprire le bombole e consentire un rinnovo dei gas, evitando così la deossigenazione. Questi due esperimenti hanno quindi permesso di valutare le potenziali conseguenze di un'operazione di dragaggio in funzione del tempo e in funzione della sua intensità.

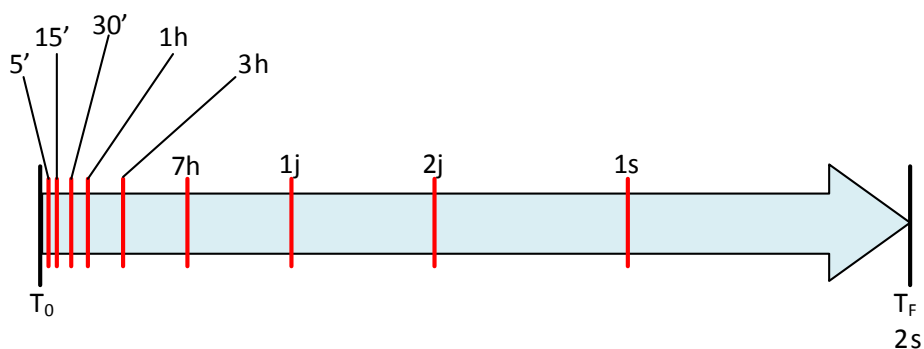


**Figura 6 .** Agitatore rotante utilizzato per garantire una miscelazione costante e riproducibile (A) e un gradiente dei rapporti sedimenti/acqua utilizzati per simulare diverse intensità di risospensione nell'area portuale (B).

Il protocollo di ciascun esperimento è stato rigorosamente applicato in modo identico ai campioni di ciascun sito. Innanzitutto, Eh e pH sono stati misurati

nell'acqua di mare per conoscere i valori di riferimento. Delle frazioni di ciascun sedimento sono state anche trasferite in provette da centrifuga di qualità Trace Metal Grade per future analisi chimiche che permettano di caratterizzare lo stato iniziale. Quindi frazioni di sedimento sono state pesate per preparare le future miscele, avendo cura di tenerle in un'atmosfera inerte fino al momento della miscelazione in acqua per preservare la loro natura riducendo il più a lungo possibile.

Per l'esperimento cinetico, una bottiglia di teflon da 5 litri è stata riempita con acqua di mare prelevata dal sito di interesse, quindi sono stati aggiunti 12,5 g di sedimento composito (corrispondenti a 5 g di sedimento secco, ovvero con un rapporto sedimenti/acqua di  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ). La miscela è stata immediatamente omogeneizzata manualmente prima dell'inserimento nell'agitatore a rotazione. Per seguire la cinetica di trasferimento degli ETM, che è controllata da vari processi veloci e lenti, sono state fissate 10 fasi temporali per prelievi dal flacone ad intervalli di tempo crescenti (Figura 7). Durante ogni prelievo dal flacone, è stato effettuato un prelievo rapido di 60 ml utilizzando una siringa dotata di tubi in teflon, pre-puliti come descritto sopra, al fine di campionare correttamente sia l'acqua che le particelle (prima che sedimentino così da evitare di sbilanciare il rapporto sedimento/acqua a lungo termine) e per evitare di interrompere l'agitazione per troppo tempo (specialmente per i primi intervalli di tempo, molto vicini tra loro). Ogni campione è stato immediatamente filtrato attraverso un filtro in linea di  $0,2 \mu\text{m}$  collegato alla siringa. Il filtrato è stato raccolto in un flacone di teflon precedentemente pulito come descritto sopra, quindi acidificato (HCl bidistillato 0.2 % v/v finale) e conservato a temperatura ambiente fino all'analisi. Parallelamente, una miscela simile è stata realizzata in un volume di 1L contenuto in una bottiglia di HDPE e inserita nell'agitatore a rotazione. Questo flacone era dedicato a misurazioni regolari di Eh e pH che non potevano essere eseguite nel flacone da 5 litri a causa del rischio di contaminazione in ETM legato alle sonde utilizzate. Le misurazioni di Eh e pH sono state effettuate in tutte le date di prelievo e una volta al giorno a partire dal terzo giorno di miscelazione.



**Figura 7.** Cronologia dei prelievi durante esperimenti di tipo "cinetico".

Per l'esperimento "ratio", sono stati scelti 10 rapporti di sedimento/acqua: 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 e  $50 \text{ g.L}^{-1}$  (equivalente in peso secco del sedimento).

Questi rapporti coprivano quindi una vasta gamma di intensità di risospensione dei sedimenti nella zona costiera, rappresentativa dei fenomeni climatici naturali (tempeste), dell'influenza del traffico marittimo e in particolare delle manovre delle imbarcazioni più grandi e delle operazioni di dragaggio intenso. Questo esperimento è stato condotto con flaconi in teflon da 250 ml, riempiti con acqua di mare prelevata dai siti di interesse. È stato quindi aggiunto il sedimento composito pre-pesato in atmosfera inerte e i flaconi sono stati agitati manualmente prima dell'inserimento nell'agitatore a rotazione. Questo esperimento è stato effettuato ogni volta in parallelo con l'esperimento cinetico, al fine di assicurarsi di lavorare con sedimenti e acqua della stessa qualità. Dopo due settimane di miscelazione, il contenuto dei flaconi è stato centrifugato a  $4250 \times g$  per 2 minuti in provette da centrifuga Trace Metal Grade da 50 ml. Il galleggiante è stato quindi filtrato utilizzando siringhe dotate di filtri porosi in linea da  $0,2 \mu\text{m}$ , tutti precedentemente puliti come descritto sopra. Il filtrato è stato raccolto in un flacone di teflon da 60 ml pre-pulito come descritto sopra, quindi acidificato (HCl bidistillato 0.2 % v/v finale) e conservato a temperatura ambiente fino all'analisi.

### *c - Analisi chimiche*

L'Eh è stato misurato utilizzando una sonda multi-parametro HQ40d (Hach-Lange). I valori di pH sono stati misurati con un pHmetro pH 1100L (Lumitron).

I campioni di sedimenti compositi conservati in provette da centrifuga Trace Metal Grade sono stati centrifugati a  $4250 \times g$  per 10 minuti. Il galleggiante è stato quindi filtrato in atmosfera inerte usando una siringa dotata di un filtro in linea di 0,2 micron di porosità, il tutto è stato precedentemente pulito come descritto sopra. Il filtrato corrispondeva all'acqua interstiziale dei sedimenti. Il fondo, corrispondente alla fase solida dei sedimenti, è stato congelato e quindi liofilizzato.

Le concentrazioni di solfuri nelle acque interstiziali sono state misurate lo stesso giorno mediante spettroscopia ad assorbimento usando kit commerciali, serbatoi di polistirene lunghi 1 cm e uno spettrofotometro UV/visibile (UV-1800, Shimadzu).

Le concentrazioni di carbonio organico disciolto (DOC) nell'acqua di mare prelevata in situ e nell'acqua interstiziale sono state determinate usando un analizzatore TOC- $V_{\text{CSH}}$  (Shimadzu). Le analisi sono state validate utilizzando un materiale di riferimento certificato (SUPER 05, Canada).

Le concentrazioni di carbonio organico particolato (POC) nei sedimenti compositi liofilizzati sono state determinate utilizzando un analizzatore CHNS flash 2000 (Thermo Electron) mediante il metodo di ossidazione catalitica ad alta temperatura ( $900^\circ\text{C}$ ). La calibrazione è stata eseguita utilizzando lo standard NC soil (Thermo Electron).

Le concentrazioni disciolte e il contenuto di metalli nei sedimenti (Cu, Pb) sono stati determinati mediante HR-ICP-MS (High Resolution - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry).

## 2. Risultati e discussione

### a - Caratterizzazione dei campioni iniziali

Per ogni esperimento, sono stati caratterizzati l'acqua e i sedimenti iniziali. Per i sedimenti, la fase solida e la loro acqua interstiziale sono state distinte per valutare rispettivamente la loro contaminazione e il loro stato diagenetico (Tabella 4).

Matrice	Variable	La Spezia	Olbia	Tolone
<b>Sedimento: solido</b>	<i>Granulometria (% &lt;63 <math>\mu\text{m}</math>)</i>	54	72	60
	<i>POC (<math>\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</i>	4.2	19	21
	<i>Cu (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</i>	26	31	41
	<i>Pb (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</i>	20	30	280
<b>Sedimento - acqua interstiziale</b>	<i>Solfuri (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<1	194	822
	<i>DOC (<math>\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</i>	14	31	12
	<i>Cu (<math>\text{nM}</math>)</i>	7	3	2
	<i>Pb (<math>\text{nM}</math>)</i>	1.2	0.62	3.74
<b>Acqua</b>	<i>Eh (<math>\text{mV}</math>)</i>	359	322	291
	<i>pH</i>	8.30	8.36	7.79
	<i>DOC (<math>\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</i>	1.02	1.17	0,79
	<i>Cu (<math>\text{nM}</math>)</i>	31	11	16
	<i>Pb (<math>\text{nM}</math>)</i>	0,28	0.25	1.31

**Tabella 4 .** Caratteristiche principali dei campioni di acqua e sedimenti prelevati nei porti di La Spezia, Olbia e Tolone per gli esperimenti di risospensione.

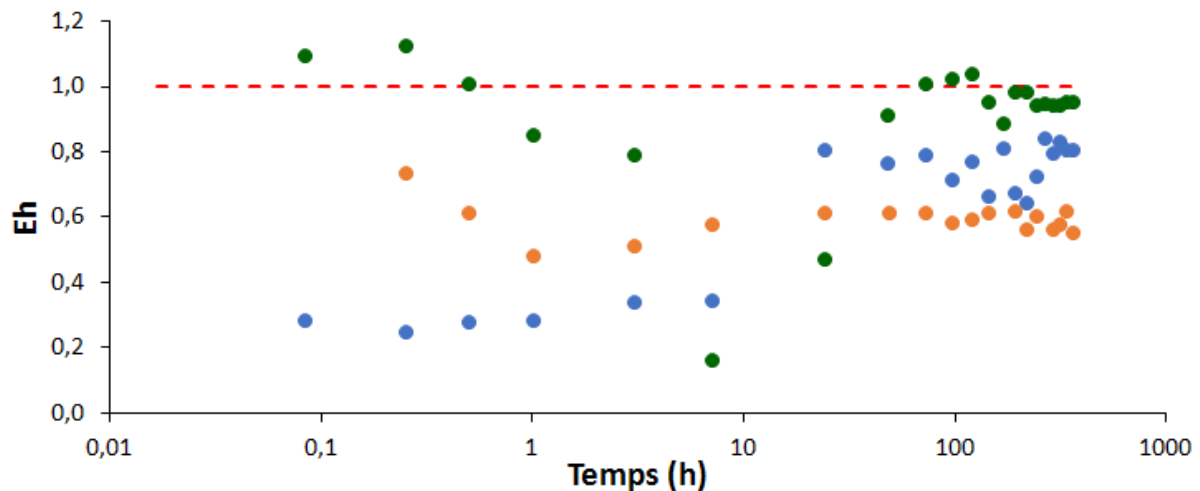
Questa prima analisi evidenzia alcuni importanti contrasti tra i campioni iniziali, in particolare un sedimento che è più povero di POC e solfuri a La Spezia rispetto agli altri due siti. L'acqua interstiziale e superficiale a La Spezia era più concentrata in Cu. I campioni di sedimento di Olbia e Tolone erano quindi caratterizzati da un maggiore contenuto di carbonio organico e dalla presenza in alta concentrazione di solfuri liberi nell'acqua interstiziale. Si distinguevano tuttavia per una contaminazione molto più elevata del Pb nel solido a Tolone. L'acqua in questi due siti si distingueva principalmente per la sua concentrazione di Pb disciolto, che era più alta a Tolone .

Al fine di confrontare le variazioni temporali dei diversi parametri analizzati in questi esperimenti tenendo conto delle differenze talvolta forti dei valori iniziali, i risultati seguenti saranno presentati dividendo tutti i valori per quelli dell'acqua di mare iniziale al fine di valutare correttamente i fattori di variazione indotta dalla risospensione.

### b - Variazioni dei parametri fisico-chimici durante la miscelazione

I tre esperimenti hanno mostrato variazioni abbastanza contrastate di Eh ma sono sempre rimasti positivi, indicando l'assenza di anossia o ipossia durante la miscelazione. Per La Spezia, si è osservata una forte riduzione nei primi minuti, i valori sono rimasti stabili intorno a 100mV fino a 7 ore di miscelazione, quindi sono aumentati dopo un giorno per stabilizzarsi all'80% circa del valore iniziale di acqua di

mare utilizzata. Per Olbia, si è verificato un brusco calo di Eh più tardivamente, dopo 7 ore di miscelazione, prima di tornare a valori vicini a quello dell'acqua di mare iniziale dopo 2 giorni. Per Tolone è stata osservata una riduzione immediata, massima dopo 1 ora e stabilizzata a circa il 55% del valore iniziale fino alla fine del monitoraggio (Figura 8).

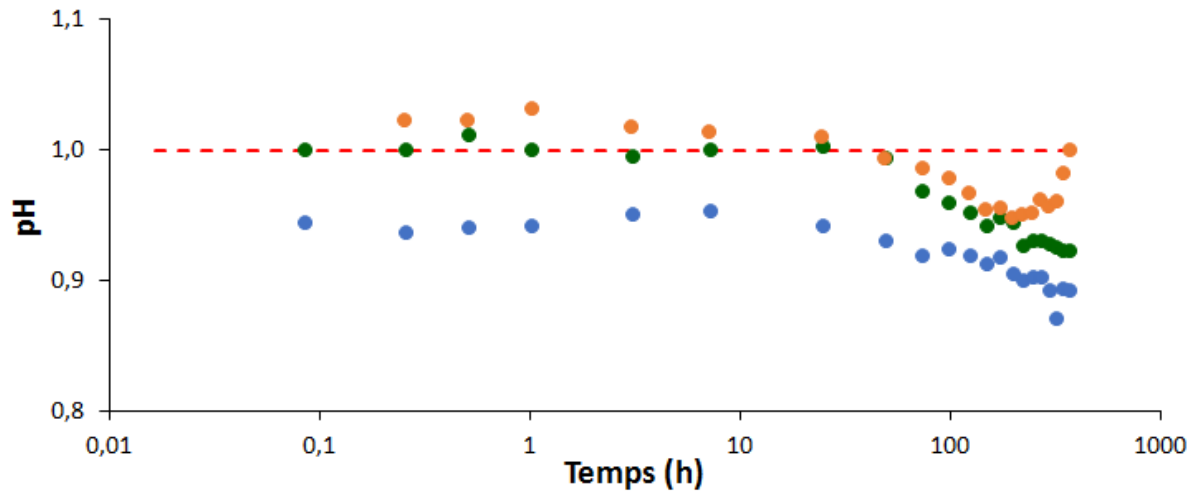


**Figura 8** . Variazioni temporali di Eh rispetto all'acqua di mare iniziale (linea tratteggiata rossa) durante i tre esperimenti effettuati. L'esperienza di La Spezia è mostrata in blu, quella di Olbia in verde e quella di Tolone in arancione.

I tre esperimenti hanno mostrato variazioni più simili nel pH, con ogni volta una progressiva acidificazione della miscela. I minimi osservati corrispondevano a diminuzioni di 0,6 punti. Una progressiva acidificazione potrebbe derivare dalla stimolazione dell'attività microbica, generando una produzione di CO<sub>2</sub> e di altre molecole di acido organico che contribuiscono a ridurre il pH (Cai e altri, 2011). Tuttavia, a La Spezia è stata osservata una variazione immediata durante i primi minuti, e per Tolone è stato osservato un aumento e un ritorno ai valori dell'acqua di mare iniziale alla fine dell'esperimento (Figura 9). Pertanto l'attività microbica sembra essere stata stimolata in modo diverso, più o meno a lungo in ogni esperimento. Il contributo di processi abiotici, come la trasformazione della materia organica e la solubilizzazione degli acidi umici presenti nei sedimenti iniziali, potrebbe anche aver contribuito alle differenze osservate (Dang e altri, 2020). Sembra allo stato attuale difficile prevedere l'impatto finale di questo tipo di risospensione dei sedimenti dopo 2 settimane sul pH dell'ambiente.

Così, dopo due settimane di miscelazione, la qualità fisico-chimica dell'acqua sembra essersi modificata in modo duraturo nei tre siti, con processi diversi.

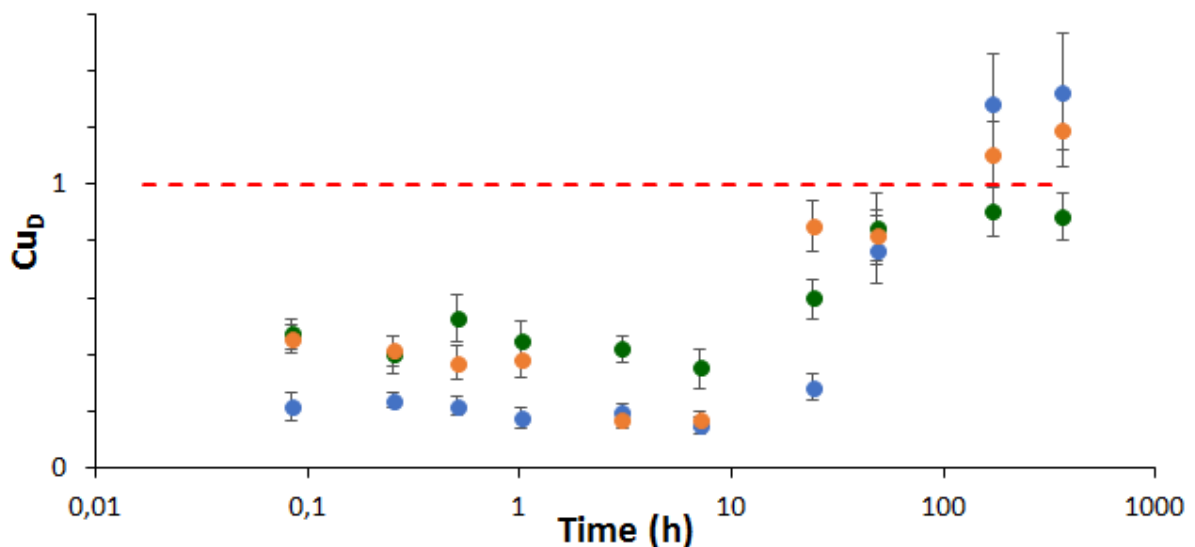




**Figura 9** . Variazioni temporali di pH sull'acqua di mare iniziale (linea tratteggiata rossa) nei tre esperimenti. L'esperienza di La Spezia è mostrata in blu, quella di Olbia in verde e quella di Tolone in arancione.

*c - Variazioni di contaminazione del rame disciolto durante la miscelazione*

Durante i tre esperimenti, è stata osservata una tendenza temporale simile dei trasferimenti di Cu: una forte diminuzione della concentrazione di Cu disciolto è stata registrata fin dai primi minuti e durante le prime ore, prima di un graduale aumento dopo uno o diversi giorni per raggiungere concentrazioni simili a quelle dell'acqua di mare iniziale (Figura 10 ).



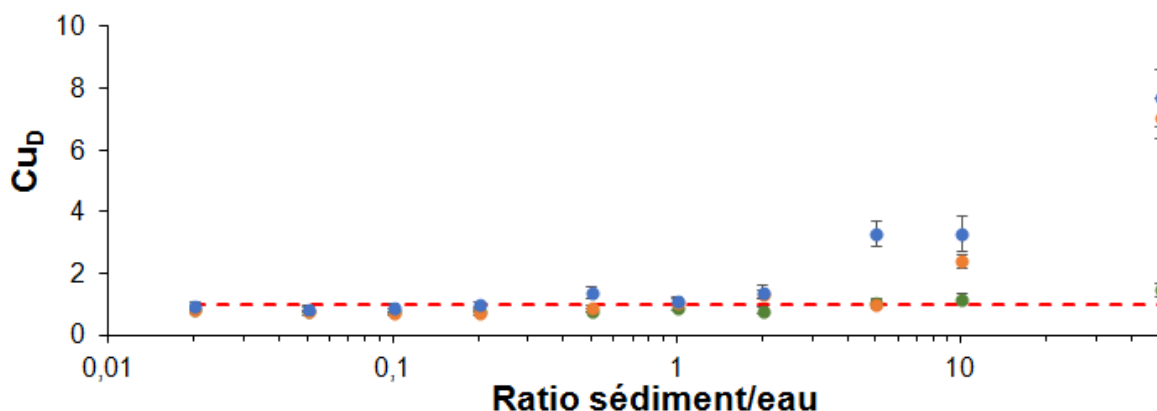
**Figura 10** . Variazioni temporali della concentrazione di Cu disciolto rispetto all'acqua di mare iniziale (linea tratteggiata rossa) durante i tre esperimenti effettuati. L'esperienza di La Spezia è mostrata in blu, quella di Olbia in verde e quella di Tolone in arancione.

Tuttavia, tra questi diversi esperimenti sono emerse notevoli differenze di ampiezza. Innanzitutto, è stato con i campioni di La Spezia che la diminuzione è stata massima durante i primi minuti di miscelazione, nonostante una concentrazione

circa due volte superiore nell'acqua iniziale. La diminuzione osservata dopo 5 minuti di miscelazione è stata dell'80% circa. Valori simili sono stati raggiunti per Tolone dopo 3 ore di miscelazione. Per Olbia, questa riduzione iniziale era limitata al 60%. Tale diminuzione di Cu disciolto corrisponde a un trasferimento significativo alle particelle, siano esse sedimentarie e organiche (assorbimento) o inorganiche e formate dall'ossidazione degli idrossidi (co-precipitazione) fornita dai sedimenti (Dang e altri, 2020; Slotton & Reuter, 1995; Van der Berg et al., 2001). Le concentrazioni di Cu nelle acque interstiziali iniziali erano simili e molto basse, rappresentando un contributo trascurabile alla miscela, non permettendo quindi di spiegare la minore diminuzione di Cu disciolto osservata a Olbia.

Il ritorno della concentrazione di Cu disciolto a valori simili a quella dell'acqua di mare iniziale corrisponde a un deassorbimento che comporta un processo più lento. Potrebbe corrispondere in particolare a un'ossidazione dei solfuri sedimentari o ad un'alterazione biotica o abiotica della materia sedimentaria organica (Dang e altri, 2020; Slotton & Reuter, 1995; Van der Berg e altri, 2001). Il contenuto di solfuri dei sedimenti iniziali non sembra influenzare questo trasferimento poiché è osservato in modo simile con campioni molto bassi in solfuri (La Spezia) e altri molto ricchi in solfuri (Olbia, Tolone).

La risospensione a diversi rapporti sedimento/acqua ha permesso di dimostrare che dopo 2 settimane è stata osservata una concentrazione di Cu disciolta simile a quella dell'acqua di mare per tutti i rapporti per i campioni di Olbia, per i rapporti tra 0.02 et 5 g.L<sup>-1</sup> per Tolone e per i rapporti tra 0.02 et 2 g.L<sup>-1</sup> per La Spezia (Figura 11). La concentrazione finale di Cu disciolto è stata moltiplicata per 7 per i rapporti maggiori con i campioni di Tolone e La Spezia.



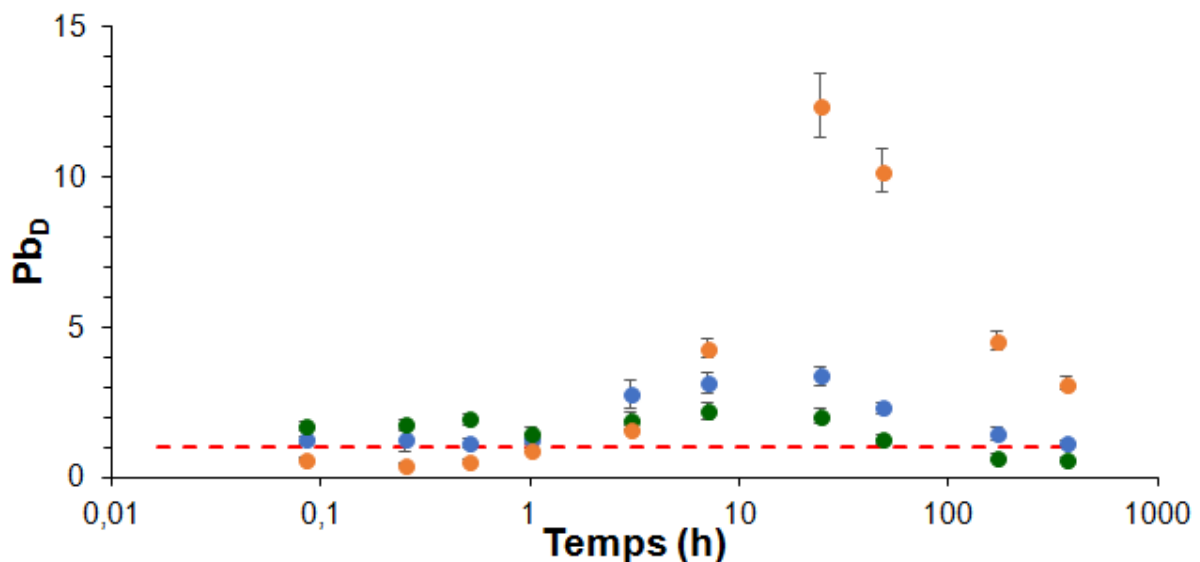
**Figura 11** . Concentrazione di Cu disciolto rispetto all'acqua di mare iniziale (linea tratteggiata rossa) dopo due settimane di miscelazione a seconda della concentrazione di sedimento risospeso (g.L<sup>-1</sup>). L'esperienza di La Spezia è mostrata in blu, quella di Olbia in verde e quella di Tolone in arancione.

Questa esperienza dimostra che il rilascio di Cu nel disciolto evidenziato nella seconda parte del monitoraggio cinetico può in determinate condizioni portare a una forte contaminazione della colonna d'acqua. Tuttavia, questa contaminazione non sembra dipendere dal contenuto di Cu o dalla concentrazione di solfuri liberi nei

sedimenti poiché i campioni di Tolone danno un risultato simile a quelli di La Spezia. Come menzionato da Dang e altri (2020), le interazioni con la materia organica per le quali Cu ha una forte affinità potrebbero spiegare questi risultati, soprattutto considerando la stretta vicinanza tra il sito di campionamento di Olbia e un'importante area di acquacoltura, fonte di forti accumuli di materia organica fresca nei sedimenti superficiali.

#### *d - Variazioni di contaminazione del piombo disciolto durante la miscelazione*

Durante i tre esperimenti, è stato osservato un andamento temporale simile nei trasferimenti di Pb: un aumento significativo della concentrazione di Pb disciolto è stato registrato dopo 3 ore di miscelazione, seguito da una tendenza a ritornare alla concentrazione iniziale alla fine dell'esperimento. Tuttavia, è stata osservata una variabilità molto grande in ampiezza e durata del tempo di crescita (Figura 12).

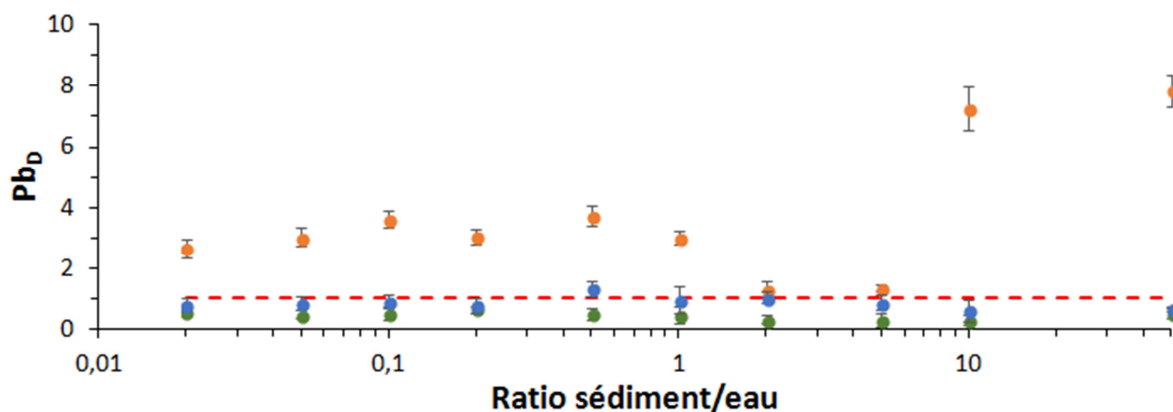


**Figura 12.** Variazioni temporali della concentrazione di Pb disciolto rispetto all'acqua di mare iniziale (linea tratteggiata rossa) durante i tre esperimenti effettuati. L'esperienza di La Spezia è mostrata in blu, quella di Olbia in verde e quella di Tolone in arancione.

Il più piccolo aumento è stato osservato con i campioni di Olbia, raggiungendo un fattore 2 dopo 7 ore e un livello simile all'acqua iniziale dopo 2 giorni. Con i campioni di La Spezia, la concentrazione è stata moltiplicata per più di 3 dopo un giorno, quindi è stato osservato un ritorno a un valore vicino alla concentrazione iniziale dopo 2 settimane. Infine, con i campioni di Tolone, il cui contenuto iniziale di Pb era circa 10 volte superiore a quello degli altri siti, è stato osservato un aumento massimo di un fattore 12 in due giorni di miscelazione, la concentrazione finale dopo due settimane di miscelazione era ancora di 3 volte maggiore a quella dell'acqua di mare iniziale. Secondo un recente lavoro, i trasferimenti di Pb osservati tra il disciolto e il solido (forte deassorbimento quindi forte assorbimento) potrebbero essere collegati all'ossidazione dei solfuri e ad una progressiva modifica delle particelle sedimentarie con conseguente creazione/rilascio di siti in elevata affinità per il Pb

(Dang e altri, 2020). Tuttavia, il nostro studio evidenzia una grande variazione di ampiezza che sembra corrispondere bene al contenuto iniziale in Pb dei sedimenti. Se Dang e altri (2020) hanno studiato bene i sedimenti con contenuti di Pb e speciazioni variabili con conseguenti ampiezze variabili di rilascio, non hanno però osservato alcun ritardo nella cinetica del rilascio di Pb. Il nostro studio tende quindi a dimostrare che il loro modello della cinetica non è universale e deve essere migliorato. Tuttavia, i fattori che controllano questa variabilità temporale rimangono da identificare. Le variazioni temporali nella qualità della materia organica disciolta e particellare, in particolare la sua affinità con Pb, rappresentano una strada interessante per la ricerca futura.

Inoltre, l'uso di diversi rapporti sedimento/acqua ha permesso di dimostrare che i campioni di Olbia e La Spezia non hanno mai mostrato un aumento della concentrazione di Pb disciolto per rapporti tra 0.02 e 50 g.L<sup>-1</sup> e questo nonostante concentrazioni iniziali molto basse nell'acqua di mare (~ 0,2 nM). Sebbene l'acqua utilizzata nel porto di Tolone avesse una concentrazione di Pb disciolta 6 volte superiore, è stato osservato un forte aumento (maggiore di un fattore 2) dopo 2 settimane fin dai rapporti più bassi. Le contaminazioni più elevate hanno raggiunto quasi 8 volte la concentrazione iniziale per i rapporti più elevati. (Figura 13).



**Figura 13** . Concentrazione di Pb disciolto rispetto all'acqua di mare iniziale (linea tratteggiata rossa) dopo due settimane di miscelazione a seconda della concentrazione di sedimento risospeso (g.L<sup>-1</sup>). L'esperienza di La Spezia è mostrata in blu, quella di Olbia in verde e quella di Tolone in arancione.

L'assenza di un legame diretto tra la concentrazione finale di Pb disciolto e il rapporto sedimento/acqua per ciascun sito studiato dimostra una mancanza di collegamento con l'intensità della risospensione e la quantità di Pb sedimentale risospeso nell'acqua. D'altra parte, la differenza tra l'esperimento condotto con i campioni di Tolone e gli altri due suggerisce una forte influenza della composizione dei campioni iniziali. I processi sottostanti, relativi ad affinità, assorbimento e precipitazione con varie sostanze e particelle (Dang e altri, 2020) rimangono da chiarire.

### 3. Conclusioni

Questa simulazione sperimentale della risospensione di sedimenti ha permesso di approfondire sia la nostra percezione dei rischi chimici associati alla risospensione di sedimenti in zone portuali e/o di acquacoltura, sia la nostra comprensione dei processi sottostanti.

In particolare, abbiamo evidenziato significativi trasferimenti di Cu e Pb tra acqua e particelle del sedimento. Questi trasferimenti possono consistere in un assorbimento, con conseguente riduzione della contaminazione disciolta nell'acqua, o in un rilascio, con conseguente aumento della contaminazione dell'acqua. Una delle conclusioni importanti sta nella successione di questi due tipi di trasferimento durante il tempo di miscelazione. Pertanto, il tempo di contatto tra le particelle di sedimento e la colonna d'acqua ossigenata è il principale fattore che influenza le concentrazioni misurate. Per Cu, nessun legame con la contaminazione iniziale dei sedimenti ha potuto essere evidenziato, ma la concentrazione di particelle risospese può influenzare fortemente la contaminazione chimica dell'acqua. Per Pb, è stata osservata una differenza di ampiezza e velocità di trasferimenti per il sito più contaminato. Se l'ampiezza sembra essere legata alla contaminazione dei sedimenti, il fattore di controllo della velocità di trasferimento del Pb, in particolare il suo re-assorbimento dopo diversi giorni di miscelazione, rimane da determinare.

Pertanto, questo lavoro dimostra che la contaminazione chimica della colonna d'acqua durante la risospensione non è solo legata al contributo dei contaminanti in forma di particolato. La contaminazione disciolta può essere ugualmente significativa, variando a seconda del tempo di risospensione e delle proprietà fisiche o chimiche dell'ambiente.

La contaminazione disciolta rappresenta un rischio ambientale significativo che attualmente è poco o per nulla presa in considerazione nelle pratiche di gestione delle attività portuali. Data l'importanza di Pb e Cu nei criteri per la valutazione delle qualità dei corpi idrici rispetto alle direttive europee (DCE, DCSMM), sembra importante continuare la ricerca sui fattori che controllano i loro trasferimenti, la valutazione dei rischi reali in situ e il miglioramento delle tecniche per la gestione dei sedimenti contaminati.

Inoltre, questo studio dimostra chiaramente che non tutti i contaminanti metallici hanno lo stesso comportamento durante la risospensione. È quindi necessario moltiplicare gli studi di questo tipo di processo, estenderli ad altri tipi di contaminanti, al fine di disporre delle conoscenze necessarie per ottimizzare pratiche di gestione basate sull'effettiva contaminazione dei sedimenti presenti sul sito.

## **B . Risposte microbiche alla risospensione dei sedimenti**

Gli ecosistemi costieri, noti per essere gli ecosistemi marini più produttivi (Costanza e altri, 1997) sono anche quelli soggetti alle maggiori pressioni antropiche (Halpern e altri, 2008). Il funzionamento di questi ecosistemi, zone a profondità ridotta, è assicurato dallo stretto accoppiamento tra compartimenti bentonico e pelagico (Marcus & Boero, 1998). I sedimenti rappresentano una zona di accumulo di materia organica e possono costituire una fonte di nutrimento per i microrganismi quando vengono risospesi nella colonna d'acqua (Ritzrau & Graf, 1992; Pusceddu, Fiordelmondo & Danovaro, 2005). Il riciclo della materia organica (MO) risospesa dal circuito microbico (Nixon, 1981) è un esempio di un processo essenziale per lo sviluppo di organismi planctonici (Azam e altri, 1983), collegamento chiave nelle reti trofiche.

I microrganismi rappresentano la maggior parte della biodiversità e la maggior parte della biomassa negli ecosistemi oceanici come il Mediterraneo (Whitman, Coleman & Wiebe, 1998). Il loro tempo di generazione molto breve rispetto alla scala della vita umana li rende estremamente reattivi alle variazioni del loro ambiente e le loro risposte sono integrate molto rapidamente a livello della comunità (Luo & Moran, 2015). Infine, la loro grande abbondanza e diversità aumentano matematicamente la probabilità di incontrare specie indicative di qualsiasi disturbo all'interno delle comunità microbiche naturali.

La risospensione dei sedimenti induce bruschi cambiamenti delle condizioni sia per gli organismi legati alla colonna d'acqua (es. iniezione di materia organica in diverse forme, di vari contaminanti, aumento della torbidità, risospensione delle cisti di resistenza) ma anche per quelli legati ai sedimenti (in particolare passaggio alle condizioni aerobiche). Gli studi hanno dimostrato che la risospensione a breve termine aumenta la diversità e influenza le funzioni microbiche (Galand e altri, 2016) . Secondo Störmer e altri, (2013), la diversità funzionale delle comunità microbiche sarebbe ridotta dalla risospensione dei sedimenti. L'uso di analisi metagenomiche ha permesso di evidenziare che la struttura delle comunità microbiche è notevolmente influenzata dalla risospensione (Won e altri, 2017) . Tuttavia, nell'ambiente marino la cinetica della dinamica microbica del compartimento pelagico durante la risospensione non è stata ancora descritta. Anche l'impatto della quantità di sedimento risospeso, che differisce a seconda dell'origine del processo (es. naturale per una tempesta o antropico per il dragaggio) su queste dinamiche, rimane inesplorato. Le analisi metagenomiche si dimostrano un buon approccio per identificare il contributo dei microrganismi inizialmente presenti nella colonna d'acqua e quelli provenienti da sedimenti risospesi.

La risospensione dei sedimenti negli ambienti costieri è il risultato di fenomeni naturali (ad esempio moto ondoso, vento) e fenomeni antropici (ad esempio costruzioni in aree portuali, dragaggio, passaggio di navi). L'entità (in termini di quantità di sedimento risospeso) e la durata di questi eventi possono essere molto variabili a seconda del fenomeno in questione. Questo studio aveva lo scopo di descrivere le risposte microbiche ad alte intensità di risospensione per capire meglio

le conseguenze ecologiche di questo tipo di fenomeno. Più nello specifico, gli obiettivi principali erano di evidenziare (1) la dinamica microbica durante una risospensione prolungata di una determinata quantità di sedimento e (2) l'influenza di una quantità crescente di sedimento risospeso su queste dinamiche. Ciascuno di questi obiettivi è stato affrontato da uno specifico esperimento condotto in laboratorio su campioni naturali prelevati in uno dei porti pilota del progetto.

## **1. Materiali e metodi**

### *a - Sito di studio, prelievi sul campo e trattamento dei campioni*

Sedimenti e acqua sono stati prelevati dalla baia di Olbia nel giugno 2018, a 4 m di profondità, in una zona di mitilicoltura. I campioni utilizzati per questo studio sono gli stessi di quelli utilizzati per lo studio dei trasferimenti di metalli riportato in precedenza in questo documento (vedere la sezione II.A ), i due esperimenti descritti nei paragrafi seguenti sono stati effettuati contemporaneamente alle esperienze dedicate allo studio dei trasferimenti di ETM.

Come descritto sopra (vedere la sezione II.A ), i sedimenti composti utilizzati per gli esperimenti descritti di seguito sono stati mantenuti in atmosfera inerte il più a lungo possibile per evitare la loro ossidazione. L'acqua di mare è stata presa 72 ore prima degli esperimenti e mantenuta a temperatura e luce ambiente.

### *b - Dispositivi e condizioni sperimentali*

Tutti gli esperimenti sono stati condotti al buio, a temperatura ambiente, con agitazione continua per rotazione (utilizzando un agitatore impostato a 12 giri al minuto).

Un primo esperimento ("cinetico") è stato condotto per valutare le variazioni temporali della diversità microbica per una miscela di sedimenti/acqua durante 2 settimane. Per questo sono stati utilizzati campioni di acqua e sedimenti di Olbia. Tre frazioni di sedimento composito sono state congelate a  $-20^{\circ}\text{C}$  per una futura caratterizzazione della diversità microbica nei sedimenti di partenza. Allo stesso modo, 3 campioni di 1L di acqua di mare sono stati filtrati attraverso filtri di acetato di cellulosa con una porosità di  $0,2\ \mu\text{m}$  per raccogliere le cellule microbiche, quindi congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  in attesa di una futura caratterizzazione di diversità microbica nell'acqua di partenza. Una condizione di controllo che utilizzava 250 ml di acqua di mare in un flacone HDPE senza aggiunta di sedimenti è stata preparata per valutare i cambiamenti nella diversità microbica planctonica indotti dal dispositivo sperimentale (assenza di luce che ferma tutta la produzione fotosintetica, agitazione). Alla fine dell'esperimento è stato preparato un singolo campione filtrando l'intero volume su un filtro in acetato di cellulosa di  $0,2\ \mu\text{m}$  di porosità per raccogliere le cellule microbiche, quindi congelando il filtro a  $-20^{\circ}\text{C}$  in 1 per una futura caratterizzazione della diversità microbica. Una seconda condizione consisteva nel mescolare sedimenti con acqua con un rapporto di  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (equivalente di massa secca di sedimenti) in un volume finale di 250 ml per valutare le variazioni temporali della diversità microbica. Per questo, sono stati utilizzati 18 flaconi di HDPE da 250

ml. Sono stati fissati sei intervalli di campionamento per valutare l'influenza della miscelazione passiva tra acqua e sedimenti (30' e 1 ora di miscelazione), l'influenza della mortalità indotta da importanti cambiamenti nelle condizioni ambientali in parallelo con lo sviluppo di organismi a crescita rapida (1 e 2 giorni di miscelazione) e influenza dello sviluppo secondario di organismi a crescita lenta (1 e 2 settimane di miscelazione). Per ogni intervallo, sono stati prelevati campioni filtrando l'intero volume di 3 flaconi su 3 filtri di acetato di cellulosa con porosità di 0,2  $\mu\text{m}$  per raccogliere le cellule microbiche, quindi congelando i filtri a  $-20^\circ\text{C}$  in attesa di una futura caratterizzazione della diversità microbica. L'agitazione è stata brevemente interrotta una volta al giorno per aprire i flaconi e consentire un rinnovo dei gas, evitando così la deossigenazione.

Un secondo esperimento ("ratio") è stato condotto per valutare l'influenza della quantità di sedimenti risospesi sulla diversità finale della comunità microbica dopo 2 settimane. Questo esperimento è stato ugualmente condotto con sedimenti e acqua di Olbia. Dieci rapporti sedimento/acqua sono stati considerati: 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 e 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (equivalente di massa secca del sedimento). È stato utilizzato un volume sperimentale di 500 ml, in flaconi di teflon, contemporaneamente agli esperimenti descritti precedentemente per lo studio del trasferimento di ETM. Alla fine dell'esperimento è stato effettuato un singolo campionamento per ciascun rapporto mediante filtrazione da 30 a 250 ml (a seconda del riempimento) su un filtro in acetato di cellulosa con porosità di 0,2  $\mu\text{m}$  per raccogliere le cellule microbiche. I filtri sono stati congelati a  $-20^\circ\text{C}$  in attesa di una futura caratterizzazione della diversità microbica.

### *c - Estratti di DNA*

Per estrarre il DNA presente nei campioni di sedimento e sui filtri, è stato utilizzato lo stesso protocollo di lisi e purificazione. All'inizio, i filtri scongelati sono stati tagliati in ambiente sterile. I campioni di sedimento sono stati scongelati ed è stato prelevato un sottocampione di 200 mg per estrarre il DNA. Tutte le estrazioni sono state eseguite in provette Eppendorf prive di nucleasi.

La fase di lisi consisteva nell'aggiunta di 525  $\mu\text{L}$  di una soluzione sterile a pH 9 contenente 400 mM di NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM di Tris-HCl e 750 mM di saccarosio. Le provette sono state agitate orizzontalmente per 10 minuti. Le provette sono state quindi incubate per 30 minuti a  $37^\circ\text{C}$  con 11  $\mu\text{L}$  di lysozyme ( $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Una seconda incubazione ha quindi avuto luogo per 15 ore a  $60^\circ\text{C}$  dopo l'aggiunta di 60  $\mu\text{L}$  di SDS (10%) e 3  $\mu\text{L}$  di proteinasi K ( $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). La fase liquida è stata quindi trasferita in nuove provette e quindi sono stati aggiunti 1  $\mu\text{L}$  di GenElute (Sigma Aldrich), 58  $\mu\text{L}$  di acetato di sodio (3M) e 600  $\mu\text{L}$  di isopropanolo. È stato osservato un tempo di incubazione di 1 ora a  $-20^\circ\text{C}$  per consentire la precipitazione del DNA. I campioni sono stati quindi centrifugati per 20 minuti a  $20.000 \times g$  e  $4^\circ\text{C}$ . Dopo aver rimosso il galleggiante, i fondi sono stati sciacquati con 500  $\mu\text{L}$  di etanolo al 70% di qualità biologia molecolare, quindi la centrifugazione è stata ripetuta. Il galleggiante è stato rimosso e i residui di etanolo sono stati fatti evaporare a vuoto. Il



fondo secco contenente il DNA è stato solubilizzato in 50  $\mu$ L di acqua MilliQ e conservato a -20°C in attesa di future analisi molecolari.

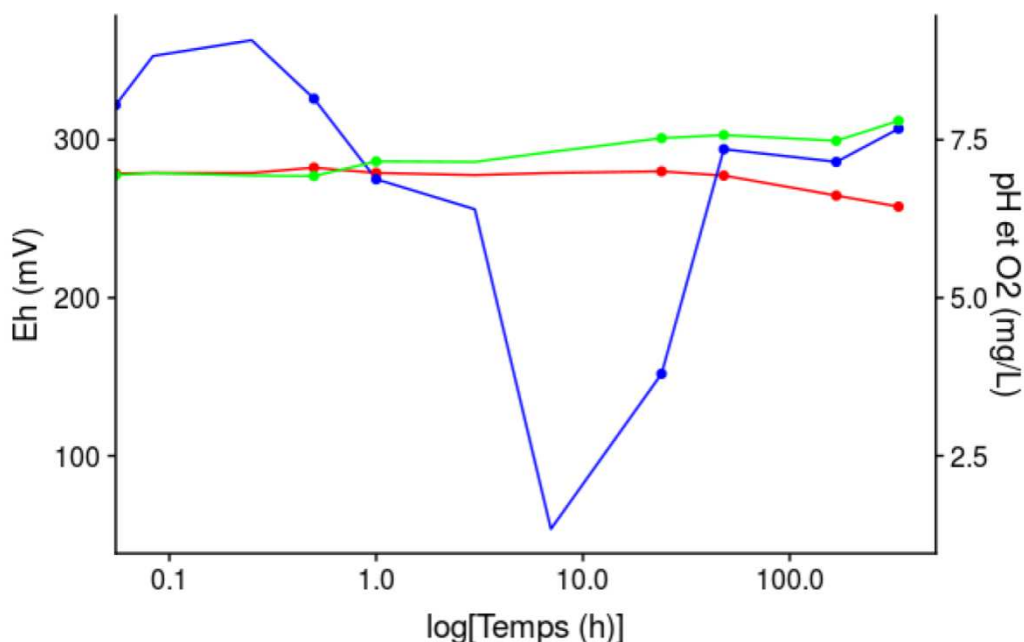
#### *d - Analisi della diversità genetica delle comunità*

La diversità microbica è stata valutata con un approccio di sequenziamento del DNA. Per questo, una frazione del gene dell'rRNA 16S da batteri è stata amplificata dalla PCR dal DNA estratto (Coclet e altri, 2019). I prodotti PCR sono stati quindi sequenziati con un sequenziatore Illumina MiSeq. Le sequenze di DNA ottenute hanno subito un trattamento bioinformatico che consente di assemblarle, filtrarle in base alla loro qualità e di associarle a gruppi tassonomici ("specie" microbiche). Le abbondanze relative di questi gruppi sono state utilizzate per calcolare diversi indici di diversità, valutare la struttura della comunità in ciascun campione (gruppi dominanti) ed eseguire un'analisi di somiglianza tra i campioni.

## 2. Risultati e discussione

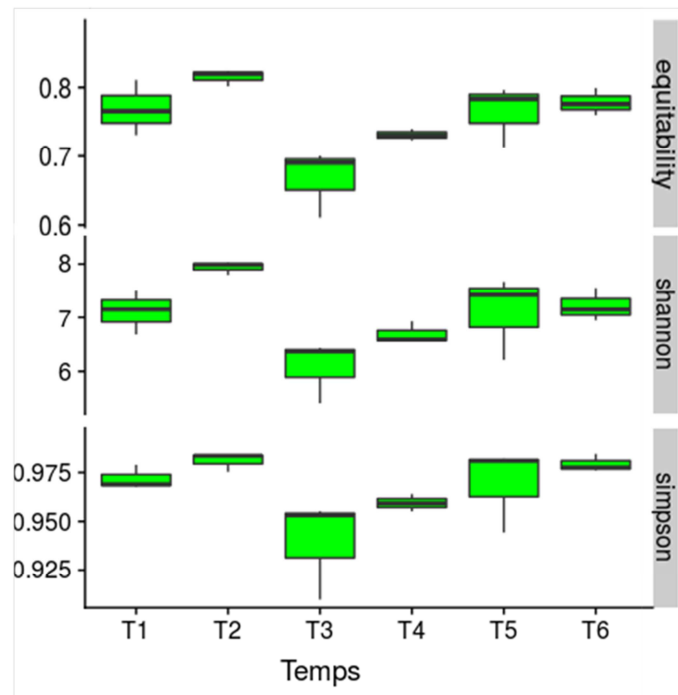
### *a - Variazioni temporali della diversità microbica durante la risospensione dei sedimenti*

La risospensione dei sedimenti ha avuto diverse conseguenze sulla fisico-chimica della miscela. Sebbene il rapporto sedimenti/acqua utilizzato ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) sia relativamente basso, in particolare rispetto ad altri usati ad esempio per la preparazione di elutriati ai fini delle analisi ecotossicologiche (vedere sezione II.C), questo ha lo stesso portato ad un brusco calo di Eh dopo 7 ore nella miscela sperimentale (Figura 14). Questa diminuzione è stata transitoria, l'Eh ha ritrovato infatti un valore vicino a quello dell'acqua di mare ( $\sim 300 \text{ mV}$ ) dopo 48 ore. La concentrazione di  $\text{O}_2$  disciolto non è diminuita durante questo esperimento, è addirittura aumentata leggermente alla fine dell'esperimento, probabilmente l'agitazione ha contribuito ad aumentare la solubilizzazione di  $\text{d'O}_2$  (Figura 14). Queste misurazioni di Eh e della concentrazione di  $\text{O}_2$  disciolto mostrano quindi chiaramente che la miscela di reazione non è mai stata anossica, né addirittura subossica. I microrganismi, qualunque sia la loro origine, hanno quindi sempre beneficiato di condizioni ossigenate per il loro sviluppo. Il pH è variato molto poco durante questo esperimento, mostrando principalmente una graduale diminuzione di circa 0,5 alla fine dell'esperimento (Figura 14). Ciò attesta una significativa attività di mineralizzazione della materia organica da parte dei microrganismi della miscela, con conseguente rilascio di  $\text{CO}_2$  e acidificazione dell'ambiente (Cai e altri, 2011).



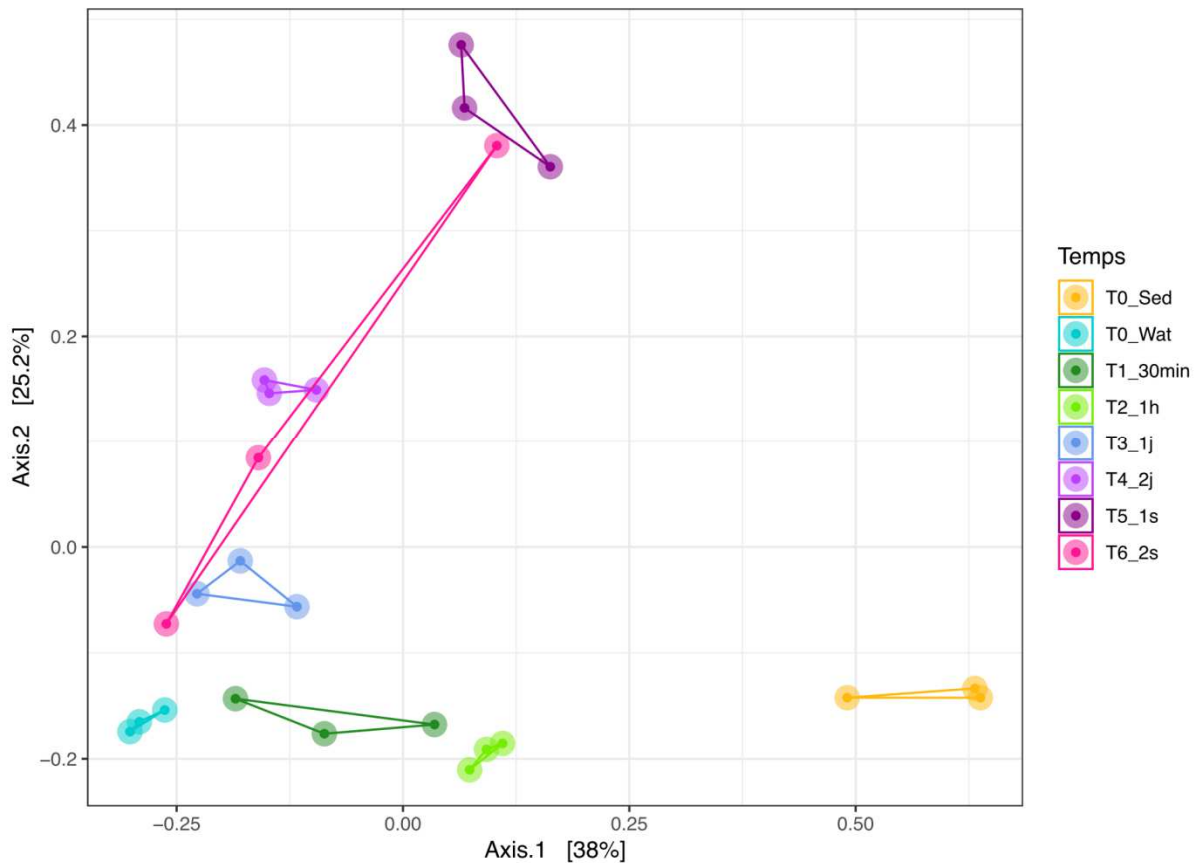
**Figura 14** . Variazioni del potenziale di ossidazione (Eh), della concentrazione di  $\text{O}_2$  disciolto e del pH nel tempo in una miscela di sedimenti e acqua della baia di Olbia in un rapporto di  $1 \text{ g.L}^{-1}$  (equivalente massa secca di sedimenti). L'intersezione delle linee con l'asse delle ordinate indica i valori nell'acqua di mare prima dell'esperimento. I valori rappresentati dai cerchi corrispondono alle fasi temporali in cui sono state eseguite le analisi della diversità microbica.

Il livello di diversità della comunità microbica della miscela, rappresentato da tre diversi indici (equità, indice di Shannon e indice di Simpson) ha mostrato una riduzione abbastanza marcata dopo 1 giorno di miscelazione (Figura 15). La diminuzione dell'equità indica un predominio più forte di alcuni taxa microbici in questo periodo di tempo e la diminuzione dei valori degli altri due indici indica sia un numero inferiore di gruppi dominanti che una perdita di gruppi rari.



**Figura 15.** Variazioni nella diversità microbica in funzione del tempo di miscelazione. T1: 30', T2: 1h, T3: 1 giorno, T4: 2 giorni, T5: 1 settimana, T6: 2 settimane.

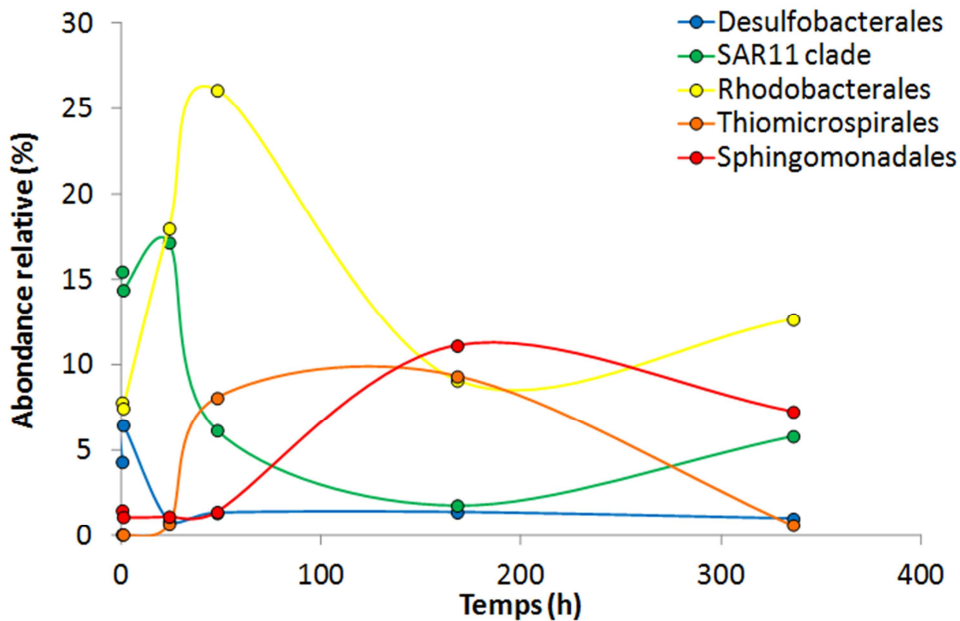
La diversità microbica deve anche essere valutata in termini di struttura, cioè in termini di proporzione relativa delle specie presenti. Per questo, i dati di sequenziamento sono stati usati per eseguire un'analisi della distanza (con la distanza di Bray-Curtis). Questa distanza è stata rappresentata graficamente in uno spazio bidimensionale per facilitarne la lettura tramite un'analisi delle coordinate principali (PCoA, figura 16). Questa analisi mostra chiaramente una differenza molto forte tra la struttura delle due comunità iniziali di acqua e sedimenti. I primi intervalli del tempo di monitoraggio (30' e 1 ora) mostrano che la struttura della comunità presenta un valore intermedio tra le due strutture iniziali. Dopo 1 giorno, la struttura della comunità si è avvicinata a quella dell'acqua prima dell'esperienza, ma inizia a differenziarsi in base al secondo asse. Questa differenziazione si accentua dopo 2 giorni e diventa massima dopo 1 settimana. Dopo due settimane, la variabilità tra i campioni aumenta drasticamente, mostrando una minore riproducibilità delle variazioni biologiche. Tuttavia, va notato che 2 campioni su 3 hanno una struttura che tende ad avvicinarsi alla struttura della comunità iniziale dell'acqua utilizzata per questo esperimento.



**Figura 16.** PCoA rappresentante l'analisi della distanza di Bray-Curtis eseguita su dati di sequenziamento tassonomico. Ogni colore rappresenta un tempo di miscelazione diverso. Più i punti sono vicini nello spazio, più hanno una forte somiglianza nella struttura tassonomica. Più sono distanti, più presentano una struttura tassonomica diversa.

Questa analisi mostra quindi che la reattività della comunità microbica a una miscela di sedimenti nell'acqua è così importante che l'identità dei gruppi che la dominano può cambiare dopo appena 1 giorno di esposizione, ciò corrisponde al minimo di diversità sopra descritto. La struttura della comunità può quindi variare rapidamente verso una struttura molto singolare. Questa esperienza mostra anche un potenziale di rapida resilienza della comunità con una chiara tendenza dopo due settimane.

L'identificazione dei gruppi tassonomici in ciascun campione per somiglianza di sequenza ha permesso di evidenziare una successione molto dinamica di taxa dominanti (Figura 17). Così, proprio all'inizio della miscelazione, la comunità era composta da una miscela di gruppi aerobici noti per essere predominanti in acqua di mare nella zona costiera mediterranea (SAR11 clade, Rhodobacteriali; Coclet e altri, 2019) e gruppi anaerobici noti per essere la maggioranza nei sedimenti marini costieri (Desulfobacteriali; Sun e altri, 2013). Dal primo giorno di miscelazione, la diminuzione della diversità precedentemente descritta corrisponde a un numero minore di gruppi dominanti, principalmente di gruppi già abbondanti nell'acqua che sembrano svilupparsi.



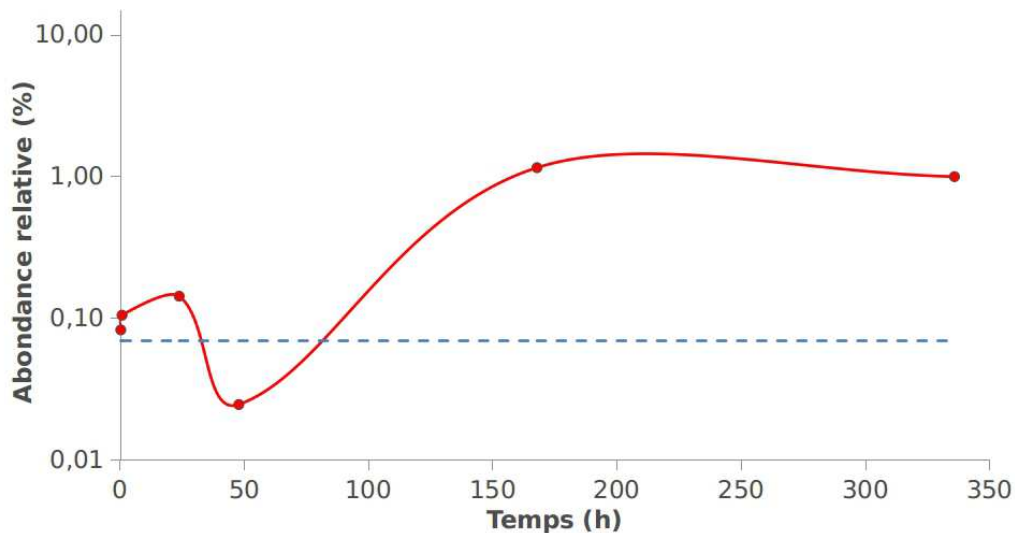
**Figura 17.** Variazioni temporali nell'abbondanza relativa dei principali gruppi dominanti nella miscela acqua-sedimento.

Inoltre, i gruppi anaerobici, come i Desulfobacteriali, mostrano un declino molto evidente, che può essere spiegato dalle condizioni molto ossidanti della miscela e quindi contribuiscono al declino dei valori degli indici di diversità. Dopo 2 giorni, il gruppo SAR11, caratteristico delle acque marine oligotrofiche declina bruscamente sotto l'effetto della competizione con i Rhodobacteriali e i Thiomicrosporali. I Rhodobacteriali sono microrganismi che crescono rapidamente e fortemente in condizioni di elevata disponibilità di risorse (Coclet e altri, 2019). Il loro sviluppo nella nostra esperienza corrisponde a una strategia di trofica *r*, che consiste in uno sfruttamento molto efficiente delle risorse abbondanti in una situazione di scarsa concorrenza (Andrews & Harris, 1986). I Thiomicrosporali sono microrganismi il cui metabolismo energetico è basato sulla solfoossidazione (Meier e altri, 2019). Nell'ambiente naturale, questi sono organismi che vivono nell'interfaccia tra zone ossiche e anossiche (ad esempio nell'interfaccia acqua/sedimenti), usano i numerosi solfuri ridotti dei sedimenti e li ossidano grazie all'ossigeno dell'ambiente e a un apparato enzimatico particolare, l'energia che ricavano da questa ossidazione consente loro di produrre la propria materia organica a partire dal carbonio inorganico (come fanno le piante utilizzando l'energia solare attraverso la fotosintesi). Il loro sviluppo in questo esperimento attesta quindi chiaramente la disponibilità di un'alta concentrazione di solfuri ridotti in condizioni ossiche. Dopo una settimana, l'abbondanza relativa di Rhodobacteriali diminuisce, segnalando la diminuzione della disponibilità di materia organica facilmente utilizzabile e/o lo sviluppo di parassiti (virus) e predatori (flagellati) ai quali gli strateghi *r* sono molto sensibili (Cram, Parada e Fuhrman, 2016). Gli sphingomonadali sembrano beneficiare di questo declino. Dopo 2 settimane di miscelazione, i Thiomicrospirali diventano nuovamente rari, suggerendo l'esaurimento dei solfuri ridotti, probabilmente in tr-s già ampiamente ossidati bioticamente o abioticamente. Quest'ultima data di campionamento segna

anche la tendenza al ritorno del gruppo SAR11, che, associato a una proporzione relativa di Rhodobacteriali vicina a quella dell'inizio dell'esperimento, segna chiaramente il ritorno a condizioni più vicine alla situazione iniziale. Questo ritorno potrebbe spiegarsi con un calo della disponibilità di materia organica facilmente utilizzabile dai batteri.

Questa successione ecologica, che implica lo sviluppo transitorio di strateghi *r* e di sulfo-ossidanti, sembra quindi essere fortemente legata all'aumento della disponibilità di risorse nutritive ed energetiche. La risospensione dei sedimenti nell'acqua arricchisce notevolmente l'acqua con materia solida, in particolare con carbonio organico. Sebbene non misurata, la concentrazione iniziale di POC nell'acqua di mare rappresenta una piccola frazione di quella di DOC (Santinelli, 2015). La concentrazione totale di carbonio organico nell'acqua di mare utilizzata per gli esperimenti qui riportati era quindi vicina a  $1.2 \text{ mg.L}^{-1}$  (valore di DOC misurato per lo studio cinetico del trasferimento di metalli, Tabella 4, sezione II.A). Pertanto, il rapporto sedimenti/acqua di  $1 \text{ g.L}^{-1}$  corrispondente a 2,5 g di sedimenti umidi per 1L di acqua e il contenuto di POC del sedimento composito di Olbia essendo di  $19 \text{ mg.g}^{-1}$  (Tabella 4, sezione II.A), circa 50 mg di POC sono aggiunti agli 1,2 mg presente in ogni litro di acqua di mare. Pertanto la concentrazione di POC portata a contatto con batteri e ossigeno nel nostro esperimento è stata di circa 50 volte superiore a quello dell'acqua di mare utilizzata inizialmente. La stimolazione rapida (da 1 a 2 giorni) di crescita degli strateghi *r* opportunisti sembra quindi coerente. Il loro declino dopo 2 settimane sembra essere collegato a una combinazione di esaurimento delle risorse e di sviluppo dei loro predatori. Se il consumo totale di carbonio organico fornito dai sedimenti nella miscela sembra improbabile, l'esaurimento della frazione labile, facilmente assimilabile dai batteri, sembra possibile considerando la letteratura scientifica che descrive la materia organica dei sedimenti come trasformata, contenente un grande percentuale di acidi umici e recalcitrante alla mineralizzazione da parte dei batteri (Dang e altri, 2014).

In parallelo a questa successione di gruppi dominanti, un aumento significativo della proporzione relativa dei batteri del genere *Legionella* è stato osservato dopo 1 settimana di miscelazione (Figura 18). Le proporzioni relative osservate erano più di 10 volte maggiori di quelle osservate nell'acqua di mare iniziale. Se i dati precisi di identificazione tassonomica hanno escluso la presenza della specie *L. pneumophila*, un noto patogeno umano, la selezione di questo tipo di batteri suggerisce ancora un rischio significativo per la salute delle specie animali marine, specialmente nell'area di acquacoltura da cui vengono prelevati i campioni. Infatti, i batteri del genere *Legionella* sono noti per il loro stile di vita parassitario di organismi marini eucarioti (Gast e altri, 2011). Il forte aumento della loro abbondanza relativa nei nostri campioni dimostra quindi un forte sviluppo di microrganismi eucarioti, che beneficiano dello sviluppo dei batteri di cui si nutrono.



**Figura 18** . Variazioni temporali nell'abbondanza relativa (scala logaritmica) di batteri del genere *Legionella*. La curva rossa indica la proporzione relativa nella miscela, la linea tratteggiata blu indica la proporzione relativa del genere nell'acqua prima dell'aggiunta di sedimenti.

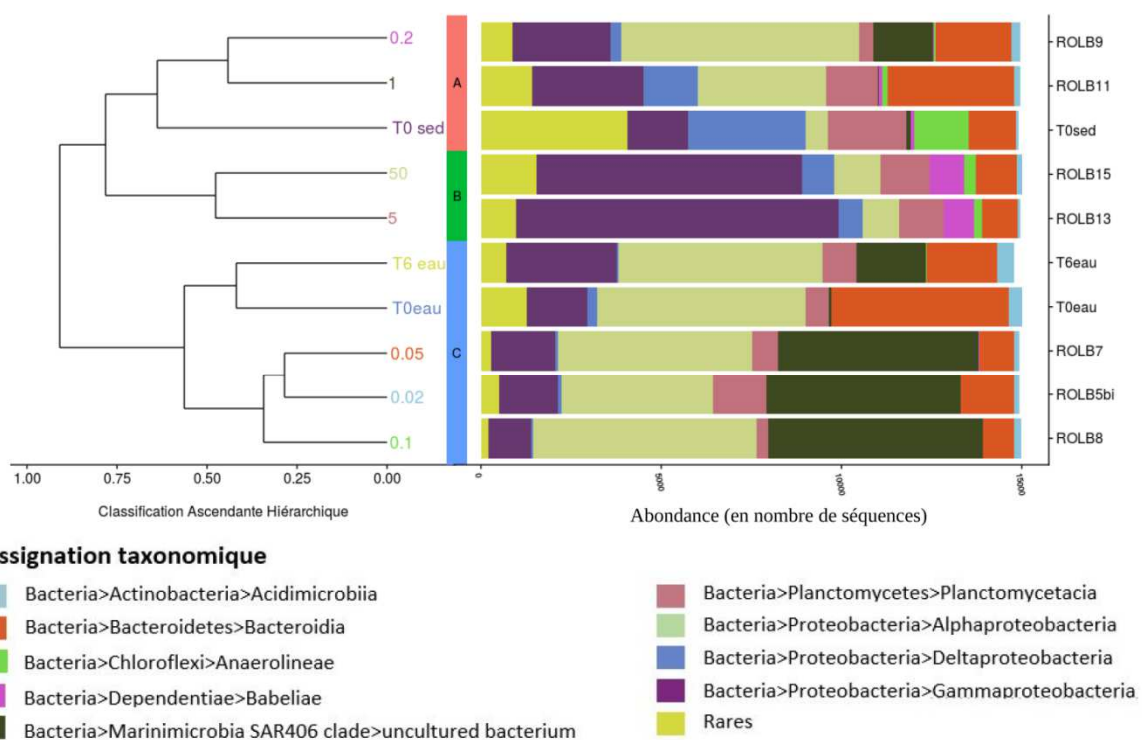
Il carbonio nei sedimenti, risospeso in acqua e utilizzato dai batteri per la loro crescita, è stato quindi almeno parzialmente trasferito a livelli trofici più elevati durante questo esperimento di 2 settimane. Potrebbe quindi contribuire a modificare in modo significativo il funzionamento della rete alimentare planctonica da un regime basato sull'autotrofia e la produzione fitoplanctonica a un regime basato sull'eterotrofia e sull'uso del carbonio organico nei sedimenti da parte dei batteri.

### *b - Influenza della quantità di sedimento risospeso sulle risposte microbiche*

La struttura tassonomica della comunità batterica dell'acqua iniziale, dei sedimenti iniziali e del controllo (acqua senza sedimenti esposta alle stesse condizioni delle miscele) è stata confrontata con quella ottenuta per 7 rapporti acqua-sedimento. In effetti, a causa di difficoltà tecniche, una quantità insufficiente di DNA per poter eseguire le misurazioni è stata estratta dai rapporti 0.5, 2 e 10 g.L<sup>-1</sup>.

Un'analisi della distanza di Bray-Curtis ha dimostrato che la struttura tassonomica del controllo dopo 2 settimane era molto simile a quella dell'acqua prima dell'esperimento. Dopo due settimane di miscelazione, la struttura tassonomica dei rapporti più bassi, da 0.02 a 0.1 g.L<sup>-1</sup>, era vicina a quella dell'acqua, suggerendo o nessun impatto dalla risospensione o una resilienza quasi perfetta della comunità in due settimane. I rapporti intermedi (0.2 et 1 g.L<sup>-1</sup>) presentavano una struttura tassonomica simile e abbastanza distante da quella dell'acqua. Infine, i rapporti più alti (5 e 50 g.L<sup>-1</sup>) avevano una struttura abbastanza vicina tra loro, ma lontana da quella di tutti gli altri campioni (Figura 19). L'identificazione tassonomica dei gruppi dominanti ha evidenziato Alphaproteobatteri (incluso il gruppo SAR11) nei campioni d'acqua e nei rapporti bassi, attestando una comunità che assomiglia fortemente alla comunità planctonica dell'ambiente costiero del Mediterraneo. I

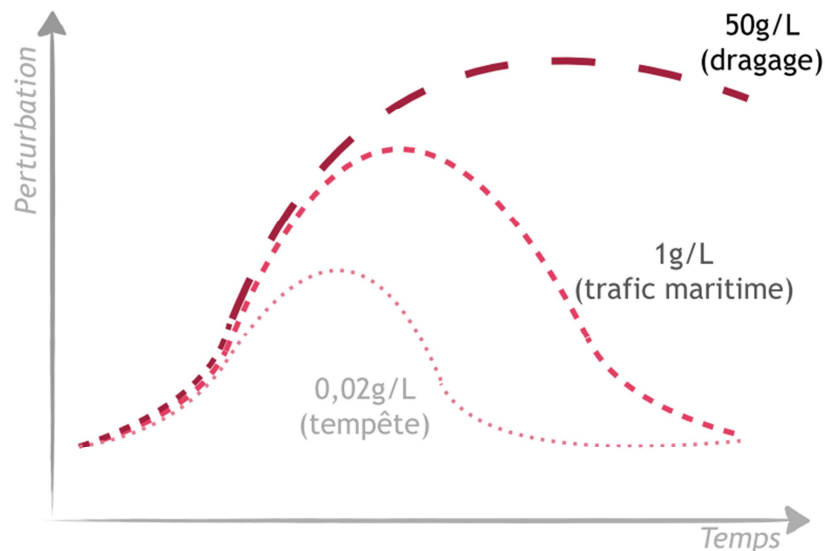
rapporti intermedi sono più dominati da Alphaproteobatteri Rhodobatteri, e hanno mostrato una percentuale significativa di SAR11 e Gammaproteobatteri del genere *Legionella*. Queste strutture sono quindi simili a quelle osservate al termine del monitoraggio temporale per il rapporto 1 g.L<sup>-1</sup>. I rapporti più alti erano in gran parte dominati dai Gammaproteobatteri, in particolare del genere *Legionella*, e presentavano una notevole proporzione della famiglia delle *Babeliae*. Tale struttura non era mai stata osservata durante il monitoraggio temporale della diversità e suggerisce uno sviluppo molto forte di eucarioti di cui questi batteri sono noti parassiti (Gast et al., 201; Deeg et al., 2019). Quindi possiamo ipotizzare un più forte sviluppo batterico, seguito da uno sviluppo molto significativo di predatori che attestano un forte trasferimento trofico del carbonio sedimentario risospeso.



**Figura 19** . Variazioni nella struttura tassonomica in funzione del rapporto sedimenti/acqua. Il dendrogramma rappresenta la distanza di Bray-Curtis tra i campioni, maggiore è la lunghezza del ramo che collega due campioni, più i campioni presentano una struttura tassonomica diversa. L'istogramma rappresenta le proporzioni relative dei gruppi batterici alla scala della classe. Il gruppo "rari" include tutte le classi procariote il cui peso relativo non ha mai superato l'1% nei campioni.

L'analisi incrociata dei risultati del monitoraggio temporale della diversità e dell'influenza dei diversi rapporti sedimenti/acqua ci consente di prevedere un modello di disturbo della comunità microbica in funzione dell'intensità della risospensione dei sedimenti (Figura 20).





**Figura 20** . Modello di risposta delle comunità microbiche alla risospensione dei sedimenti secondo diversi rapporti che rappresentano diversi scenari.

In effetti, dalle nostre osservazioni, sembrerebbe che una risospensione di una piccola quantità di sedimento, rappresentativa di un evento naturale come una tempesta e il moto ondoso ad essa associato, induca solo un debole disturbo nella comunità microbica planctonica tanto da rilevare solo un leggero cambiamento nella sua diversità dopo 2 settimane di miscelazione. Ciò potrebbe essere spiegato da un aumento molto limitato delle risorse organiche disponibili (da un fattore vicino a 2 per il rapporto più piccolo di sedimenti che abbiamo usato). Un disturbo più forte, corrispondente ai nostri rapporti intermedi e che rappresenta un disturbo di origine antropica come il passaggio di una grande nave, induce un disturbo trofico ed energetico transitorio, consentendo lo sviluppo di strateghi *r* opportunisti e un probabile trasferimento trofico di carbonio attraverso lo sviluppo di predatori eucarioti. Ricordiamo che per un rapporto di  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  nella nostra esperienza, la disponibilità di carbonio organico è risultata moltiplicata per circa 50. Questi rapporti intermedi sembravano tuttavia presentare una possibilità di tendenza alla resilienza della comunità dopo 2 settimane. Infine, i rapporti più alti, tra 5 e  $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , rappresentativi di un'operazione di dragaggio e corrispondenti ad un aumento della disponibilità di carbonio organico per batteri di un fattore fino a 2.500, causano un disturbo tale che non è stato possibile per noi osservare la minima tendenza alla resilienza dopo 2 settimane. La struttura della comunità batterica ottenuta era così unica che è impossibile per noi sapere se era ancora in fase di sviluppo o di ritorno allo stato iniziale. Questo modello resta da confermare attraverso lo studio di contesti diversi, con sedimenti e acqua con diverse proprietà fisiche, chimiche e biologiche. Anche le conseguenze funzionali di questi disturbi rimangono da approfondire, in particolare per quanto riguarda il rischio di alterazione del funzionamento trofico dell'ambiente, del servizio ecosistemico di imprigionamento del carbonio nei sedimenti e della proliferazione di parassiti potenzialmente patogeni per le risorse dell'acquacoltura. Infine, un'analisi delle risospensioni intermittenti, più rappresentative della realtà

temporale degli eventi climatici o di origini antropiche dovranno essere oggetto di lavori futuri.

### **3. Conclusioni**

Le attività portuali che inducono una risospensione dei sedimenti sono numerose. Anche se le operazioni di dragaggio possono causare un'intensa risospensione, queste sono poco frequenti. Altre attività, in particolare legate al traffico marittimo, portano a una risospensione molto meno importante ma più frequente. Queste diverse attività si svolgono nelle aree portuali in cui la circolazione oceanica è ostacolata da costruzioni finalizzate alla protezione delle infrastrutture (dighe, moli, etc.). Che siano intense ma poco frequenti o poco intense ma molto frequenti, queste attività contribuiscono così ad arricchire regolarmente la colonna d'acqua di risorse di carbonio utilizzabili dai microrganismi planctonici e ad accumularle in una zona relativamente limitata.

Gli esperimenti effettuati dimostrano chiaramente l'altissima reattività dei microrganismi a un arricchimento di nutrienti, perché se gli esperimenti hanno maggiormente riguardato la risospensione dei sedimenti, essi hanno dimostrato l'impatto legato alla disponibilità di risorse nutritive e energetiche. Se le specie meno adattabili regrediscono dai primi giorni, altre specie che beneficiano dell'aggiunta di sostanze dai sedimenti risospesi sono in grado di moltiplicarsi molto rapidamente e proliferare dopo solo 1 o 2 giorni di contatto. Il risultato è un cambiamento nella strategia trofica della comunità con lo sviluppo di opportunisti che producono un'alta biomassa a partire dal carbonio organico dei sedimenti. Questa biomassa può quindi essere trasferita a predatori e ai livelli trofici più elevati. Questo è un normale funzionamento trofico, ma accentuato dalla risospensione dei sedimenti. Contribuisce alla massima produttività biologica del sistema, ma può anche contribuire ad accelerare la sua eutrofizzazione, a questo proposito la risospensione dei sedimenti portuali presenta un rischio ecologico. Attraverso la crescita di microrganismi dal metabolismo particolare (es. sulfo-ossidanti), la risospensione dei sedimenti portuali può anche disturbare gli equilibri biogeochimici. Tuttavia, gli esperimenti effettuati non consentono di arrivare a una conclusione sull'importanza quantitativa di questi disturbi.

Tra i batteri opportunisti che sfruttano l'abbondanza di risorse nutritive, alcuni sono i parassiti presenti nell'acqua iniziale in proporzione molto piccola. Pertanto, i sedimenti possono certamente essere una potenziale fonte di agenti patogeni, ma la loro risospensione può anche essere sufficiente per stimolare lo sviluppo di agenti patogeni, che potenzialmente arrivano da altre fonti. Questi parassiti possono rappresentare un rischio ecologico o anche socioeconomico se nelle vicinanze ci sono attività di acquacoltura.

Tuttavia, gli esperimenti effettuati mostrano un potenziale relativo di resilienza della comunità microbica entro poche settimane. Questa capacità di resilienza sembra fortemente dipendente dalla concentrazione di particelle risospese, che

influisce sul tempo necessario alla resilienza. Bisogna però essere prudenti rispetto all'effettiva resilienza dell'intero ecosistema, e alla dipendenza di questa capacità di resilienza dalle condizioni fisiche, chimiche e biologiche iniziali dell'ecosistema coinvolto.

## C . Valutazione della tossicità dei sedimenti mediante approcci ecotossicologici

### 1. Introduzione

Le seguenti fasi sono generalmente prese in considerazione quando si valuta la tossicità di un sedimento e dei contaminanti associati: il sedimento “in quanto tale”, l'acqua interstiziale e l'elutriato .

Sebbene i sedimenti in quanto tali rappresentino lo scenario di esposizione più realistico, la realizzazione di analisi biologiche sui sedimenti in quanto tali può richiedere un investimento considerevole in risorse umane, attrezzature e tempo. A differenza dei sedimenti in quanto tali, l'acqua interstiziale è una matrice che può rappresentare una via di esposizione diretta per molte specie, ma non sempre per tutti i tipi di sedimenti (principalmente campioni sabbiosi) è possibile estrarre una quantità di acqua interstiziale utile per eseguire una batteria di test; inoltre, la metodologia di estrazione può portare ad alterazioni fisico-chimiche (pH e potenziale redox in primis) della matrice stessa che possono influire sulla reale biodisponibilità di qualsiasi contaminante presente.

Tra le tre matrici trattate, l'elutriato rappresenta quello che è il più facilmente estraibile dal sedimento e trova ampia applicazione in una vasta gamma di test biologici con specie appartenenti a diversi livelli trofici. Questo è il motivo per cui è ampiamente utilizzato per eseguire esami preliminari rapidi e/o di routine, in particolare quando non è possibile utilizzare determinati parametri sul sedimento in quanto tale.

Per molti autori, lo svantaggio nell'uso di test sull'elutriato è dovuto alla tendenza (legata alla procedura di preparazione dell'elutriato) a ridurre la tossicità del campione diluendo i contaminanti che possono essere presenti e al fatto che si tratta di una matrice in cui è generalmente possibile trovare solo contaminanti idrofili (partizione di contaminanti) (Haring e altri, 2012).

I test sull'elutriato simulano l'esposizione a sedimenti risospesi mescolando sedimenti con acqua di mare e hanno lo scopo di fornire indicazioni sul rilascio di contaminanti nella colonna d'acqua a seguito di sversamento di sedimenti in mare, risospensione di sedimenti in ambienti contaminati, come i bacini di inondazione (CDF) e risospensione dei sedimenti nelle aree dragate.

Per la preparazione degli elutriati, il metodo comunemente usato si riferisce al protocollo ASTM E1391 (2000), che consiste nella miscelazione di un volume di sedimenti con quattro volumi di acqua. Tuttavia , sotto l'impulso di un certo numero di programmi di ricerca relativi alle attività di dragaggio e alla gestione dei materiali dal dragaggio in conformità con la legge sulla ricerca e protezione marina (Ocean Dumping Act ) e la legge la pulizia delle acque 1972 (CWA), il corpo degli ingegneri dell'esercito del Stati Uniti (USACE) ha sviluppato un certo numero di protocolli di preparazione degli elutriati utilizzando diversi rapporti acqua/sedimento al fine di

simulare al meglio le condizioni ambientali che si verificano durante le operazioni di movimentazione dei sedimenti come lo sversamento dei sedimenti in serbatoi di riempimento, lo scarico in mare e il dragaggio.

A livello internazionale, non esiste un metodo universalmente riconosciuto e accettato per la preparazione di elutriati e la letteratura scientifica ha prodotto negli ultimi anni numerosi articoli sull'argomento; analogamente, in Italia, il DM 173/2016, che definisce i metodi e i criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di scavo dei fondali marini, non fornisce alcuna indicazione sul metodo di preparazione degli elutriati ma indica semplicemente un rapporto generico acqua/sedimento di 1:4 (p/v) per la loro preparazione.

Diversi metodi di preparazione degli elutriati possono portare a risultati diversi per i sedimenti analizzati; per questo motivo, nell'ambito del progetto Interreg SEDRIPORT per la valutazione degli effetti ecotossicologici legati alla risospensione dei sedimenti, è stato utilizzato il test di sviluppo embrionale con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* con gli elutriati dei sedimenti raccolti nei porti di Olbia, Cagliari, La Spezia e Tolone, preparati sia secondo il protocollo ASTM sia sulla base del protocollo di prova per gli elutriati di dragaggio sviluppato dalla USACE, per valutare il grado di contaminazione da sedimenti nella colonna d'acqua della zona di dragaggio.

Inoltre, per ciascuno dei protocolli sperimentali per la preparazione degli elutriati, sono stati testati gli effetti sullo sviluppo larvale di *P. lividus* degli elutriati preparati modificando il tempo di miscelazione tra acqua e sedimenti.

## **2. Materiali e metodi**

### *a - Campionamento di sedimenti*

I sedimenti sono stati raccolti in varie stazioni nei porti di Olbia, Cagliari, La Spezia e Tolone, come mostrato nella Figura 21, nel periodo che va da novembre 2017 a dicembre 2018. I sedimenti superficiali sono stati raccolti utilizzando una benna di tipo Van Veen da 8 litri e trasferiti in laboratorio, in contenitori di polietilene conservati a 4°C, per preparazione degli elutriati e caratterizzazione fisico-chimica.

I campioni di sedimento sono stati conservati per un massimo di due settimane prima di essere utilizzati per preparare gli elutriati.

Gli elutriati sono stati preparati usando acqua di mare prelevata da ciascun sito di campionamento a 1 m dal fondo. L'acqua è stata presa con una bottiglia di Niskin decontaminata il giorno prima del suo utilizzo con una soluzione di acido nitrico al 10%, quindi sciacquata con acqua ultrapura.



**Figura 21:** Ubicazione delle stazioni di campionamento nei porti di Olbia, Cagliari, Tolone e La Spezia

*b - Analisi della dimensione delle particelle*

Per determinare le caratteristiche granulometriche dei sedimenti, ogni campione (circa 70 g) è stato trattato con una soluzione di perossido di idrogeno e acqua distillata (1:8) per 48 ore a temperatura ambiente per facilitare la separazione dei granuli.

Quindi, il sedimento è stato setacciato attraverso una rete di 63 µm allo stato umido con acqua distillata; le due frazioni così ottenute sono state essiccate in un forno a 60°C e quindi pesate.

La frazione > 63 µm (sabbia e ghiaia) è stata setacciata con maglie da 2000, 1000, 500, 250, 125 e 63 µm della serie ASTM; il sedimento corrispondente a ciascun intervallo è stato pesato e al termine delle operazioni è stata calcolata la percentuale delle diverse frazioni presenti nel campione.

### *c - Carbonio organico totale*

La determinazione del carbonio organico totale è stata effettuata mediante il metodo della perdita al momento dell'accensione (Luckzak e altri, 1997) che prevede l'incenerimento dei campioni di sedimenti come di seguito descritto. Un crogiuolo contenente 7 g di sedimento è stato posto in un forno a 105°C per 24 ore, quindi pesato su una scala decimale a quattro cifre. Il campione è stato quindi posto in un forno a muffola, prima a 160°C per 6 ore, quindi a 400°C per 4 ore. Alla fine del passaggio attraverso il forno, il campione è stato pesato e il contenuto di carbonio organico totale (COT) è stato determinato utilizzando la seguente formula:

$$COT (g.kg^{-1}) = (peso\ netto\ 160^{\circ}C - peso\ netto\ 400^{\circ}C) / (peso\ netto\ 105^{\circ}C)$$

### *c - Analisi di metalli pesanti*

Il campione (circa 0,3 g di sedimento secco) è stato mineralizzato in bottiglie di teflon, utilizzando un forno a microonde opportunamente programmato (Milestone 1200), aggiungendo 3 ml di HNO<sub>3</sub> (65%) e 1 ml di HCl ultra puro (30%). Una quantità di acqua ultra-pura è stata aggiunta alla soluzione ottenuta per raggiungere il volume finale di 25 ml. La determinazione analitica è stata eseguita mediante spettrofotometria ad emissione ottica (Varian Liberty AX Sequential ICP-OES 720) per tutti i metalli tranne il mercurio. Per quest'ultimo, le analisi sono state eseguite mediante spettroscopia ad assorbimento atomico (metodo del vapore freddo, Cetac M-7600). L'accuratezza del metodo è stata valutata utilizzando il materiale di riferimento standard LGC 6137 (Promochem), che è stato trattato allo stesso modo dei campioni. Il limite di rilevazione del metodo e il limite di quantificazione per ciascun metallo analizzato sono riportati nella Tabella 5.

	Al	As	Cd	Cr	Cu	Hg	O	Pb	V	Zn
<b>Rilevazione (mg/l)</b>	0.078	0,0005	0.00004	0,0061	0,0035	0,0004	0,0071	0,0036	0.027	0,1672
<b>Quantificazione (mg/kg)</b>	6.50	0,0441	0,0029	0.512	0,2951	0.0001	0,5907	0,2998	2,2499	13.93

**Tabella 5:** Limiti di rilevazione e quantificazione dei metalli

#### *d - Preparazione di elutriati*

Per valutare i possibili effetti dei contaminanti presenti nei sedimenti e scaricati nella colonna d'acqua a seguito di operazioni di dragaggio o risospensione causate dal traffico marittimo, è stato effettuato un test di embriotossicità con il riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

L'elutriato è la matrice acquosa in cui si trova la parte solubile delle sostanze estraibili dai sedimenti (ASTM, 1994) e che simula meglio gli effetti legati ai movimenti del fondo marino e al dragaggio (USEPA/USACE, 1991), attività recentemente standardizzate in Italia come parte dell'allegato tecnico al DM 173/2016.

In letteratura esistono diversi metodi per preparare gli elutriati (USEPA/USACE, 1991; USEPA, 2001) a seconda della natura dell'ambiente (Volpi Ghirardini e altri, 2005; Arizzi Novelli e altri, 2006, 2007 ) e lo scopo di utilizzo (USACE, 2003; appendice tecnica al DM 173/2016).

Nel presente studio, gli elutriati sono stati preparati sia sulla base del metodo descritto nel protocollo ASTM E1391 (2000) sia utilizzando il protocollo modificato del test sugli elutriati di dragaggio (DRET) sviluppato dal USACE (2003).

##### ➤ *Preparazione di elutriati con il protocollo ASTM E1391 - (2000)*

Per ogni campione, una frazione di sedimento, precedentemente omogeneizzata, è stata miscelata con quattro parti di acqua (1:4) proveniente dall'area di raccolta dei sedimenti (acqua/sedimento, v/v). La sospensione così ottenuta è stata agitata per 1 ora a 400 rpm usando un agitatore orizzontale (IKA-WERKE, Mod . OS 2 Basic). Successivamente, il galleggiante è stato rimosso e centrifugato (Thermo Scientific , Mod. SL 16R) a 4°C per 20 minuti a 1200 x g . La frazione acquosa è stata conservata a 4°C per un massimo di 48 ore prima di essere utilizzata per i test biologici.

##### ➤ *Preparazione di elutriati con il protocollo DRET-USACE (2003)*

L'elutriato è stato preparato miscelando i sedimenti con acqua proveniente dal sito di raccolta dei sedimenti fino a ottenere una concentrazione di 10 g.L<sup>-1</sup> di solidi sospesi. La miscela è stata aerata per 1 ora poi decantata per 1 ora a 4°C. Successivamente, il galleggiante è stato centrifugato a 3000 rpm per 20 minuti e la frazione acquosa è stata raccolta e conservata a 4°C per un massimo di 48 h prima di essere utilizzata per la preparazione del test con *P. lividus* .

##### ➤ *Variazione del tempo di miscelazione acqua/sedimento*

Per i due protocolli metodologici di preparazione degli elutriati e per ciascun campione di sedimento, gli elutriati sono stati preparati aumentando il tempo di miscelazione (ASTM) e il tempo di aerazione (USACE) fino a 3 e a 24 ore.

Per entrambi i protocolli, le fasi successive di preparazione degli elutriati sono rimaste invariate.



### *e - Test di embriotossicità con *Paracentrotus lividus**

L'affidabilità del riccio di mare come bioindicatore è riconosciuta in tutto il mondo e, dagli anni '80, i test di fertilizzazione e sviluppo dell'embrione sono stati inclusi nell'elenco CIEM (1997) dei test biologici più affidabili per il monitoraggio dell'inquinamento marino. Sono state sviluppate procedure standard per i test di fecondazione e sviluppo dell'embrione per le specie East Coast (*Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus droebachiensis*) e West Coast (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Dendraster excentricus*) degli Stati Uniti (USEPA, 1994; ASTM, 1995) e in Canada (Environment Canada, 1992). In Italia, la specie autoctona *P. lividus*, ha trovato applicazione nel campo dell'ecotossicologia in particolare per quanto riguarda lo studio degli effetti sulla fertilizzazione e sullo sviluppo embrionale (difetti dello sviluppo e aberrazioni mitotiche) delle sostanze pure e degli effluenti. Il test biologico con *P. lividus*, può essere utilizzato sia per la stima della tossicità di sostanze o preparati solubili in acqua di mare sia per la valutazione della qualità delle matrici dell'ambiente marino salino, come acqua interstiziale ed elutriato.

Il test biologico dello sviluppo embrionale del riccio di mare mira a sviluppare la larva di *P. lividus* allo stadio di pluteo a quattro braccia (P4). Il test di sviluppo dell'embrione di *P. lividus* è stato condotto sulla base dei metodi descritti nel quaderno di ecotossicologia ISPRA n. 11/2017 (ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 11/2017) e brevemente descritto di seguito.

Gli organismi utilizzati per questo lavoro sono stati prelevati dal sistema a circuito chiuso (RAS) presente nei laboratori ISPRA di Livorno, dove gli organismi vengono allevati e mantenuti in condizioni di maturità sessuale mediante diete ad hoc (Sartori e Gaion, 2015; Sartori e altri, 2016).

Una volta recuperati dai bacini di riproduzione, gli organismi sono stati portati a rilasciare gameti iniettando 0,5 ml di KCl 0,5 M attraverso la membrana peristomale con una siringa da insulina. Le uova sono state raccolte in provette di vetro da 100 ml riempite con acqua di mare, ponendo la femmina con l'apparato genitale di fronte all'acqua (Fig. 22A). Lo sperma è stato raccolto "a secco" direttamente dai gonopori dell'animale (Fig. 22B) mediante aspirazione mediante una pipetta Pasteur di vetro e conservato a 4°C in una provetta da 1,5 ml (Tipo Eppendorf®).

Le uova sono state inizialmente osservate al microscopio per valutarne la qualità (obiettivi 4x e 10x), eliminando uova vuote, irregolari o piccole. Le uova appropriate sono state trasferite, usando pipette di plastica Pasteur, in flaconi di vetro da 500 ml contenenti acqua di mare a 0,22 µm (FSW). La sospensione di uova è stata diluita ad una densità di 1000 uova/mL e quindi fecondata aggiungendo alcuni µl di sperma. Dopo 20 minuti, è stato verificato che tutte le uova fossero state effettivamente fecondate (Fig. 23A). Il test di embriotossicità è stato effettuato esponendo 1 ml di soluzione di uova fecondate per 72 ore in 10 ml di elutriato da

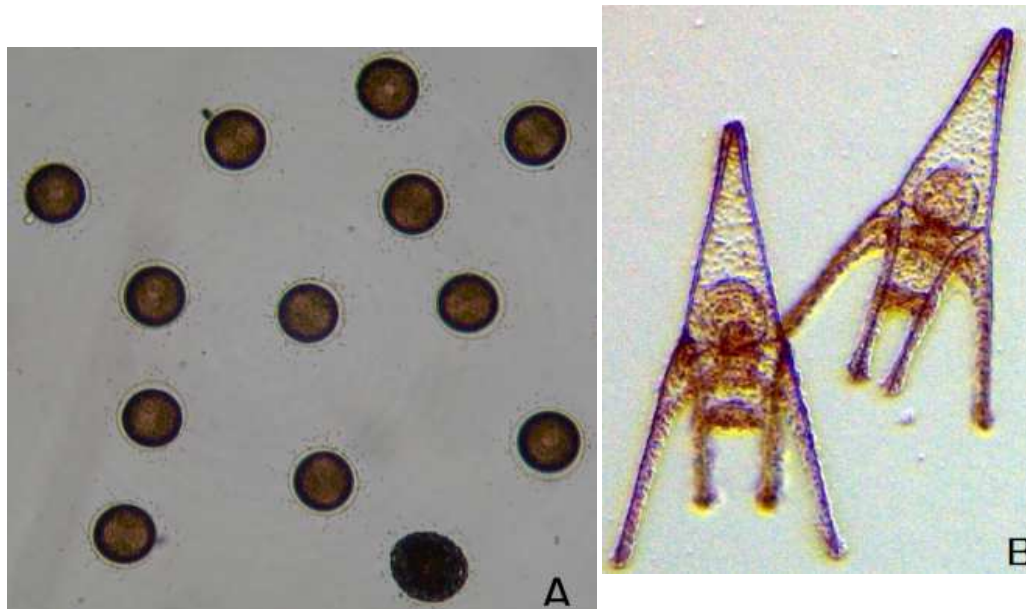
testare. L'elutriato è stato testato tale quale (100%) e diluito con acqua di mare filtrata a 0,45 µm per concentrazioni finali del 25% e 50%.

Parallelamente, un controllo negativo, costituito dall'esposizione delle uova fecondate all'acqua di mare filtrata a 0,22 µm (FSW) e un controllo positivo della tossicità per esposizione al nitrato di rame ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) sono stati usati per valutare la sensibilità dei gameti.

Normalmente, a 18°C, gli zigoti si sviluppano e raggiungono lo stadio larvale in 48 ore, ma la durata dell'esposizione scelta per il test (72 ore) garantisce che tutti gli zigoti raggiungano lo stadio larvale (pluteo) nel controllo negativo. Il test è stato fissato con alcune gocce di soluzione Lugol forte. Successivamente, è stata calcolata la % di larve che si sono sviluppate normalmente (Fig. 23B).



**Figura 22:** Raccolta di gameti di *P. Lividus*: emissione di uova (A) e sperma (B).



**Figura 23:** Uova fecondate con membrana di fecondazione chiaramente visibile (A) e larve che hanno raggiunto uno stadio di pluteo senza malformazioni (B).

Al fine di ottenere una stima più precisa degli effetti embriotossici, le anomalie dello sviluppo possono essere classificate distinguendo le larve malformate, vale a dire le larve sviluppate ma presentanti malformazioni dello scheletro e/o del tratto digestivo e le larve precoci, stadi pre-larvali di blastula, gastrula e prisma che si sono bloccate prima di raggiungere il pieno sviluppo.

Le percentuali di embrioni malformati rilevate nei campioni di elutriato testati e nel controllo positivo sono state utilizzate per il calcolo di CE20 e CE50 rispettivamente da Tox Calc 5.0 (analisi probit) e Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton e altri, 1978). La scala adottata per la quantificazione della tossicità è mostrata nella Tabella 6 (ICRAM-APAT, 2007).

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

**Tabella 6:** Scala di tossicità dei test su *P. Lividus*.

### **3. Risultati**

#### *a - Caratteristiche granulometriche*

La tabella 7 presenta i risultati delle analisi delle dimensioni delle particelle dei sedimenti raccolti nei porti di Tolone, Olbia, La Spezia e Cagliari.

Sites		GHIAIA	SABBIA					SILTS	
		2000µm	1000 µm	500 µm	250 µm	125 µm	63 µm	TOT	< 63µm
<b>Toulon</b>	Lazaret	<b>0,00</b>	0,00	1,75	4,08	6,84	3,64	<b>16,30</b>	<b>83,70</b>
	Tour Royale	<b>0,00</b>	0,71	2,70	6,53	28,27	9,94	<b>48,15</b>	<b>51,85</b>
	Corsica	<b>0,00</b>	0,29	0,43	1,01	2,44	3,88	<b>8,05</b>	<b>91,95</b>
	Suffren	<b>0,00</b>	0,00	0,14	0,43	1,57	2,42	<b>4,56</b>	<b>95,44</b>
<b>Olbia</b>	P1	<b>5,08</b>	1,94	7,55	5,67	16,86	20,36	<b>52,39</b>	<b>42,53</b>
	P2	<b>1,17</b>	1,33	3,20	18,62	50,65	11,21	<b>85,02</b>	<b>13,81</b>
	P3	<b>13,22</b>	17,88	14,74	15,58	27,54	6,08	<b>81,81</b>	<b>4,96</b>
<b>Cagliari</b>	Rinascita	<b>0,00</b>	0,29	1,29	4,59	39,17	9,04	<b>54,38</b>	<b>45,62</b>
	Darsena	<b>0,00</b>	0,28	1,00	2,71	9,54	4,99	<b>18,52</b>	<b>81,48</b>
	S. Elmo	<b>0,00</b>	0,43	1,57	1,43	1,71	0,86	<b>5,99</b>	<b>94,01</b>

<b>La Spezia</b>	<b>MF1</b>	<b>0,73</b>	1,45	3,27	6,91	10,18	8,00	<b>29,82</b>	<b>69,45</b>
	<b>MF2</b>	<b>0</b>	1,45	4	7,5	10,25	7,9	<b>31,1</b>	<b>68,90</b>
	<b>MF3</b>	<b>0</b>	1,9	3,5	6,8	10	8,6	<b>30,8</b>	<b>69,20</b>
	<b>MF4</b>	<b>0,8</b>	1,45	3,27	7,6	9,6	8	<b>30,72</b>	<b>69,28</b>

**Tabella 7:** Distribuzione dei sedimenti in classi di dimensione delle particelle (%) per i diversi siti dei 4 porti studiati.

I sedimenti di Tolone, La Spezia e Cagliari hanno una forte componente silicea, generalmente superiore al 45%, che a volte supera addirittura il 90% (vedi le stazioni Corsica e Suffren per il porto di Tolone e S. Elmo per il porto di Cagliari). Per il porto di Olbia, ad eccezione della stazione P1 dove i silts rappresentano il 42,53% delle frazioni granulometriche, i campioni hanno una composizione prevalentemente sabbiosa (> 80%).

*b - Carbonio organico totale*

La tabella 8 presenta i risultati dell'analisi TOC nei sedimenti raccolti nelle aree di studio.

<b>Campione</b>		<b>TOC (g.kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Toulon</b>	<b>Lazaret</b>	0,1016
	<b>Tour Royale</b>	0,0214
	<b>Corsica</b>	0,0611
	<b>Suffren</b>	0,0281
<b>Olbia</b>	<b>P1</b>	0,0456
	<b>P2</b>	0,0178
	<b>P3</b>	0,0094
<b>Cagliari</b>	<b>Rinascita</b>	0,0169
	<b>Darsena</b>	0,0460
	<b>S. Elmo</b>	0,1473
<b>La Spezia</b>	<b>MF1</b>	0,0215
	<b>MF2</b>	0,0340
	<b>MF3</b>	0,0215
	<b>MF4</b>	0,0149

**Tabella 8:** contenuto di TOC nei sedimenti dei quattro porti studiati.

*c - Metalli pesanti*

La tabella 9 presenta i risultati dell'analisi dei metalli pesanti nei sedimenti campionati nei vari siti studiati. La precisione del metodo per quanto riguarda i materiali certificati (sedimenti portuali; LGC 6137 Promochem ) è mostrata nella Tabella 10.

		As	Cu	Ni	Cr	Cd	Pb	Zn	Hg
<b>Toulon</b>	<b>LAZARET</b>	21.53	34.58	15.73	27.62	0.05	48.59	121.49	0.71
	<b>TOUR ROYALE</b>	5.56	20.15	10.28	13.60	0,013	25.00	58.57	0,77
	<b>CORSICA</b>	39.23	462,90	25.48	52.23	0,19	195,08	415,38	9.85
	<b>SUFFREN</b>	16.11	136.79	25.47	42.74	0.41	133.27	396,45	2.13
<b>Olbia</b>	<b>P1</b>	5.55	26.99	10.36	17.43	0.078	21.73	119.22	0,058
	<b>P2</b>	4.61	11.11	5.12	9.11	0.068	11.83	65.95	0,031
	<b>P3</b>	6.01	6.04	7.50	13.25	0,031	10.34	47.68	0,022
<b>Cagliari</b>	<b>MOLO RINASCITA</b>	9.32	20.88	7.74	15.18	0.39	61,87	94.19	0.22
	<b>MOLO DARSENA</b>	19.40	117.18	20.00	32.59	2.20	304,47	422,59	0.26
	<b>MOLO ST.ELMO</b>	5.45	141.90	21.11	30.06	1.084	120.70	461,50	0.64
<b>La Spezia</b>	<b>MF1</b>	11.43	40.81	53.52	56.6	0,19	48.41	201,91	0,18
	<b>MF2</b>	10.67	37.65	48.03	57.25	0,17	48.94	199,45	0.16
	<b>MF3</b>	8.51	33.92	41.76	54.89	0,231	45.45	195,90	0.15
	<b>MF4</b>	9.04	31.60	38.87	55.03	0,245	40.05	158.18	0.14

**Tabella 9:** contenuto di metalli pesanti (mg.kg<sup>-1</sup> massa secca) nei sedimenti dei quattro porti studiati.

% Recupero LGC	Al	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
<b>2017</b>	100.00	118.88	100.00	87.87	103.15	86.58	97.37	89.42	93.20

**Tabella 10:** Resa di estrazione dei vari metalli considerati a partire dal materiale certificato (sedimenti portuali LGC 6137) soggetti allo stesso protocollo dei campioni di progetto.

*d - Test biologici*

Le seguenti tabelle presentano i risultati dei test di embriotossicità su *P. lividus* (Tab. 11-14b) effettuati sugli elutriati dei campioni di sedimenti prelevati nei porti di Tolone, Olbia, Cagliari e La Spezia.

**Tabella 11a** Risultati del test di embriotossicità di *P. lividus* effettuato sugli elutriati dei campioni di Tolone. La tabella mostra la media ( $\mu$ ) di larve malformate, le deviazioni standard (s) e il valore EC20/EC50 determinato dall'analisi Probit.

	Sito	Diluizione (%)	P4 formati normalmente (repliche)			P4 malformati ( $\mu$ )	s	EC <sub>20</sub> /EC <sub>50</sub> (%)	Tossicità
ASTM 1h	Site Lazaret	100	75	73	76	25.33	1.53	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	79	77	80	21.33	1.53		
		25	80	81	80	19.67	0.58		
	Tour Royale	100	80	81	81	19.33	0.58	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	82	81	81	18.67	0.58		
		25	82	82	83	17.67	0.58		
	Corsica	100	55	51	54	46.67	2.08	EC <sub>20</sub> =56,17 (48,84-63,65)	Media
		50	73	71	72	28.00	1.00		
		25	75	76	77	24.00	1.00		
	Suffren	100	76	78	76	23.33	1.15	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	80	81	81	19.33	0.58		
		25	80	82	82	18.67	1.15		
ASTM 3h	Lazaret	100	67	65	67	33.67	1.15	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	80	77	78	21.67	1.53		
		25	81	80	81	19.33	0.58		
	Tour Royale	100	78	80	80	20.67	1.15	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	82	81	81	18.67	0.58		
		25	82	81	83	18.00	1.00		
	Corsica	100	30	31	32	69.00	1.00	EC <sub>50</sub> =77.97 (68.74- 87.84)	Alta
		50	74	73	72	27.00	1.00		
		25	79	81	80	20.00	1.00		
	Suffren	100	59	54	55	44.00	2.65	EC <sub>20</sub> =51,49 (44,17-59,48)	Media
		50	66	66	68	33,33	1.15		
		25	80	81	82	19.00	1.00		
ASTM24h	Lazaret	100	66	63	64	35.67	1.53	EC <sub>20</sub> =48,39 (46,21-50,20)	Media
		50	78	76	78	22.67	1.15		
		25	81	82	81	18.67	0.58		
	Tour Royale	100	63	62	63	37.33	0.58	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	78	79	78	21.67	0.58		
		25	80	82	80	19.33	0.58		
	Corsica	100	75	72	74	26.33	1.53	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	80	80	81	19.67	0.58		
		25	82	83	82	17.67	0.58		
	Suffren	100	35	32	34	66.33	1.53	EC <sub>50</sub> =46,33 (44,99-47,59)	Alta
		50	54	52	54	46.67	1.15		
		25	80	81	82	19.00	1.00		
USACE 1h	Lazaret	100	80	82	81	19.00	1.00	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	80	81	83	18.67	1.53		
		25	84	80	84	17.33	2.31		

	Tour Royale	100	78	81	81	20.00	1.73	EC <sub>20</sub> >90	Assente	
		50	81	79	81	19.67	1.15			
		25	84	82	81	17.67	1.53			
	Corsica	100	80	81	80	19.67	0.58	EC <sub>20</sub> >90	Assente	
		50	82	80	83	18.33	1.53			
		25	83	82	85	16,67	1.53			
	Suffren	100	37	35	34	64.67	1.53	EC <sub>50</sub> =73.14 (59.64-90.74)	Alta	
		50	54	56	54	45.33	1.15			
		25	79	79	81	20.33	1.15			
USACE 3h	Lazaret	100	80	81	81	19.33	0.58	EC <sub>20</sub> >90	Assente	
		50	79	82	81	19.33	1.53			
		25	82	84	81	17.67	1.53			
	Tour Royale	100	74	76	75	25.00	1.00	EC <sub>20</sub> >90	Assente	
		50	80	81	79	20.00	1.00			
		25	82	80	80	19.33	1.15			
	Corsica	100	79	80	83	19.33	2.08	EC <sub>20</sub> >90	Assente	
		50	82	79	81	19.33	1.53			
		25	82	82	84	17.33	1.15			
	Suffren	100	63	66	65	35.33	1.53	EC <sub>20</sub> >90	Assente	
		50	79	77	78	22.00	1.00			
		25	81	80	81	19.33	0.58			
USACE 24h	Lazaret	100	81	78	79	20.67	1.53	EC <sub>20</sub> >90	Assente	
		50	82	84	82	17.33	1.15			
		25	83	81	83	17.67	1.15			
	Tour Royale	100	79	80	77	21.33	1.53	EC <sub>20</sub> >90	Assente	
		50	80	80	77	21.00	1.73			
		25	82	82	83	17.67	0.58			
	Corsica	100	36	35	36	64.33	0.58	EC <sub>50</sub> = 79.66 (64.65-102.07)	Alta	
		50	61	62	62	38.33	0.58			
		25	79	76	75	23.33	2.08			
			100	80	81	81	19.33	0.58	EC <sub>20</sub> >90	Assente
			50	79	81	83	19.00	2.00		
			25	82	81	84	17.67	1.53		

Tabella 11b Parametri di convalida per i test con *P. lividus* effettuati con gli elutriati di Tolone.

	Parametri	Risultati attesi	Risultati raggiunti
Controllo negativo (FSW)	% plutei (P4) normalmente formati	> 80%	84%
Controllo positivo Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *3H <sub>2</sub> O	EC <sub>50</sub> (µg.L <sup>-1</sup> )	22,60 - 68,34	EC <sub>50</sub> =27.96 (25.20-30.22)

La percentuale di larve malformate nel controllo negativo (FSW) era inferiore al 20% mentre il valore EC50 ottenuto con il tossico di riferimento (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*3H<sub>2</sub>O) era di 27,96 (25,20-30,22) µg.L<sup>-1</sup>. Questo valore è compreso nell'intervallo di valori (22.60-68.34 (UCL) µg.L<sup>-1</sup>) forniti nel documento di controllo di laboratorio; e corrisponde ai dati riportati in letteratura per questa specie con questo riferimento tossico (His e altri, 1999; Fernández e Beiras, 2001; Arizzi, Novelli e altri, 2002, 2003a; Anderson e altri, 2004; Sartori e altri, 2016).

Tra gli elutriati ottenuti sulla base dei protocolli di preparazione ASTM e USACE utilizzando 3 diversi tempi di miscelazione/aerazione (1 ora, 3 ore e 24 ore), 17 sono risultati non tossici, 3 moderatamente tossici e 4 hanno mostrato elevata tossicità. Le stazioni più tossiche sono Corsica e Suffren.

**Tabella 12a** Risultati del test di embriotossicità di *P. lividus* effettuato sui campioni di elutriati di Olbia. La tabella mostra la media ( $\mu$ ) di larve malformate, le deviazioni standard (s) e il valore EC<sub>20</sub>/EC<sub>50</sub> determinato dall'analisi Probit.

	Sito	Diluizione (%)	P4 formati normalmente (repliche)			P4 malformati ( $\mu$ )	s	EC <sub>20</sub> /EC <sub>50</sub> (%)	Tossicità
ASTM 1h	P1	100	71	74	73	27.33	1.53	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	80	81	82	19.00	1.00		
		25	82	83	82	17.67	0.58		
	P2	100	64	62	62	37.33	1.15	EC <sub>20</sub> =88,20 (81,62-89,98); EC <sub>50</sub> >100	Media
		50	80	80	78	20.67	1.15		
		25	81	82	83	18.00	1.00		
	P3	100	82	83	81	18.00	1.00	EC <sub>20</sub> >90	Media
		50	82	83	83	17.33	0.58		
		25	83	83	84	16,67	0.58		
ASTM 3h	P1	100	78	77	77	22.67	0.58	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	80	81	78	20.33	1.53		
		25	82	81	79	19.33	1.53		
	P2	100	60	57	59	41.33	1.53	EC <sub>20</sub> =57,44 (52,63-62,38)	Media
		50	74	73	72	27.00	1.00		
		25	78	80	79	21.00	1.00		
	P3	100	53	54	56	45.67	1.53	EC <sub>20</sub> =63,08 (56,92-69,22); EC <sub>50</sub> =115.87 (92.25-345.69)	Media
		50	74	78	79	23.00	2.65		
		25	81	80	82	19.00	1.00		
ASTM24h	P1	100	80	81	82	19.00	1.00	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	81	83	80	18.67	1.53		
		25	82	82	83	17.67	0.58		
	P2	100	78	76	79	22.33	1.53	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	78	81	79	20.67	1.53		
		25	80	82	82	18.67	1.15		
	P3	100	48	46	48	52.67	1.15	EC <sub>20</sub> =52,08 (47,71-56,72) EC <sub>50</sub> =103.08 (80.83-175.16)	Media
		50	69	71	73	29.00	2.00		
		25	80	79	79	20.67	0.58		
USACE 1h	P1	100	66	67	66	33.67	0.58	EC <sub>20</sub> =76,05 (71,63-80,56); EC <sub>50</sub> >100	Media
		50	75	76	75	24.67	0.58		
		25	80	81	81	19.33	0.58		
	P2	100	29	30	30	70.33	0.58	EC <sub>50</sub> =67.04 (53,59-83,32)	Alta
		50	54	52	52	47.33	1.15		
		25	74	73	71	27.33	1.53		
	P3	100	29	30	31	70.00	1.00	EC <sub>50</sub> =68.63 (55,25-84,55)	Alta
		50	56	56	54	44.67	1.15		
		25	74	74	75	25.67	0.58		
USA CE	P1	100	23	25	26	75.33	1.53	EC <sub>50</sub> =65.65 (53,29-78,29)	Alta
		50	58	58	55	43.00	1.73		



USACE 24h	P2	25	71	70	74	28.33	2.08	EC <sub>20</sub> >90	Assente	
		100	78	80	81	20.33	1.53			
		50	81	82	81	18.67	0.58			
		25	84	82	84	16.67	1.15			
	P3	100	54	56	54	45.33	1.15	EC <sub>20</sub> =75,55 (69,92-81,83); EC <sub>50</sub> =104,00	Media	
		50	80	82	82	18.67	1.15			
		25	81	81	83	18.33	1.15			
	P1	100	28	29	27	72.00	1.00	EC <sub>50</sub> =69.18 (57,62-80,83)	Alta	
			50	60	57	58	41.67			1.53
			25	80	81	78	20.33			1.53
		P2	100	10	11	11	89.33	0.58	EC <sub>50</sub> =61.24 (54,41-67,19)	Alta
			50	60	58	60	40.67	1.15		
25			80	79	81	20.00	1.00			
P3		100	6	3	3	96.00	1.73	EC <sub>50</sub> =53.53 (47,74-58,41)	Alta	
		50	47	48	48	52.33	0.58			
		25	79	78	79	21.33	0.58			

**Tabella 12b** Parametri di validazione per test con *P. lividus* effettuati con gli elutriati di Olbia.

	Parametri	Risultati attesi	Risultati raggiunti
<b>Controllo negativo (FSW)</b>	<b>% plutei (P4) normalmente formati</b>	> 80%	87%
<b>Controllo positivo Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>*3H<sub>2</sub>O</b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg.L<sup>-1</sup>)</b>	22,60 - 68,34	EC <sub>50</sub> = 26.33 (24.32- 28.87)

Nel controllo negativo (FSW), la percentuale di larve normalmente formate era dell'87% mentre il valore EC<sub>50</sub> ottenuto con il tossico di riferimento (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*3H<sub>2</sub>O) era 26,33 (24,32-28, 87) µg.L<sup>-1</sup>. Questo valore è compreso nell'intervallo di valori (22.60-68.34 (UCL) µg.L<sup>-1</sup>) forniti nel documento di controllo di laboratorio e corrisponde ai dati riportati in letteratura per questa specie con questo tossico di riferimento (His e altri, 1999; Fernández e Beiras, 2001; Arizzi, Novelli e altri, 2002, 2003a; Anderson e altri, 2004; Sartori e altri, 2016).

La maggior parte degli elutriati ottenuti sulla base dei protocolli di preparazione ASTM e USACE utilizzando 3 diversi tempi di miscelazione/aerazione (1 ora, 3 ore e 24 ore) ha mostrato tossicità e in particolare un terzo dei campioni testati hanno mostrato elevata tossicità.

Il campione P1, preparato secondo il metodo ASTM, è risultato privo di tossicità, indipendentemente dal tempo di miscelazione acqua/sedimento utilizzato per preparare gli elutriati.

Tutti gli elutriati preparati secondo il protocollo USACE sono risultati tossici, ad eccezione del campione P2 ottenuto con 3 ore di aerazione dei sedimenti.

Qualunque sia il protocollo di preparazione utilizzato, la stazione P3 era quella con la più alta tossicità.

**Tabella 13a** Risultati del test di embriotossicità di *P. lividus* effettuato sugli elutriati dei campioni di Cagliari. La tabella mostra la media ( $\mu$ ) di larve malformate, le deviazioni standard (s) e il valore EC20/EC50 determinato dall'analisi Probit.

	Sito	Diluzione (%)	P4 formati normalmente (repliche)			P4 malformati ( $\mu$ )	s	EC <sub>20</sub> /EC <sub>50</sub> (%)	Tossicità
ASTM 1h	Rinascita	100	4	2	4	96,67	1,15	EC <sub>50</sub> =58,97 (54,32-63,53)	Alta
		50	64	63	63	36,67	0,58		
		25	78	78	76	22,67	1,15		
	Darsena	100	7	3	8	94,00	2,65	EC <sub>50</sub> =61,30 (56,24-66,08)	Alta
		50	69	64	68	33,00	2,65		
		25	82	83	82	17,67	0,58		
	S. Elmo	100	0	0	0	100,00	0,00	EC <sub>50</sub> <40	Molto alta
		50	0	0	0	100,00	0,00		
		25	0	0	0	100,00	0,00		
ASTM 3h	Rinascita	100	10	14	13	87,67	2,08	EC <sub>50</sub> =46,48 (39,89-52,64)	Alta
		50	42	37	38	61,00	2,65		
		25	76	76	79	23,00	1,73		
	Darsena	100	0	1	0	99,67	0,58	EC <sub>50</sub> = 34.59 (30,93-37,96)	Alta
		50	10	13	11	88,67	1,53		
		25	75	73	76	25,33	1,53		
	S. Elmo	100	0	0	0	100,00	0,00	EC <sub>50</sub> <40	Molto alta
		50	0	0	0	100,00	0,00		
		25	0	0	0	100,00	0,00		
ASTM24h	Rinascita	100	8	6	9	92,33	1,53	EC <sub>50</sub> =64.55 (n.c. - n.c.)	Alta
		50	69	66	68	32,33	1,53		
		25	72	74	74	26,67	1,15		
	Darsena	100	0	1	2	99,00	1,00	EC <sub>50</sub> =53.74 (n.c. -n.c.)	Alta
		50	50	49	48	51,00	1,00		
		25	68	70	67	31,67	1,53		
	S. Elmo	100	0	0	0	100,00	0,00	EC <sub>50</sub> <40	Molto alta
		50	0	0	0	100,00	0,00		
		25	0	0	0	100,00	0,00		
USACE 1h	Rinascita	100	69	65	66	33,33	2,08	EC <sub>20</sub> =62,78	Media
		50	80	79	80	20,33	0,58		
		25	81	82	83	18,00	1,00		
	Darsena	100	72	74	72	27,33	1,15	EC <sub>20</sub> >90	Assente
		50	80	81	80	19,67	0,58		
		25	80	79	78	21,00	1,00		
	S. Elmo	100	10	9	10	90,33	0,58	EC <sub>50</sub> = 68,37 (61,42-73,85)	Alta
		50	78	80	76	22,00	2,00		
		25	83	82	82	17,67	0,58		
USACE 3h	Rinascita	100	0	0	0	100,00	0,00	EC <sub>50</sub> =65,81 (52,78-73,35)	Alta
		50	83	82	81	18,00	1,00		
		25	83	83	82	17,33	0,58		
	Darsena	100	30	35	32	67,67	2,52	EC <sub>50</sub> =81,22 (71,84-88,96)	Alta
		50	80	78	81	20,33	1,53		
		25	82	82	82	18,00	0,00		
	S. Elmo	100	15	20	22	81,00	3,61	EC <sub>50</sub> =69,95 (62,54-76,54)	Alta
		50	74	70	69	29,00	2,65		
		25	80	77	78	21,67	1,53		

<b>USACE 24h</b>	<b>Rinascita</b>	100	10	12	12	88,67	1,15	<b>EC<sub>50</sub>=67.57 (61,06-73,05)</b>	<b>Alta</b>
		50	76	76	73	25,00	1,73		
		25	80	82	82	18,67	1,15		
	<b>Darsena</b>	100	30	31	28	70,33	1,53	<b>EC<sub>50</sub>= 80.42 (70,32-87,39)</b>	<b>Alta</b>
		50	82	80	81	19,00	1,00		
		25	83	81	81	18,33	1,15		
	<b>S. Elmo</b>	100	6	5	6	94,33	0,58	<b>EC<sub>50</sub>=65,74 (59,62-70,92)</b>	<b>Alta</b>
		50	77	76	78	23,00	1,00		
		25	81	82	82	18,33	0,58		

**Tabella 13b** Parametri di validazione per test con *P. lividus* eseguite con elutriati di Cagliari.

	Parametri	Risultati attesi	Risultati raggiunti
<b>Controllo negativo (FSW)</b>	<b>% plutei (P4) normalmente formati</b>	> 80%	89%
<b>Controllo positivo Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>*3H<sub>2</sub>O</b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg.L<sup>-1</sup>)</b>	22,60 - 68,34	EC 50 = 29.13 (26.57-31.28)

Le percentuali di larve malformate riscontrate nel controllo negativo (<20%) e il valore EC50 ottenuto con il tossico di riferimento (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*3H<sub>2</sub>O) certificano la qualità dei test ecotossicologici effettuati. Nel porto di Cagliari, tutti i campioni analizzati hanno mostrato una tossicità generalmente elevata. Solo l'elutriato ottenuto dai sedimenti della stazione di Darsena con il protocollo USACE 3h è risultato privo di tossicità. In generale, i sedimenti della stazione di S. Elmo sono quelli che hanno mostrato la maggiore tossicità.

**Tabella 14a** Risultati del test di embriotossicità di *P. lividus* effettuato sugli elutriati dei campioni di La Spezia. La tabella mostra la media (µ) di larve malformate, le deviazioni standard (s) e il valore EC20/EC50 determinato dall'analisi Probit.

	Sito	Diluzione (%)	P4 formati normalmente (repliche)			P4 malformati (µ)	s	EC <sub>20</sub> /EC <sub>50</sub> (%)	Tossicità
<b>ASTM 1h</b>	<b>MF1</b>	100	80	81	81	19,33	0,58	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>
		50	81	83	81	18,33	1,15		
		25	84	84	84	16,00	0,00		
	<b>MF2</b>	100	80	79	80	20,33	0,58	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>
		50	81	80	81	19,33	0,58		
		25	82	83	81	18,00	1,00		
	<b>MF3</b>	100	80	78	78	21,33	1,15	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>
		50	83	83	82	17,33	0,58		
		25	84	82	81	17,67	1,53		
<b>MF4</b>	100	6	11	11	90,67	2,89	<b>EC<sub>20</sub>=39,15 (nd-nd) EC<sub>50</sub>=55,91(nd-nd)</b>	<b>Alta</b>	
	50	21	20	21	79,33	0,58			
	25	60	54	54	44,00	3,46			
<b>ASTM 3h</b>	<b>MF1</b>	100	6	10	5	93,00	2,65	<b>EC<sub>20</sub>=45,29 (41,25-48,68); EC<sub>50</sub>=60,37 (57,21 - 63,19)</b>	<b>Alta</b>
		50	22	20	15	81,00	3,61		
		25	60	61	63	38,67	1,53		
<b>MF2</b>	100	6	8	11	91,67	2,52	<b>EC<sub>20</sub>=43,57 (nd-nd);</b>	<b>Alta</b>	

		50	15	13	11	87,00	2,00	<b>EC<sub>50</sub>=60,37 (nd - nd)</b>		
		25	60	61	62	39,00	1,00			
		<b>MF3</b>	100	80	81	81	19,33	0,58	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>
			50	82	81	83	18,00	1,00		
			25	85	84	83	16,00	1,00		
		<b>MF4</b>	100	80	79	81	20,00	1,00	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>
	50		81	83	81	18,33	1,15			
	25		83	84	84	16,33	0,58			
	<b>ASTM24h</b>	<b>MF1</b>	100	60	67	62	37,00	3,61	<b>EC<sub>20</sub>=83,30 (65,57-96,96); EC<sub>50</sub>&gt;100</b>	<b>Media</b>
			50	71	72	73	28,00	1,00		
			25	78	78	81	21,00	1,73		
		<b>MF2</b>	100	60	59	58	41,00	1,00	<b>EC<sub>20</sub>=81,69 (68,08-91,08); EC<sub>50</sub>&gt;100</b>	<b>Media</b>
50			69	70	71	30,00	1,00			
25			80	81	82	19,00	1,00			
<b>MF3</b>		100	47	48	45	53,33	1,53	<b>EC<sub>20</sub>=73,29 (63,67-79,86); EC<sub>50</sub>&gt;100</b>	<b>Media</b>	
		50	68	66	65	33,67	1,53			
		25	80	78	81	20,33	1,53			
<b>MF4</b>		100	30	31	32	69,00	1,00	<b>EC<sub>20</sub>=52,05 (43,47-58,43); EC<sub>50</sub>=85,62 (79,54-92,48)</b>	<b>Alta</b>	
		50	54	53	58	45,00	2,65			
		25	66	69	68	32,33	1,53			
<b>USACE 1h</b>	<b>MF1</b>	100	81	80	83	18,67	1,53	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	82	85	85	16,00	1,73			
		25	85	82	82	17,00	1,73			
	<b>MF2</b>	100	84	82	81	17,67	1,53	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	84	83	82	17,00	1,00			
		25	84	84	83	16,33	0,58			
	<b>MF3</b>	100	81	82	78	19,67	2,08	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	81	81	83	18,33	1,15			
		25	83	84	83	16,67	0,58			
	<b>MF4</b>	100	80	82	82	18,67	1,15	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	83	80	81	18,67	1,53			
		25	81	83	84	17,33	1,53			
<b>USACE 3h</b>	<b>MF1</b>	100	80	81	80	19,67	0,58	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	82	82	82	18,00	0,00			
		25	83	81	83	17,67	1,15			
	<b>MF2</b>	100	79	81	81	19,67	1,15	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	84	82	84	16,67	1,15			
		25	83	86	80	17,00	3,00			
	<b>MF3</b>	100	76	75	78	23,67	1,53	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	80	81	82	19,00	1,00			
		25	82	82	83	17,67	0,58			
	<b>MF4</b>	100	80	79	78	21,00	1,00	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	81	80	81	19,33	0,58			
		25	82	83	83	17,33	0,58			
<b>USACE 24h</b>	<b>MF1</b>	100	82	81	82	18,33	0,58	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	83	81	82	18,00	1,00			
		25	83	84	84	16,33	0,58			
	<b>MF2</b>	100	81	81	81	19,00	0,00	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	82	84	81	17,67	1,53			
		25	85	83	83	16,33	1,15			
	<b>MF3</b>	100	80	81	80	19,67	0,58	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>	
		50	82	82	83	17,67	0,58			

		25	84	85	83	16,00	1,00		
<b>MF4</b>		100	80	82	82	18,67	1,15	<b>EC<sub>20</sub>&gt;90</b>	<b>Assente</b>
		50	82	80	82	18,67	1,15		
		25	83	83	82	17,33	0,58		

**Tabella 14b** Parametri di validazione per test con *P. lividus* effettuati con gli elutriati di La Spezia.

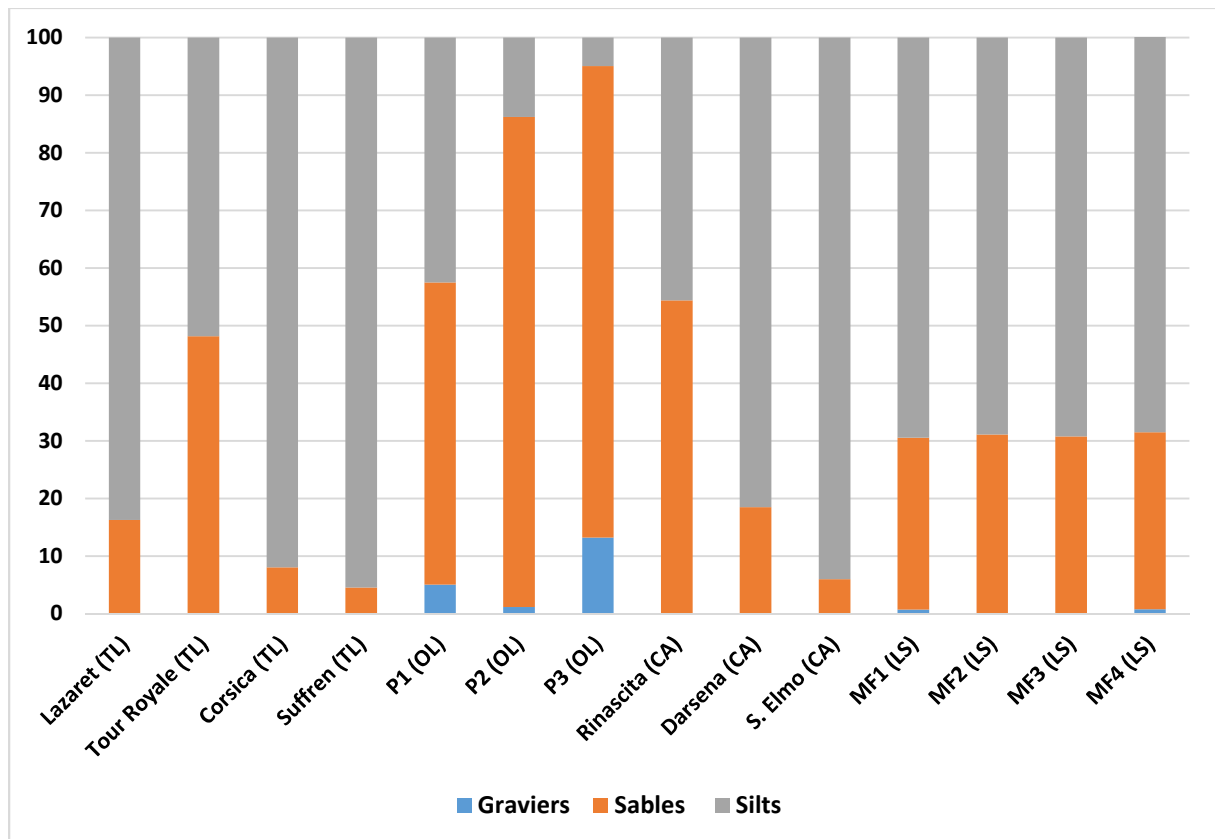
	<b>Parametri</b>	<b>Risultati attesi</b>	<b>Risultati raggiunti</b>
<b>Controllo negativo (FSW)</b>	<b>% plutei (P4) normalmente formati</b>	> 80%	86%
<b>Controllo positivo Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>*3H<sub>2</sub>O</b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg.L<sup>-1</sup>)</b>	22,60 - 68,34	EC <sub>50</sub> =30,08 (26,16-34,32)

La sensibilità dei gameti utilizzati nel test di sviluppo dei ricci di mare al tossico di riferimento è risultata conforme ai dati in letteratura per *P. lividus* ed è inclusa nella scheda di controllo di laboratorio (22,60 - 68,34 µg.L<sup>-1</sup>).

Tutti gli elutriati preparati secondo il metodo USACE non hanno mostrato alcun effetto tossico; gli elutriati preparati secondo il metodo ASTM a 3 e 24 h sono quelli che hanno mostrato la più alta tossicità, ad eccezione della stazione MF4 in cui l'elutriato preparato agitando l'acqua e i sedimenti per 1 ora ha mostrato una tossicità alta.

## 4. Discussione

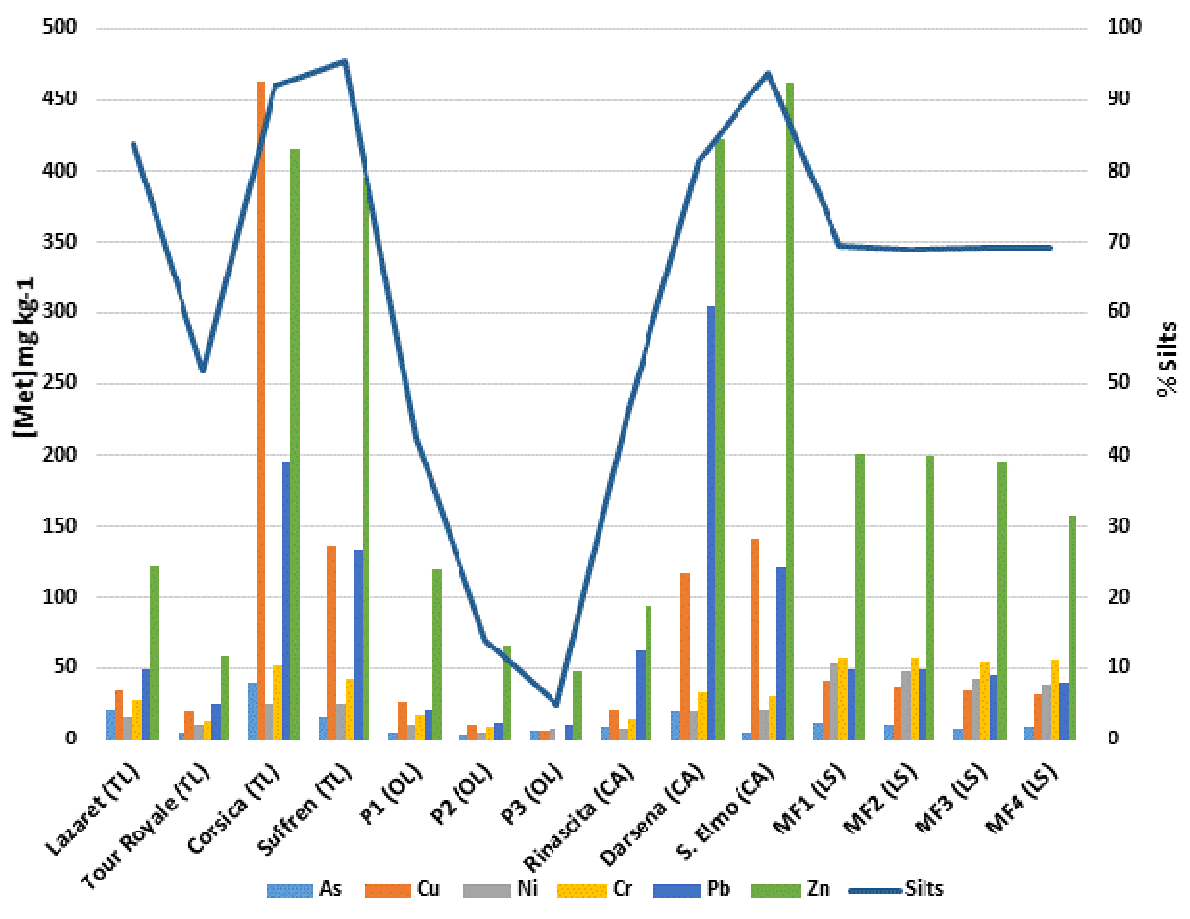
Da un punto di vista granulometrico, i sedimenti provenienti dai porti di Tolone, Cagliari e La Spezia sono caratterizzati dalla presenza di una considerevole percentuale di silts, generalmente superiore al 50%, che raggiunge l'80% nelle stazioni di Lazaret, Corsica e Suffren del porto di Tolone e Darsena e S. Elmo del porto di Cagliari (Figura 24). I sedimenti campionati nel porto di Olbia hanno una composizione granulometrica prevalentemente sabbiosa.



**Figura 24:** proporzioni relative delle diverse classi di dimensioni delle particelle dei sedimenti campionati nei porti di Tolone, Olbia, Cagliari e La Spezia.

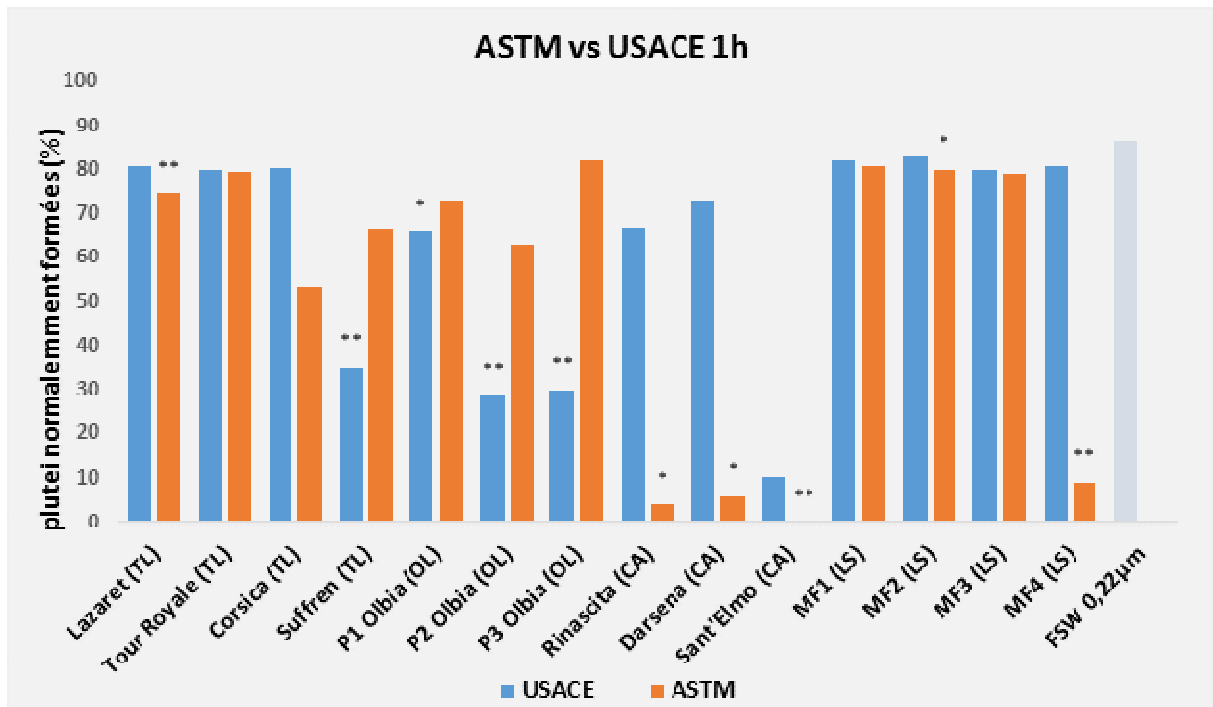
La percentuale di silts sembra fortemente legata alla concentrazione di alcuni metalli pesanti, come Pb e Zn (Figura 25), le cui concentrazioni sono particolarmente elevate nelle stazioni di Corsica e Suffren per il porto di Tolone e nelle stazioni di Darsena e S. Elmo per il porto di Cagliari. Per la stazione di Suffren, anche la concentrazione di Cu presente nei sedimenti è molto alta (462,9 mg.Kg<sup>-1</sup>).

Per quanto riguarda le concentrazioni dei metalli pesanti analizzati, Hg merita un'attenzione particolare: nei sedimenti dell'area di studio, le concentrazioni di questo metallo variano tra 0,022 e 0,64 mg.kg<sup>-1</sup>, mentre per i sedimenti prelevati nel porto di Tolone, in particolare nelle stazioni di Suffren e Corsica, i livelli di Hg rilevati sono rispettivamente di 2,13 e 9,85 mg.kg<sup>-1</sup>.



**Figura 25:** variazioni rispettive della frazione di silice (linea blu) e delle concentrazioni di As, Cu, Ni, Cr, Pb e Zn ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) nei sedimenti studiati.

I risultati del test di embriotossicità effettuato su elutriati ottenuti secondo i protocolli ASTM e USACE non modificati hanno mostrato una diversa criticità per i porti dell'area studiata (Figura 26). Per il porto di Tolone e La Spezia, i risultati ottenuti con il test, sebbene comparabili, hanno mostrato alcune differenze, in particolare per la stazione di Suffren (Tolone), dove il test con *P. lividus* ha rivelato una tossicità più elevata ( $p < 0.01$ ) per gli elutriati preparati secondo il protocollo USACE, e la stazione MF4 (La Spezia) dove il test effettuato sugli elutriati preparati secondo il protocollo ASTM ha fornito una percentuale significativamente più alta di larve malformate ( $p < 0,01$ ) rispetto al test USACE. Per il porto di Olbia, in generale, gli elutriati preparati secondo il metodo USACE hanno mostrato una tossicità più elevata (percentuale di larve significativamente malformate ( $p < 0,01$ ) rispetto ai test ASTM, mentre per il porto di Cagliari, la tossicità era significativamente più alta nei test ASTM.

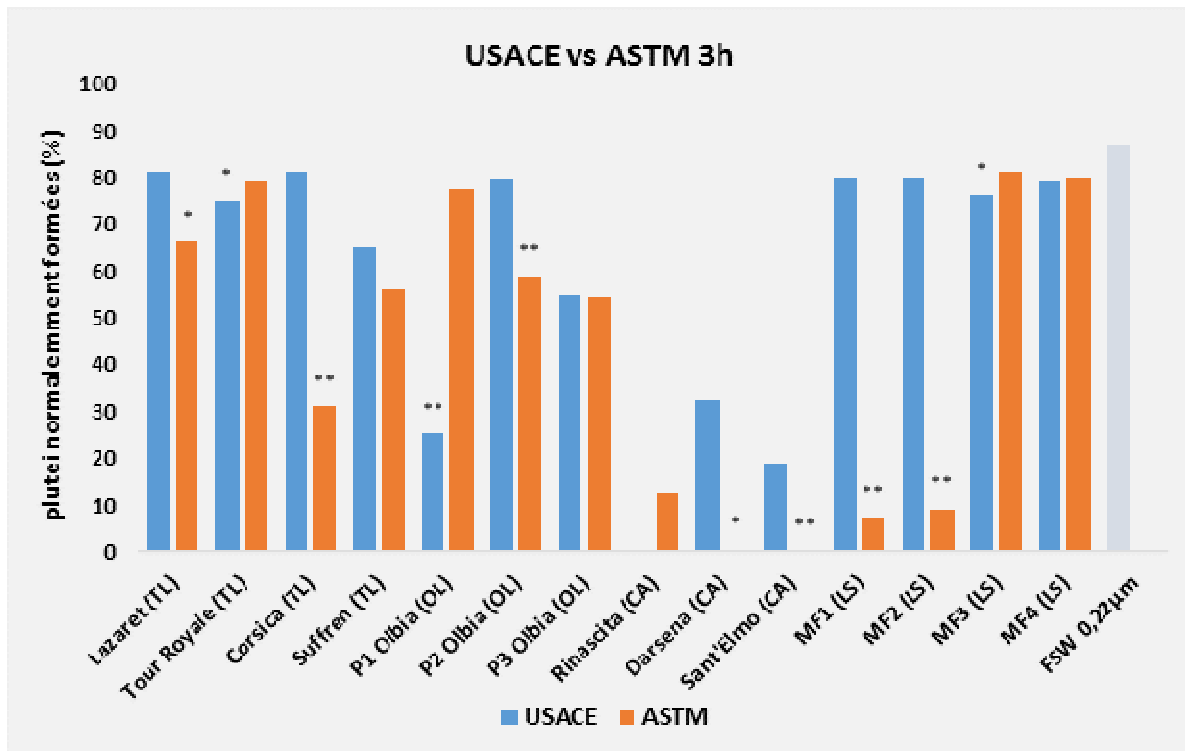


**Figura 26:** Percentuale di larve plutei normalmente formate con gli elutriati preparati secondo i protocolli USTM e USACE dopo un tempo di miscelazione acqua/sedimento di 1 ora e con controllo negativo (FSW). \* indica una differenza significativa con  $p < 0,05$ , \*\* indica una differenza significativa con  $p < 0,01$ .

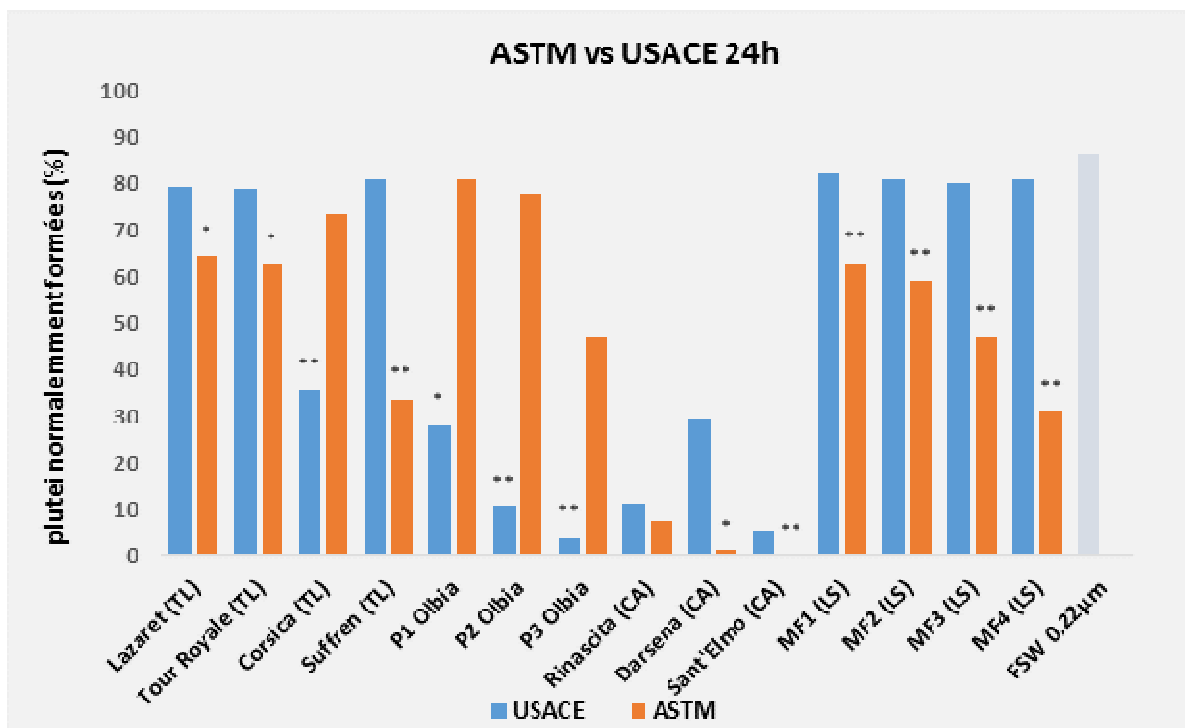
Se prendiamo in considerazione i test effettuati sugli elutriati preparati con i protocolli ASTM e USACE, aumentando il tempo di miscelazione/aerazione tra acqua e sedimenti a 3 ore, si può notare che il protocollo ASTM evidenzia i principali punti critici, anche se con alcune eccezioni, come per la stazione P1 nel porto di Olbia e la stazione Rinascita nel porto di Cagliari, dove le percentuali di larve deformi erano significativamente più elevate per i test effettuati sugli elutriati preparati in base al protocollo USACE (Figura 27).

I test effettuati secondo i protocolli ASTM e USACE, aumentando il tempo di miscelazione/aerazione fino a 24 ore, hanno sostanzialmente confermato la maggiore tossicità degli elutriati preparati secondo il metodo ASTM, ad eccezione dei test effettuati su sedimenti raccolti nel porto di Olbia dove la tossicità (in termini di percentuale di larve malformate) era significativamente più elevata con i test di *P. lividus* effettuati sugli elutriati USACE (Figura 28).





**Figura 27:** percentuale di larve plutei normalmente formate con gli elutriati preparati secondo i protocolli USTM e USACE dopo un tempo di miscelazione acqua/sedimento di 3 ore e con controllo negativo (FSW). \* indica una differenza significativa con  $p < 0,05$ , \*\* indica una differenza significativa con  $p < 0,01$ .



**Figura 8:** percentuale di larve plutei normalmente formate con gli elutriati preparati secondo i protocolli USTM e USACE dopo un tempo di miscelazione acqua/sedimento di 24 ore e con controllo negativo (FSW). \* indica una differenza significativa con  $p < 0,05$ , \*\* indica una differenza significativa con  $p < 0,01$ .

## 5. Conclusioni

I sedimenti raccolti nei porti studiati sono caratterizzati da un'alta concentrazione di Zn e Pb e, per quanto riguarda il porto di Tolone, da alte concentrazioni di Hg e As.

I due protocolli metodologici utilizzati per la preparazione degli elutriati fornivano risultati parzialmente sovrapponibili per i porti di Tolone e Cagliari, mentre per i porti di La Spezia e Olbia i dati ottenuti erano talvolta discordanti.

Sebbene con sfumature diverse, i due metodi hanno dimostrato che i sedimenti raccolti nel porto di Cagliari sono quelli che presentano la maggiore criticità. Se per il porto di La Spezia, gli elutriati preparati secondo il protocollo ASTM erano gli unici a presentare effetti tossici, d'altra parte, per il porto di Olbia, erano gli elutriati preparati secondo il metodo USACE a mostrare una tossicità significativa. La tossicità rilevata, a fronte di una contaminazione da metalli pesanti non particolarmente elevata in questo sito, potrebbe essere dovuta alla presenza di contaminanti non analizzati durante la caratterizzazione chimica dei sedimenti, sebbene i dati storici mostrino solo una bassa contaminazione da metalli e HAP per l'area di studio (De Luca e altri 2005).

L'elevata tossicità osservata per gli elutriati dei sedimenti di Olbia può essere dovuta alla presenza di fattori di disturbo, quali composti dello zolfo ( $H_2S$ ) o ammoniacale ( $NH_3$ ) che derivano dalla degradazione della materia organica legata alla presenza di mitilicoltura nel golfo di Olbia. L'ammoniaca, una volta disciolta negli elutriati, influenza significativamente lo sviluppo larvale di *P. lividus* con un CSEO riportato nella letteratura di  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  (Saco-Álvarez e altri, 2010) e un CMEQ per ammoniacale totale di  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (Losso e altri., 2007). L'acido solfidrico, come riportato in letteratura, può essere la causa di falsi positivi per il test di embriotossicità sui ricci di mare, in particolare per lo sviluppo delle larve ( $CSEO=0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ; Losso e altri, 2004); tuttavia, a differenza di  $NH_3$ ,  $H_2S$  può essere facilmente rimosso mediante una leggera aerazione del campione.

In generale, i risultati del test di sviluppo embrionale con *P. lividus* hanno mostrato un aumento della tossicità legato all'aumento del tempo di miscelazione tra acqua e sedimenti durante la preparazione degli elutriati, sia per il protocollo ASTM che per il protocollo USACE, mostrando una migliore capacità di estrazione di composti idrofili nella fase acquosa all'aumentare del tempo di contatto tra l'acqua e il sedimento. La variazione della tossicità in funzione del tempo può essere collegata alle diverse cinetiche di migrazione dei metalli in traccia dai sedimenti alla fase acquosa (Dang e altri 2020) durante la preparazione degli elutriati o alle sinergie che si possono stabilire tra alcuni metalli pesanti (come Hg, Pb e Cu) e i cui effetti si verificano sullo sviluppo larvale di *P. lividus* come riportato da Fernandez e Beiras (2001).

La discrepanza nei risultati ottenuti è probabilmente legata alla diversa capacità dei due protocolli di preparazione degli elutriati di estrarre contaminanti che aderiscono al sedimento a causa delle diverse condizioni fisico-chimiche che si verificano durante la preparazione degli elutriati. A questo proposito, è importante

sottolineare come l'aerazione della miscela acqua-sedimento fornita dal metodo USACE e mirata a creare un ambiente ossidante nel galleggiante durante la fase di sedimentazione degli elutriati (USACE, 2003) può influenzare la mobilità dei metalli, specialmente se presenti nei sedimenti sotto forma di solfuri che diventano molto instabili e quindi solubili in ambienti ossidanti (Moore e altri, 1990).

Un aspetto non preso in considerazione nella valutazione dei dati di tossicità evidenziati dal test con *P. lividus* è la possibile presenza di contaminanti emergenti (come profumi, ritardanti di fiamma, creme solari, etc.) che, per aree come il Golfo di Olbia, caratterizzate da un forte aumento della pressione antropica durante la stagione primavera-estate, possono aumentare considerevolmente la loro concentrazione nella colonna d'acqua e di conseguenza accumularsi nel sedimento che funge da collettore finale di tutti i contaminanti scaricati nelle acque marine costiere.

Al fine di evitare diverse interpretazioni dei risultati ottenuti durante la valutazione della qualità ecotossicologica dei sedimenti marini sottoposti a movimentazione, è necessario in futuro raggiungere una uniformità e standardizzazione dei metodi di preparazione delle matrici da analizzare, non solo per rendere comparabili i risultati ottenuti in zone diverse e in momenti diversi, ma soprattutto per migliorare la gestione dei sedimenti così da non compromettere la qualità dell'ambiente marino, laddove esistono ecosistemi di particolare valore naturalistico e attività produttive, come gli impianti di acquacoltura, il cui danno può creare un rischio per la salute umana.

## BIBLIOGRAFIA

- Andrews JH, Harris RF. 1986. r- and K-Selection and Microbial Ecology. In: Marshall KC ed. *Advances in Microbial Ecology*. Advances in Microbial Ecology. Boston, MA: Springer US, 99–147. DOI: 10.1007/978-1-4757-0611-6\_3.
- Arizzi Novelli A., Argese E., Tagliapietra D., Bettiol C., Volpi Ghirardini A., 2002. Toxicity of tributyltin and triphenyltin to early life-stages of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environ Toxicol Chem* 21(4): 859-864
- Arizzi Novelli A., Losso C., Ghetti P.F., Volpi Ghirardini A., 2003a. Toxicity of heavy metal using sperm cell and embryo toxicity with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparison with exposure concentration in the lagoon of Venice, Italy. *Environ Toxicol Chem* 22(6): 1295–1301.
- Arizzi Novelli A., Picone M., Losso C., Volpi Ghirardini A., 2003b. Ammonia as confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Toxicol and Environ Chem* 85(4-6):183-191.
- Arizzi Novelli A., Losso C., Libralato G., Tagliapietra D., Pantani C. and Volpi Ghirardini A., 2006. Is the 1:4 elutriation ratio reliable? Ecotoxicological comparison of four different sediment: water proportions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 306-313.
- Arizzi Novelli A., Losso C., Libralato G., Volpi Ghirardini A., 2007. Valutazione delle metodologie di elutriazione mediate saggi di tossicità. *Biologia Marina Mediterranea*, 14 (1): 87-89.
- ASTM, 1994. Standard Guide for Designing Biological Tests With Sediments. ASTM E1525: 22 pp.
- ASTM, 1995. Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests With Echinoid Embryos. ASTM E1563: 20 pp.
- ASTM E1367 – 03:2014. Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Estuarine and Marine Invertebrates.
- ASTM. (2000). E 1391–94 Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing. In: 2000 ASTM Standards on Environmental Sampling, Vol. 11.05 (pp. 768–788) Conshohocken, PA.
- Azam F, Fenchel T, Field J, Gray J, Meyer-Reil L, Thingstad F. 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series* 10:257–263. DOI: 10.3354/meps010257.

- van den Berg GA, Meijers GGA, van der Heijdt LM, Zwolsman JJG. 2001. Dredging-related mobilisation of trace metals: a case study in The Netherlands. *Water Research* 35:1979–1986. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00452-8.
- Buchan A, LeCleir GR, Gulvik CA, González JM. 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews Microbiology* 12:686–698. DOI: 10.1038/nrmicro3326.
- Cabrol L, Quéméneur M, Misson B. 2017. Inhibitory effects of sodium azide on microbial growth in experimental resuspension of marine sediment. *Journal of Microbiological Methods* 133:62–65. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.12.021.
- Cai W-J, Hu X, Huang W-J, Murrell MC, Lehrter JC, Lohrenz SE, Chou W-C, Zhai W, Hollibaugh JT, Wang Y, Zhao P, Guo X, Gundersen K, Dai M, Gong G-C. 2011. Acidification of subsurface coastal waters enhanced by eutrophication. *Nature Geoscience* 4:766–770. DOI: 10.1038/ngeo1297.
- Chow C-ET, Sachdeva R, Cram JA, Steele JA, Needham DM, Patel A, Parada AE, Fuhrman JA. 2013. Temporal variability and coherence of euphotic zone bacterial communities over a decade in the Southern California Bight. *The ISME Journal* 7:2259–2273. DOI: 10.1038/ismej.2013.122.
- Cindrić A-M, Cukrov N, Durrieu G, Garnier C, Pižeta I, Omanović D. 2017. Evaluation of Discrete and Passive Sampling (Diffusive Gradients in Thin-films – DGT) Approach for the Assessment of Trace Metal Dynamics in Marine Waters – a Case Study in a Small Harbor. DOI: 10.5562/cca3163.
- Cindrić A-M, Garnier C, Oursel B, Pižeta I, Omanović D. 2015. Evidencing the natural and anthropogenic processes controlling trace metals dynamic in a highly stratified estuary: The Krka River estuary (Adriatic, Croatia). *Marine Pollution Bulletin* 94:199–216. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2015.02.029.
- Coclet C, Garnier C, Delpy F, Jamet D, Durrieu G, Le Poupon C, Mayer M, Misson B. 2018. Trace metal contamination as a toxic and structuring factor impacting ultraphytoplankton communities in a multicontaminated Mediterranean coastal area. *Progress in Oceanography* 163:196–213.
- Coclet C, Garnier C, Durrieu G, Omanovic D, D’Onofrio S, Le Poupon C, Mullot J-U, Briand J-F, Misson B. 2019. Changes in bacterioplankton communities resulting from direct and indirect interactions with trace metal gradients in an urbanized marine coastal area. *Frontiers in microbiology* 10:257.
- Costanza R, d’Arge R, de Groot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, Limburg K, Naeem S, O’Neill RV, Paruelo J, Raskin RG, Sutton P, van den Belt M. 1997. The value of the world’s ecosystem services and natural capital. *Nature* 387:253–260. DOI: 10.1038/387253a0.
- Cram JA, Parada AE, Fuhrman JA. 2016. Dilution reveals how viral lysis and grazing shape microbial communities. *Limnology and Oceanography* 61:889–905. DOI: 10.1002/lno.10259.

- Dang DH, Evans RD, Durrieu G, Layglon N, El Houssainy A, Mullot J-U, Lenoble V, Mounier S, Garnier C. 2018. Quantitative model of carbon and nitrogen isotope composition to highlight phosphorus cycling and sources in coastal sediments (Toulon Bay, France). *Chemosphere* 195:683–692. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.109.
- Dang DH, Layglon N., Ferretto N., Omanovic D., Mullot JU, Lenoble V., Mounier S., Garnier C. 2020. Kinetic processes of copper and lead remobilization during sediment resuspension of marine polluted sediments. *Science of the Total Environment* 698, 134120. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134120.
- Dang DH, Schäfer J, Brach-Papa C, Lenoble V, Durrieu G, Dutruch L, Chiffolleau J-F, Gonzalez J-L, Blanc G, Mullot J-U, Mounier S, Garnier C. 2015. Evidencing the Impact of Coastal Contaminated Sediments on Mussels Through Pb Stable Isotopes Composition. *Environmental Science & Technology* 49:11438–11448. DOI: 10.1021/acs.est.5b01893.
- Deeg CM, Zimmer MM, George EE, Husnik F, Keeling PJ, Suttle CA. 2019. *Chromulinavorax destructans*, a pathogen of microzooplankton that provides a window into the enigmatic candidate phylum *Dependentiae*. *PLOS Pathogens* 15:e1007801. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007801.
- Delpy F, Serranito B, Jamet J-L, Grégori G, Le Poupon C, Jamet D. 2018. Pico- and Nanophytoplankton Dynamics in Two Coupled but Contrasting Coastal Bays in the NW Mediterranean Sea (France). *Estuaries and Coasts* 41:2039–2055. DOI: 10.1007/s12237-018-0412-9.
- De Luca G., Furesi A., Micera G., Panzanelli A., Piu P.C., Pilo M.I., Spano N., Sanna G., 2005. Nature, distribution and origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments of Olbia harbor (Northern Sardinia, Italy). *Marine Pollution Bulletin* 50 (2005) 1223–1232.
- Dufresne C, Duffa C, Rey V. 2014. Wind-forced circulation model and water exchanges through the channel in the Bay of Toulon. *Ocean Dynamics* 64:209–224. DOI: 10.1007/s10236-013-0676-3.
- Dufresne C, Duffa C, Rey V, Verney R. 2018. Hydro-sedimentary model as a post-accidental management tool: Application to radionuclide marine dispersion in the Bay of Toulon (France). *Ocean & Coastal Management* 153:176–192. DOI: 10.1016/j.ocecoaman.2017.12.026.
- Environment Canada, 1992. Biological test method: fertilization assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars). Environmental Protection Series, EPS 1/RM/27, Ottawa, Canada.
- Fernandez N. and Beiras R., 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology* 10: 263–271.

- Fuhrman JA, Steele JA, Hewson I, Schwalbach MS, Brown MV, Green JL, Brown JH. 2008. A latitudinal diversity gradient in planktonic marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:7774–7778. DOI: 10.1073/pnas.0803070105.
- Galand PE, Lucas S, Fagervold SK, Peru E, Pruski AM, Vétion G, Dupuy C, Guizien K. 2016. Disturbance Increases Microbial Community Diversity and Production in Marine Sediments. *Frontiers in Microbiology* 7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01950.
- Gast RJ, Moran DM, Dennett MR, Wurtsbaugh WA, Amaral- Zettler LA. 2011. Amoebae and Legionella pneumophila in saline environments. *Journal of water and health* 9:37–52. DOI: 10.2166/wh.2010.103.
- Gilbert JA, Steele JA, Caporaso JG, Steinbrück L, Reeder J, Temperton B, Huse S, McHardy AC, Knight R, Joint I, Somerfield P, Fuhrman JA, Field D. 2012. Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME Journal* 6:298–308. DOI: 10.1038/ismej.2011.107.
- Goñi-Urriza M, Moussard H, Lafabrie C, Carre C, Bouvy M, Sakka Hlaili A, Pringault O. 2018. Consequences of contamination on the interactions between phytoplankton and bacterioplankton. *Chemosphere* 195:212–222. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.053.
- Grégori G, Citterio S, Ghiani A, Labra M, Sgorbati S, Brown S, Denis M. 2001. Resolution of Viable and Membrane-Compromised Bacteria in Freshwater and Marine Waters Based on Analytical Flow Cytometry and Nucleic Acid Double Staining. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4662–4670. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4662-4670.2001.
- Guigue C, Tedetti M, Dang DH, Mullot J-U, Garnier C, Goutx M. 2017. Remobilization of polycyclic aromatic hydrocarbons and organic matter in seawater during sediment resuspension experiments from a polluted coastal environment: Insights from Toulon Bay (France). *Environmental Pollution* 229:627–638. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.06.090.
- Halpern BS, Walbridge S, Selkoe KA, Kappel CV, Micheli F, D'Agrosa C, Bruno JF, Casey KS, Ebert C, Fox HE, Fujita R, Heinemann D, Lenihan HS, Madin EMP, Perry MT, Selig ER, Spalding M, Steneck R, Watson R. 2008. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science* 319:948–952. DOI: 10.1126/science.1149345.
- 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.
- Haring H.J., Smith M.E., Lazorchak J.M., Crocker P.A., Euresti A., Blocksom K., Wratschko M.C., Schaub M.C. 2012. An interlaboratory comparison of sediment elutriate preparation and toxicity test methods. *Environ Monit Assess* 184:7343–7351.

- Hartmann M, Zubkov MV, Scanlan DJ, Lepère C. 2013. In situ interactions between photosynthetic picoeukaryotes and bacterioplankton in the Atlantic Ocean: evidence for mixotrophy. *Environmental Microbiology Reports* 5:835–840. DOI: 10.1111/1758-2229.12084.
- His E, Heyvang I, Geffard O, De Montaudouin X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassay for toxicological studies. *Water Res* 33(7):1706–1718.
- ICES, 1997. Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment.
- ICRAM-APAT, 2007. Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini. (consultabile sul web all'indirizzo [www.isprambiente.it](http://www.isprambiente.it)).
- Jonsson S, Andersson A, Nilsson MB, Skjellberg U, Lundberg E, Schaefer JK, Åkerblom S, Björn E. 2017. Terrestrial discharges mediate trophic shifts and enhance methylmercury accumulation in estuarine biota. *Science Advances* 3:e1601239. DOI: 10.1126/sciadv.1601239.
- Kim MS, Choi MS, Kim C-K. 2016. Monitoring trace metals in seawater using a diffusive gradient in thin film probe in Ulsan Bay, East Sea, Korea: Comparison with transplanted mussels. *Ocean Science Journal* 51:169–182. DOI: 10.1007/s12601-016-0015-y.
- Lares ML, Marinone SG, Rivera-Duarte I, Beck A, Sañudo-Wilhelmy S. 2009. Spatial Variability of Trace Metals and Inorganic Nutrients in Surface Waters of Todos Santos Bay, México in the Summer of 2005 During a Red Tide Algal Bloom. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56:707–716. DOI: 10.1007/s00244-008-9210-x.
- Losso C., Arizzi Novelli A., Picone M., Volpi Ghirardini A., Ghetti P.F., Rudello D., Ugo P., 2004. Sulfide as a confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparisons with chemical analysis data. *Environ Toxicol Chem* 23(2): 396-401.
- Losso C., Arizzi Novelli A., Picone M., Marchetto D., Pantani C., Ghetti P. F., Ghirardini A. V., 2007. Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(2): 252–7.
- Louis Y, Garnier C, Lenoble V, Mounier S, Cukrov N, Omanović D, Pižeta I. 2009. Kinetic and equilibrium studies of copper-dissolved organic matter complexation in water column of the stratified Krka River estuary (Croatia). *Marine Chemistry* 114:110–119. DOI: 10.1016/j.marchem.2009.04.006.
- Luczak C., Janquin M-A., Kupka A., 1997. Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia* 345: 87–94.
- Luo H, Moran MA. 2015. How do divergent ecological strategies emerge among marine bacterioplankton lineages? *Trends in Microbiology* 23:577–584. DOI: 10.1016/j.tim.2015.05.004.



- Luria CM, Amaral-Zettler LA, Ducklow HW, Repeta DJ, Rhyne AL, Rich JJ. 2017. Seasonal shifts in bacterial community responses to phytoplankton-derived dissolved organic matter in the Western Antarctic Peninsula. *Frontiers in microbiology* 8:2117.
- Marcus NH, Boero F. 1998. Minireview: The importance of benthic-pelagic coupling and the forgotten role of life cycles in coastal aquatic systems. *Limnology and Oceanography* 43:763–768. DOI: 10.4319/lo.1998.43.5.0763.
- Marie D, Rigaut-Jalabert F, Vaultot D. 2014. An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry Part A* 85:962–968. DOI: 10.1002/cyto.a.22517.
- Meier DV, Pjevac P, Bach W, Markert S, Schweder T, Jamieson J, Petersen S, Amann R, Meyerdierks A. 2019. Microbial metal-sulfide oxidation in inactive hydrothermal vent chimneys suggested by metagenomic and metaproteomic analyses. *Environmental Microbiology* 21:682–701. DOI: 10.1111/1462-2920.14514.
- Misson B, Garnier C, Lauga B, Dang DH, Ghiglione J-F, Mullet J-U, Duran R, Pringault O. 2016. Chemical multi-contamination drives benthic prokaryotic diversity in the anthropized Toulon Bay. *Science of The Total Environment* 556:319–329. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.038.
- Moore T.J., Hartwig R.C., Loeppert R.H., 1990. Steady-state procedure for determining the effective particle-size distribution of soil carbonates. *Soil Sci. Sot.Am. J.*, 54, 559.
- Nicolau R, Lucas Y, Merdy P, Raynaud M. 2012. Base flow and stormwater net fluxes of carbon and trace metals to the Mediterranean sea by an urbanized small river. *Water Research* 46:6625–6637. DOI: 10.1016/j.watres.2012.01.031.
- Nixon SW. 1981. Remineralization and Nutrient Cycling in Coastal Marine Ecosystems. In: Neilson BJ, Cronin LE eds. *Estuaries and Nutrients. Contemporary Issues in Science and Society*. Totowa, NJ: Humana Press, 111–138. DOI: 10.1007/978-1-4612-5826-1\_6.
- Omanović D, Kwokal Ž, Goodwin A, Lawrence A, Banks CE, Compton RG, Komorsky-Lovrić Š. 2006. Trace metal detection in Šibenik Bay, Croatia: Cadmium, lead and copper with anodic stripping voltammetry and manganese via sonoelectrochemistry. A case study. *Journal of the Iranian Chemical Society* 3:128–139. DOI: 10.1007/BF03245940.
- Oursel B, Garnier C, Durrieu G, Mounier S, Omanović D, Lucas Y. 2013. Dynamics and fates of trace metals chronically input in a Mediterranean coastal zone impacted by a large urban area. *Marine Pollution Bulletin* 69:137–149. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.01.023.
- Oursel B, Garnier C, Pairaud I, Omanović D, Durrieu G, Syakti AD, Le Poupon C, Thouvenin B, Lucas Y. 2014. Behaviour and fate of urban particles in coastal waters: Settling rate, size distribution and metals contamination

characterization. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 138:14–26. DOI: 10.1016/j.ecss.2013.12.002.

Pougnat F, Schäfer J, Dutruch L, Garnier C, Tessier E, Dang DH, Lanceleur L, Mullot J-U, Lenoble V, Blanc G. 2014. Sources and historical record of tin and butyltin species in a Mediterranean bay (Toulon Bay, France). *Environmental Science and Pollution Research International* 21:6640–6651. DOI: 10.1007/s11356-014-2576-6.

Pusceddu A, Fiordelmondo C, Danovaro R. 2005. Sediment resuspension effects on the benthic microbial loop in experimental microcosms. *Microbial Ecology* 50:602–613. DOI: 10.1007/s00248-005-5051-6.

Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque n. 39 - IT ISSN 0390-6329. Milano.

Ritzrau W, Graf G. 1992. Increase of microbial biomass in the benthic turbidity zone of Kiel Bight after resuspension by a storm event. *Limnology and Oceanography* 37:1081–1086. DOI: 10.4319/lo.1992.37.5.1081.

Saco-Álvarez L., Durán I., Lorenzo J.I. and Beiras R., 2010. Methodological basis for the optimization of marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 491 – 499.

Sartori D., Gaion A., 2015. Can sea urchins benefit from an artificial diet? Physiological and histological assessment for echinoculture feasibility Evaluation. *Aquac. Nutr.* <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12326>

Šantić D, Krstulović N, Šolić M, Kušpilić G. 2012. HNA and LNA bacteria in relation to the activity of heterotrophic bacteria. *Acta Adriatica* 53:25–40.

Santinelli C. 2015. Chapter 13 - DOC in the Mediterranean Sea. In: Hansell DA, Carlson CA eds. *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* (Second Edition). Boston: Academic Press, 579–608. DOI: 10.1016/B978-0-12-405940-5.00013-3.

Sañudo-Wilhelmy SA, Flegal AR. 1996. Trace Metal Concentrations in the Surf Zone and in Coastal Waters off Baja California, Mexico. *Environmental Science & Technology* 30:1575–1580. DOI: 10.1021/es9505560.

Sartori D., Gaion A., 2015. Can sea urchins benefit from an artificial diet? Physiological and histological assessment for echinoculture feasibility Evaluation. *Aquac. Nutr.* <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12326>

Sartori D., Pellegrini D., Macchia S., Gaion A., 2016. Can echinoculture be a feasible and effective activity? Analysis of fast reliable breeding conditions to promote gonadal growth and sexual maturation in *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 451: 39-46.

Sartori D., 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.

- Shaw, M., Mueller, J.F., 2005. Preliminary evaluation of the occurrence of herbicides and PAHs in the Wet Tropics region of the Great Barrier Reef, Australia, using passive samplers. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 876–881.
- Slotton DG, Reuter JE. 1995. Heavy metals in intact and resuspended sediments of a California reservoir, with emphasis on potential bioavailability of copper and zinc. *Marine and Freshwater Research* 46:257–265. DOI: 10.1071/mf9950257.
- Stephens, B.S., Mueller, J.F., Kapernick, A., Eaglesham, G., 2003. Pesticide and pharmaceutical monitoring of polar organic pollutants using solid phase extraction disks in novel aquatic passive samplers. In: 19 CRC: 19th Conference of Residue Chemists, Brisbane.
- Suffridge CP, Gómez-Consarnau L, Monteverde DR, Cutter L, Arístegui J, Alvarez-Salgado XA, Gasol JM, Sañudo-Wilhelmy SA. 2018. B Vitamins and Their Congeners as Potential Drivers of Microbial Community Composition in an Oligotrophic Marine Ecosystem. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 123:2890–2907. DOI: 10.1029/2018JG004554.
- Sun MY, Dafforn KA, Johnston EL, Brown MV. 2013. Core sediment bacteria drive community response to anthropogenic contamination over multiple environmental gradients. *Environmental Microbiology* 15:2517–2531. DOI: 10.1111/1462-2920.12133.
- Tessier E, Garnier C, Mullot J-U, Lenoble V, Arnaud M, Raynaud M, Mounier S. 2011. Study of the spatial and historical distribution of sediment inorganic contamination in the Toulon bay (France). *Marine Pollution Bulletin* 62:2075–2086. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.07.022.
- Thyssen M, Grégori GJ, Grisoni J-M, Pedrotti ML, Mousseau L, Artigas LF, Marro S, Garcia N, Passafiume O, Denis MJ. 2014. Onset of the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea: influence of environmental pulse events on the in situ hourly-scale dynamics of the phytoplankton community structure. *Systems Microbiology* 5:387. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00387.
- USEPA, 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. EPA 823-B-01-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.
- 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, 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.
- USACE, 2003. Evaluation of dredged material proposed for disposal at island, nearshore, or upland confined disposal facilities - Testing Manual,” Technical Report ERDC/EL TR-03-1, U.S. Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS.

- Volpi Ghirardini A., Arizzi Novelli A., Losso C., Ghetti P.F., 2005. Sperm cell and embryo toxicity tests using the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk) In: *Techniques in Aquatic Toxicology*, vol.II, Cap. 8, G.Ostrander (Ed) CRC press. pp. 147-168.
- Wafo E, Abou L, Nicolay A, Boissery P, Perez T, Ngono Abondo R, Garnier C, Chacha M, Portugal H. 2016. A chronicle of the changes undergone by a maritime territory, the Bay of Toulon (Var Coast, France), and their consequences on PCB contamination. *SpringerPlus* 5:1230. DOI: 10.1186/s40064-016-2715-2.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6578–6583. DOI: 10.1073/pnas.95.12.6578.
- Williams TJ, Wilkins D, Long E, Evans F, DeMaere MZ, Raftery MJ, Cavicchioli R. 2013. The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environmental Microbiology* 15:1302–1317. DOI: 10.1111/1462-2920.12017.
- Won N-I, Kim K-H, Kang JH, Park SR, Lee HJ. 2017. Exploring the Impacts of Anthropogenic Disturbance on Seawater and Sediment Microbial Communities in Korean Coastal Waters Using Metagenomics Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14. DOI: 10.3390/ijerph14020130.
- 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.

## ACTIVITÉ T.2.4

# LIVRABLES T2.4.9 LINEE GUIDA SULLA GESTIONE DEI SEDIMENTI E SUI RISCHI PER L'AMBIENTE COSTIERO DURANTE I PROCESSI DI RIMOBILIZZAZIONE/RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI

**Descrizione:** *report sul contributo apportato dalle nuove tecniche proposte nella valutazione degli effetti causati dai processi di rimobilizzazione/risospensione dei sedimenti nei porti (UTLN, ISPRA, UNICA).*



[La cooperazione al cuore del Mediterraneo](#)

La cooperazione al cuore del Mediterraneo  
La coopération au cœur de la Méditerranée

## SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>4</b>
<b>MONITORAGGIO <i>IN SITU</i> (PLURIENNALE) DELLE OPERAZIONI DI DRAGAGGIO NEL PORTO DI TOLONE: INDIVIDUAZIONE DEGLI IMPATTI GENERATI DALLE ATTIVITÀ' DI MOVIMENTAZIONE MEDIANTE L'INTEGRAZIONE DI DATI GEOCHIMICI E BIOLOGICI .....</b>	<b>6</b>
<b>L'APPLICAZIONE DI UN APPROCCIO SPERIMENTALE INNOVATIVO A DIVERSI CONTESTI PORTUALI MIGLIORA LA COMPrensIONE DELLA CONTAMINAZIONE METALLICA ASSOCIATA ALLA RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI.....</b>	<b>8</b>
<b>STUDIO AD ALTA RISOLUZIONE DELLA DINAMICA DELLA DIVERSITÀ' MICROBICA SPECIFICA E L'IMPATTO ECOLOGICO DELLA RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI.....</b>	<b>11</b>
<b>LA PREPARAZIONE DEGLI ELUTRIATI NEI TEST DI TOSSICITÀ': DAL CONFRONTO TRA IL PROTOCOLLO ASTM E USACE ALLA NECESSITÀ' DI STANDARDIZZARE LE METODICHE .....</b>	<b>13</b>
<b>L'ESECUZIONE DEI SAGGI <i>IN SITU</i> IN ALTERNATIVA ALL'ESECUZIONE DEI TEST IN CONDIZIONI CONTROLLATE DI LABORATORIO .....</b>	<b>16</b>
<b>CONCLUSIONI E PROSPETTIVE .....</b>	<b>18</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>19</b>

---

## INTRODUZIONE

La valutazione degli effetti causati dalla risospensione dei sedimenti nelle aree portuali è un aspetto fondamentale perché può incidere considerevolmente sulla qualità delle acque portuali sebbene la sua quantificazione risulti talvolta complessa. In letteratura, nelle attività di monitoraggio e studio di impatto ambientale, si contrappongono due approcci principali: da un lato la valutazione *in situ*, che richiede osservazioni e misurazioni prima/dopo l'operazione seguita, e dall'altro la simulazione, sia numerica che sperimentale in laboratorio.

La valutazione *in situ* degli effetti rimane l'approccio più accurato e realistico perché, gli effetti, incorporano la complessità naturale dell'ecosistema. Questa valutazione è necessaria per una gestione in tempo reale delle operazioni portuali in questione. Tuttavia, non sempre è possibile garantire un adeguato approccio sul campo e i motivi principali sono i seguenti :

- l'approccio *in situ* si basa su un confronto con dati acquisiti prima dell'inizio delle attività e relativi alla variabilità naturale del sito di studio, che non sempre è evidente per due motivi: la data di inizio e il luogo delle operazioni non sempre sono conosciuti con sufficiente anticipo; le regolari attività di monitoraggio della qualità ambientale riguardano solo un numero molto limitato di siti;
- l'area interessata da attività di rimobilizzazione/risospensione può essere di difficile accesso a causa delle complesse richieste di autorizzazione, dell'intervento di aziende private, non necessariamente interessate a facilitare il monitoraggio scientifico, anche alla luce dei possibili rischi per i responsabili del campionamento;
- il campionamento in mare richiede attrezzature specifiche (materiale scientifico e mezzi in mare), le condizioni climatiche possono rendere lo studio delicato o addirittura pericoloso;
- la molteplicità di parametri fisici, chimici e biologici da prendere in considerazione per valutare accuratamente il degrado della qualità dell'ambiente può rendere le operazioni molto complesse e costose;
- la diversità dei contesti portuali e l'eterogeneità naturale della qualità delle acque e dei sedimenti tra i porti limita, al momento, la generalizzazione degli impatti osservati. Può risultare quindi difficile proporre una breve lista di parametri da monitorare per coprire i potenziali impatti sull'area di studio;
- le correnti costiere, a causa della loro variabilità temporale su scala locale, possono influenzare fortemente i processi di dispersione e la rappresentatività delle misure puntuali;
- alcuni parametri possono variare su scale temporali diverse, da pochi minuti a diversi anni, con i parametri più dinamici che risultano i più difficili da monitorare;
- la distribuzione delle sostanze (nella fase disciolta o adsorbita alle particelle) e degli organismi viventi studiati (planctonici, pelagici mobili, bentonici/sessili) può richiedere un monitoraggio su scale temporali e spaziali diverse.

La simulazione sperimentale in laboratorio di eventi di risospensione dei sedimenti permette di tenere sotto controllo parte delle variazioni ambientali (temperatura,



dispersione, luce, etc.). E' così possibile valutare con precisione impatti molto specifici, valutare con estrema precisione i flussi di materiale (contaminanti, risorse di nutrienti), identificare i processi biotici e abiotici presenti e gli effetti sugli organismi viventi. Questo approccio sperimentale di simulazione è quindi necessario per identificare gli indicatori di impatto più adeguati e per confrontare rigorosamente i rischi della stessa attività di risospensione per qualsiasi tipologia di sedimenti e acque attraverso il controllo rigoroso di alcuni fattori. Tuttavia, il controllo delle condizioni sperimentali comporta necessariamente una semplificazione delle condizioni naturali. In effetti, attualmente non esiste un metodo sperimentale che rappresenti perfettamente le condizioni naturali o la diversità delle risposte biologiche corrispondenti ai vari organismi presenti nell'ambiente marino. Inoltre, questi approcci sperimentali si basano molto spesso sulla scelta di particolari scenari di risospensione e non coprono la molteplicità di scenari che si possono incontrare durante le operazioni portuali. È quindi necessario replicare gli esperimenti di laboratorio per garantire una buona comprensione e rappresentatività dei potenziali impatti sull'ambiente, il che implica un lungo e costoso lavoro di laboratorio.

Sulla base dei dati acquisiti sul campo e attraverso esperimenti di laboratorio, gli strumenti di simulazione numerica hanno un interessante potenziale per prevedere le conseguenze di un evento di risospensione su scala locale. Tuttavia, deve essere garantita la robustezza dei dati di ingresso (cioè le misure *in situ* devono essere sufficientemente risolutive e robuste, e gli esperimenti di laboratorio sufficientemente rappresentativi), e deve essere disponibile uno strumento di simulazione adattato al sito di studio e alle sue correnti. Tuttavia, raramente è possibile disporre contemporaneamente di osservazioni sul campo, della caratterizzazione dell'acqua e dei sedimenti e dei modelli di trasporto per un sito di studio. La previsione dell'impatto delle attività è quindi possibile solo per un numero molto limitato di sistemi portuali.

Sebbene imperfetti, questi diversi approcci sono complementari e aiutano le autorità pertinenti nella gestione dei sedimenti portuali. Nell'ambito dell'attività T.2.4 del progetto SE.D.RI.PORT. è stato realizzato un innovativo abbinamento tra osservazioni *in situ* e approcci sperimentali per valutare meglio l'impatto della risospensione dei sedimenti portuali.

## MONITORAGGIO *IN SITU* (PLURIENNALE) DELLE OPERAZIONI DI DRAGAGGIO NEL PORTO DI TOLONE: INDIVIDUAZIONE DEGLI IMPATTI GENERATI DALLE ATTIVITÀ' DI MOVIMENTAZIONE MEDIANTE L'INTEGRAZIONE DI DATI GEOCHIMICI E BIOLOGICI

Nel porto di Tolone è stata effettuata un'importante operazione di dragaggio. A causa del rischio pirotecnico presente nei sedimenti del porto, il dragaggio è stato effettuato mediante una draga aspirante-refluente, che ha permesso una notevole riduzione della dispersione delle particelle risospese. Inoltre, a causa della loro elevatissima contaminazione chimica, i sedimenti dragati sono stati raccolti e poi collocati in una discarica a terra. A questo scopo, e secondo quanto previsto dalla normativa francese, i sedimenti rimossi sono stati temporaneamente depositati in una vasca rivestita internamente da un geotessile semi-permeabile in grado di impedire il passaggio delle particelle di sedimento, riducendo al minimo il rischio di dispersione nell'ambiente delle particelle sedimentarie chimicamente contaminate.

Nell'ambito di una collaborazione con la Marina Francese, per conto della quale è stato eseguito questo dragaggio, è stato effettuato un follow-up sul campo. Questo monitoraggio è iniziato 1 anno prima dell'avvio dell'operazione di dragaggio e si è concluso quasi 2 anni dopo il suo completamento. Ha permesso di studiare l'area di dragaggio dei sedimenti, l'area di stoccaggio (all'interno e all'esterno del recinto confinato) e un sito un sito situato a 3 km dalla zona di dragaggio, in prossimità di un'area di acquacoltura.

Per valutare l'impatto di questa operazione è stata messa a punto un'innovativa combinazione di analisi geochimiche (concentrazioni, distribuzione e biodisponibilità di rame (Cu) e piombo (Pb)) e di analisi biologiche (conteggio del fitoplancton e dei batteri mediante citometria a flusso). L'integrazione di queste differenti linee di evidenza ha avuto diversi importanti vantaggi, tra cui :

- un'alta frequenza temporale di acquisizione, con analisi settimanale o mensile a seconda dei parametri;
- l'integrazione nel tempo della variabilità delle concentrazioni di Cu e Pb attraverso l'utilizzo di accumulatori passivi di tipo DGT (la cui utilità è ulteriormente descritta nei prodotti delle attività T.2.3.5 e T.2.3.6);
- tracciare la fonte sedimentaria della contaminazione, studiando sia i rapporti tra le concentrazioni disciolte e totali di Cu e Pb, sia studiando i rapporti tra le concentrazioni di Cu e Pb disciolti;
- prendere in considerazione la naturale variabilità temporale e spaziale dei vari parametri nella baia di Tolone;
- creare un collegamento con gli organismi viventi, prendendo in esame i gruppi microbici che svolgono un ruolo importante nel funzionamento dell'ecosistema marino;
- la possibilità di campionare all'interno di un'ambiente conterminato, ha permesso una migliore valutazione della protezione reale fornita dal dispositivo.

Questo studio ha confermato, per la prima volta, l'efficacia del metodo di dragaggio utilizzato nel limitare la dispersione di sedimento nella colonna d'acqua: l'unica traccia di

contaminazione di rame e piombo dovuta alle particelle di sedimento è stata rilevata all'interno della vasca impermeabilizzata in cui il sedimento dragato è stato stoccato temporaneamente. Per quanto concerne le comunità fitoplanctoniche, solo all'interno dell'area dove erano stati depositati i sedimenti sono state registrate delle variazioni, mentre nell'area esterna all'area di stoccaggio non sono state registrate variazioni nella struttura delle comunità fitoplanctoniche. La possibilità di effettuare campionamenti nell'area di deposito ha permesso di avanzare un'ipotesi generale relativa al potenziale impatto delle attività svolte nell'area portuale sulla diversità microbica nella baia di Tolone: la risospensione cronica dei sedimenti da parte delle abituali attività marittime (traffico e manovre delle navi) unita all'intralcio della corrente da parte delle infrastrutture portuali potrebbe essere la principale forza trainante del disturbo a lungo termine sulla diversità e proliferazione di fitoplancton e batterioplancton in questa zona portuale.

L'integrazione delle analisi chimiche e biologiche ha tuttavia evidenziato un dato mai riportato in letteratura fino ad allora: sebbene effettuata in condizioni controllate, il dragaggio ha portato ad un aumento delle concentrazioni di metalli disciolti nell'acqua che è stato rilevato fino a diversi chilometri di distanza. Per il piombo, questa contaminazione è stata rilevata, sia attraverso il campionamento discreto sia attraverso l'utilizzo dei campionatori passivi, indicando che questa contaminazione era potenzialmente biodisponibile. Inoltre, durante il periodo di dragaggio è stata osservata una crescita significativamente più elevata di batteri eterotrofi in tutta l'area di studio, il che suggerisce anche un arricchimento della colonna d'acqua con materia organica disciolta.

Queste varie osservazioni dimostrano che anche se vengono prese efficaci precauzioni per ridurre la dispersione delle particelle, un'operazione di dragaggio può portare alla solubilizzazione di composti che, una volta disciolti nell'acqua, possono essere veicolati a grandi distanze sotto l'effetto delle correnti. Mentre la risospensione delle particelle sedimentarie è nota da decenni per contribuire alla contaminazione da particolato della colonna d'acqua e all'eutrofizzazione dell'ambiente, il contributo dell'arricchimento in sostanze disciolte è stato finora poco studiato. Va notato che la contaminazione da Pb del porto di Tolone è particolarmente elevata e le osservazioni fatte probabilmente non valgono per altre aree portuali.

Allo stato attuale, il trasferimento di contaminanti dal particolato alla colonna d'acqua e le conseguenze ecologiche ad esso connesse (impatto ecologico) non possono essere controllate da una barriera fisica, come quella utilizzata in questo caso. È necessario comprendere i fattori che controllano questi trasferimenti dal particolato al disciolto, per proporre successivamente mezzi di controllo efficaci.

## L'APPLICAZIONE DI UN APPROCCIO SPERIMENTALE INNOVATIVO A DIVERSI CONTESTI PORTUALI MIGLIORA LA COMPrensIONE DELLA CONTAMINAZIONE METALLICA ASSOCIATA ALLA RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI

In considerazione dell'impatto chimico della risospensione, evidenziato dallo studio sul campo precedentemente riportato, è stata necessaria una valutazione dell'influenza della natura del sedimento e dell'acqua, così come della quantità di sedimento risospeso sul trasferimento dei metalli tra le particelle e la fase disciolta.

Nella letteratura scientifica possono trovarsi un numero limitato di studi che coprono una bassa casistica di contesti portuali, e quindi una limitata diversità di caratteristiche dei sedimenti. Tuttavia, i pochi lavori esistenti hanno già dimostrato un potenziale "controllo" del potenziale di ossido-riduzione che varia fortemente quando si risospendono sedimenti molto riducenti (anossici) in acqua molto ossidante (perché è ben ossigenata).

In questo contesto, nell'ambito del progetto SE.D.RI.PORT, è stato applicato un approccio sperimentale sviluppato in laboratorio, per simulare diversi eventi di risospensione dei sedimenti dei 3 porti pilota del progetto (La Spezia, Olbia e Tolone).

La caratterizzazione iniziale dei sedimenti di questi 3 porti (vedi prodotto di attività T.2.3.5) ha evidenziato l'elevata diversità dei contesti portuali studiati: sedimenti relativamente contaminati rimossi con un'operazione di livellamento (La Spezia), sedimenti poco contaminati ma arricchiti in sostanza organica proveniente dagli impianti di mitilicoltura (Olbia) e sedimenti altamente contaminati, non rimossi e lontani da impianti di acquacoltura (Tolone). Questa variabilità nei contesti portuali ha portato ad una significativa variabilità delle proprietà fisico-chimiche iniziali dei sedimenti (concentrazione di solfuro libero, contenuto di metalli, granulometria, progresso della diagenesi precoce).

L'innovativa metodologia impiegata ha richiesto una logistica importante, soprattutto per le operazioni effettuate in Italia, con la movimentazione di attrezzature pesanti e ingombranti, ma necessarie per la preparazione delle sperimentazioni. Innanzitutto è stato necessario prelevare i sedimenti mediante carotaggio, per poter prelevare un campione che integrasse lo stesso spessore di sedimento in tutti i porti. In secondo luogo, è stato necessario manipolare questi sedimenti senza ossidarli. Per fare questo, sono state utilizzate attrezzature per gestire i sedimenti in un'atmosfera arricchita di azoto. Per ogni esperimento è stata richiesta l'acqua del sito in cui è stato raccolto il sedimento per caratterizzare correttamente i potenziali impatti rappresentativi dell'area. Tutte le apparecchiature per il campionamento, il trattamento e gli esperimenti di simulazione della risospensione dovevano anche essere adeguate per le analisi dei metalli in tracce.

Per quanto riguarda il progetto sperimentale, le stesse condizioni di risospensione sono state applicate a tutti i porti pilota: monitoraggio cinetico per 2 settimane in una condizione di risospensione moderata (1 g di sedimento (equivalente di massa secca) per litro di acqua di mare, in costante agitazione) e una valutazione finale dopo 2 settimane di 10 rapporti sedimento/acqua (da 0,02 a 50 g per litro di acqua di mare) che copre una serie di processi corrispondenti a fenomeni climatici naturali così come le attività portuali antropogeniche.

Queste esperienze hanno permesso di individuare andamenti comuni nei tre contesti portuali studiati. Il trasferimento di Cu e Pb tra le particelle e la fase disciolta sembra seguire una cinetica che è molto poco influenzata dalle caratteristiche iniziali del campione. Sia in presenza di sedimenti e acque poco o altamente contaminati, il Cu, inizialmente, si dissolve e si adsorbe molto rapidamente (in pochi minuti) sulle particelle organiche risospese. Questa condizione, se associata ad una rapida deposizione delle particelle di sedimento, può contribuire a migliorare la qualità dell'acqua. Se la risospensione dei sedimenti prosegue per più di 1 settimana, e la quantità di sedimento risospeso è bassa, il Cu sembra risolubilizzarsi nuovamente a valori prossimi alla concentrazione iniziale disciolta. Se la quantità di sedimenti risospesi è elevata, la concentrazione di Cu disciolto può arrivare, dopo 2 settimane, a concentrazioni ben al di sopra del valore iniziale. Per quanto riguarda il Pb, è stata osservata una fase iniziale (dopo alcune ore) nella quale si ha il rilascio di Pb dalle particelle all'acqua, evidenziando un alto rischio di contaminazione della frazione disciolta; questa situazione concorda con quanto osservato nel monitoraggio effettuato sul campo e riportato in precedenza. Questo trasferimento precoce può essere seguito, dopo una o due settimane, da un trasferimento inverso, con la tendenza della concentrazione di Pb disciolto a ritornare al valore iniziale presente nell'acqua di mare. Sono emerse, tuttavia, differenze significative tra i diversi contesti portuali oggetto di indagine. Per quanto riguarda il porto di Olbia, la contaminazione da Cu disciolto dopo due settimane non è stata rilevata neanche in presenza di elevati rapporti sedimento/acqua. Questa osservazione suggerisce una possibile interferenza delle attività di mitilicoltura, presenti nel golfo di Olbia, sui trasferimenti di Cu, che dovrebbe essere indagata ulteriormente. Per quanto riguarda il Pb, il picco di contaminazione disciolta varia da 7h, per i siti meno contaminati, a 24h per il sito più contaminato (Tolone). Inoltre, dopo 2 settimane, con i campioni di Tolone, la concentrazione finale di Pb disciolto è risultata il doppio della concentrazione iniziale presente in acqua di mare anche per rapporti sedimenti/acqua molto bassi. Questo suggerisce che il livello iniziale di contaminazione dei sedimenti può interferire con l'ampiezza di trasferimento del Pb. Le interazioni con altre proprietà dei sedimenti, in particolare la presenza di solfuri in eccesso, dovranno essere valutate attraverso ulteriori approfondimenti.

L'applicazione di questo approccio sperimentale ai tre porti pilota del progetto ha dimostrato la possibilità di generalizzare la cinetica di trasferimento di Cu e Pb tra particelle e acqua durante la risospensione dei sedimenti. Tuttavia, le caratteristiche specifiche del sito sembrano influenzare l'ampiezza e l'evoluzione dei processi. Questo approccio sperimentale supporta quindi il diverso comportamento dei contaminanti metallici presenti e dimostra la necessità di ottimizzare le pratiche di gestione della risospensione su scala locale in funzione delle caratteristiche del sito (come ad esempio il grado di contaminazione e il tipo di contaminazione presente). Sono ora necessarie ulteriori ricerche per contribuire a sviluppare un piano di gestione della frequenza e dell'intensità della risospensione. In particolare, sarà necessario prendere in esame la natura transitoria della risospensione *in situ* e della sua possibile progressiva riduzione a causa degli effetti delle correnti e delle caratteristiche idrodinamiche del sito.



## STUDIO AD ALTA RISOLUZIONE DELLA DINAMICA DELLA DIVERSITÀ' MICROBICA SPECIFICA E L'IMPATTO ECOLOGICO DELLA RISOSPENSIONE DEI SEDIMENTI

Sebbene invisibili ad occhio nudo e di dimensioni molto piccole, i batteri rappresentano la "maggioranza invisibile" degli esseri viventi. Infatti, la maggior parte della biodiversità del nostro pianeta è rappresentata da organismi unicellulari, e i batteri rappresentano la maggior parte della loro biomassa. Ad esempio, nell'ambiente marino, dove ci sono tra  $10^5$  e  $10^6$  batteri per mL di acqua, la biomassa dei batteri rappresenterebbe più del 95% della biomassa totale. Al di là di questa diversità e della loro importanza in termini di numero e di massa, i batteri svolgono una serie di funzioni specifiche. Così, il funzionamento naturale degli ecosistemi si basa in gran parte su questo mondo invisibile.

Mentre l'impatto della risospensione dei sedimenti sul compartimento microbico è stato valutato per diversi decenni attraverso studi di impatto di dragaggio, i recenti progressi tecnologici che consentono lo studio dettagliato dei batteri sono stati poco utilizzati per descrivere le loro risposte alle "perturbazioni" e la nostra comprensione della loro reattività è ancora limitata. Pertanto, la loro reattività e resilienza a breve termine non sono ancora state studiate.

Un approccio sperimentale molto simile a quello impiegato per studiare i trasferimenti di metalli, è stato utilizzato con i campioni di acqua e sedimento di Olbia per studiare la cinetica di risposta della diversità batterica alla risospensione dei sedimenti e l'influenza della quantità di sedimenti risospesi. Il sequenziamento ad alto rendimento del DNA batterico è stato utilizzato per valutare la diversità della comunità, identificare le specie presenti e valutare la loro abbondanza relativa. Questo tipo di studio non ha eguali nella letteratura scientifica fino ad oggi.

Questo studio ha mostrato una diminuzione della diversità batterica dopo 48 ore di risospensione di 1 g di sedimento (equivalente di massa secca) per litro di acqua di mare. La diversità è aumentata per poi tornare al suo livello iniziale. Queste variazioni di diversità sono state accompagnate da un massiccio sviluppo di specie inizialmente rare, note per svilupparsi molto rapidamente in caso di un massiccio apporto di materia organica. Poi queste specie sono regredite gradualmente dopo due settimane, permettendo il ritorno della specie inizialmente dominante. La comunità batterica è rapidamente stimolata dall'improvviso aumento della disponibilità di materia organica legata alla risospensione dei sedimenti, tuttavia, l'alterazione della corrispondente diversità specifica sembra essere transitoria e la resilienza possibile. L'analisi dei diversi rapporti sedimento/acqua ha mostrato che la resilienza è fortemente influenzata dalla quantità di sedimenti risospesi nell'acqua.

Inoltre, l'identificazione dei batteri presenti ha rivelato un significativo sviluppo di batteri patogeni degli organismi marini, sinonimo di sviluppo dei loro ospiti eucarioti. Questa osservazione suggerisce quindi che la materia organica messa a disposizione dei batteri non è solo degradata, ma viene in parte trasferita alla rete alimentare per via diretta,

contribuendo così ad aumentare la produttività biologica dell'ecosistema e contribuendo alla sua eutrofizzazione.

Questo innovativo approccio sperimentale dimostra l'utilità del mondo microbico come indicatore della risposta dell'ecosistema alla risospensione e sottolinea la necessità di non dimenticare i fondamentali, e da tempo noti, effetti trofici a favore degli studi sui contaminanti chimici. Le risposte microbiche devono essere studiate in modo ancora più approfondito, analizzate in base ai diversi contesti portuali per identificare i fattori di controllo e trarre conclusioni generalizzabili che possano poi servire come base per ottimizzare la gestione della risospensione dei sedimenti nelle aree portuali.



## **LA PREPARAZIONE DEGLI ELUTRIATI NEI TEST DI TOSSICITÀ': DAL CONFRONTO TRA IL PROTOCOLLO ASTM E USACE ALLA NECESSITÀ' DI STANDARDIZZARE LE METODICHE**

Nella valutazione della qualità ambientale di aree portuali, l'integrazione di analisi chimiche ed ecotossicologiche, condotte sui sedimenti, è una attività eseguita routinariamente. Le analisi chimiche permettono di identificare e quantificare il tipo e la sorgente del contaminante, senza però rilevarne la biodisponibilità, le conseguenze sugli organismi viventi e gli eventuali effetti sinergici e/o antagonisti delle miscele d'inquinanti. Nella valutazione della tossicità di un sedimento e dei contaminanti ad esso legati, sono generalmente prese in considerazione le seguenti matrici: sedimento tal quale, acqua interstiziale ed elutriato. Se da un lato il sedimento tal quale, rappresenta lo scenario più reale di esposizione, dall'altro, l'esecuzione di saggi biologici sul sedimento tal quale, può richiedere un investimento considerevole di risorse umane, materiale e tempo. L'acqua interstiziale, costituisce una via di esposizione diretta per molte specie, tuttavia, per alcune tipologie di sedimento (campioni prevalentemente sabbiosi), non è possibile estrarne una quantità sufficiente per l'allestimento dei saggi biologici. Inoltre, la metodologia di estrazione, può portare ad alterazioni chimico fisiche (pH e potenziale redox in primis) della matrice stessa, che possono influire sulla reale biodisponibilità dei contaminanti eventualmente presenti. L'elutriato, a differenza del sedimento tal quale e dell'acqua interstiziale, è la matrice più facilmente utilizzabile e trova una larga applicazione in numerosi saggi biologici che impiegano specie appartenenti a livelli trofici differenti.

Per alcuni autori, la miscelazione di acqua e sedimento, necessaria alla preparazione dell'elutriato, può portare alla diluizione dei contaminanti e ridurre sensibilmente la loro tossicità.

I test con elutriati simulano gli effetti dell'esposizione degli organismi bioindicatori al sedimento risospeso, e hanno come scopo quello di fornire indicazioni riguardo il rilascio di contaminanti nella colonna d'acqua, a seguito dello sversamento in mare di sedimenti, refluito degli stessi in ambienti conterminati (vasche di colmata (CDF)) e la risospensione di sedimenti in aree sottoposte a dragaggio.

Nella preparazione degli elutriati, la metodica comunemente utilizzata fa riferimento al protocollo ASTM E1391 (2000), il quale prevede la miscelazione di una parte di sedimento e quattro volumi di acqua. Tuttavia, sotto la spinta di una serie di programmi di ricerca inerenti le attività di dragaggio e la gestione dei materiali dragati, nel rispetto delle indicazioni fornite dalla Marine Protection Research and Sanctuaries Act (Ocean Dumping Act) e la Clean Water Act del 1972 (CWA), l'U.S. Army Corp of Engineers (USACE) ha sviluppato numerosi protocolli di preparazione degli elutriati, che prevedono l'impiego di differenti rapporti tra acqua e sedimento, al fine di simulare al meglio le condizioni ambientali che si verificano durante le differenti attività di movimentazione dei sedimenti.

A livello internazionale non esiste una metodica universalmente riconosciuta ed accettata nella preparazione degli elutriati. A riguardo, la letteratura scientifica ha prodotto in questi anni numerosi articoli e persino in Italia, il DM 173/2016, recante le modalità e i criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali

marini, non fornisce alcuna indicazione in merito alla metodica da utilizzare nella preparazione degli elutriati, indicando un generico rapporto acqua/sedimento per la preparazione degli stessi di 1:4 (p/v).

Le diverse metodiche di preparazione degli elutriati possono condurre a risultati e ad opzioni di gestione differenti dei sedimenti analizzati; per questo, all'interno del progetto Interreg SEDRI-PORT, e nell'ambito della valutazione degli effetti ecotossicologici legati alla risospensione dei sedimenti, sono stati testati, mediante il saggio di sviluppo embrionale con il riccio di mare *P. lividus*, gli elutriati dei sedimenti prelevati all'interno dei porti di Olbia, Cagliari, La Spezia e Tolone, preparati sia in accordo con il protocollo ASTM, sia sulla base di quanto riportato nel protocollo per il *dredging elutriate test*, sviluppato da USACE, per valutare il grado dei contaminanti rilasciati dal sedimento nella colonna d'acqua nell'area di dragaggio.

I risultati del saggio di embriotossicità hanno evidenziato criticità differenti a seconda del protocollo di preparazione degli elutriati impiegato (ASTM o USACE). Per i porti di Tolone e La Spezia, i risultati ottenuti, seppur confrontabili tra di loro, hanno evidenziato le seguenti differenze: la stazione *Suffren* (Tolone), ha rivelato una maggiore tossicità ( $p < 0.01$ ) con gli elutriati preparati secondo il protocollo USACE. Nella stazione *MF4* (La Spezia), invece, sono risultati più tossici gli elutriati preparati con il protocollo ASTM. Per il porto di Olbia, in linea generale, gli elutriati preparati secondo la metodica USACE hanno mostrato una tossicità più elevata (percentuale di plutei malformati significativamente ( $p < 0,01$ ) più alta) rispetto ai saggi condotti sugli elutriati ASTM; al contrario, per il porto di Cagliari, la tossicità è risultata maggiore per i test condotti sugli elutriati preparati con il protocollo ASTM.

Considerate la differente tossicità riscontrata in elutriati preparati con i protocolli ASTM o USACE, è stato preso in esame una ulteriore variabile: il tempo di agitazione della miscela acqua/sedimento. Sulla base di quanto già riportato, dal gruppo di lavoro del MIO dell'università di Tolone, sulla diversa cinetica dei contaminanti metallici in sospensione, gli elutriati dei sedimenti prelevati nei porti indagati, sono stati preparati aumentando il tempo di agitazione della miscela acqua/ sedimento a 3 e 24 ore. Aumentando il tempo di miscelazione/aereazione tra acqua e sedimento a 3 ore, il protocollo ASTM ha evidenziato le criticità maggiori seppur con alcune eccezioni, quali la stazione *P1* nel porto di Olbia e la stazione *Molo Rinascita* nel Porto di Cagliari, dove le percentuali di plutei malformati sono risultate significativamente più alte per i saggi condotti sugli elutriati preparati sulla base del protocollo USACE .

Portando il tempo di miscelazione/aereazione fino a 24h, gli elutriati preparati secondo la metodica ASTM, ad eccezione delle prove condotte sui sedimenti prelevati nel Porto di Olbia, hanno mostrato una maggiore tossicità.

Anche se con sfumature differenti, entrambe le metodiche hanno evidenziato che i sedimenti prelevati nel Porto di Cagliari sono quelli che presentano le criticità maggiori. Se per il Porto di La Spezia, gli elutriati preparati in accordo con il protocollo ASTM sono stati i soli ad evidenziare effetti tossici, al contrario, per il porto di Olbia, sono stati gli elutriati preparati secondo la metodica USACE a mostrare una tossicità rilevante.

La tossicità rilevata nel porto di Olbia, a fronte di una contaminazione da metalli pesanti non particolarmente elevata, potrebbe essere dovuta, oltre che alla presenza di contaminanti non analizzati durante la caratterizzazione chimica dei sedimenti, alla diversa

rimobilizzazione dei contaminanti ottenuta con le diverse tecniche di preparazione degli elutriati. Inoltre, la presenza nei sedimenti di confounding factors, quali i composti dello Zolfo ( $H_2S$ ) o dell'ammonio ( $NH_3$ ), che si originano dalla degradazione della sostanza organica correlata alla presenza di impianti di mitilicoltura all'interno del Golfo di Olbia, può essere una delle cause nelle quali ricercare l'elevata tossicità di questi sedimenti.

In linea generale, i risultati del saggio di sviluppo embrionale con *P. lividus* hanno evidenziato un aumento della tossicità correlata con l'aumento del tempo di miscelazione tra acqua e sedimento nella preparazione degli elutriati, sia per il protocollo ASTM, sia per quello USACE. E' lecito ipotizzare a riguardo, una maggiore capacità di estrazione di composti idrofilici, nella fase acquosa, all'aumentare del tempo di contatto tra acqua e sedimento. Il variare della tossicità in funzione del tempo può essere legata alla differente cinetica dei metalli in traccia che migrano dal sedimento alla fase acquosa (Dang et al. 2020), o con i sinergismi che si possono instaurare tra alcuni metalli pesanti (quali Hg, Pb e Cu), i cui effetti si manifestano sullo sviluppo larvale di *P. lividus* come riportato da Fernandez and Beiras (2001).

La discordanza dei risultati ottenuti con i due protocolli di preparazione degli elutriati può essere legata alle differenti condizioni chimico fisiche che si possono instaurare durante la preparazione degli elutriati. L'aerazione della miscela acqua sedimento, prevista dalla metodica USACE, e volta a creare un ambiente ossidante nel sovrantante durante la fase sedimentazione degli elutriati (USACE 2003), può influenzare la mobilità dei metalli, specialmente se presenti nel sedimento sotto forma di solfuri, che diventano altamente instabili e quindi solubili in ambienti ossidanti (Moore et al. 1990)

Per evitare differenti interpretazioni dei risultati ottenuti nella valutazione della qualità ecotossicologica di sedimenti marini sottoposti a movimentazione è necessario in futuro arrivare ad una uniformazione e standardizzazione delle metodiche di preparazione delle matrici da analizzare, non solo per rendere confrontabili tra di loro i risultati ottenuti da aree diverse e in tempi diversi, ma soprattutto per una migliore gestione dei sedimenti, che non vada a pregiudicare la qualità dell'ambiente marino, laddove siano presenti ecosistemi di particolare pregio e valore naturalistico e attività produttive, quali gli impianti di acquacoltura, il cui danneggiamento può andare a creare un rischio per la salute umana.

## L'ESECUZIONE DEI SAGGI *IN SITU* IN ALTERNATIVA ALL'ESECUZIONE DEI TEST IN CONDIZIONI CONTROLLATE DI LABORATORIO

I saggi biologici sono tra le tecniche più utilizzate per valutare la tossicità di matrici ambientali. Tuttavia, i saggi presentano numerose limitazioni evidenziate da numerosi articoli scientifici. Tra gli svantaggi, la questione più dibattuta, riguarda la mancanza di affidabilità nello spiegare effetti sito-specifici; infatti non vengono presi in esame parametri ambientali come luce, temperatura, salinità, pH, solidi sospesi, idrodinamismo, ecc., che possono presentare variazioni significative, nel tempo, all'interno dello stesso sito di studio. Questi parametri possono interagire con i contaminanti presenti, dando luogo a effetti sinergici che possono influenzare la risposta biologica degli organismi alla tossicità e, inoltre, la manipolazione dei campioni ambientali, nelle fasi immediatamente precedenti l'esecuzione dei test, possono comportare un'alterazione della biodisponibilità delle sostanze tossiche stesse. Al fine di ovviare a questi problemi, è possibile monitorare i contaminanti presenti nell'ecosistema indagato mediante un'esposizione *in situ* degli organismi, consentendo di integrare nel tempo gli effetti della presenza di contaminanti e delle loro interazioni con altri fattori ambientali. Il vantaggio di questa metodologia è quello di permettere un'interpretazione più realistica della contaminazione dell'ecosistema oggetto di studio. Tuttavia, la maggiore complessità e i costi più alti, rendono spesso difficoltoso compiere esperimenti con un numero adeguato di repliche.

Nell'ambito di questo progetto, il saggio di embriotossicità con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* è stato eseguito sia in condizioni controllate di laboratorio sia esponendo gli embrioni direttamente in 4 stazioni nella baia di Tolone: Lazaret, Tour Royale, Corsica e Suffren. Per consentire l'esposizione nella colonna d'acqua degli embrioni di *P. lividus* è stata appositamente costruita una "sonda biologica" (Fig. 1).

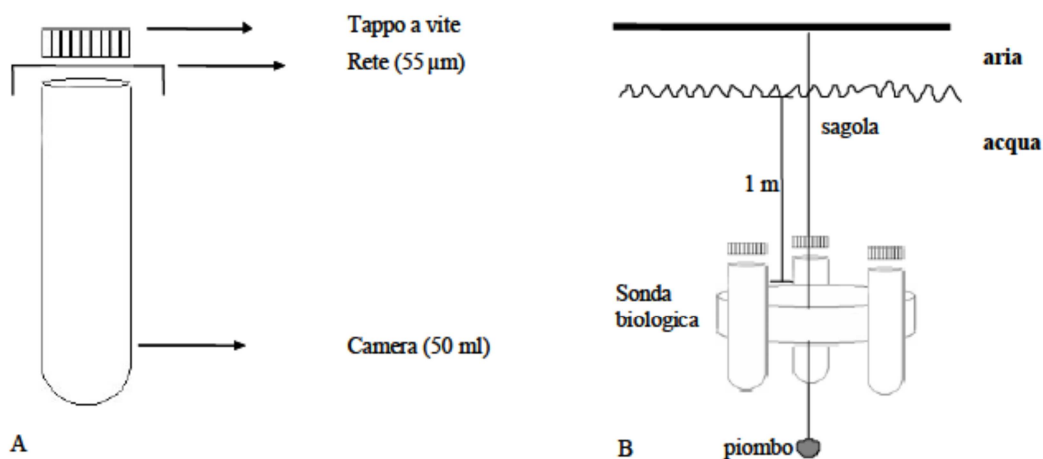


Fig. 1 – Sonda biologica: camera d'esposizione (A) e posizione in mare della sonda biologica (B).

La sonda così realizzata è stata collegata ad una boa appositamente posizionata nella stazione oggetto di studio e mantenuta ad un metro di profondità (Fig. 1B).

I test condotti in laboratorio non hanno evidenziato particolari criticità, ad eccezione della stazione Suffren situata all'interno del Porto di Tolone. I test condotti *in situ* hanno evidenziato una bassa tossicità per le stazioni Lazaret e Tour Royale; nelle stazioni Corsica e Suffren la percentuale di plutei malformati è risultata estremamente alta. Per la stazione Suffren, oltre alla probabile presenza di contaminanti disciolti nella colonna d'acqua (come evidenziato dai test condotti in laboratorio), la totale assenza di larve ben sviluppate è dovuta alla concomitante presenza nell'area indagata di ciliati, come evidenziato nelle successive analisi in laboratorio.

I saggi *in situ* hanno mostrato maggiore sensibilità ai contaminanti presenti nella colonna d'acqua, fornendo una stima della tossicità integrata nel tempo. Tuttavia, il risultato ottenuto nella stazione Suffren ha evidenziato la fragilità dell'applicazione di questo tipo di test. I risultati ottenuti richiederanno, in futuro, ulteriori approfondimenti per una migliore e più corretta interpretazione.

---

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Nel progetto SE.D.RI.PORT. il consorzio scientifico ha utilizzato campioni naturali rappresentativi della diversità dei contesti portuali, ha studiato contaminanti storici ma ancora problematici, organismi marini essenziali per il funzionamento naturale dell'ecosistema o un organismo modello che rappresenta anche una risorsa dell'acquacoltura. Sono stati utilizzati approcci innovativi per monitorare le operazioni di dragaggio, simulare la risospensione dei sedimenti, studiare i processi e le alterazioni generate dalla rimobilizzazione dei sedimenti, e migliorare le procedure di valutazione del rischio tossico per gli organismi marini.

Questo lavoro ha dimostrato che il rischio associato alla dispersione delle particelle non dovrebbe essere l'unico da considerare, che le pratiche di gestione richiedono adeguamenti relativi alle specificità del sito e ai contaminanti chimici che destano preoccupazione in un determinato sito, e che è necessario uno sforzo per standardizzare i metodi di valutazione della tossicità dei sedimenti.

Nella continuità di questo progetto, sembra rilevante aumentare lo sforzo di ricerca sull'impatto di attività più modeste ma più frequenti, come il traffico marittimo e le manovre delle grandi navi, o il livellamento dei fondali portuali, oltre a continuare lo sforzo mirato sulle attività di dragaggio. Sembra necessario completare l'approccio sperimentale sul trasferimento dei contaminanti metallici per estenderlo ad altri contaminanti e avvicinarsi all'intermittenza della risospensione che avviene *in situ*. Per valutare meglio l'influenza sugli organismi viventi, si deve tener conto delle risposte microbiche funzionali (biogeochimica, patogenicità, degradazione dei contaminanti chimici) migliorando l'approccio sperimentale per avvicinarsi all'intermittenza delle operazioni *in situ*. Infine, sembra opportuno promuovere approcci multidisciplinari, ad esempio per ottimizzare i test di tossicità in funzione del trasferimento di contaminanti chimici e dello sviluppo di patogeni microbici in seguito alla risospensione dei sedimenti. Seguendo queste diverse prospettive, alla fine si otterrà una comprensione migliore degli impatti delle attività portuali che portano alla risospensione dei sedimenti e si faciliterà l'ottimizzazione della gestione di queste attività.

## BIBLIOGRAFIA

- ASTM. (2000). E 1391–94 Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing. In: 2000 ASTM Standards on Environmental Sampling, Vol. 11.05 (pp. 768–788) Conshohocken, PA.
- Dang DH, Layglon N., Ferretto N., Omanovic D., Mullot JU, Lenoble V., Mounier S., Garnier C. 2020. Kinetic processes of copper and lead remobilization during sediment resuspension of marine polluted sediments. *Science of the Total Environment* 698, 134120. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134120.
- Fernandez N. and Beiras R., 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology* 10: 263–271.
- Moore T.J., Hartwig R.C., Loeppert R.H., 1990. Steady-state procedure for determining the effective particle-size distribution of soil carbonates. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54, 559.
- USACE, 2003. Evaluation of dredged material proposed for disposal at island, nearshore, or upland confined disposal facilities - Testing Manual," Technical Report ERDC/EL TR-03-1, U.S. Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS.



## **PROGETTO SE.D.RI.PORT**

ATTIVITÀ T2.3: Raccolta ed implementazione dei dati relativi alla qualità ambientale dei sedimenti di accumulo e delle possibili aree di destinazione dei materiali dragati nei porti oggetto di studio – Caratterizzazioni

PRODOTTO T2.3.7: Report del monitoraggio degli effetti del lockdown sulla qualità delle acque portuali e cartografia GIS

Partner responsabile: ISPRA Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale

Partner contributori: Autorità di Sistema Portuale del Mare di Sardegna, Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale, ARPAL

in collaborazione con



## **PROGETTO GEREMIA**

ATTIVITÀ T.2: Definizione e applicazione dei piani di monitoraggio dei bacini

PRODOTTO T2.2.3: Report del monitoraggio degli effetti del lockdown sulla qualità delle acque portuali e cartografia GIS

Partner responsabile: ISPRA Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale

Soggetto attuatore: ARPAL

**La cooperazione al cuore del Mediterraneo**  
**La coopération au cœur de la Méditerranée**



### **Autori SE.D.RI.PORT**

<b>Nome</b>	<b>Partner</b>	<b>Progetto</b>
Simona Macchia	ISPRA	SE.D.RI.PORT
Davide Sartori	ISPRA	SE.D.RI.PORT

### **Autori GEREMIA**

<b>Nome</b>	<b>Partner</b>	<b>Progetto</b>
Maria Elena Piccione	ISPRA	GEREMIA
Margherita Secci	ISPRA	GEREMIA
Valentina Vitiello	ISPRA	GEREMIA

### **Coordinatori**

<b>Nome</b>	<b>Partner</b>	<b>Progetto</b>
Simona Macchia	ISPRA	SE.D.RI.PORT
Maria Elena Piccione	ISPRA	GEREMIA

*Si ringraziano per la preziosa collaborazione nelle operazioni di prelievo e invio dei mitili da Olbia presso la sede ISPRA di Livorno Dott. Roberto Bertuccelli dell'Autorità Portuale del Mare di Sardegna ed il Sig. Gianpiero Mariani della Cooperativa Olbia Mitili e la Coop Mitilicoltori Spezzini Srl per il prelievo dei mitili dagli impianti presenti internamente ed esternamente alla rada di La Spezia.*

*Si ringraziano inoltre la Dott.ssa Alice Scuderi, il Dott. Stefano Ferrari di ISPRA ed i colleghi di ARPAL per aver rispettato i tempi di consegna dei risultati delle analisi chimiche in un momento molto complicato per l'organizzazione del lavoro nei laboratori.*

## INDICE

1.	Introduzione .....	4
2.	Area di studio e campagne di monitoraggio .....	6
3.	Materiali e metodi .....	10
3.1	Trapianto, prelievo e preparazione dei campioni di mitili .....	10
3.2	Analisi di bioaccumulo .....	11
3.2.1	Calcolo della percentuale di umidità .....	11
3.2.2	Analisi dei metalli e degli elementi in traccia .....	11
3.2.3	Analisi degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) .....	12
3.2.4	Analisi dei Policlorobifenili (PCB) .....	13
3.2.5	Analisi dei pesticidi organoclorurati .....	14
3.2.6	Analisi del tributilstagno (TBT) .....	15
4.	RISULTATI .....	17
4.1	La Spezia .....	17
4.1.1	Umidità .....	17
4.1.2	Bioaccumulo di metalli ed elementi in traccia .....	17
4.1.3	Bioaccumulo di Idrocarburi Policiclici Aromatici .....	29
4.1.4	Bioaccumulo di PCB .....	35
4.1.5	Bioaccumulo di pesticidi organoclorurati .....	39
4.1.6	Bioaccumulo di TBT .....	39
4.2	Olbia .....	40
4.2.1	Umidità .....	40
4.2.2	Bioaccumulo di metalli ed elementi in traccia .....	40
4.2.3	Bioaccumulo di Idrocarburi Policiclici Aromatici .....	51
4.2.4	Bioaccumulo di PCB .....	53
4.2.5	Bioaccumulo di pesticidi organoclorurati .....	56
4.2.6	Bioaccumulo di TBT .....	56
5.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....	57
6.	BIBLIOGRAFIA .....	61

## 1. INTRODUZIONE

All'inizio di marzo 2020, per contenere il propagarsi del contagio da coronavirus Sars-COVID-19, l'Italia entra nella fase di lockdown: le attività economiche non essenziali vengono interrotte e la popolazione è invitata a rimanere in casa. Con qualche settimana di ritardo rispetto all'Italia, anche la Francia adotterà le stesse misure.

Durante il lockdown ha preso avvio un involontario esperimento unico nel suo genere e senza precedenti dal dopoguerra: la drastica riduzione dell'impatto antropico sull'ambiente, incluso il sistema marino-costiero, soprattutto nelle aree dei grandi agglomerati urbani ed industriali.

I ricercatori di tutto il mondo si sono interrogati su quali effetti questa situazione eccezionale potesse avere sulla qualità delle acque, sull'ecosistema marino e sull'inquinamento.

A livello europeo e italiano sono partiti diversi progetti finalizzati a quantificare la potenziale riduzione dell'impatto antropico conseguente al lockdown sul sistema marino-costiero in aree ad elevata densità urbana. Anche a livello istituzionale sono state intraprese campagne straordinarie di monitoraggio per fotografare gli effetti del lockdown. Su invito del MATTM, il Sistema Nazionale di Protezione dell'Ambiente (SNPA) in collaborazione con il Comando Generale del Corpo delle Capitanerie, da aprile a giugno 2020, ha effettuato un'intensa attività di indagini in mare, prelievi ed analisi, con l'obiettivo di concorrere a realizzare un monitoraggio "straordinario" rispetto a quelli condotti dalle Agenzie per rispondere agli obblighi derivanti dalle Direttive comunitarie, quali in particolare la Direttiva Quadro sulle Acque, la Direttiva Balneazione e la Direttiva Quadro per la Strategia Marina.

Il Programma Interreg Italia-Francia Marittimo, per sopperire alle difficoltà incontrate dai progetti per il completamento delle attività in corso, ha dato la possibilità di rivedere, nei contenuti e nei tempi, il piano delle attività, chiedendo ai partner dei progetti di ripensare le attività nell'ottica di dare una risposta alle criticità emerse in seguito all'emergenza sanitaria legata al COVID-19.

Il progetto SE.D.RI.PORT, finanziato sul primo avviso del Progetto Interreg Marittimo Italia-Francia 2014-2020, occupandosi di dragaggi nelle aree portuali, ha realizzato diverse attività per valutare gli impatti e i rischi all'interno dei porti. Il progetto GEREMIA è stato finanziato sul secondo avviso con l'obiettivo di individuare un indice per valutare la qualità degli ambienti portuali e definire strumenti di governance per la prevenzione ed il contenimento dell'inquinamento delle acque.

In considerazione del tema comune ai due progetti, inerente alla valutazione dei rischi e della qualità degli ambienti portuali, la domanda che i progetti si sono posti davanti a questa

situazione straordinaria è stata: *“Quali sono gli effetti della drastica riduzione delle attività antropiche sulla qualità delle acque dei siti pilota del progetto?”*. Poiché entrambi i progetti hanno attuato sistemi di monitoraggio basati sull'utilizzo di differenti bioindicatori, si è stabilito di valutare i possibili effetti della riduzione del traffico marittimo durante il lockdown, effettuando campagne di Mussel Watch nei siti pilota comuni ai due progetti (Olbia e La Spezia).

## 2. AREA DI STUDIO E CAMPAGNE DI MONITORAGGIO

A seguito del lockdown imposto dall'emergenza epidemiologica tuttora in atto dovuta al COVID-19, ISPRA, in accordo con gli altri partner dei progetti SE.D.RI.PORT e GEREMIA, ha effettuato tre campagne di monitoraggio aggiuntive nei siti di La Spezia e di Olbia, finalizzate a valutare, tramite prove di bioaccumulo, gli eventuali effetti dovuti alla drastica riduzione del traffico navale durante il periodo di lockdown.

Le campagne sono state eseguite, per entrambi i siti, tra la fine del mese di maggio e la fine del mese di luglio 2020 e comparate con una campagna precedente realizzata nella medesima stagione per un confronto più attendibile dei risultati.

Per La Spezia è stata scelta come campagna di riferimento quella avvenuta nel mese di aprile 2019, nel caso di Olbia invece è stata selezionata la campagna condotta nel mese di luglio 2018 (Prodotto T2.3.5. SEDRIPORT; UNICA-ISPRA-UNTLN 2020).

### Sito pilota di La Spezia

L'area marina della rada di La Spezia si estende da punta Pezzino a ponente, a Punta Calandrello a levante, su una superficie di circa 1564 ettari, delimitata a sud-est da una diga foranea, di circa 2,8 Km. La profondità media della rada è di circa 10 metri, con un canale di accesso per il passaggio delle navi di profondità media di 15 m ed una profondità massima intorno ai 17 m. L'intera area marina è interessata da una importante antropizzazione legata alla presenza di diverse attività, come la presenza di un porto commerciale adibito a traffico mercantile e passeggeri, diversi porti turistici, un Arsenale Militare, aree interessate da cantieristica navale, aree interessate da attività di carico e scarico (gasdotto, etc.) ed impianti di mitilicoltura ed itticoltura. All'interno della rada confluiscono inoltre numerosi scarichi sia industriali che civili. Nell'area a terra sono presenti numerose attività di tipo commerciale e industriale, con impianti attivi (centrale termoelettrica ENEL, etc.) o dismessi (ex fonderia di Piombo Pertusola, etc.), attività di cantieristica navale, presidi militari ed impianti di gestione rifiuti, tra cui aree dismesse, che in passato sono state sede di impianti di smaltimento, ed aree utilizzate in maniera discontinua come discariche. Le attività che hanno insistito ed insistono sull'area sono responsabili di una contaminazione diffusa dei fondali marini (Prodotto T1.6.6. SEDRIPORT; ARPAL-ISPRA 2019).

Per ciascuna campagna di monitoraggio post lockdown (maggio, giugno e luglio 2020), grazie alla collaborazione con la Cooperativa Mitilicoltori Spezzini A.r.l. di Lerici, è stato effettuato il prelievo dei mitili direttamente dai filari, in tre diverse aree (MT05, MT06 e MT07). La scelta di prelevare i mitili direttamente dagli impianti è stata determinata dalla necessità di disporre subito dopo la fine del lockdown di esemplari da analizzare, senza

doverli trapiantare.

In **Errore**. L'origine riferimento non è stata trovata. è riportata l'ubicazione delle stazioni di monitoraggio pregresse (in verde) e delle stazioni eseguite nel corso delle tre campagne post lockdown (in giallo).



Figura 1 - Stazioni di prelievo dei mitili nella Rada di La Spezia per le campagne di monitoraggio pre (in verde) e post lockdown (in giallo)

In Tabella 1 sono riportate le coordinate delle stazioni di prelievo dei mitili.

Tabella 1 - Coordinate geografiche delle stazioni di La Spezia in cui è stato eseguito il Mussel Watch

Campagna	Codice stazione	Longitudine	Latitudine
Pre lockdown	MT-01	9.845780	44.104638
	MT-02	9.840331	44.103593
	MT-03	9.824972	44.083152
	MT-04	9.881586	44.081907
Post lockdown	MT-05	9.857999	44.071822
	MT-06	9.872758	44.078254
	MT-07	9.877725	44.077077

### Sito pilota di Olbia

Il Golfo di Olbia è situato sulla costa orientale della Sardegna. Le pressioni antropiche più evidenti in questo corpo idrico sono la presenza del porto di Olbia, il potenziale apporto di contaminanti provenienti dal fiume Padrongianus (15 km) nella parte meridionale e gli impianti di acquacoltura, che rappresentano la più grande area di allevamento di cozze e vongole della Sardegna. Il porto di Olbia, primo in Sardegna per traffico passeggeri e per merci ro-ro, rappresenta uno dei più importanti scali passeggeri del Mediterraneo, con quattro milioni di presenze ogni anno ed è anche un importante scalo commerciale, con quasi sei milioni di tonnellate di merci (Prodotto 2.3.6 SEDRIPO, UNICA-UNTLN-ISPRA 2020).

Analogamente a quanto avvenuto a La Spezia, per il sito di Olbia, sono state effettuate tre campagne di monitoraggio post lockdown, durante le quali sono stati prelevati i mitili direttamente dai filari. Per questo sito sono state mantenute le stesse stazioni di campionamento utilizzate nella campagna precedente al lockdown (Figura 2).

Il prelievo dei mitili nelle stazioni MT-01, MT-02 e MT-03 (Tabella 2) e la spedizione presso i laboratori di ISPRA sono stati possibili grazie al supporto della Cooperativa Olbia Mitili e dell'Autorità Portuale del Mare di Sardegna (Olbia).

Tabella 2 - Coordinate geografiche delle stazioni di Olbia in cui è stato eseguito il Mussel Watch

Codice stazione	Longitudine	Latitudine
MT-01	9.531496	40.925851
MT-02	9.540648	40.919371
MT-03	9.561134	40.923329



Figura 2 - Stazioni di prelievo dei mitili nel golfo di Olbia per le campagne di monitoraggio pre e post lockdown



### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Trapianto, prelievo e preparazione dei campioni di mitili**

Per entrambi i siti di La Spezia e di Olbia, nella campagna pre lockdown selezionata come riferimento (La Spezia campagna di aprile 2019, Olbia campagna di luglio 2018), il monitoraggio è stato effettuato trapiantando gli organismi nei siti prestabiliti. I mitili sono stati acquistati rispettivamente dalle Cooperative Mitilicoltori di La Spezia e di Olbia e traslocati, senza alcuna stabulazione, per un periodo di circa 4 settimane nelle aree da monitorare.

Sono stati trapiantati circa 200-300 individui di taglia omogenea (5-7 cm), approssimativamente compresa tra il 70 ed il 90% delle dimensioni massime della popolazione da cui sono stati raccolti. Il trapianto è stato effettuato mantenendo gli organismi in reti di nylon o strutture plastiche fissate nella stazione da monitorare, ad una profondità compresa tra 1 e 5 m e ad almeno un metro dal fondo.

Nelle campagne post lockdown i mitili sono stati prelevati direttamente dagli impianti di allevamento ad intervalli di circa 4 settimane, senza il trapianto preventivo. Questa modalità di indagine si è resa necessaria per avere immediatamente a disposizione mitili che stazionavano negli impianti da almeno 1 mese e mezzo, periodo corrispondente alla fase di lockdown.

Le campagne post lockdown nel sito di La Spezia sono state eseguite rispettivamente il 25 maggio, 22 giugno e 20 luglio 2020, mentre quelle di Olbia nei giorni 3 giugno, 24 giugno e 17 luglio 2020. Poiché tra la fine di maggio e l'inizio di giugno 2020 le attività portuali non erano ancora riprese in maniera regolare, si presuppone che la campagna del 25 maggio a La Spezia e quella del 3 giugno a Olbia siano quelle che hanno risentito in misura maggiore del blocco dei traffici.

Sia nel caso delle campagne pregresse prese come riferimento, sia per le campagne post lockdown, i mitili recuperati, sono stati mantenuti refrigerati a circa 4°C in ambiente umido (ma non immersi in acqua) e trasferiti presso i laboratori deputati alle analisi entro 24 ore dal prelievo. Presso i laboratori ISPRA sono state eseguite le analisi dei metalli e dei composti in tracce, mentre ARPAL si è occupata delle analisi di IPA, PCB, TBT e pesticidi organoclorurati.

Presso i laboratori i mitili sono stati aperti per il prelievo dei tessuti molli che, dopo essere stati lavati con acqua deionizzata (MilliQ), sono stati congelati a -20°C fino al momento dell'analisi.

Nel laboratorio di ISPRA, per ciascuna stazione di prelievo sono stati preparati 3 pool, ciascuno costituito generalmente dalle parti intere molli di circa 10 organismi, più 1 pool da

mantenere come riserva. Le quantità necessarie ad ARPAL, considerato il maggior numero di analisi da effettuare, sono state pari ad 8 pool.

## **3.2 Analisi di bioaccumulo**

### **3.2.1 Calcolo della percentuale di umidità**

Il metodo di determinazione dell'umidità del campione usato è quello riportato nei "Rapporti ISTISAN 96/34" (Metodo D).

Il contenuto di umidità del campione, viene espresso in percentuale, e calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Umidità (g / 100 g)} = (E - m) \times 100 / E$$

dove:

*E* = massa iniziale in grammi del campione

*m* = massa in grammi del campione secco.

### **3.2.2 Analisi dei metalli e degli elementi in traccia**

Per quanto riguarda le analisi del bioaccumulo di metalli nei mitili, la mineralizzazione del campione è stata effettuata su aliquote di circa 0.3-0.4 g di sostanza preventivamente seccata in stufa a 50°C fino al raggiungimento di un peso costante. I tessuti molli dei mitili sono stati successivamente polverizzati in mortaio, pesati con bilancia (avente risoluzione al decimo di mg), direttamente nel recipiente in teflon in cui avviene la mineralizzazione.

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

I metalli in traccia determinati sui tessuti molli di *Mytilus galloprovincialis* sono stati As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn. Le analisi sono state condotte mediante l'impiego di Spettrofotometria ad Emissione Ottica (Agilent AX Sequential ICP-OES 720). Per il mercurio le analisi sono state condotte mediante l'utilizzo di Spettroscopia ad Assorbimento Atomico (metodo dei Vapori Freddi; Cetac M-7600).

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

In Tabella 3 si riportano le percentuali di recupero degli elementi in traccia con relativo Limite di Quantificazione (LoQ) per ciascun elemento analizzato espresso in mg/kg.

Tabella 3 - Percentuale di recupero e limite di quantificazione (mg/kg) dei metalli e degli elementi in traccia

		% REC							
		As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
LA SPEZIA	PRE LD	106	105	103	99	123	96	98	106
	I POST LD	104	89	93	115	95	98	92	99
	II POST LD	112	106	114	99	89	113	114	97
	III POST LD	107	106	107	101	111	116	99	94
OLBIA	PRE LD	100	113	86	97	100	85	104	101
	I POST LD	104	93	115	89	95	98	92	99
	II POST LD	112	106	114	99	89	113	114	97
	III POST LD	107	106	107	101	111	116	121	94
LOQ		0.025	0.025	0.025	0.025	0.001	0.01	0.025	0.05

### 3.2.3 Analisi degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Ai fini della determinazione nella matrice biota dei 16 Idrocarburi policiclici Aromatici (IPA) definiti Inquinanti Prioritari dall'agenzia americana EPA (Environmental Protection Agency, US-EPA), si procede secondo il metodo QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe). Gli IPA misurati sono stati i seguenti: Acenaftene, Acenaftilene, Antracene, Benzo(a)antracene, Benzo(a)pirene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(g,h,i)perilene, Benzo(k)fluorantene, Crisene, Dibenzo(a,h)antracene, Fenantrene, Fluorantene, Fluorene, Indeno(1,2,3-c,d)pirene, Naftalene, Pirene, Sommatoria IPA.

Si trasferiscono 10 g di campione umido omogeneizzato in una provetta monouso da 50 ml, unendo una barretta di ceramica per rompere gli agglomerati e mantenere omogeneo il campione. Si aggiungono, quindi 12 ml di acetonitrile e si pone la provetta su un agitatore orizzontale per 15 minuti. Si aggiungono 6 g MgSO<sub>4</sub> e 1.5 g di NaCl, si agita per 1 minuto e si procede a centrifugare per 10 minuti a 5000 giri. Per la procedura di estrazione in fase solida dispersiva (d-SPE, dispersive solid phase extraction), si trasferiscono 4 ml del surnatante (acetonitrile) in provetta monouso da 15 ml contenente 400 mg di PSA, 400 mg di C18 end capped, 1200 mg MgSO<sub>4</sub>, si agita per 1 minuto e si centrifuga 10 minuti per 3200 giri. Circa 1.5 ml del surnatante purificato viene filtrato su membrane in PVDF con porosità 0.45 µm e trasferito in vial di vetro. A questo punto si procede con l'analisi strumentale in cromatografia liquida ad ultra-prestazione con rivelatore a fluorescenza (UPLC/FLD Waters Acquity). La determinazione viene condotta, quindi, in HPLC/FLD con taratura a cinque punti da 0.1 ng/ml a 100 ng/ml (corrispondenti a 0.12 e 120 µg/kg p.u. nel campione di biota).

Il materiale di riferimento certificato utilizzato per la preparazione degli standard di calibrazione è stato il *Dr Ehrenstorfer DRE-L20950045AL*, 18 analiti a 10.0 µg/mL in acetonitrile. Il LOQ per i singoli IPA nel biota è 0.2 µg/Kg.

### **3.2.4 Analisi dei Policlorobifenili (PCB)**

Il metodo di riferimento per la determinazione dei PCB è il metodo EPA 1668C 2010. I PCB misurati sono stati i seguenti: PCB 101, PCB 118, PCB 126, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180, PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, Sommatoria PCB (28+52+77+81+101+118+126+138+ 153+156+169+180).

Il metodo è basato sull'utilizzo della gas cromatografia ad alta risoluzione abbinata alla spettrometria ad alta risoluzione (HRGC/HRMS) per la separazione, l'identificazione e la quantificazione, mediante diluizione isotopica dei PCB, in particolare è applicato alla determinazione dei 12 congeneri diossina-simili (77, 81, 105, 114, 118, 123, 125, 156, 157, 167, 169, 189) e dei 6 congeneri dei PCB indicatori (28, 52, 101, 138, 153, 180) in matrici di varia natura, compreso il biota. Per diluizione isotopica si intende la tecnica di calcolo dei congeneri d'interesse nativi rispetto ai loro analoghi marcati C13.

La procedura di analisi si articola in diverse fasi: preparazione dell'aliquota e aggiunta di standard marcati, estrazione della parte lipidica, purificazione, evaporazione degli estratti e trasferimento in vial di iniezione, analisi strumentale. L'analisi dei campioni è abbinata da un bianco procedurale che deve seguire le stesse procedure a cui sono sottoposti i campioni. I risultati della determinazione del bianco vengono utilizzati per correggere le misure dei campioni o per rilevare errori dovuti all'interferenza di contaminanti presenti nei reagenti. La preparazione prevede che il campione da analizzare sia liofilizzato prima di essere estratto, per eliminare l'umidità ed aumentare l'efficienza dell'estrazione. Viene pesata un'aliquota di campione omogeneizzato alla quale viene aggiunta la quantità nota dello standard di estrazione contenente i congeneri marcati ed essa viene sottoposta alla liofilizzazione. Il campione liofilizzato viene trasferito in una cella per l'estrazione con solvente mediante l'ASE200 (accelerated solvent extractor) DIONEX. L'estratto ottenuto viene filtrato su solfato di sodio anidro in un pallone da rotavapor, il solvente concentrato a pochi millilitri e portato successivamente a secco sotto il flusso dell'azoto per cambio solvente per proseguire con la fase di purificazione.

La purificazione prevede due trattamenti: distruzione della matrice organica/lipidica mediante colonna multistrato, di cui componente principale è la celite impregnata da acido solforico concentrato che agisce da agente che "brucia" la matrice e purificazione su sistema di colonnine di silice e di allumina ai fini di eliminare/separare l'analita d'interesse da sostanze interferenti. Prima di iniziare il trattamento di purificazione all'estratto viene aggiunto lo standard marcato di cleanup, per poter valutare eventuali perdite di analiti in questa fase. Nella fase finale l'estratto purificato viene microconcentrato: dopo la purificazione il solvente del campione viene evaporato su rotavapor a pochi ml, trasferito

nella vial e portato a secco con il flusso di azoto. Prima dell'iniezione viene aggiunto lo standard di siringa e il campione viene iniettato nel sistema HRGC/HRMS.

I limiti di quantificazione sono calcolati automaticamente per ogni congenere da software di quantificazione in considerazione del peso e del volume di ciascun campione, e in considerazione dell'effetto matrice (l'algoritmo di calcolo si basa su segnale/rumore); quindi i limiti di quantificazione sono diversi per ogni campione e sono riportati nel rapporto di prova.

Per aliquota di controllo qualità viene analizzato un bianco con l'aggiunta dei congeneri nativi, prova OPR (ongoing precision&recovery), il cui risultati vengono confrontati con i requisiti del metodo EPA1668C (QC Acceptance criteria, tabella 6); nella prova sono compresi solo congeneri diossina-simili (77, 81, 118, 126, 156, 169); per quanto riguarda congeneri marker (28, 52, 101, 138, 153, 180) la loro valutazione è tenuta sotto controllo mediante partecipazione al PT europeo su alimenti, che viene eseguito 2 volte all'anno.

### **3.2.5 Analisi dei pesticidi organoclorurati**

Il metodo di riferimento per la determinazione dei Pesticidi è il metodo UNI EN 15662:2009.

I Pesticidi misurati sono stati i seguenti: Aldrin, Dieldrin, Endrin, Eptacloro epossido A, Eptacloro epossido B, esaclorobenzene (HCB),  $\alpha$ HCH esaclorocicloesano alfa,  $\beta$ HCH esaclorocicloesano beta,  $\gamma$ HCH esaclorocicloesano gamma, DDD, DDT, DDE.

Il principio del metodo prevede l'estrazione con solvente dei pesticidi clorurati da organismi marini, successiva purificazione e determinazione gas-cromatografica.

L'analisi è condotta a partire da 10 g di campione sgusciato tal quale, senza alcun processo di liofilizzazione e si procede secondo il metodo QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe).

La metodica QuEChERS può essere suddivisa in due parti: la prima consiste nell'omogeneizzazione ed estrazione con acetonitrile; la seconda consiste nelle fasi di purificazione con SPE dispersiva (d-SPE, dispersive solid phase extraction).

Si procede quindi con l'analisi strumentale eseguita con LC-MS/MS costituito da un analizzatore a triplo quadrupolo. La gascromatografia di massa è effettuata utilizzando una colonna modello TG- 5 ms 20metri. Lo strumento è caratterizzato da un TSQ Quantum Ultra prodotto dalla ditta Thermo.

È utilizzato, inoltre, a garanzia del risultato, uno standard di processo.

Gli standard utilizzati per la curva di calibrazione, i recuperi e le verifiche delle curve sono stati i seguenti:

- G25 Ditta Lab Standard (cat. LBS3L3L651, Lotto 18LFEA299)

- Esaclorobenzene Ditta Lab Standard (cat. L14160000, Lotto 18LFEA299)
- HCH Ditta Lab Standard (cat. LBS1Y6AX909, Lotto 15LILI351)
- Endrin Ditta Lab Standard (cat. LBS1Y6AX345, Lotto 17LCDE80)
- Cus 21870 Ditta Ultra Scientific (cat. LM24-CUS-70340, Lotto 686039).

Il LOQ per i singoli pesticidi è LOQ 0,01 mg/kg.

### 3.2.6 Analisi del tributilstagno (TBT)

Il metodo di analisi è il Metodo C050 - Composti organostannici. La determinazione del tributilstagno in biota avviene tramite estrazione assistita in microonde e successiva determinazione mediante HPLC-ICP-MS.

L'estrazione assistita con microonde, o microwave-assisted extraction (MAE), è una tecnica di estrazione rapida ed efficiente basata sull'impiego di microonde per riscaldare la miscela campione/solvente allo scopo di facilitare e velocizzare l'estrazione dell'analita.

Il campione (2.0 g. circa), dopo essiccazione all'aria, è trasferito nei liner di estrazione. Ad ogni campione sono aggiunti 10 ml di una soluzione estraente (Acetato di Ammonio 0.5M, Acido Acetico 1M, in Metanolo). Il programma a microonde prevede una estrazione a 100°C per 5 min.

Dopo raffreddamento, ciascun campione è filtrato in vials da 10 ml. Segue una evaporazione sotto azoto ad un volume di 2 ml (un volume minore provoca intorbidimento della soluzione). I campioni sono conservati a -20°C. Prima dell'analisi strumentale ogni campione è diluito di un fattore 2 con acqua Milli-Q.

Per la separazione dei composti organostannici si utilizza un HPLC PerkinElmer Serie 200; si monta una colonna C18 ultrafast, con particelle della fase stazionaria di diametro di 1.9 µm. Le condizioni analitiche sono riportate nella Tabella 4.

Tabella 4 - Condizioni analitiche per la separazione dei composti organostannici

<b>Colonna</b>	<b>Fase inversa</b>	C-18
	<b>Diametro interno</b>	2.1 mm
	<b>Lunghezza</b>	8 cm
	<b>Diametro particelle</b>	1.9 µm
<b>Eluente</b>	<b>Composizione</b>	Acetonitrile:Acqua:Acido Acetico 65:23:12 con aggiunta di TEA allo 0.1%
	<b>Flusso</b>	0.3 ml/min
<b>Iniezione</b>	<b>Volume</b>	20 µl

Si utilizza come metodo di taratura la calibrazione esterna, con soluzioni standard aventi concentrazione di 5, 10, 20, 40 e 50 µg/l. Gli standard sono preparati direttamente in vials

di vetro di capacità 1.5 ml.

Sia i campioni che gli standard sono stati preparati in matrice 50% acquosa e 50% solvente.

Una percentuale maggiore di solvente determina una notevole instabilità del plasma.

La quantificazione dell'analita avviene mediante spettrometria ICP-MS (ELAN 9000 PerkinElmer), utilizzando gli isotopi più abbondanti dello stagno:  $^{118}\text{Sn}$  e  $^{120}\text{Sn}$ . Si utilizza un micronebulizzatore PFA e una camera di nebulizzazione ciclonica raffreddata a  $2^{\circ}\text{C}$ , per minimizzare la quantità di solvente in torcia; l'utilizzo di ossigeno post colonna diminuisce la quantità di sostanza organica che si deposita sull'interfaccia.

Il limite di quantificazione per il tributilstagno è  $5\ \mu\text{g}/\text{Kg}$  sul fresco e il laboratorio di analisi di ARPAL non usa materiali certificati di riferimento durante l'analisi, ma procede nel seguente modo: dopo la taratura, si controlla il valore di 2 standard e poi dopo 10 letture di campione si rileggono i 2 standard e così per gli altri campioni.

## 4. RISULTATI

### 4.1 La Spezia

Nei seguenti paragrafi sono riportati i risultati delle analisi condotte nel sito di La Spezia. Si precisa che per valutare i possibili effetti dovuti al lockdown, si è stabilito di confrontare le concentrazioni misurate durante le campagne del 2020, con una campagna pregressa, condotta indicativamente nella stessa stagione (aprile 2019). In particolare, sono state poste a confronto le concentrazioni misurate nella stazione MT-04, posizionata in corrispondenza del molo della scuola di vela di Santa Teresa (campagna pre lockdown) e la stazione MT-06 (campagne post lockdown), ubicata nell'area degli impianti interni alla diga, in prossimità dell'imboccatura di levante.

#### 4.1.1 Umidità

In Tabella 5 si riportano i risultati dell'umidità determinata sui campioni di mitili prelevati nelle diverse stazioni e nel campione di riferimento MT-T0 (campagna di aprile 2019) del porto di La Spezia.

Tabella 5 - Risultati dell'umidità (g/100g) misurata nei campioni di mitili – Porto di La Spezia

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (aprile 2019)	Post Lockdown		
			I campagna 25/05/2020	II campagna 22/06/2020	III campagna 20/07/2020
Umidità %	MT-T0	87.73	-	-	-
	MT-01	83.10	-	-	-
	MT-02	85.30	-	-	-
	MT-03	87.00	-	-	-
	MT-04	85.30	-	-	-
	MT-05	-	81.80	82.48	80.76
	MT-06	-	82.31	79.40	78.75
	MT-07	-	81.71	79.85	80.06

**NOTA:** le stazioni utilizzate per il confronto pre e post lockdown sono colorate rispettivamente in verde e giallo

#### 4.1.2 Bioaccumulo di metalli ed elementi in traccia

In Tabella 6 si riportano le concentrazioni dei metalli ed elementi in traccia misurate su tutti i campioni prelevati nel Porto di La Spezia (campagne pre e post lockdown), compreso il campione di mitili analizzato al tempo zero per la campagna pre lockdown, condotta nel mese di aprile 2019. Tutti i risultati sono inseriti nella tabella con la relativa deviazione standard.



Tabella 6 – Concentrazioni di metalli ed elementi in traccia (mg/kg peso secco) determinate nei mitili prelevati a La Spezia, espressi come media  $\pm$  deviazione standard

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (aprile 2019)	Post Lockdown		
			I campagna 25/05/2020	II campagna 22/06/2020	III campagna 20/07/2020
As	MT-T0	21.58 $\pm$ 0.71	-	-	-
	MT-01	16.06 $\pm$ 0.15	-	-	-
	MT-02	9.88 $\pm$ 0.30	-	-	-
	MT-03	9.62 $\pm$ 0.14	-	-	-
	MT-04	9.96 $\pm$ 0.89	-	-	-
	MT-05	-	17.76 $\pm$ 0.68	17.66 $\pm$ 0.59	12.64 $\pm$ 0.61
	MT-06	-	16.08 $\pm$ 1.09	14.95 $\pm$ 0.76	14.32 $\pm$ 0.62
	MT-07	-	19.05 $\pm$ 1.39	16.78 $\pm$ 1.28	15.78 $\pm$ 1.39
Cd	MT-T0	0.45 $\pm$ 0.06	-	-	-
	MT-01	0.27 $\pm$ 0.05	-	-	-
	MT-02	0.25 $\pm$ 0.01	-	-	-
	MT-03	0.43 $\pm$ 0.05	-	-	-
	MT-04	0.42 $\pm$ 0.03	-	-	-
	MT-05	-	0.39 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.11
	MT-06	-	0.25 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.04
	MT-07	-	0.27 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.07
Cr	MT-T0	3.36 $\pm$ 0.40	-	-	-
	MT-01	1.71 $\pm$ 0.16	-	-	-
	MT-02	1.94 $\pm$ 0.48	-	-	-
	MT-03	1.50 $\pm$ 0.26	-	-	-
	MT-04	2.51 $\pm$ 0.84	-	-	-
	MT-05	-	0.93 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.08	0.82 $\pm$ 0.05
	MT-06	-	0.79 $\pm$ 0.16	0.77 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.07
	MT-07	-	0.90 $\pm$ 0.09	0.92 $\pm$ 0.18	0.66 $\pm$ 0.06
Cu	MT-T0	7.16 $\pm$ 0.16	-	-	-
	MT-01	7.39 $\pm$ 0.81	-	-	-
	MT-02	5.39 $\pm$ 1.00	-	-	-
	MT-03	9.97 $\pm$ 1.23	-	-	-
	MT-04	5.58 $\pm$ 0.30	-	-	-
	MT-05	-	6.56 $\pm$ 0.17	6.93 $\pm$ 0.27	5,65 $\pm$ 0,33
	MT-06	-	5.02 $\pm$ 0.57	4.30 $\pm$ 0.13	4.87 $\pm$ 0.27
	MT-07	-	4.77 $\pm$ 0.36	5.15 $\pm$ 0,31	4.49 $\pm$ 0.61
Hg	MT-T0	0.17 $\pm$ 0.01	-	-	-
	MT-01	0.11 $\pm$ 0.01	-	-	-
	MT-02	0.10 $\pm$ 0.00	-	-	-
	MT-03	0.20 $\pm$ 0.02	-	-	-
	MT-04	0.14 $\pm$ 00	-	-	-
	MT-05	-	0.10 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.003	0.06 $\pm$ 0.01
	MT-06	-	0.09 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
	MT-07	-	0.07 $\pm$ 0.001	0.05 $\pm$ 0.001	0.06 $\pm$ 0.01
Ni	MT-T0	2.35 $\pm$ 0.18	-	-	-
	MT-01	1.14 $\pm$ 0.08	-	-	-
	MT-02	1.55 $\pm$ 0.18	-	-	-
	MT-03	1.47 $\pm$ 0.16	-	-	-
	MT-04	2.09 $\pm$ 0.55	-	-	-
	MT-05	-	0.60 $\pm$ 0.04	1.24 $\pm$ 0.54	0,71 $\pm$ 0,05
	MT-06	-	0.46 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.15	0.56 $\pm$ 0.03
	MT-07	-	0.74 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.12	0.68 $\pm$ 0.20
Pb	MT-T0	5.47 $\pm$ 0.70	-	-	-
	MT-01	3.14 $\pm$ 0.76	-	-	-
	MT-02	2.31 $\pm$ 0.39	-	-	-
	MT-03	4.97 $\pm$ 1.44	-	-	-
	MT-04	4.27 $\pm$ 0.86	-	-	-
	MT-05	-	4.69 $\pm$ 0.7	3.55 $\pm$ 0.32	1,41 $\pm$ 0,11

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (aprile 2019)	Post Lockdown		
			I campagna 25/05/2020	II campagna 22/06/2020	III campagna 20/07/2020
Zn	MT-06	-	2.69 ± 0.4	2.75 ± 0.38	3.20 ± 0.29
	MT-07	-	1.95 ± 0.50	1.74 ± 0.23	1.30 ± 0.44
	MT-T0	329 ± 60.05	-	-	-
	MT-01	370.53 ± 44.30	-	-	-
	MT-02	273.26 ± 47.09	-	-	-
	MT-03	294.76 ± 33.85	-	-	-
	MT-04	192.41 ± 30.87	-	-	-
	MT-05	-	376.05 ± 15.05	241.63 ± 17.10	184.42 ± 17.99
	MT-06	-	192.60 ± 18.70	168.83 ± 23.02	216.16 ± 32.58
	MT-07	-	113.32 ± 7.35	103.26 ± 7.51	106.47 ± 17.20

**NOTA:** le stazioni utilizzate per il confronto pre e post lockdown sono colorate rispettivamente in verde e giallo

In Figura 3 è riportato l'andamento della concentrazione del cadmio (mg/kg p.s.) nelle stazioni MT-04 (campagna di aprile 2019) e MT-06 (campagne del 2020), rapportato alla concentrazione misurata nel campione MT-T0 prelevato nel mese di aprile 2019.

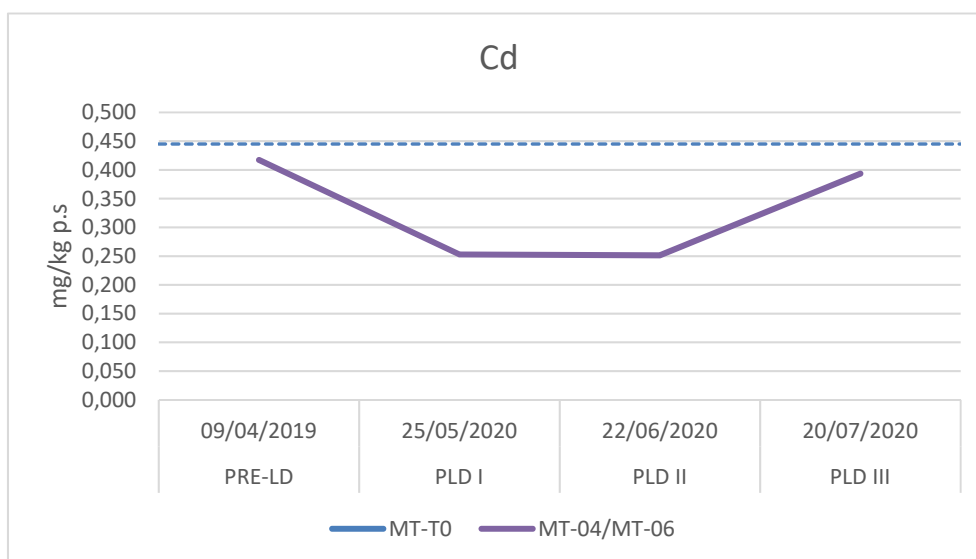


Figura 3 - Andamento della concentrazione del cadmio (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di La Spezia

Come si può osservare dal grafico e dalla Figura 4, la presenza di cadmio nei mitili diminuisce in maniera evidente nella campagna di maggio 2020 rispetto a quanto misurato nei mitili di MT-04 nell'aprile 2019. Un nuovo aumento si registra nella terza campagna 2020, dopo la ripresa del traffico navale.

Si evidenzia che le concentrazioni misurate sono sempre inferiori a quelle misurate nel campione MT-T0.

Confrontando tra loro le tre stazioni di monitoraggio del 2020, si osserva una situazione differente nei mitili prelevati in MT-05, dove la diminuzione della concentrazione di cadmio

è stata meno significativa rispetto a MT-06 e dove si delinea un nuovo incremento già dalla seconda campagna di monitoraggio. Nella stazione MT-07, infine, mentre la diminuzione è paragonabile a quella dei mitili prelevati in MT-06, l'incremento appare già dalla seconda campagna e rimane costante anche per la successiva.

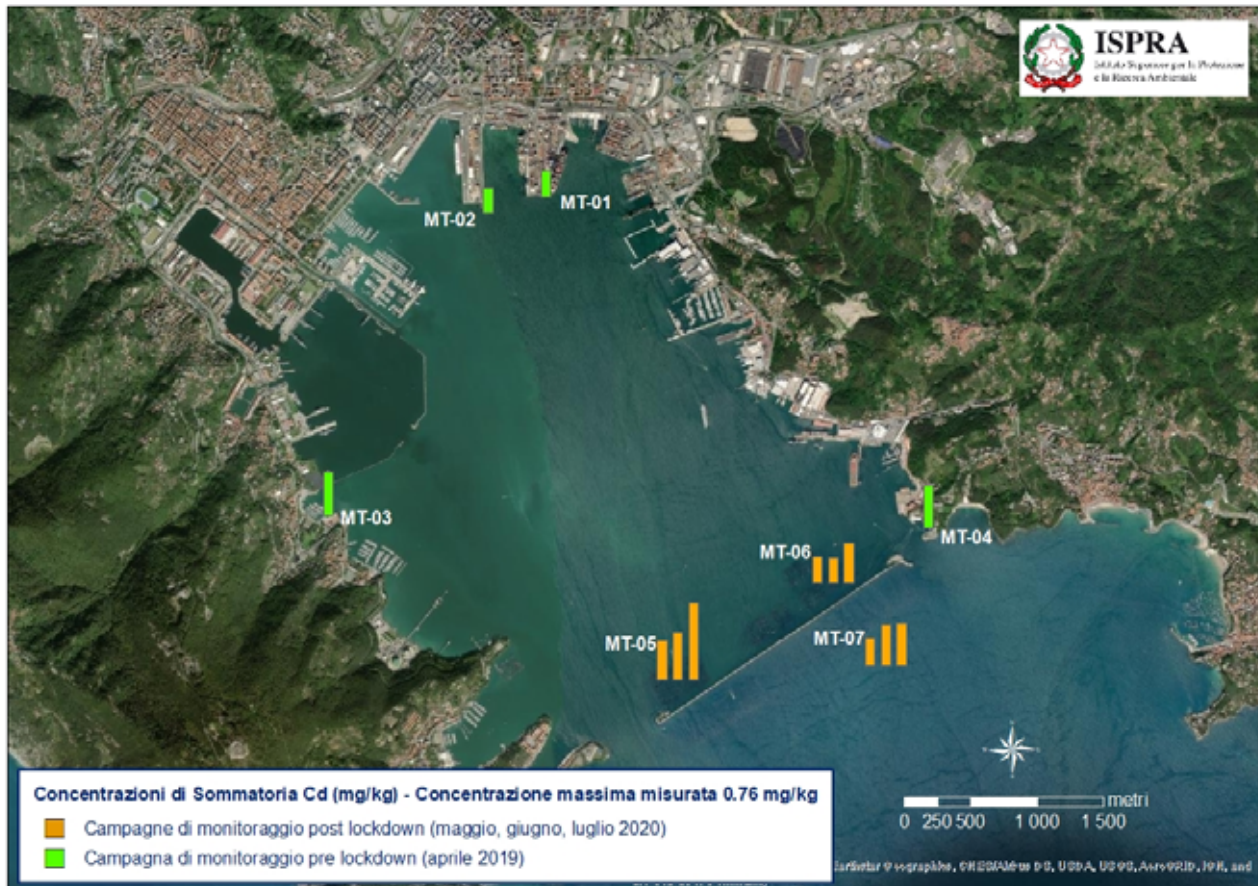


Figura 4 - Andamento delle concentrazioni del cadmio nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di aprile 2019

Anche le concentrazioni di cromo (Figura 5 e Figura 6) nei mitili prelevati durante la campagna del maggio 2020 sono diminuite di oltre la metà del valore misurato in MT-04 ad aprile 2019. A differenza di quanto osservato per il cadmio, non si registrano aumenti di concentrazioni nelle due successive campagne di monitoraggio. Le concentrazioni misurate sono comunque inferiori a quelle misurate nel campione MT-T0.

La riduzione consistente della concentrazione del cromo nei tessuti dei mitili non si rileva esclusivamente nella stazione MT-06, dove sono state misurate le concentrazioni più basse, ma anche nelle altre due stazioni monitorate.

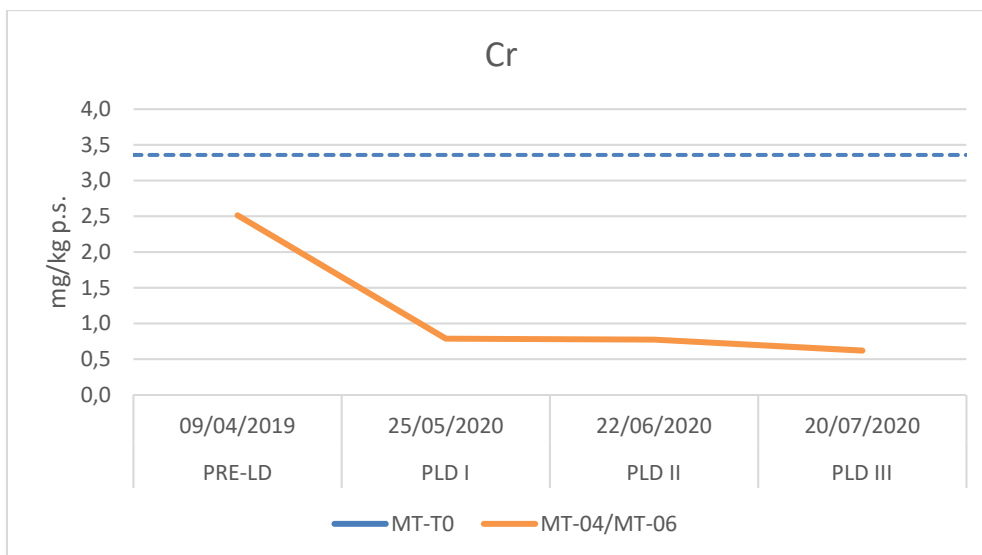


Figura 5 - Andamento della concentrazione del cromo (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di La Spezia

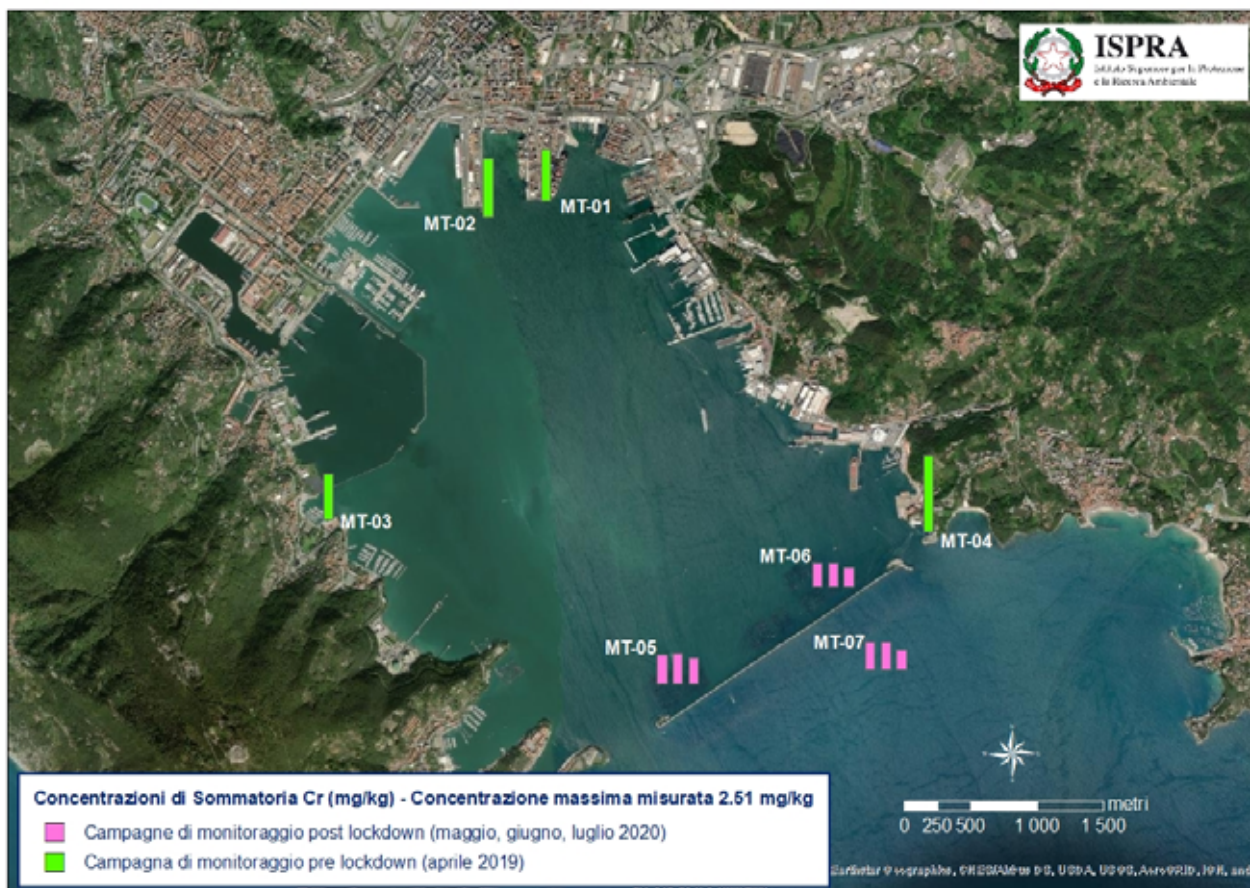


Figura 6 - Andamento delle concentrazioni del cromo nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di aprile 2019.

La concentrazione del rame (Figura 7 e Figura 8) determinata nei tessuti dei mitili sembra risentire solo marginalmente dagli effetti del lockdown. La concentrazione più bassa, pari a 5.85 mg/kg, è stata registrata nella campagna di giugno 2020 nella stazione MT-06. Tutte le concentrazioni misurate sono sempre inferiori a quelle del campione prelevato al T0.

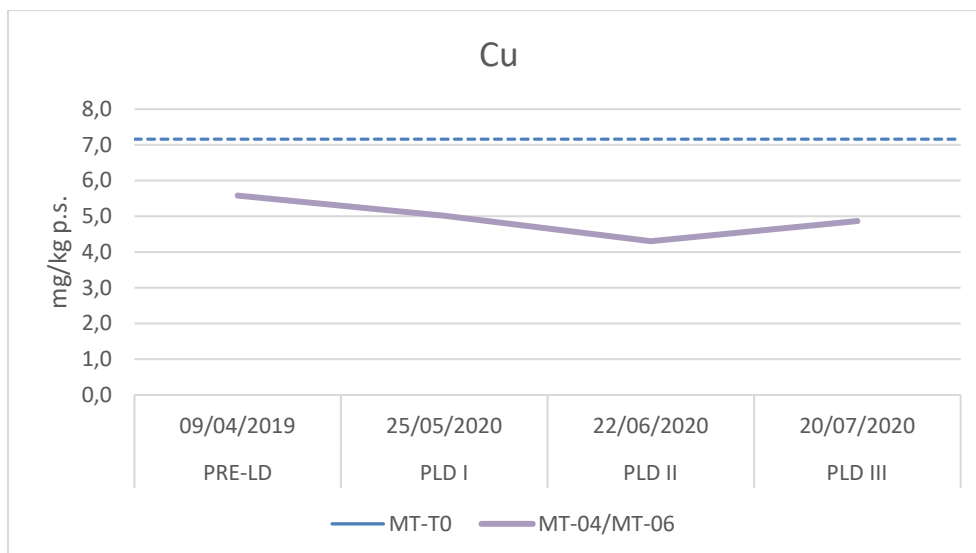


Figura 7 - Andamento della concentrazione del rame (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di La Spezia

Confrontando tra loro le stazioni di monitoraggio effettuate nel 2020, si può osservare come l'andamento del rame si mantenga pressoché costante nel corso delle tre campagne di monitoraggio, con valori leggermente più alti misurati in corrispondenza della stazione MT-05, ubicata in prossimità del canale di accesso.

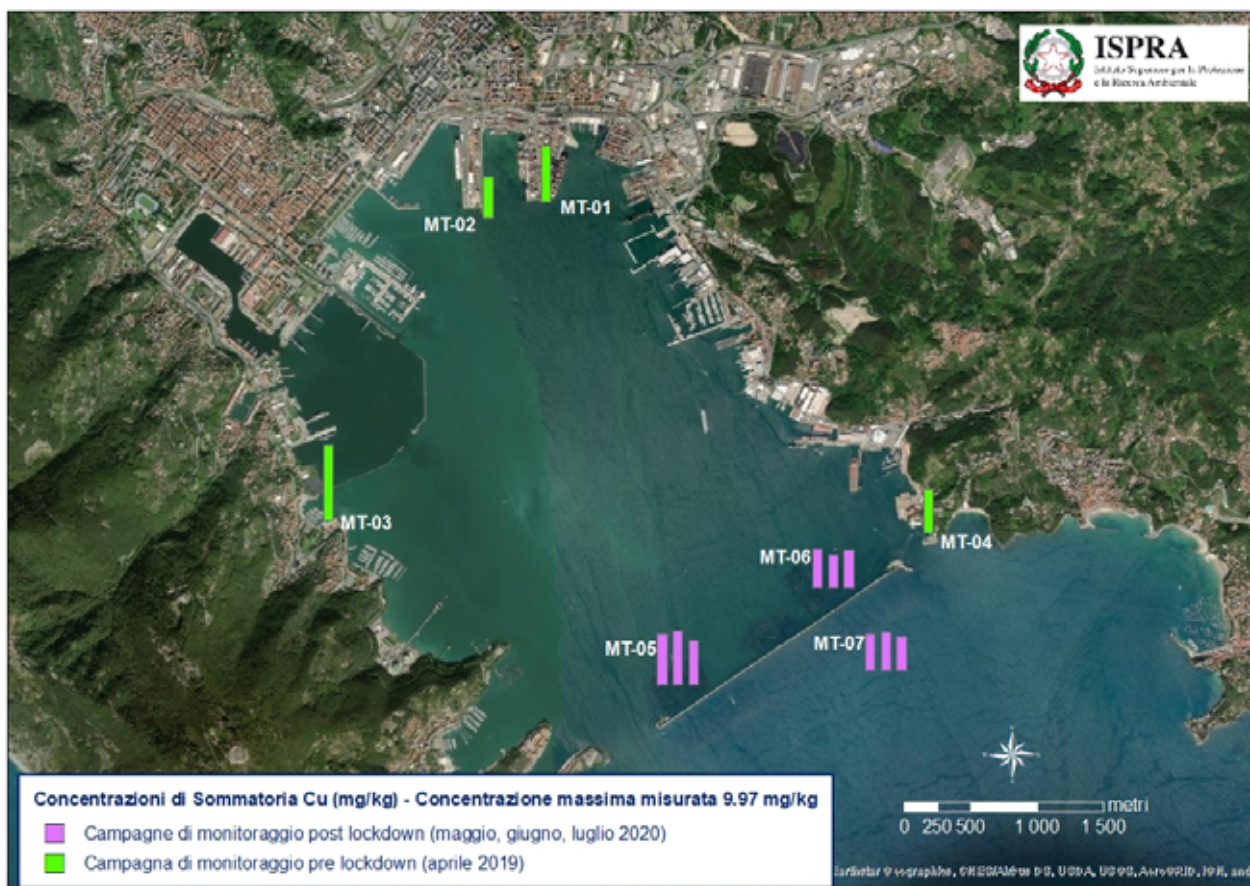


Figura 8 - Andamento delle concentrazioni del rame nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di aprile 2019.

Come rappresentato in Figura 9 e Figura 10, anche per il mercurio si è assistito ad un

notevole decremento delle concentrazioni misurate, che in MT-06 si sono quasi dimezzate nella campagna di maggio 2020 e sono ulteriormente diminuite nella successiva. Un lieve incremento è stato rilevato nella campagna di luglio, analogamente a quanto osservato per il rame ed il cadmio. Anche per il mercurio il campione MT-T0 ha una concentrazione più elevata rispetto a quanto misurato nel 2020.

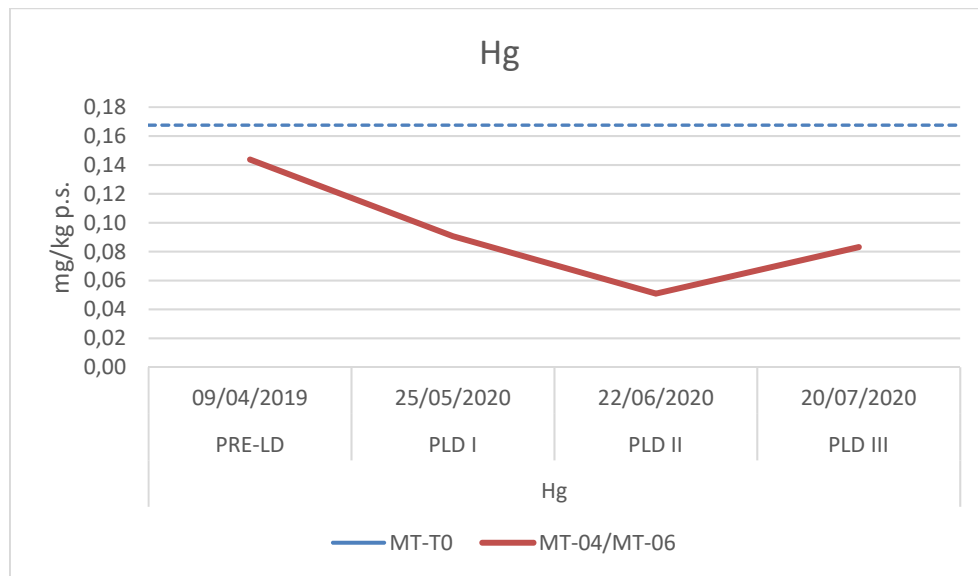


Figura 9 - Andamento della concentrazione del mercurio (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di La Spezia

I mitili prelevati nella stazione MT-07 mostrano un andamento delle concentrazioni paragonabile a quella dei mitili prelevati in MT-06, mentre nei mitili della stazione MT-05 le concentrazioni diminuiscono progressivamente, anche dopo la ripresa del traffico navale.

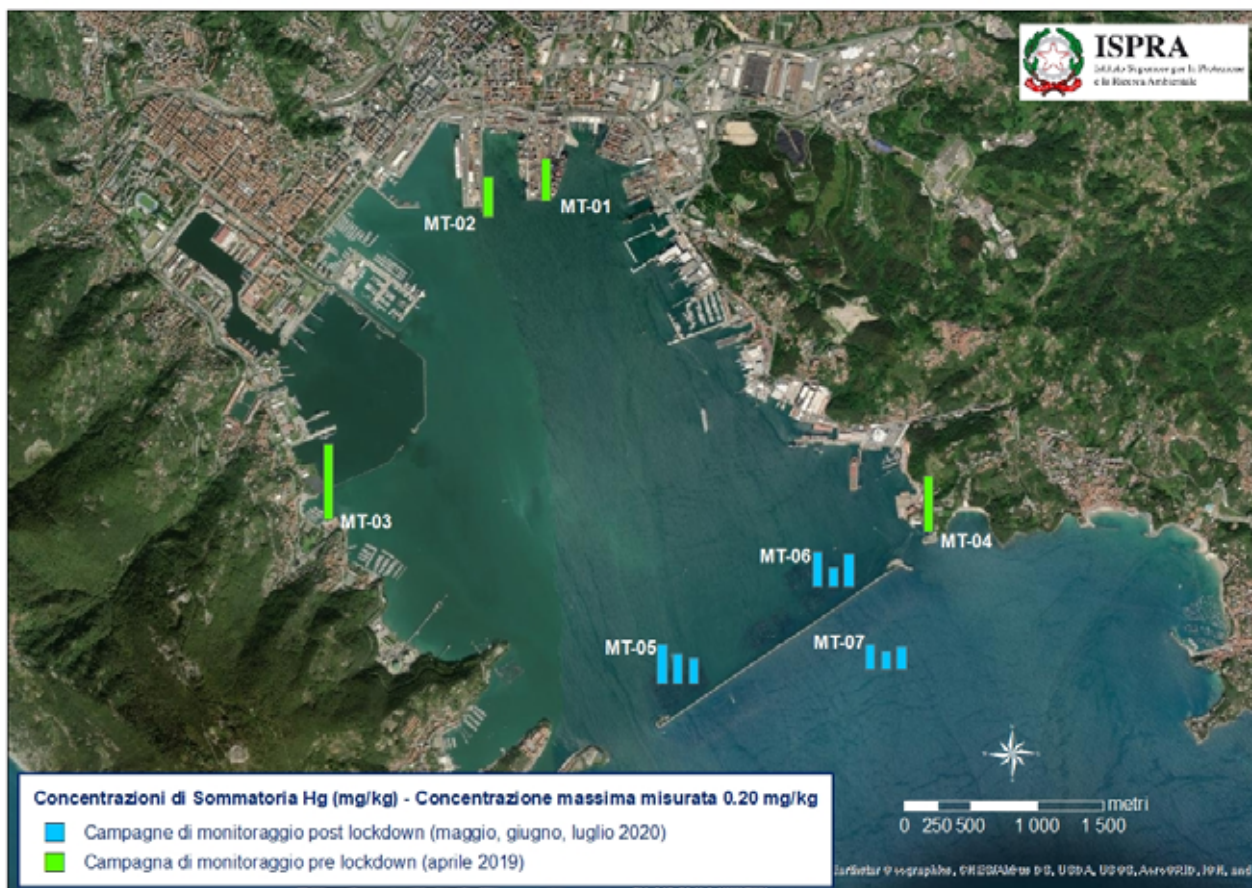


Figura 10 - Andamento delle concentrazioni del mercurio nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di aprile 2019

Come emerge chiaramente dal grafico di Figura 11 e dalla Figura 12, nei mitili della stazione MT-06 la concentrazione di nichel misurata a maggio è decisamente bassa (circa un quarto) rispetto a quanto misurato nella stazione MT-04 nel mese di aprile 2019. Anche se nella campagna successiva si è osservato un aumento, questo è comunque estremamente ridotto. Le concentrazioni di MT-T0 sono sempre maggiori di quanto misurato nel 2020.

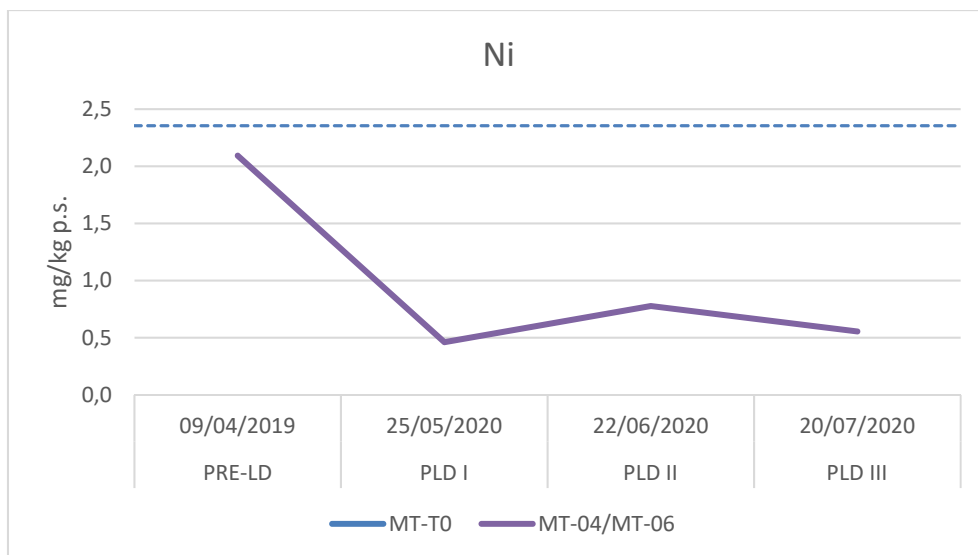


Figura 11 - Andamento della concentrazione del nichel (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di La Spezia

I mitili della stazione MT-05 mostrano un andamento della concentrazione simile a quello rappresentato per MT-06. Nella stazione esterna invece, il valore più basso di nichel è stato misurato nella campagna intermedia.

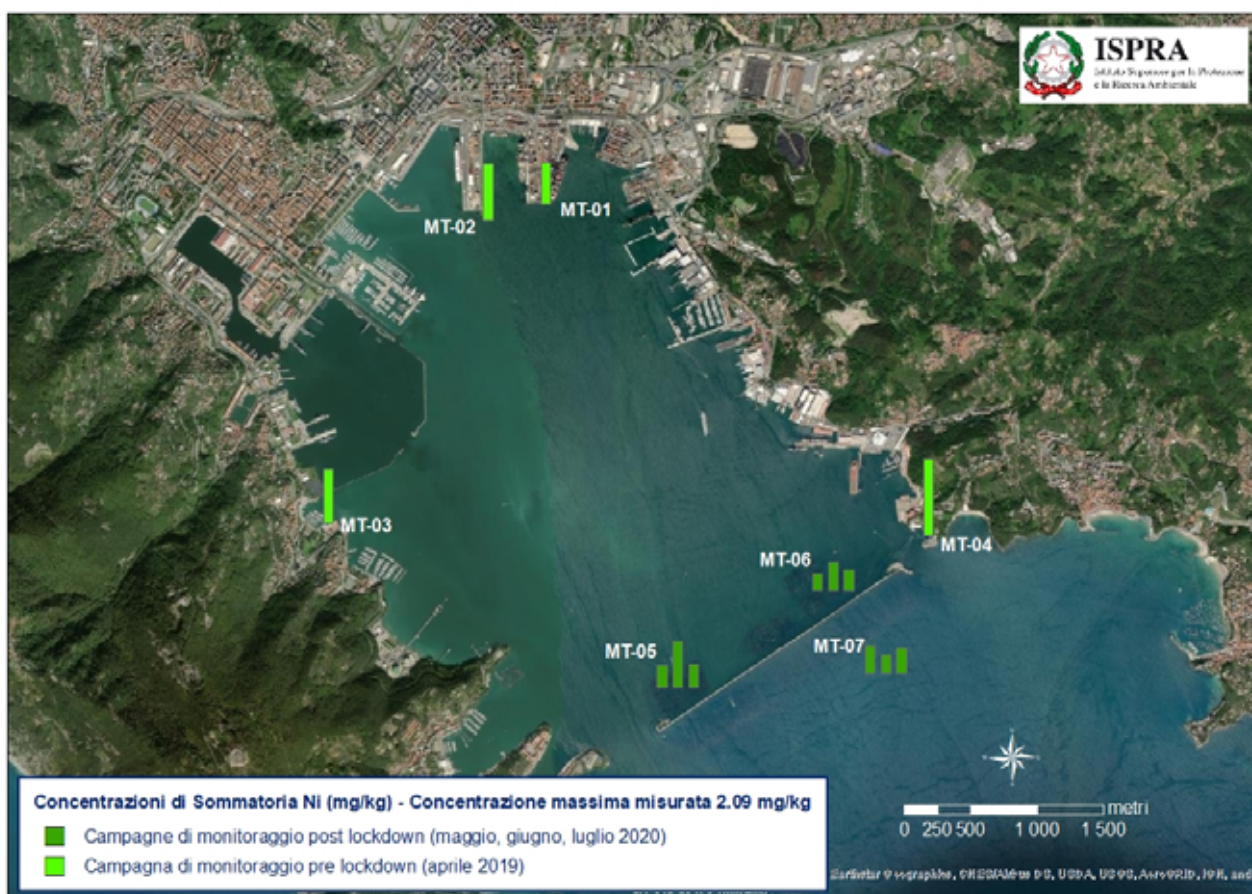


Figura 12 - Andamento delle concentrazioni del nichel nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di aprile 2019



Anche per quanto riguarda il piombo, le concentrazioni misurate in MT-06 sono evidentemente diminuite rispetto al 2019 (Figura 13) e rimaste in questa stazione pressoché costanti nel corso delle tre campagne del 2020. La concentrazione di MT-T0 è anche per questo parametro superiore ai valori misurati nel 2020.

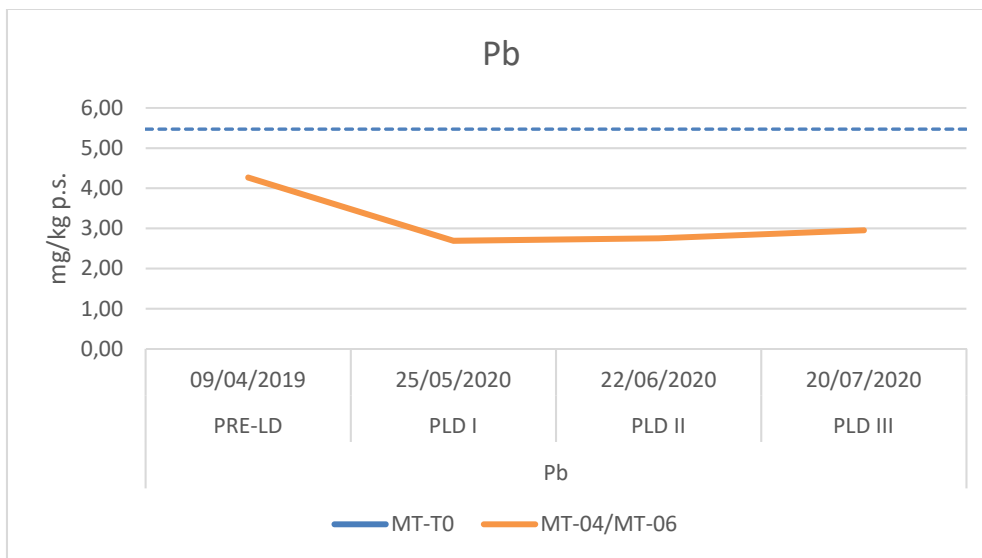


Figura 13 - Andamento della concentrazione del piombo (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di La Spezia

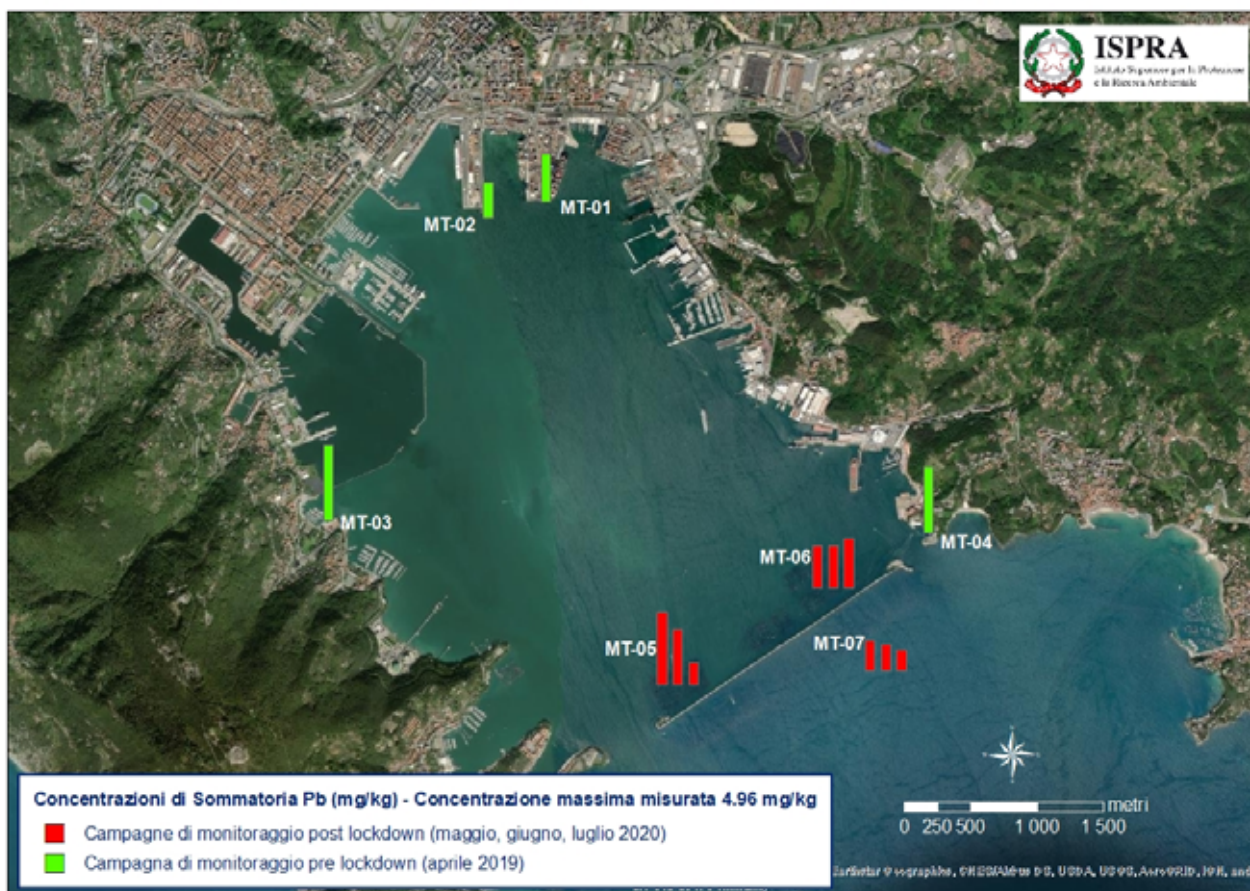


Figura 14 - Andamento delle concentrazioni del piombo nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di aprile 2019

Confrontando tra loro le stazioni del monitoraggio 2020 (Figura 14), si osserva nella stazione MT-05, prossima al canale di accesso, una diminuzione progressiva della concentrazione da maggio a luglio 2020, mentre nella stazione esterna (MT-07) i valori misurati sono i più bassi di tutte le campagne.

Le concentrazioni dello zinco (Figura 15), come osservato precedentemente per il rame, sembrano essere variate in maniera meno significativa e sono comunque inferiori al valore del campione MT-T0.

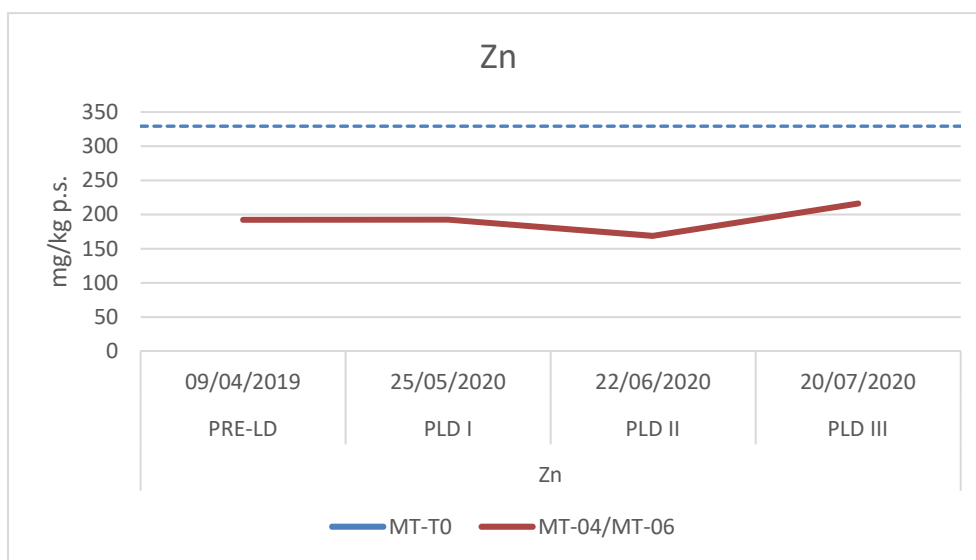


Figura 15 - Andamento della concentrazione dello zinco (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di La Spezia

Guardando nel dettaglio le stazioni di monitoraggio del 2020 (Figura 16) si può osservare che nella stazione MT-05 la concentrazione di zinco diminuisce nel corso delle tre campagne di monitoraggio e che nella stazione esterna le concentrazioni di zinco sono molto più basse rispetto a quanto misurato negli organismi prelevati dagli impianti interni alla diga.

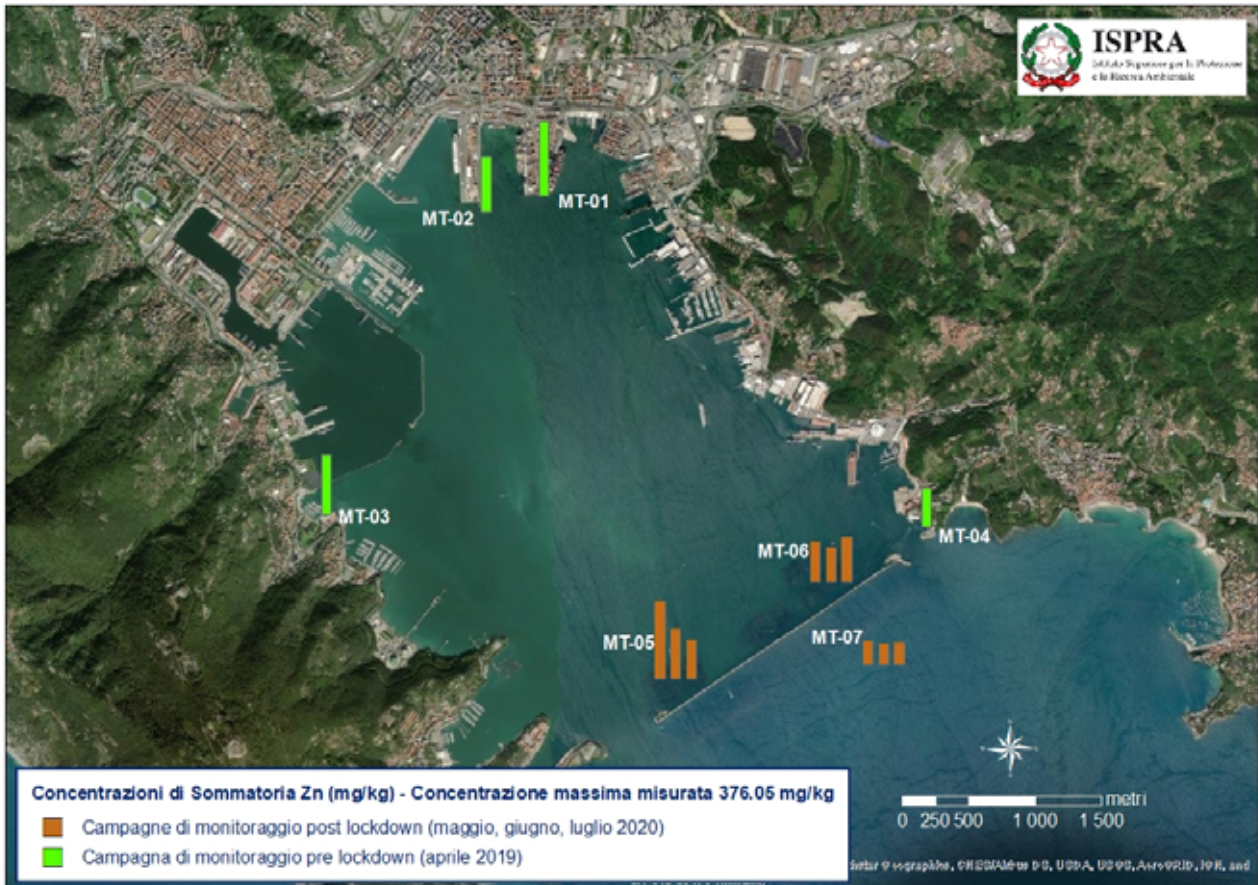


Figura 16 - Andamento delle concentrazioni dello zinco nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di aprile 2019

L'unico parametro per cui si evidenzia un lieve aumento della concentrazione rispetto alla campagna di aprile 2019 è l'arsenico (Figura 17). In tutte e tre le campagne del 2020, i valori misurati nelle tre stazioni di monitoraggio sono risultati sempre più alti di quelli rilevati nella stazione MT-04 utilizzata come confronto pregresso (Figura 18). Si osserva comunque una lieve diminuzione nel corso delle tre campagne, più evidente nel campione prelevato in MT-05 nel mese di luglio 2020.

Queste leggere variazioni potrebbero essere dovute al ciclo biologico del mitilo, essendo l'arsenico maggiormente presente con le sue forme organicate all'interno del tessuto gonadico.

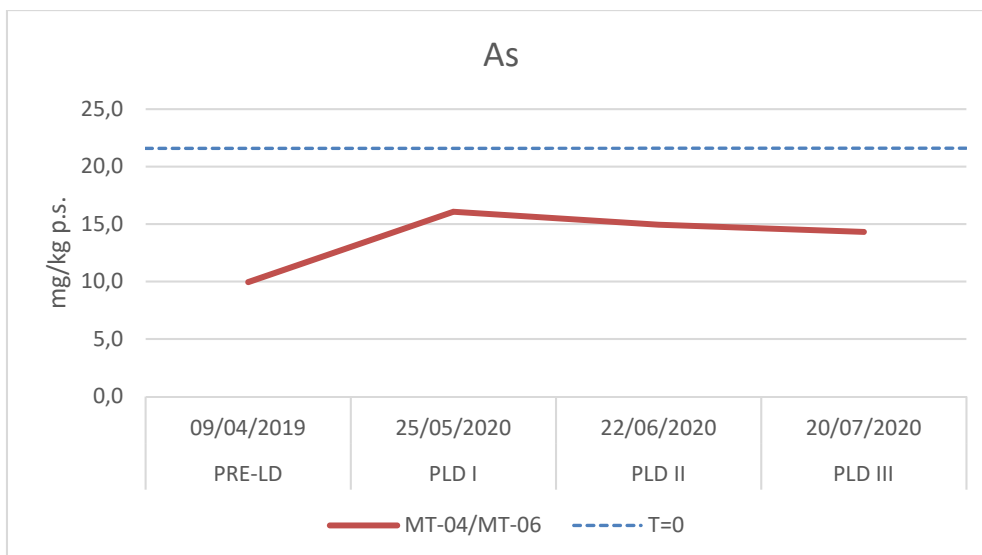


Figura 17 - Andamento della concentrazione dell'arsenico (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di La Spezia

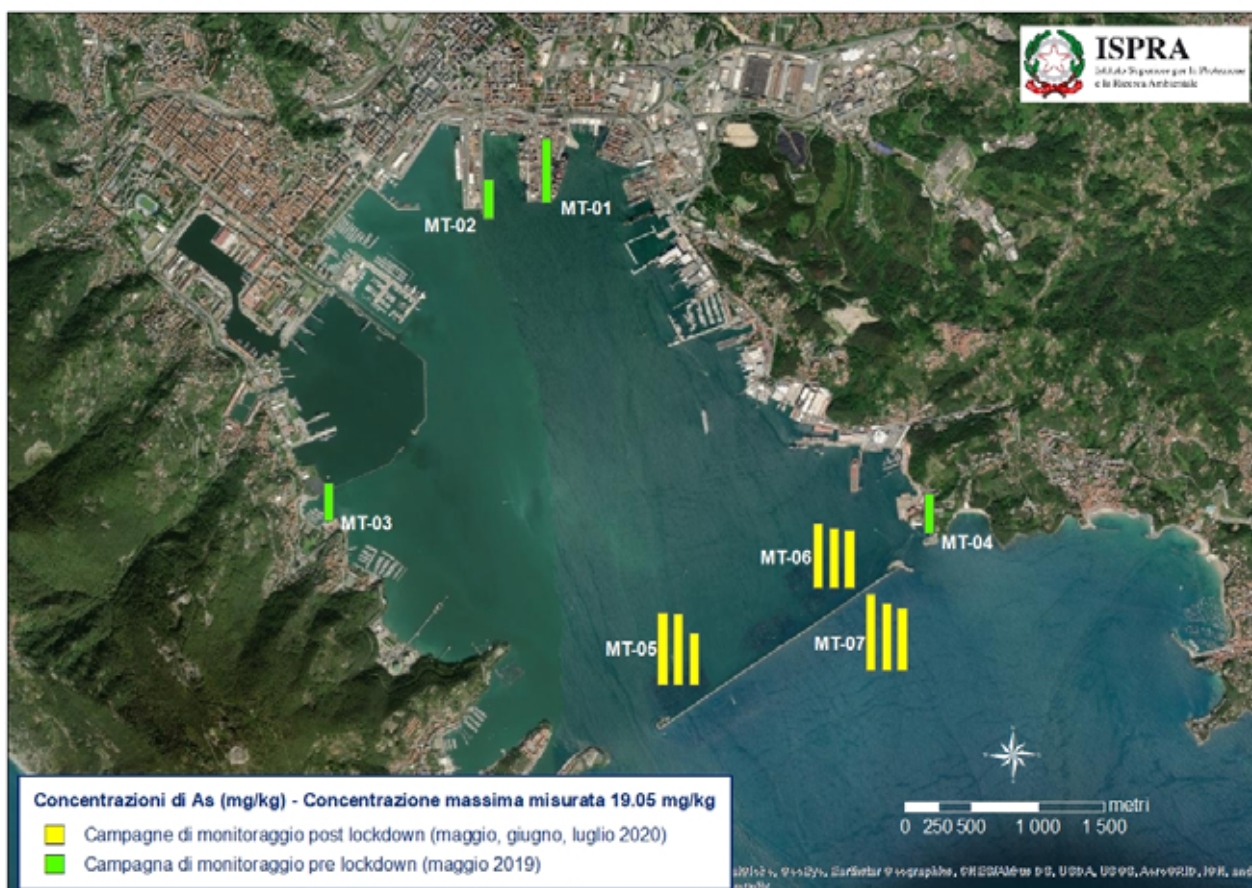


Figura 18 – Andamento delle concentrazioni dell'arsenico nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di aprile 2019

#### 4.1.3 Bioaccumulo di Idrocarburi Policiclici Aromatici

In Tabella 7 si riportano le concentrazioni di Idrocarburi Policiclici Aromatici misurate su tutti i campioni prelevati nel Porto di La Spezia (campagne pre e post lockdown), compreso il

campione di mitili analizzato al tempo zero per la campagna pre lockdown, condotta nel mese di aprile 2019.

Tabella 7- Concentrazioni di IPA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  peso secco) determinate nei mitili prelevati nel porto di La Spezia.

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (aprile 2019)	Post Lockdown		
			I campagna 25/05/2020	II campagna 22/06/2020	III campagna 20/07/2020
Acenaftene	MT-T0	0.40	-	-	-
	MT-01	0.30	-	-	-
	MT-02	0.30	-	-	-
	MT-03	0.20	-	-	-
	MT-04	0.30	-	-	-
	MT-05	-	1.3	0.2	0.2
	MT-06	-	1.2	<0.2	<0.2
	MT-07	-	1.7	<0.2	<0.2
Acenaftilene	MT-T0	<0.2	-	-	-
	MT-01	<0.2	-	-	-
	MT-02	<0.2	-	-	-
	MT-03	<0.2	-	-	-
	MT-04	<0.2	-	-	-
	MT-05	-	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-06	-	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-07	-	<0.2	<0.2	<0.2
Antracene	MT-T0	0.7	-	-	-
	MT-01	0.5	-	-	-
	MT-02	1.5	-	-	-
	MT-03	0.30	-	-	-
	MT-04	0.50	-	-	-
	MT-05	-	0.2	0.5	<0.2
	MT-06	-	0.2	0.4	<0.2
	MT-07	-	0.2	<0.2	<0.2
Benzo(a)antracene	MT-T0	6.40	-	-	-
	MT-01	7.40	-	-	-
	MT-02	18.40	-	-	-
	MT-03	0.90	-	-	-
	MT-04	5.70	-	-	-
	MT-05	-	<0.2	0.3	0.2
	MT-06	-	<0.2	0.4	<0.2
	MT-07	-	<0.2	<0.2	0.2
Benzo(a)pirene	MT-T0	1.80	-	-	-
	MT-01	3.40	-	-	-
	MT-02	13.10	-	-	-
	MT-03	0.80	-	-	-
	MT-04	3.70	-	-	-
	MT-05	-	0.2	0.2	<0.2
	MT-06	-	0.2	0.2	<0.2
	MT-07	-	0.2	<0.2	<0.2
Benzo(b)fluorantene	MT-T0	9.10	-	-	-
	MT-01	5.80	-	-	-
	MT-02	18.20	-	-	-
	MT-03	1.00	-	-	-
	MT-04	6.40	-	-	-
	MT-05	-	0.4	1.4	0.7
	MT-06	-	0.4	0.8	0.6
	MT-07	-	0.3	0.6	0.4
Benzo(g,h,i)perilene	MT-T0	3.90	-	-	-

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (aprile 2019)	Post Lockdown		
			I campagna 25/05/2020	II campagna 22/06/2020	III campagna 20/07/2020
	MT-01	1.80	-	-	-
	MT-02	5.60	-	-	-
	MT-03	1.00	-	-	-
	MT-04	3.30	-	-	-
	MT-05	-	0.5	1.5	0.8
	MT-06	-	0.4	0.9	0.5
	MT-07	-	0.2	0.4	0.4
Benzo(k)fluorantene	MT-T0	6.60	-	-	-
	MT-01	3.50	-	-	-
	MT-02	9.60	-	-	-
	MT-03	0.70	-	-	-
	MT-04	3.80	-	-	-
	MT-05	-	0.3	0.6	0.4
	MT-06	-	0.2	0.5	0.3
Crisene	MT-07	-	0.2	0.3	0.3
	MT-T0	29.80	-	-	-
	MT-01	9.80	-	-	-
	MT-02	28.80	-	-	-
	MT-03	2.30	-	-	-
	MT-04	8.50	-	-	-
	MT-05	-	0.6	2.9	1.6
Dibenzo(a,h)antracene	MT-06	-	0.7	1.9	1.3
	MT-07	-	0.4	1.1	0.7
	MT-T0	<0.20	-	-	-
	MT-01	<0.20	-	-	-
	MT-02	<0.20	-	-	-
	MT-03	<0.2	-	-	-
	MT-04	<0.2	-	-	-
Fenantrene	MT-05	-	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-06	-	<0.2	0.2	<0.2
	MT-07	-	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-T0	6.20	-	-	-
	MT-01	3.10	-	-	-
	MT-02	8.30	-	-	-
	MT-03	2.20	-	-	-
Fluorantene	MT-04	3.80	-	-	-
	MT-05	-	4.6	6.6	5.3
	MT-06	-	4.9	4.8	3.2
	MT-07	-	4.7	3.6	2.1
	MT-T0	44.10	-	-	-
	MT-01	14.60	-	-	-
	MT-02	26.50	-	-	-
Fluorene	MT-03	4.30	-	-	-
	MT-04	12.90	-	-	-
	MT-05	-	1.1	4.0	2.0
	MT-06	-	1.7	3.0	1.7
	MT-07	-	1.3	1.7	1.0
	MT-T0	<0.20	-	-	-
	MT-01	0.20	-	-	-
Indeno(1,2,3,c,d)pirene	MT-02	1.00	-	-	-
	MT-03	<0.2	-	-	-
	MT-04	0.40	-	-	-
	MT-05	-	1.3	1.6	1.8
	MT-06	-	1.3	1.0	1.2
	MT-07	-	1.3	1.2	0.9
	MT-T0	3.50	-	-	-

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (aprile 2019)	Post Lockdown		
			I campagna 25/05/2020	II campagna 22/06/2020	III campagna 20/07/2020
	MT-01	2.80	-	-	-
	MT-02	3.30	-	-	-
	MT-03	1.60	-	-	-
	MT-04	6.60	-	-	-
	MT-05	-	0.5	1.4	0.7
	MT-06	-	0.5	1.0	0.4
	MT-07	-	0.5	1.7	0.6
Naftalene	MT-T0	9.50	-	-	-
	MT-01	6.30	-	-	-
	MT-02	7.10	-	-	-
	MT-03	6.00	-	-	-
	MT-04	6.10	-	-	-
	MT-05	-	19.5	5.1	8.7
	MT-06	-	23.6	<0.2	6.9
MT-07	-	23.1	5.9	9.1	
Pirene	MT-T0	11.70	-	-	-
	MT-01	11.90	-	-	-
	MT-02	31.60	-	-	-
	MT-03	2.30	-	-	-
	MT-04	9.90	-	-	-
	MT-05	-	1.0	5.2	1.10
	MT-06	-	1.5	4.1	1.20
MT-07	-	0.4	1.0	0.30	
Sommatoria IPA	MT-T0	133.70	-	-	-
	MT-01	71.40	-	-	-
	MT-02	173.30	-	-	-
	MT-03	23.60	-	-	-
	MT-04	71.90	-	-	-
	MT-05	-	31.3	31.7	23.7
	MT-06	-	36.8	19.4	17.2
MT-07	-	34.5	17.5	15.8	

**NOTA:** le stazioni utilizzate per il confronto pre e post lockdown sono colorate rispettivamente in verde e giallo

In Figura 19 è rappresentato l'andamento delle concentrazioni della sommatoria degli IPA, misurate nelle stazioni MT-04 (pre lockdown) e MT-06 (post lockdown). È inoltre riportato il valore della concentrazione misurata nel campione MT-T0.

La sommatoria degli IPA subisce una consistente riduzione già a partire dalla campagna di maggio 2020 e prosegue anche nella campagna successiva. Il decremento della concentrazione degli IPA nei tessuti dei mitili non interessa solo la stazione di riferimento MT-06 ma anche le altre due stazioni di monitoraggio a dimostrazione dell'impatto che il traffico navale ha in tutta l'area (Figura 22). In particolare, si evidenzia come l'assenza di traffico navale abbia portato a una concentrazione della sommatoria degli IPA paragonabile tra l'interno e l'esterno della Rada. La concentrazione di MT-T0 è più del doppio di quanto misurato nel 2020 in tutte le stazioni.

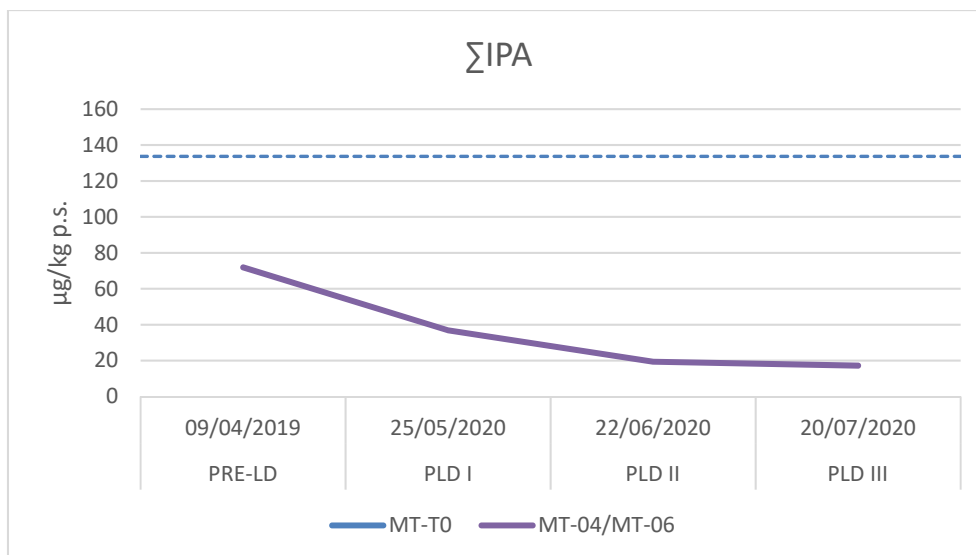


Figura 19 - Andamento delle concentrazioni della ΣIPA (µg/Kg su p.s.) nei mitili del Porto di La Spezia



Figura 20 – Andamento delle concentrazioni della ΣIPA (µg/Kg su p.s.) nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di aprile 2019

In analogia con quanto osservato per la sommatoria degli IPA, anche la concentrazione di benzo(a)pirene subisce una riduzione consistente già a partire dalla campagna di maggio 2020 e resta bassa fino alla campagna di luglio (Figura 21). Inoltre, come avvenuto per gli altri parametri, le concentrazioni misurate sono risultate sempre inferiori a quelle del campione MT-T0.



Questo parametro riveste un significato importante perché nel regolamento 1881/2006/CE vengono definiti i tenori massimi che devono essere rispettati per il consumo umano. Le concentrazioni del benzo(a)pirene in tutte le campagne considerate risultano inferiori al limite imposto dalla normativa (5 ppb su pesce fresco), con l'eccezione del valore registrato nella stazione MT-02 ad aprile 2019 (i dati in tabella sono espressi su peso secco, ma possono essere facilmente convertiti in peso umido con la percentuale di umidità riportata in Tabella 5).

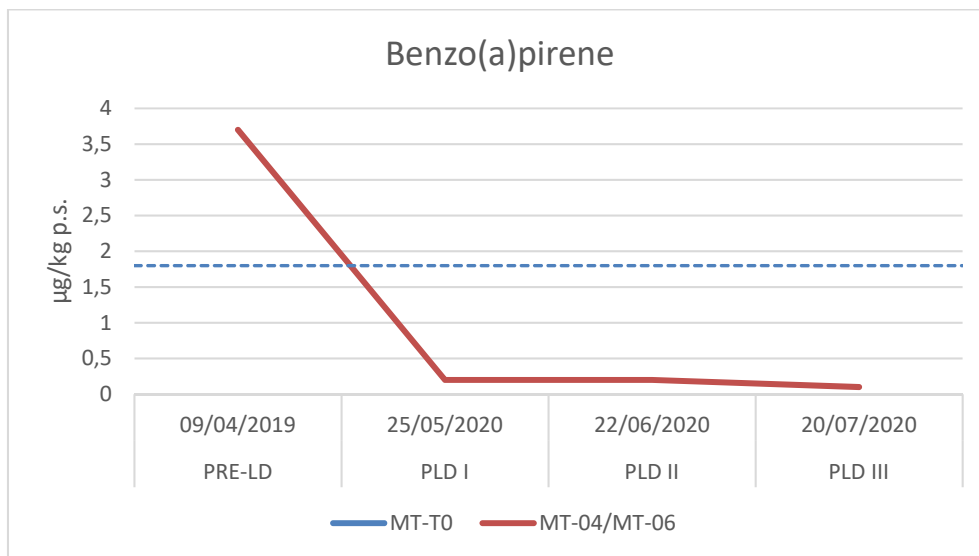


Figura 21 - Andamento delle concentrazioni del benzo(a)pirene ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  su p.s.) nei mitili del Porto di La Spezia

#### 4.1.4 Bioaccumulo di PCB

In Tabella 8 si riportano le concentrazioni di policlorobifenili misurate su tutti i campioni prelevati nel Porto di La Spezia (campagne pre e post lockdown), compreso il campione di mitili analizzato al tempo zero per la campagna pre lockdown, condotta nel mese di aprile 2019.

Tabella 8 – Concentrazioni di PCB (ng/kg su p.s) determinate nei mitili prelevati a La Spezia

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (aprile 2019)	Post Lockdown		
			I campagna 25/05/2020	II campagna 22/06/2020	III campagna 20/07/2020
PCB 101	MT-T0	1533	-	-	-
	MT-01	3404	-	-	-
	MT-02	2426	-	-	-
	MT-03	1997	-	-	-
	MT-04	6194	-	-	-
	MT-05	-	3416	3737	4236
	MT-06	-	3736	5500	4681
	MT-07	-	1858	2092	1894
PCB 118	MT-T0	1103	-	-	-
	MT-01	1916	-	-	-
	MT-02	1363	-	-	-
	MT-03	1348	-	-	-
	MT-04	5251	-	-	-
	MT-05	-	2320	2566	2721
	MT-06	-	2330	3552	3159
	MT-07	-	1190	1305	1308
PCB 126	MT-T0	5.13	-	-	-
	MT-01	9.68	-	-	-
	MT-02	8.17	-	-	-
	MT-03	5.91	-	-	-
	MT-04	19.80	-	-	-
	MT-05	-	15.1	17.2	34.3
	MT-06	-	21.4	17.5	26.3
	MT-07	-	11.8	13.5	17.0
PCB 138	MT-T0	2099	-	-	-
	MT-01	3402	-	-	-
	MT-02	2396	-	-	-
	MT-03	2835	-	-	-
	MT-04	8686	-	-	-
	MT-05	-	3876	4337	3876
	MT-06	-	3771	5408	5030
	MT-07	-	2140	2371	2146
PCB 153	MT-T0	4623	-	-	-
	MT-01	6659	-	-	-
	MT-02	4530	-	-	-
	MT-03	6012	-	-	-
	MT-04	17510	-	-	-
	MT-05	-	8574	9876	8987
	MT-06	-	8632	13489	11889
	MT-07	-	4636	4356	5023
PCB 156	MT-T0	108	-	-	-
	MT-01	173	-	-	-
	MT-02	147	-	-	-
	MT-03	136	-	-	-
	MT-04	477	-	-	-
	MT-05	-	199	228	182

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (aprile 2019)	Post Lockdown		
			I campagna 25/05/2020	II campagna 22/06/2020	III campagna 20/07/2020
	MT-06	-	205	292	237
	MT-07	-	128	129	130
PCB 169	MT-T0	<0.228	-	-	-
	MT-01	<1.38	-	-	-
	MT-02	<1.29	-	-	-
	MT-03	<1.76	-	-	-
	MT-04	<1.95	-	-	-
	MT-05	-	<0.962	2.81	3.37
	MT-06	-	<0.821	<1.28	3.34
	MT-07	-	<0.803	1.76	2.26
PCB 180	MT-T0	433	-	-	-
	MT-01	667	-	-	-
	MT-02	441	-	-	-
	MT-03	415	-	-	-
	MT-04	2027	-	-	-
	MT-05	-	562	640	445
	MT-06	-	593	810	494
	MT-07	-	298	376	286
PCB 28	MT-T0	289	-	-	-
	MT-01	685	-	-	-
	MT-02	1148	-	-	-
	MT-03	187	-	-	-
	MT-04	477	-	-	-
	MT-05	-	252	301	406
	MT-06	-	327	365	297
	MT-07	-	192	236	283
PCB 52	MT-T0	844	-	-	-
	MT-01	2300	-	-	-
	MT-02	2661	-	-	-
	MT-03	1009	-	-	-
	MT-04	2629	-	-	-
	MT-05	-	1884	2150	2320
	MT-06	-	2235	3258	2327
	MT-07	-	914	1200	1933
PCB 77	MT-T0	33.90	-	-	-
	MT-01	77.20	-	-	-
	MT-02	94.90	-	-	-
	MT-03	34.60	-	-	-
	MT-04	98.90	-	-	-
	MT-05	-	58.7	68.4	155
	MT-06	-	80.2	69.5	110
	MT-07	-	32.9	44.8	61.2
PCB 81	MT-T0	<0.270	-	-	-
	MT-01	<1.40	-	-	-
	MT-02	<1.80	-	-	-
	MT-03	<1.45	-	-	-
	MT-04	<1.90	-	-	-
	MT-05	-	<0.870	<0.782	<0.915
	MT-06	-	<0.833	<1.10	<0.797
	MT-07	-	<0.750	<0.791	<0.536
Σ PCB	MT-T0	11072	-	-	-
	MT-01	19295	-	-	-
	MT-02	15218	-	-	-
	MT-03	13984	-	-	-
	MT-04	43374	-	-	-
	MT-05	-	21842	24682	24093

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (aprile 2019)	Post Lockdown		
			I campagna 25/05/2020	II campagna 22/06/2020	III campagna 20/07/2020
	<b>MT-06</b>	-	22578	33775	29116
	<b>MT-07</b>	-	11798	12579	13533

**NOTA:** le stazioni utilizzate per il confronto pre e post lockdown sono colorate rispettivamente in verde e giallo

Come rappresentato in Figura 22 l'andamento delle concentrazioni di PCB, mostra una drastica diminuzione della concentrazione negli organismi prelevati a maggio 2020 ed un successivo incremento. A differenza di quanto osservato per tutti gli altri parametri, nel caso dei PCB le concentrazioni del campione MT-T0 sono sempre inferiori a quelle misurate negli organismi campionati sia nel 2020 che nella campagna di aprile 2019 (stessa campagna del campione T0).

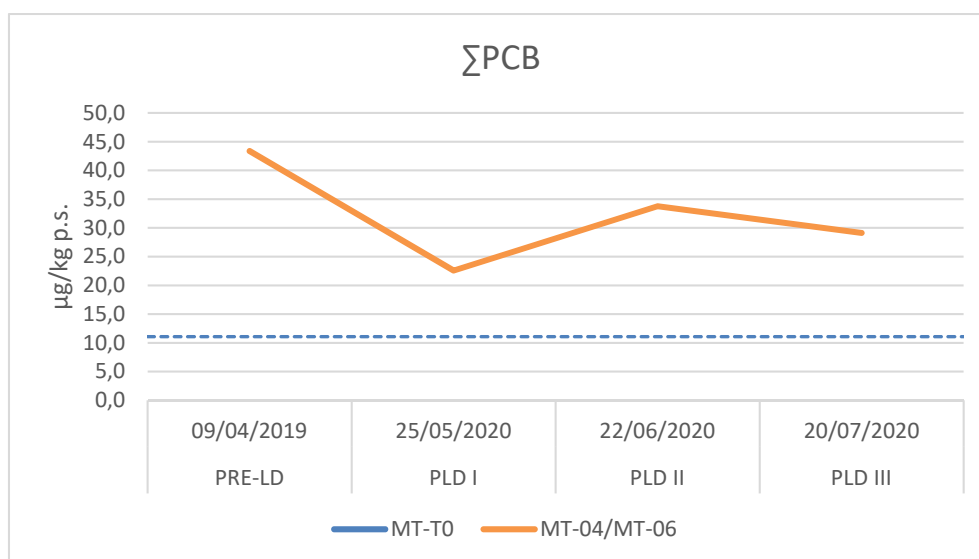


Figura 22 - Andamento della concentrazione della  $\Sigma$  PCB (ng/kg su p.s) nei mitili del Porto di La Spezia

Dall'immagine riportata in Figura 23 si può evidenziare una netta differenza tra gli organismi prelevati all'interno della diga foranea, per cui i valori sono più elevati, rispetto agli organismi provenienti dall'area esterna, nei cui tessuti sono stati rilevati valori molto più bassi.

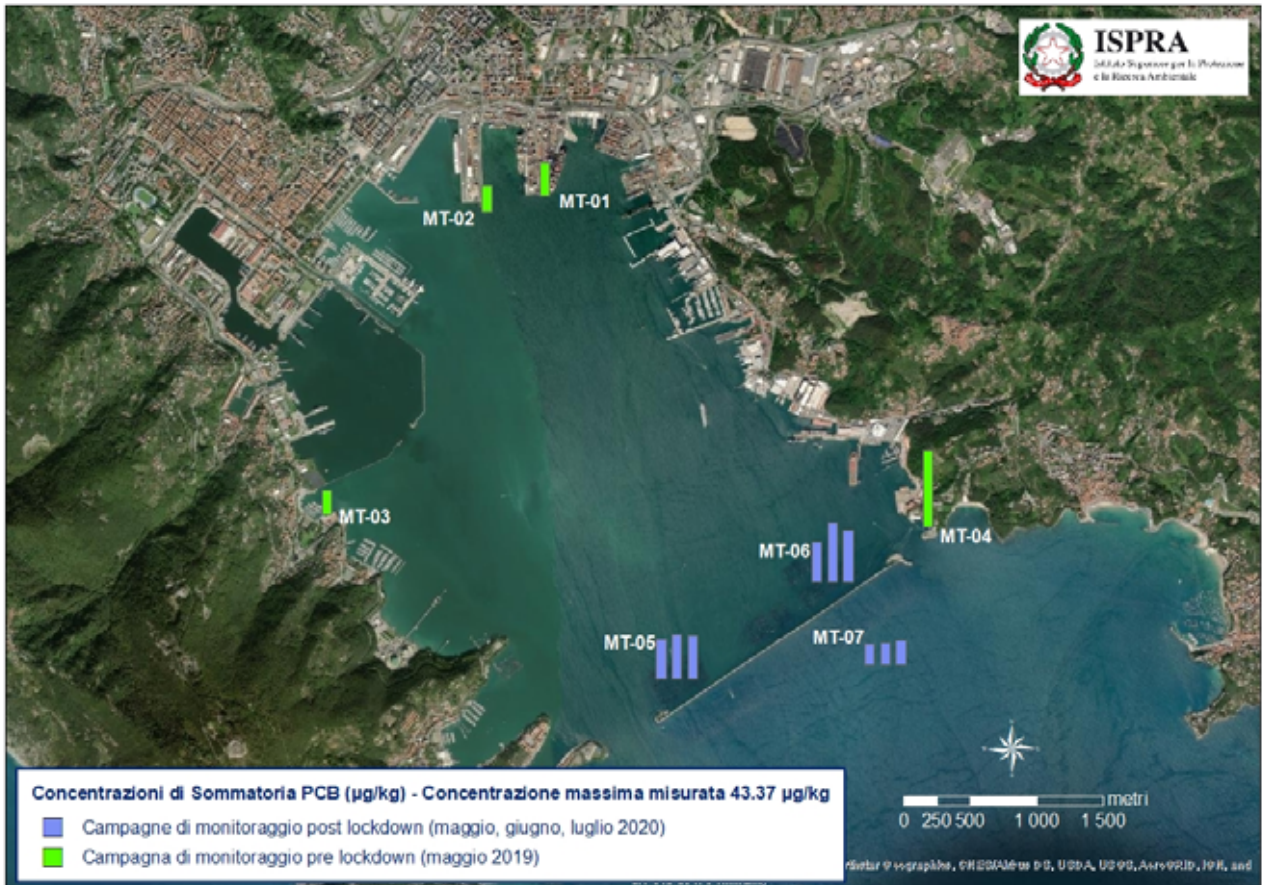


Figura 23 - Andamento delle concentrazioni di PCB ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  su p.s.) nei mitili del Porto di La Spezia

#### **4.1.5 Bioaccumulo di pesticidi organoclorurati**

Le concentrazioni di pesticidi misurate nei tessuti dei mitili prelevati in tutte le stazioni del porto di La Spezia nelle 4 campagne di riferimento, sono risultate sempre inferiori al limite di quantificazione della metodica pari a 0.01 mg/Kg.

#### **4.1.6 Bioaccumulo di TBT**

Analogamente alle determinazioni condotte per i pesticidi, anche la concentrazione del tributilstagno è risultata inferiore al limite di quantificazione della metodica, pari a 5 µg/Kg, in tutti campioni prelevati nelle 4 campagne di riferimento.

## 4.2 Olbia

Nei seguenti paragrafi sono riportati i risultati delle analisi condotte nel sito di Olbia. Si precisa che per confrontare i risultati delle campagne condotte dopo il lockdown è stata selezionata come riferimento una campagna pregressa, condotta indicativamente nella stessa stagione (luglio 2018). Le stazioni eseguite nelle tre campagne post lockdown sono state posizionate in corrispondenza delle stazioni eseguite durante le precedenti campagne.

### 4.2.1 Umidità

In Tabella 9 si riportano i risultati dell'umidità determinata nei campioni di mitili prelevati nel Porto di Olbia.

Tabella 9 - Risultati dell'umidità (g/100g su p.s) nei mitili – Porto di Olbia

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (luglio 2018)	Post Lockdown		
			I campagna (03/06/2020)	II campagna (24/06/2020)	III campagna (17/07/2020)
Umidità %	MT-T0	94.02	-	-	-
	MT-01	75.99	75.68	74.99	77.56
	MT-02	79.22	76.31	74.42	74.53
	MT-03	78.22	74.46	74.28	76.07

### 4.2.2 Bioaccumulo di metalli ed elementi in traccia

In

Tabella 10 si riportano le concentrazioni dei metalli ed elementi in traccia misurate su tutti i campioni prelevati nel Porto di Olbia (campagne pre e post lockdown), compreso il campione di mitili analizzato al tempo zero per la campagna pre lockdown, condotta nel mese di luglio 2018. Tutti i risultati sono inseriti nella tabella con la relativa deviazione standard.

Tabella 10 – Concentrazioni di metalli ed elementi in traccia (mg/kg peso secco) determinati nei mitili prelevati a Olbia

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (luglio 2018)	Post Lockdown		
			I campagna (03/06/2020)	II campagna (24/06/2020)	III campagna (17/07/2020)
As	MT-T0	16.81±2.84	-	-	-
	MT-01	9.29±0.49	10.85±0.8	12.55±1.0	10.80±1.1
	MT-02	8.41±3.27	9.92±1.3	12.33±0.7	9.88±0.3
	MT-03	9.76±0.53	9.95±1.1	11.48±1.0	10.23±0.4
Cd	MT-T0	0.47±0.04	-	-	-
	MT-01	0.33±0.05	0.12±0.03	0.26±0.03	0.19±0.05
	MT-02	0.66±0.21	0.13±0.03	0.24±0.01	0.21±0.01
	MT-03	0.62±0.09	0.11±0.04	0.26±0.01	0.22±0.04
Cr	MT-T0	0.43±0.04	-	-	-
	MT-01	0.47±0.16	0.73±0.05	0.75±0.13	0.37±0.05
	MT-02	0.74±0.1	0.75±0.10	0.46±0.12	0.39±0.04

Parametro	Stazione	Pre Lockdown (luglio 2018)	Post Lockdown		
			I campagna (03/06/2020)	II campagna (24/06/2020)	III campagna (17/07/2020)
	MT-03	0.54±0.07	0.52±0.10	0.52±0.10	0.50±0.06
Cu	MT-T0	3.59±0.36	-	-	-
	MT-01	2.22±0.29	4.54±0.9	4.10±0.47	3.27±0.5
	MT-02	3.63±2.59	3.72±0.6	3.65±0.3	3.45±0.2
	MT-03	1.92±0.29	4.14±0.2	4.55±0.2	3.30±0.4
Hg	MT-T0	0.02±0.01	-	-	-
	MT-01	0.02±0.002	0.03±0.0	0.03±0.002	0.03±0.001
	MT-02	0.04±0.004	0.03±0.0	0.02±0.001	0.04±0.003
	MT-03	0.03±0.003	0.03±0.0	0.02±0.001	0.03±0.002
Ni	MT-T0	0.74±0.03	-	-	-
	MT-01	0.71±0.06	1.70±0.2	0.42±0.08	0.39±0.1
	MT-02	1.27±0.15	1.31±0.2	0.420±0.1	0.57±0.27
	MT-03	0.99±0.13	0.47±0.2	0.24±0.3	0.35±0.10
Pb	MT-T0	0.37±0.11	-	-	-
	MT-01	0.12±0.04	1.51±1.4	0.58±0.19	0.20±0.1
	MT-02	0.26±0.14	0.70±0.1	0.47±0.1	0.34±0.17
	MT-03	0.16±0.08	0.64±0.3	0.49±0.1	0.36±0.07
Zn	MT-T0	85.63±15.24	-	-	-
	MT-01	110.4±15.44	100±14.3	79.6±3.6	75.30±3.5
	MT-02	108.2±21.33	75.80±2.0	86.96±10.9	70.63±4.2
	MT-03	140.62±14.04	74.22±7.5	68.78±7.7	77.97±3.6

In generale, l'andamento delle concentrazioni dei metalli nel porto di Olbia sembra risentire in modo minore degli effetti del lockdown rispetto a quanto rilevato nel porto di La Spezia. Sono pochi i parametri che già dalla prima campagna post lockdown registrano un decremento nei valori della concentrazione, mentre altri subiscono un aumento, seguito nelle fasi successive (in particolare nella terza campagna) da una riduzione, raggiungendo concentrazioni paragonabili a quelle pre lockdown o addirittura inferiori.

Di seguito si riportano i grafici e il commento dell'andamento delle concentrazioni per i singoli metalli ed elementi in traccia analizzati.

La concentrazione dell'arsenico risulta in tutte le campagne di monitoraggio notevolmente più bassa rispetto a quella determinata nei mitili del campione T0 della campagna pre lockdown (Figura 24). Il lockdown sembra non avere effetto sulla concentrazione dell'arsenico, anzi nella seconda campagna del post lockdown si registra la concentrazione più alta osservata nell'arco di tutto il periodo di monitoraggio. Come si può notare dalla Figura 25, le tre stazioni di monitoraggio mostrano lo stesso comportamento, rappresentativo di una situazione piuttosto omogenea in tutto il golfo. Le variazioni osservate potrebbero essere correlate, come già osservato per La Spezia, al ciclo biologico dei mitili, in quanto nel periodo primaverile-estivo si assiste alla prevalente emissione gonadica.



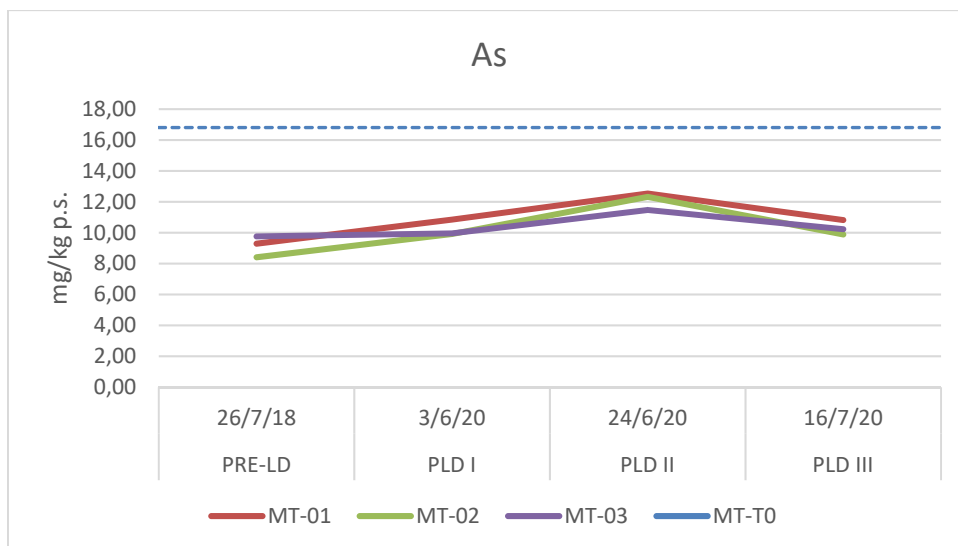


Figura 24 - Andamento della concentrazione di arsenico (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di Olbia

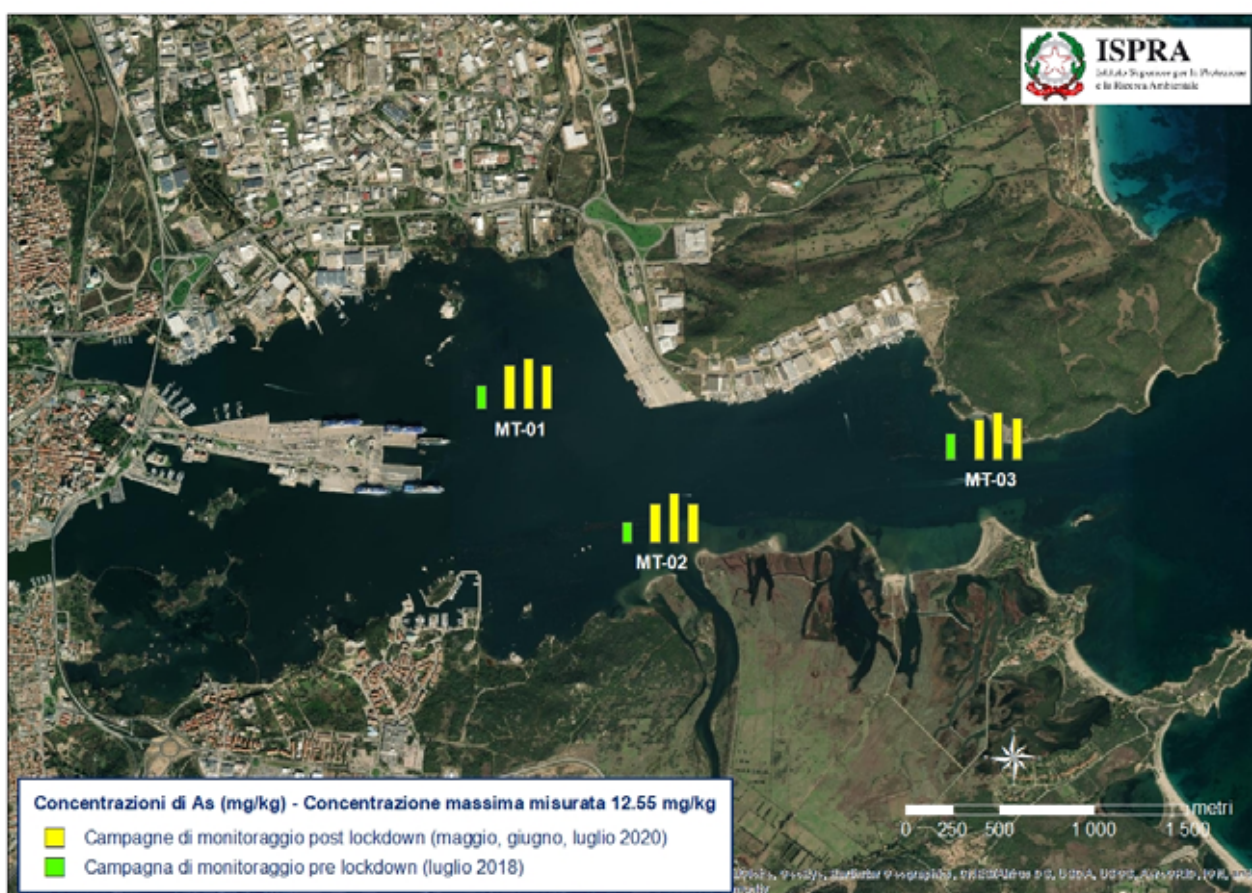


Figura 25 - Andamento delle concentrazioni dell'arsenico nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

Il cadmio è il parametro che sembra risentire maggiormente degli effetti del blocco del traffico navale nel periodo del lockdown (Figura 26). La diminuzione maggiore della concentrazione si registra nella prima campagna di giugno 2020 (Figura 27), a cui segue un lieve aumento nelle due campagne successive, senza però tornare ai valori precedenti al lockdown. Nelle tre stazioni di prelievo questo parametro mostra lo stesso andamento per

l'intero periodo di monitoraggio. Tutte le concentrazioni misurate nel 2020 sono inferiori al valore del campione T0.

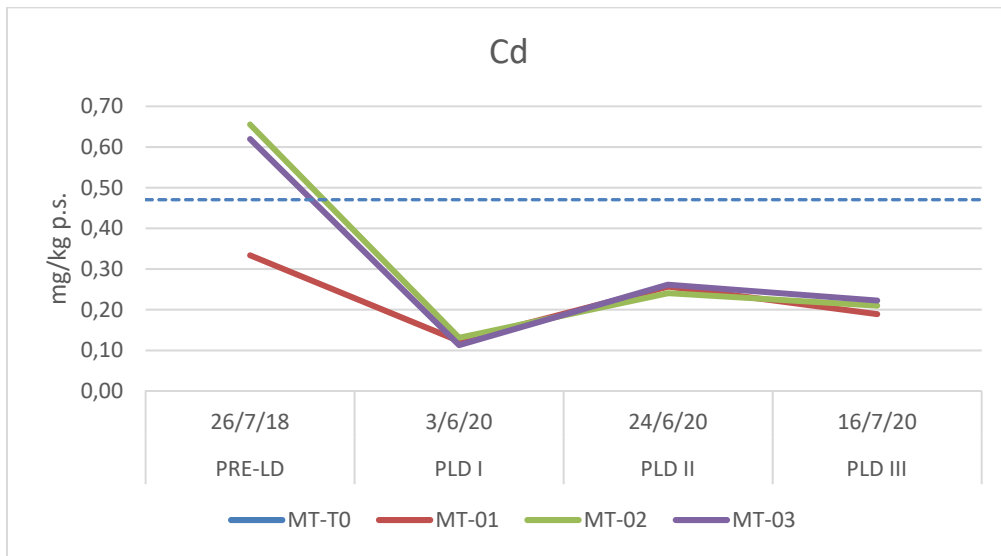


Figura 26 - Andamento delle concentrazioni del cadmio (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di Olbia

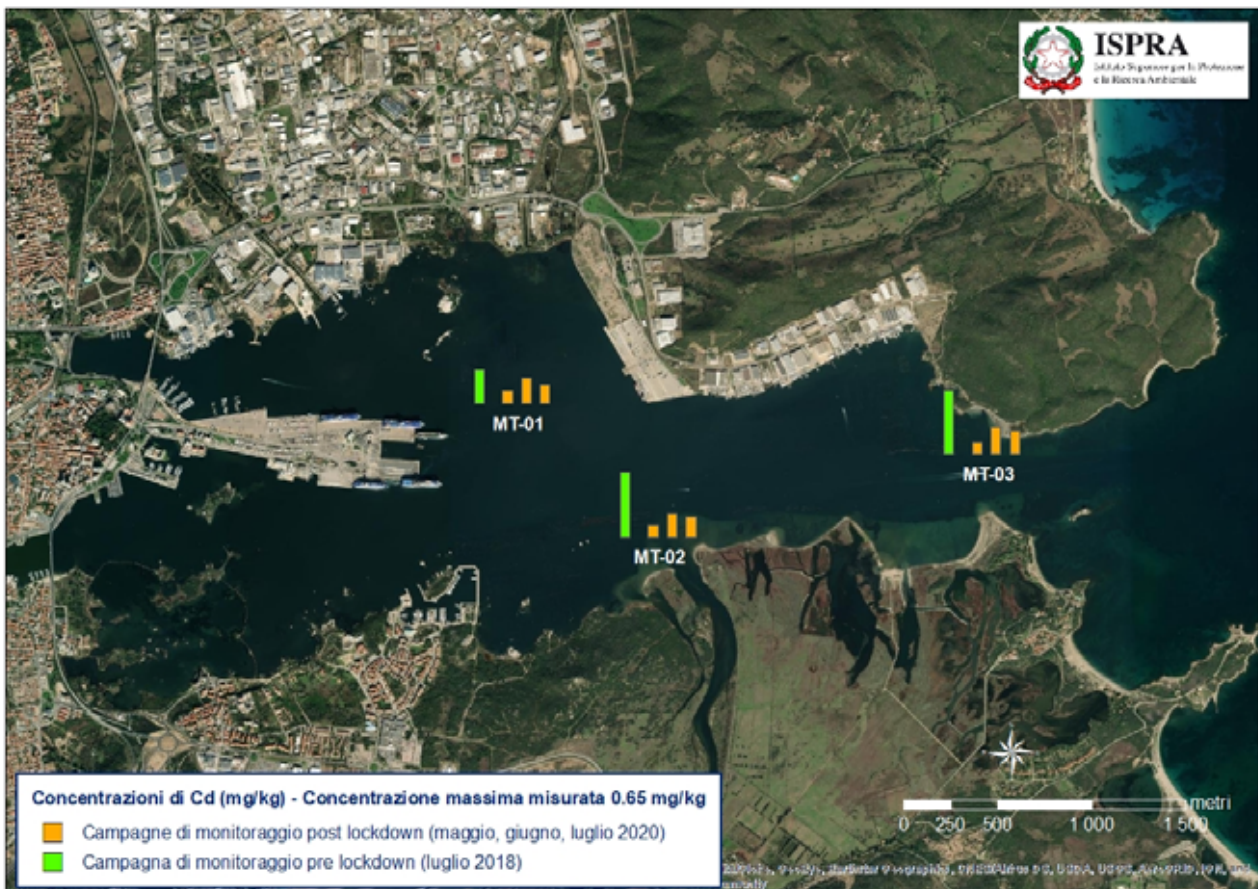


Figura 27 - Andamento delle concentrazioni del cadmio nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

La concentrazione del cromo risulta più alta di quella registrata nei mitili prelevati al tempo

zero, in tutte le campagne, ad eccezione della terza post-lockdown, indicando una presenza di questo metallo in particolare nelle stazioni più interne al Golfo di Olbia (Figura 28). Nella stazione MT-02 la diminuzione della concentrazione si manifesta già a partire dalla prima campagna post lockdown; al contrario nella stazione MT-01 nella stessa campagna la concentrazione del cromo aumenta, mantenendosi sullo stesso valore anche nel successivo campionamento. L'andamento opposto osservato nelle stazioni MT-01 e MT-03 scompare nella ultima campagna di monitoraggio, nella quale si registra la concentrazione più bassa di cromo ritrovata nei mitili prelevati nelle due stazioni. Un andamento ancora diverso si osserva nella stazione MT-03, nella quale la concentrazione del cromo rimane pressoché invariata durante le quattro campagne di monitoraggio (Figura 29).

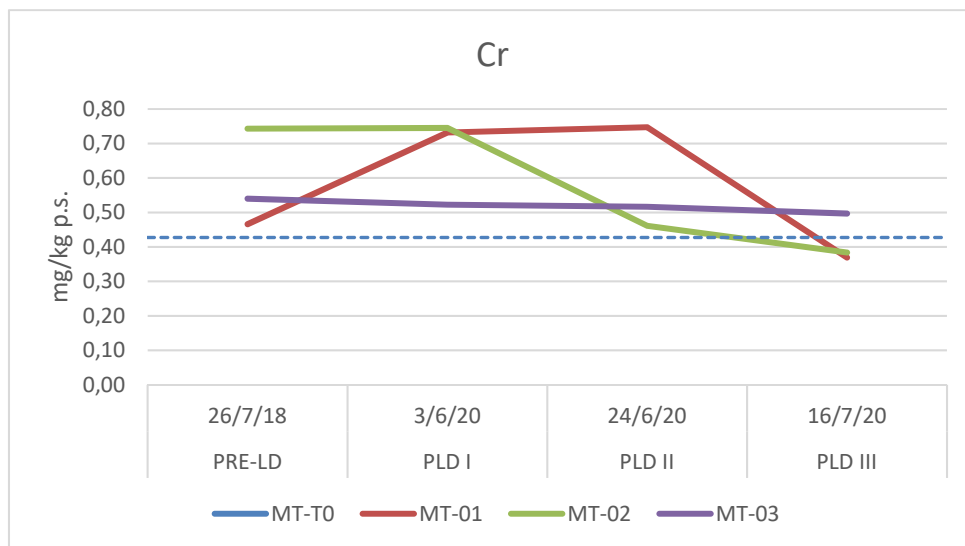


Figura 28 - Andamento delle concentrazioni del cromo (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di Olbia

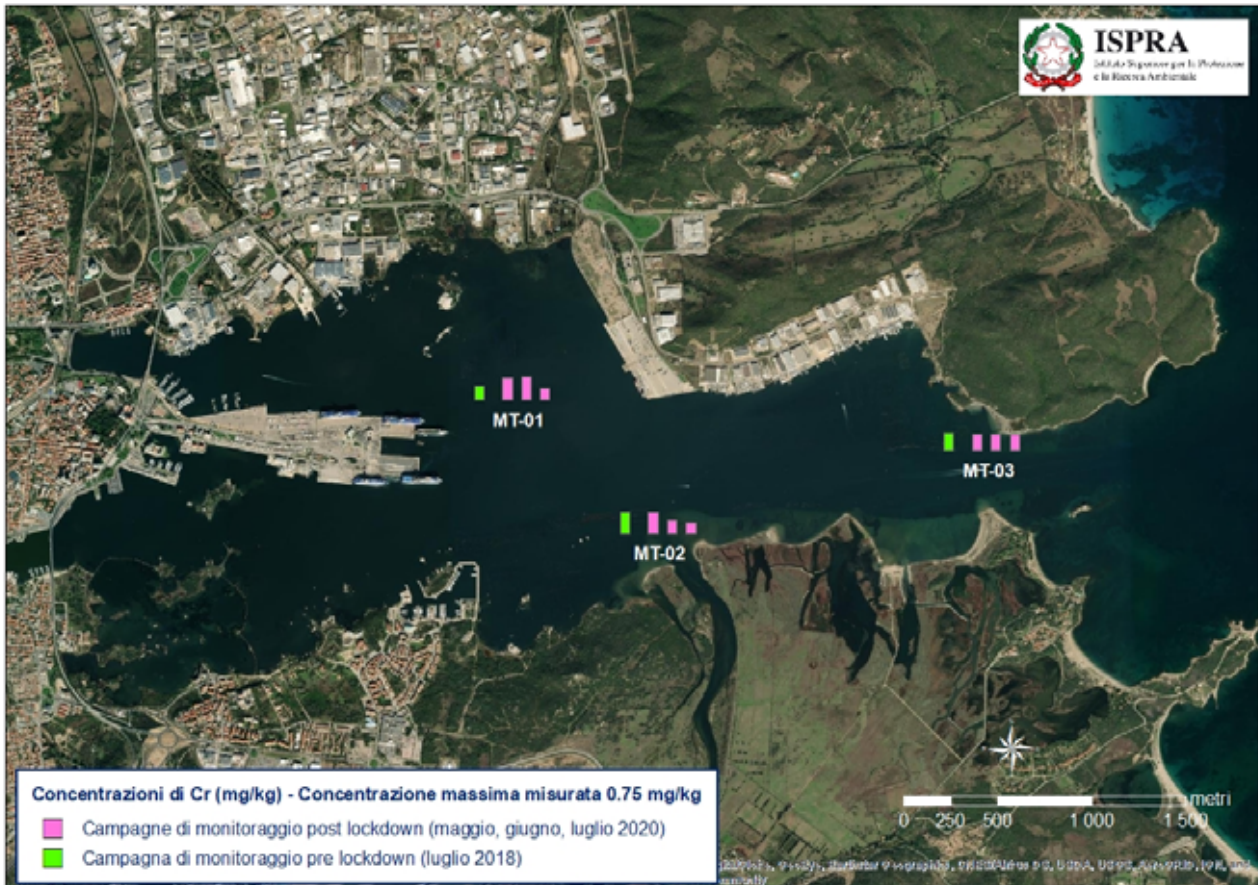


Figura 29 - Andamento delle concentrazioni del cromo nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

Mentre la concentrazione del rame nella stazione MT-02 resta pressoché invariata in tutte le campagne di monitoraggio e paragonabile a quella registrata nei mitili al tempo zero (Figura 30), nelle altre due stazioni si assiste ad aumento delle concentrazioni nelle prime due campagne post lockdown e ad una successiva diminuzione nella terza campagna, senza però tornare ai valori registrati prima del blocco (Figura 31).

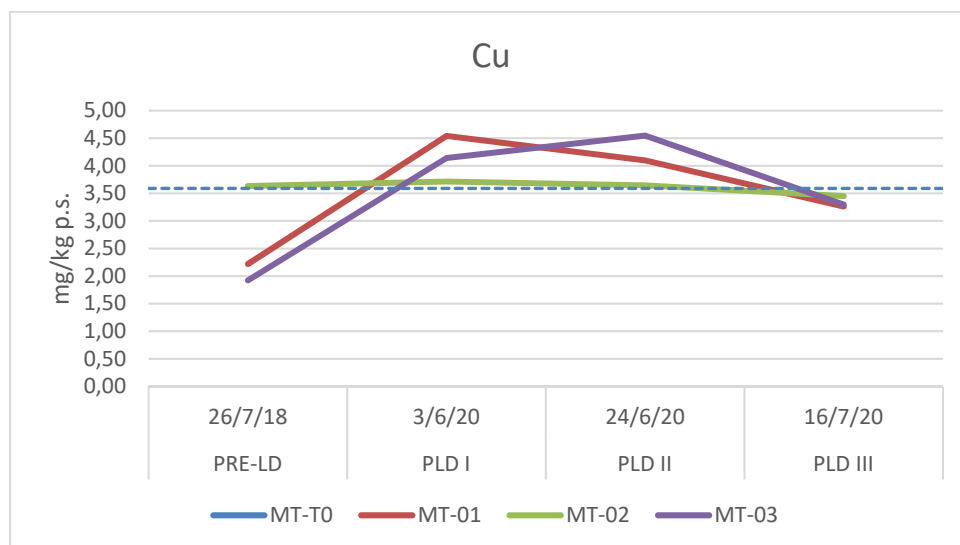


Figura 30 - Andamento delle concentrazioni del rame (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di Olbia

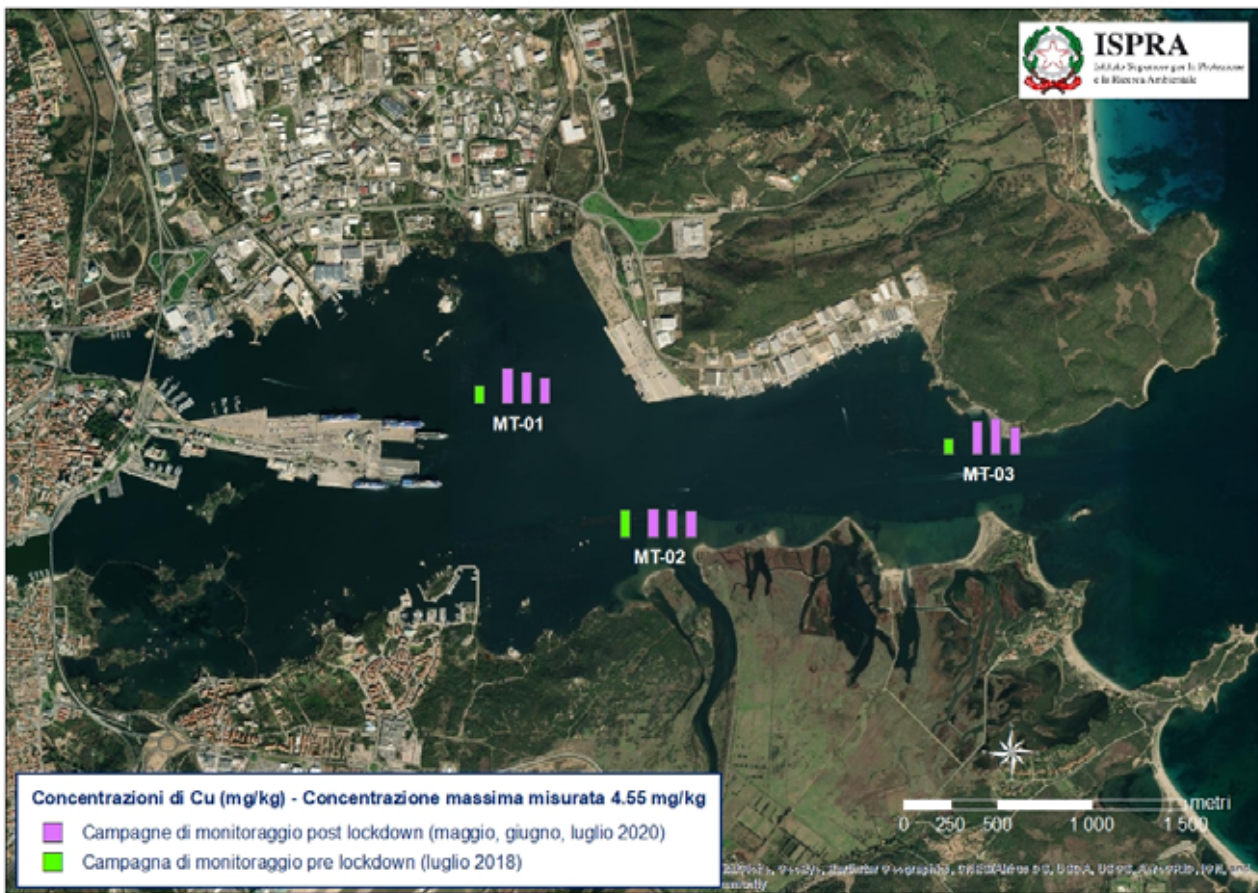


Figura 31 - Andamento delle concentrazioni del rame nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

La concentrazione del mercurio, già piuttosto bassa nella fase precedente al lockdown (Figura 32), subisce una riduzione nella prima e seconda campagna post lockdown nelle stazioni MT-02 e MT-03, mentre nella stazione MT-01 le concentrazioni del mercurio rimangono pressoché invariate prima e dopo il lockdown (Figura 33).

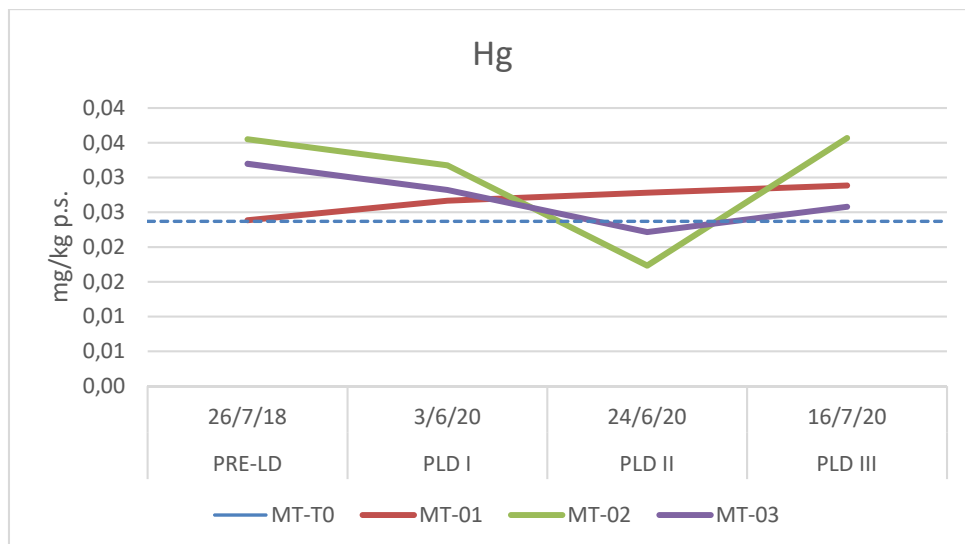


Figura 32 - Andamento delle concentrazioni del mercurio (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di Olbia

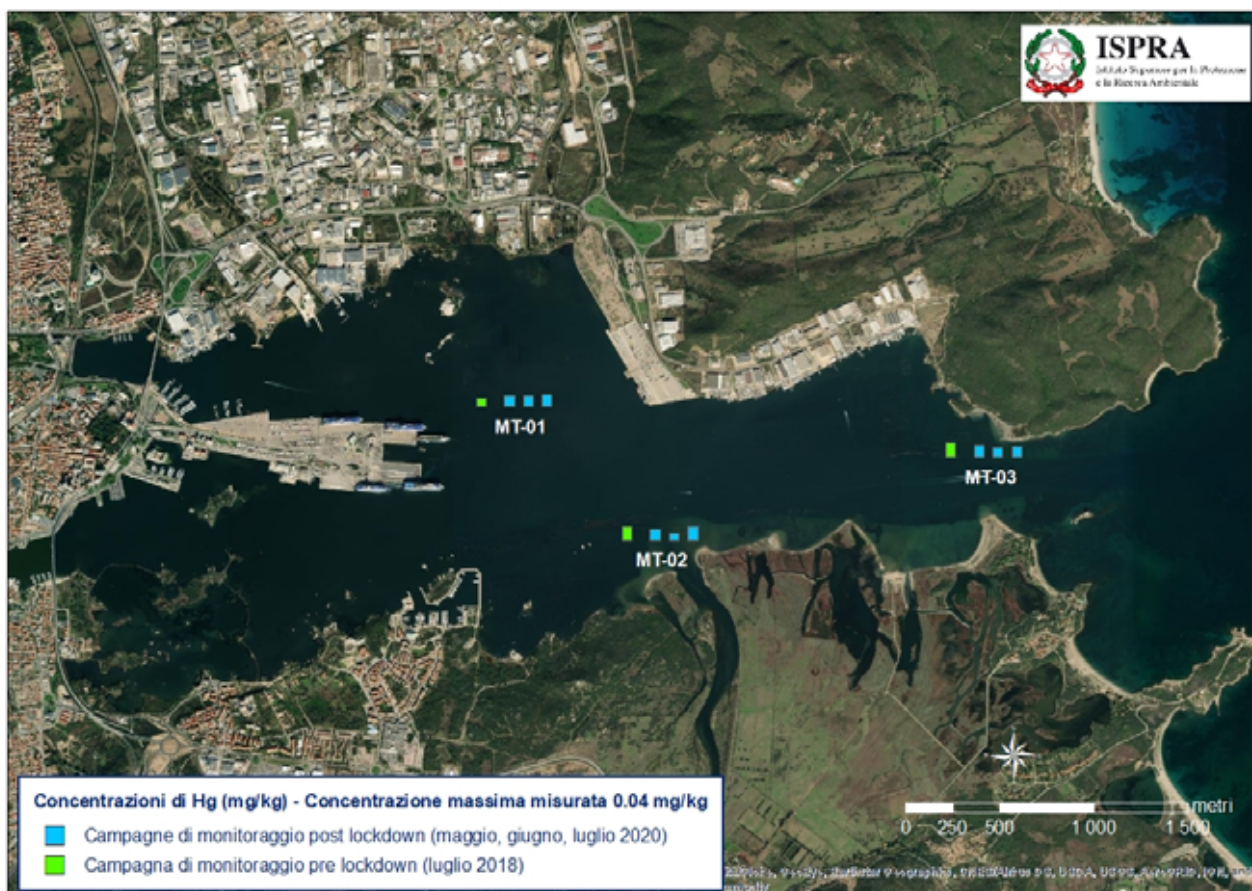


Figura 33 - Andamento delle concentrazioni del mercurio nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

Per quanto riguarda la concentrazione del nichel, nella prima campagna post lockdown si assiste ad un comportamento diverso in tutte e tre le stazioni di monitoraggio (Figura 34 e Figura 35): mentre in MT-01 la concentrazione raddoppia rispetto alla fase precedente al blocco, in MT-02 la concentrazione resta invariata e in MT-03 diminuisce. A partire dalla seconda campagna post lockdown in tutte le stazioni si registra la diminuzione della concentrazione del nichel, anche inferiore al valore registrato nei mitili del campione T0.

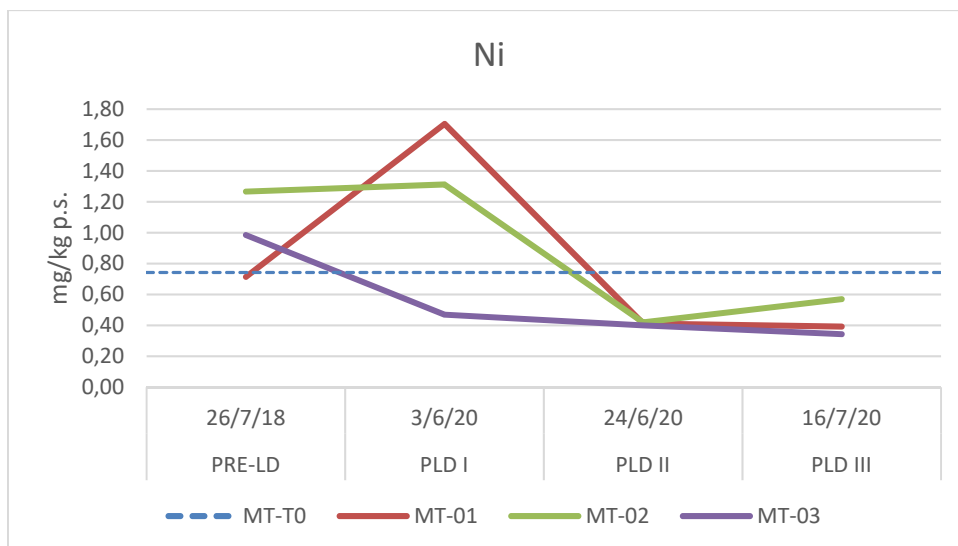


Figura 34 - Andamento delle concentrazioni del nichel (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di Olbia

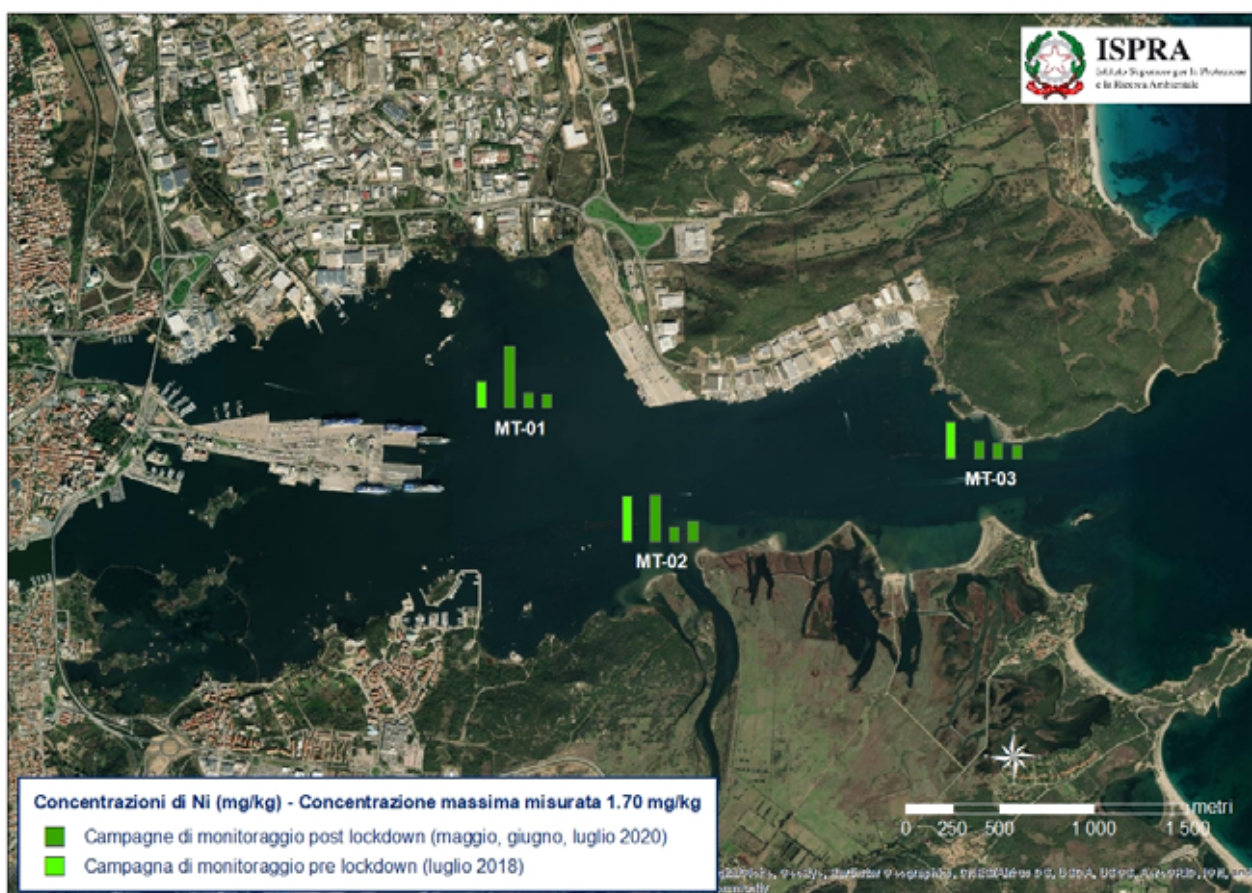


Figura 35 - Andamento delle concentrazioni del nichel nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

Nella prima campagna post lockdown si assiste ad un aumento della concentrazione di piombo in tutte le stazioni di monitoraggio, particolarmente evidente nella stazione MT-01 (Figura 36). A partire dalla seconda campagna post lockdown la concentrazione del piombo diminuisce in tutte le stazioni, tornando nella terza campagna ai valori precedenti al

lockdown (Figura 37).

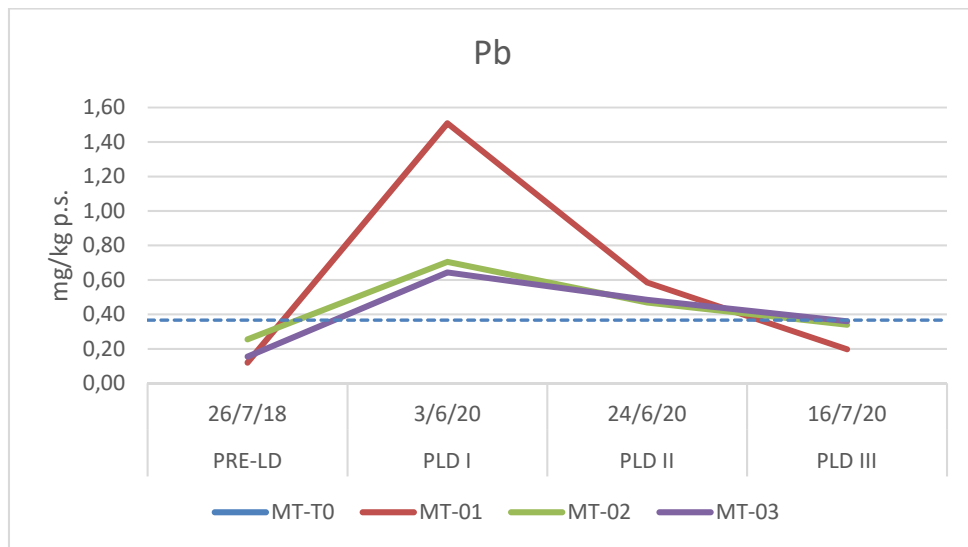


Figura 36 - Andamento delle concentrazioni del piombo (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di Olbia

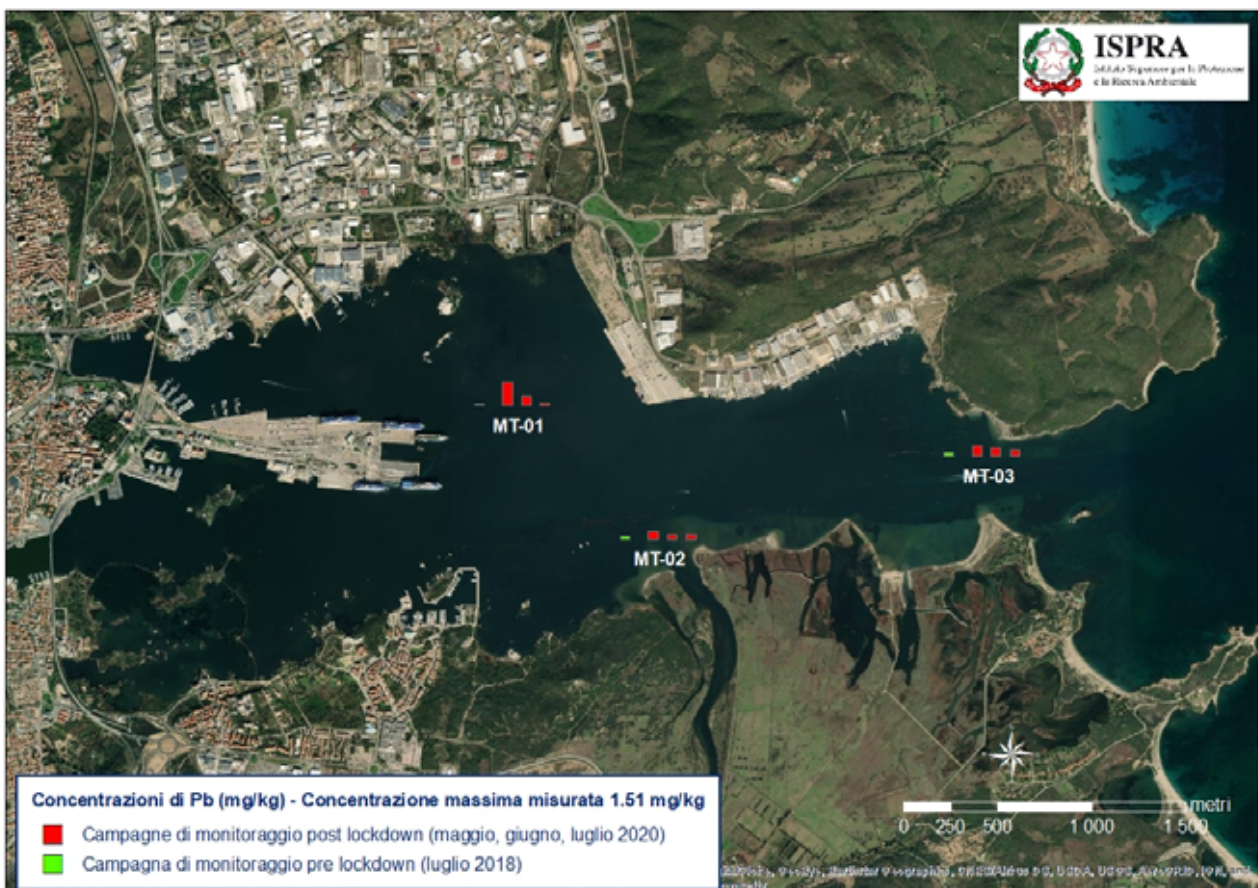


Figura 37 - Andamento delle concentrazioni del nichel nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

La riduzione della concentrazione di zinco si registra a partire dalla prima campagna post lockdown nelle stazioni MT-02 e MT-03, mentre in MT-01 per registrare un calo bisogna attendere la seconda campagna (Figura 38). Nella terza e ultima campagna post lockdown,



in tutte e tre le stazioni, le concentrazioni sono inferiori alla fase precedente al blocco e simili tra loro, ad evidenziare una presenza uniforme di questo metallo in tutto il Golfo di Olbia (Figura 39) ed inferiore a quella registrata nei mitili del campione T0.

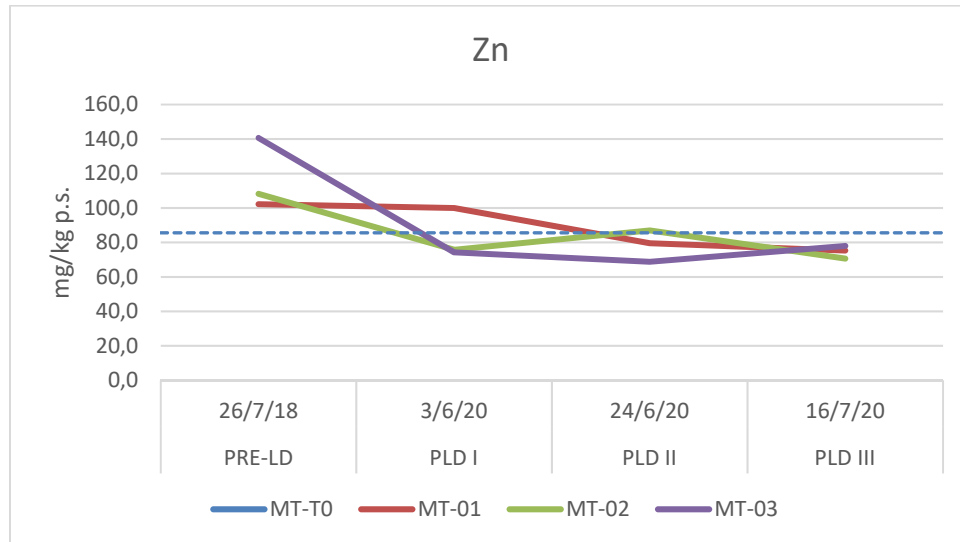


Figura 38 - Andamento delle concentrazioni dello zinco (mg/kg peso secco) nei mitili del Porto di Olbia

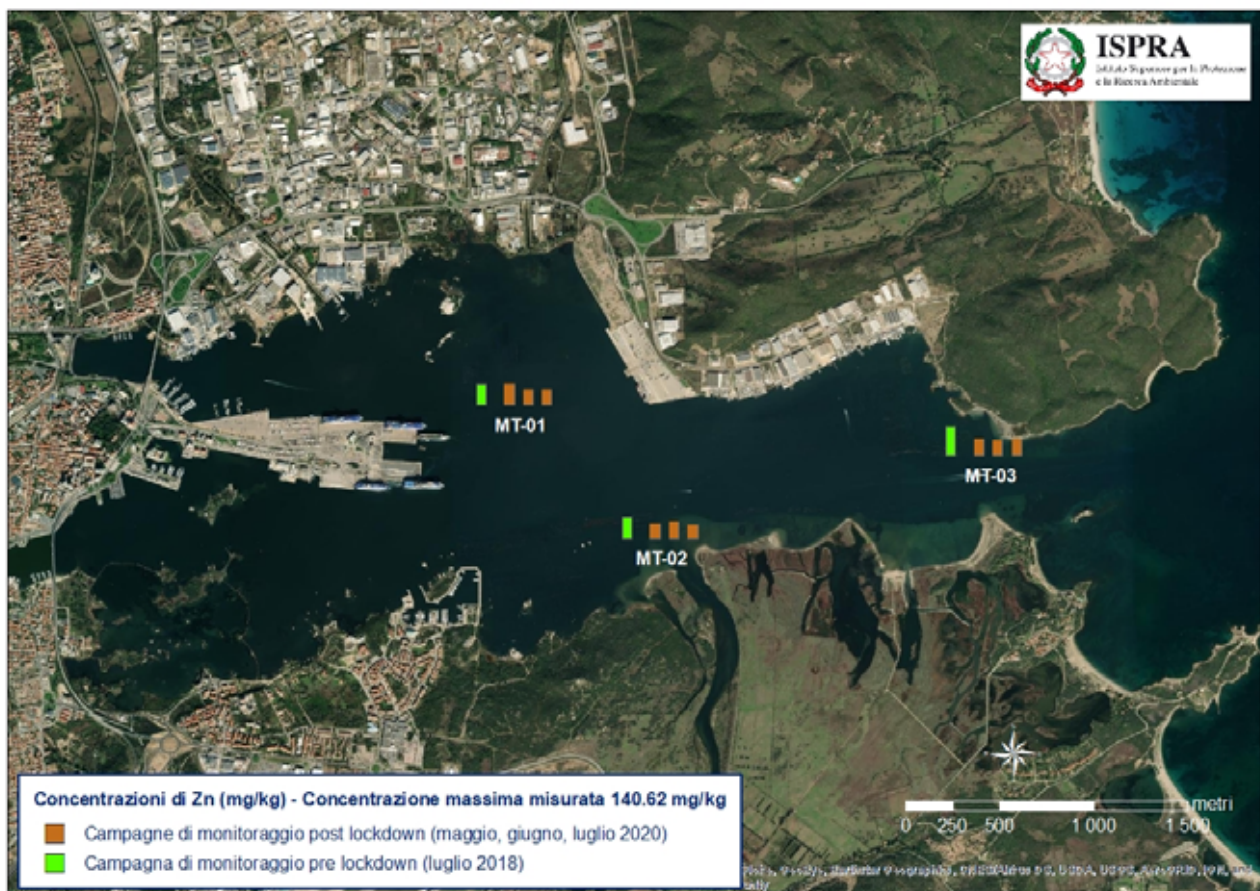


Figura 39 - Andamento delle concentrazioni dello zinco nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

### 4.2.3 Bioaccumulo di Idrocarburi Policiclici Aromatici

In Tabella 11 si riportano le concentrazioni di Idrocarburi Policiclici Aromatici misurate su tutti i campioni prelevati nel Porto di Olbia (campagne pre e post lockdown), compreso il campione di mitili analizzato al tempo zero per la campagna pre lockdown, condotta nel mese di luglio 2018.

In Figura 40 è rappresentato l'andamento delle concentrazioni della sommatoria degli IPA misurate nelle tre stazioni eseguite nella campagna pre lockdown presa come riferimento e nelle tre campagne post lockdown. È inoltre riportato il valore della concentrazione misurata nel campione MT-T0.

Tabella 11 – Concentrazioni di IPA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  su p.s.) determinate nei mitili prelevati nel porto di Olbia

Parametro	Campione	Pre Lockdown	Post Lockdown		
			I campagna	II campagna	III campagna
Acenaftene	MT-T0	<0.2	-	-	-
	MT-01	<0.2	1.3	0.6	0.3
	MT-02	<0.2	1.4	0.6	0.3
	MT-03	<0.2	<0.2	0.5	0.3
Acenaftilene	MT-T0	<0.2	-	-	-
	MT-01	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-02	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-03	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Antracene	MT-T0	0.3	-	-	-
	MT-01	0.4	<0.2	0.4	<0.2
	MT-02	0.4	<0.2	0.7	<0.2
	MT-03	0.3	<0.2	0.3	<0.2
Benzo(a)antracene	MT-T0	0.3	-	-	-
	MT-01	0.3	<0.2	0.4	0.2
	MT-02	0.3	0.2	<0.2	<0.2
	MT-03	0.3	0.2	<0.2	<0.2
Benzo(a)pirene	MT-T0	<0.2	-	-	-
	MT-01	0.2	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-02	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-03	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Benzo(b)fluorantene	MT-T0	0.3	-	-	-
	MT-01	0.4	<0.2	0.2	0.2
	MT-02	0.3	<0.2	0.3	0.2
	MT-03	0.3	<0.2	0.2	0.2
Benzo(g,h,i)perilene	MT-T0	0.3	-	-	-
	MT-01	0.4	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-02	0.3	<0.2	0.2	<0.2
	MT-03	0.4	0.2	<0.2	0.2
Benzo(k)fluorantene	MT-T0	0.2	-	-	-
	MT-01	0.3	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-02	0.2	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-03	0.2	<0.2	0.2	<0.2
Crisene	MT-T0	0.5	-	-	-
	MT-01	0.7	0.2	0.4	0.3
	MT-02	0.5	0.2	0.6	0.2
	MT-03	0.5	0.3	0.4	0.3
Dibenzo(a,h)antracene	MT-T0	<0.2	-	-	-
	MT-01	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2

Parametro	Campione	Pre Lockdown	Post Lockdown		
			I campagna	II campagna	III campagna
	MT-02	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
	MT-03	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Fenantrene	MT-T0	3.0	-	-	-
	MT-01	3.2	2.3	6.5	1.9
	MT-02	3.2	1.8	8.7	1.8
	MT-03	2.8	2.2	6.9	2.0
Fluorantene	MT-T0	0.4	-	-	-
	MT-01	0.5	1.0	3.9	<0.2
	MT-02	0.3	0.8	5.2	<0.2
	MT-03	0.3	<0.2	3.3	<0.2
Fluorene	MT-T0	<0.2	-	-	-
	MT-01	0.2	0.8	1.8	1.0
	MT-02	<0.2	0.9	2.1	1.0
	MT-03	<0.2	1.0	1.7	0.8
Indeno(1,2,3,c,d)pirene	MT-T0	<0.2	-	-	-
	MT-01	<0.2	<0.2	0.4	<0.2
	MT-02	<0.2	0.	0.4	<0.2
	MT-03	0.2	0.4	0.2	<0.2
Naftalene	MT-T0	1.1	-	-	-
	MT-01	0.9	16.8	12.3	11.4
	MT-02	1.1	18.5	11.8	10.6
	MT-03	1.5	12.5	10.7	10.3
Pirene	MT-T0	0.6	-	-	-
	MT-01	1.1	0.9	0.7	0.4
	MT-02	0.8	0.5	1.1	0.6
	MT-03	0.6	0.4	0.8	0.8
Sommatoria IPA	MT-T0	7.0	-	-	-
	MT-01	8.6	23.3	27.5	15.7
	MT-02	7.4	24.5	32.0	14.8
	MT-03	7.4	17.2	24.9	14.8

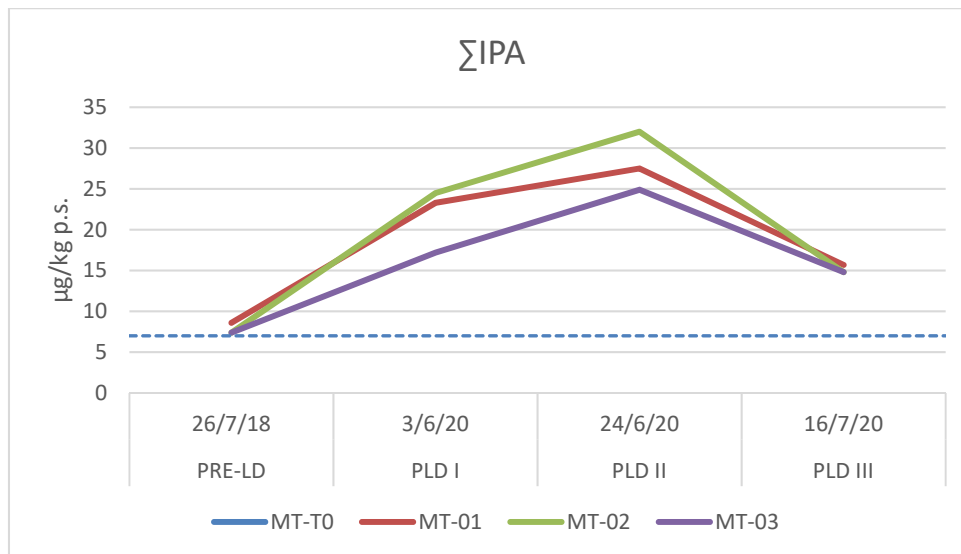


Figura 40 - Andamento delle concentrazioni degli IPA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  su p.s.) nei mitili - Porto di Olbia

In tutte le stazioni di monitoraggio si assiste allo stesso comportamento della sommatoria degli IPA: un aumento graduale fino alla seconda campagna post lockdown, seguito da una diminuzione delle concentrazioni che però restano più alte rispetto al periodo precedente.

Se nella fase pre lockdown il bioaccumulo di IPA era pressoché nullo nelle stazioni di monitoraggio distribuite in tutto il golfo, nel periodo successivo al blocco delle attività si assiste ad un aumento dei livelli di questo parametro in tutta l'area portuale con concentrazioni sempre superiori a quelle ritrovate nei mitili del tempo zero della campagna pre lockdown (Figura 41).

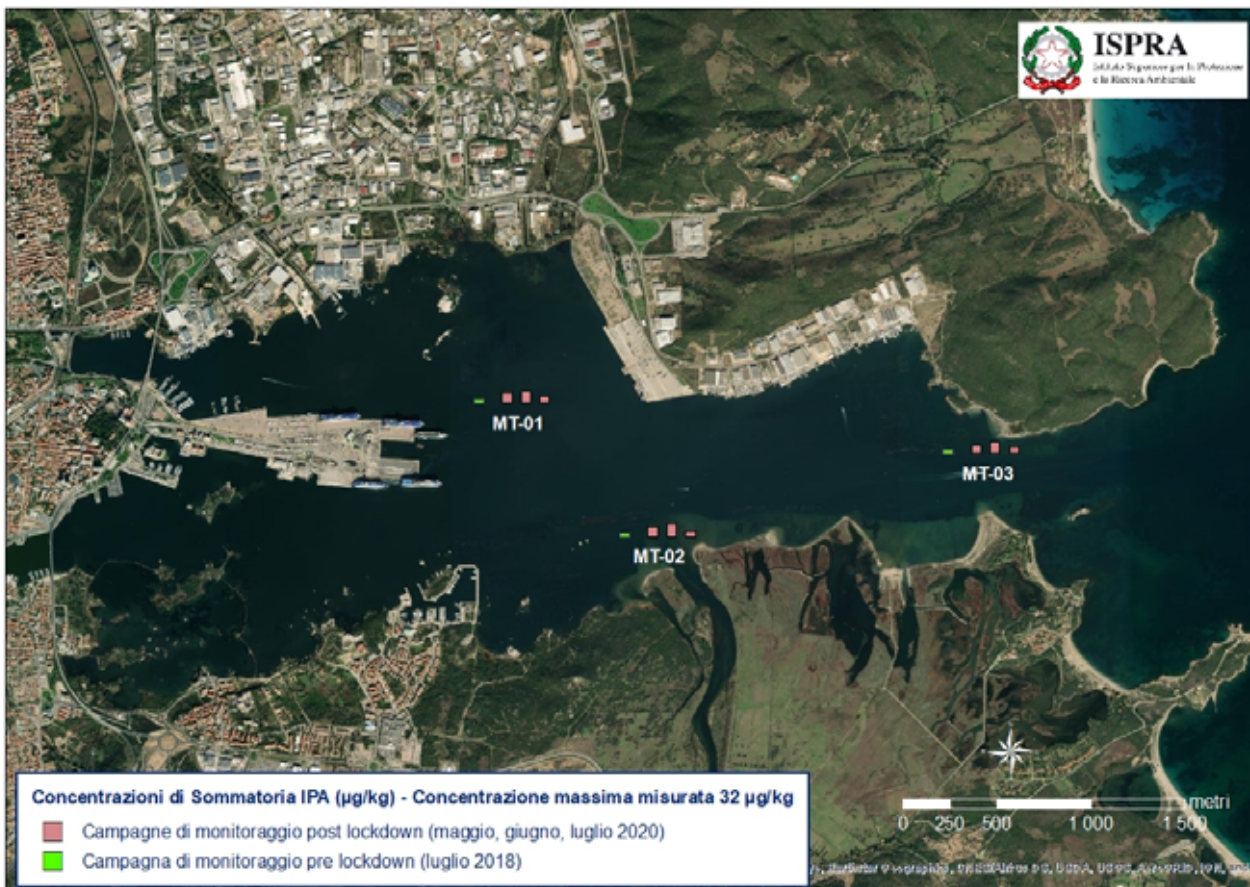


Figura 41 - Andamento delle concentrazioni degli IPA nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

#### 4.2.4 Bioaccumulo di PCB

In Tabella 12 si riportano le concentrazioni di Policlorobifenili misurate su tutti i campioni prelevati nel Porto di Olbia (campagne pre e post lockdown), compreso il campione di mitili analizzato al tempo zero per la campagna pre lockdown, condotta nel mese di luglio 2018.

In Figura 42 è rappresentato l'andamento delle concentrazioni della sommatoria dei PCB misurate nelle tre stazioni eseguite nella campagna pre lockdown presa come riferimento e nelle tre campagne post lockdown. È inoltre riportato il valore della concentrazione misurata nel campione MT-T0.

Tabella 12 - Risultati dei PCB (ng/kg su p.s) determinati nei mitili prelevati a Olbia

Parametro	Campione	Pre Lockdown	Post Lockdown		
			I campagna	II campagna	III campagna
PCB 101	MT-T0	848	-	-	-
	MT-01	654	661	1004	619
	MT-02	700	621	739	708
	MT-03	685	715	581	584
PCB 118	MT-T0	705	-	-	-
	MT-01	446	573	1003	643
	MT-02	596	560	633	948
	MT-03	563	637	708	584
PCB 126	MT-T0	4.16	-	-	-
	MT-01	2.70	2.81	5.76	3.44
	MT-02	3.73	3.23	3.67	4.66
	MT-03	3.13	3.49	3.53	3.14
PCB 138	MT-T0	1040	-	-	-
	MT-01	733	597	748	425
	MT-02	1052	476	720	706
	MT-03	979	538	496	638
PCB 153	MT-T0	2108	-	-	-
	MT-01	1254	1497	1856	1097
	MT-02	2106	1223	1673	1820
	MT-03	1765	1251	1067	1421
PCB 156	MT-T0	56.6	-	-	-
	MT-01	36.7	43.9	67.6	49.1
	MT-02	49.4	40.8	49.3	78.1
	MT-03	42.5	48.8	60.1	45.2
PCB 169	MT-T0	0.748	-	-	-
	MT-01	0.501	<0.528	<1.99	<0.863
	MT-02	<0.808	<1.43	<1.06	<0.836
	MT-03	0.33	<1.53	<0.934	<0.499
PCB 180	MT-T0	128	-	-	-
	MT-01	112	95.0	148	67.5
	MT-02	81.5	81.5	134	113
	MT-03	71.2	102	83.8	82.1
PCB 28	MT-T0	130	-	-	-
	MT-01	252	165	245	189
	MT-02	67.0	247	114	230
	MT-03	57.6	255	210	80.4
PCB 52	MT-T0	618	-	-	-
	MT-01	716	584	969	493
	MT-02	308	647	520	603
	MT-03	329	579	442	325
PCB 77	MT-T0	19.5	-	-	-
	MT-01	14.5	17.1	19.6	22.5
	MT-02	13.3	14.6	17.8	28.5
	MT-03	12.7	17.6	25.4	16.4
PCB 81	MT-T0	<0.150	-	-	-
	MT-01	<0.271	<0.519	<1.43	<0.902
	MT-02	<0.730	<1.16	<1.04	<0.988
	MT-03	0.340	<1.23	<0.821	<0.448
Σ PCB	MT-T0	5658	-	-	-
	MT-01	4222	4353	6208	3694
	MT-02	4979	4010	4740	5345
	MT-03	4508	4243	3760	3898

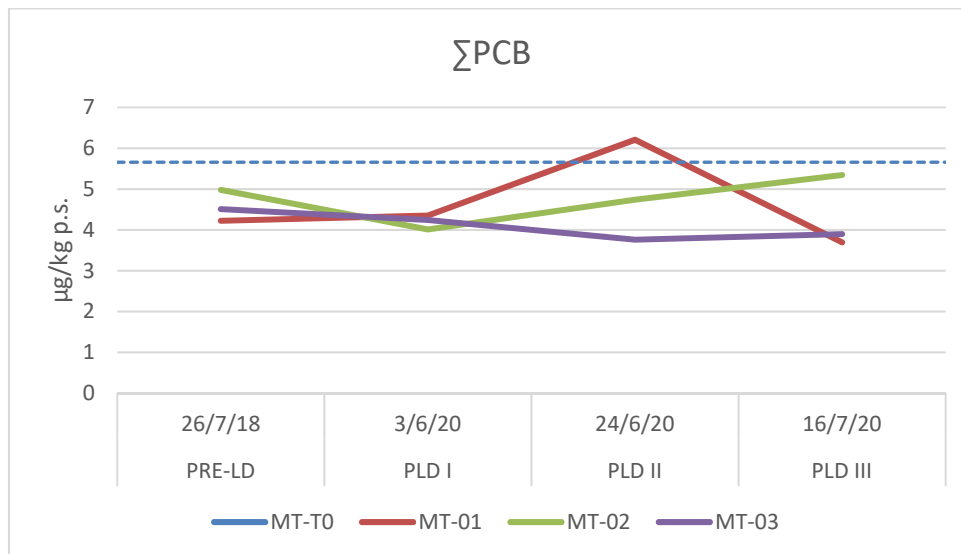


Figura 42 - Andamento delle concentrazioni dei PCB (µg/Kg su p.s.) nei mitili del Porto di Olbia

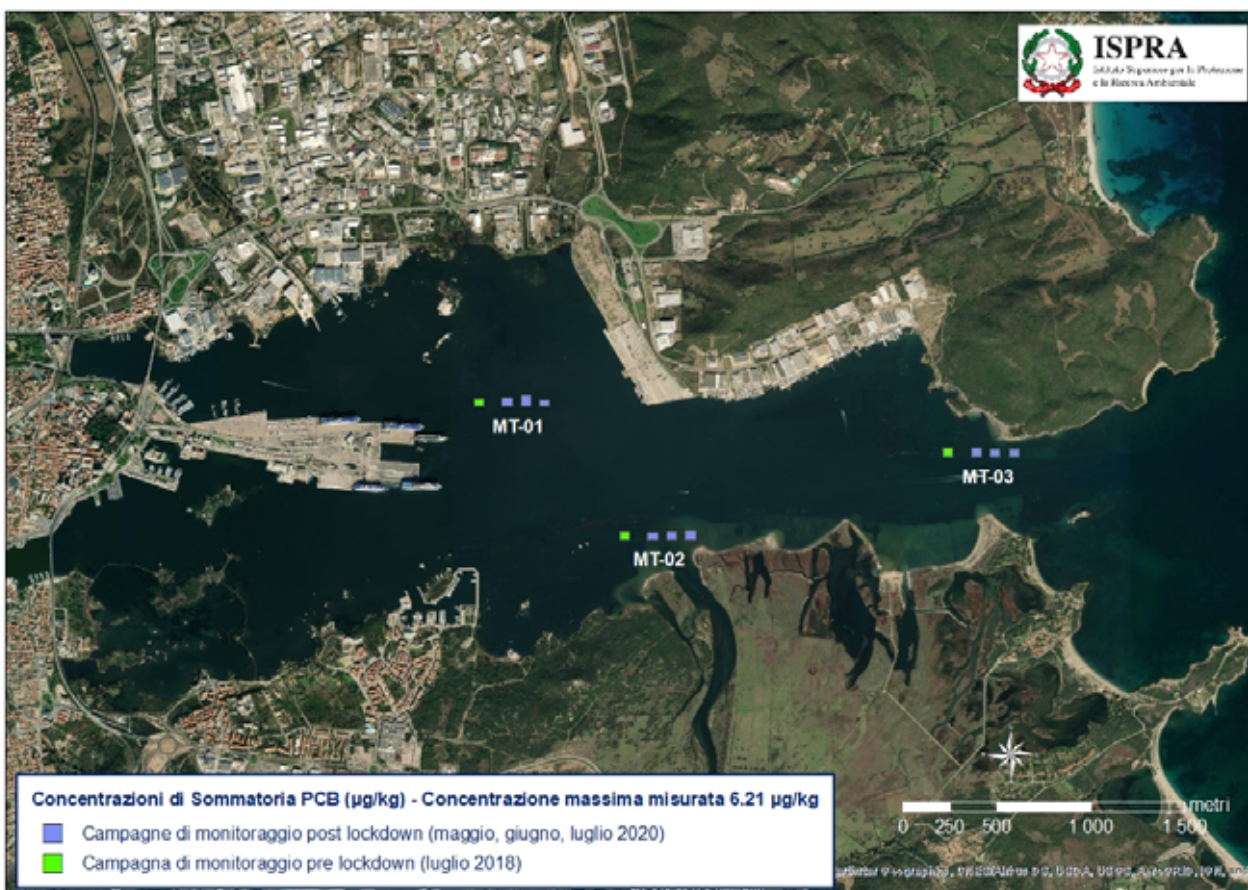


Figura 43 - Andamento delle concentrazioni di PCB nelle campagne di monitoraggio del 2020 e nella campagna di riferimento del mese di luglio 2018

La concentrazione dei PCB sembra non risentire particolarmente degli effetti del lockdown: le concentrazioni restano abbastanza simili in tutte le stazioni nel corso delle quattro campagne di monitoraggio e inferiori al valore determinato nei mitili prelevati al tempo zero

della campagna pre lockdown con l'eccezione della stazione MT-01 che nella seconda campagna post lockdown fa registrare il superamento di questo valore (Figura 43).

#### **4.2.5 Bioaccumulo di pesticidi organoclorurati**

Le concentrazioni di pesticidi misurate nei tessuti dei mitili prelevati in tutte le stazioni del porto di Olbia nelle 4 campagne di riferimento, sono risultate sempre inferiori al limite di quantificazione della metodica pari a 0.01 mg/Kg.

#### **4.2.6 Bioaccumulo di TBT**

Analogamente alle determinazioni condotte per i pesticidi, anche la concentrazione del tributilstagno è risultata inferiore al limite di quantificazione della metodica, pari a 5 µg/Kg, in tutti campioni prelevati nelle 4 campagne di riferimento.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel sito di La Spezia, dall'analisi dei risultati e dei grafici riportati nel capitolo 4, è emerso piuttosto chiaramente un effetto positivo sulla qualità delle acque legato al lockdown. In generale, per tutti i metalli, ad eccezione dell'arsenico, si è osservata una drastica diminuzione della concentrazione nella stazione MT-06, scelta come riferimento, rispetto ai valori misurati nella stazione MT-04 della campagna di aprile 2019.

Tale diminuzione è particolarmente evidente nei risultati della campagna di maggio 2020; successivamente è stato osservato per qualche caso un nuovo leggero incremento delle concentrazioni, che potrebbe essere associabile alla ripresa del traffico navale e delle attività portuali.

Anche per quanto concerne gli IPA, nel corso delle tre campagne del 2020 si è verificata una costante diminuzione delle concentrazioni della sommatoria totale, testimonianza di una reale diminuzione della presenza di tali contaminati nelle acque della Rada di La Spezia.

Dall'analisi dei rapporti delle concentrazioni (Tabella 13) di alcuni IPA rilevati nei tessuti dei mitili, emerge una generale contaminazione legata a processi di combustione di biomasse legnose, erba e/o carbone ed emissioni diesel ( $FLA / (FLA + PYR) > 0,5$  e  $FL / (FL + PYR) > 0,5$ ) in tutte le campagne, ad eccezione delle stazioni MT-05 e MT-06 durante la seconda campagna di monitoraggio, dove i rapporti tra  $FLA / (FLA + PYR) < 0,5$  e  $FL / (FL + PYR) < 0,5$  suggeriscono un'origine della contaminazione legata a *spill* di petrolio e a processi di combustione di combustibili fossili (Ravindra *et al.*, 2008; De La Torre-Roche, *et al.*, 2009). L'origine della contaminazione in questo caso è in linea con quanto è lecito attendersi all'interno di un porto commerciale come quello di La Spezia ed è confermata dal rapporto  $IcdP / (IcdP + BghiP)$  che per queste stazioni risulta compreso tra 0,4 e 0,5 (Yunker *et al.*, 2002). La componente petrogenica della contaminazione per le stazioni all'interno del porto di La Spezia è confermata anche dai rapporti  $ANT / (ANT + PHE)$  e  $BaA / (BaA + CHR)$ , inferiori rispettivamente a 0,1 e 0,2 (Yunker *et al.*, 2002; Pies *et al.*, 2008).

Anche la stazione MT-07, stazione di controllo ubicata all'esterno della diga foranea, presenta una contaminazione simile e in taluni casi superiore sia per IPA sia per PCB rispetto alle stazioni posizionate all'interno del Porto di La Spezia.



Tabella 13 – Rapporti tra le concentrazioni dei principali IPA misurati

		FL/(FL+PYR)	FLA/(FLA+PYR)	ANT /(ANT+PHE)	BaA/(BaA+CHR)	IcdP/(IcdP + BghiP)
I Campagna	MT-07	0.76	0.76	0.041	nd	0.711
	MT-06	0.46	0.53	0.039	nd	0.56
	MT-05	0.57	0.52	0.042	nd	0.5
II Campagna	MT-07	0.55	0.63	nd	nd	0.81
	MT-06	0.20	0.42	0.077	0.17	0.53
	MT-05	0.24	0.43	0.070	0.094	0.48
III Campagna	MT-07	0.62	0.65	nd	0.11	0.47
	MT-06	0.50	0.59	nd	nd	0.44
	MT-05	0.75	0.77	nd	0.22	0.6

Nota: Nota: FL=Fluorene; PYR=Pirene; FLA=Fluorantene; ANT=Antracene; PHE= Fenantrene; BaA=Benzo(a)Antracene; CHR=Crisene; IcdP=Indeno(1,2,3-c,d)Pirene; BghiP=Benzo(g,h,i)Perilene. nd=non determinabile.

In analogia con quanto descritto per metalli ed elementi in traccia ed IPA, anche le concentrazioni dei PCB rilevate nei tessuti degli organismi analizzati, sono diminuite in maniera evidente nella prima campagna post lockdown rispetto alla campagna di riferimento (circa dimezzati). Nelle successive campagne la concentrazione è aumentata nuovamente, pur non tornando ai livelli misurati nella campagna di riferimento.

Si può pertanto affermare che gli organismi analizzati nel porto di La Spezia durante il lockdown hanno accumulato un quantitativo minore di contaminanti rispetto a quanto misurato in precedenza. Si è osservato anche che la ripresa delle attività portuali ha determinato, seppur in maniera moderata, un nuovo incremento dei parametri ricercati nei tessuti dei mitili, segno che il possibile miglioramento della qualità ambientale è stato effettivamente ristretto al momento di completa inattività portuale.

Dai risultati ottenuti dalle analisi condotte sugli organismi prelevati nel porto di Olbia invece non emerge un quadro chiaro degli effetti del lockdown. In generale le concentrazioni misurate negli organismi prelevati ad Olbia sono infatti più basse rispetto a quelle degli organismi degli impianti di La Spezia e le loro variazioni non sono particolarmente significative. Non si osservano pertanto effetti evidenti attribuibili al lockdown ed alla riduzione del traffico navale. Si precisa, però, che tali risultati potrebbero essere condizionati dal fatto che la prima campagna post lockdown ad Olbia è stata eseguita nei primi giorni di giugno, dopo l'iniziale ripresa delle attività. Il ritardo nell'esecuzione della prima campagna di monitoraggio ad Olbia è imputabile alle limitazioni imposte alle attività lavorative ed agli spostamenti tra regioni, che hanno ostacolato l'organizzazione delle attività di prelievo e trasferimento dei mitili presso la sede di Livorno.

Volendo comunque procedere ad una analisi di maggiore dettaglio, per quanto riguarda i

metalli, soltanto il cadmio e lo zinco sembrano diminuire, sebbene in maniera moderata, negli organismi prelevati nel corso delle campagne effettuate nel 2020. È interessante notare, rispetto alla fase pre lockdown, l'incremento significativo nella prima data di campionamento di nichel, piombo e cromo, inquinanti tipici della cantieristica navale (saldature, verniciature, riparazioni ecc.) e del rame, metallo contenuto negli antivegetativi. Questo incremento nei tessuti può essere attribuibile alla ripresa delle attività di cantiere al termine del lockdown.

Per quanto riguarda i composti organici, sia IPA che PCB, si evidenzia un generale incremento delle concentrazioni rinvenute nei tessuti dei mitili tra la prima e la seconda campagna di monitoraggio. Questo risultato è compatibile con l'intensificarsi di traffici commerciali nel Golfo di Olbia al termine del lockdown (a partire da giugno 2020) ed è essenzialmente legato all'incremento delle concentrazioni di due molecole a tre anelli di condensazione: Fenantrene e Fluorantene.

Nella terza campagna di monitoraggio le concentrazioni totali di PCB ed IPA tornano nuovamente a scendere e in generale, per gli IPA, le concentrazioni più elevate sono state rilevate nella stazione ubicata all'interno del Porto (MT-01). Per quanto riguarda i PCB, le concentrazioni più alte sono associate alla stazione ubicata all'interno del Porto (MT-01), per la prima e seconda campagna di monitoraggio e nella stazione collocata in prossimità del fiume Padrongianus (MT-02), in riferimento alla terza campagna di monitoraggio. Questo dato suggerisce, per il monitoraggio effettuato nel mese di giugno, un possibile dilavamento dai terreni di questa classe di inquinanti e il conseguente trasporto, per mezzo del corso d'acqua, nel golfo di Olbia.

L'analisi dei rapporti delle concentrazioni di alcuni IPA riscontrati nei tessuti dei mitili analizzati quali  $FL/(FL+PYR) > 0,5$  e  $BaA/(BaA+CHR) > 0.35$  suggeriscono un'origine degli IPA sostanzialmente legata ai processi di combustione ed emissione veicolare (Ravindra *et al.*, 2008; Akyüz and Çabuk, 2010) sebbene i rapporti tra  $IcdP/(IcdP + BghiP)$  e  $FLA/(FLA+PYR)$ , in riferimento alla prima e seconda campagna di monitoraggio, suggeriscano un contributo alla contaminazione da IPA nei mitili causata da processi di combustione di biomasse come erba, legno e carbone (Younker *et al.* 2002; De La Torre-Roche, *et al.*, 2009).

Tabella 14 – Rapporti tra le concentrazioni dei principali IPA misurati

		<b>FL/ (FL+PYR)</b>	<b>FLA/ (FLA+PYR)</b>	<b>ANT/ (ANT+PHE)</b>	<b>BaA/ (BaA+CHR)</b>	<b>IcdP/ (IcdP + BghiP)</b>
I Campagna	MT-01	0.47	0.53	nd	nd	nd
	MT-02	0.64	0.62	nd	0.5	nd
	MT-03	0.71	nd	nd	0.4	0.68
II Campagna	MT-01	0.72	0.85	0.058	0.5	nd
	MT-02	0.66	0.83	0.074	nd	0.67
	MT-03	0.68	0.80	0.042	nd	nd
III Campagna	MT-01	0.71	nd	nd	0.4	nd
	MT-02	0.63	nd	nd	nd	nd
	MT-03	0.5	nd	nd	nd	nd

Nota: Nota: FL=Fluorene; PYR=Pirene; FLA=Fluorantene; ANT=Antracene; PHE= Fenantrene; BaA=Benzo(a)Antracene; CHR=Crisene; IcdP=Indeno(1,2,3-c,d)Pirene; BghiP=Benzo(g,h,i)Perilene. nd=non determinabile.

In conclusione, si può affermare che per il sito di La Spezia è risultato evidente un effetto positivo del lockdown che ha determinato la riduzione dell'accumulo di contaminanti da parte di organismi come i mitili, indicatori della qualità della colonna d'acqua. Tale evidenza non è stata riscontrata negli organismi prelevati ad Olbia, per i quali comunque le concentrazioni misurate dei diversi contaminanti sono sempre state mediamente più basse rispetto a quanto osservato nei mitili spezzini, segno di una situazione generale ordinariamente meno compromessa, per cui eventuali effetti positivi sono rilevabili con più difficoltà.

## 6. BIBLIOGRAFIA

CETAC M-7600 Mercury Analyzer Manual, [https://www.environmental-expert.com/files/7782/download/456685/38-M7600\\_Op\\_Manual.pdf](https://www.environmental-expert.com/files/7782/download/456685/38-M7600_Op_Manual.pdf)

Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river bank soils. *Chemosphere* 72, 1594e1601.

C050 Dibutilstagno C050 - Composti organostannici ACQUE (Superficiali, Sotterranee) - MARE - SEDIMENTI - BIOTA - MITILI - ACQ TRANS BA.01.002 + BA.02.054

De La Torre-Roche, R.J., Lee, W.-Y., Campos-Díaz, S.I., 2009. Soil-borne polycyclic aromatic hydrocarbons in El Paso, Texas: analysis of a potential problem in the United States/Mexico border region. *Journal of Hazardous Materials* 163, 946e958.

Pies, C., Hoffmann, B., Petrowsky, J., Yang, Y., Ternes, T.A., Hofmann, T., 2008.

Ravindra, K., Wauters, E., Van Grieken, R., 2008. Variation in particulate PAHs levels and their relation with the transboundary movement of the air masses. *Science of the Total Environment* 396, 100e110.

Rapporti ISTISAN 96/34 (1996). Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti. Raccolta a cura di Massimo Baldini, Fabio Fabietti, Stefania Giammarioli, Roberta Onori, Leucio Orefice e Angelo Stacchini. Istituto Superiore di Sanità, 265 p.

SEDRIPORT, 2019. Prodotto T1.6.6 “Documento di sintesi della sperimentazione dell'applicazione modellistica all'interno di un bacino portuale pilota” - ARPAL-ISPRA.

SEDRIPORT, 2020. Prodotto 2.3.6 “Applicazioni pratiche” UNICA-UNTLN-ISPRA

Tobiszewski, M., Tsakovski, S., Simeonov, V., Namie\_snik, J., 2010. Surface water quality assessment by the use of combination of multivariate statistical classification and expert information. *Chemosphere* 80, 740e746.

UNI EN 15662 (2009) Alimenti di origine vegetale - Determinazione dei residui di pesticidi utilizzando GC-MS e/o LC-MS/MS dopo estrazione/separazione con acetonitrile e purificazione mediante SPE dispersiva - Metodo QuEChERS.

US EPA 1668C (2010) Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS. EPA-820-R-10-005. Washington, DC

Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S., 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33, 489 e 515.