

Progetto - Projet

GEREMIA - Gestione dei reflui per il miglioramento delle acque portuali



PRODOTTO T2.1.1 : DEFINIZIONE DEL MODELLO CONCETTUALE PER LA CREAZIONE DELL'INDICE INTEGRATO

LIVRABLE T2.1.1 : DÉFINITION DU MODÈLE CONCEPTUEL POUR LA CRÉATION DE L'INDEX INTÉGRÉ

Partner responsabile - Partner responsable : Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale - Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) dell'Università Politecnica delle Marche

Nome del prodotto	Redatto da:	Verificato da:	Validato da:
T2.1.1 – Definizione del modello concettuale per la creazione dell'indice integrato	Giuseppe d'Errico, Stefania Gorbi, Francesco Regoli (DiSVA)	Maria Elena Piccione, Sara Dastoli, Valentina Vitiello (ISPRA), Laura Cutroneo (UNIGE)	Marco Capello (UNIGE)

Descrizione del Prodotto: Viene descritto il modello Weight Of Evidence (WOE) per l'Analisi di Rischio Ecologico in ambienti portuali, ed il successivo sviluppo del *tool*/ applicativo che permette l'elaborazione e l'integrazione complessiva dei risultati ottenuti da sei diverse linee di evidenza.

Description du livrable: Le modèle Weight Of Evidence (WOE) pour l'analyse des risques écologiques dans les environnements portuaires est décrit, ainsi que le développement ultérieur de l'outil d'application qui permet le traitement et l'intégration globale des résultats obtenus à partir de six sources de données différentes.

Sintesi

Al fine di ottenere un indice di valutazione delle acque portuali, è stato sviluppato un modello applicativo basato su un approccio Weight Of Evidence (WOE), come componente fondamentale di uno schema gerarchico di analisi di rischio ambientale applicata alle acque costiere e sedimenti.

L'approccio WOE è basato su indagini multidisciplinari che integrano e danno un peso diverso in funzione della rilevanza ecologica a diverse tipologie di indagine, o linee di evidenza (LOE). Queste LOE includono le tradizionali analisi chimiche ed un ampio spettro di indagini biologiche, condotte sia in condizioni di laboratorio che naturali; l'obiettivo complessivo è quello di stabilire non solo la presenza ma anche la biodisponibilità dei contaminanti e la comparsa di effetti biologici avversi ai diversi livelli, da quello molecolare fino a quelli di organismi o comunità. Sebbene la scelta delle linee di indagine più opportune sia variabile e dipende da obiettivi e specificità locali, l'approccio WOE è in linea con la Direttiva Europea sulle Acque (2000/60/CE; EU, 2006) che richiede agli Stati membri di valutare e classificare lo stato ecologico degli ambienti acquatici integrando diversi elementi di qualità.

In questo documento viene riportato uno schema operativo per l'elaborazione di dati relativi ad una serie di sei possibili LOE utilizzabili all'interno di un'analisi di rischio ambientale in aree portuali.

Prodotto n. T2.1.1

Queste LOE si riferiscono alla caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE-1), alla caratterizzazione chimica della colonna d'acqua (LOE-2), alla valutazione della biodisponibilità in opportuni organismi bioindicatori (LOE-3), agli effetti biologici sub-letali misurati attraverso l'analisi dei biomarkers (LOE-4), all'applicazione di batterie di saggi ecotossicologici (LOE-5), all'analisi delle comunità bentoniche (LOE-6).

In questa relazione vengono discussi e riportati gli elementi tecnici come la scelta degli analiti chimici da analizzare e dei livelli (o normative) di riferimento; le specie più tipicamente utilizzate come organismi bioindicatori nelle varie condizioni sperimentali; il significato e la funzione biologica dei biomarker che possono essere applicati all'interno di un'analisi di rischio ambientale; i criteri per la scelta dei saggi ecotossicologici in funzione delle ipotesi di rischio, le specie e gli endpoints biologici tipicamente riconosciuti a livello normativo o di linee guida; la descrizione degli indici per la definizione della qualità ambientale tramite le comunità bentoniche.

Synthèse

Afin d'obtenir un indice d'évaluation pour les eaux portuaires, un modèle d'application basé sur une approche de type Weight Of Evidence (WOE) a été développé en tant que composant fondamental d'un schéma hiérarchique d'analyse des risques environnementaux appliqué aux eaux et sédiments côtiers.

L'approche WOE repose sur des enquêtes pluridisciplinaires qui intègrent et accordent un poids différent, en fonction de leur pertinence écologique, à différents types d'enquêtes, ou lignes de preuve (LOE). Ces LOE comprennent des analyses chimiques traditionnelles et un large éventail d'investigations biologiques, menées à la fois en laboratoire et dans des conditions naturelles ; l'objectif global est d'établir non seulement la présence mais aussi la biodisponibilité des contaminants et l'apparition d'effets biologiques néfastes à différents niveaux, de la molécule aux organismes ou aux communautés. Bien que le choix des axes d'investigation les plus appropriés soit variable et dépende des objectifs et des spécificités locales, l'approche WOE est conforme à la directive-cadre européenne sur l'eau (2000/60/CE ;

La cooperazione al cuore del Mediterraneo
La coopération au coeur de la Méditerranée

UE, 2006) qui impose aux États membres d'évaluer et de classer l'état écologique des milieux aquatiques en intégrant différents éléments de qualité.

Ce document fournit un schéma opérationnel de traitement des données pour un ensemble de six possibles LOE qui peuvent être utilisées dans le cadre d'une analyse des risques environnementaux dans les zones portuaires.

Ces LOE font référence à la caractérisation chimique des sédiments (LOE-1), à la caractérisation chimique de la colonne d'eau (LOE-2), à l'évaluation de la biodisponibilité chez les organismes bioindicateurs appropriés (LOE-3), aux effets biologiques sublétaux mesurés par l'analyse des biomarqueurs (LOE-4), à l'application de batteries d'essais écotoxicologiques (LOE-5) et à l'analyse des communautés benthiques (LOE-6).

Ce rapport discute et rapporte les éléments techniques tels que le choix des analytes chimiques à analyser et des niveaux de référence (ou standards) ; les espèces les plus typiquement utilisées comme organismes bioindicateurs dans les différentes conditions expérimentales ; la signification et la fonction biologique des biomarqueurs qui peuvent être appliqués dans le cadre d'une analyse de risque environnemental ; les critères de choix des tests écotoxicologiques en fonction des hypothèses de risque, des espèces et des critères biologiques typiquement reconnus au niveau réglementaire ou des lignes directrices ; la description des indices pour la définition de la qualité environnementale à travers les communautés benthiques.

Indice

1. Inquadramento e descrizione generale delle principali Linee di Evidenza ai fini dell'Analisi di Rischio Ecologico.....	1
2. Descrizione dei moduli e degli algoritmi di calcolo per l'elaborazione dei dati relativi alle Linee di Evidenza (LOE) proposte ai fini dell'Analisi di Rischio Ecologico.....	7
2.1 LOE-1 (Caratterizzazione chimica di sedimenti)	8
2.2. LOE-2 (Caratterizzazione chimica dell'acqua).....	17
2.3. LOE-3 (Biodisponibilità).....	22
2.4. LOE-4 (Biomarker)	27
2.5. LOE-5 (Batterie di Saggi Ecotossicologici).....	33
2.6. LOE-6 (Comunità bentoniche).....	38
3. Integrazione Weight of Evidence (WOE)	43
4. Bibliografia	46

1. Inquadramento e descrizione generale delle principali Linee di Evidenza ai fini dell'Analisi di Rischio Ecologico.

Le caratterizzazioni chimiche delle matrici abiotiche, come sedimenti ed acqua, rappresentano Linee di Evidenza obbligate in un processo che porta alla definizione del rischio ecologico. Queste analisi permettono di quantificare esattamente le concentrazioni e la natura degli inquinanti presenti, possibili gradienti spaziali o variazioni temporali, la cui caratterizzazione può risultare di fondamentale importanza quando si debba valutare lo stato di salute di un ambiente, l'impatto di sversamenti accidentali e/o l'efficacia di possibili misure di contenimento o mitigazione. L'interpretazione dei risultati delle analisi chimiche è normalmente affidata al confronto con valori limite indicati all'interno di specifiche normative o linee guida che forniscono standard di qualità ambientale (SQA). Le varie normative nazionali ed internazionali contemplano liste di sostanze chimiche prioritarie che possono essere diverse in funzione dell'obiettivo normativo.

Nonostante l'importanza delle analisi chimiche, e dunque la necessità di includere linee di evidenza che contemplino questo tipo di caratterizzazione, bisogna tuttavia sottolineare anche alcuni limiti importanti. La valutazione dei risultati chimici è spesso basata sul superamento del limite previsto anche per un solo contaminante: tuttavia questo criterio "*pass-to-fail*" non permette una efficace discriminazione del reale pericolo chimico che, ovviamente sarebbe profondamente diverso a seconda che il superamento del limite interessi una o molte sostanze, che queste sostanze siano biologicamente inerti o altamente tossiche, che le concentrazioni misurate siano soltanto leggermente oppure centinaia di volte superiori rispetto al limite superato.

Una analisi di rischio, o anche una più semplice caratterizzazione di qualità ambientale basata solo su analisi chimiche avrebbe inoltre importanti limiti anche di natura concettuale. La scelta dei contaminanti da analizzare raramente è esaustiva e rappresenta sempre una percentuale delle sostanze che potrebbero essere presenti. Basarsi solo sui composti indicati dalle normative può essere restrittivo se si considera che non esistono valori di riferimento per molte molecole che solo recentemente sono state identificate come sostanze pericolose o pericolose e prioritarie (EU, 2006). Quando un contaminante analizzato non ha un valore di

riferimento a livello normativo altri criteri possono essere utilizzati per evidenziare un arricchimento antropogenico e possibili rischi per il biota, tra cui il confronto con i livelli basali tipici del sito, o con studi scientifici che associno queste sostanze alla comparsa di effetti tossici negli organismi.

Oltre alla natura degli inquinanti da analizzare, anche la scelta dei valori di riferimento influenza il giudizio finale e non deve pertanto essere sottovalutata poiché da essa dipende l'obiettivo di protezione o la scelta delle migliori opzioni gestionali: le stesse analisi chimiche possono determinare un giudizio di qualità molto positivo o molto negativo se paragonate a normative o linee guida con valori limite diversi o che contemplino limiti per un diverso numero di composti tra quelli analizzati.

La sola caratterizzazione chimica delle matrici abiotiche non permette inoltre di valutare se i composti analizzati sono trasferibili al comparto biologico, se possano essere trasformati e se, anche a concentrazioni inferiori ai riferimenti normativi, possano rappresentare comunque un rischio associato ad esempio ad una tossicità additiva o sinergica dei vari composti; dall'altra parte, concentrazioni di inquinanti superiori ai riferimenti normativi, che spesso impongono specifiche conseguenze di tipo gestionale, non necessariamente rappresentano anche una condizione di pericolo o danno ambientale poiché tali sostanze potrebbero essere presenti in forme non biodisponibili.

E' oggi universalmente riconosciuta a livello scientifico la necessità di affrontare tale complessità con un approccio multidisciplinare Weight Of Evidence (WOE) che integri e pesi adeguatamente diverse tipologie di indagine, o linee di evidenza: queste devono contemplare, oltre alle analisi chimiche, anche un'ampia possibilità di analisi biologiche, condotte ai diversi livelli, da quello molecolare fino a quelli di organismo o comunità, per stabilire la presenza ma anche la biodisponibilità dei contaminanti e la comparsa di effetti biologici avversi.

Tra le Linee di Evidenza che considerano aspetti biologici, la valutazione della biodisponibilità è di fondamentale importanza per stabilire quanto i contaminanti presenti nelle matrici abiotiche possano effettivamente essere trasferiti al comparto biotico e rappresentare pertanto un possibile rischio per gli organismi e per l'ambiente. Sono molti gli organismi che presentano caratteristiche adeguate per poter essere utilizzati come bioindicatori, sono rappresentativi di *taxa* e livelli trofici diversi e dunque utili sia per indagini a

livello locale o sito-specifiche, che per valutare una potenziale diffusione o trasferimento di inquinanti attraverso le reti trofiche.

La biodisponibilità può essere analizzata in organismi naturali che forniscono indicazioni ecologicamente rilevanti, mentre l'utilizzo di organismi trapiantati (cioè provenienti da un sito di riferimento e mantenuti per un periodo di qualche settimana nel sito indagato) permette di valutare meglio la biodisponibilità recente, così come una sua eventuale variazione in seguito a fenomeni di sversamento accidentale di inquinanti o di movimentazione di sedimenti (Bocchetti et al., 2008; Piva et al., 2011; Regoli et al., 2013; Benedetti et al., 2014; Regoli et al., 2019).

La presenza di inquinanti biodisponibili può determinare effetti di tossicità sia acuta che cronica in funzione dell'entità e della durata dell'esposizione. Una Linea di Evidenza basata sulla misurazione di effetti a livello molecolare, biochimico, cellulare permette di identificare in maniera sensibile la comparsa dei primi effetti di disturbo causati dai contaminanti, anche in assenza di risposte di tossicità più evidenti a livello di organismi o comunità. In questo senso i biomarkers rappresentano degli utili campanelli di allarme con valore predittivo, in grado cioè di anticipare la comparsa di future alterazioni ecologicamente più rilevanti. Sono basati su una approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari che stanno alla base dei processi di metabolizzazione, detossificazione e di tossicità indotta dalle principali classi di inquinanti ambientali. In questo senso esistono sia biomarkers definiti di esposizione e che rispondono a precise classi di inquinanti (ad esempio metalli, idrocarburi policiclici aromatici, diossine e composti diossino-simili), che biomarkers di effetto, alcuni dei quali possono riflettere specifiche forme di rischio tossicologico (genotossicità, carcinogenesi, alterazioni ormonali ed estrogenicità); in questo senso i biomarker possono differire in termini di rilevanza biologica a seconda dell'end point che rappresentano. Oltre al valore predittivo, i biomarker possono essere importanti anche come strumenti diagnostici, che contribuiscono a chiarire le cause di fenomeni di alterazione evidenziati a livello di popolamenti o comunità. Alcuni biomarker indicano fenomeni di tossicità potenzialmente reversibili, altri danni irreparabili, alcuni sono molto sensibili ma di basso significato tossicologico, altri più lenti a comparire ma maggiormente associati allo stato di salute di un organismo; da questo punto di vista non esiste un singolo biomarker che possa essere utilizzato da solo, ma è necessario adottare sempre un

approccio multi-biomarker che integri numerose risposte di significato e complessità complementari (Cajaraville *et al.*, 2000; McCarty *et al.*, 2002; Galloway *et al.*, 2004; Hagger *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2006; Viarengo *et al.*, 2007 ; Benedetti *et al.*, 2012). L'importanza e l'utilità dell'approccio basato sui biomarker sono oggi testimoniate dal loro utilizzo in tutte le indagini rivolte a valutare l'impatto biologico della contaminazione ambientale, e dal loro recepimento sempre maggiore all'interno di normative e linee guida nazionali ed internazionali tra cui quelle del North Sea Task Force Monitoring Master Plan, dell'Integrated North Sea Program (Eggens *et al.*, 1995), del National Status and Trends Program della National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) (O'Connor, 1998), del Consiglio Internazionale per l'Esplorazione del Mare (ICES), della Commissione Oceanografica Intergovernativa (IOC), dello United Nations Environment Programme (UNEP, 1999), del Joint Monitoring Programme della Convenzione OSPAR per il monitoraggio del Mare del Nord, soprattutto in relazione alle attività delle compagnie petrolifere, fino alla più recente Marine Strategy Framework Directive (MSFD).

Dagli effetti cellulari a quelli di organismo, l'applicazione di una Linea di Evidenza che contempli l'esecuzione di saggi ecotossicologici permette di valutare il possibile pericolo di tossicità per numerose matrici abiotiche (sedimenti, suoli, elutriati, acque, etc). I saggi ecotossicologici forniscono infatti una valutazione integrata della tossicità di una matrice, e considerano anche il possibile effetto di contaminanti presenti ma non analizzati chimicamente, così come l'effetto biologico complessivo causato da interazioni sinergiche o additive di più classi di inquinanti all'interno di una matrice complessa. E' pertanto possibile che questa linea di evidenza, così come la precedente sui biomarker, possa dare risultati apparentemente in contrasto con quelli estrapolabili da una caratterizzazione chimica. I saggi ecotossicologici possono utilizzare un ampio numero di specie test appartenenti a *taxa* e livelli trofici diversi (dai batteri ai pesci, dai decompositori ai consumatori secondari), per i quali esistono metodologie ampiamente standardizzate e validate. I saggi ecotossicologici possono essere realizzati su organismi (*in vivo*) o su porzioni isolate (*in vitro*) come cellule, proteine o enzimi, organuli; possono inoltre testare la tossicità di varie matrici (sedimento tal quale, elutriato o estratti) e fornire indicazioni di effetti acuti o cronici. Numerosi sono gli endpoint che vengono misurati, dalla variazione di attività enzimatiche a modifiche comportamentali, comparsa di effetti genotossici, compromissioni della crescita, del potenziale riproduttivo e

dello sviluppo, inibizione della bioluminescenza fino alla mortalità. A seconda della specie utilizzata, dell'endpoint biologico, della matrice testata e del tempo di esposizione cambia sia la rilevanza ecologica che la sensibilità di un saggio nell'evidenziare un possibile pericolo di tossicità, così come il livello di estrapolazione necessaria per predire effetti ai livelli successivi di popolazione o comunità.

Proprio per questa grande versatilità e variabilità dei saggi ecotossicologici, tutti i protocolli nazionali ed internazionali considerano completamente inaffidabile l'utilizzo di un unico test, ma è ritenuto fondamentale invece applicare batterie di saggi che contemplino contemporaneamente specie rappresentative di gruppi e posizioni trofiche diverse, la misurazione di endpoint biologici sia acuti che cronici con un diverso significato tossicologico, e diverse vie di esposizione (es. sedimento tal quale, elutriato, acqua interstiziale).

Una descrizione dei criteri da seguire per scegliere le batterie di saggi più opportuni per testare la tossicità di acque costiere e sedimenti, la scelta delle matrici, le specie e gli endpoints disponibili, così come alcuni criteri per interpretare i risultati di tossicità, sono stati recentemente riassunti nel Decreto Legislativo 173/2016" Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini (D. Lgs. 173/16). In questo regolamento viene proposto un riferimento tecnico scientifico sull'applicazione delle metodologie ecotossicologiche nell'ambito degli ambienti portuali, con l'obiettivo di proporre un insieme di batterie di saggi biologici, da elaborare attraverso specifici criteri di integrazione ponderata che permettono una valutazione complessiva dei risultati ottenuti da tutti i saggi della batteria.

Oltre all'applicazione di batterie di saggi ecotossicologici, per un'analisi di rischio ecologico è fondamentale considerare anche Linee di Evidenza che facciano riferimento ad alterazioni dei livelli biologici superiori come le popolazioni naturali che controllano molti dei processi ecosistemici. Una Linea di Evidenza molto importante è quella che considera le comunità bentoniche. L'analisi della struttura e la dinamica dei popolamenti bentonici, che sono direttamente esposti all'effetto dei contaminanti, permette di evidenziare se, e quanto, i contaminanti presenti in un ambiente determinino modificazioni nel funzionamento degli ecosistemi; l'analisi dei popolamenti bentonici nei sedimenti rappresenta un essenziale elemento di congiunzione fra le valutazioni chimiche ed ecotossicologiche, relative alla

Prodotto n. T2.1.1

presenza e all'effetto biologico dei contaminanti, e le conseguenze ecologiche in termini di alterazione dei processi e delle funzioni degli ecosistemi sedimentari. Un buon funzionamento dell'ecosistema è alla base della produzione di beni e servizi, essenziali per garantire le sue caratteristiche di resistenza e resilienza, e in ultima istanza il benessere dell'uomo. Per valutare se e quanto i contaminanti presenti in un ambiente determinino modificazioni nel funzionamento degli ecosistemi, è possibile analizzare la struttura e la dinamica dei popolamenti bentonici che sono direttamente esposti all'effetto dei contaminanti nei sedimenti. Per la loro importanza come elementi di valutazione della qualità ambientale i popolamenti bentonici sono stati recentemente introdotti nelle direttive europee (Water Framework Directive 2000/60/EC, Marine Strategy Framework Directive /EC) come elemento essenziale nella valutazione della qualità e dello stato ecologico degli ecosistemi acquatici.

2. Descrizione dei moduli e degli algoritmi di calcolo per l'elaborazione dei dati relativi alle Linee di Evidenza (LOE) proposte ai fini dell'Analisi di Rischio Ecologico

All'interno del software applicativo per il calcolo dell'indice integrato, sono stati sviluppati specifici algoritmi e diagrammi di flusso che, sulla base di precisi obiettivi ed assunzioni da giudizio esperto, permettono di applicare criteri di integrazione ponderata ad ampi data-sets di dati ottenuti da 6 linee di evidenza: caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE-1), caratterizzazione chimica dell'acqua (LOE-2), biodisponibilità dei contaminanti (LOE-3), effetti subletali misurati tramite biomarkers (LOE-4), effetti tossici a livello di organismo misurati tramite batterie di saggi (LOE-5), analisi delle comunità bentoniche (LOE-6). Ciascuna linea di evidenza è stata sviluppata all'interno di un singolo modulo in grado di fornire per ciascuna tipologia di dati, sia un indice quantitativo di pericolo (HQ, Hazard Quotient), che un giudizio sintetico del livello di pericolo (suddiviso in 5 classi, da assente a molto alto). Queste procedure di calcolo sono state ulteriormente sviluppate all'interno di un Software dedicato che, nonostante l'elaborazione di dati complessi in indici sintetici, mantiene tuttavia informazioni di grande importanza e valore scientifico utili per eventuali approfondimenti.

Il modello contiene poi un modulo di elaborazione finale WOE che integra le diverse linee di evidenza, dando un peso diverso in funzione della loro rilevanza ai fini dell'indagine, per arrivare alla valutazione sia quantitativa che qualitativa del Rischio. L'integrazione finale WOE è flessibile, prevedendo che possano essere integrate un numero variabile di linee di evidenza, e che l'utente possa cambiare il loro "peso" in funzione delle ipotesi di rischio e delle caratteristiche sito-specifiche dell'indagine.

Vengono di seguito riassunti i principali criteri scientifici ed i relativi flow-charts sviluppati per le 6 LOE nell'ambito del modello.

2.1 LOE-1 (Caratterizzazione chimica di sedimenti)

Per quanto riguarda il modulo relativo alla caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE-1), il modello prevede una prima parte con le indicazioni generali del sito, l'eventuale classificazione della carota e/o dei livelli nelle situazioni in cui siano previsti questi tipi di campionamenti. L'inserimento dei dati relativi alle analisi chimiche prevede una ampia lista di analiti che comprende metalli, idrocarburi volatili, idrocarburi alifatici, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), bifenili policlorurati (PCBs), pesticidi e composti organoalogenati, organostannici, diossine e composti diossino-simili, solventi aromatici, alogenati, nitro-aromatici, fenoli, ammine aromatiche, ecc. (Tabella 1).

A questi composti è stato assegnato un "peso" diverso (compreso tra 1 e 1.3) a seconda della loro presenza nella lista delle sostanze "prioritarie" o "pericolose e prioritarie" identificate dalla Direttiva 2008/105/CE. Il diverso peso assegnato ai vari composti ha lo scopo di dare una maggiore rilevanza, all'interno di un'analisi di rischio, alla variazione di inquinanti che siano caratterizzati da una più elevata tossicità.

I valori misurati sono poi riferiti ad una serie di riferimenti sia normativi che di carattere scientifico tra quelli più utilizzati a livello nazionale, europeo o internazionale, applicabili ai sedimenti: L1 e L2 del Decreto Legislativo 173/2016; SQS (D.Lgs. 172/2015); TEL, Threshold Effect Level, e PEL, Probable Effect Level (MacDonald, 1994; Long *et al.*, 1995); ERL (Effect Range Low) e ERM (Effect Range Median) (Long & Morgan; 1991; Long *et al.*, 1995); COLONNA A e COLONNA B della Tabella 1 dell'Allegato 5 alla parte IV Titolo 5 del Dlgs 152/2006; SL e SQHV (ANZECC 2009).

Le caratteristiche di questi riferimenti sono:

- L1 del Decreto Legislativo 173/2016 relativo alla movimentazione dei fondali marini. Esso rappresenta, per ciascun parametro, quel livello chimico, prossimo ai valori di fondo naturale in corrispondenza del quale sono assai improbabili effetti tossici nei confronti delle comunità acquatiche e che sarebbe pertanto compatibile con tutte le opzioni di gestione nel caso di movimentazione dei sedimenti.

- L2 del Decreto Legislativo 173/2016 relativo alla movimentazione dei fondali marini. Esso costituisce quel livello di concentrazione dei contaminanti che determina con buona probabilità effetti tossici negativi nei confronti delle comunità acquatiche.
- D.Lgs. 172/2015 recepisce gli Standard di Qualità dei Sedimenti (SQS) in relazione alla Direttiva Europea 2000/60/CE. Rappresenta lo standard di riferimento qualitativo a cui tendere per il raggiungimento del "buono stato" ecologico secondo i criteri della Direttiva Quadro Comunitaria.
- TEL (Threshold Effect Level) rappresenta il limite superiore del range di concentrazioni dei contaminanti in corrispondenza del quale non si registrano effetti biologici avversi. Sviluppato dal Florida Department of Environmental Protection (FDEP, 1994), è calcolato come media geometrica tra il 15° percentile di un set di dati tossici e il 50° percentile di un set di dati non tossici (Mac Donald, 1994), utilizzando il database sviluppato da Long *et al.* (1995).
- PEL (Probable Effect Level) rappresenta il limite inferiore del range di concentrazione dei contaminanti in corrispondenza del quale si registrano frequentemente o sempre effetti biologici avversi. Sviluppato dal Florida Department of Environmental Protection (FDEP, 1994), è calcolato come media geometrica tra il 50° percentile del set di dati tossici e l'85° percentile del set di dati non tossici (Mac Donald, 1994), utilizzando il database sviluppato da Long *et al.* (1995).
- ERL (Effect Range Low) è dato dal 10° percentile di un ampio data set che associa concentrazioni chimiche osservate, o previste mediante il principio dell'equilibrio di ripartizione (EqP), con la comparsa di effetti biologici (Long & Morgan; 1991; Long *et al.*, 1995). I valori corrispondenti ad ERL sono indicativi di concentrazioni al di sotto delle quali è improbabile che si manifestino effetti avversi.
- ERM (Effect Range Median) è dato dal 50° percentile di un ampio data set che associa concentrazioni chimiche osservate, o previste mediante il principio dell'equilibrio di ripartizione (EqP), con la comparsa di effetti biologici (Long & Morgan; 1991; Long *et al.*, 1995). I valori corrispondenti ad ERM sono rappresentativi di concentrazioni al di sopra delle quali si manifestano frequentemente effetti avversi.

Prodotto n. T2.1.1

- COLONNA A Tabella 1 Allegato 5 alla parte IV Titolo 5 del Dlgs 152/2006. Presenta i livelli massimi di contaminanti ammessi per i suoli con destinazione d'uso residenziale o a verde pubblico. Non sono specificati nella normativa i criteri con i quali è stato sviluppato e viene spesso considerato come riferimento anche per i sedimenti marini nei siti di bonifica.
- COLONNA B Tabella 1 Allegato 5 alla parte IV Titolo 5 del Dlgs 152/2006. Presenta i livelli massimi di contaminanti ammessi per i suoli con destinazione d'uso industriale. Non sono specificati nella normativa i criteri con i quali è stato sviluppato e viene spesso considerato come riferimento anche per i sedimenti marini nei siti di bonifica.
- SL (ANZECC 2009) indica i valori Screening Levels adottati dalla Australian and New Zealand Environment Conservation Council; valori al di sotto del 95° percentile sono considerabili come livelli basali, al di sopra è richiesto un approfondimento sulle caratteristiche geochimiche dell'area.
- SQHV (ANZECC 2009) indica i valori massimi (High Values) che non dovrebbero essere raggiunti nei sedimenti. Questi valori sono in gran parte ottenuti dal data base di Long *et al.*, (1995) con qualche modifica.

Questi riferimenti possono essere aggiornati con notevole semplicità, ed il modello prevede inoltre la possibilità che l'utente possa inserire manualmente altri "riferimenti" sito-specifici, creati in funzione degli obiettivi o delle caratteristiche dell'indagine.

Tabella 1 – Lista dei parametri chimici previsti per il sedimento e organismi (LOE-1 e LOE-3)

CHEMICALS	Weighting	CAS number			
1 Ag	1	7440-22-4	59 PCB-81	1	70362-50-4
2 Al	1	7429-90-5	60 PCB-101	1	37680-73-2
3 As	1	7784-42-1	61 PCB-118	1	31508-00-6
4 Ba	1	81-25-4	62 PCB-126	1	57465-28-8
5 Be	1	7440-41-7	63 PCB-128	1	38380-07-3
6 Cd	1,3	7440-43-9	64 PCB-138	1	35065-28-2
7 Co	1	7440-48-4	65 PCB-153	1	35065-27-1
8 Cr total	1	7440-47-3	66 PCB-156	1	38380-08-4
9 Cr VI	1	n.a.	67 PCB-169	1	32774-16-6
10 Cu	1	7440-50-8	68 PCB-180	1	35065-29-3
11 Fe	1	8053-60-9	69 Σ PCB	1	n.a.
12 Hg	1,3	7439-97-6	70 Alachlor	1,1	15972-60-8
13 Me-Hg	1,3	n.a.	71 Aldrin	1	309-00-2
14 Mn	1	8075-39-6	72 Atrazine	1,1	1912-24-9
15 Ni	1,1	7440-02-0	73 α -Hexachlorocyclohexane	1,3	319-84-6
16 Pb	1,1	7439-92-1	74 β -Hexachlorocyclohexane	1,3	319-85-7
17 Sb	1	7803-52-3	75 γ -Hexachlorocyclohexane	1,3	581-89-9
18 Se	1	95788-45-7	76 total Hexachlorocyclohexane	1,3	n.a.
19 Sn	1	7440-31-5	77 Chlordane	1	57-74-9
20 Tl	1	137322-20-4	78 Σ DDD	1	72-54-8 + 53-19-0
21 V	1	7440-62-2	79 Σ DDE	1	82413-20-5 + 72-55-9
22 Zn	1	9029-97-4	80 Σ DDT	1	50-29-3 + 789-02-6
23 Cyanides	1	n.a.	81 Σ DDD_DDE_DDT	1	n.a.
24 Fluorides	1	n.a.	82 Dieldrin	1	60-57-1
25 Total hydrocarbons	1	n.a.	83 Endrin	1	72-20-8
26 Hydrocarbons (C $\leq$ 12)	1	n.a.	84 Endosulfan	1,3	115-29-7
27 Hydrocarbons (C $>$ 12)	1	n.a.	85 Methoxychlor	1	72-43-5
28 Acenaphthene ° +	1	83-32-9	86 Eptachlor epoxide	1	1024-57-3
29 Acenaphthylene ° +	1	208-96-8	87 Chlorfenvinphos	1,1	470-90-6
30 Anthracene ° +	1,3	120-12-7	88 Chlorpyrifos	1,1	2921-88-2
31 Benzo(a)anthracene * § +	1	56-55-3	89 Diuron	1,1	330-54-1
32 Benzo(a)pyrene * § +	1,3	50-32-8	90 Hexachlorobutadiene	1,3	87-68-3
33 Benzo(b)fluoranthene * +	1,3	205-99-2	91 Monobutyltin compounds (Sn)	1	n.a.
34 Benzo(k)fluoranthene * +	1,3	207-08-9	92 Dibutyltin compounds (Sn)	1	1002-53-5
35 Benzo(g,h,i)perylene * +	1,3	191-24-2	93 Tributyltin compounds (Sn)	1,3	36643-28-4
36 Chrysene * § +	1	218-01-9	94 Σ organotin compounds	1,3	n.a.
37 Dibenzo(a,h)anthracene * § +	1	53-70-3	95 Σ PCDD,PCDF (TE-I)	1	n.a.
38 Fenantrene ° +	1	85-01-8	96 Σ PCDD,PCDF, dioxin-like PCB (TE-I)	1	n.a.
39 Fluorene ° +	1	86-73-7	97 Benzene #	1,1	71-43-2
40 Fluoranthene § +	1,1	206-44-0	98 Ethylbenzene #	1	70955-17-8
41 Indeno(1,2,3,c,d)pyrene * +	1,3	193-39-5	99 Styrene #	1	[100-42-5
42 Naphtalene ° +	1,1	91-20-3	100 Toluene #	1	108-88-3
43 2-Methylnaphtalene	1	91-57-6	101 Xylene #	1	1330-20-7
44 Pyrene * § +	1	129-00-0	102 Σ aromatic (#)	1	n.a.
45 Dibenzo(a,e)pyrene	1	192-65-4	103 Pentachlorobenzene	1,3	608-93-5
46 Dibenzo(a,i)pyrene	1	189-55-9	104 Hexachlorobenzene (HCB)	1,3	118-74-1
47 Dibenzo(a,l)pyrene	1	191-30-0	105 Methylphenol	1	n.a.
48 Dibenzo(a,h)pyrene	1	189-64-0	106 Phenol	1	108-95-2
49 Σ PAH (*)	1,3	n.a.	107 2-Chlorophenol	1	95-57-8
50 Σ PAH (°)	1,3	n.a.	108 2,4-Dichlorophenol	1	120-83-2
51 Σ PAH (§)	1,3	n.a.	109 2,4,6-Trichlorofenol	1	88-06-2
52 Σ PAH (+)	1,3	n.a.	110 Pentachlorofenol	1,1	87-86-5
53 Σ PAH (LMW)	1	n.a.	111 4-Nonylphenol (Nonylphenol)	1,3	104-40-5 (25154-52-3)
54 Σ PAH (HMW)	1	n.a.	112 Octylphenol	1,1	1806-26-4
55 Σ PAH (TOT)	1,3	n.a.	113 Polybromodiphenylethers	1,1	n.a.
56 PCB-28	1	7012-37-5	(28 -47 -99 -100 -153 -154)		
57 PCB-52	1	35693-99-3	114 2-Ethylexylphthalate (DEHP)	1,1	117-81-7
58 PCB-77	1	32598-13-3	115 Radionuclides (alpha + beta)	1	n.a.

Il calcolo dell'Hazard Quotient specifico per il modulo Chimica dei sedimenti è riportato in Figura 1. Le fasi principali sono il calcolo per ogni parametro della variazione rispetto al riferimento, il *Ratio To Reference (RTR)*, corretto per la tipologia (peso) del contaminante (*RTR_w*), al fine di enfatizzare l'importanza delle variazioni osservate per i contaminanti più pericolosi. Nel calcolo dell'Hazard Quotient specifico per la caratterizzazione chimica dei sedimenti (*HQ_C*), viene calcolato un *RTR_w* mediato per tutti quei parametri con *RTR* ≤ 1 (cioè valori inferiori rispetto al limite della SQG), mentre per quei contaminanti con *RTR* > 1, i singoli *RTR_w* vengono addizionati in una sommatoria Σ:

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

dove *N* e *M* sono il numero dei parametri con *RTR* rispettivamente ≤ o > 1, mentre *j* e *k* sono indici che permettono di ripetere il calcolo per *N* o *M* volte. Con questo calcolo, in funzione del numero di parametri che superano i riferimenti, dell'entità del superamento e della tipologia del contaminante, l'indice di pericolo chimico complessivo (*HQ_C*) discrimina anche sedimenti solo moderatamente inquinati (cioè vicini ai valori di riferimento), aumenta in funzione del numero dei parametri e dell'entità dello sfioramento dei singoli, non è abbassato dall'analisi di molti parametri che non sfiorano.

Basandosi su un giudizio esperto, l'indice di pericolo cumulativo *HQ_C* è assegnato ad una classe di gravità del pericolo (da assente a molto alto) identificata da un diverso colore: ASSENTE/bianco se *HQ_C* < 0.7; TRASCURABILE/verde se 0.7 ≥ *HQ_C* < 1.3; BASSO/azzurro se 1.3 ≥ *HQ_C* < 2.6; MEDIO/giallo se 2.6 ≥ *HQ_C* < 6.5; ALTO/rosso se 6.5 ≥ *HQ_C* < 13; MOLTO ALTO/nero se *HQ_C* ≥ 13. Un valore di *HQ_C* < 0.7 corrisponde a sedimenti con una concentrazione media delle sostanze chimiche inferiore al 70% dei rispettivi limiti normativi; un valore di *HQ_C* compreso tra 0.7 e < 1.3 indica sedimenti con concentrazioni medie comprese tra il 70% ed il valore indicato dai riferimenti normativi, e/o al massimo un parametro tra quelli non pericolose e prioritari (con peso < 1.3) che superi leggermente il suo limite. Dall'altra parte, un valore di *HQ_C* ≥ 13 potrebbe essere raggiunto con sedimenti in cui le concentrazioni di 10 contaminanti pericolosi

e prioritari raggiungono i loro limiti normativi, o dalla presenza di un unico di questi inquinanti che lo superi di 10 volte.

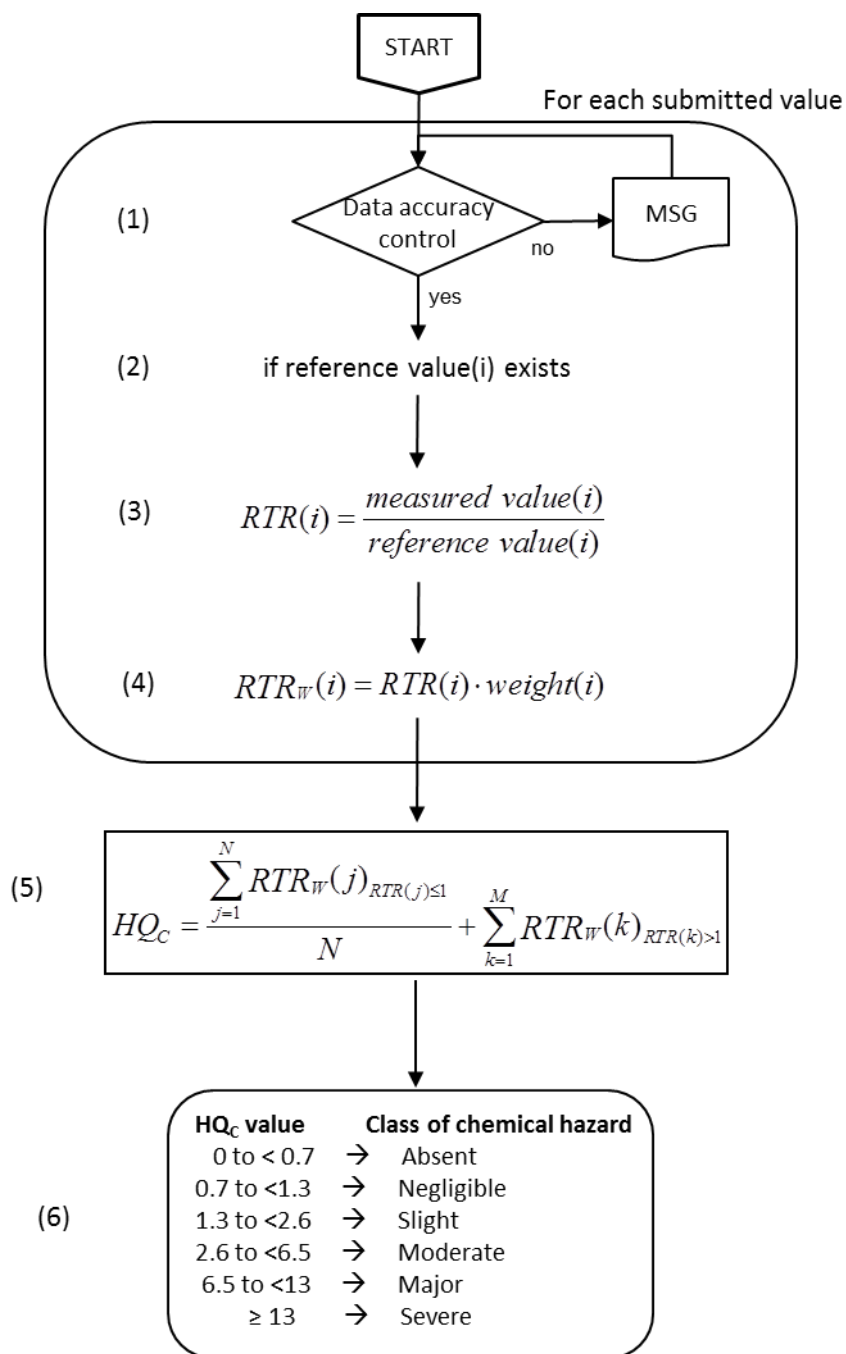


Figura 1. Flow-chart dell'elaborazione dei dati chimici per la caratterizzazione chimica dei sedimenti, LOE-1.

Prodotto n. T2.1.1

Oltre al valore di HQ_c e al livello di pericolo assegnato, l'output del modello fornisce, per ogni normativa considerata, anche informazioni aggiuntive importanti quali ad esempio la % al pericolo complessivo dato dal parametro che sfiora di più, il numero di parametri non conformi, di quelli previsti all'interno del riferimento, di quelli analizzati ed infine la classe di pericolo chimico (Figura 2).



Figura 2. Esempio di output del modello dall'elaborazione dei dati chimici per la caratterizzazione dei sedimenti, LOE-1.

2.2. LOE-2 (Caratterizzazione chimica dell'acqua)

Il modulo per l'elaborazione dell'indice di pericolo relativo alla caratterizzazione chimica dell'acqua è sostanzialmente basato sullo stesso algoritmo di calcolo già descritto per la linea di evidenza precedente, adeguato tuttavia per quanto riguarda i limiti e i riferimenti normativi utilizzati per il confronto con i risultati dell'indagine.

Anche in questo modulo, la prima parte prevede una serie di informazioni generali sul sito e sul campionamento (compresa l'eventuale profondità di prelievo), e poi l'inserimento delle concentrazioni misurate nei vari campioni di acqua per la lista di analiti riportata nel DM 260/2010, tra cui metalli, idrocarburi volatili, idrocarburi alifatici, idrocarburi policiclici aromatici, bifenili policlorurati, pesticidi e composti organoalogenati, organo-stannici, diossine e composti diossino-simili, solventi aromatici, alogenati, nitro-aromatici, fenoli, ammine aromatiche, ecc. (Tabella 2).

Anche nella LOE-2 ai vari composti è stato assegnato un "peso" compreso tra 1 e 1.3 a seconda della loro presenza nella lista delle sostanze prioritarie o pericolose e prioritarie (Direttiva 2008/105/Ce); questo peso assegnato può essere modificato dall'utente del programma, ed anche la lista dei composti chimici da analizzare è facilmente aggiornabile laddove ci siano esigenze specifiche.

Il funzionamento del modulo della LOE-2 non richiede che tutti gli analiti siano stati analizzati: i valori misurati sono poi confrontati con i riferimenti normativi degli Standard di Qualità Ambientale (SQA) del DM 260 del 2010 (Tabella 2).

Tabella 2. Lista dei parametri chimici previsti per la colonna d'acqua, LOE-2.

CHEMICALS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SQA	Weighting			
1 As	10	1	57 Diclorvos	0,01	1
2 Cd 1	0,08	1,3	58 Dimetoato	0,5	1
3 Cd 2	0,08	1,3	59 Diuron	0,2	1,1
4 Cd 3	0,09	1,3	60 Endosulfan	0,005	1,3
5 Cd 4	0,15	1,3	61 Eptaclor	0,005	1
6 Cd 5	0,25	1,3	62 Esaclorobenzene (HCB)	0,005	1,3
7 Cd		1,3	63 Esaclorobutadiene	0,05	1,3
8 Cr totale		1	64 Esaclorocicloesano	0,02	1,3
9 Hg	0,03	1,3	65 Fenitroton	0,01	1
10 Ni	20	1,1	66 Fention	0,01	1
11 Pb	7,2	1,1	67 Fluorantene	0,1	1,1
12 1,1,1 Tricloroetano	10	1,1	68 Isoproturon	0,3	1,1
13 1,2 dichloroethane	10	1,1	69 Linuron	0,5	1
14 1,2 dichloromethane	20	1,1	70 Malation	0,01	1
15 1,2 Diclorobenzene	2	1	71 MCPA	0,5	1
16 1,3 Diclorobenzene	2	1	72 Mecoprop	0,5	1
17 1,4 Diclorobenzene	2	1	73 Metamidofos	0,5	1
18 1-Cloro-2-nitrobenzene	1	1	74 Mevinfos	0,01	1
19 1-Cloro-3-nitrobenzene	1	1	75 Naftalene	2,4	1,1
20 1-Cloro-4-nitrobenzene	1	1	76 Octilfenolo	0,1	1,1
21 2 Cloroanilina	1	1	77 Omatoato	0,5	1
22 2,4 D	0,5	1	78 Ossidemeton-metile	0,5	1
23 2,4,5 T	0,5	1	79 Paration etile	0,01	1
24 2,4,5-Triclorofenolo	1	1	80 Paration metile	0,01	1
25 2,4,6-Triclorofenolo	1	1	81 PCB-101	0,1	1
26 2,4-Diclorofenolo	1	1	82 PCB-118	0,1	1
27 2-Clorofenolo	4	1	83 PCB-126	0,1	1
28 2-Clorotoluene	1	1	84 PCB-128	0,1	1
29 3 Cloroanilina	2	1	85 PCB-138	0,1	1
30 3,4-Dicloroanilina	0,5	1	86 PCB-153	0,1	1
31 3-Clorofenolo	2	1	87 PCB-156	0,1	1
32 3-Clorotoluene	1	1	88 PCB-169	0,1	1
33 4 Cloroanilina	1	1	89 PCB-180	0,1	1
34 4-Clorofenolo	2	1	90 PCB-28	0,1	1
35 4-Clorotoluene	1	1	91 PCB-52	0,1	1
36 4-Nonilfenolo (Nonilfenolo)	0,3	1,3	92 PCB-77	0,1	1
37 Alachlor	0,3	1,1	93 PCB-81	0,1	1
38 Alcani, C10-C13, cloro	0,4	1,3	94 Pentaclorobenzene	0,007	1,3
39 Aldrin		1	95 Pentaclorofenolo	0,4	1,1
40 Antracene	0,1	1,3	96 pp DDT	0,01	1,1
41 Atrazina	0,6	1,1	97 S DDT	0,025	1,1
42 Azinfos etile	0,01	1	98 S PCB	1	1
43 Azinfos metile	0,01	1	99 S PCDD,PCDF,PCB diossina simili (TE-I)	0,1	1
44 Bentazone	0,5	1	100 Simazina	1	1,1
45 Benzene	10	1,1	101 TBT (Sn)	0,0002	1,3
46 Benzo(a)pirene	0,05	1,3	102 Terbutilazina	0,5	1
47 Benzo(b)fluorantene + Benzo(k)fluorantene	0,03	1,3	103 Tetracloroetilene	10	1,1
48 Benzo(g,h,i)perilene + Indeno(1,2,3,c,d)pirene	0,002	1,3	104 Tetracloruro di C	12	1,1
49 Brominated diphenyl ether	0,0005	1,1	105 Toluene	5	1
50 Chlorfenvinphos	0,1	1,1	106 Triclorobenzeni	0,4	1,1
51 Chlorpyriphos	0,03	1,1	107 Tricloroetilene	10	1,1
52 ciclodiene + Aldrin + Dieldrin + Endrin + Isodrin	0,01	1,1	108 Triclorometano	2,5	1,1
53 Clorobenzene	3	1	109 Trifenilstagno	0,0002	1
54 Cloronitrotolueni	1	1	110 Triflularin	0,03	1,1
55 Demeton	0,1	1	111 Xilene	5	1
56 Di(2-ethylhexyl)phthalate	1,3	1,1			

Prodotto n. T2.1.1

Il calcolo dell'Hazard Quotient specifico per la caratterizzazione chimica dell'acqua è basato sugli stessi criteri, assunzioni e valutazioni da giudizio esperto utilizzate per i sedimenti (Figura 3). Per ogni parametro viene calcolata la variazione rispetto al riferimento, il *Ratio To Reference (RTR)*, successivamente corretta per la tipologia (peso) del contaminante (*RTRw*), per enfatizzare l'importanza dei contaminanti più pericolosi. L'Hazard Quotient specifico per questa LOE calcola un *RTRw* mediato per tutti i parametri con $RTR \leq 1$ (cioè valori inferiori rispetto agli SQA), mentre per quei contaminanti con $RTR > 1$, i singoli *RTRw* vengono addizionati in una sommatoria Σ :

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

dove N e M sono il numero dei parametri con RTR rispettivamente $\leq$ o > 1 , mentre j e k sono indici che permettono di ripetere il calcolo per N o M volte. Con questo calcolo, in funzione del numero di parametri che superano i riferimenti dell'entità del superamento e della tipologia del contaminante, l'indice di pericolo chimico dell'acqua (HQ_C) discrimina anche campioni di acqua solo moderatamente inquinati (cioè vicini ai valori di riferimento), aumenta in funzione del numero dei parametri e dell'entità dello sfioramento dei singoli, non è abbassato dall'analisi di molti parametri che non sfiorano.

Il D.M. 260/2010, individua un indice trofico, il $TRIX$, quale elemento di qualità fisico-chimica a sostegno degli Elementi di Qualità Biologica (EQB), pertanto può contribuire alla classificazione dello stato ecologico delle acque marino-costiere. L'indice dello stato trofico ($TRIX$) il cui valore numerico è dato dall'integrazione di variabili quali Ossigeno disciolto (OD%), Clorofilla "a" (Chla), Fosforo totale (P) e Azoto (N):

$$TRIX = (\log[Chla \times |OD\%| \times N \times P] - [-1.5])/1.2$$

l'indice trofico $TRIX$ è assegnato ad uno stato trofico da Elevato a scadente:

Elevato se $TRIX < 4$;

Buono se $4 \leq TRIX < 5$;

Medio se $5 \leq TRIX < 6$;

MEDIO/giallo se $2.6 \leq HQ_C < 6.5$;

ALTO/rosso se $6.5 \leq HQ_C < 13$;

MOLTO ALTO/nero se $HQ_C \geq 13$.

Le indicazioni dell'indice TRIX non vengono utilizzate nell'integrazione finale ma, qualora analizzato, sono di supporto all'indice di pericolo chimico dell'acqua (HQ_C).

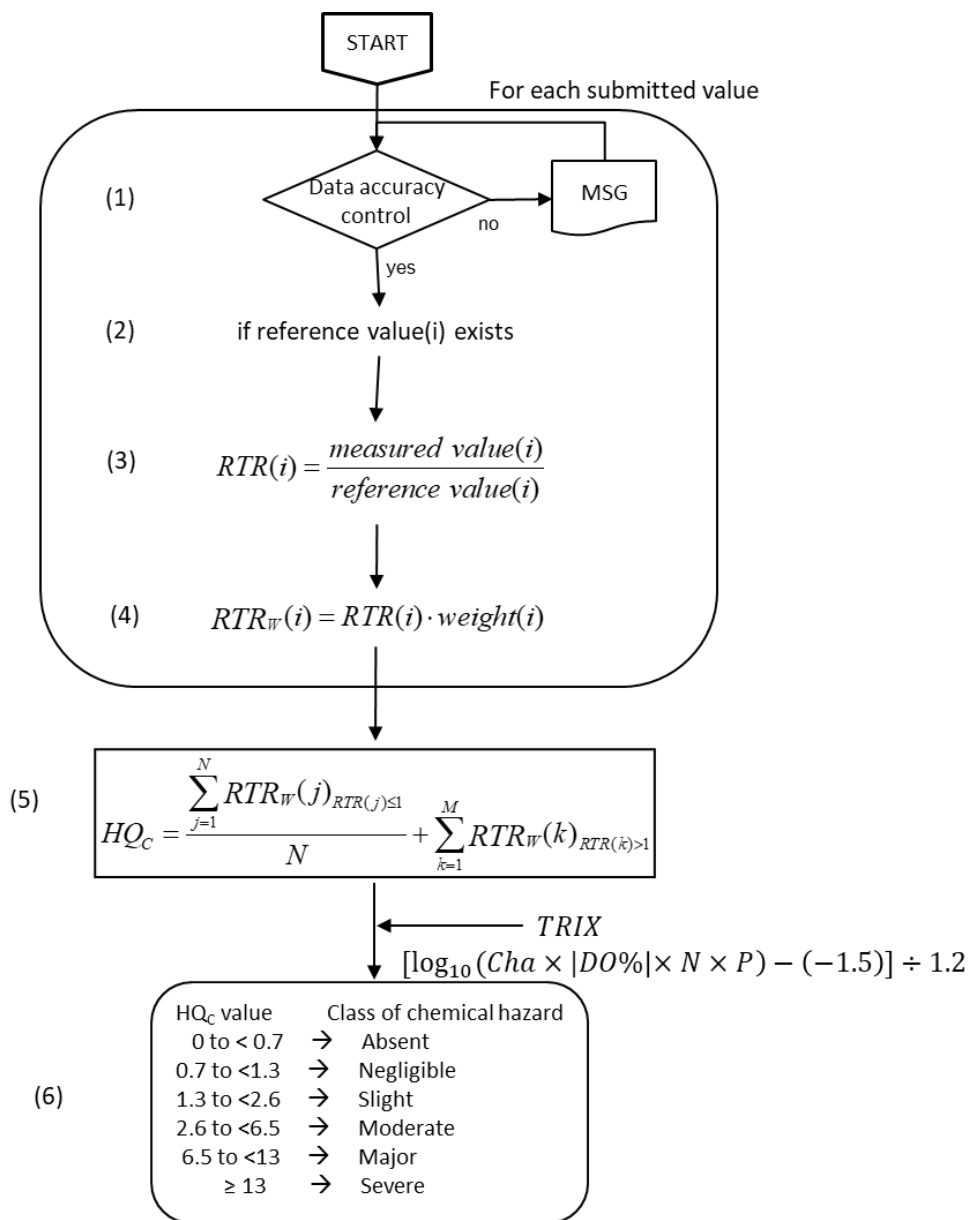


Figura 3. Flow-chart dell'elaborazione dei dati chimici per la caratterizzazione chimica della colonna d'acqua, LOE-2.

Prodotto n. T2.1.1

Basandosi su un giudizio esperto, l'indice di pericolo chimico dell'acqua è assegnato ad una classe di pericolo chimico (da assente a molto alto); l'output del modello fornisce, oltre al valore di HQ_C e al rispettivo livello di pericolo assegnato, anche informazioni aggiuntive importanti quali ad esempio la distribuzione percentuale dei parametri analizzati nelle 5 classi di pericolo (Figura 4).

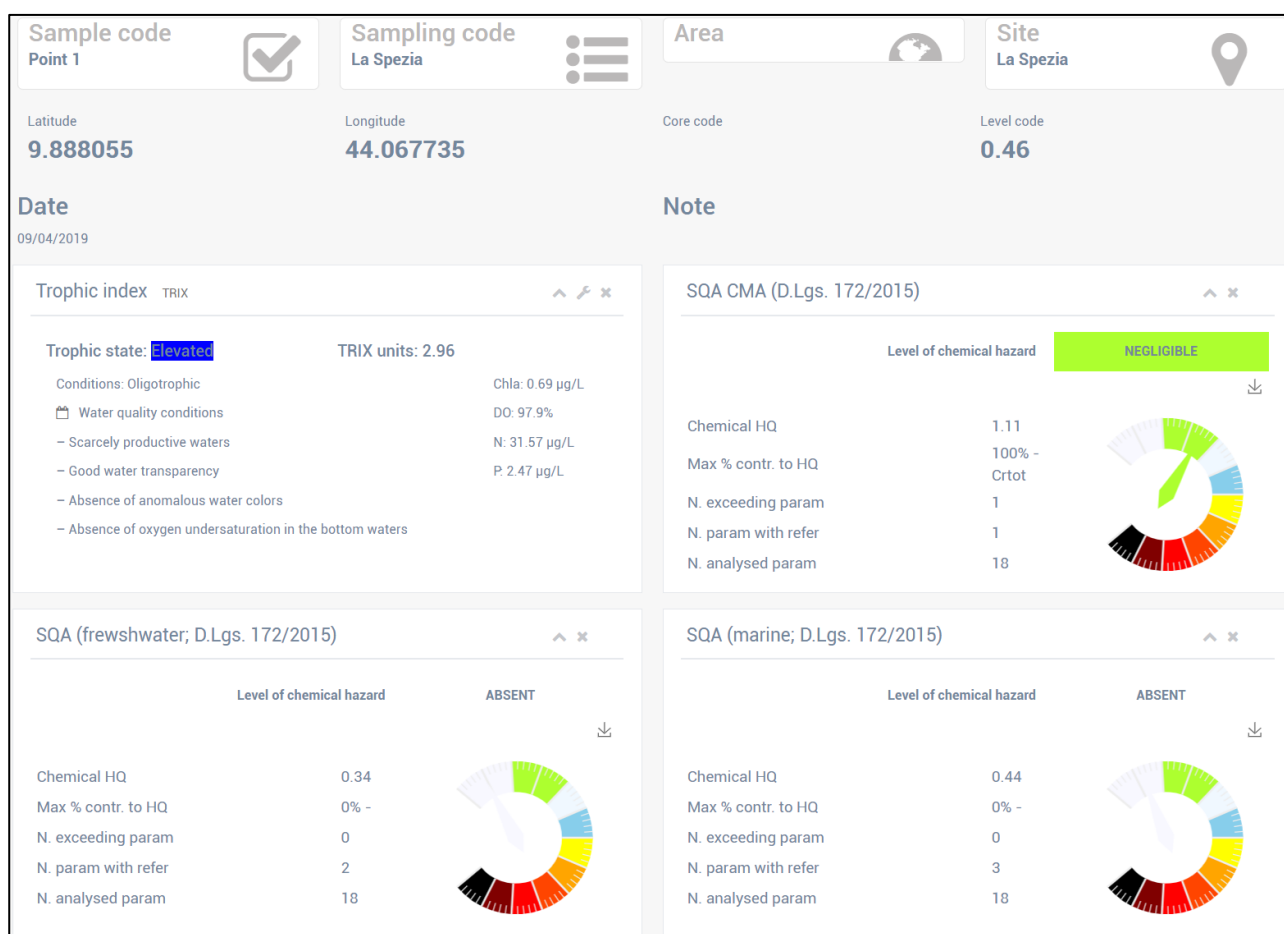


Figura 4. Esempio di output del modello dall'elaborazione dei dati chimici per la caratterizzazione della colonna d'acqua, LOE-2.

2.3. LOE-3 (Biodisponibilità)

Il modulo di elaborazione dei dati sulla biodisponibilità (LOE-3) è fondamentale in quanto permette di stabilire il pericolo associato al possibile trasferimento al comparto biotico dei contaminanti associati ai sedimenti e/o presenti nell'acqua.

In questo modulo, dopo le stesse informazioni generali sul sito di indagine e sul campionamento effettuato, è possibile selezionare la specie su cui è stata testata la biodisponibilità, scegliendo in una lista di numerosi vertebrati o invertebrati tra quelli maggiormente utilizzati come bioindicatori (*Mytilus galloprovincialis*, *Anguilla anguilla*, *Crassostrea gigas*, *Tapes sp.*, *Chamelea gallina*, *Mullus sp.*, *Hediste diversicolor*, *Scorpaena spp.*, *Zosterisessor ophiocephalus*, *Gobius sp.*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Hexaplex spp.*, etc.); viene poi richiesto di indicare il tessuto/i in cui sono condotte le analisi (ad esempio fegato/ghiandola digestiva, branchie, tessuti interi), e la condizione sperimentale che può prevedere l'analisi di organismi raccolti in condizioni naturali, organismi trapiantati, o organismi esposti in condizioni di laboratorio alle matrici di cui si voglia testare la biodisponibilità (ad esempio sedimenti, elutriati o acqua). L'elaborazione del modello consente di valutare separatamente la biodisponibilità nei diversi tessuti di una stessa specie (importante, ad esempio, per fare valutazioni sulla via di esposizione), ma anche di procedere ad integrazioni successive che riassumano il pericolo biodisponibilità per una specie o, nel caso siano stati analizzati più tipi di organismi, per un sito o area di campionamento.

I parametri chimici sui quali viene testata la biodisponibilità sono quelli già considerati nel modulo sulla caratterizzazione chimica dei sedimenti (Tabella 1). Il calcolo dell'indice di pericolo biodisponibilità (HQ_{BA}) viene riportato in Figura 5. Per ciascun parametro viene calcolata la variazione di concentrazione misurata nei tessuti degli organismi indagati rispetto ai controlli (RTR), corretta ancora una volta (RTR_w) in funzione della tipologia del contaminante e della significatività statistica delle differenze applicando la "funzione z". Questa funzione non cambia il valore di RTR se $p < 0.05$, ma lo riduce fino al 50% se $0.05 < p < 0.06$, e poi al 20% se $p > 0.06$; questa correzione, sebbene arbitraria, non preclude di considerare contaminanti che siano stati accumulati con un'elevata variabilità, ma ne riduce il contributo quantitativo nel calcolo finale dell'indice di pericolo. Il modello richiede che per ciascun analita misurato in un

campione siano indicati valore medio, deviazione standard e numero di replicati (almeno 3 per non pregiudicare il confronto statistico): tuttavia, se per motivi contingenti all'indagine, il numero dei replicati è inferiore a 3, l'operatore può decidere se applicare un fattore di correzione (0.2 o 0.5 o 1.0), per ridurre il valore di risultati che non siano stati testati statisticamente.

A seconda del valore di RTR_w ottenuto, ciascun contaminante analizzato viene attribuito ad una di 5 classi di pericolo (da assente a molto alto), sulla base di un giudizio esperto che considera la variabilità naturale delle concentrazioni tissutali dei contaminanti negli organismi: il parametro viene assegnato alle classi Assente o Basso se $RTR_w < 2.6$ (cioè un aumento delle concentrazioni tissutali inferiore a 2 volte rispetto a quanto misurato nei controlli per una sostanza non pericolosa e prioritaria), Medio se $2.6 \leq RTR_w < 6.5$, Alto se $6.5 \leq RTR_w < 13$, e Molto Alto se $RTR_w \geq 13$ (ad esempio un aumento di 10 volte per un composto pericoloso e prioritario).

Il calcolo dell'indice cumulativo di pericolo biodisponibilità (HQ_{BA}) non considera i parametri con $RTR_w < 1.3$ (effetto Assente), calcola la media di quelli con RTR_w compreso tra 1.3 e 2.6 (effetto Basso), e somma (Σ) tutti gli $RTR_w > 2.6$ (parametri con effetti Medio, Alto e Molto Alto):

$$HQ_{BA} = \frac{\sum_{n=1}^j RTR_w(n)_{1.3 \leq RTR_w < 2.6}}{j} + \sum_{n=1}^k RTR_w(n)_{RTR_w \geq 2.6}$$

Il livello complessivo di pericolo biodisponibilità viene poi calcolato in funzione della distribuzione % dei parametri nelle varie classi secondo la formula:

$$(\%param_{RTR < 1.3}) + (\%param_{1.3 \leq RTR < 2.6} \cdot 3) + (\%param_{2.6 \leq RTR < 6.5} \cdot 9) + (\%param_{6.5 \leq RTR < 13} \cdot 27) + (\%param_{RTR \geq 13} \cdot 81)$$

Il valore ottenuto può oscillare tra un minimo di 100 (che corrisponde al livello di pericolo biodisponibilità Assente, quando il 100% dei parametri analizzati è stato assegnato alla prima classe di effetto) fino ad 8100 (livello di pericolo biodisponibilità Molto Alto, quando il 100% dei parametri analizzati è stato assegnato all'ultima classe di effetto). La scelta di un fattore moltiplicativo cubico aumenta molto l'importanza dei parametri che rientrano nelle classi di effetto più alte, ed è stata validata dopo numerose simulazioni per garantire che un elevato livello di pericolo, che potrebbe derivare anche da un singolo parametro che sia stato

Prodotto n. T2.1.1

fortemente accumulato negli organismi, non sia mascherato dalla contemporanea analisi di altri composti che rientrano invece nelle classi di effetto più basse. L'output del modello riassume il numero dei parametri assegnati a ciascuna delle 5 classi di effetto, il valore dell'indice di pericolo biodisponibilità e la classe di pericolo assegnata (Figura 6).

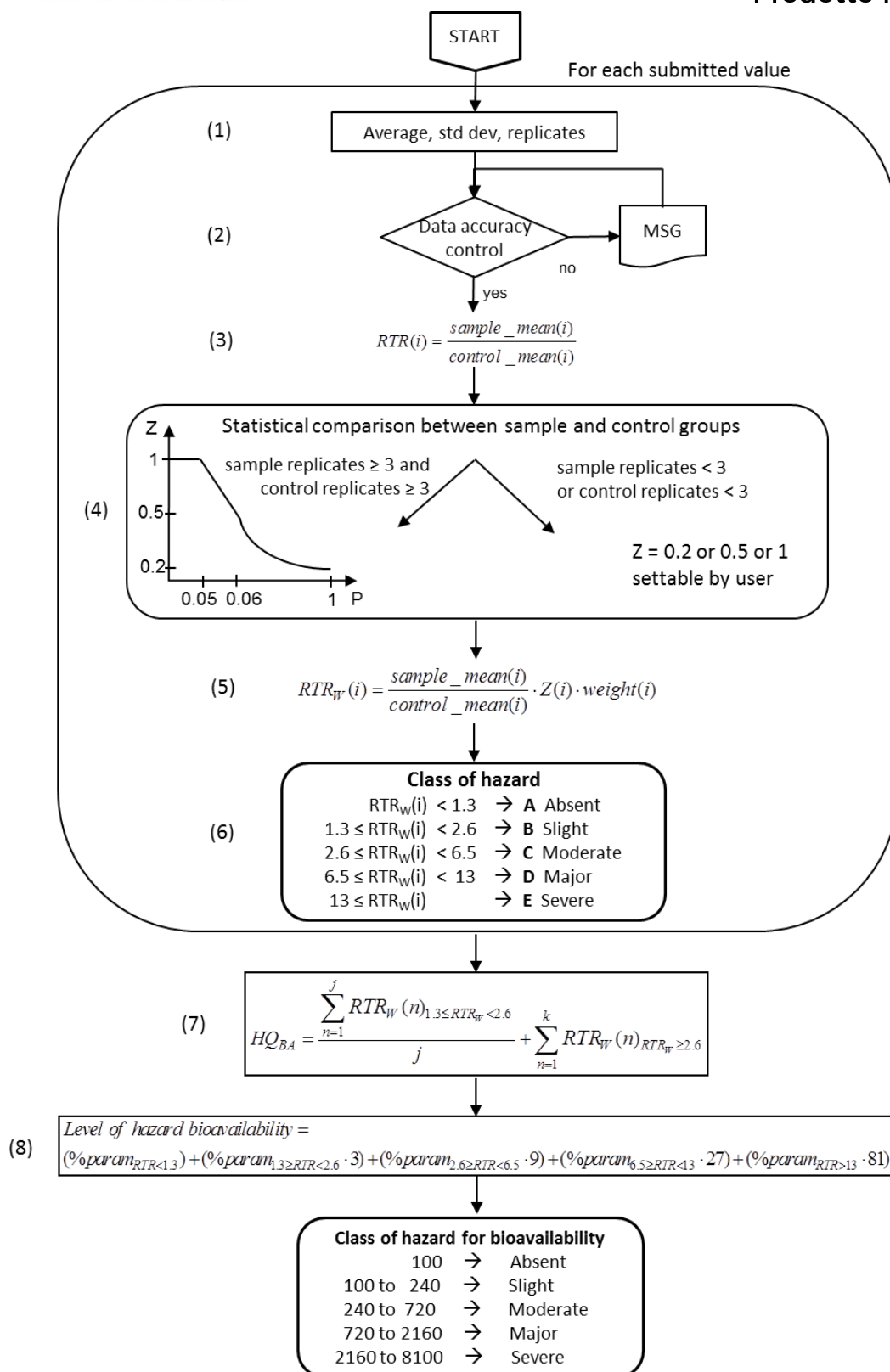


Figura 5. Flow-chart dell'elaborazione dei dati dell'elaborazione dei dati di biodisponibilità, LOE-3.

Sample code GR-OL-I-MT-01		Sampling code I campagna GR-OL-I-MT-01		Area Olbia		Site Banchina Isola Bianca	
Latitude 40.925851	Longitude 9.531496	Core code	Level code	Note Banchina Isola Bianca			
Date 26/07/2018				Bioavailability			
Reference area: Olbia Reference site: Banchina Isola Bianca Experimental condition: Transplanted Exposure time: Specie: Mytilus_galloprovincialis Tissue: Whole tissues				Level of hazard for bioavailability			
				Bioavailability HQ: 6.12 N. param in class ABSENT: 36 N. param in class SLIGHT: 6 N. param in class MODERATE: 1 N. param in class MAJOR: 0 N. param in class SEVERE: 0			
							

Figura 6. Esempio di output del modello dell'elaborazione dei dati di biodisponibilità, LOE-3.

2.4. LOE-4 (Biomarker)

I biomarkers rappresentano le prime alterazioni evidenziabili a livello molecolare e cellulare come risposta ai contaminanti ambientali ed hanno dunque un potenziale applicativo notevole per evidenziare precocemente l'insorgenza, o l'eventuale regressione di una condizione di disturbo chimico, per valutare l'impatto biologico e prevedere gli effetti nel medio-lungo termine quando si voglia monitorare una attività antropica o controllare l'efficienza di operazioni di recupero ambientale.

Nel modulo sulle analisi dei Biomarkers (LOE-4), dopo le informazioni generali sul sito di indagine e sul campionamento, viene selezionata la specie tra quelle già riportate nel modulo precedente e previste come bioindicatori anche per l'analisi della biodisponibilità (Tabella 3); viene quindi indicata la condizione sperimentale (organismi naturali, trapiantati, o esposti in condizioni di laboratorio) dei campioni ed i tessuti sui cui è stata effettuata l'analisi dei biomarker.

I biomarker contemplati nel modello rientrano all'interno di un'ampia lista di risposte (Tabella 3a-b) comunemente utilizzate e validate dalla comunità scientifica internazionale (Cajaraville *et al.*, 2000; Goksøyr, 2006; Koehler, 2004; Moore *et al.*, 2006; Regoli, 2000; Regoli *et al.*, 2002; Viarengo *et al.*, 2007). A ciascun biomarker è associato un peso da 1 a 3, a seconda della rilevanza biologica della risposta nel tessuto indagato e del livello di conoscenze sui meccanismi coinvolti; inoltre, per ciascun biomarker, in funzione della specie e del tessuto analizzati, è stabilita anche una soglia di variazione biologicamente significativa (*Threshold*) che tiene conto delle possibili risposte bi-fasiche di certi biomarkers che possono essere sia indotti che inibiti (Tabella 3a-b). Il modello non impone l'analisi di specifici biomarkers, lasciando la possibilità di scegliere tra le risposte ritenute più adeguate in funzione dell'indagine o dell'esperienza di chi la conduce; tuttavia, per garantire un approccio multi-biomarkers, è richiesto come requisito minimo per calcolare l'indice cumulativo di pericolo per i biomarkers HQ_{BM} , che il peso totale delle risposte analizzate non sia inferiore a 6, con almeno 3 biomarkers di peso ≥ 1.2 .

Tabella 3a. Lista dei biomarkers con relativi pesi (W) e soglie (T-, T+) previsti per le varie specie di invertebrati

INVERTEBRATES	BIOMARKER	Digestive gland				Gills				Whole tissues				Whole tissues				Haemolymph				Gonads			
		W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species
a) <i>Chamalea gallina</i> b) <i>Crassostrea</i> spp c) <i>Hediste diversicolor</i> d) <i>Hexaplex</i> spp e) <i>Mytilus galloprovincialis</i> f) <i>Tapes</i> spp	Acetylcholinesterase	1.5	25	30	abdef	1.5	25	30	abdef	0.75	25	30	af	1.5	25	30	c	1.5	25	30	abcdef				
	AcylCoA oxidase PP	1.2	20	30	abdef	1.2	20	30	abdef	0.6	20	30	af	1.2	20	30	c								
	Antioxidants catalase	1	25	25	abdef	1	25	25	abdef	0.5	25	25	af	1	25	25	c								
	Antioxidants Glutathione	1	25	25	abdef	1	25	25	abdef	0.5	25	25	af	1	25	25	c								
	Antioxidants Glutathione peroxidases CHP	1	25	25	abdef	1	25	25	abdef	0.5	25	25	af	1	25	25	c								
	Antioxidants Glutathione peroxidases H2O2	1	25	25	abdef	1	25	25	abdef	0.5	25	25	af	1	25	25	c								
	Antioxidants Glutathione reductase	1	25	25	abdef	1	25	25	abdef	0.5	25	25	af	1	25	25	c								
	Antioxidants Glutathione S transferases	1	25	25	abdef	1	25	25	abdef	0.6	25	25	af	1	25	25	c								
	Antioxidants SOD	1	25	25	abdef	1	25	25	abdef	0.6	25	25	af	1	25	25	c								
	BaP hydroxylase	0.6		50	abdef																				
	Butirrylcholinesterase	1.5	25	30	abdef	1.5	25	30	abdef	0.75	25	30	af	1.5	25	30	c	1.5	25	30	abcdef				
	Ca ATPase	1	25	30	abdef	1	25	30	abdef	1	25	30	af	1	25	30	c								
	Carboxylesterase	1.5	25	30	abdef	1.5	25	30	abdef	0.75	25	30	af	1.5	25	30	c	1.5	25	30	abcdef				
	DNA damage Comet					1.5		25	abdef									1.5		25	abcdef				
	DNA damage micronuclei					1.9			abdef									1.9			abcdef				
	EROD	0.7		100	abdef																				
	Gonadosomatic Index																					1	15		abdef
	Hepatosomatic Index	1	15		abdef																				
	Histopathology	2.4			abdef																	2.4			abdef
	HSP	1		100	abdef	1		100	abdef	0.75		100	af	1		100	c								
	Imposex																					1.9			d
	Lipofuscin	1.2	30	50	abdef	1.2	30	50	c																
	Lysosomal stability LLP	1.2	25		abdef																				
	Lysosomal stability NRRT																	1.2	25		abdef				
	Lysosomes cytoplasm	1.5		50	abdef									1.5		50	c								
	Malondialdehyde	1.2	30	50	abdef	1.2	30	50	abdef	0.75	30	50	af	1.2	30	50	c								
	Metallothioneins	1		40	abdef	1		40	abdef	0.5		40	af	1		40	c								
	Mortality (not survival!)													3		15	acdef								
	MXR	1.2	25	50	abdef	1.2	25	50	abdef	0.5	25	50	af	1.2	25	50	c								
	Neutral lipids	1.2	25	100	abdef									1.2	25	100	c								
	Pgp	1.2	25	50	abdef	1.2	25	50	abdef	0.6	25	50	af	1.2	25	50	c								
	Reproductive impairment													2.4		15	abcdef								
	Stress on Stress (Air survival time)													1.5	20		abcdef								
	TOSCA hydroxyl radicals	1.5	20	25	abdef	1.5	20	25	abdef	0.5	20	25	af	1.5	20	25	c								
	TOSCA peroxy radicals	1.5	20	25	abdef	1.5	20	25	abdef	0.5	20	25	af	1.5	20	25	c								
	TOSCA peroxynitrite	1.5	20	25	abdef	1.5	20	25	abdef	0.5	20	25	af	1.5	20	25	c								
	Vitellogenin (mRNA or protein)	1.9			abdef									0.95			af	1.5			abcdef	1.9			abcdef
	Vitellogenin (male vs female)	1.9			abdef									0.95			af	1.5			abcdef	1.9			abcdef
	Vitellogenin (sample male vs control male)	1.9			abdef									0.95			af	1.5			abcdef	1.9			abcdef
	Granulocytes halynocytes ratio																	1	25	25	e				
	Phagocytosis %																	1	25	25	e				



Prodotto n. T2.1.1

Tabella 3b. Lista dei biomarkers con relativi pesi (W) e soglie (T-, T+) previsti per le varie specie di vertebrati

VERTEBRATES	BIOMARKER	Liver				Gills				Brain				Blood				Bile				Spleen				Gonads				Whole animal			
		W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species	W	T-	T+	Species
g) <i>Anguilla anguilla</i> h) <i>Dicentrarchus labrax</i> i) <i>Gobius spp</i> j) <i>Mullus spp</i> k) <i>Scorpaena spp</i> l) <i>Sparus aurata</i> m) <i>Zosterisess</i> or <i>ophiocephalus</i>	Acetylcholinesterase	1.5	25	30	ghijklm	1.9	25	30	ghijklm	1.9	25	30	ghijklm	1.5	25	30	ghijklm																
	AcylCoA oxidase PP	1.2	20	30	ghijklm	1.2	20	30	ghijklm																								
	ALA D													1	25	25	ghijklm																
	Antioxidants catalase	1	25	25	ghijklm	1	25	25	ghijklm	0.7	25	25	ghijklm																				
	Antioxidants Glutathione	1	25	25	ghijklm	1	25	25	ghijklm	0.7	25	25	ghijklm																				
	Antioxidants Glutathione peroxidases CHP	1	25	25	ghijklm	1	25	25	ghijklm	0.7	25	25	ghijklm																				
	Antioxidants Glutathione peroxidases H2O2	1	25	25	ghijklm	1	25	25	ghijklm	0.7	25	25	ghijklm																				
	Antioxidants Glutathione reductase	1	25	25	ghijklm	1	25	25	ghijklm	0.7	25	25	ghijklm																				
	Antioxidants Glutathione S transferases	1	25	25	ghijklm	1	25	25	ghijklm	0.7	25	25	ghijklm																				
	Antioxidants SOD	1	25	25	ghijklm	1	25	25	ghijklm	0.7	25	25	ghijklm																				
	BaP hydroxylase	1.5		50	ghijklm																												
	Butirrylcholinesterase	1.5	25	30	ghijklm	1.5	25	30	ghijklm					1.5	25	30	ghijklm																
	Ca ATPase	1	25	30	ghijklm	1	25	30	ghijklm																								
	Carboxylesterase	1.5	25	30	ghijklm	1.5	25	30	ghijklm					1.5	25	30	ghijklm																
	DNA damage Comet					1.5		25	ghijklm					1.5		25	ghijklm																
	DNA damage micronuclei					1.9			ghijklm					1.9			ghijklm					1.9			ghijklm								
	EROD	1.5		200	ghijklm	0.6		200	ghijklm	0.8		100	ghijklm																				
	Gonadosomatic Index																									1	15		ghijklm				
	Hepatosomatic Index	1	15		ghijklm																												
	Histopathology	2.4			ghijklm																				2.4			ghijklm					
	Carcinogenesis	2.4			ghijklm																												
	HSP	1		100	ghijklm	1		100	ghijklm																								
	Lipofuscin	1.2	30	50	ghijklm	1.2	30	50	ghijklm	0.6	30	50	ghijklm																				
	Lysosomal stability LLP	1.2	25		ghijklm																												
	Lysosomal stability NRRT													1.2	25		ghijklm																
	Lysosomes cytoplasm	1.5		50	ghijklm																												
	Malondialdehyde	1.2	30	50	ghijklm	1.2	30	50	ghijklm	0.6	30	50	ghijklm																				
	Bile metabolites (BaP)																	1	100	ghijklm													
	Bile metabolites (Naph)																	1	200	ghijklm													
	Bile Metabolites (Pyr)																	1	150	ghijklm													
	Metallothioneins	1		40	ghijklm	1		40	ghijklm																								
	Mortality (not survival!)																												3	15	ghijklm		
	MXR	1.2	25	50	ghijklm	1.2	25	50	ghijklm	0.8	25	50	ghijklm																				
	Neutral lipids	1.2	25	100	ghijklm																												
	Pgp	1.2	25	50	ghijklm	1.2	25	50	ghijklm	0.8	25	50	ghijklm																				
	Porphyrines	1		25	ghijklm									1		25	ghijklm																
	TOSCA hydroxyl radicals	1.2	25	50	ghijklm	1.2	25	50	ghijklm	0.8	25	50	ghijklm																				
	TOSCA peroxy radicals	1.2	25	50	ghijklm	1.2	25	50	ghijklm	0.8	25	50	ghijklm																				
	TOSCA peroxy nitrite	1.2	25	50	ghijklm	1.2	25	50	ghijklm	0.8	25	50	ghijklm																				
	Vitellogenin (mRNA or protein)	1.9			ghijklm									1.9			ghijklm								1.9			ghijklm					
	Vitellogenin (male vs female)	1.9			ghijklm									1.9			ghijklm								1.9			ghijklm					
	Vitellogenin (sample male vs control male)	1.9			ghijklm									1.9			ghijklm								1.9			ghijklm					
	Zona radiata proteins	1.9			ghijklm									1.9			ghijklm								1.9			ghijklm					
	ZRP (male vs female)																																
	ZRP (sample male vs control male)																																

La variazione misurata per ciascun biomarker è confrontata con la soglia e corretta sia per la significatività statistica della differenza rispetto al controllo, che per l'importanza biologica della risposta (Figura 7); anche nel modulo biomarker la correzione della significatività statistica viene effettuata mediante l'applicazione della Funzione z, già descritta nel flow-chart relativo alla LOE-3 sulla biodisponibilità. Sulla base di un giudizio esperto, la variazione di ciascun biomarker viene assegnata ad una di 5 possibili classi di effetto: Assente o Basso se l'effetto misurato per il biomarker è più basso (o vicino) alla soglia, Medio se l'effetto è compreso tra la soglia ed un valore doppio (per differenze statisticamente significative), Alto se l'effetto è tra le 2 e le 3 volte superiore rispetto alla soglia, Molto Alto se l'effetto è più di 3 volte maggiore rispetto alla soglia.

I risultati di tutti i biomarkers sono diversamente pesati nel calcolo del pericolo cumulativo HQ_{BM} , che non considera il contributo dei biomarker nelle prime due classi di effetto (Assente e Basso), calcola la media degli effetti pesati ($Effect_w$) per quelli in classe Medio, e addiziona (Σ) quelli assegnati alle ultime due classi di effetto (Alto e Molto Alto):

$$HQ_{BM} = \left(\frac{\sum_{j=1}^N Effect_w(j)_{1 < Effect(j) \leq 2}}{num\ biomarker_{1 < Effect(j) \leq 2}} + \sum_{k=1}^M Effect_w(k)_{Effect(j) > 2} \right)$$

Il livello complessivo di pericolo per i biomarker viene poi calcolato in funzione della distribuzione % dei parametri nelle varie classi secondo la formula:

$$(\%biomarker_{Effect < 1} \cdot 1) + (\%biomarker_{1 \geq Effect < 1.5} \cdot 1.5) + (\%biomarker_{1.5 \geq Effect < 2.5} \cdot 2.5) + (\%biomarker_{2.5 \geq Effect < 4} \cdot 4) + (\%biomarker_{Effect \geq 4} \cdot 6)$$

Il valore ottenuto può oscillare tra un minimo (che corrisponde al livello di pericolo biomarker Assente, quando il 100% delle risposte analizzate è stato assegnato alla prima classe di effetto) fino a 600 (livello di pericolo biomarker Molto Alto, quando il 100% delle risposte analizzate è stato assegnato all'ultima classe di effetto). Il fattore moltiplicativo è più basso rispetto a quello cubico descritto nella LOE-3 sulla biodisponibilità, dove anche un singolo composto chimico potrebbe rappresentare un pericolo molto alto se accumulato a dosi estremamente elevate; all'interno di una cellula invece, le diverse risposte che vengono analizzate sono sempre (direttamente o indirettamente) collegate, e dunque una integrazione più bilanciata tra numero, entità e rilevanza biologica delle risposte è stata calcolata e validata.

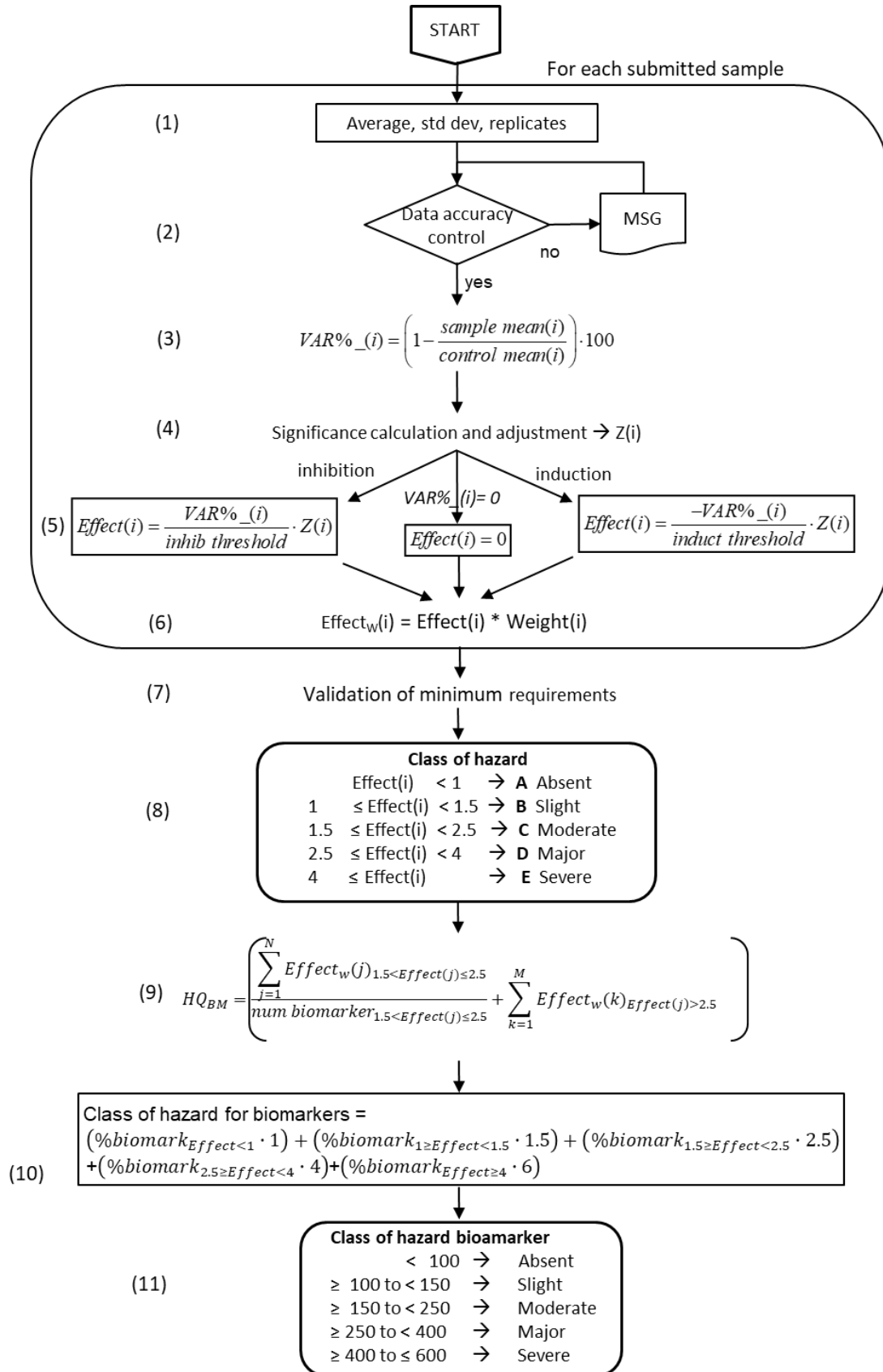


Figura 7. Flow-chart dell'elaborazione dei dati di biomarkers, LOE-4.

Prodotto n. T2.1.1

L'output del modello indica il numero di biomarkers all'interno di ciascuna delle 5 classi, il valore di pericolo cumulativo HQ_{BM} e la classe di pericolo complessivo per i biomarkers (Figura 8).

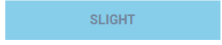
Sample code GR-SP-III-MT-03		Sampling code Terza campagna GR-SP-III-MT-03		Area La Spezia		Site Cadimare molo aeronautica militare																							
Latitude 44.08315167		Longitude 9.824972222		Core code		Level code																							
Date 19/11/2019		Note Seconda campagna																											
Biomarkers				Level of hazard for biomarker																									
<table> <tr> <td>Reference sample</td> <td>CTRL14 MT04</td> </tr> <tr> <td>Experimental condition</td> <td>Transplanted</td> </tr> <tr> <td>Exposure time</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Specie</td> <td>Mytilus_galloprovincialis</td> </tr> <tr> <td>Tissue</td> <td>haemolymph</td> </tr> </table>				Reference sample	CTRL14 MT04	Experimental condition	Transplanted	Exposure time		Specie	Mytilus_galloprovincialis	Tissue	haemolymph	<table> <tr> <td>Biomarker HQ</td> <td>2.2</td> </tr> <tr> <td>N. param in class ABSENT</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>N. param in class SLIGHT</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>N. param in class MODERATE</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>N. param in class MAJOR</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>N. param in class SEVERE</td> <td>0</td> </tr> </table>				Biomarker HQ	2.2	N. param in class ABSENT	4	N. param in class SLIGHT	0	N. param in class MODERATE	1	N. param in class MAJOR	0	N. param in class SEVERE	0
Reference sample	CTRL14 MT04																												
Experimental condition	Transplanted																												
Exposure time																													
Specie	Mytilus_galloprovincialis																												
Tissue	haemolymph																												
Biomarker HQ	2.2																												
N. param in class ABSENT	4																												
N. param in class SLIGHT	0																												
N. param in class MODERATE	1																												
N. param in class MAJOR	0																												
N. param in class SEVERE	0																												
				 																									

Figura 8. Esempio di output del modello dell'elaborazione dei dati di biomarkers, LOE-4.

2.5. LOE-5 (Batterie di Saggi Ecotossicologici)

Nel modulo di elaborazione dei saggi ecotossicologici (LOE-5), è possibile scegliere tra un'ampia selezione di saggi. Sono compresi saggi ecotossicologici che prevedono l'utilizzo di modelli biologici rappresentativi di numerosi *taxa* (colture cellulari, batteri, alghe ed altri vegetali acquatici, rotiferi, crostacei, nematodi, anellidi, insetti, pesci, anfibi) e livelli trofici diversi (dai decompositori ai consumatori secondari), che possono essere applicati per testare la tossicità acuta e/o cronica delle matrici più classiche (sedimento, elutriati, campioni d'acqua), misurando endpoint biologici che vanno dalla variazione di attività enzimatiche a modifiche comportamentali, comparsa di effetti genotossici, compromissioni della crescita, del potenziale riproduttivo e dello sviluppo, inibizione della bioluminescenza fino alla mortalità. La lista dei saggi ecotossicologici, degli end-point biologici misurati, delle matrici e dei tempi di esposizione previsti nel modello sono riportati nella Tabella 4.

A ciascun saggio viene attribuito un "peso" che dipende dall'end-point biologico misurato, la durata del saggio e la matrice testata, ed una "soglia" che indica una variazione ritenuta biologicamente significativa per ciascuna specie (Threshold). Il modello richiede come requisito minimo che una batteria sia composta da almeno 3 saggi (con 2 specie e 2 end-point diversi).

Tabella 4. Lista dei saggi biologici con relativi pesi, soglie e fattori di correzione, LOE-5.

SPECIES	Endpoint (E)	Threshold (%)	Exposure (T)	Matrices (M)	Weight of Assay
<i>Acartia clausi</i>	mortality	15	Acute/Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
<i>Acartia tonsa</i>	mortality	20	Acute/Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
<i>Ampelisca diadema</i>	mortality	15	Acute/Chronic	Whole sediment, Interstitial water, Elutriate, Wet sediment, Water column, Organic extracts	E x T x M
	behaviour	15	Acute/Chronic	Whole sediment, Interstitial water, Elutriate, Wet sediment, Water column, Organic extracts	E x T x M
<i>Artemia salina</i>	mortality	10	Acute/Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
<i>Balanus amphitrite</i>	behaviour	10	Acute/Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
	mortality	10	Acute/Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
<i>Brachionus plicatilis</i>	mortality	15	Acute/Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
<i>Corophium insidiosum</i>	behaviour	15	Acute/Chronic	Whole sediment, Wet sediment	E x T x M
	mortality	15	Acute/Chronic	Whole sediment, Wet sediment	E x T x M
<i>Corophium orientale</i>	behaviour	15	Acute/Chronic	Whole sediment, Wet sediment	E x T x M
	mortality	15	Acute/Chronic	Whole sediment, Wet sediment	E x T x M
<i>Crassostrea gigas</i>	development	15	Acute/Chronic	Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	mortality	15	Acute/Chronic	Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
	growth	15	Acute/Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	growth	10	Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	development	15	Acute/Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Paracentrotus lividus</i>	reproduction	15	Acute	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
	development	15	Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	growth	10	Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Skeletonema costatum</i>	growth	10	Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Sparus aurata</i>	mortality	15	Acute/Chronic	Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
	growth	15	Acute/Chronic	Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Sphaerechinus granularis</i>	reproduction	15	Acute	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
	development	15	Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Tapes philippinarum</i>	development	15	Acute/Chronic	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
<i>Tigriopus fulvus</i>	growth	10	Acute	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)
	mortality	10	Acute	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
<i>Tisbe battagliai</i>	mortality	15	Acute	Interstitial water, Elutriate, Water column, Organic extracts	E x T x M
<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescence	25	Acute	Whole sediment, Interstitial water, Elutriate, Wet sediment, Water column, Organic extracts	E x T x M (x H)

ENDPOINT	(E)	MATRIX	(M)
Behaviour	1	Whole sediment	1
Growth	1,2	Interstitial water	0,8
Reproduction	1,5	Elutriate	0,7
Development	1,9	Wet sediment	0,6
Bioluminescence	2,4	Water column	0,3
Mortality	3	Organic extracts	0,1
Algal grow	2,1	EXPOSURE TIME (T)	
		acute	1
		chronic	0,7

Prodotto n. T2.1.1

Come evidenziato dal flow chart della LOE-5 (Figura 9), per ciascun saggio il modello calcola l'effetto (E) inteso come variazione percentuale dell'endpoint biologico rispetto al controllo, che viene successivamente corretto in funzione della significatività statistica della differenza (mediante la Funzione z , già descritta per le precedenti LOE-3 e LOE-4) e rapportato al valore di *Threshold* specifica per ciascun saggio (E_w).

Il valore dell'indice di pericolo ecotossicologico della batteria è dato dalla sommatoria (Σ) degli E_w calcolati per tutti i saggi ed ulteriormente corretti da un fattore w_2 che considera la rilevanza dell'endpoint biologico misurato, la matrice e il tempo di esposizione (Tabella 4):

$$HQ_{\text{Battery}}: \Sigma Effect_w(k) w_2$$

Per l'attribuzione del livello di pericolo derivante dalla batteria di saggi ecotossicologici, il valore ottenuto per l'indice HQ_{Battery} è normalizzato ad una scala compresa tra 0 e 10, dove 1 corrisponde al valore di soglia della batteria (cioè il valore di HQ che si otterrebbe se tutti i saggi della batteria mostrassero un effetto pari alla rispettiva soglia) e 10 corrisponde al valore massimo della batteria (quando tutti i saggi mostrano il 100% di effetto). A seconda del valore dell' HQ_{Battery} normalizzato, il livello di pericolo ecotossicologico viene attribuito alla classe Assente (se <1 e con tutti i saggi della batteria con $E_w < 1$, oppure se <0.8 e al massimo 1 saggio con $E_w > 1$), Basso (se compreso tra 0.8 e 1.5), Medio (tra 1.5 e 3), Alto (tra 3 e 6), Molto Alto (tra 6 e 10).

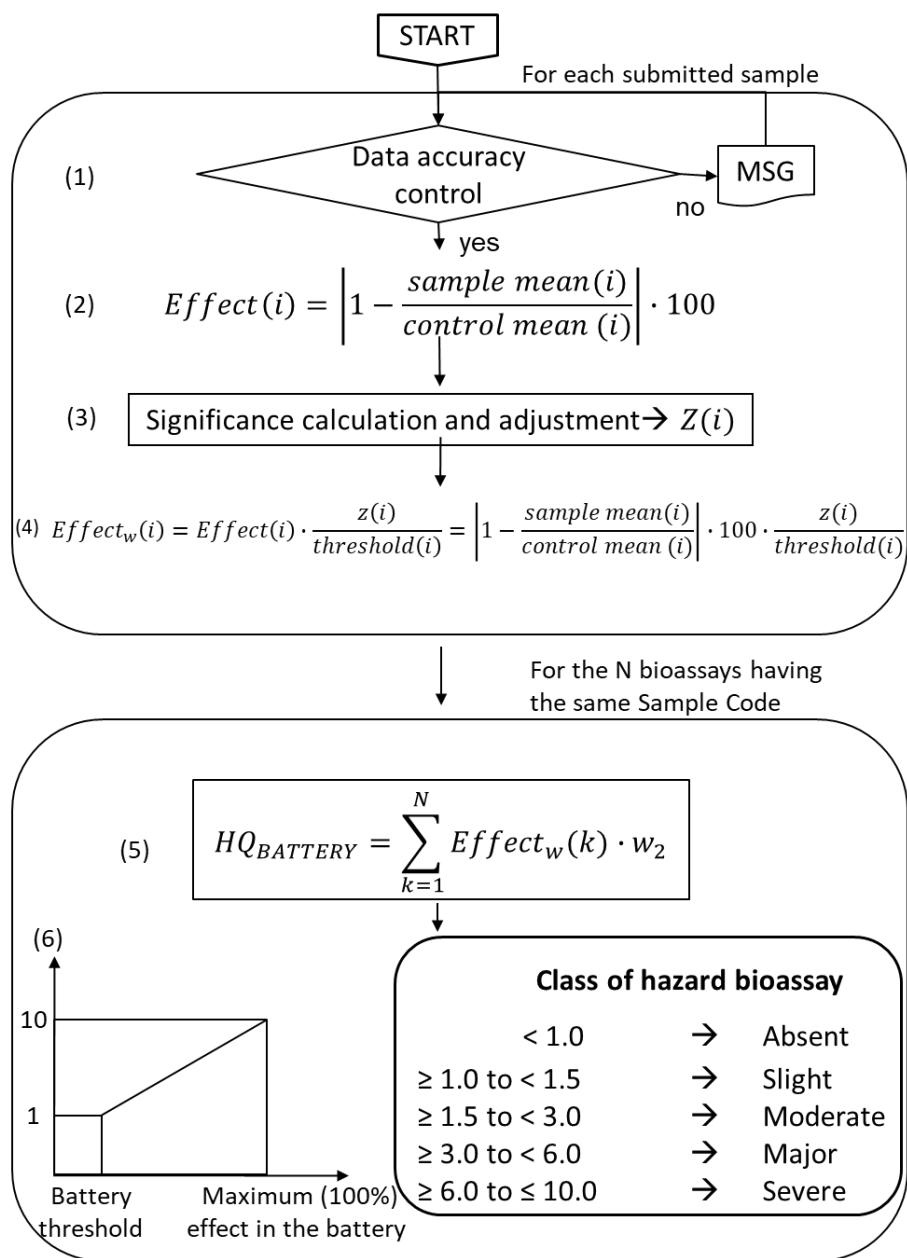


Figura 9. Flow-chart dell'elaborazione dei dati dei saggi ecotossicologici, LOE-5.

L'output finale del modello fornisce informazioni sugli effetti misurati nei singoli saggi, oltre che il valore dell'indice di pericolo calcolato per la batteria di saggi ecotossicologici e la sua attribuzione ad uno dei 5 livelli di pericolo (Figura 10).

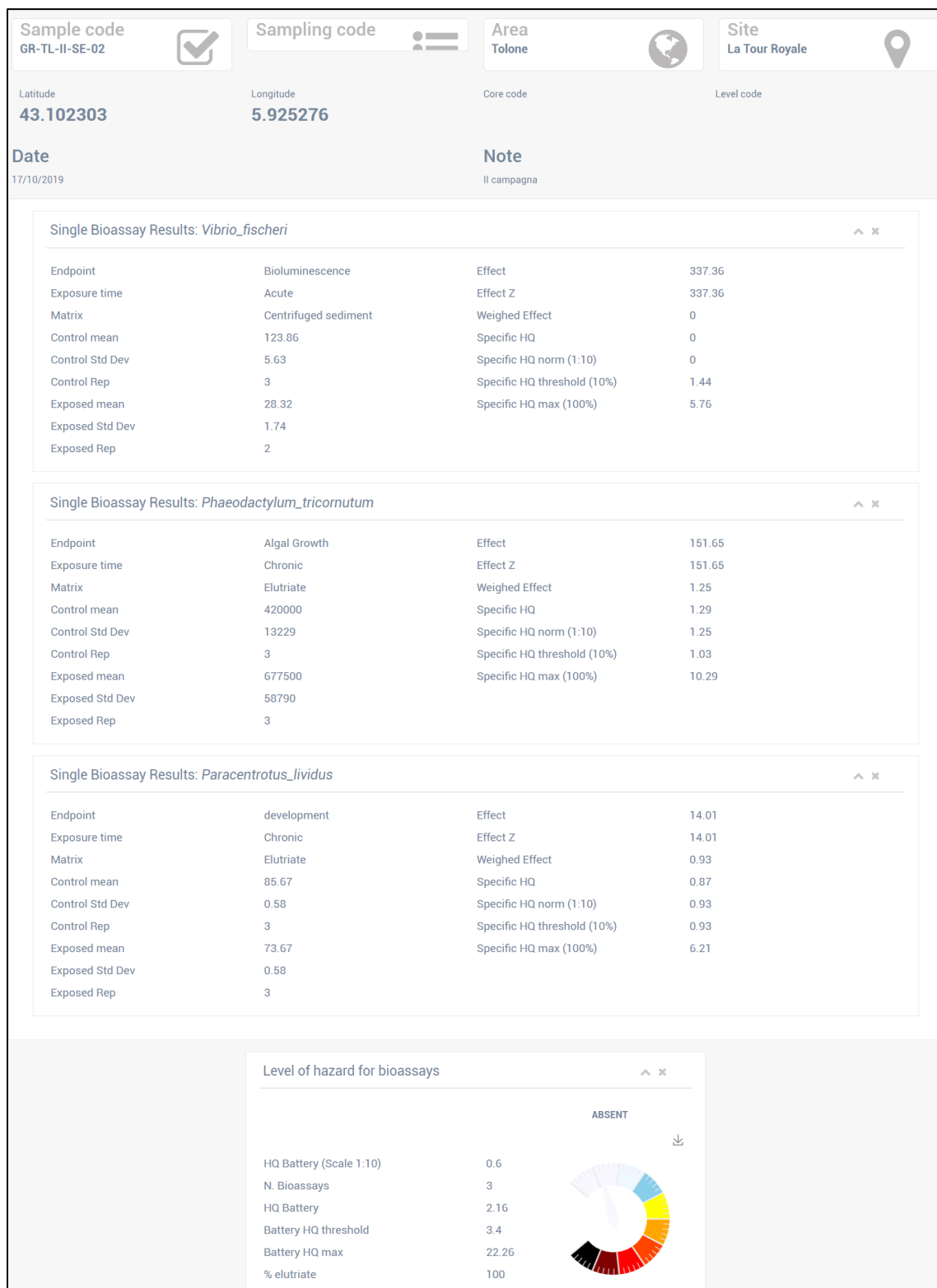


Figura 10. Esempio di output del modello dell'elaborazione dei saggi ecotossicologici, LOE-5.

2.6. LOE-6 (Comunità bentoniche)

Per quanto riguarda l'elaborazione dei dati sulle comunità bentoniche, il modello utilizza la lista delle specie per elaborare un'ampia serie di indici univariati e multivariati, tra quelli più ampiamente descritti ed utilizzati a livello scientifico, che prendono in considerazione la composizione specifica e la ripartizione degli individui fra le specie e nei singoli campioni.

Tra questi vi sono semplici descrittori di comunità come la densità numerica (N), la ricchezza tassonomica (S) intesa come numero di specie o *taxa* per campione. Vi sono poi degli indici di diversità tassonomica come l'indice Shannon-Weaver (Shannon & Weaver, 1963), Margalef (Margalef, 1969), Pielou (Pielou, 1969).

Gli indicatori ecologici elaborati includono invece gli indici AMBI (Borja et al., 2000), M-AMBI (Muxika et al., 2007), BENTIX (Simboura & Zenetos, 2002), BOPA (Gesteira & Dauvin, 2000), BITS (Mistri & Munari, 2008) e EcoQI (Zenetos & Simboura, 2001), EcoQII (Vincent et al., 2002) (Tabella 5).

Tabella 5. Elenco dei descrittori di comunità, indici e indicatori ecologici previsti dal modello.

Abbondanza totale N	Numero complessivo di individui per campione
Ricchezza specifica totale (Pielou, 1974) S	Numero totale di specie presenti in ogni campione
Diversità specifica di Shannon-Weaver (1949) H' $H' = \sum_{i=1}^s (p_i)(\log 2 p_i)$ p_i=frequenza numerica della specie i-esima rispetto al totale degli individui s= numero di specie	Parametro ottenuto rapportando l'abbondanza totale e la ricchezza specifica tra loro e con i dati dell'intero stock campionato
Equitabilità di Pielou (1974) J $J = \frac{H'}{H'_{\max}} = \frac{H'}{\log S}$	Misura della distribuzione degli individui tra le specie
AZTI' Marine Biotic Index AMBI $AMBI = \frac{[(0 \times \%GI) + (1.5 \times \%GII) + (3 \times \%GIII) + (4.5 \times \%GIV) + (6 \times \%GV)]}{100}$ GI: specie sensibili GII: specie sensibili/tolleranti GIII: specie tolleranti GIV: specie opportuniste (secondo ordine) GV: specie opportuniste (primo ordine)	Si basa sulla classificazione delle specie macrobentoniche in cinque gruppi che corrispondono a differenti livelli di sensibilità, partendo dal primo (I), il più sensibile per arrivare al gruppo V che comprende specie opportuniste caratteristiche di ambienti fortemente inquinati
Multimetric-AZTI Marine Biotic Index M-AMBI	I valori di AMBI vengono combinati con quelli di diversità di

Prodotto n. T2.1.1

	Shannon (H') e di ricchezza specifica (S) mediante un'Analisi Fattoriale
Bentic Index BENTIX $BENTIX = \frac{[6 \times \%GI + 2 \times (\%GII + \%GIII)]}{100}$ GI: taxa sensibili e indifferenti GII: taxa tolleranti e opportunisti di secondo ordine GIII: taxa opportunisti di primo ordine	Usa lo stesso approccio metodologico di AMBI con i gruppi ecologici considerati ridotti da 5 a 3
Benthic Opportunistic Polychaetes mphipods BOPA $\log [fp/(fa + 1) + 1]$ fp: frequenza dei policheti opportunisti; fa: frequenza degli anfipodi	L'indice considera il numero totale di individui del campione, i policheti opportunisti e gli anfipodi
Benthic Index based on Taxonomic Sufficiency BITS $\log[(6fl + fII)/(fIII + 1) + 1] + \log[nI/(nII + 1) + nI/(nIII + 1) + 0.5nII/(nIII + 1) + 1]$ fl, fII, fIII: frequenza delle famiglie rispettivamente sensibili, tolleranti, opportuniste; nI, nII, nIII: numero di famiglie	L'indice considera la frequenza e il peso delle famiglie presenti nel campione, suddivise in tre gruppi: sensibili, tolleranti, opportuniste

Il modello fornisce l'elaborazione automatica di tutti questi indici e, per ciascuno di questi, elabora degli indicatori grafici di pericolo di immediata comprensione e lettura.

Il Flowchart completo specifico per il modulo LOE6 è riportato in Figura 11. Le fasi principali, dopo un controllo dati, sono il calcolo dei descrittori di comunità, indici e indicatori ecologici (Figura 12).

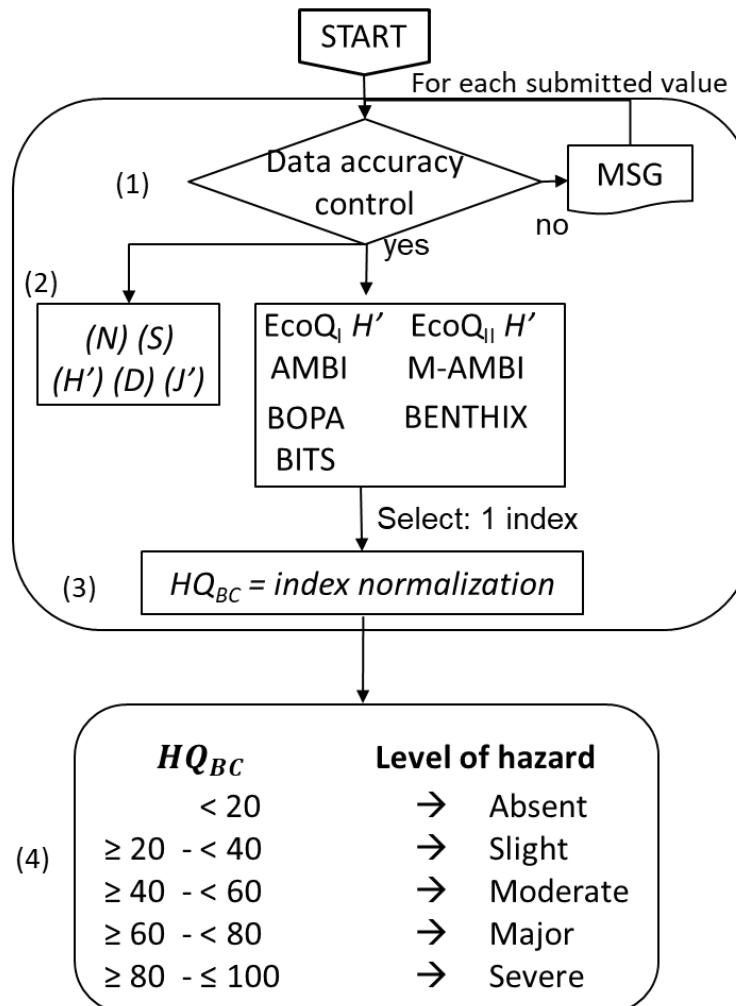


Figura 11. Flow-chart dell'elaborazione dei dati delle comunità bentoniche, LOE-6.

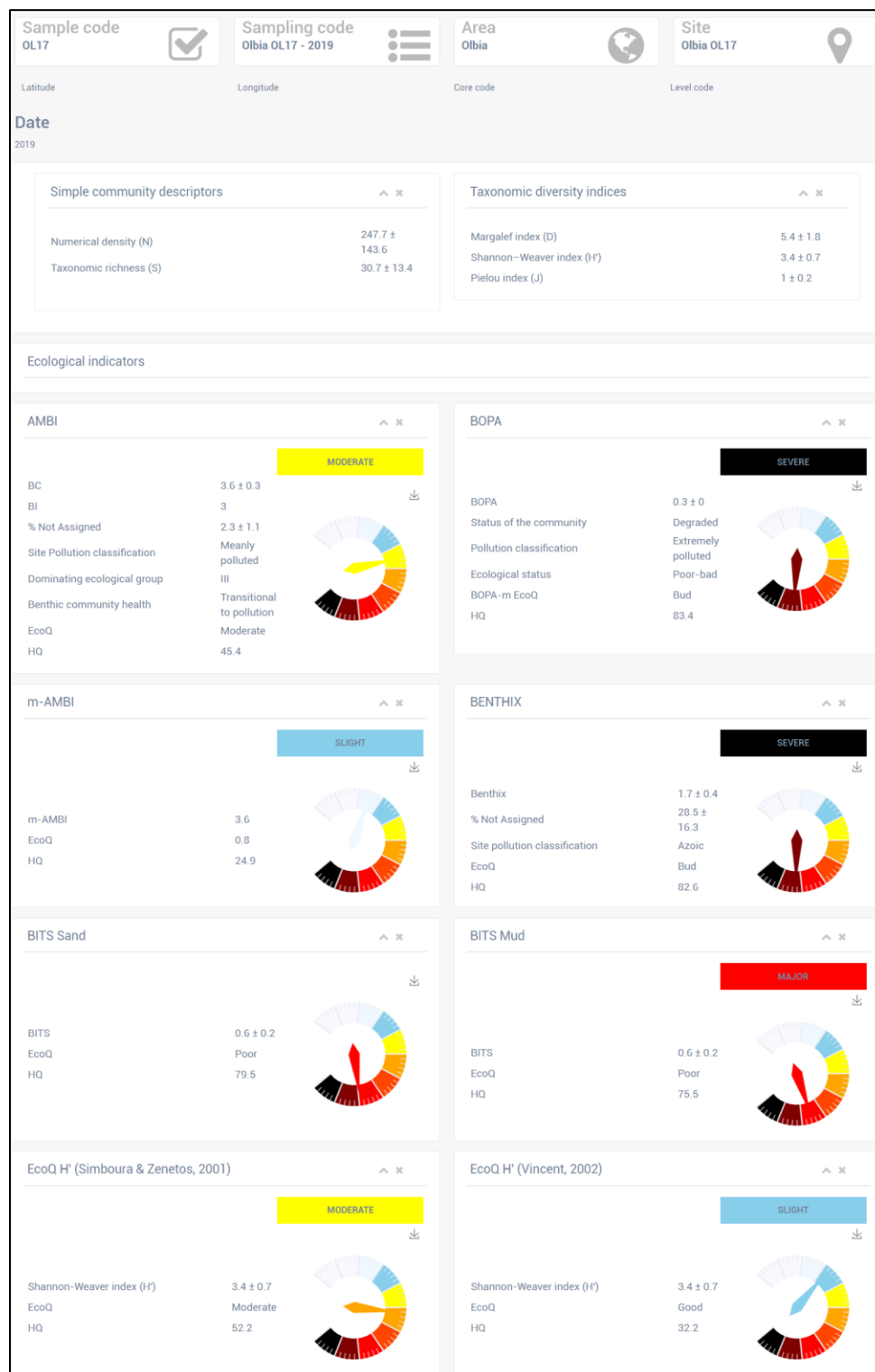


Figura 12. Esempio di output del modello dell'elaborazione dei dati delle comunità bentoniche, LOE-6.

3. Integrazione Weight of Evidence (WOE)

I risultati ottenuti dai singoli moduli vengono integrati nella fase finale attraverso un classico approccio triade (o tetrad e o pentade, ecc) che dà pesi diversi alle varie linee di evidenza secondo il concetto WOE (Chapman, 2007; Chapman & Hollert, 2006; Dagnino et al., 2008, Regoli et al., 2019). Gli indici di pericolo specifici per ciascuna LOE devono essere normalizzati ad una scala comune prima di moltiplicare questi valori per il loro rispettivo peso (Figura 13). Sebbene l'attribuzione dei pesi dipenda dalla rilevanza ecologica delle varie LOE utilizzate, questa scelta è comunque soggettiva e può essere condizionata da caratteristiche sito-specifiche o obiettivi dell'indagine; in questo senso la scelta dei pesi da attribuire prima della integrazione WOE può essere modificata dall'utente. L'output finale della integrazione WOE riporta l'elenco di tutte le LOE che sono state integrate con il loro rispettivo livello di pericolo, e la classe di rischio complessiva ottenuta al termine dell'elaborazione (Figura 14).

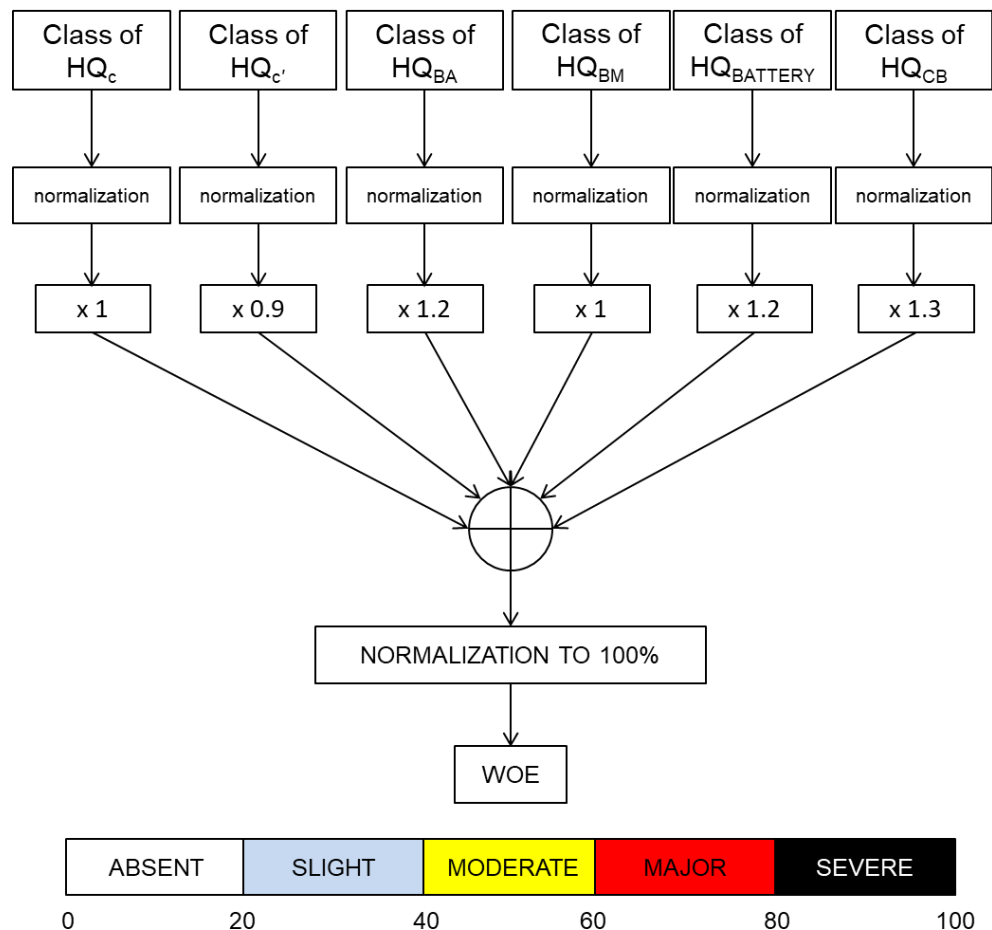


Figura 13. Flow-chart dell'elaborazione complessiva WOE dei risultati ottenuti dalle diverse linee di evidenza.

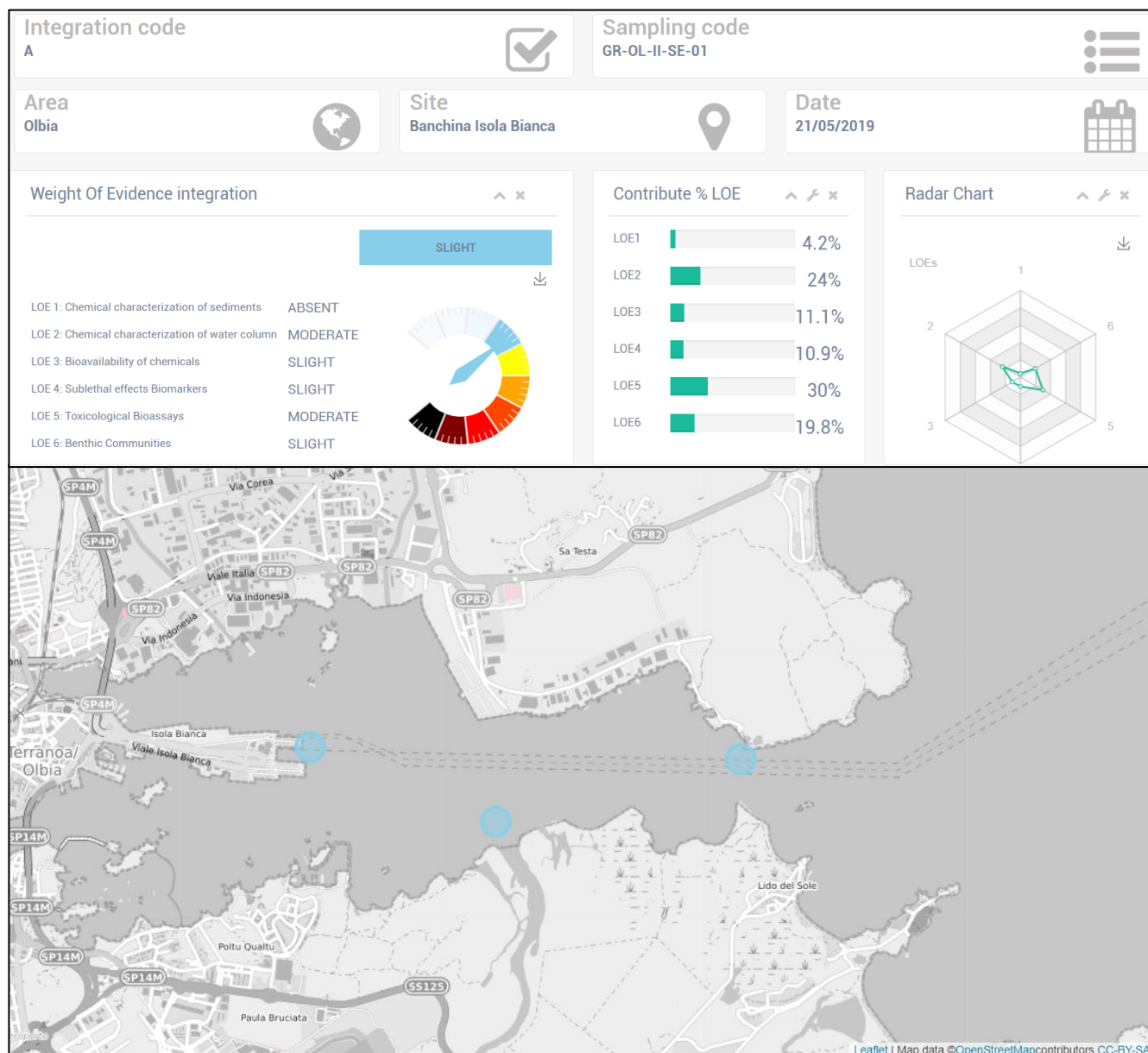


Figura 14. Esempio di output del modello dall'elaborazione complessiva WOE dei risultati ottenuti dalle diverse linee di evidenza.

4. Bibliografia

- Benedetti M, Ciaprini F, Piva F, Onorati F, Fattorini D, Notti A, Ausili A, Regoli F, 2012. A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environ Intern* 38: 17-28
- Benedetti, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d'Errico, G., Piva, F., Pacitti, D., Regoli, F. (2014). Environmental hazards from natural hydrocarbons seepage: integrated classification of risk from sediment chemistry, bioavailability and biomarkers responses in sentinel species. *Environmental Pollution*. 185, 116-126.
- Bocchetti R, Fattorini D, Pisanelli B, Macchia S, Oliviero L, Pilato F, Pellegrini D, Regoli F, 2008. Contaminant accumulation and biomarkers responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquat Toxicol* 89: 257-266
- Borja A., Franco J., Perez V., 2000. A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin* 40: 1100-1114
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A, 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ* 247: 295-311
- Chapman PM, Hollert H, 2006. Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad? *J Soil Sediment* 6: 4-8
- Chapman, P.M., 2007. Determining when contamination is pollution – weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environ. Internat.* 33, 492-501

Prodotto n. T2.1.1

- Dagnino A, Sforzini S, Dondero F, Fenoglio S, Bona E, Jensen J, Viarengo A, 2008. A "Weight-of-Evidence" approach for the integration of environmental "Triad" data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integr Environ Assess Manag* 4: 314-26
- Decreto Ministeriale 173/2016, 15 luglio 2016. Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini
- DM 260/2010. Regolamento recante i Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo. G.U. 30 del 7 Febbraio 2011.
- Eggens M, Bergman A, Vethaak D, van der Weiden M, Celander M, Boon JP, 1995. Cytochrome P4501a indices as biomarkers of contaminant exposure: results of a field study with plaice (*Pleuronectes platessa*) and flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea. *Aquat Toxicol* 32: 211-225
- EU, 2006. Decision No. 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending. Directive 2000/60/EC
- Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH, 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ Sci Technol* 38: 1723-1731
- Gesteira & Dauvin, 2000. Amphipods are Good Bioindicators of the Impact of Oil Spills on Soft-Bottom Macrobenthic Community. *Marine Pollution Bulletin*. 40. 1017-1027. 10.1016/S0025-326X(00)00046-1.
- Goksøyr A, 2006. Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *J Toxicol Environ Health A*. 8: 175-184
- Hagger JA, Jones MB, Leonard DR, Owen R, Galloway TS, 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integr Environ Assess Manag* 2: 312-329

- Koehler A, 2004. Toxic injury and gender-specific hepatocellular carcinogenesis in flounder (*Platichthys flesus* (L.)). *Aquat Toxicol* 70: 257-276
- Long ER, MacDonald DD, Smith SL, Calder FD, 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ Manag* 19: 81-97
- Long ER, Morgan LG, 1991. The Potential for Biological Effects of Sediment-Sorbed Contaminants
MacDonald Donald D, 1994. Approach to the Assessment of Sediment Quality in Florida Coastal Waters. *Florida Department of Environmental Protection*, Tallahassee, Florida
- Margalef, R., 1969. Perspectives in Ecological Theory. The University of Chicago Press, Chicago
- McCarty LS, Power M, Munkittrick KR, 2002. Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment. *Human Ecol Risk Assess* 8: 159-164
- Mistri M., Munari C., 2008. BITS: a SMART indicator for soft-bottom, non-tidal lagoons. *Marine Pollution Bulletin* 56: 587-599
- Moore MN, Icarus Allen J, McVeigh A, 2006. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar Environ Res* 61: 278-304
- Muxika I., Borja A, Bald J, 2007. Using historical data, expert judgement and multivariate analysis in assessing reference conditions and benthic ecological status, according to the European Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin* 55: 16-29
- National Oceanic and Atmospheric Administration.*
- O'Connor TP, 1998. The NOAA National Status and Trends Program. *Mar Pollut Bull* 37: 3-5
- Pielou, E.C., 1969. An Introduction to Mathematical Ecology. Wiley-Interscience, New York
- Piva F, Ciaprini F, Onorati F, Benedetti M, Fattorini D, Ausili A, Regoli F (2011). Assessing sediment hazard through a Weight Of Evidence approach with bioindicator organisms: a practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere* 83: 475-485

- Regoli F, 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat Toxicol* 50: 351-361
- Regoli F, Pellegrini D, Winston GW, Gorbi S, Giuliani S, Virno-Lamberti C, Bompadre S, 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar Pollut Bull* 44: 912-922
- Regoli F., d'Errico G., Nardi A., Mezzelani, M., Fattorini, D., Benedetti M., Di Carlo M., Pellegrini D., Gorbi S. (2019). Application of a weight of evidence approach for monitoring complex environmental scenarios: The case-study of off-shore platforms. *Frontiers in Marine Science*. 6, 377.
- Regoli, F., Pellegrini, D., Cicero, A. M., Nigro, M., Benedetti, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d'Errico, G., Di Carlo, M., Nardi, A., Gaion, A., Scuderi, A., Giuliani, S., Romanelli, G., Berto, D., Trabucco, D., Gui-di, P., Bernardeschi, M., Scarcelli, V., Frenzilli, G. (2014). A multidis-ciplinary weight of evidence approach for environmental risk asses-ment at the Costa Concordia wreck: integrative indices from Mussel Watch. *Marine Environmental Research*. 96, 92-104.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana, Illinois
- Simboura & Zenetos, 2002. Benthic indicators to use in ecological quality classification of Mediterranean soft bottoms marine ecosystems, including a new biotic index. *Mediterranean Marine Science*. 3/2: 77-111. *Mediterranean Marine Science*. 3. 71-111.
- Simboura N., Zenetos A., 2002. Benthic indicators to use in Ecological Quality classification of Mediterranean soft bottom marine ecosystems, including a new Biotic Index. *Mediterranean Marine Science* 3, 77-111
- Tested in the National Status and Trends Program. *NOAA Technical Memorandum* NOS OMA 52,
- UNEP, 1999. Manual on the Biomarkers recommended for the Med Pol biomonitoring Programme, *UNEP*, Athens 1999

Prodotto n. T2.1.1

- Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A, 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 281-300
- Vincent C., Heinrich H., Edwards A., Nygaard K., Haythornthwaite J., 2002. Guidance on typology, reference conditions and classification systems for transitional and coastal waters, CIS Working Group 2.4(Coast) Common Implementation *Strategy of the Water Framework Directive, European Commission*