



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea magistrale (*ordinamento  
ex D.M. 270/2004*)

in Scienze ambientali

Tesi di Laurea

—  
Ca' Foscari  
Dorsoduro 3246  
30123 Venezia

**I saggi con microalghe nella valutazione  
ecotossicologica di sedimenti lagunari:  
il caso di studio con *P. tricornutum***

**Relatore**

Ch. Prof. Annamaria Volpi Ghirardini

**Correlatori**

Giovanni Libralato

Diego Minetto

**Laureando**

Carlo Zannin

Matricola 828982

**Anno Accademico**

**2014 / 2015**



*Tutti vogliono tornare alla natura, ma nessuno ci vuole andare a piedi*  
(Andrew J. Wollensky)

## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno supportato nella stesura della tesi:

Ringrazio anzitutto la prof.ssa Volpi Ghirardini, Relatore ed il professor Libralato, Correlatore per il supporto costante e la guida sapiente.

Proseguo con i collaboratori dott. Minetto e Di Stefano, ed il dottorando Costa Devoti, riferimenti costanti durante le fasi di lavoro sperimentale.

Un ringraziamento particolare va agli amici ed ai colleghi d'università con cui ho avuto sempre confronti costruttivi uniti a momenti di svago.

Vorrei infine ringraziare le persone a me più care: i parenti, talvolta fonte di saggi consigli ed incoraggiamento, gli amici che mi sopportano quotidianamente e soprattutto la mia famiglia, cui dedico questo lavoro.

## Sommario

- i) [Indice delle figure](#)
- ii) [Indice delle tabelle](#)
- iii) [Lista degli acronimi](#)
- A. Razionale
- B. Scopo
- C. Organizzazione dell'attività sperimentale

### 1. INTRODUZIONE

#### 1.1 Inquadramento normativo

1.2 I test microalgali per la valutazione della qualità del sedimento in ecosistemi costieri di transizione.

1.2.1 I test di tossicità microalgale per la qualità del sedimento in laguna di Venezia.

1.2.2 Il caso di *P. tricorutum*: biologia ed ecologia della specie, sensibilità ai principali contaminanti

1.2.3 *P. tricorutum* sul sedimento: casi di studio pratici

1.3 Approccio metodologico del test di tossicità con *P. tricorutum*

1.4 Attività sperimentale

### 2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento, produzione e stoccaggio dei campioni

2.1.1 Campionamento: area di indagine

2.1.2 Elutriati e acque dei pori

2.1.2.1 Conservazione e trattamento dei campioni di sedimento

2.1.2.2 Determinazione del contenuto d'acqua dei campioni di sedimento

2.1.2.3 Elutriato

2.1.2.4 Acque dei pori

2.2 Valutazione fisico-chimica

2.2.1 Reagenti

2.2.2 Ammoniaca

2.2.3 Solfuri

2.3 Test di tossicità con *P. tricorutum*

2.3.1 Reagenti

2.3.2 Fasi procedurali del saggio biologico di tossicità

2.4 Analisi dati

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Valutazione fisico-chimica

3.2 Valutazione ecotossicologica

3.2.1 Risultati del test con *P. tricornutum*

3.2.2 pH, Eh e tossicità

3.2.3 Ammoniaca, solfuri e tossicità

3.3 Retta di taratura (Assorbanza/Densità algale)

4 CONCLUSIONI

Bibliografia

Allegati

## Indice delle figure

Figura 1 - Diagramma di flusso dell'attività sperimentale .....	15
Figura 2 - Schema della struttura di un generico frustulo di diatomea (Rumeau A. & Coste M., 1988).....	23
Figura 3 - Tre immagini al microscopio ottico che mostrano i morfotipi di <i>P. tricornutum</i> (sulla sx il morfotipo fusiforme, a dx: in alto il triradiale ed in basso il morfotipo ovale) (Falkowski et al., 2008).....	25
Figura 4 - Laguna di Venezia. In evidenza le tre bocche di porto e l'area industriale di Porto-Marghera (Fonte: Google earth) .....	32
Figura 5 - Granulometria dei sedimenti (0 - 20 cm) nei bassifondi della Laguna di Venezia (Autorità di bacino - Reg. Veneto, 2010).....	34
Figura 6 - suddivisione in corpi idrici della Laguna di Venezia .....	35
Figura 7 – A) carota di sedimento “tal quale”; B) carota divisa in sezioni; C) sedimento omogeneizzato .....	37
Figura 8 - Campioni in agitazione nello Jar test nella camera climatica a 4 °C .....	39
Figura 9 - Schematizzazione delle fasi di preparazione della matrice elutriato .....	40
Figura 10 – Sintesi delle fasi di preparazione della matrice acqua interstiziale .....	42
Figura 11 – A) un dettaglio della struttura della camera di conta vista al microscopio; B) la conformazione del vetrino (Minetto D., 2012, Università Cà Foscari di Venezia).....	48
Figura 12 - Disposizione delle piastre in frigo-termostato.....	51
Figura 13 - Rappresentazione delle fasi in cui si articola il saggio di tossicità con <i>P. tricornutum</i> .....	54
Figura 14 - Scala di tossicità da Libralato G. et al. (2015) .....	55
Figura 15 - Sistema di classificazione in classi di pericolo di Persoone et al. (2003) .....	55
Figura 16 - Istogrammi riassuntivi per la variabile pH valutata nelle 3 matrici di studio .....	60
Figura 17 - Istogrammi riassuntivi per la variabile Eh valutata nelle 3 matrici di studio.....	62

Figura 18 - Istogrammi riassuntivi per la variabile T valutata nelle 3 matrici di studio.....	63
Figura 19 - Istogrammi riassuntivi per la variabile salinità valutata nelle 3 matrici di studio.....	65
Figura 20 - Grafico a dispersione contenente i valori di pH ed Eh misurati sui campioni delle tre matrici.....	66
Figura 21 – Istogrammi che riportano i dati in concentrazione (mg/L) di Ammonia suddivisi per matrice di studio; PW = acque interstiziali (Pore Water).....	68
Figura 22 - Istogrammi che riportano i dati in concentrazione (mg/L) di Solfuri suddivisi per matrice di studio (PW = acque intestiziali o Pore Water);.....	69
Figura 23 - Carta di controllo per il bicromato di potassio (tossico di riferimento) del Gruppo di Ricerca del laboratorio di Ecotossicologia (periodo). In giallo i dati prodotti nell’ambito del presente lavoro .....	71
Figura 24 - Grafico a barre che mostra i risultati del test di tossicità per le acque interstiziali .....	72
Figura 25 - Grafico a barre che mostra i risultati del test di tossicità per gli elutriati nei rapporti 1:4 e 1:20.....	72
Figura 26 – Istogramma che riassume i risultati della classificazione di Libralato G. et al.(2015) .....	74
Figura 27 - istogramma che riassume i risultati della classificazione di Persoone G. et al.(2003) .....	75
Figura 28 – diagrammi a dispersione per confrontare i risultati di pH, Eh e tossicità.....	79
Figura 29 - grafici a dispersione suddivisi per stazioni di campionamento, con i risultati ottenuti dalle analisi sulla matrice liquida elutriato nel rapporto 1:4 .....	81
Figura 30 - grafici a dispersione suddivisi per stazioni di campionamento, con i risultati ottenuti dalle analisi sulla matrice liquida elutriato nel rapporto 1:20 .....	82
Figura 31 – regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione di l’ammoniaca per le acque interstiziali; la linea verde rappresenta il valore di NOEC per N-NH <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	84

Figura 32 - regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione di l'ammoniaca per la matrice elutriato 1:4; la linea verde rappresenta il valore di NOEC per N-NH <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	85
Figura 33 - regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione di l'ammoniaca per la matrice elutriato 1:20; la linea verde rappresenta il valore di NOEC per N-NH <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	86
Figura 34 - regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione dei solfuri per le acque interstiziali .....	87
Figura 35 - regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione dei solfuri per la matrice elutriato in rapporto 1:4.....	87
Figura 36 - regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione dei solfuri per la matrice elutriato in rapporto 1:20 .....	88
Figura 37 – Retta di taratura per le variabili: densità algale (cell/mL) ed assorbanza misurata a 670 nm di lunghezza d'onda .....	90

## Indice delle tabelle

Tabella 1 - schematizzazione in ordine cronologico delle normative in materia di dragaggi e caratterizzazione della matrice sedimento .....	19
Tabella 2 - classificazione sistematica per la specie <i>P. tricornutum</i> .....	24
Tabella 3 - I valori dell'endpoint (EC <sub>50</sub> ) per la specie <i>P. tricornutum</i> .....	27
Tabella 4 - Codici delle carote di sedimento, alle cui lettere (P, Q, R, T, U, V, e Z) sono associate le diverse stazioni di prelievo mentre i numeri (da 1 a 5) si riferiscono a profondità crescenti .....	36
Tabella 5 – Sali necessari alla preparazione dell'ASW .....	45
Tabella 6 - Composizione delle tre soluzioni stock per le colture algali .....	45
Tabella 7 - Tossico di riferimento (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) .....	46
Tabella 8 - Principali vantaggi e svantaggi dei due approcci metodologici .....	48
Tabella 9 - Codice dei 60 campioni analizzati nelle 8 stazioni (P, Q, R, S, T, U, V e Z) .....	57
Tabella 10 – statistiche descrittive sul modello di regressione lineare tra pH ed Eh .....	66
Tabella 11 - Classificazione dei campioni in base all'applicazione della scala di tossicità di Libralato G. et al. (2015).....	73
Tabella 12 – schema riassuntivo dei risultati ottenuti dall'applicazione dei diversi sistemi di classificazione.....	76
Tabella 13 - parametri del modello di regressione (tossicità-ammoniaca) per le acque interstiziali.....	85
Tabella 14 - parametri del modello di regressione (tossicità-ammoniaca) per l'elutriato in rapporto 1:4 .....	85
Tabella 15 - parametri del modello di regressione (tossicità-ammoniaca) per l'elutriato in rapporto 1:20 .....	86
Tabella 16 - parametri del modello di regressione (tossicità-solfuri) per le acque interstiziali.....	87

Tabella 17 - parametri del modello di regressione (tossicità-solfuri) per l'elutriato in rapporto 1:4.....	88
Tabella 18 - parametri del modello di regressione (tossicità-solfuri) per l'elutriato in rapporto 1:20.....	88
Tabella 19 - statistiche descrittive del modello di regressione tra assorbanza e densità algale .....	89

## [Lista degli acronimi](#)

ASW: artificial sea water

BU: Biostimulation Unit

DAIS: Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica

DS: deviazione standard

EC<sub>20</sub>: Effect Concentration 20%

EC<sub>50</sub>: Effect Concentration 50%

ISO: International Standard Organization

NOEC: No Observed Effect Concentration

OLS: Ordinary Least Squares

PE: percentage of effect

RPM: revolutions per minute

SIN: Sito Interesse Nazionale

TU: Toxic Unit

# Razionale

---

Per valutare lo stato di salute dei corpi idrici è necessario esaminare il ruolo che ha il sedimento nel ciclo biogeochimico degli inquinanti. In effetti, numerosi contaminanti sono normalmente riscontrati solo a livello di tracce nelle acque, mentre gli stessi elementi e composti tendono ad accumularsi nel sedimento anche in concentrazioni elevate ( $\mu\text{g/L}$  e  $\text{mg/L}$ ). Questo perché i sedimenti (in particolare i sedimenti marini e lacustri) rappresentano il punto di raccolta e accumulo finale sia dei materiali provenienti dal comparto geochimico delle terre emerse sia di quanto introdotto nell'ambiente dalle attività antropiche. Lo studio dei sedimenti, pertanto, è un ottimo approccio per ottenere informazioni sull'inquinamento prodotto, recente e passato.

Nel presente lavoro di tesi una serie di campioni di sedimento della laguna di Venezia (laguna centrale, fronte area industriale di Porto Marghera, Venezia) sono stati indagati da un punto di vista ecotossicologico considerando il test di inibizione della crescita con *Phaeodactylum tricornutum*. Una serie di dati fisico-chimici sono stati prodotti a corredo dei dati di tossicità (Eh, pH, T, salinità,  $\text{N-NH}_3$  e  $\text{S}^{2-}$ ).

In generale, per l'allestimento di una batteria di saggi ecotossicologici è opportuno inserire specie autoctone dell'area di studio e per le quali esistono, possibilmente, dei protocolli standardizzati da enti riconosciuti a livello internazionale (i.e. ISO, UNICHIM ecc.), in aggiunta alla letteratura scientifica disponibile (Pellegrini D. et al., 2002).

L'esigenza di indagare con un saggio algale su matrici liquide derivate dal sedimento (elutriati e acque interstiziali) nasce da un lato dalle prescrizioni normative e dall'altro, dalla limitata diffusione di informazioni disponibili sulla sensibilità di modelli microalgali applicati alla valutazione della qualità del sedimento. Il saggio sarà effettuato su campioni di sedimento fresco per i quali verrà definito un primo database con i risultati di tossicità.

La scelta di *P. tricornutum* come specie-test è giustificabile dall'ampia letteratura scientifica per altre tipologie di matrici ambientali e sostanze pure, dalla sua biogeografia (ambienti di transizione compresi), dal fatto che è richiesto dalla normativa italiana per la valutazione della qualità dei sedimenti (DM 7 aprile 2008, D.lgs 260/2010) e dal fatto che è già disponibile un

protocollo standard internazionale che norma l'esecuzione di questo saggio di tossicità, assicurando una maggior riproducibilità per lavori futuri.

## Scopo

---

Le considerazioni proposte in questo lavoro di tesi sono focalizzate sulla caratterizzazione fisico-chimica (di minima) ed ecotossicologica eseguita su due diverse matrici liquide (elutriati ed acque interstiziali) derivate da campioni di sedimento della laguna di Venezia.

Più precisamente, gli obiettivi della tesi sono stati:

- a. Definizione di una retta di taratura (assorbanza/densità cellulare) per le letture dei campioni per via spettrofotometrica ( $\lambda = 670 \text{ nm}$ ), derivando una funzione che permettesse di ricondurre i valori ad una stima delle concentrazioni algali di *P. tricornutum*;
- b. Caratterizzazione fisico-chimica di minima dei campioni (Eh, pH, T, salinità,  $\text{N-NH}_3$  e  $\text{S}^{2-}$ ) (i.e. la caratterizzazione fisico-chimica completa dei campioni di sedimento non sarà disponibile in tempi utili alla presente tesi di laurea);
- c. Caratterizzazione ecotossicologica dei campioni;
- d. Valutazione della capacità di *P. tricornutum* nel discriminare diversi gradi di contaminazione nelle due matrici analizzate;
- e. Valutazione della capacità del test microalgale nel differenziare effetti di biostimolazione ed inibizione;
- f. Integrazione ed elaborazione statistica dei risultati fisico-chimici e di tossicità per evidenziare eventuali correlazioni tra le variabili;
- g. Applicazione di approcci per la classificazione degli effetti (e.g. scale di tossicità);
- h. Definizione di un primo database di dati di tossicità microalgale con *P. tricornutum* su matrici liquide (elutriato e acqua interstiziale) di sedimenti della laguna di Venezia.

# Organizzazione dell'attività sperimentale

L'attività sperimentale ha riguardato il trattamento a scala laboratorio di una serie di carote di sedimento per ottenere le matrici liquide derivate (i.e. elutriato e acqua interstiziale). Il campionamento del sedimento è stato eseguito da una ditta terza incaricata allo scopo. Le carote di sedimento sono giunte con cadenza settimanale in laboratorio (Laboratorio di Bioindicazione ed Ecotossicologia, sede della Celestia). Le carote hanno seguito le opportune procedure di conservazione (catena del freddo) e sono state processate entro massimo due settimane dal loro arrivo in laboratorio. Ciascuna carota è stata aperta e opportunamente processata per ricavare le due matrici su cui eseguire i test di tossicità e le valutazioni fisico-chimiche.

Elutriati ed acque interstiziali sono stati ottenuti seguendo scrupolosamente le rispettive procedure ed i campioni così ottenuti sono stati poi congelati (-18 °C), in attesa di eseguire le analisi del caso. I risultati conclusivi sono stati letti in un'ottica d'integrazione delle informazioni disponibili.

In Figura 1 è schematizzata la sequenza delle fasi di questo lavoro:

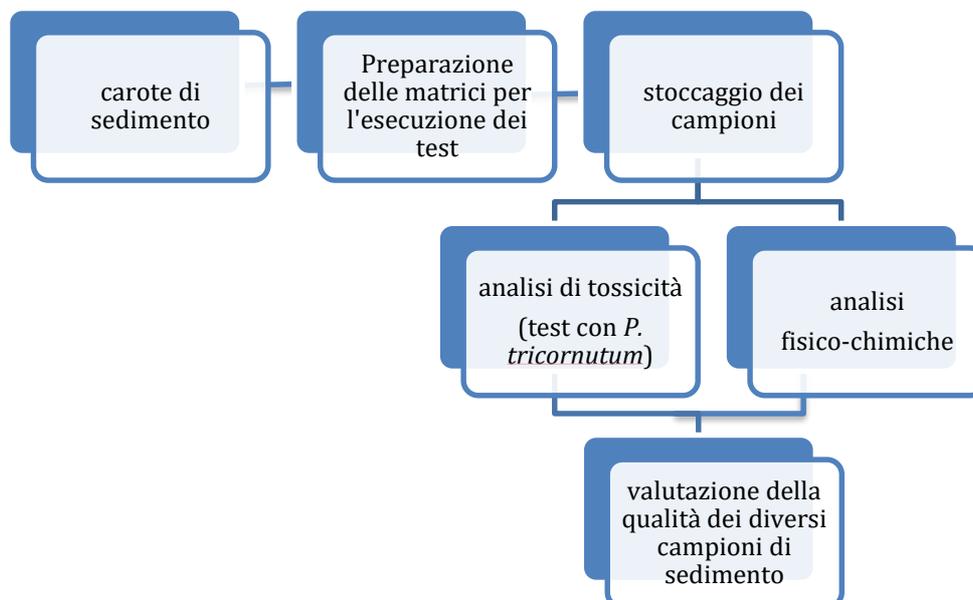


Figura 1 - Diagramma di flusso dell'attività sperimentale

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Inquadramento normativo

Nel “protocollo fanghi” del 1993 sono fornite le procedure di caratterizzazione dei sedimenti da dragare unite alle concentrazioni limite per una serie di contaminanti chimici più frequentemente rinvenuti nei sedimenti della Laguna Veneta. Non vi è però alcun tipo di menzione per quanto concerne i saggi ecotossicologici.

L’emanazione del D.Lgs 152/1999 sembra intraprendere questa direzione, in quanto per la prima volta introduce all’uso dell’ecotossicologia per il monitoraggio e la classificazione dei corpi idrici e per il controllo delle acque di scarico. Nello specifico, nell’Allegato 1 del decreto sono riportate le prove di tossicità da eseguire per le acque di transizione (qui definite come “ambienti acquatici costieri dove avviene il mescolamento delle acque dolci provenienti da terra con l’acqua di mare”) e per la matrice sedimento: “saggi biologici su diversi gruppi tassonomici di ambienti marini”. L’individuazione della specie è omessa anche se è indicata una generica preferenza all’uso di metodi standardizzati o specie autoctone. Tuttavia, la 152/1999 non prevede l’obbligatorietà d’esecuzione per queste analisi, considerandole solo integrative dei parametri chimici necessari per la classificazione (Sbirilli G., 2000).

Nella Direttiva Quadro 2000/60/CE, recepita in Italia come D.Lgs 152/2006 e s.m.i., è evidenziata l’importanza delle indagini sui sedimenti, sia per la determinazione della presenza di specie inquinanti e quindi per la definizione dello stato chimico dei corpi idrici, sia per l’individuazione delle loro caratteristiche fisiche e chimico-fisiche, che condizionano lo stato e l’evoluzione delle comunità biologiche.

Nel D.Lgs 152/2006 e s.m.i., nella parte Terza “Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall’inquinamento e di gestione delle risorse idriche”, Titolo III “Tutela dei corpi idrici e disciplina degli scarichi”, Capo IV “Ulteriori misure per la tutela dei corpi idrici”, Art. 109 “Immersione in mare di materiale derivante da attività di escavo e attività di posa in mare di cavi e condotte”, indica solo che è necessaria un’autorizzazione, ma non specifica su quali basi l’autorizzazione è rilasciata o negata. Al Titolo IV “Strumenti di tutela”, Capo II “Autorizzazione agli scarichi”, l’Art. 137 “Fanghi derivanti dal

trattamento delle acque reflue”, si precisa che è vietato il loro smaltimento in acque superficiali dolci e salmastre.

Tuttavia, il DLgs. 152/2006 rimanda all’emanazione di uno specifico decreto ministeriale con i relativi allegati tecnici (Cesari A., 2006).

ICRAM e APAT, su richiesta del Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, nell’agosto 2006 (con successiva revisione nel novembre 2007) hanno redatto il “Manuale per la movimentazione di sedimenti marini”, che rappresenta la base tecnica del decreto. Tale testo riporta: “contestualmente alla caratterizzazione chimico-fisica, o successivamente alle risultanze analitiche, devono essere condotte analisi ecotossicologiche che concorrono alla definizione della qualità dei materiali da dragare. Esse devono essere eseguite su aliquote di sedimento fresco”, cioè non congelato (Pellegrini D. et al. - APAT e ICRAM, 2006). Pertanto le indagini ecotossicologiche non sono qualcosa di sostitutivo alle suddette analisi chimiche ma piuttosto integrano i risultati finali. Infatti, le sole valutazioni chimiche non danno una diretta informazione sui potenziali effetti dei contaminanti sugli ecosistemi e sulle loro componenti biotiche (Pellegrini D. et al., 2002).

Tale Manuale, è in parte recepito, acquisendo valenza legislativa, con il Decreto dell’8 novembre 2010, n.260 che fa sue anche le indicazioni della Direttiva Quadro definendo gli standard di qualità dei sedimenti per i corpi idrici marino-costieri e di transizione. Inoltre, esso rende obbligatori i saggi biologici di tossicità per il monitoraggio della matrice sedimentaria (Allegato 1). Nel merito, l’Allegato 1 stabilisce i criteri per il monitoraggio e la classificazione dei corpi idrici superficiali e sotterranei, inserendo le analisi ecotossicologiche obbligatorie nel caso in cui vengano riscontrati uno o più superamenti per gli standard di qualità del sedimento (Stato chimico) durante le campagne periodiche di monitoraggio. In questo caso, il Decreto introduce l’obbligo di effettuare un monitoraggio almeno annuale dei sedimenti che includa per almeno i primi 2 anni batterie di saggi biologici costituite da almeno tre specie-test, finalizzati ad evidenziare eventuali effetti ecotossicologici a breve e a lungo termine, nonché ogni altra indagine ritenuta utile a valutare gli eventuali rischi per la salute umana associati al superamento riscontrato.

I saggi biologici sono eseguiti utilizzando protocolli metodologici normati o in corso di standardizzazione secondo le indicazioni UNI e con specie di organismi appartenenti ad almeno tre differenti livelli trofici (da scegliere tra decompositori/saprofiti,

detritivori/filtratori, produttori primari, consumatori). I saggi di tossicità per la qualità del sedimento, possono essere applicati a diverse matrici naturali, secondo la seguente priorità: sedimento tal quale, acqua interstiziale, elutriato.

Nel caso di saggi di tossicità acuta o a breve termine, il campione è considerato privo di tossicità quando gli effetti di tutti i test sono riconducibili a:  $EC_{20} \leq 90\%$ , oppure effetto massimo  $\leq 15\%$ , anche se statisticamente significativo.

Nel caso di saggi di tossicità cronica o a lungo termine, il campione viene considerato privo di tossicità quando gli effetti di tutti i test sono riconducibili a:  $EC_{20} < 90\%$ ,  $EC_{50} > 100\%$ , oppure effetto massimo  $\leq 30\%$ , come riportato anche in Tabella 2.4 del Manuale ICRAM-APAT 2007. Il risultato ottenuto verrà poi integrato con i dati delle analisi chimiche ed attribuito alla relativa classe a cui è associata una linea di gestione secondo lo schema indicato in Figura 2.6 del Manuale ICRAM-APAT 2007 (Fonte: [www.arpa.emr.it/cms3/documenti/reti/normativa/DM\\_260-2010.pdf](http://www.arpa.emr.it/cms3/documenti/reti/normativa/DM_260-2010.pdf)).

Altro importante Decreto, che regola le operazioni di dragaggio e le relative analisi da effettuare sui sedimenti è il DM del 7 novembre del 2008. Esso disciplina le operazioni di dragaggio nei siti di bonifica di interesse nazionale (SIN), ai sensi dell'articolo 1, comma 996, della legge 27 dicembre 2006, n. 296. Come noto, la zona di Porto Marghera è diventata SIN con la legge 426/1998 ed è quindi regolamentata, tra le altre, dal suddetto Decreto che sottolinea la necessità di verificare la qualità del sedimento prima della movimentazione con analisi di tipo fisico, chimico ed ecotossicologico. Nello specifico delle analisi ecotossicologiche (saggi biologici di tossicità), l'Allegato A del Decreto (GU Serie Generale n.284 del 4-12-2008) sottolinea come esse debbano essere applicate su di un numero significativo dei campioni (pari ad almeno il 30% del totale) e per almeno due matrici ambientali rappresentate da:

- Fase solida del sedimento (sedimento tal quale)
- Fase liquida del sedimento (elutriati e/o acque dei pori).

Il tutto mediante l'impiego di una batteria di saggi costituita da almeno tre specie-test appartenenti a gruppi tassonomici e filogenetici differenti. Un testo che traccia le linee guida per la scelta di una batteria di saggi adatta alla valutazione del comparto sedimentario è quello redatto da ISPRA: "Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque marine e salmastre" (ISPRA, 2011).

Per il gruppo delle Alghe sono indicate quattro specie tra cui *P. tricornutum*. Per questo modello biologico, l'esecuzione del test di tossicità è standardizzata dalla norma UNI EN ISO 10253 che valuta l'endpoint d'inibizione della crescita algale per testare la tossicità di soluzioni acquose (2006).

Ancora in fase d'emanazione ma prossimo all'uscita in Gazzetta Ufficiale, è la modifica all'Art. 109 della 152/2006 in materia di "modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare di materiali di escavo da fondali marini". La riformulazione dell'Art. 109, farà seguito alle altre normative rendendo obbligatoria la caratterizzazione ecotossicologica (oltre che chimica, fisica e biologica) da eseguire, previa operazioni di dragaggio dell'area, sull'intero gruppo di campioni prelevati.

Il sedimento intero o la frazione solida del sedimento dev'essere saggiata (salvo specifiche indicazioni del metodo adottato) a fresco, prima possibile e comunque non oltre i 15 giorni di conservazione a 4 – 6 ° C, al buio. La frazione liquida (acqua interstiziale o elutriato che sia) dev'essere preparata entro 10 giorni dal sedimento tal quale, ugualmente a partire da sedimento fresco e poi, se non analizzata entro le 24 h dalla preparazione, conservata a -20° C in attesa d'eseguire le analisi. La batteria di saggi dovrà contenere almeno 3 organismi-test tra quelli riportati in Tab. 2.3 (tra le altre, è presente anche la specie *P. tricornutum*), associati secondo una delle combinazioni riportate in Allegato Tecnico (Min. dell'Ambiente e della tutela del territorio e del mare, 2016).

**Tabella 1 - schematizzazione in ordine cronologico delle normative in materia di dragaggi e caratterizzazione della matrice sedimento**

PROTOCOLLO FANGHI (1993)	Non c'è menzione all'uso di saggi biologici di tossicità
D.LGS 152/1999	Introduzione ai saggi biologici seppur non obbligatori ma solo strumento integrativo alle analisi chimiche
DIRETTIVA QUADRO (recepita in Italia come D.LGS 152/2006)	Saggi biologici non ancora obbligatori (decreto rimanda all'emanazione di allegati tecnici)

DM 7 APRILE 2008	Saggi biologici obbligatori per operazioni di dragaggio nei SIN
D.LGS 260/2010	Saggi biologici resi obbligatori, quale strumento per il monitoraggio di corpi idrici

Riassumendo quanto detto, le normative esistenti prevedono l'utilizzo di batterie di test ecotossicologici per la caratterizzazione di matrici ambientali. Il presente lavoro di tesi, avente come oggetto il saggio con *P. tricornutum*, s'inserisce in una, ben più ampia, batteria di test di cui non si darà conto nella presente tesi di laurea.

## 1.2 I test microalgali per la valutazione della qualità del sedimento in ecosistemi costieri di transizione

Gli ambienti di transizione sono così chiamati perché si collocano fisicamente all'interno della linea di costa ed in "transizione" non solo per quanto concerne il grado di salinità in acqua ma anche per il cambiamento nel tipo di bioma, da continentale a marino (Sacchi CF., 1995). Essi sono caratterizzati da un valore di profondità media limitato e di conseguenza, si contraddistinguono per un alto rapporto tra la superficie del fondale e il volume d'acqua soprastante. I processi che avvengono all'interno della colonna d'acqua e all'interfaccia acqua-sedimento sono fortemente influenzati dalla qualità del sedimento (Botter M., 2012).

Per indagare la qualità del sedimento di un ambiente di transizione è indispensabile scegliere dei target biologici che siano rappresentativi delle condizioni ecologiche dell'ambiente sottoposto ad indagine.

### 1.2.1 I test di tossicità microalgali per la qualità del sedimento in laguna di Venezia

La letteratura propone numerosi saggi ecotossicologici eseguiti sul sedimento (o su matrici da esso derivate) ma le peculiarità della Laguna di Venezia e la sua diversità intrinseca sono tali per cui è utile prendere spunto da casi riferiti nello specifico a questo ecosistema. A tal proposito, vari studi sulla presenza di inquinanti nel sedimento (Pavoni B. et al., 1987; Zonta et al., 1992; Zonta et al., 1994; Bellucci L. G. et al., 2002; Zonta et al., 2007; Botter M., 2012) hanno evidenziato come la laguna sia da considerarsi un insieme di differenti unità

morfologiche (la rete di canali lagunari, le barene, i bassifondi, tanto per citarne le principali) che registrano frequentemente la presenza di gradienti di concentrazione (esempio salinità, nitrati, clorofilla) paragonabili a quelli massimi del sistema (nello specifico quelli rilevati in prossimità alle bocche di porto e nelle zone più a ridosso della terraferma) (Autorità di Bacino – Reg.Veneto, 2010; Ghezzi M. et al., 2011).

Nell'anno 2006, il Magistrato delle acque di Venezia, tramite il suo concessionario unico, Consorzio Venezia Nuova, ha svolto due indagini conoscitive allo scopo di valutare la qualità delle matrici ambientali nei canali industriali di Porto Marghera (indagine denominata ISAP) e nell'area lagunare compresa tra la zona industriale e la città di Venezia (indagine MAVPE-1) (Consorzio Venezia Nuova, 2008; Sarni A. et al., 2007). Le analisi condotte sui sedimenti sono state sia chimiche che ecotossicologiche. In particolare, per quanto attiene all'ecotossicologia, è stata impiegata una batteria composta da saggi di tossicità acuta con il batterio *Vibrio fischeri* (su sedimento risospeso ed elutriato) ed il crostaceo *Tigriopus fulvus* (su elutriato) e saggi di tossicità sub-cronica su elutriati con le alghe unicellulari *Dunaliella tertiolecta* e *P. tricornutum*. I risultati delle analisi ecotossicologiche (dati non disponibili) hanno messo in evidenza l'elevata contaminazione dei sedimenti nei canali della zona industriale. Diversamente, i sedimenti dei bassifondi nella laguna di Venezia, nel loro complesso, hanno mostrato delle concentrazioni di inquinanti del tutto paragonabili a quelle riscontrate in altri ambienti costieri o di transizione.

Per quanto riguarda invece, le analisi chimiche effettuate sulle carote di sedimento, considerando la classificazione secondo il Protocollo Fanghi (1993) in tre classi a qualità decrescente (A, B, C), l'insieme di dati ricavati (573 campioni analizzati) ha prodotto numericamente i seguenti risultati: un 73% di campioni in classe B, mentre alle classi A, C e >C sono stati rispettivamente ascritti il 5%, il 21% e l'1% dei campioni analizzati. In relazione a tale classificazione, i sedimenti superficiali dei bassifondi (0-25 cm) e dei canali (0-50 cm) sono risultati generalmente di qualità migliore rispetto ai livelli immediatamente sottostanti (25-50 cm e 50-100 cm rispettivamente). I dati sono stati resi noti in un rapporto pubblicato il 20.05.2008 (Consorzio Venezia Nuova, 2008).

Dall'integrazione dei dati chimici ed ecotossicologici è emerso, in sintesi, quanto segue: si è constatata una progressiva diminuzione dei livelli di contaminazione nei sedimenti passando dai canali industriali alle aree lagunari (bassifondi) più lontane dalla zona industriale. Inoltre,

il profilo verticale del sedimento ha evidenziato una contaminazione inferiore dello strato prossimo alla colonna d'acqua rispetto a quello immediatamente sottostante.

In seguito, nell'ambito del programma di monitoraggio 2010/2012 a carico dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Regione Veneto (Arpav), sono stati eseguiti dei saggi ecotossicologici sul sedimento della Laguna finalizzati all'attribuzione del giudizio di tossicità/non tossicità. Per ogni corpo idrico è stato individuato almeno un sito d'indagine dove sono state eseguite le analisi tossicologiche, applicando una batteria di 3 test tra cui quello di tipo sub-cronico, atto a valutare l'endpoint di inibizione della crescita algale per la specie *D. tetriolecta* (ARPAV - Reg. Veneto, 2014).

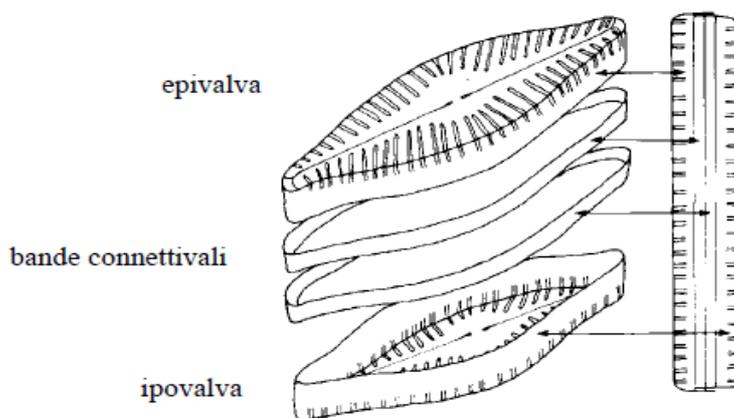
### 1.2.2 Il caso di *P. tricornutum*: biologia ed ecologia della specie, sensibilità ai principali contaminanti

*P. tricornutum* è una micro-alga marina bentonica, appartenente al gruppo delle *Pennales* (diatomee pennate), con un ampio areale di distribuzione nelle acque marine, marino-costiere e di transizione (Garrido M., 2007; Kim K.Y. et al., 2004; Libralato G. et al., 2015). Le diatomee sono alghe brune unicellulari appartenenti alla classe delle *Bacillariophyceae* (divisione *Heterokontophyta*). L'origine evolutiva delle diatomee è riconducibile a un'endosimbiosi avvenuta tra un'alga rossa (*Rhodophyta*) ed un flagellato eterotrofico (appartenente agli *Oomycetes*) circa 300 milioni di anni fa (Scala S. et al., 2002). Le più antiche diatomee risalgono al Giurassico Inferiore, ma ritrovamenti sono molto rari fino al Cretaceo Superiore. Esistono più di 250 generi differenti, costituiti a loro volta da più di 100.000 specie presenti in tutti i mari, laghi e fiumi del Pianeta (Norton T.A. et al., 1996). Questi organismi costituiscono il più importante gruppo eucariotico del fitoplancton e sono responsabili di circa il 40% della produttività primaria (Falkowski P.G. et al., 1998). La loro produttività sostiene le maggiori attività di pesca al mondo ed i loro resti fossili sono la principale fonte di petrolio (Vardi A. et al., 2008).

Le diatomee sono organismi foto sintetizzanti dato che utilizzano la radiazione solare per la produzione di glucosio, principale fonte di nutrimento. La reazione di fotosintesi è di seguito riportata:  $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ . Il processo di fotosintesi ha una componente di stagionalità poiché favorito quando l'intensità luminosa e la durata del giorno sono ottimali.

Nelle stagioni più favorevoli (primavera-estate) si può talvolta assistere a fenomeni detti bloom algali che altro non sono che aumenti sostanziali della concentrazione di questi organismi in sospensione fino a migliaia di cellule/mL (Acri F. et al., 2004).

Altra caratteristica comune a quasi tutte le diatomee è la presenza di un rivestimento esterno amorfo di natura silicea  $[(SiO_2)_n(H_2O)]$ , chiamato *frustulo*, costituito da una porzione superiore più ampia detta epivalva e di una porzione inferiore più stretta detta ipovalva (Falciatore A. & Bowler C., 2002). Nel punto di connessione delle due valve sono presenti le bande connettivali che rappresentano il prolungamento laterale delle valve stesse (Figura 2).



**Figura 2 - Schema della struttura di un generico frustulo di diatomea (Rumeau A. & Coste M., 1988)**

In base alle caratteristiche del frustulo, le diatomee sono distinte in due ordini principali (Round F.E. et al., 2007):

- 1) *Centrales* o diatomee centriche hanno valve circolari, poligonali o ellittiche e posseggono una simmetria radiale. Questo gruppo comprende specie planctoniche che sono particolarmente abbondanti in zone ricche di nutrienti;
- 2) *Pennales* o diatomee pennate hanno valve allungate, a contorno ellittico o lanceolato e sono caratterizzate da simmetria bilaterale. Le diatomee pennate sono prevalentemente bentoniche e aderiscono a substrati di diversa natura. Presentano perforazioni e strutture scheletriche disposte ad angolo retto rispetto alla linea mediana delle valve denominata *rafe*, attraverso cui sono secrete sostanze di natura

polisaccaridica che permettono l'ancoraggio ed il movimento sulle superfici solide. Il rafe è una struttura che caratterizza quest'ordine ma non è sempre presente.

Le diatomee hanno un ciclo vitale diplonte con fase vegetativa ( $2n$ ). Nel ciclo si distinguono due fasi:

1. la riproduzione asessuata che avviene per scissione binaria e consiste: la cellula madre si divide in due e ogni cellula figlia eredita una delle valve che agirà, in entrambe, come valva dorsale più grande (epivalva). In seguito, è generata una nuova valva, leggermente più piccola (ipovalva) alloggiata dentro l'epivalva. Nel corso del tempo, in ciascuna divisione, si verifica una progressiva diminuzione della taglia di una delle cellule figlie, quella cioè che eredita l'ipovalva parentale che diventa la sua epivalva. Conseguentemente, in una popolazione di diatomee derivanti da una cellula capostipite, alcuni individui conservano le dimensioni originarie, mentre altri vanno progressivamente rimpicciolendosi.

Poiché questo processo non può protrarsi all'infinito, quando i frustuli raggiungono le dimensioni minime compatibili con la vita delle cellule, s'innescia la riproduzione sessuata, il cui esito è anche quello di ripristinare le dimensioni caratteristiche della specie;

2. la seconda fase è associata alla riproduzione sessuata con produzione di gameti. Il processo meiotico forma gameti che sono morfologicamente uguali tra loro nelle diatomee pennate (isogamia) mentre nelle diatomee centriche i gameti maschili e femminili risultano differenti (oogamia). Il prodotto della fusione dei gameti maschili e femminili genera un'auxospora ( $2n$ ). Essa andrà incontro ad un processo di accrescimento detto auxosporulazione per produrre alla fine un nuovo individuo (Round F.E. et al., 2007).

La diatomea pennata *P. tricornutum*, condivide i principali tratti genotipici che caratterizzano la classe d'appartenenza, ma le analisi genetiche condotte su questa specie hanno portato alla luce diverse peculiarità.

**Tabella 2 - classificazione sistematica per la specie *P. tricornutum***

REGNO	PLANTAE
PHYLUM	Heterokontophyta
CLASSE	Bacillariophyceae
FAMIGLIA	Phaeodactylaceae
GENERE	<i>Phaeodactylum</i>
SPECIE	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>

*P. tricornutum* è stato isolato per la prima volta negli U.S.A da Allen e Nelson (1910) che ne descrissero le principali caratteristiche morfologiche. La cellula di *P. tricornutum* può assumere tre diversi morfotipi: a) fusiforme b) triradiale c) ovale (Fig. 3). Il morfotipo fusiforme è lungo 20 - 30  $\mu\text{m}$  ed ha un diametro di 1 - 3  $\mu\text{m}$ ; il morfotipo triradiale ha tre bracci di circa 15 - 20  $\mu\text{m}$  di lunghezza che partono da un nucleo centrale; il morfotipo ovale è il più contenuto, con dimensioni comprese tra 10  $\mu\text{m}$  e 12  $\mu\text{m}$ . (Francius G. et al., 2008)

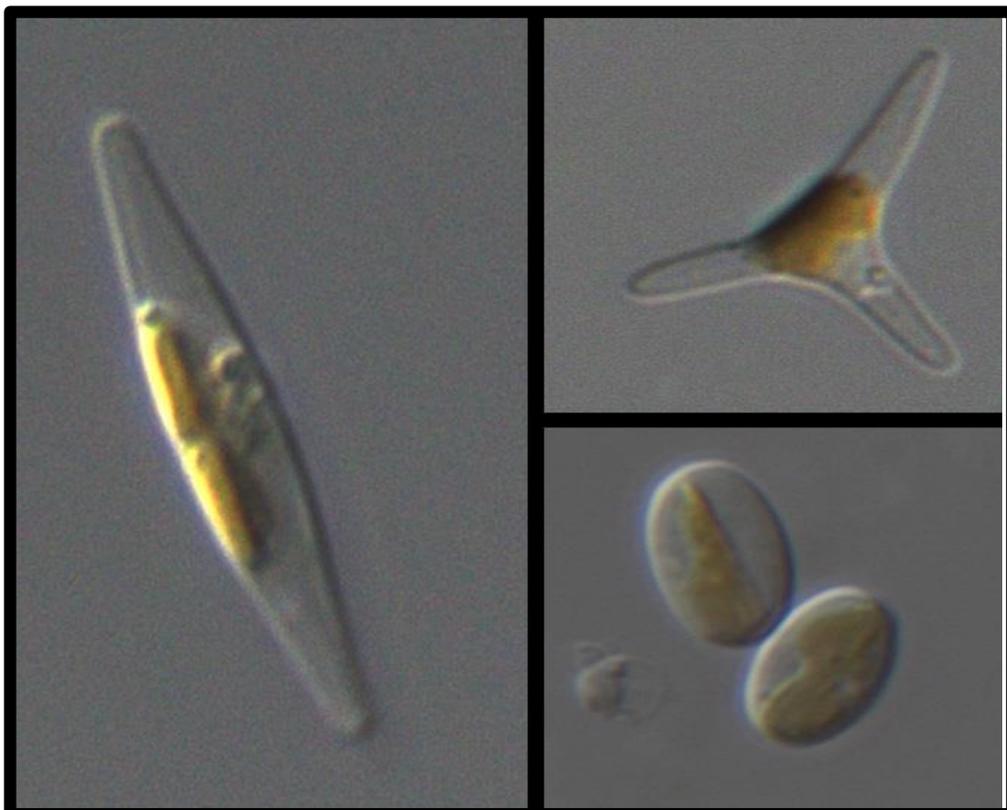


Figura 3 - Tre immagini al microscopio ottico che mostrano i morfotipi di *P. tricornutum* (sulla sx il morfotipo fusiforme, a dx: in alto il triradiale ed in basso il morfotipo ovale) (Falkowski et al., 2008)

Le cause riconducibili ad un morfotipo piuttosto che ad un altro sono state ricondotte a fattori di tipo ambientale quali l'intensità della radiazione luminosa e la disponibilità di nutrienti (Lewin J.C. et al., 1958)

Le diatomee, generalmente, possiedono una struttura silicizzata (parete cellulare, scheletro) che le contraddistingue, ma la biologia di questa specie non richiede l'esistenza del silicio per crescere e svilupparsi, con la parete cellulare che è composta essenzialmente da composti organici. Nel caso di questa specie, la silicizzazione dipende essenzialmente dal morfotipo e la forma ovale è l'unica a poter sintetizzare vere teche in silicio. Viceversa, gli altri due morfotipi presentano strutture di rivestimento lisce e meno strutturate con pareti cellulari composte prevalentemente da polisaccaridi, proteine ed una frazione minore di lipidi (Tesson B. et al., 2009).

In precedenti studi, è stato dimostrato il ruolo chiave svolto dal microfitobentos per la protezione del sedimento superficiale dal fenomeno erosivo e nella produzione primaria (Widdows J. & Brinsley M., 2002). La specie *P. tricornutum* è in grado di sintetizzare biomassa utilizzando i nutrienti e la radiazione solare e tutto questo grazie alla presenza di pigmenti quali clorofilla *a* e carotenoidi accessori come  $\beta$ -carotene diatoxantina. Questi ultimi, sono in grado di mascherare il colore verde della clorofilla, conferendo alle cellule una colorazione giallo-bruna (Ragni M. & D'Alcalà M., 2007).

Fondamentale per il successo ecologico di questa specie è la capacità di crescere in un ampio intervallo di luce e temperatura (Lewin J.C. et al., 1958). Infatti, è possibile trovare *P. tricornutum* sia in ambienti marino-costieri sia di transizione (Francius G. et al., 2008). Essa si colloca alla base della catena alimentare e la sua presenza contribuisce a sostenere gli organismi dei livelli trofici superiori (MacIntyre H.L et al., 1996).

Recenti studi sul genoma di questa specie, hanno evidenziato come essa utilizzi un sistema di riciclo dell'urea simile a quello del regno animale e ciò le consente di efficientare l'utilizzo di azoto e carbonio presenti nell'ambiente (Allen A.E. et al., 2011). Quest'aspetto del metabolismo, non presente nel resto del regno vegetale, è probabile possa essere una delle conseguenze della storia evolutiva delle diatomee (endosimbiosi) e giustificherebbe il dominio delle stesse in ambiente marino. Tutto questo suggerisce che le diatomee possano aver intrapreso un percorso evolutivo differente dagli altri organismi autotrofi e che, prima dell'acquisizione evolutiva dei meccanismi fotosintetici, gli antenati delle diatomee fossero

più vicini agli antenati degli animali che a quelli delle piante (Allen A.E. et al., 2011). Dal punto di vista ecologico, questo chiarisce meglio anche le capacità di ripresa di *P. tricornutum* da condizioni di carenza di nutrienti, un aspetto che in laboratorio appare evidente quando, dopo il rinnovo del mezzo di crescita, si assiste rapidamente alla fase di crescita esponenziale.

Sempre in ambito sperimentale, si sono notate le ottime capacità di adattamento e stabilità di *P. tricornutum* alle condizioni di laboratorio e ciò ha permesso un suo diffuso utilizzo in studi di fisiologia ed ecologia, consentendo di aumentare ulteriormente il bagaglio conoscitivo per questa specie (Bowler C. et al., 2008).

Quanto detto precedentemente, indirizza all'utilizzo di questa microalga come organismo-test ma ciò che fa realmente la differenza è la sua sensibilità nella risposta ad un evento di contaminazione, favorita dall'elevato rapporto superficie/volume che contraddistingue il fitoplancton (Libralato G. et al., 2015). Un precedente studio di Othman HB et al. (2012), ha testato la sensibilità di differenti specie fitoplanctoniche all'esposizione a differenti stressori, evidenziando una correlazione tra la dimensione cellulare e la sensibilità nella risposta che è maggiore quanto più piccoli sono i diametri cellulari.

*P. tricornutum* è stata presa come modello biologico di riferimento per le sue caratteristiche specie-specifiche e testata per 524 composti differenti (Fonte: PAN pesticides database), organici ed inorganici, nonché per valutare alcuni dei cosiddetti "contaminanti emergenti" come le nanoparticelle, prodotti farmaceutici ed altri (Libralato G. et al., 2015).

In Tabella 3 vengono riportati alcuni valori di EC<sub>50</sub> per questa specie nei confronti di alcuni metalli pesanti, inquinanti prioritari per le matrici testate (Horvatic J. & Persic C., 2007).

**Tabella 3 - I valori dell'endpoint (EC<sub>50</sub>) per la specie *P. tricornutum***

<b>Specie chimica</b>	<b>EC<sub>50</sub> (mg/L)</b>	<b>Bibliografia</b>
Cadmio (Cd <sup>2+</sup> )	5,368	(Horvatic J. & Persic C., 2007)
Mercurio (Hg <sup>2+</sup> )	0,88E+03	(Kegley S.E. et al., 2014)
Nichel (Ni <sup>2+</sup> )	7,28	(Horvatic J. & Persic C., 2007)
Rame (Cu <sup>2+</sup> )	635'500,032	(Kegley S.E. et al., 2014)
Zinco (Zn <sup>2+</sup> )	41,85	(Horvatic J. & Persic C., 2007)

### 1.2.3 *P. tricornutum* sul sedimento: casi di studio pratici

I saggi ecotossicologici che utilizzano *P. tricornutum* come indicatore biologico, sono già stati applicati alla matrice sedimento, dimostrando una buona sensibilità nella risposta da parte della specie (Tolun L.G. et al., 2001; Moreno-Garrido I. et al., 2007).

Il caso di studio del 2001, ne è un primo esempio. Esso ha interessato la baia di Izmit (Turchia), zona densamente popolata che è stata il centro di attività industriali negli ultimi 30 anni. In questo lavoro si è indagato il comparto sedimentario, con prelievi alle bocche dei principali scarichi e confrontati con un sito di riferimento scelto al di fuori della baia, nel mar di Marmara. Sui sedimenti campionati si sono eseguite le analisi tossicologiche utilizzando *P. tricornutum* come bioindicatore. I risultati prodotti hanno mostrato una sensibile inibizione della crescita fitoplanctonica che ha riguardato quattro dei sette campioni indagati. Per altri tre invece, la risposta è stata di stimolazione della crescita algale dimostrando comunque, una generale tossicità del sedimento nei confronti del modello biologico scelto, maggiore per i campioni più interni alla baia (Tolun L.G. et al., 2001).

Infatti, l'utilizzo di *P. tricornutum* funge da indicatore non solo per gli effetti di tossicità espletati da alcuni composti sulla specie ma permette di evidenziare anche la presenza di altri composti (azotati e fosfati) in grado di indurre effetti di biostimolazione.

Altro caso di studio interessante per questa specie è quello eseguito da Moreno-Garrido I. et al. (2011) che espone *P. tricornutum* a sedimenti contaminati con differenti livelli del tensioattivo LAS (Linear Alkylbenzene Sulfonate). L'esperimento è stato condotto sia su cellule algali libere sia su cellule immobilizzate (supporto di calcio-alginato), allo scopo di verificare eventuali differenze nella sensibilità della risposta. L'immobilizzazione con calcio-alginato rappresenta un promettente strumento per condurre prove di tossicità in-situ. Dai risultati ottenuti si è potuto constatare la velocità e sensibilità nella risposta (in termini di inibizione della crescita) delle cellule algali libere nei confronti del sedimento contenente il LAS. La risposta è risultata più lenta per le alghe immobilizzate (Moreno-Garrido I. et al., 2007).

Precedenti studi su *P. tricornutum*, eseguiti con l'obiettivo di verificare la sensibilità della specie nell'ambito di test eseguiti sulla matrice sedimento, hanno evidenziato la buona risposta data dagli organismi. Sono stati confrontati i risultati anche rispetto ad altre specie microalgali su cui si è eseguito il medesimo test, confermando quanto detto (Moreno-Garrido

I. et al., 2007; Mucha A.P. et al., 2003). Nell'esperienza di lavoro di Moreno-Garrido et al. (2007), è evidenziato come la specie *P. tricornutum* sia la più sensibile, delle tre prese in esame (*P. tricornutum*, *Cylindrotheca closterium* and *Navicula* sp.), ad una distribuzione granulometrica in cui si verifica un crescente aumento della percentuale di limo, in una matrice composita, costituita da sabbia e limo. Infatti, dai grafici presenti, si evince una brusca differenza in termini d'inibizione della crescita (a 72 h) per questa specie ad un aumento di oltre il 12% di limo nella matrice sedimentaria. Questa maggior sensibilità può essere spiegata sia tenendo conto del fatto che *P. tricornutum* ha dimensioni inferiori rispetto alle altre due e di conseguenza, la sua velocità di sedimentazione sarà minore, e sia che essa è l'unica ad essere immobile. Questo fatto, nel caso di un inquinamento puntuale, può influire nella risposta della specie che non potrà investire energia per sfuggire alla contaminazione.

Nel lavoro di Mucha A.P et al. (2003) sono state scelte tre diverse specie di alghe unicellulari: *Emiliana huxleyi*, *Dunaliella minuta*, *P. tricornutum*, appartenenti a gruppi tassonomici diversi (ripettivamente Coccolitofori, alghe verdi e diatomee) per valutare la sensibilità delle stesse, in termini di inibizione della crescita. I tre modelli biologici sono stati utilizzati nell'ambito del saggio d'inibizione alla crescita per caratterizzare due differenti matrici ambientali sottoposte a processo di elutriazione. I risultati hanno prodotto risposte diverse da parte degli organismi, dimostrando l'influenza della sensibilità nella risposta finale. Nello specifico, la diatomea *P. tricornutum* è stata più sensibile rispetto alle altre due specie, confermando una certa rilevanza come specie-test per saggi di tossicità.

### 1.3 Approccio metodologico del test di tossicità con *P. tricornutum*

Di particolare interesse per la sua semplicità e chiarezza è la definizione di saggio algale secondo Trainor (1984):

“La maggior parte dei saggi algali sono teoricamente molto simili. Dopo l'eliminazione degli organismi indigeni attraverso un sistema di rimozione meccanica, di regola per mezzo della filtrazione in ambiente sterile, introdurre la specie algale prescelta per il saggio nel campione d'acqua, il quale viene utilizzato come terreno di coltura. Incubare quest'ultimo in ambiente controllato per alcuni giorni. La crescita algale, o l'assenza di essa, è indice di presenza di nutrienti o di sostanze tossiche “ (Baudo R. et al. - ISPRA, 2011).

Nello specifico, il principio del metodo del saggio con *P. tricornutum* consiste nel misurare sperimentalmente la riduzione del tasso di crescita specifico di una coltura algale esposta per

72 h ad un tossico, rispetto ad una coltura di controllo negativo (il “bianco”), esposta nelle medesime condizioni di crescita. Il test di tossicità così eseguito è di tipo cronico a breve termine e l’endpoint valutato è inibizione della crescita cellulare a 72 h (UNI EN ISO 10253, 2006).

Ad oggi, la letteratura è ricca di esempi che utilizzano il bioindicatore *P. tricornutum* per saggi di tossicità. La maggior parte di questi seguono la procedura standard (ISO 10253:2006) per la valutazione del relativo endpoint. A questi, negli ultimi anni, si sono aggiunti test più articolati per questa specie, che misurano endpoint differenti come: la concentrazione della clorofilla-a, l’attività enzimatica e la divisione cellulare (Libralato G. et al., 2015).

I principali vantaggi legati a questo saggio biologico di tossicità si possono così riassumere:

1. Gli organismi sono **facilmente** mantenuti in condizioni di laboratori all’interno di un frigo termostato a 20 °C e con un’illuminazione compresa tra i 6000 e i 10000 lux, tale da assicurare la produzione di biomassa per questa specie. La coltura va mantenuta vitale con un rinnovo ogni 7-15 giorni circa. Effettuando quest’operazione almeno 72 h prima dell’esecuzione del test assicureremo la crescita esponenziale della popolazione;
2. Il test è **riproducibile** grazie al protocollo ISO 10253:2006, con il bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ) come tossico di riferimento ed utilizzato come controllo positivo ( $EC_{50}=20,1$  mg/L ; n=7; CV=26%);
3. La specie-test è **sensibile** alle principali classi di contaminanti riscontrabili negli ecosistemi acquatici;
4. La specie-test assicura una buona **rilevanza ecologica** per ambienti marini, marino-costieri e di transizione in quanto produttori primari che si trovano alla base della catena trofica;
5. Il test comporta un **basso dispendio economico** considerato che non necessita di strumentazioni sofisticate, i costi di esercizio (intesi come numero di operatori e consumi) sono ridotti, la fase operativa non esige ampi spazi e nemmeno il mantenimento delle colture algali (Minetto D., 2012).

Per la lettura algale, nel protocollo standard (10253:2006) sono indicati gli apparati per la stima della densità algale, indicando una preferenza per metodi di conta diretti come quello con contatore elettronico di particelle (impostando un intervallo dimensionale) oppure la

conta al microscopio con camera di Bürker, ma aprendo anche all'utilizzo di procedure indirette come la misura della fluorescenza tramite fluorimetri. Questi apparati sono in grado di rilevare la fluorescenza prodotta dalla clorofilla-a. Esiste, infatti, un'alta correlazione tra il pigmento primario e le cellule realmente presenti nel mezzo considerato (Mayer P. et al., 1997).

## 1.4 Attività sperimentale

Carote di sedimento (complessivamente 24, a profondità crescente tra 0 e 8 m) provenienti dall'area collocata tra la zona industriale e quella portuale della laguna di Venezia sono giunti in laboratorio ad opera di una ditta terza incaricata del campionamento e del trasporto sino alle strutture universitarie (Laboratorio di Ecotossicologia e Bioindicazione della sede della Celestia). Da queste, sono stati ricavati, a varie quote, 24 + 24 campioni della matrice liquida elutriato nei due rapporti di elutriazione (1:4 e 1:20) e 12 campioni di acque interstiziali. La fase di preparazione delle matrici è stata condotta nel periodo luglio-settembre 2015. I test di tossicità d'inibizione della crescita di *P. tricorutum* sono stati effettuati nel periodo settembre-dicembre 2015 per lotti di campioni successivi sulla base del protocollo 10253:2006. La lettura del test ha avuto luogo prendendo in considerazione in parallelo sia la lettura con camera di conta del tipo Bürker sia lettura spettrofotometrica.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Campionamento, produzione e stoccaggio dei campioni

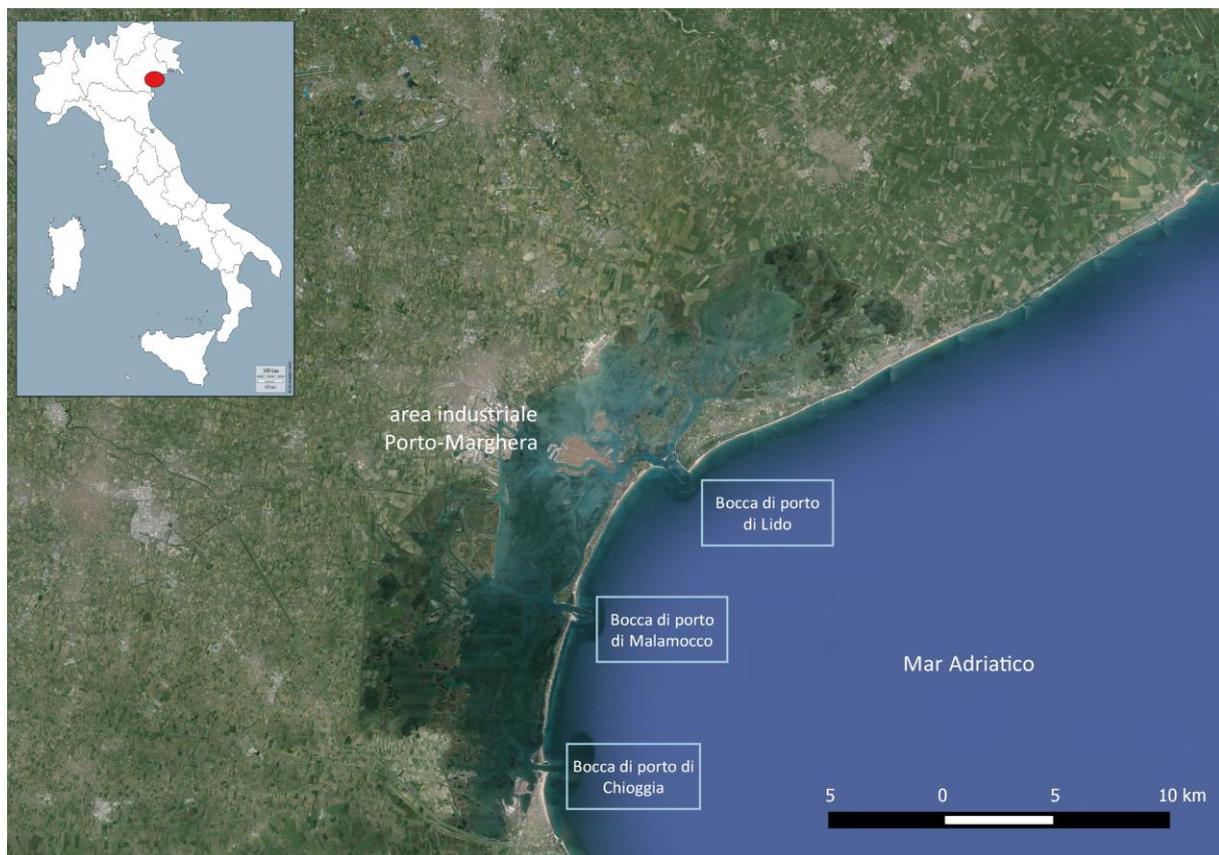
#### 2.1.1 Campionamento: area di indagine

Il contesto ambientale d'indagine per questo lavoro è la Laguna di Venezia. Essa fa parte del complesso delle Lagune del nord Adriatico, considerato uno dei maggiori distretti di lagune costiere al mondo (Nichols M.N. & Bonn J.D., 1994). La Laguna di Venezia presenta un'estensione di 550 km<sup>2</sup>, di cui circa 432 km<sup>2</sup> sono interessati dal ricambio mareale, fenomeno che contraddistingue questo contesto ambientale. La Laguna è delimitata a nord dal fiume Sile ed a sud dal Brenta (Autorità di bacino - Reg. Veneto, 2010). Essa comunica con il mare Adriatico mediante tre bocche di porto (larghe dai 400 ai 900 m e profonde da 8 a 20 m) che consentono, dopo ogni ciclo di marea (12 ore), lo scambio di circa il 60% del volume

d'acqua lagunare con il mare (Facca C. et al., 2014). L'ampiezza media della marea in Laguna è di 0,60 m, valore che permette di ascriverla all'interno delle lagune costiere microtidali (Tagliapietra D. & Volpi Ghirardini A., 2006).

Sulla base dei parametri fisici uniti all'analisi della circolazione generale delle acque, la laguna di Venezia è suddivisa in 4 bacini:

- I. Lido-Treporti, nella parte di laguna più a nord, con un'area pari a 150 km<sup>2</sup>;
- II. Lido-San Nicolò, porzione con un'area di circa 100 km<sup>2</sup>;
- III. Malamocco, in zona centrale e che confina a nord con la zona di Burano e Torcello e a sud dal canale navigabile Malamocco-Marghera. Questa porzione di laguna (170 km<sup>2</sup>) è caratterizzata da un elevato impatto antropico dovuto alla concentrazione di popolazione e alle innumerevoli attività produttive;
- IV. Chioggia, porzione di Laguna più a sud (130 km<sup>2</sup>). In quest'area le pressioni antropiche sono relativamente basse e dovute prevalentemente agli allevamenti di vongole (Facca C. et al., 2014; Solidoro C. et al., 2004; Tagliapietra & Volpi Ghirardini, 2006).

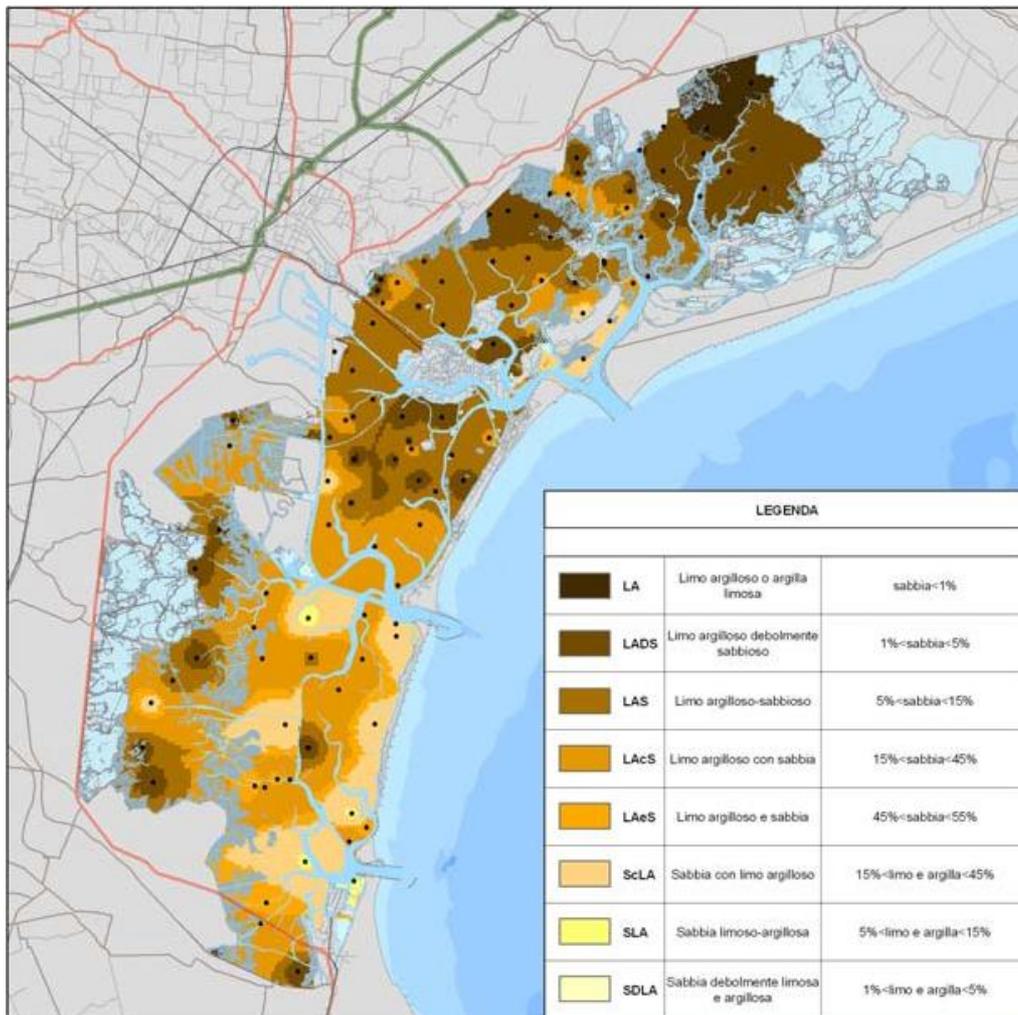


**Figura 4 - Laguna di Venezia. In evidenza le tre bocche di porto e l'area industriale di Porto-Marghera (Fonte: Google earth)**

L'analisi del contenuto mineralogico dei componenti maggiori presenti in Laguna, evidenzia la prevalenza di carbonati (dolomite in particolare) e silicati. La dolomite prevale nel bacino centro-settentrionale e settentrionale della Laguna, diminuendo da nord a sud e verso il bordo interno della laguna; i silicati prevalgono invece nel bacino meridionale, in particolare a sud di Chioggia, diminuendo verso nord e in generale verso il mare.

Dal punto di vista sedimentario, la laguna centro-settentrionale risulta caratterizzata dalla prevalente presenza di sedimenti a granulometria del silt e del silt argilloso, mentre i fondali più meridionali vedono la prevalenza di sedimenti più grossolani quali silt sabbioso e sabbia siltosa.

Inoltre, è evidente un gradiente granulometrico esistente tra le aree più interne della laguna, caratterizzate da sedimenti più fini, e quelle più prossime alle bocche di porto, caratterizzate da sedimenti più grossolani in virtù della maggiore forza erosiva delle correnti (Autorità di bacino - Reg. Veneto, 2010).



**Figura 5 - Granulometria dei sedimenti (0 - 20 cm) nei bassifondi della Laguna di Venezia (Autorità di bacino - Reg. Veneto, 2010)**

La Laguna di Venezia, proprio per la sua elevata eterogeneità strutturale e variabilità interna, in un'ottica di miglior gestione, è stata suddivisa in 14 corpi idrici, identificati in relazione alle pressioni ed agli impatti che insistono nell'area ed alle informazioni esistenti sullo stato chimico ed ecologico presente nelle diverse zone.

Dalle valutazioni fatte, sono stati individuati alla fine 11 corpi idrici naturali e 3 corpi idrici fortemente modificati come rappresentato in Figura 6 (Valli laguna nord, Centro storico, Valli laguna centro-sud). I criteri per l'individuazione dei corpi idrici fortemente modificati si sono basati su quanto riportato nella normativa e, in particolare, in base a quanto definito dal D.Lgs 152/2006 art. 74 e 77, dalla Direttiva 2000/60/CE art. 2 e dal D.M. Ambiente 131/2008 – Allegato 1 (Autorità di bacino - Reg. Veneto, 2010).

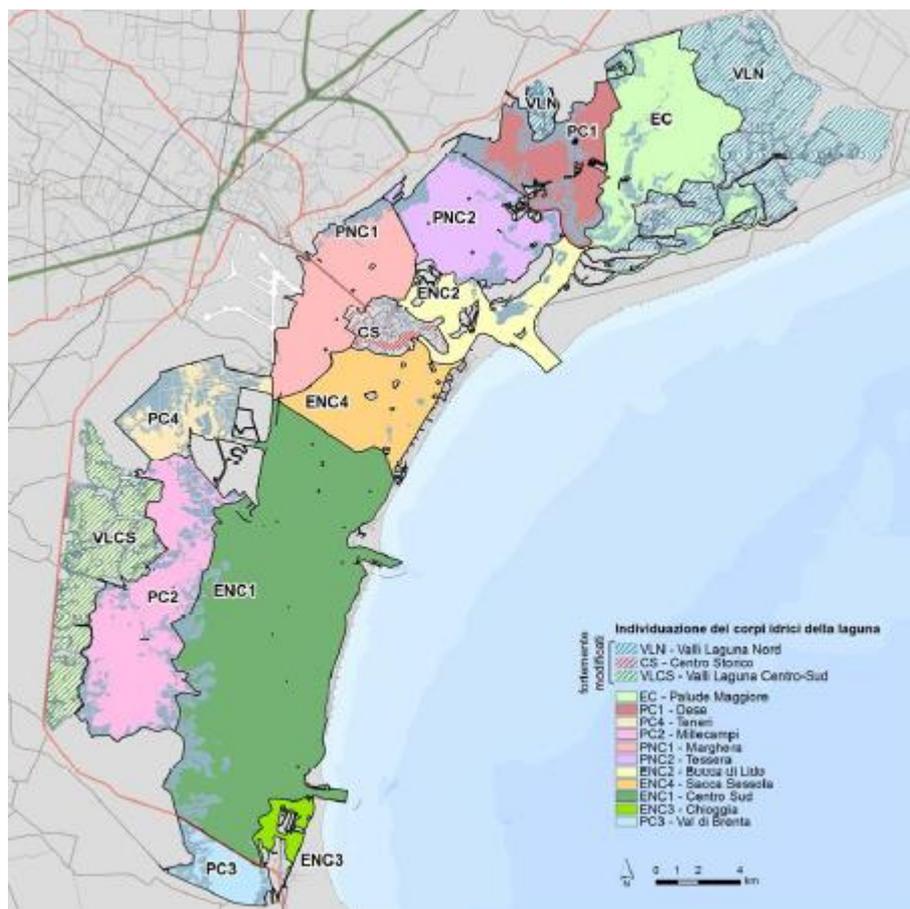


Figura 6 - suddivisione in corpi idrici della Laguna di Venezia

Entrando nel merito del campionamento per questo lavoro, i carotaggi sono stati eseguiti per conto terzi in una zona interna del bacino Malamocco, di fronte alla zona industriale di Porto-Marghera (corpo idrico PNC1, di cui sotto sono riportate le informazioni riassuntive), storicamente molto impattata dalle attività del petrolchimico.

Tabella 2 - Dati riassuntivi del corpo idrico in cui è stato eseguito il campionamento per questo lavoro (Autorità di bacino - Reg. Veneto, 2010)

Categoria	Codice corpo idrico	Nome corpo idrico	Denominazione tipo	Corpo fortemente modificato
Acque di transizione	PNC1	Marghera	Laguna costiera, microtidale, di grandi dimensioni, polialina, non confinata	No

Nello specifico, il campionamento è stato svolto tramite carotatore idraulico con l'ausilio di una chiatta galleggiante, indispensabile per eseguire carotaggi profondi fino ad 8 m. Sono state raccolte 24 carote di sedimento in totale da 8 differenti stazioni di prelievo (rinominate

dai codici P, Q, R, S, T, U, V, Z) e a diverse profondità (da 1 a 5). Le carote così prelevate, sono state opportunamente etichettate (codici riportati in Tab. 4) e consegnate ai laboratori del DAIS (vedi sezione 1.4).

**Tabella 4 - Codici delle carote di sedimento, alle cui lettere (P, Q, R, T, U, V, e Z) sono associate le diverse stazioni di prelievo mentre i numeri (da 1 a 5) si riferiscono a profondità crescenti**

P1
P2
P3
P4
P5
Q1
R1
R2
R3
R4
R5
S1
T1
T2
T3
T4
T5
U1
V1
V2
V3
V4
V5
Z1

### 2.1.2 Elutriati ed acque dei pori

Di seguito, vedremo come sono stati processati i campioni al fine di ricavare le due matrici per l'esecuzione dei test.

#### 2.1.2.1 Conservazione e trattamento dei campioni di sedimento

Le carote di sedimento una volta giunte presso il laboratorio sono state conservate in celle termostate a 4 °C. Per prima cosa si è proceduto ad annotare le principali informazioni di base contenute nell'etichetta identificativa di ciascuna carota. Successivamente, le carote di sedimento sono state tagliate trasversalmente mediante un multi-attrezzo Stanley per ricavare delle sezioni a minor dimensione. Il sedimento ha poi subito un trattamento di omogeneizzazione eseguito sotto cappa aspirante in atmosfera naturale per ricavare la

matrice elutriato o eseguito in atmosfera di azoto nel caso delle acque interstiziali, come spiegato meglio in seguito. Infine, il sedimento omogeneizzato è stato sottoposto a vagliatura manuale. Il prodotto delle diverse fasi preliminari di trattamento eseguite sulle carote di campione è stato fotografato e rappresentato in Figura 7.



**Figura 7 – A) carota di sedimento “tal quale”; B) carota divisa in sezioni; C) sedimento omogeneizzato**

#### 2.1.2.2 Determinazione del contenuto d’acqua dei campioni di sedimento

Dalle operazioni preliminari spiegate in precedenza, si è proseguiti poi con il calcolo dell’umidità (Eq.1) contenuta nei campioni: all’interno delle vasche con il sedimento omogeneizzato, è stata prelevata una quota di materiale (una spatola abbondante) a peso noto e posto in capsule di alluminio (anche dette “navicelle”) precedentemente preparate, numerate e pesate a vuoto (tara). Ogni capsula è stata quindi inserita in stufa a 105° per 24 h. Trascorse le 24 h, le navicelle sono state pesate (previo raffreddamento sino a temperatura ambiente in essiccatore circa 1 h) ed è stata calcolata la percentuale di acqua contenuta in ogni campione. Questo dato è fondamentale per calcolare il corretto rapporto di elutrazione che sarà spiegato nei paragrafi a seguire.

$$\left(1 - \frac{x_s}{x_u}\right) * 100 \quad \text{Eq. 1}$$

dove  $x_s$  corrisponde al peso secco ed  $x_u$  al peso umido di un’aliquota di sedimento.

### 2.1.2.3 Elutriati

Il fenomeno di risospensione del sedimento è una fonte primaria d'inquinamento per il comparto acquatico. Lo scarico di rifiuti, le attività di pesca e di navigazione, e lo smaltimento di materiale dragato rappresentano le principali cause per questo fenomeno (USEPA, 1997). L'elutriato è una matrice che permette di simulare il fenomeno di mobilitazione che avviene in ambiente e di prevedere gli effetti di rilascio dei contaminanti dal sedimento alla colonna d'acqua (ASTM, 1990). La preparazione di questa matrice d'analisi è stata eseguita prendendo come riferimento la procedura USEPA (1991), cui sono state apportate alcune modifiche per adattarla a sedimenti di ambiente lagunare, prendendo in considerazione lavori più recenti fatti nello specifico per la Laguna di Venezia (Volpi Ghirardini et al., 2005; Arizzi Novelli A. et al, 2006). Per questo lavoro sono stati scelti i rapporti di elutrazione 1:4 e 1:20. I motivi alla base di questa scelta sono i seguenti:

- Il rapporto 1:4 è quello globalmente più utilizzato dalle agenzie internazionali che si occupano di protezione ambientale e consente pertanto una confrontabilità maggiore dei risultati;
- Il rapporto 1:20 risente meno dei fattori di confusione ed i contaminanti riescono ad avere una miglior dissoluzione e quindi biodisponibilità per il comparto biotico (Ariszi Novelli A. et al, 2006).

La preparazione è stata eseguita in diversi passaggi successivi: innanzitutto, partendo dal volume di acqua deionizzata (Milli-Q) da aggiungere in ogni becker, si sono calcolati i rispettivi grammi di sedimento (considerando il contenuto di umidità precedentemente determinato e già presente nel campione) per ottenere i due rapporti di elutrazione per ogni diverso campione (qualora il quantitativo di sedimento fosse in eccesso sono state preparate anche più repliche dello stesso campione). Le pesate sono state effettuate alla bilancia tecnica (Gibertini, ser.no.102129). I diversi becker contenenti le due fasi sono stati sottoposti ad un processo di energico mescolamento tramite Jar test (mod. ISCO, Vittadini, Italy).



**Figura 8 - Campioni in agitazione nello Jar test nella camera climatica a 4 °C**

I campioni sono stati posizionati centralmente alle pale rotanti del Jar test (Fig. 8) e lo strumento è stato impostato a 230 RPM per 24 h. Il processo è avvenuto all'interno di una cella termostata a 4° e al buio. Trascorse le 24 h di agitazione, il surnatante è stato prelevato da ogni becker e sottoposto a centrifugazione dopo 1 h di sedimentazione a 4°. La centrifuga (mod. L7-35, Beckmann, Milan, Italy) dev'essere preventivamente accesa, impostando la temperatura d'esercizio a 4 °C, in modo che possa raggiungere la condizione di vuoto. La separazione per centrifugazione è avvenuta a 10'000 RPM (7700g) per 15 min (Volpi Ghirardini et al., 2005, Arizzi Novelli A. et al., 2006). Trascorso quest'arco di tempo, servendosi di una pipetta da 10 mL e facendo attenzione a non risospendere parte del materiale compattato, il surnatante è stato prelevato il surnatante e posto in bottiglie di polietilene (PE) da 50 ml, preventivamente lavate in acido. Ognuna delle bottiglie-campione è stata contrassegnata con l'opportuna etichetta. Le matrici (ELU 1:4 e ELU 1:20) così preparate sono state stoccate in freezer (-18° C) in attesa dell'esecuzione delle analisi. E' indispensabile che tale procedura sia effettuata entro due settimane dal campionamento per evitare la perdita di componenti

volatili o una parziale ossidazione del sedimento. In Figura 9, sono state sintetizzate le fasi sopra descritte.

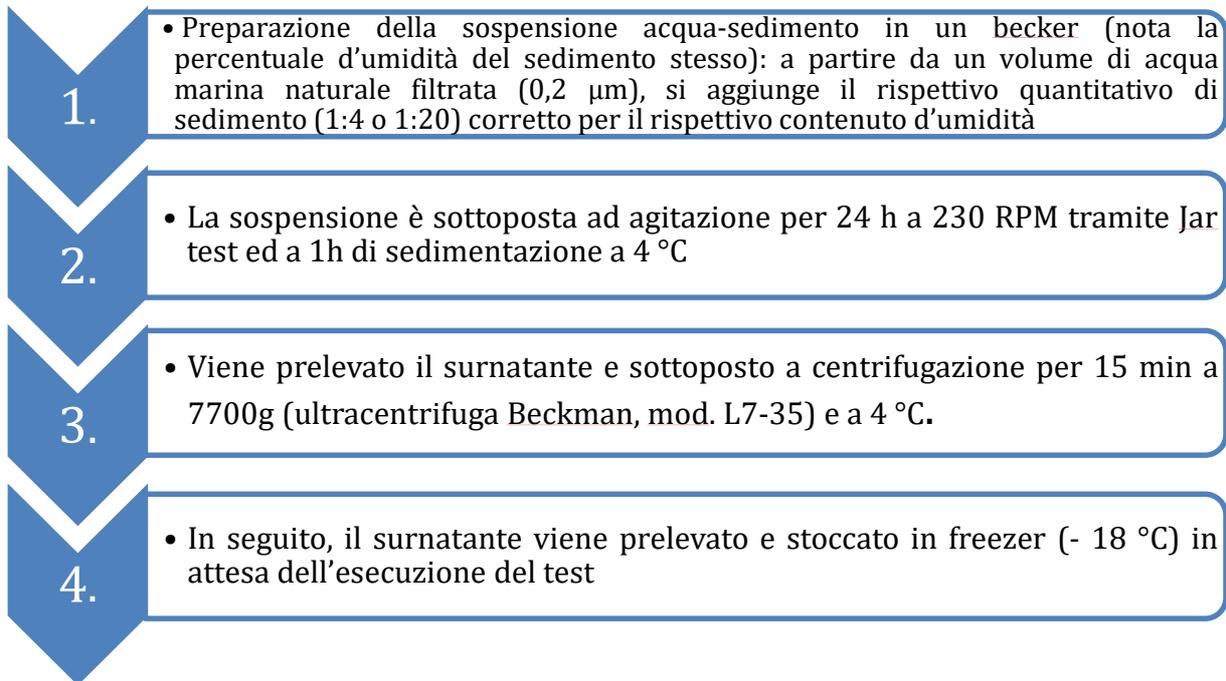


Figura 9 - Schematizzazione delle fasi di preparazione della matrice elutriata

#### 2.1.2.4 Acque dei pori

Le acque dei pori o acque interstiziali rappresentano un'importante via d'esposizione ai contaminanti per gli organismi che vivono a stretto contatto con il comparto sedimentario (Chapman P.M. et al., 2002). In particolare quindi, l'analisi delle acque interstiziali fornisce informazioni sulla porzione di contaminanti più solubile e biodisponibile.

Come riassunto da Carr and Nipper (2003), questa matrice rileva la tossicità più frequentemente rispetto ai test con fase solida. Tuttavia, nell'articolo scientifico vengono anche evidenziati dei problemi legati all'utilizzo di questa matrice e che riguardano soprattutto: la scelta di un'adeguata metodologia d'estrazione, il tempo e le condizioni di conservazione dei campioni e la presenza di fattori d'interferenza (cosiddetti *confounding factors*).

Alcuni metodi d'estrazione proposti per le acque interstiziali possono essere suddivisi in due categorie: 1) metodi *in-situ* che hanno il vantaggio di ridurre la manipolazione e le fonti d'errore (ossidazione del sedimento, contaminazione da metalli, filtrazione) ma che sono generalmente difficili da attuare, riuscendo a ricavare volumi ridotti di matrice; 2) metodi ex-

situ, sono quelli più utilizzati perché permettono di ricavare volumi maggiori per le analisi ma richiedono grossi quantitativi di sedimento ed è necessario operare in un'atmosfera inerte in modo da minimizzare l'ossidazione del sedimento campionato. Nel presente lavoro di tesi, facendo riferimento alla precedente esperienza di Losso C. et al. (2009) già condotta sui sedimenti della Laguna di Venezia, si è scelto di utilizzare un metodo d'estrazione ex-situ per ricavare questa matrice.

Ogni carota di campione quindi, è stata aperta, trattata ed omogeneizzata nel glove box in atmosfera controllata di azoto (inerte) al fine di impedire il fenomeno ossidativo. In quest'ambiente confinato, il sedimento ha subito una grossolana vagliatura eseguita manualmente per togliere i pezzi di conchiglia più grandi. Successivamente, sono stati riempiti con il sedimento i provettoni da centrifuga in policarbonato. I pesi sono stati aggiustati in modo da favorire il bilanciamento del rotore dell'ultracentrifuga. La mancanza in letteratura di un protocollo globalmente riconosciuto ed utilizzato, per quanto concerne le modalità di centrifugazione, ha fatto propendere per l'utilizzo del metodo suggerito da ASTM (2000), Environment Canada (1994) e USEPA (2001) e già precedentemente utilizzato dal gruppo di ricerca. La centrifuga è stata impostata a 13'000 RPM (> 10'000 g) per 30 min a 4 °C (Losso C. et al., 2009). Alla fine del ciclo di centrifugazione, i campioni sono stati estratti con cura (le operazioni sono state condotte rapidamente in modo da minimizzare l'ossidazione della matrice), prelevando il surnatante con una pipetta da 10 mL e ponendo la matrice ricavata in contenitori da 50 mL in PE, precedentemente etichettati e lavati in acido. Qualora necessario, è stato eseguito un secondo ciclo di centrifugazione per ricavare una matrice quanto più esente possibile da impurità sospese nel mezzo acquoso. I campioni sono stati stoccati in freezer (-18° C), in attesa d'esser analizzati. Di seguito, è riportata una rappresentazione schematica della procedura (Figura 10).

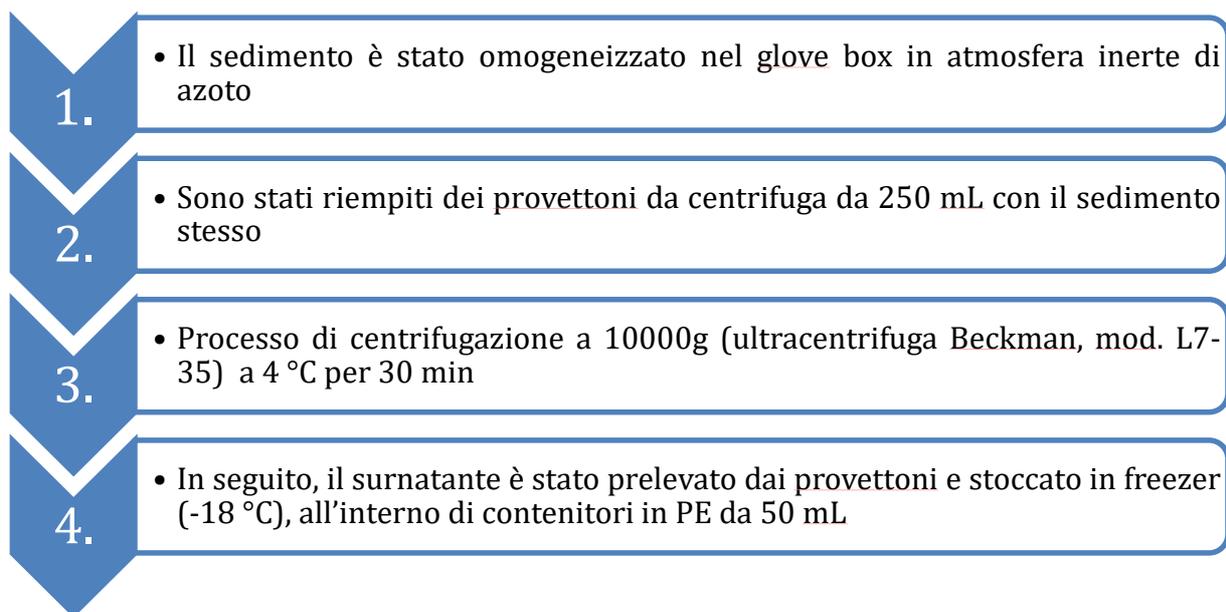


Figura 10 – Sintesi delle fasi di preparazione della matrice acqua interstiziale

## 2.2 Valutazione fisico-chimica

### 2.2.1 Reagenti

La sonda multiparametrica HACH® HQ40d è stata usata per le misure di pH, potenziale redox (Eh) e temperatura.

La salinità è stata valutata tramite il rifrattometro ATAGO S/Milli-E.

I parametri ammoniaca (N-NH<sub>3</sub>) e solfuri (S<sup>2-</sup>) sono stati determinati per via spettrofotometrica mediante i rispettivi metodi standard: Readon J. et al. (1966) e USEPA SM 4500-S2 D utilizzando lo spettrofotometro (HACH® DR 2800) ed i reagenti sono stati forniti dalla HACH® (Permachem® Reagents).

### 2.2.2 Ammoniaca

L'analisi dell'ammoniaca totale, eseguita per entrambe le matrici di studio (elutriati ed acque dei pori), riveste particolare importanza per saggi di tossicità di questo tipo perché tale parametro viene inserito all'interno dei cosiddetti fattori d'interferenza o "confounding factors" (Postma J.F. et al., 2002; Losso C. et al., 2007). Queste variabili presenti in matrici d'origine ambientale, influenzano la risposta del target biologico scelto per il test in maniera differente in base alla sensibilità della specie-test verso la variabile stessa. Nel precedente lavoro di Postma J.F. et al (2002), è evidenziata una concentrazione a cui non sono evidenziati

effetti significativi rispetto al controllo negativo (NOEC) per  $N-NH_3+NH_4^+$  pari a 57 mg/L, misurata a 20 °C, pH = 8 e salinità pari a 32 g/kg per la specie *P. tricornutum*.

Per la procedura di determinazione si è fatto riferimento al metodo spettrofotometrico con salicilato (Readon J. et al., 1966). Il principio si basa sulla reazione chimica che avviene tra l'ammoniaca ( $NH_3$ ), il salicilato e gli ioni ipoclorito ( $ClO^-$ ) che, in presenza di ioni ferrocianuro ( $[Fe(CN)_6]^{4-}$ ) formano acido salicilico ( $C_7H_6O_3$ ), analogo al blu indofenolo.

La procedura è stata eseguita in diversi passaggi:

1. Inizialmente, è stata predisposta la vetreria e la strumentazione necessaria, versando in un becker da 50 mL, un volume di 5 mL di campione "tal quale";
2. All'interno del campione, è stato versato il primo reagente (1 bustina contiene il quantitativo per 5 mL di soluzione) ammonio salicilato. Dopo aver ben mescolato il contenuto, si attende un periodo di reazione di 3 min;
3. Trascorso il periodo, si aggiunge il secondo reagente ammonio cianurato e si mescola in modo che non restino residui del composto sul fondo del Becker. Il tempo di reazione per il secondo è di 15 min;
4. Alla fine del periodo, è stato possibile leggere il campione allo spettrofotometro ( $\lambda=660$  nm), dopo averlo preventivamente tarato con un "bianco", contenente cioè solo ASW con l'aggiunta dei due reagenti. Lo strumento ha restituito come output la concentrazione di ammoniaca totale in mg/L. Sono state eseguite tre letture per campione (repliche).

A questo metodo analitico sono associati due limiti di rilevabilità: il limite inferiore si attesta a 0.01 mg/L mentre quello superiore è di 0,50 mg/L. Talvolta, è possibile che la soluzione indagata presenti una concentrazione che ricada al di fuori dell'intervallo di rilevabilità. In questo caso si rende necessaria la diluizione del campione a monte e la ripetizione della procedura. Per quanto detto, la prima lettura di un nuovo campione è anche detta "esplorativa".

### 2.2.3 Solfuri

I solfuri sono inseriti nei fattori d'interferenza per i saggi biologici di tossicità (Postma J.F., 2002; Losso C. et al., 2007). Precedenti lavori, hanno constatato l'interferenza di questa specie

chimica in saggi ecotossicologici su organismi marini (Knezovich J.P. et al, 1996; Losso C. et al, 2004). Le concentrazioni di solfuri sono state valutate con il metodo che utilizza il blu di metilene (USEPA SM 4500-S2 D) per le determinazioni spettrofotometriche. L'analisi chimica si è svolta in diverse fasi, come di seguito spiegato:

1. dopo aver allestito il materiale per il test e preparato i reagenti necessari, è stato versato, in un Becker sterile da 100 ml, un volume di 25 ml di campione;
2. Successivamente, vengono aggiunte alcune gocce (circa 0.5 ml) del reagente 1 ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$ ) e a seguire il reagente 2 (NaOH) con le medesime modalità. Il tempo di reazione previsto dal protocollo è di 5 min, durante i quali l' $\text{HS}^-$  e i solfuri metallici acidi in soluzione, favoriti dal pH basico presente nel mezzo, reagiscono con N, N-dimetil-p-fenilendiammina solfato per formare blu di metilene, un composto colorato.
3. In seguito, sono state eseguite, previa taratura con un "bianco", le letture (tre per campione) allo spettrofotometro impostando  $\lambda=665\text{nm}$  ed ottenendo un valore in concentrazione di  $\text{S}^{2-}$  espresso in  $\mu\text{g/L}$ .

Questo metodo presenta un intervallo di rilevabilità compreso tra 5 e 800  $\mu\text{g/L}$  e come anche detto precedentemente, qualora il valore di concentrazione rilevato per un campione sia ricaduto al di fuori di questo intervallo, si è resa necessaria la diluzione del mezzo.

## 2.3 Test di tossicità con *P. tricornutum*

### 2.3.1 Reagenti

La preparazione dell'acqua marina ricostruita (o artificial sea water, ASW) è stata eseguita seguendo le proporzioni indicate nel protocollo standard (10253:2006). Nello specifico, sono stati preparati 5 L di soluzione salina (composizione riportata in Tab.5) in una beuta, volume necessario per la ripetizione del saggio di tossicità per tutti i campioni. La beuta, contenente 2/3 del volume finale di acqua MilliQ, è stata posta in agitazione e riscaldamento, allo scopo di favorire il discioglimento dei diversi sali. Successivamente, il contenuto della beuta è fatto fluire all'interno di un apparato filtrante a vuoto allo scopo di eliminare eventuali impurità presenti nel mezzo acquoso precedentemente preparato. Per la filtrazione sono stati utilizzati filtri sterili di cellulosa con una porosità di 0,45  $\mu\text{m}$ .

**Tabella 5 – Sali necessari alla preparazione dell'ASW**

Sali	Concentrazione dei Sali (g/L)
NaCl	22
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	9,7
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anidro)	3,7
CaCl <sub>2</sub> (anidro)	1,0
KCl	0,65
NaHCO <sub>3</sub>	0,20
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,023

Sempre seguendo le indicazioni riportate nel protocollo standard per questo saggio biologico (10253:2006) sono state preparate le tre soluzioni stock (Tab.6). Esse contengono i nutrienti necessari alla coltura algale per crescere in condizioni ottimali e vanno aggiunte ad 1 L di ASW nelle seguenti quantità: 15 mL di stock 1 (sali minerali), 0,5 mL di stock 2 (vitamine) e 1 mL di stock 3 (P, N e SiO<sub>2</sub>). La soluzione ottenuta (chiamata “mezzo di crescita”) è poi filtrata attraverso membrane da 0,2 µm e conservata al buio a 4°C.

**Tabella 6 - Composizione delle tre soluzioni stock per le colture algali**

Sale	Formula	mg/L
<b>STOCK 1</b>		
Ferro cloruro esaidrato	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	48
Manganese cloruro tetraidrato	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	144
Zinco solfato eptaidrato	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	45
Solfato di rame pentaidrato	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,157
Cobalto cloruro esaidrato	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,404
Acido borico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1140
Acido etilendiamintetraacetato	Na <sub>2</sub> EDTA	1000
<b>STOCK 2</b>		
Tiamina idrocloruro (vitamina B)		50
Biotina (vitamina B7)		0,01
Cianocobalamina (vitamina B12)		0,10
<b>STOCK 2</b>		

Potassio fosfato	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3
Sodio nitrato	NaNO <sub>3</sub>	50
Sodio metasilicato pentaidrato	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	14,9

La soluzione madre di bicromato di potassio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) è stata preparata alla concentrazione di 1 gr/L ed è stata utilizzata come tossico di riferimento nel test microalgale secondo lo schema sperimentale riportato in Tabella 7.

**Tabella 7 - Tossico di riferimento (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)**

Concentrazione iniziale (mg/L)	Vol. iniziale (mL)	Vol. finale (mL)	Concentrazione finale (mg/L)	Volume di ASW (mL) per pozzetto (*)
1000	0,000	3	0	2,850
1000	0,011	3	3,75	2,839
1000	0,023	3	7,5	2,828
1000	0,046	3	15,3	2,804
1000	0,090	3	30	2,760
1000	0,180	3	60	2,670

(\*) volume di nutrienti = 0,15 mL, aggiunti in seguito

### 2.3.2 Fasi procedurali del saggio biologico di tossicità

Lo standard di riferimento seguito per l'esecuzione del test con *P. tricornutum* è l'UNI EN ISO 10253:2006, "Water quality, Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*", con cui è stato possibile caratterizzare le due matrici derivate dal sedimento campionato nell'area antistante la zona industriale di Porto Marghera. L'attività sperimentale ha considerato l'analisi dei campioni tal quali (100%) per entrambe le matrici ed in diluizione (6.25, 12.5, 25, 50%) per le sole acque interstiziali e considerando un

fattore in scala geometrica pari a 2. Sono stati inoltre presi in considerazione sempre un controllo negativo e un controllo positivo ( $K_2Cr_2O_7$ ) per le opportune procedure di valutazione e controllo della qualità delle analisi. Tutti campioni sono stati valutati almeno in triplicato per ciascuna diluizione testata.

Entrando nel merito della procedura standard legata a questo saggio, essa prevede di eseguire la lettura del mezzo algale di partenza, per conoscerne la concentrazione iniziale e dalla lettura delle piastre dopo 72 h al fine di ottenere la concentrazione algale finale. In condizioni ideali, trascorse le 72 h, è previsto che la coltura algale sia all'apice della fase di crescita esponenziale (Minetto D., 2012).

Nello specifico di questo lavoro, al termine delle 72 h, la lettura delle piastre è avvenuta sia attraverso il metodo di conta al microscopio ottico con camera di conta di Bürker sia con la lettura dell'assorbanza (Abs) allo spettrofotometro. Questo è stato possibile partendo dalla creazione di un modello di regressione lineare Abs-cell/mL che permettesse di trasformare i dati derivanti dalle letture spettrofotometriche in concentrazione di cellule algali.

La densità ottica delle sospensioni indagate è stata ottenuta con lo spettrofotometro DR 2800, impostato alla lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 670 nm come suggerito da Renzi M. et al. (2014) per questa specie. A questa  $\lambda$  infatti, sono minimizzate le interferenze che possono derivare da altri coloranti presenti in soluzione (Fawley M.W. and Grossman A.R., 1986; Renzi M. et al, 2014). I campioni sono inseriti nelle apposite cuvette per un volume totale di 6 mL. Prima della lettura strumentale, la cuvetta è agitata energicamente per favorire la sospensione delle cellule algali e poi inserita nell'apposito incavo dello spettrofotometro. A questo punto, è richiuso il comparto in cui alloggia il campione e si esegue la lettura tre volte in successione.

Diversamente, la conta al microscopio con camera di Bürker è un metodo di conta diretto che utilizza un microscopio ad inversione ed un vetrino specifico denominato appunto camera di conta di Bürker. Questo vetrino, presenta una struttura a griglia come quella riportata in Figura 11, in cui si evidenziano 9 quadrati grandi della superficie di  $1 \text{ mm}^2$  ed al cui interno sono presenti 16 quadratini più piccoli per ognuno dei nove con superficie di  $0,0625 \text{ mm}^2$ . Di seguito, sono riportate le fasi di letture con camera di conta:

1. Il campione da analizzare è inizialmente mescolato per favorire la risospensione delle cellule algali e poi alcuni microlitri sono prelevati e posti nella camera di conta;

2. Il vetrino è poi osservato al microscopio con un ingrandimento di 20x, tale da consentire il conteggio delle singole cellule. Sono scelti 3 quadrati grandi in cui effettuare il conteggio (nel nostro caso sono stati scelti in diagonale);
3. Il valore totale di cellule conteggiate in tre quadrati è poi mediato in modo da ottenere il numero di cellule per  $\text{mm}^2$  ( $1\text{mm}^2 = 0,1\text{ mm}^3$ ).

Questo valore sarà poi moltiplicato per un fattore di  $10^4$  ( $1\text{mL} = 1000\text{ mm}^3$ ) per ottenere il numero di cellule per mL di sospensione, necessario a valutare il valore dell'eventuale inibizione o stimolazione algale.

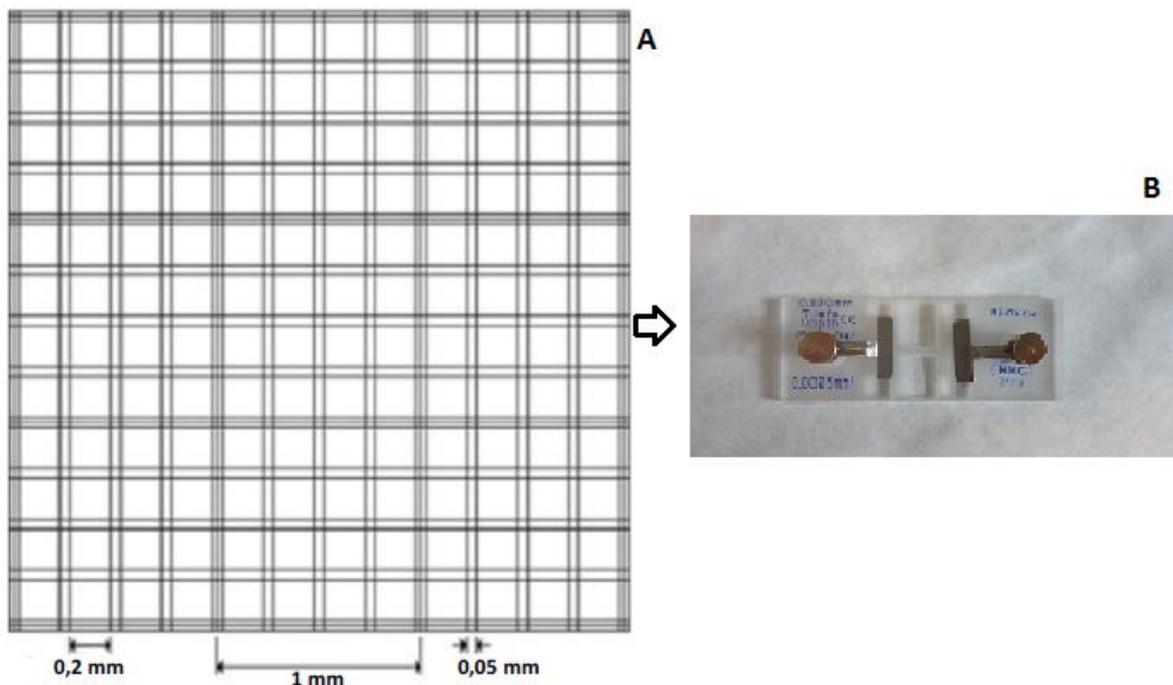


Figura 11 – A) un dettaglio della struttura della camera di conta vista al microscopio; B) la conformazione del vetrino (Minetto D., 2012)

Nel lavoro di Renzi M. et al (2014) i due approcci per la stima dell'endpoint d'inibizione della crescita sono analizzati più nel dettaglio. In Tabella 8 sono riportati i principali vantaggi e svantaggi legati a ciascun metodo.

Tabella 8 - Principali vantaggi e svantaggi dei due approcci metodologici

Metodo spettrofotometrico		Metodo d'analisi al microscopio con camera di Bürker	
Vantaggi	Svantaggi	Vantaggi	Svantaggi
Facilità d'esecuzione	Risultati affetti da errore associato alla	Facilità d'esecuzione	Tempistiche maggiori

	torbidità del campione		
Buona riproducibilità delle misure	Effetti sub-letali non rilevati	Buona riproducibilità delle misure	Errore associato all'operatore
Disponibilità di un protocollo standardizzato		Disponibilità di un protocollo standardizzato	
Tempistiche ridotte		Assenza d'errore associato alla torbidità del mezzo	

Riassumendo quanto detto fino ad ora sul test, sono di seguito spiegate in successione le diverse fasi sperimentali:

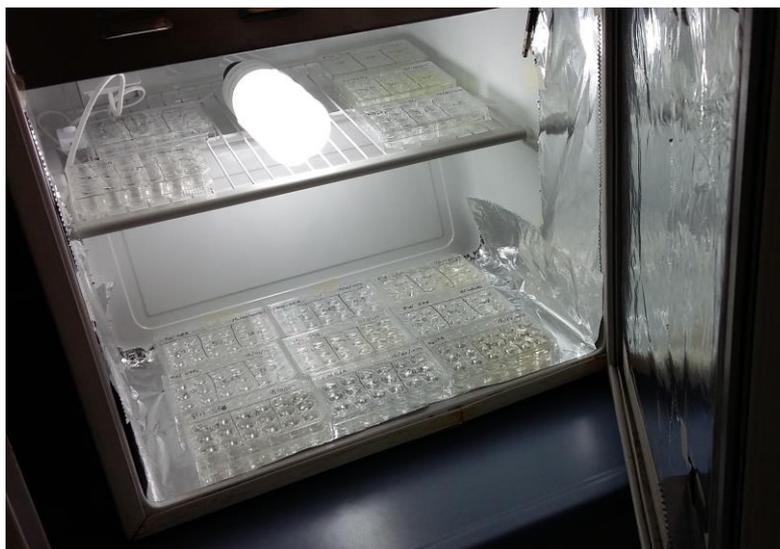
- i. in previsione del saggio algale, 72 h prima è stato effettuato il rinnovo della coltura. Questa semplice operazione è stata eseguita inoculando 8 mL di una precedente coltura algale in una beuta contenente 100 mL del mezzo di crescita rinnovato (composizione disponibile nel protocollo ISO 10253, di riferimento). Inoltre, si è proceduto ad un controllo di tutti gli apparati da impiegare durante le successive fasi come: il frigo-termostato, le cappe aspiranti, i bagni termostatici e lo spettrofotometro.

Quest'ultimo, in particolare, è stato oggetto di alcune prove di lettura. Nello specifico, sono state eseguite letture in serie a volumi crescenti di soluzione al fine di verificare il volume ottimale con cui eseguire le letture dei campioni veri e propri. Durante queste prove, è stata constatata una certa difficoltà dello strumento a leggere volumi inferiori a 5mL e di conseguenza, si è deciso di pianificare il test per letture con 6 mL. In aggiunta, in questa fase ci si è posti l'obiettivo di costruire una retta di taratura (Abs-cell/mL) allo scopo di minimizzare le tempistiche in fase di lettura del test. Per costruire una relazione affidabile tra questi due parametri si è partiti dalla lettura della coltura algale "tal quale", eseguendo in parallelo la lettura dell'assorbanza ed il conteggio al microscopio (Leica, DMIL), con ingrandimento 20x della soluzione. Nel proseguo, sono state eseguite una serie di diluizioni sul "tal quale" e le rispettive letture in parallelo. I dati ottenuti sono stati poi processati in un foglio Excel (2015) di calcolo. Inoltre, in

questa fase vengono preparati i reagenti necessari per il saggio di tossicità quali: l'ASW, il mezzo di crescita ed il bicromato di potassio.

La fase di allestimento è stata eseguita 24 h prima dell'inoculo algale ed è consistita, sostanzialmente, nella predisposizione del laboratorio ad accogliere al meglio le successive fasi di lavoro. Per ospitare le soluzioni da analizzare sono state scelte le piastre monouso a 24 pozzetti (Iwaki, Japan). Esse sono state aperte e sono state annotate le principali informazioni di base: nome del campione, data d'incubazione del test ed eventuali rapporti di diluizione, pianificando per ogni concentrazione di campione la lettura di 3 repliche per un volume di 6 mL ciascuna (ogni pozzetto può contenere 3 mL di soluzione quindi due pozzetti per replica). Successivamente, sono stati eseguiti i calcoli per ottenere i volumi di diluizione per il controllo positivo e per i campioni, dove necessario. Nell'ultima parte, i volumi di ASW e quelli di bicromato sono stati inseriti all'interno delle piastre, poi termostatate a 20° in attesa dell'inoculo.

- ii. Nella fase dell'inoculo algale, è necessario dapprima conoscere la concentrazione della coltura da immettere in ogni piastra. Per questo, è stata eseguita una conta al microscopio del mezzo di partenza ed in base al risultato della lettura, è stato calcolato il volume di inoculo da inserire in 3 mL (volume pozzetto) in modo da inoculare una concentrazione pari a  $10^4$  cell/mL, come previsto dal protocollo standard (10253:2006). A questo punto, sono organizzate le piastre sul piano di lavoro ed utilizzando una pipetta tarata munita di puntale, viene inserito dapprima un volume di 0.15 mL del mezzo di crescita in ogni pozzetto ed a seguire il volume di inoculo algale. Le piastre sono quindi richiuse e disposte omogeneamente in frigo termostato a 20° C  $\pm$  1 (Fig. 12); sono annotate la data e l'ora d'inizio test.



**Figura 12 - Disposizione delle piastre in frigo-termostato**

- iii. La lettura del test è fatta a 72 h dall'inoculo. In questa fase, le piastre sono tolte dal frigo-termostato e sono eseguite le letture spettrofotometriche su 6 mL di soluzione (volume ricavato da due pozzetti) per la stima dell'assorbanza. Si è scelto di partire dal controllo negativo per valutare l'effettiva avvenuta crescita delle alghe in condizioni "normali" ed a seguire con il resto delle piastre. In parallelo e soltanto per la prima replica di ogni campione, sono state eseguite le letture di controllo con camera di Bürker. Le letture in parallelo hanno lo scopo di contrapporre i due metodi e confermare la coerenza della retta di taratura.
- iv. I dati d'assorbanza ricavati dallo spettrofotometro, sono ricondotti al loro valore in concentrazione (cell/mL). Diversamente, i dati delle letture alla camera Bürker (X=numero cellule conteggiate) sono moltiplicati per il fattore di correzione della camera di conta che è pari a  $10^4$  da cui deriva l'equazione (Eq 2):

$$(\text{cell/mL}) = X * 10^4 \qquad \text{Eq. 2}$$

I valori di concentrazione algale sono tabulati in un foglio Excel (2015) e processati al fine di ottenere i tassi di crescita specifici ( $\mu$ ), con la seguente formula (Eq.3):

$$\mu = \frac{\ln(N_L) - \ln(N_0)}{t_L - t_0} \quad \text{Eq. 3}$$

dove con  $N_L$  e  $N_0$  sono indicate rispettivamente le concentrazioni finali ed iniziali mentre a denominatore, è riportata la differenza tra i tempi di fine ed inizio del test. A seguire, viene poi calcolata la percentuale d'inibizione del tasso di crescita algale rispetto al controllo negativo (Eq. 4):

$$I_\mu = \left[ \frac{(\mu_c - \mu_i)}{\mu_c} \right] * 100 \quad \text{Eq. 4}$$

dove i due parametri sono:  $\mu_c$  è la media del tasso di crescita specifico per il controllo negativo e  $\mu_i$  è il tasso di crescita specifico della replica. La percentuale d'effetto (inibizione della crescita algale) per ogni campione di elutriato o acqua interstiziale è generata mediando i tassi di crescita specifici delle singole repliche e calcolando la percentuale d'inibizione su questa media. Il risultato può essere positivo nel caso in cui il campione produca un effetto di inibizione sulla crescita algale oppure assumere un valore negativo nel caso in cui il campione produca biostimolazione. I dati ottenuti per i controlli positivi e negativi sono confrontati con le soglie di accettabilità presenti nel metodo ISO 10253:2006 al fine di confermare la buona riuscita del test. A questo, va aggiunta la misura del pH che, nel controllo negativo, non deve incrementare di più di 1 unità durante il test.

Comunque, dai valori di percentuale d'effetto, qualora siano disponibili più concentrazioni per il singolo campione, è possibile calcolare il valore di  $EC_{50}$ .

Il parametro si ricava agevolmente con la regressione lineare dei valori delle percentuali di inibizione ricavati rispetto alle concentrazioni a cui tali effetti sono stati misurati. In questo modo otterremo i valori dell'intercetta  $q$  e del coefficiente angolare  $m$  di una retta generica ( $Y = mX + q$ ). Tale equazione consente di ricavare il parametro d'effetto corrispondente alla  $X$ , isolandola rispetto agli altri termini e sostituendo alla  $Y$  il valore 50. Il valore ottenuto, altro non è che la concentrazione di tossico alla quale si verifica un effetto d'inibizione del 50% della popolazione algale. Essendo, in questo

test, l'inibizione della crescita l'effetto valutato, il generico acronimo ( $EC_{50}$ ) si può anche scrivere come  $IC_{50}$  (Inhibition Concentration 50%).

L'elaborazione dei dati prosegue poi con la trasformazione dell' $IC_{50}$  in Toxic Unit(TU), mediante una semplicissima equazione matematica (Eq.5):

$$TU_{50} = 100 / EC_{50} \quad \text{Eq. 5}$$

Se il tossico produce un effetto di biostimolazione piuttosto che d'inibizione, le Toxic Unit sono dette Biostimulation Unit (BU).

Viceversa, se il calcolo dell' $IC_{50}$  non è possibile, è ugualmente possibile esprimere la percentuale d'effetto in unità di tossicità mediante una diversa equazione (Eq.6):

$$TU_{50} \text{ (o } BU)_{50} = PE / 50 \quad \text{Eq. 6}$$

Le TU, in generale, permettono un confronto tra differenti parametri, come mostrato anche da Libralato G. et al. (2015).

Da ricordare che, le diverse fasi sopra esplicate e schematizzate in Figura 13, sono state ripetute per ognuna delle matrici considerate, verificando ad ogni ripetizione del test le soglie di accettabilità imposte dal protocollo standard di riferimento.

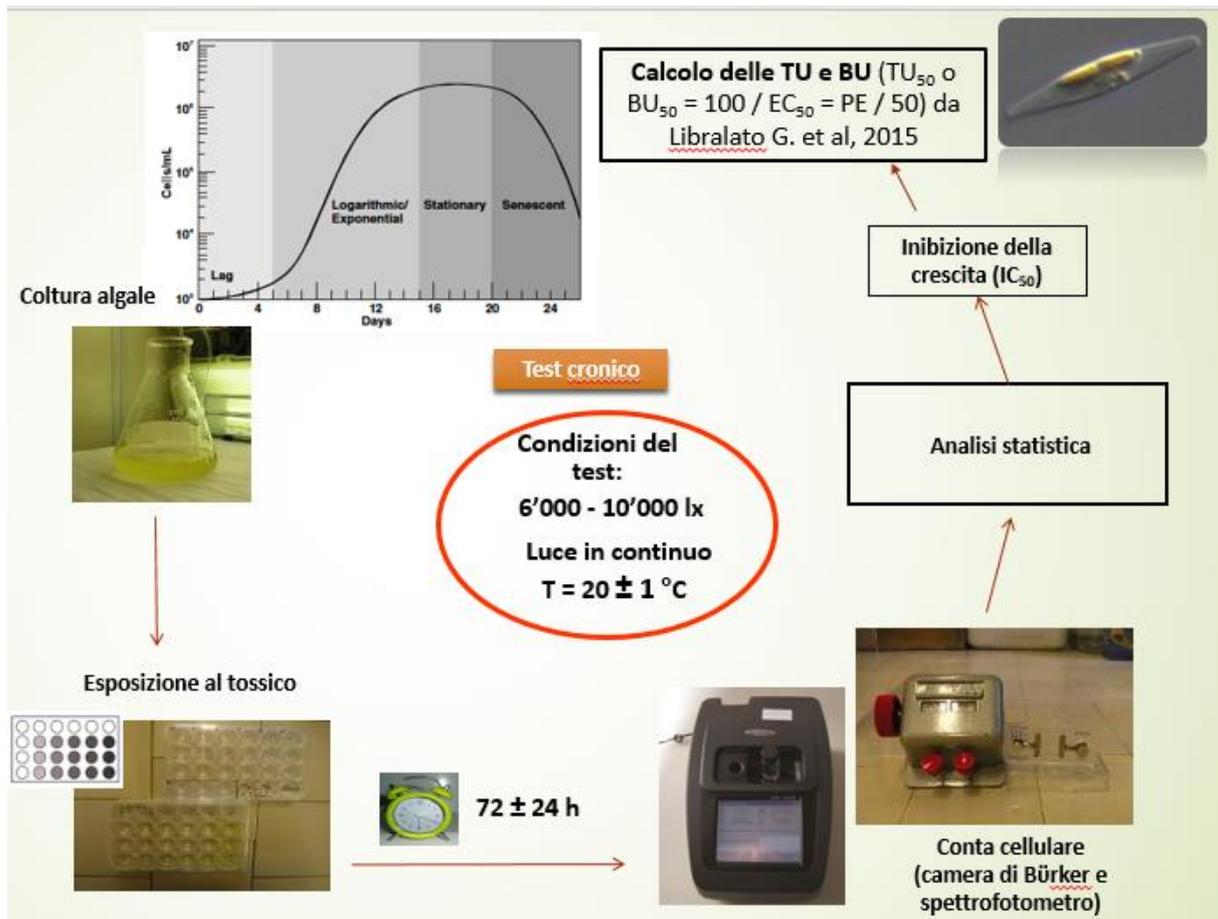


Figura 13 - Rappresentazione delle fasi in cui si articola il saggio di tossicità con *P. tricornutum*

## 2.4 Analisi dei dati

La tossicità dei campioni di sedimento è stata espressa come unità di tossicità o di biostimolazione (TU o BU). Tali valori sono stati calcolati a partire dai valori di concentrazione d'effetto espressa sul 50% della popolazione (IC<sub>50</sub>), dove possibile, o in alternativa dai valori di percentuale d'effetto (PE). I dati di effetto sono stati classificati mediante due tipologie di approcci:

1. La scala di tossicità proposta da Libralato G. et al. (2015), secondo lo schema di classificazione riportato in Figura 14.

Endpoint	Toxicity Score	Effect	Score
Algae growth stimulation	$BU_{50} > 1.64$	very high	4
	$1.05 < BU_{50} \leq 1.64$	high	3
	$0.31 < BU_{50} \leq 1.05$	medium	2
	$0 < BU_{50} \leq 0.31$	low	1
	$BU_{50} \text{ or } TU_{50} = 0$	absent	0
Algae growth inhibition	$0 < TU_{50} \leq 0.07$	low	1
	$0.07 < TU_{50} \leq 2.67$	medium	2
	$2.67 < TU_{50} \leq 5.86$	high	3
	$TU_{50} > 5.86$	very high	4

Figura 14 - Scala di tossicità da Libralato G. et al. (2015)

2. In alternativa, è stato applicato il sistema di classificazione di Persoone G. et al (2003) secondo lo schema in Figura 15.

TU		Toxicity	Symbol
$< 0.4$	Class I	No acute toxicity	
$0.4 < TU < 1$	Class II	Slight acute toxicity	
$1 < TU < 10$	Class III	Acute toxicity	
$10 < TU < 100$	Class IV	High acute toxicity	
$TU > 100$	Class V	Very high acute toxicity	

Figura 15 - Sistema di classificazione in classi di pericolo di Persoone et al. (2003)

I dati ricavati sperimentalmente sono stati inseriti in un foglio Excel (2015) e processati mediante il software statistico Microsoft® Excel 2016/ XLSTAT-Pro (Version 2015.6.01.25106,

Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA), attraverso il quale è stato possibile modellizzare (regressione lineare) e descrivere il nostro set di dati.

Come accennato nel precedente paragrafo, nelle fasi preliminari del test con *P. tricornutum*, i dati sulla densità algale ricavati tramite conta al microscopio sono stati plottati con i valori di assorbanza ricavati dalle letture spettrofotometriche al fine di generare un modello matematico affidabile (retta di taratura) per ricondurre i valori di assorbanza in valori di concentrazione (cell/mL) e così velocizzare le future operazioni di lettura.

Il set di dati è stato affinato mediante l'applicazione del metodo Thompson  $\tau$  modificato (Cimbala J.M., 2011). Il metodo per coppie di dati prevede il calcolo della differenza tra il valore dell'assorbanza predetto dalla funzione polinomiale e quello misurato con lo spettrofotometro, da cui si ottiene l'errore o residuo per la coppia di dati considerata ( $e_i$ ). Segue, il calcolo dell'Errore standard ( $S_{y,x}$ ) che rappresenta l'errore complessivo commesso dalla funzione in predizione e calcolato con la seguente formula di base (Eq. 7):

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y)^2}{df}} \quad \text{Eq. 7}$$

dove con  $y$  sono indicate le singole misurazioni di Abs mentre  $Y$  è la media di tutte le  $y$ .

Tali calcoli permettono di individuare i cosiddetti "outlier", definiti come punti statisticamente incoerenti con il resto del set di dati e che possono pertanto essere eliminati.

Sono due i criteri da seguire per determinare se una coppia di dati ( $x, y$ ) è da considerarsi un outlier:

- il valore assoluto del residuo standardizzato ( $e_i/S_{x,y}$ ) per quella coppia di dati dev'essere  $>2$ ;
- il residuo standardizzato per la coppia Abs/densità cellulare dev'essere divergente rispetto ai punti vicini ad esso quando plottati in funzione della variabile  $x$  (Cimbala J.M., 2011).

I risultati delle analisi chimiche ed ecotossicologiche sono stati confrontati mediante la matrice di similarità/dissimilarità di Pearson, il cui scopo è quello di misurare la correlazione tra le variabili considerate attraverso un coefficiente ( $r$ ), il quale assume un valore adimensionale da -1 a +1, in cui +1 rappresenta una relazione perfettamente lineare e positiva tra le due variabili e viceversa, -1 rappresenta una relazione lineare negativa. Il calcolo di  $r$  avviene attraverso la seguente equazione (Eq. 8):

$$r = \frac{sp}{\sqrt{SS_x SS_y}} \quad \text{Eq. 8}$$

in cui SP rappresenta la somma del prodotto degli scarti dalla media (anche detta covarianza).  $SS_x$  è la somma degli scarti per la variabile X (anche detta varianza di X) e  $SS_y$  corrisponde alla sommatoria degli scarti per la variabile Y (varianza di Y).

I modelli di regressione lineare applicati sono ascrivibili alla categoria degli OLS, acronimo che riconduce all'utilizzo dei minimi quadrati ordinari per la costruzione del modello. Nello specifico, il metodo può essere rappresentato da un'equazione generica (Eq. 9) come quella qui sotto riportata:

$$y = a + bX \quad \text{Eq. 9}$$

dove: a = intercetta ( $\bar{y} - b\bar{x}$ ); b = coefficiente angolare della retta derivante dal rapporto tra SP /  $SS_x$ .

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel presente lavoro, sono state raccolte e caratterizzate 24 carote di sedimento di lunghezza pari ad 1 metro, da cui è stato possibile ricavare un totale di 60 campioni: 24 campioni di Elutriato 1:4 (ELU 1:4), 24 campioni di Elutriato 1:20 (ELU 1:20) e 12 di acque interstiziali (PW) rinominati secondo i codici riportati in Tabella 9. Le lettere presenti nei codici rappresentano le diverse stazioni di campionamento (P, Q, R, S, T, U, V e Z) mentre i numeri (da 1 a 5), la profondità di campionamento (crescente al crescere del numero).

**Tabella 9 - Codice dei 60 campioni analizzati nelle 8 stazioni (P, Q, R, S, T, U, V e Z)**

ELU1:4 P1	ELU1:20 P1	PW P1
ELU1:4 P2	ELU1:20 P2	PW P2
ELU1:4 P3	ELU1:20 P3	
ELU1:4 P4	ELU1:20 P4	
ELU1:4 P5	ELU1:20 P5	

ELU1:4 Q1	ELU1:20 Q1	PW Q1
-----------	---------------	-------

ELU1:4 R1	ELU1:20 R1	PW R1
ELU1:4 R2	ELU1:20 R2	PW R2
ELU1:4 R3	ELU1:20 R3	
ELU1:4 R4	ELU1:20 R4	
ELU1:4 R5	ELU1:20 R5	

ELU1:4 S1	ELU1:20 S1	PW S1
-----------	------------	-------

ELU1:4 T1	ELU1:20 T1	PW T1
ELU1:4 T2	ELU1:20 T2	PW T2
ELU1:4 T3	ELU1:20 T3	
ELU1:4 T4	ELU1:20 T4	
ELU1:4 T5	ELU1:20 T5	

ELU1:4 U1	ELU1:20 U1	PW U1
-----------	------------	-------

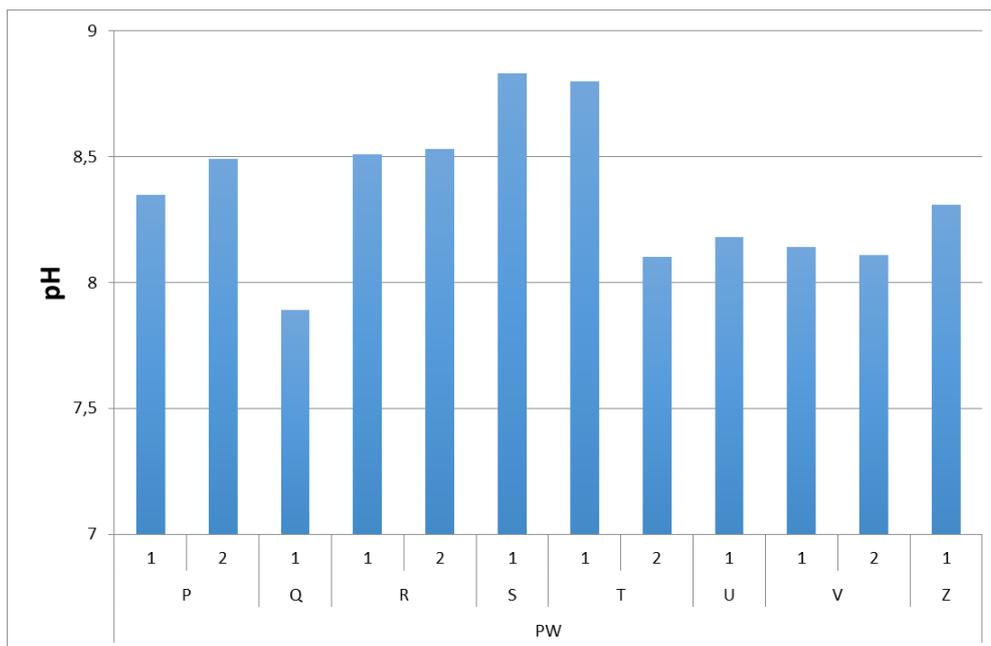
---

ELU1:4 V1	ELU1:20 V1	PW V1
ELU1:4 V2	ELU1:20 V2	PW V2
ELU1:4 V3	ELU1:20 V3	
ELU1:4 V4	ELU1:20 V4	
ELU1:4 V5	ELU1:20 V5	

ELU1:4 Z1	ELU1:20 Z1	PW Z1
-----------	------------	-------

### 3.1 Valutazione fisico-chimica

I risultati dettagliati delle analisi fisico-chimiche su pH, Eh, T e salinità sono riportati in Allegato 1 e sono qui riassunti e rappresentati mediante istogrammi suddivisi per matrice di studio (Fig. 16,17,18 e 19).



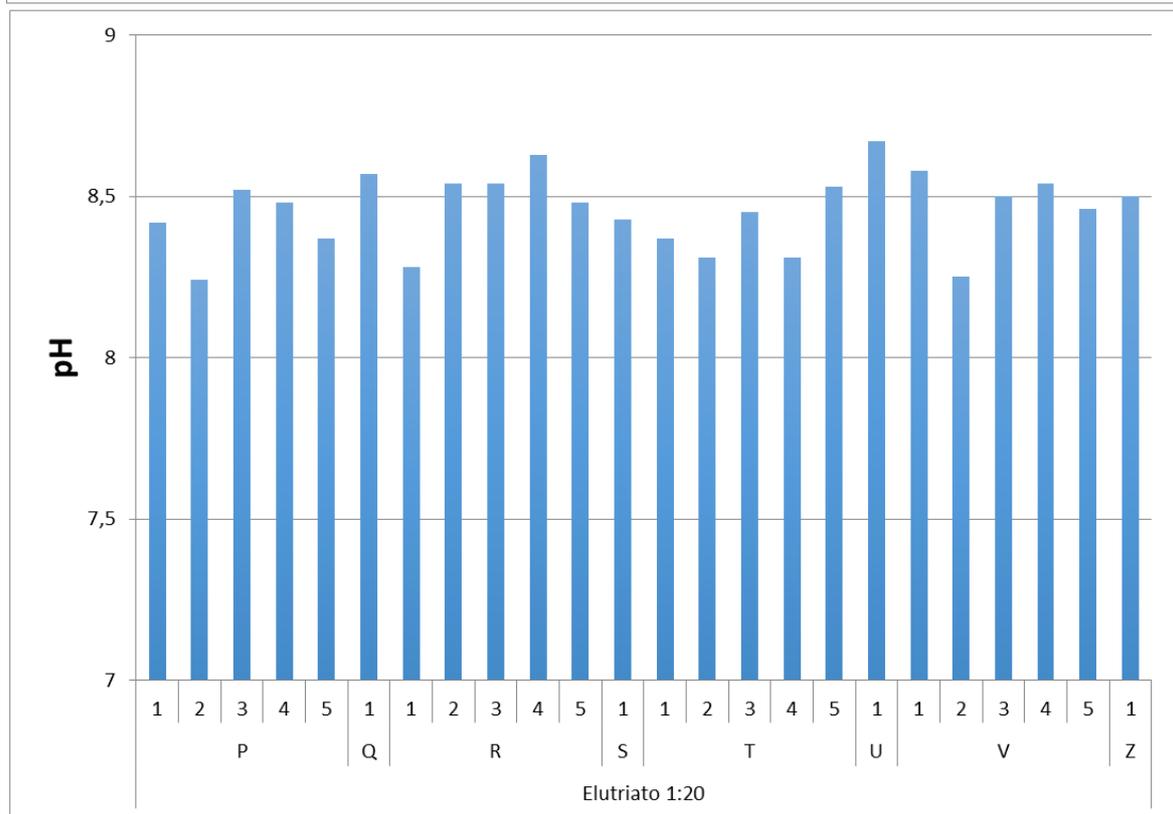
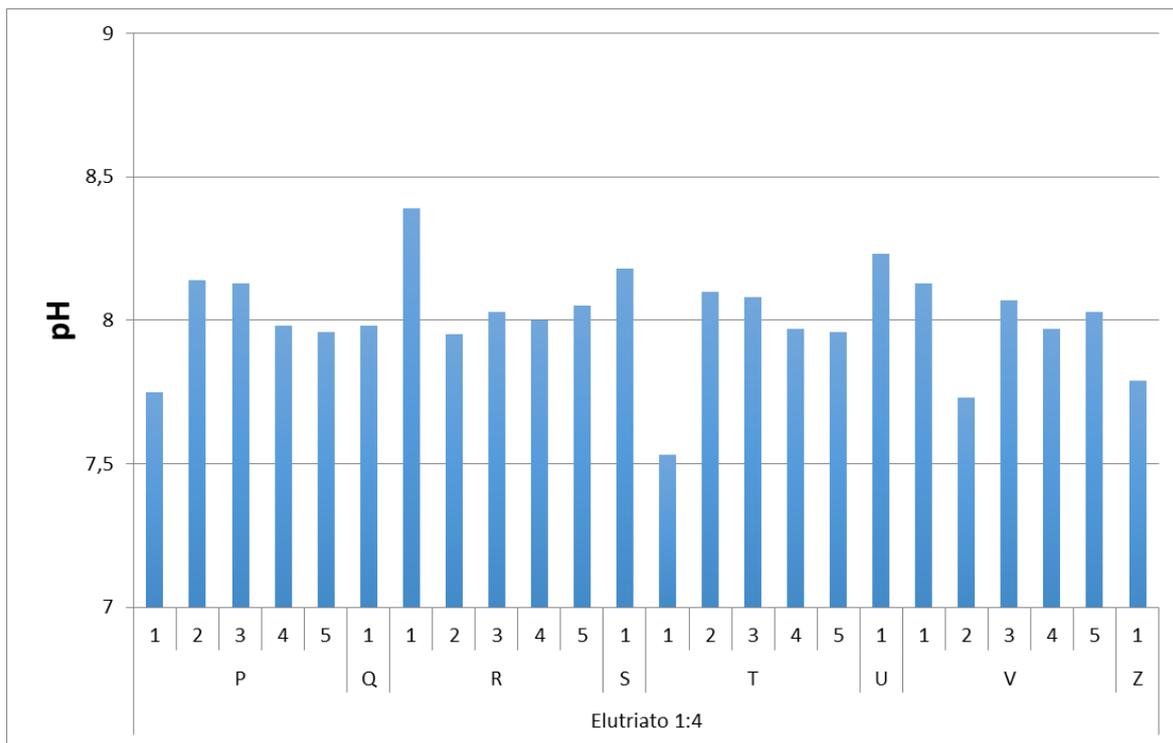
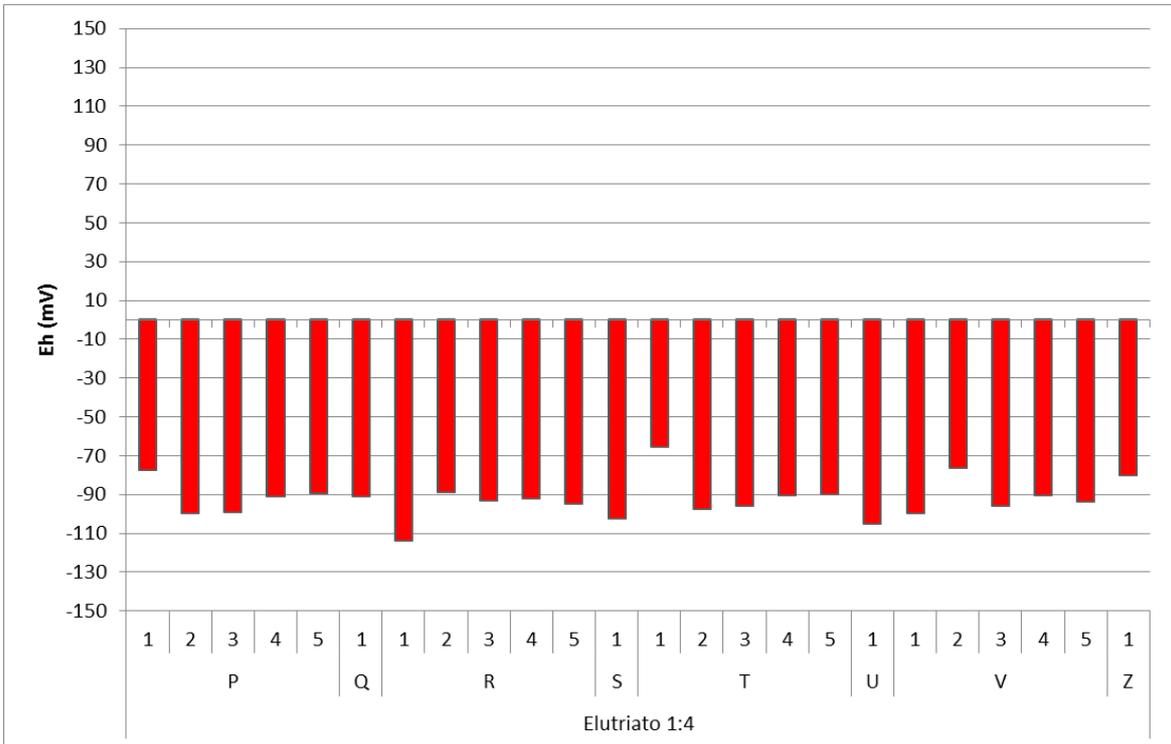
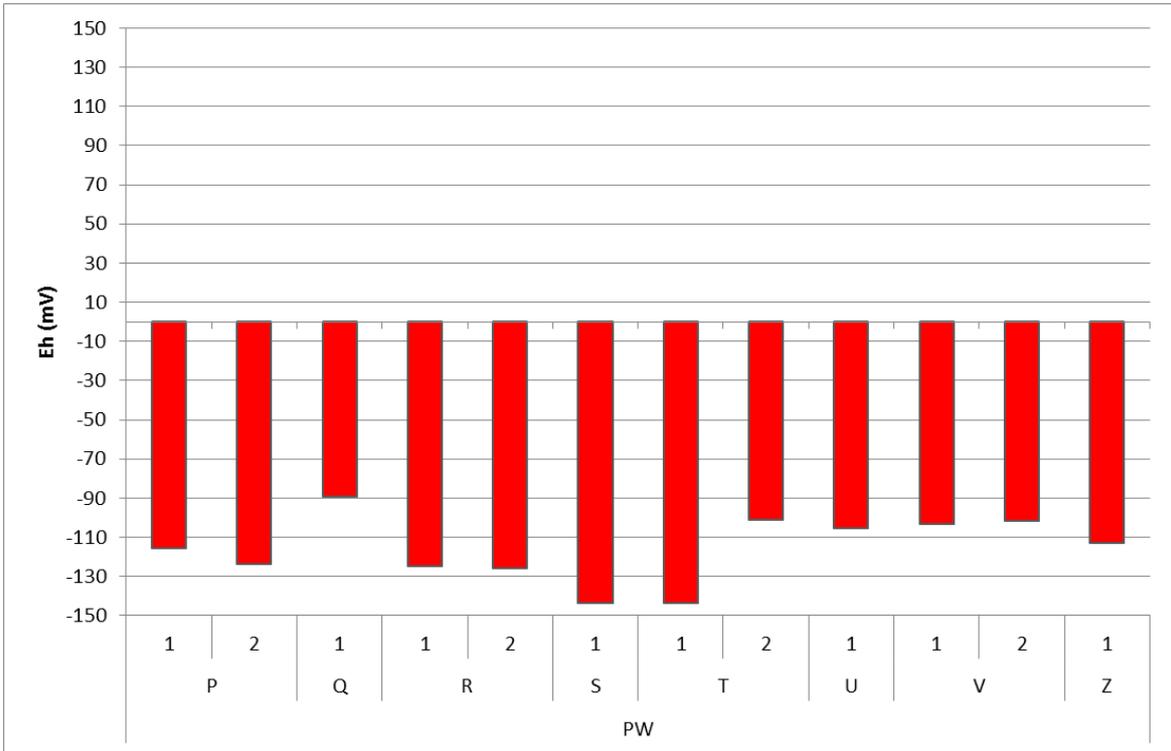


Figura 16 - Istogrammi riassuntivi per la variabile pH valutata nelle 3 matrici di studio (PW, elutriato 1:4 e elutriato 1:20)



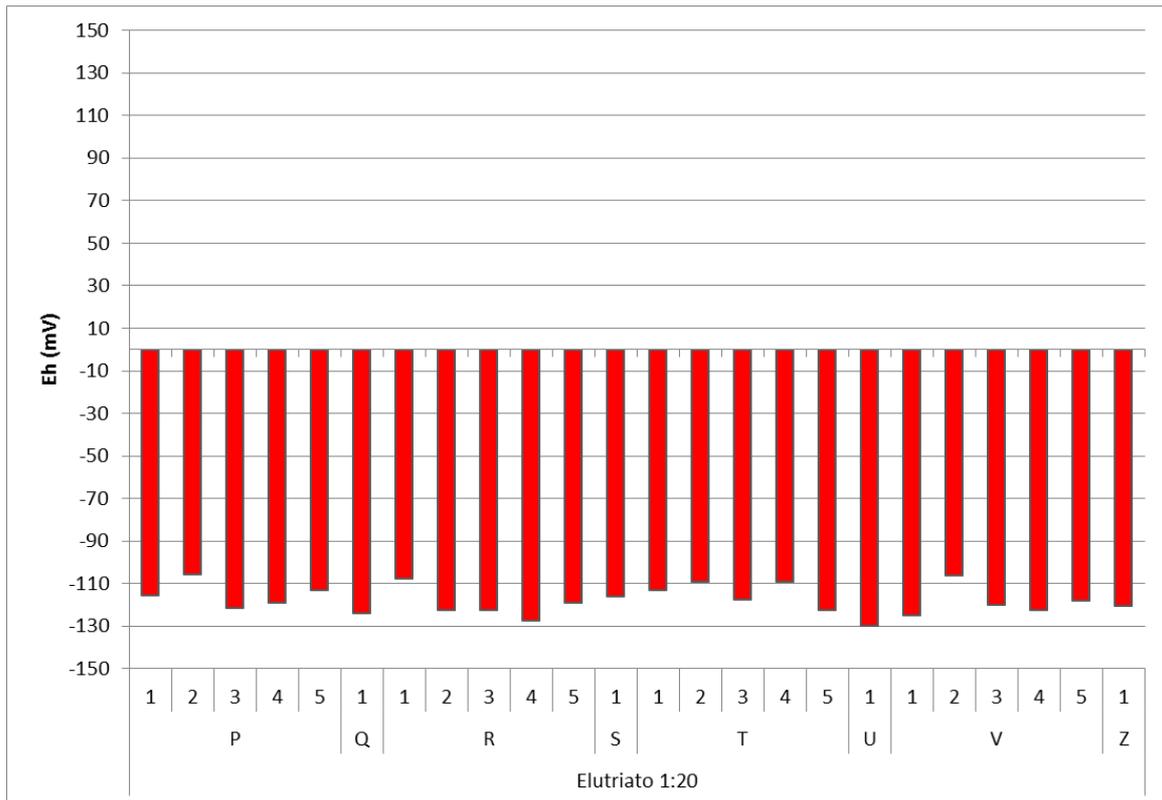
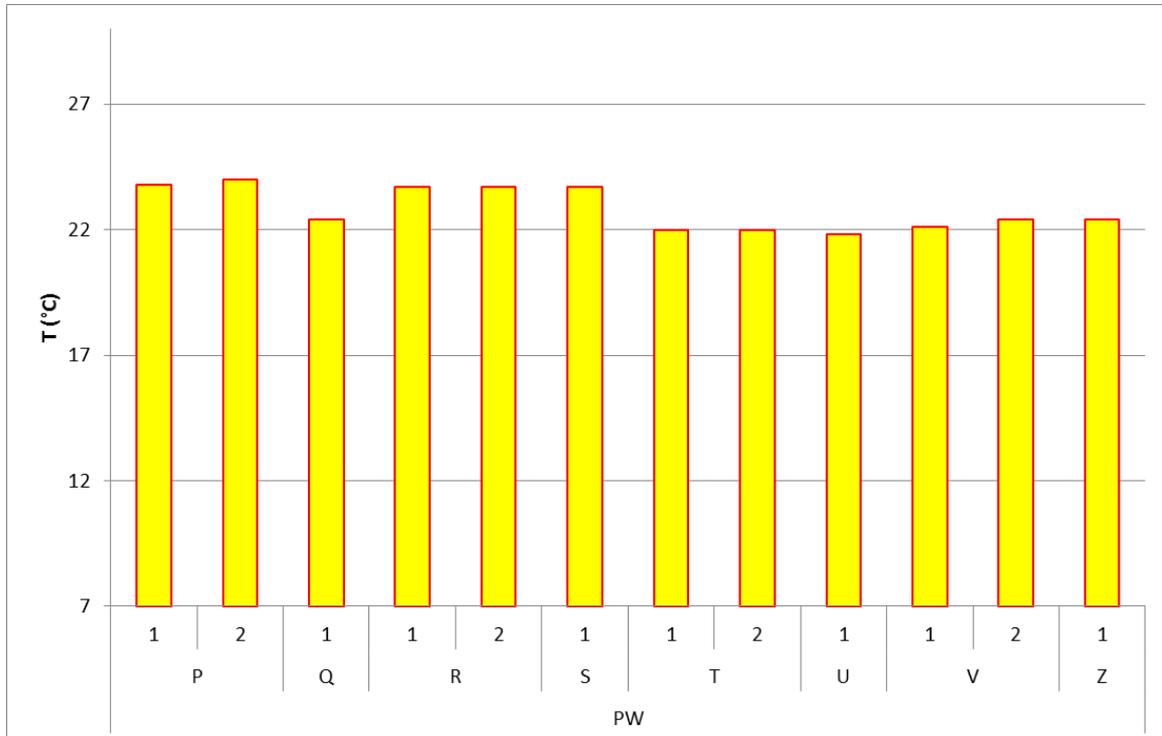


Figura 17 - Istogrammi riassuntivi per la variabile Eh valutata nelle 3 matrici di studio



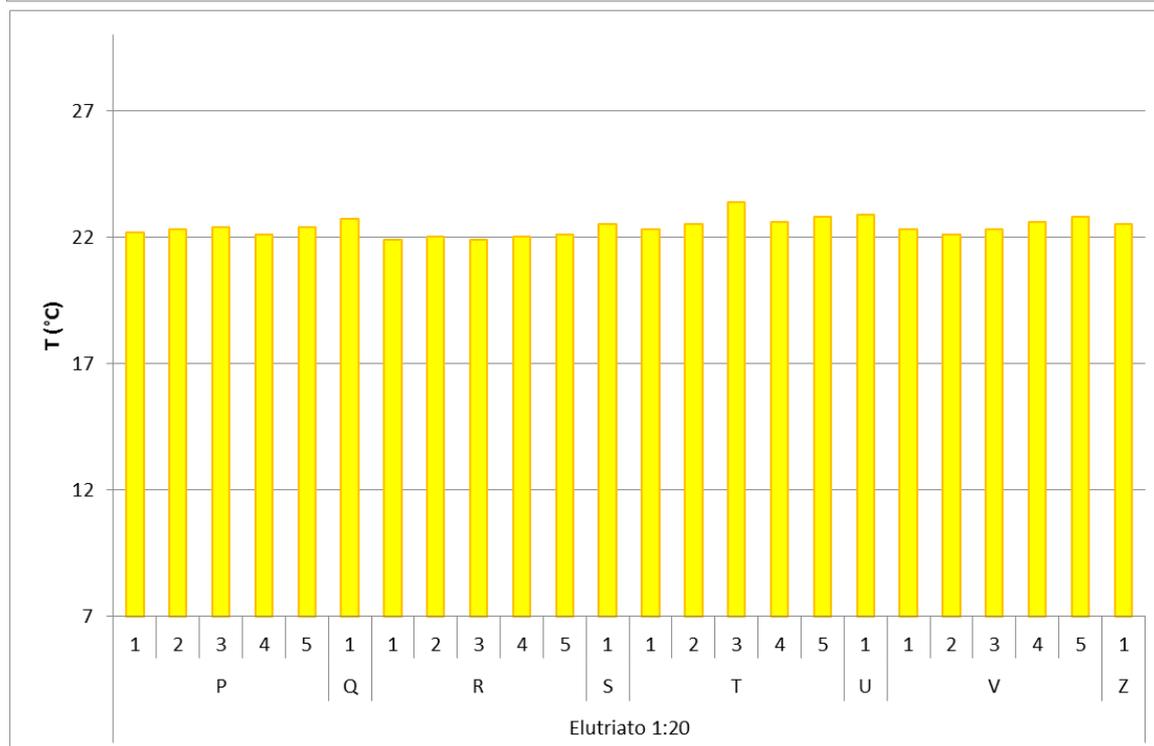
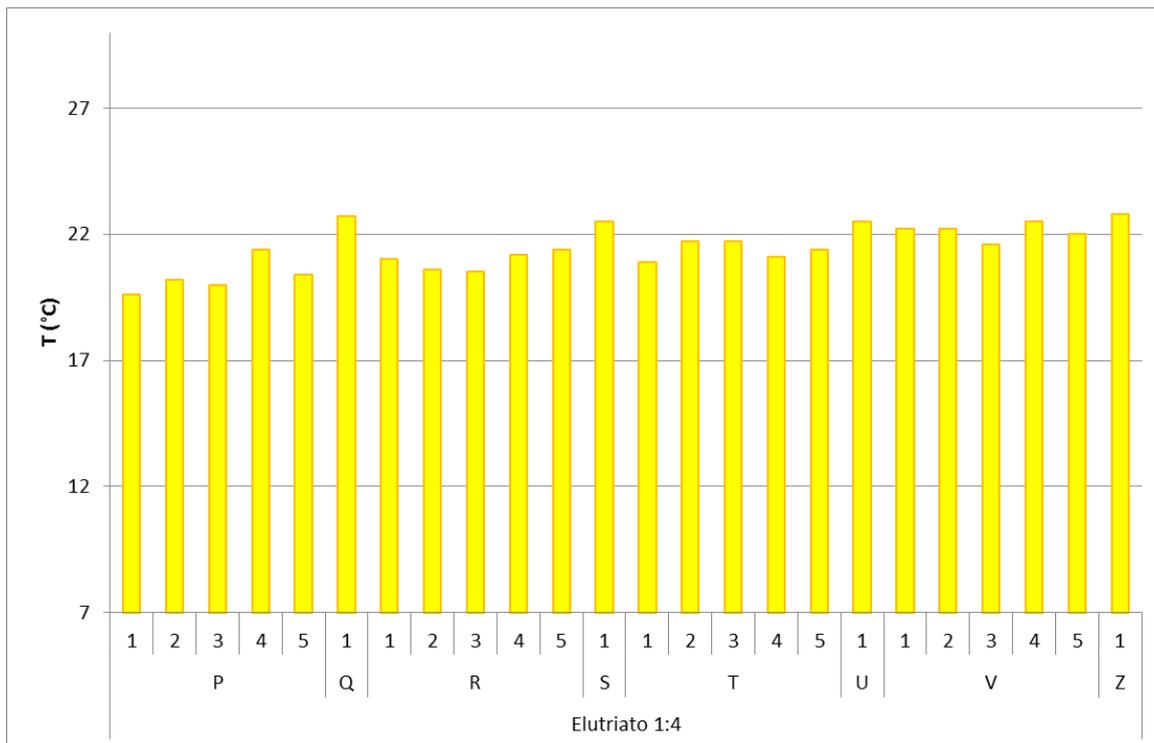
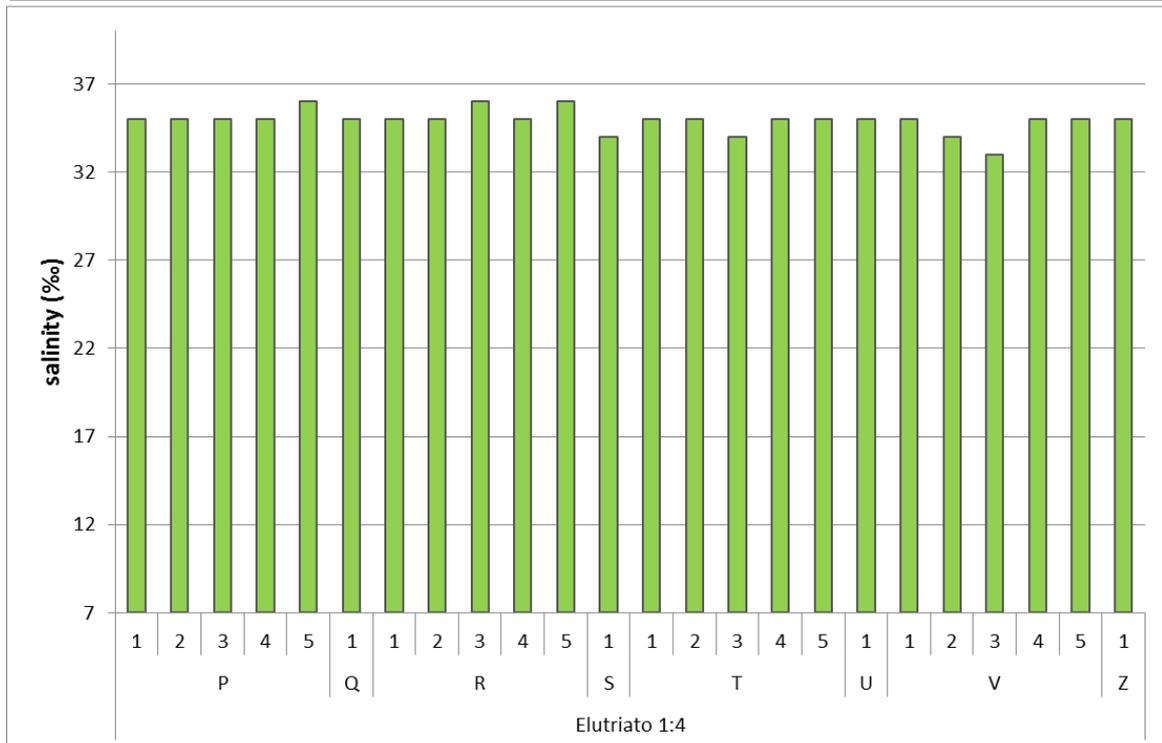
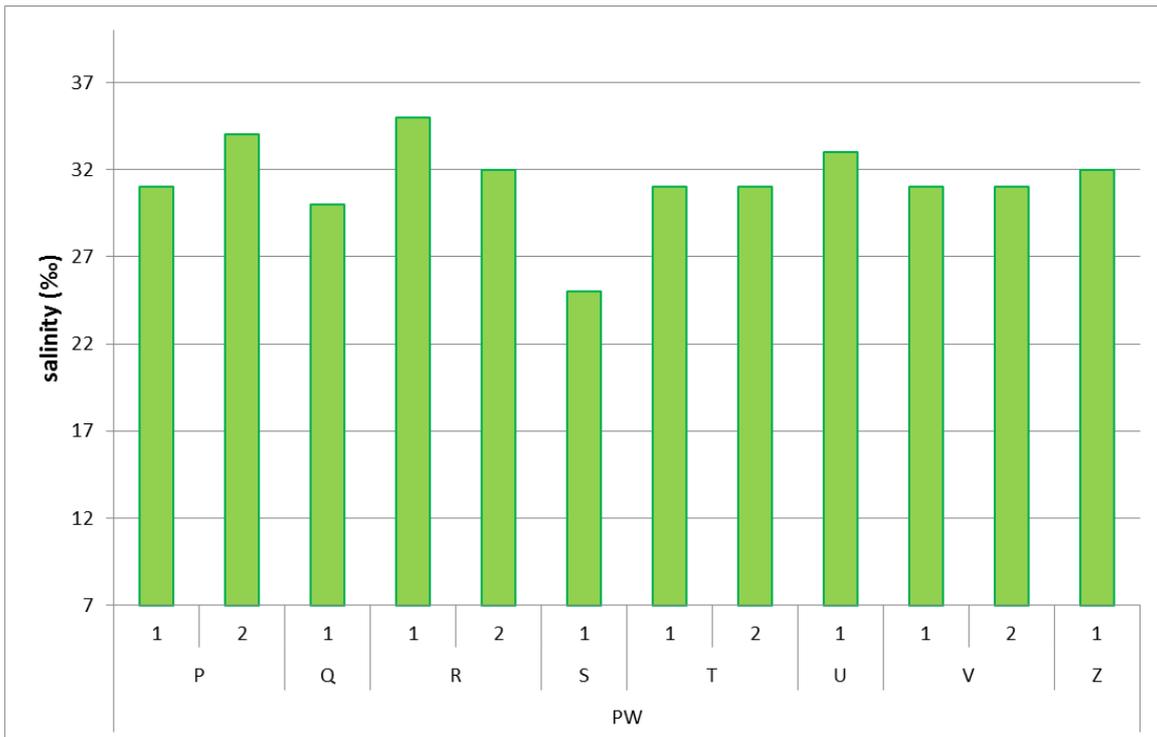
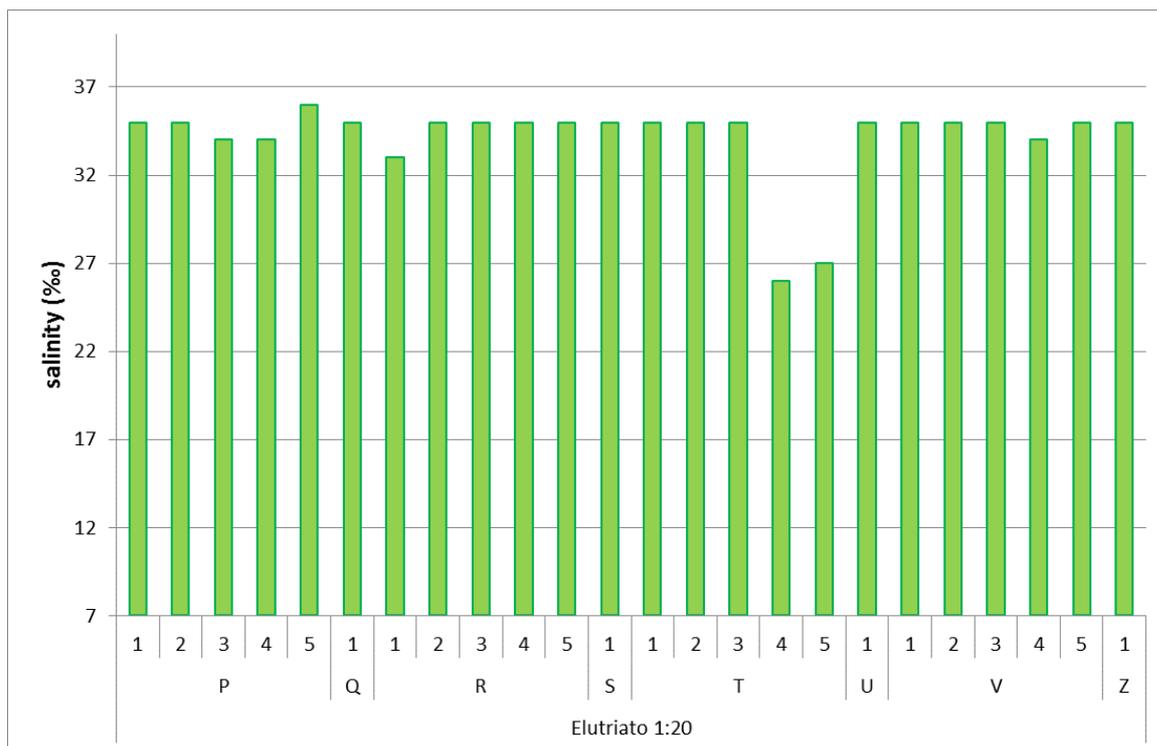


Figura 18 - Istogrammi riassuntivi per la variabile T valutata nelle 3 matrici di studio

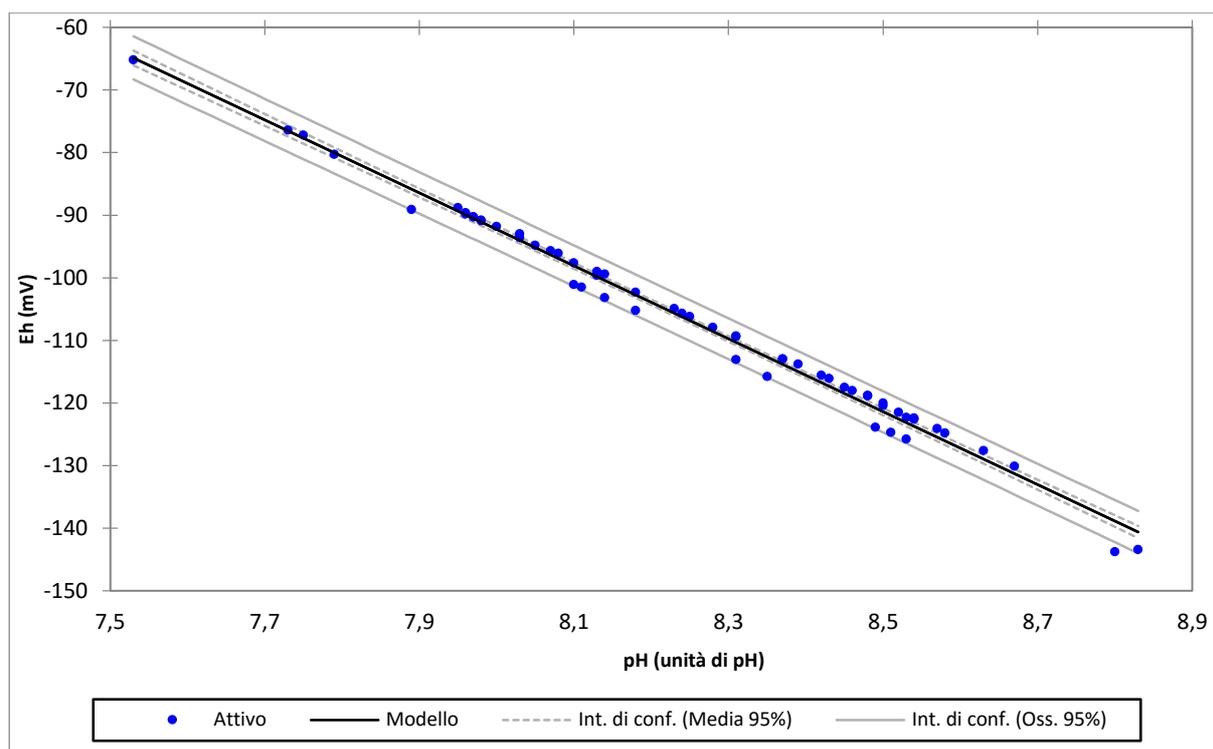




**Figura 19 - Istogrammi riassuntivi per la variabile salinità valutata nelle 3 matrici di studio**

I diagrammi sopra riportati dimostrano come non vi siano differenze significative nei valori delle quattro variabili considerate per le differenti matrici se non per qualche leggera fluttuazione verso valori inferiori alla media, registrate per la salinità nei campioni di acque interstiziali.

Nel grafico a dispersione in Figura 20 vengono messi a confronto i dati di pH ed Eh (n=60), i quali dimostrano come vi sia una diretta corrispondenza (negativa) tra queste due variabili, giustificata anche da un valore del coefficiente di correlazione vicino ad 1 (Tab. 10).



**Figura 20 - Grafico a dispersione contenente i valori di pH ed Eh misurati sui campioni delle tre matrici liquid (PW, elutriato 1:4 e 1:20)**

**Tabella 10 – statistiche descrittive sul modello di regressione lineare tra pH ed Eh**

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Dev. std.
Eh	60	-143,800	-65,200	-107,158	16,270
pH	60	7,530	8,830	8,256	0,278

Parametri del modello:

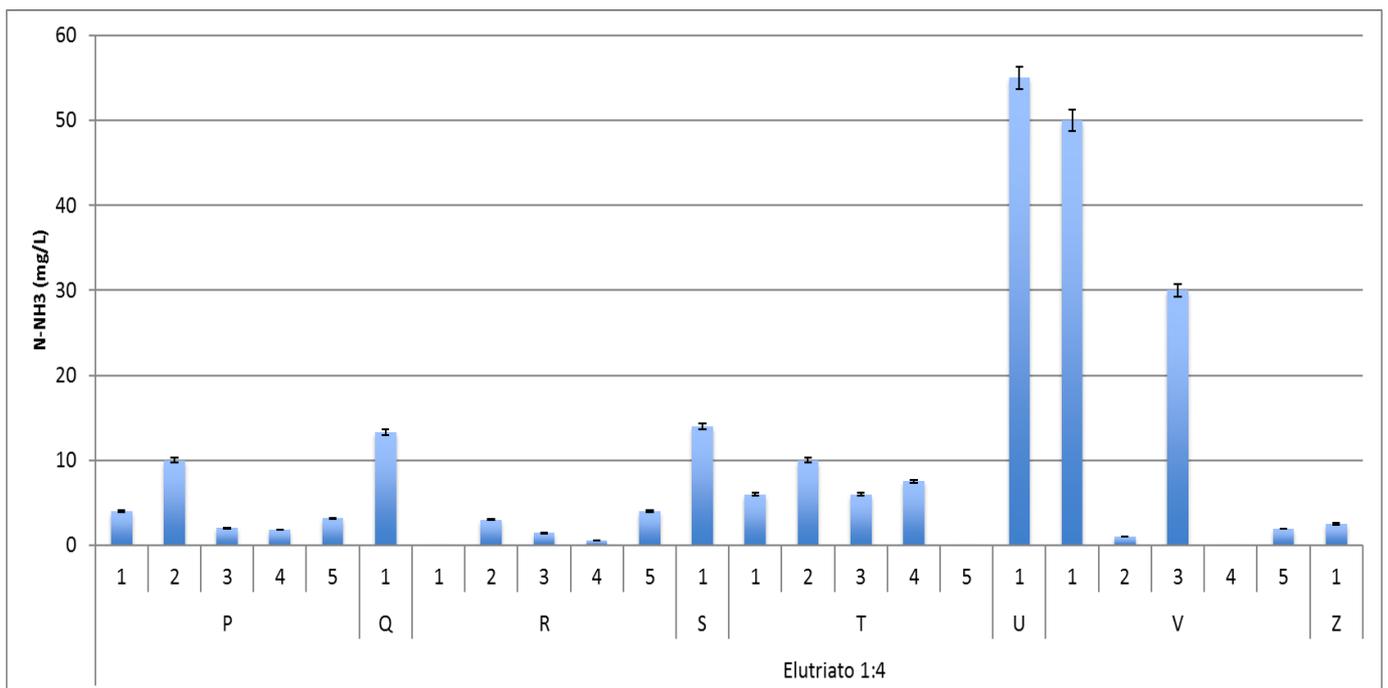
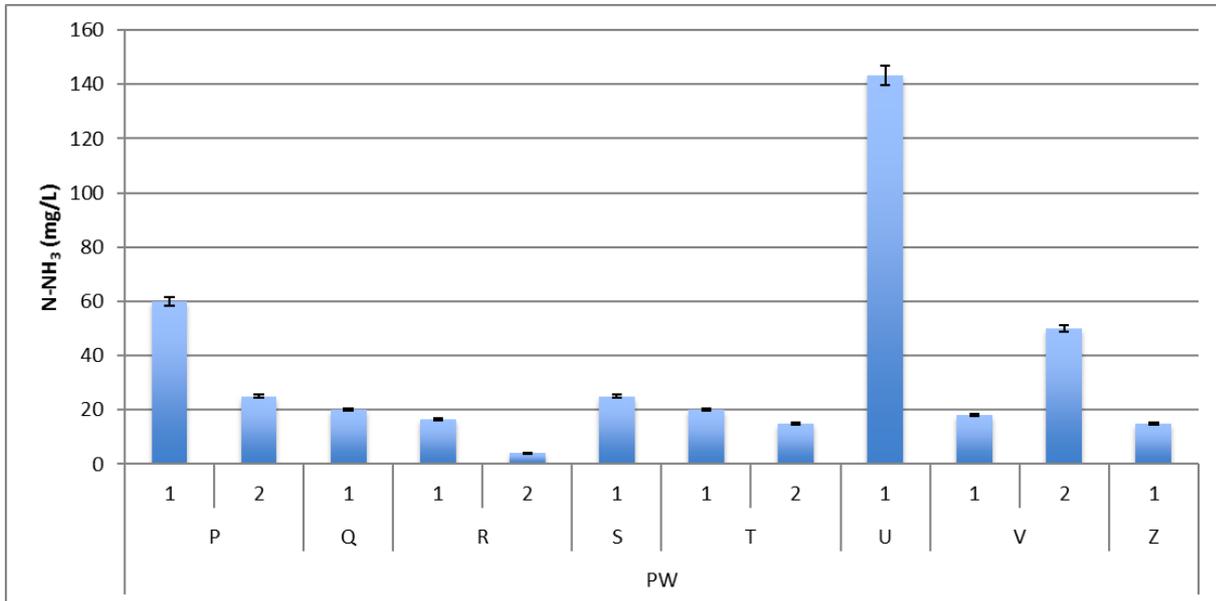
Fonte	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	R <sup>2</sup>
Intercetta	374,051	6,268	59,677	< 0,0001	361,504	386,598	0,990
pH	-58,288	0,759	-76,816	< 0,0001	-59,807	-56,769	

Il modello di regressione lineare applicato a questi dati ha restituito una relazione matematica del tipo riportato in Equazione 10.

$$Eh = 374,050 - 58,288 * pH \quad \text{Eq. 10}$$

Per quanto riguarda invece, i dati risultanti dall'analisi spettrofotometrica su ammoniaca e solfuri, questi sono riportati in dettaglio nell'Allegato 2 della tesi. I risultati sono stati proposti sotto forma di istogrammi in cui sono inserite le barre d'errore associate al valore di

deviazione standard per ogni campione. I grafici stessi sono suddivisi per matrice ambientale indagata (PW, ELU 1:4 e ELU 1:20) ed il valore in concentrazione viene espresso in mg/L (Figura 20, 21).



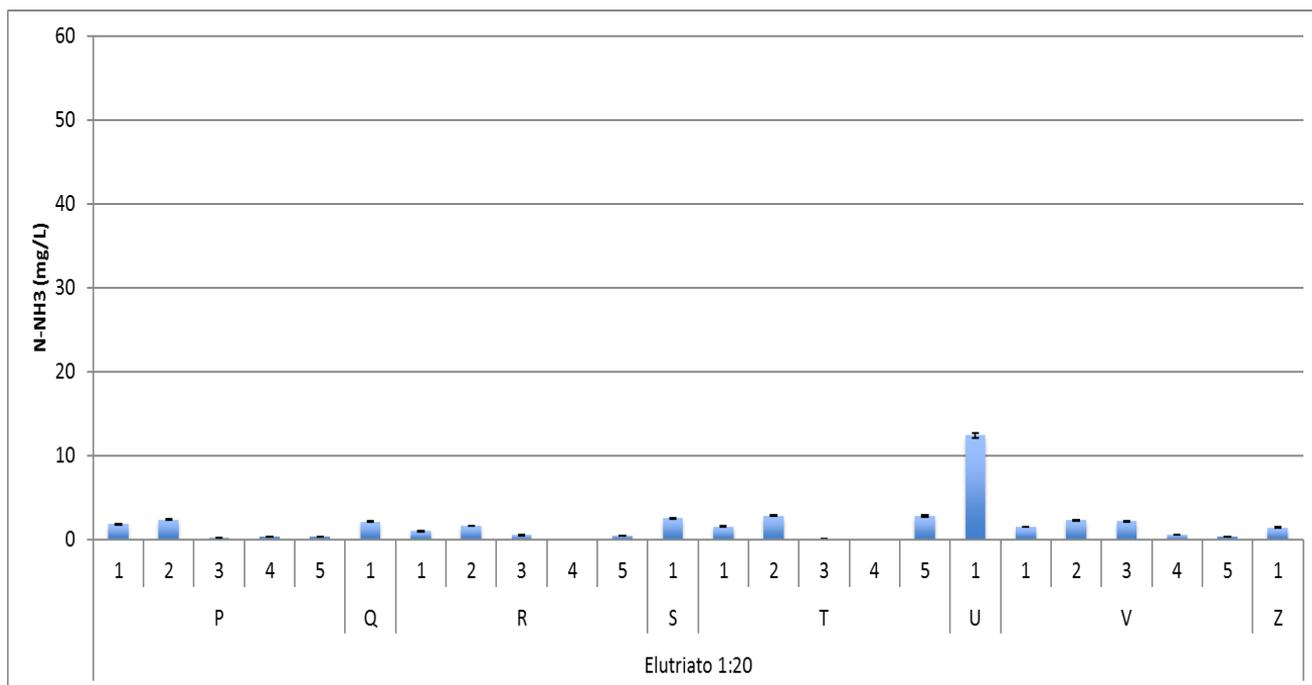
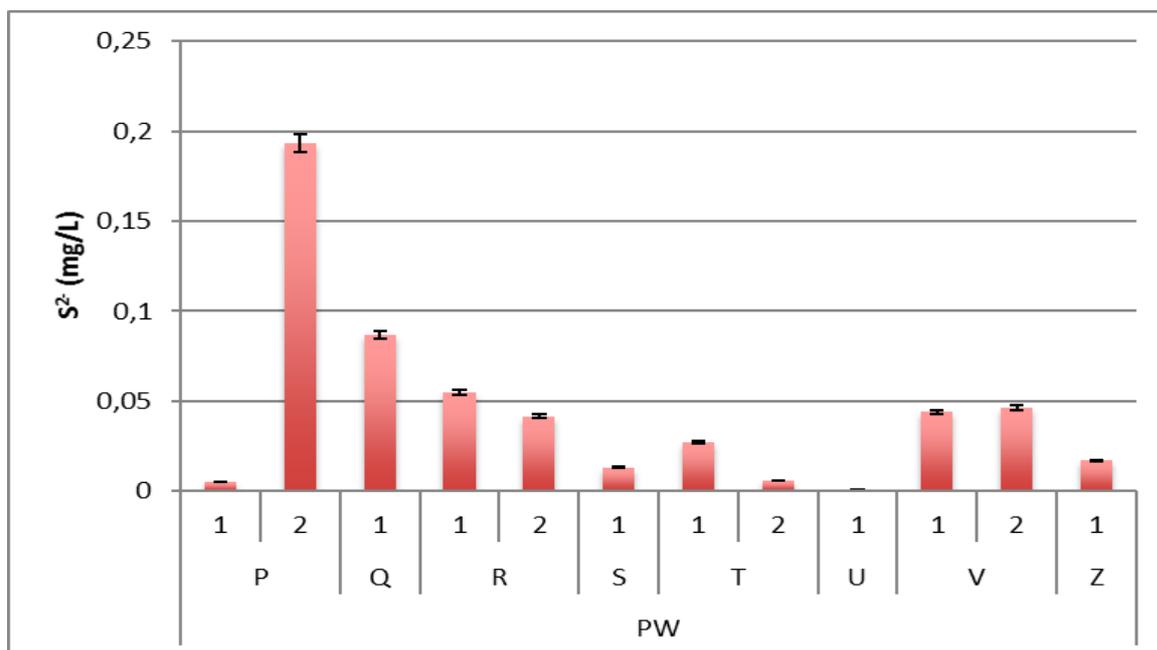


Figura 21 – Istogrammi che riportano i dati in concentrazione (mg/L) di Ammonia suddivisi per matrice di studio; PW = acque interstiziali (Pore Water)



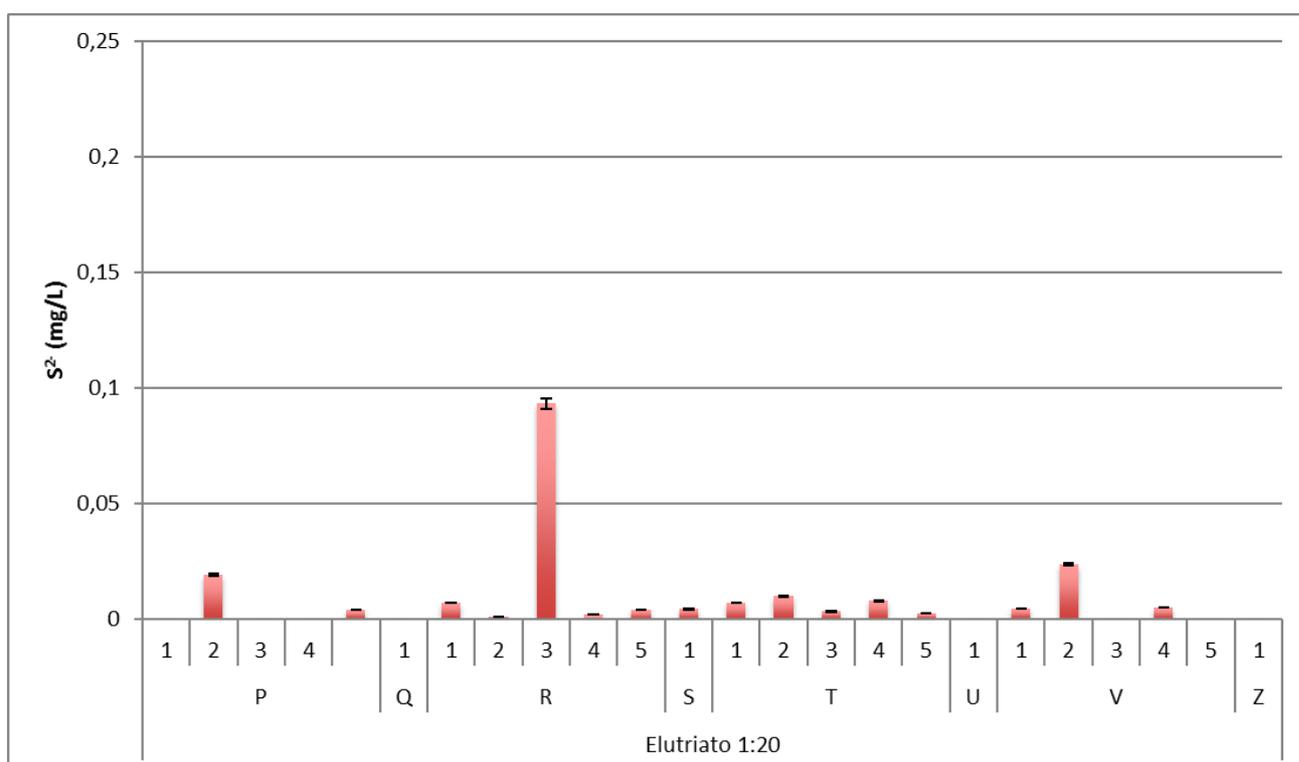
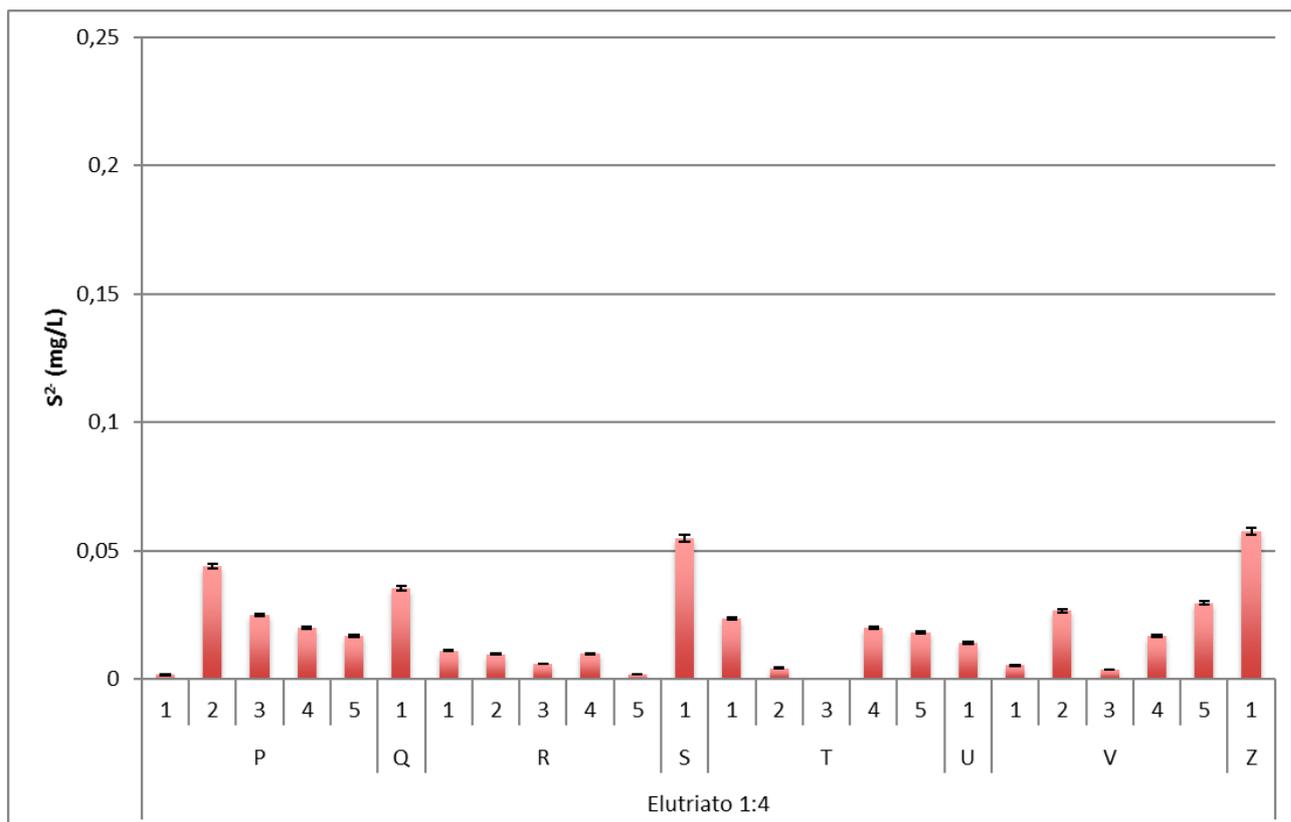


Figura 22 - Istogrammi che riportano i dati in concentrazione (mg/L) di Solfuri suddivisi per matrice di studio (PW = acque interstiziali o Pore Water);

Dai grafici per l'ammoniaca è possibile constatare come la concentrazione del composto in soluzione sia mediamente superiore nella matrice liquida acqua interstiziale (media dei valori

riscontrati per questa matrice pari a 34,32 mg/L) rispetto agli elutriati (9,76 mg/L per i campioni di elutriato 1:4, 1,69 mg/L per i campioni in rapporto 1:20), a conferma di quanto già presente in letteratura (Losso C. et al., 2007; Losso C. et al., 2009). Quest'aspetto è riscontrabile anche nei grafici dei solfuri, con la media dei valori nelle acque dei pori che sia attestata in 0,045 mg/L contro il valore di 0,019 per gli elutriati 1:4 e lo 0,008 degli elutriati 1:20. I valori massimi di ammoniaca sono stati registrati nelle carote di sedimento più superficiale, fatta eccezione per il campione V. Il dato in concentrazione più importante è stato letto nel campione PW U1, con un valore di N-NH<sub>3</sub> pari a 143,33 mg/L. Per i solfuri le concentrazioni maggiori sono state registrate nel campione PW P2 con un valore di 0,19 mg/L.

## 3.2 Valutazione ecotossicologica

### 3.2.1 Risultati del test con *P. tricornutum*

Le soglie di accettabilità, riportate dal protocollo in vigore, sono state verificate di volta in volta per ogni test eseguito:

- il tasso di crescita giornaliero ( $\mu$ /day) calcolato sul controllo negativo, dev'essere di valore minimo pari a 0,9 d<sup>-1</sup>. Questa soglia è stata rispettata per tutti e 3 i test effettuati;
- per il controllo positivo con bicromato di potassio, le soglie di IC<sub>50</sub> dei singoli esperimenti sono calcolate facendo la regressione lineare sui risultati di PE (All.3,4 e 5). Questi dati sono stati inseriti nella carta di controllo del Gruppo di Ricerca del laboratorio di Ecotossicologia (Fig. 22), la quale raccoglie l'informazione complessiva di tutti i test di controllo eseguiti nell'ambito del laboratorio nel corso degli anni, al fine di attestare la riproducibilità del saggio. I valori derivanti dai test effettuati sono rappresentati in Figura 22 con il colore giallo.

La media complessiva dei valori di IC<sub>50</sub> rispetto al K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> è risultata pari a 20,05 mg/L, con un coefficiente di variazione ( $[SD / media] \cdot 100$ ) CV = 29,98%, per n = 23. I limiti di validità inferiore e superiore (EC<sub>50</sub> medio  $\pm$  2\*SD) sono, rispettivamente, pari a 8,02 e 32,07 mg/L. In merito, il protocollo standard riporta un valore di IC<sub>50</sub> pari a 20,1 mg/L (n=10; CV=26%). Ciò dimostra come i valori prodotti nel laboratorio presso cui è stato svolto il presente lavoro di tesi siano perfettamente congrui ed accettabili e, di conseguenza, si è così accertato che gli organismi della specie *P. tricornutum* utilizzati

nei vari test eseguiti durante questo lavoro hanno espresso una buona sensibilità nella risposta.

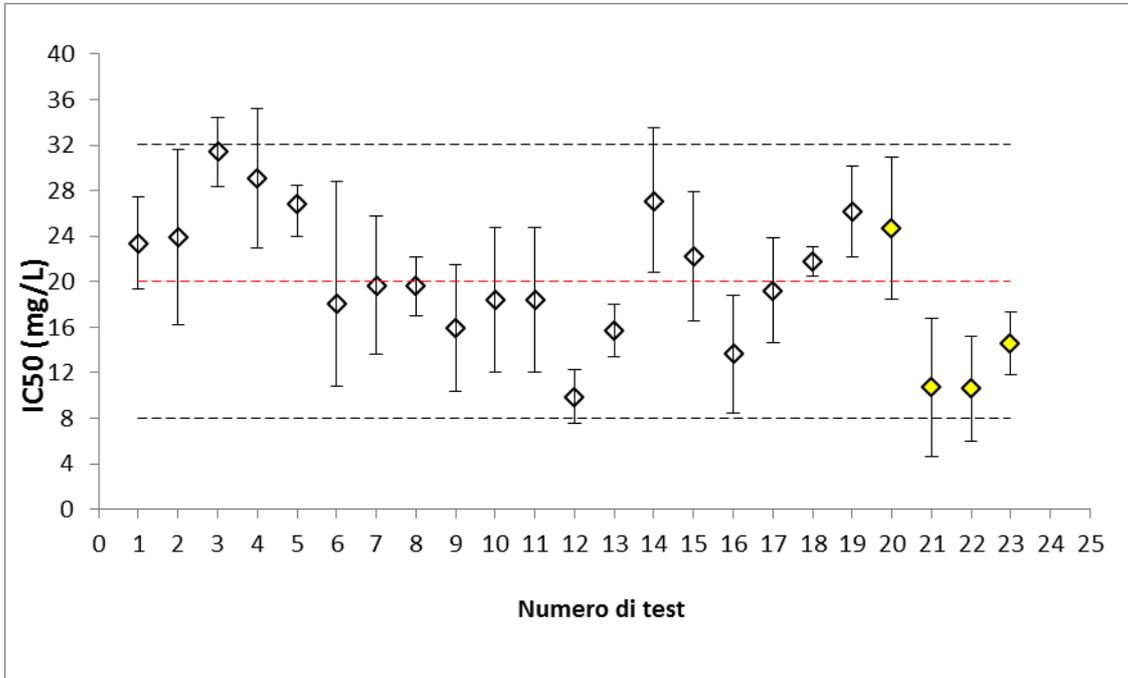


Figura 23 - Carta di controllo per il bicromato di potassio (tossico di riferimento) del Gruppo di Ricerca del laboratorio di Ecotossicologia (2006-2015). In giallo i dati prodotti nell'ambito del presente lavoro

I risultati del saggio di tossicità con *P. tricornutum* sono espressi mediante i valori delle TU o BU e rappresentati tramite grafici a barre in Figura 23 e 24.

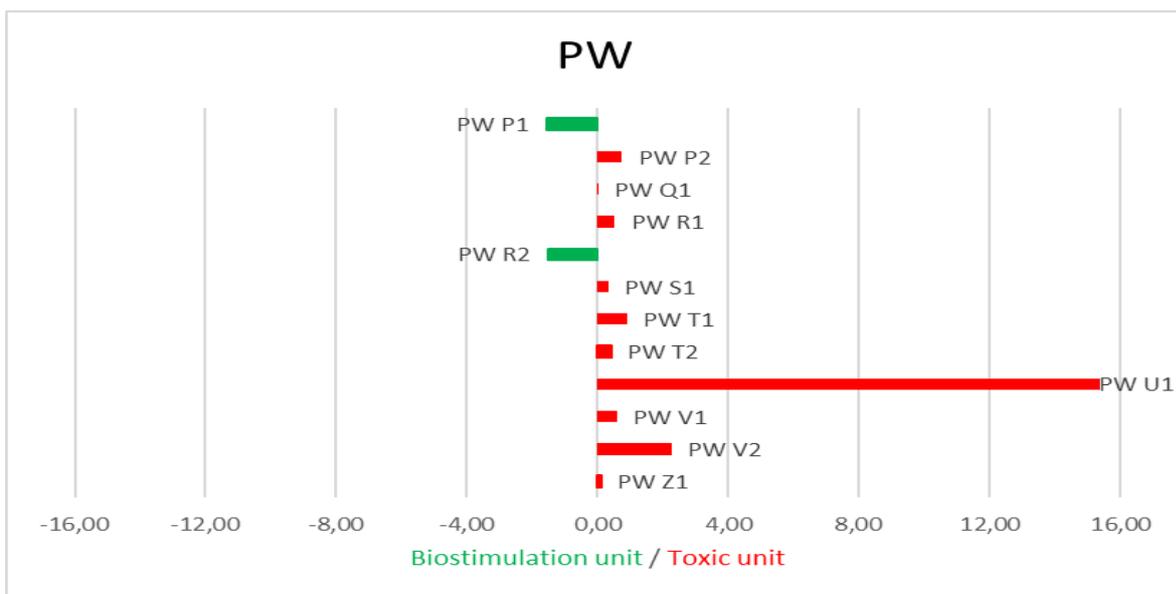


Figura 24 - Grafico a barre che mostra i risultati del test di tossicità per le acque interstiziali

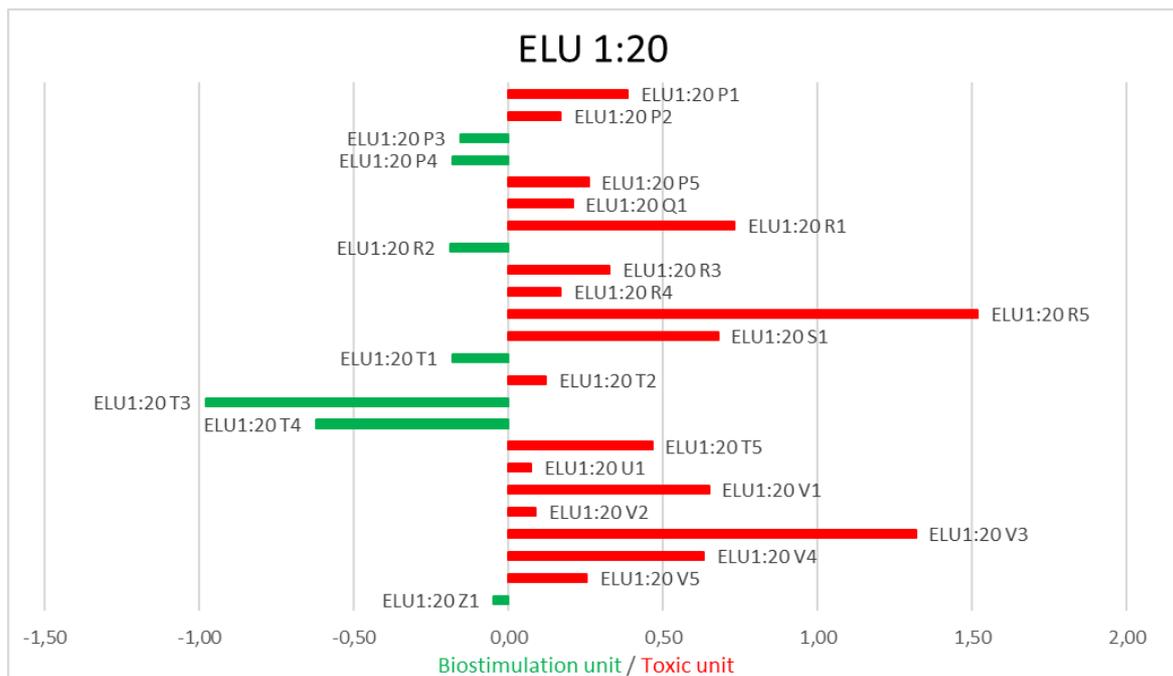
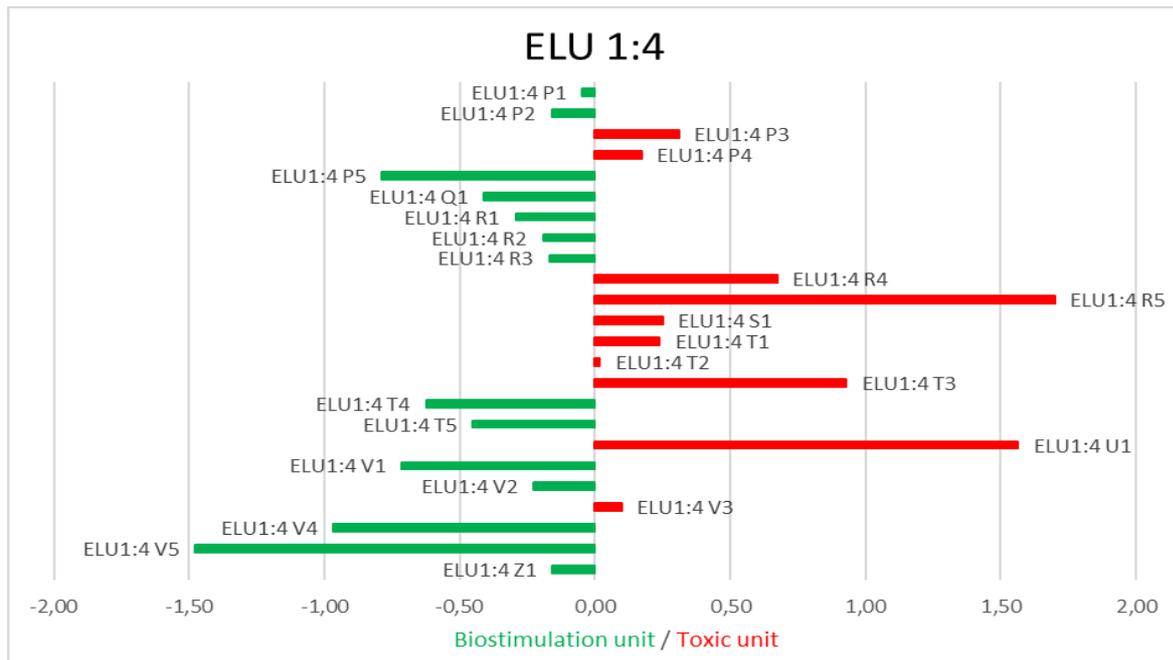


Figura 25 - Grafico a barre che mostra i risultati del test di tossicità per gli elutriati nei rapporti 1:4 e 1:20

Dalle evidenze dei grafici possiamo dire che, in generale, per i 24 campioni di Elutriato 1:4 è prevalente l'effetto di stimolazione (58,3 % dei campioni) e questo può essere una conseguenza del fatto che, a questo rapporto di diluizione, non tutte le sostanze presenti nel sedimento riescono effettivamente a passare in soluzione acquosa ma allo stesso tempo sono

trasferite quelle più solubili tra cui i nutrienti capaci di fornire sostentamento alla specie microalgale. Infatti, passando ad una maggior diluizione del campione (Elutriato 1:20), l'effetto inibitorio diventa prevalente rispetto a quello di stimolazione (75% dei campioni in inibizione), avvalorando la precedente affermazione. Nelle acque interstiziali infine, prevale certamente l'effetto d'inibizione per 10 campioni su 12. Di questi, nei due campioni maggiormente tossici è stato calcolato il valore di IC<sub>50</sub> utilizzando il modello di regressione lineare (riportato in All. 6). I valori di concentrazione ottenuti sono stati i seguenti: 43,94 % per il campione PW V2 e 6,50 % per il PW U1.

Di seguito, i risultati dell'applicazione dei due sistemi di classificazione per l'interpretazione dei dati di tossicità:

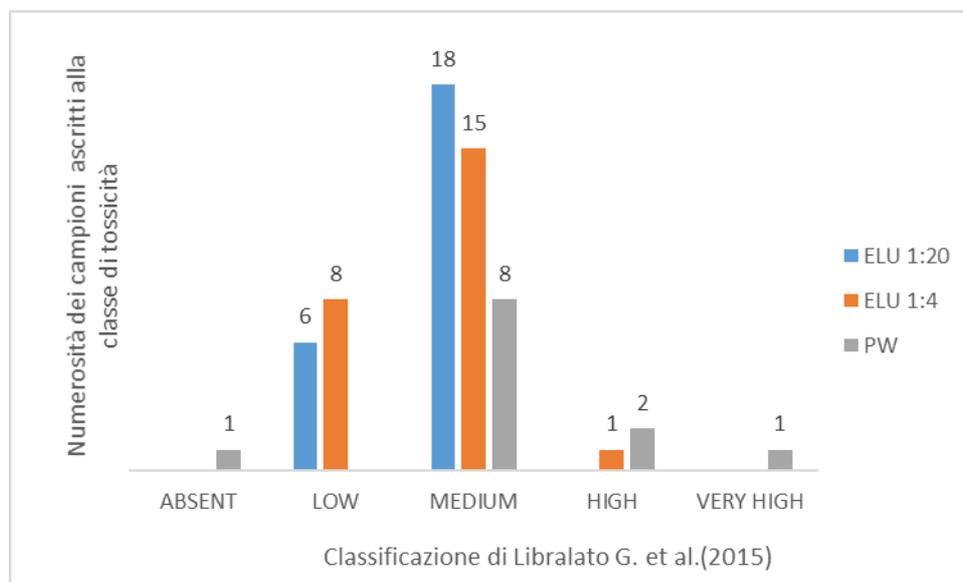
1. I risultati derivanti dall'applicazione della classificazione secondo la scala di tossicità di Libralato G. et al. (2015) sono riportati in Tabella 8 in ordine crescente di effetto.

**Tabella 11 - Classificazione dei campioni in base all'applicazione della scala di tossicità di Libralato G. et al. (2015)**

Campioni	TU	Campioni	BU
PW Q1	0,003	ELU1:4 P1	-0,047
ELU1:4 T2	0,018	ELU1:20 Z1	-0,047
ELU1:20 U1	0,071	ELU1:4 Z1	-0,156
ELU1:20 V2	0,088	ELU1:20 P3	-0,157
ELU1:4 V3	0,098	ELU1:4 P2	-0,160
PW Z1	0,107	ELU1:4 R3	-0,169
ELU1:20 T2	0,121	ELU1:20 T1	-0,181
ELU1:20 R4	0,167	ELU1:20 P4	-0,183
ELU1:20 P2	0,168	ELU1:20 R2	-0,190
ELU1:4 P4	0,174	ELU1:4 R2	-0,193
ELU1:20 Q1	0,207	ELU1:4 V2	-0,227
ELU1:4 T1	0,237	ELU1:4 R1	-0,291
ELU1:4 S1	0,250	ELU1:4 Q1	-0,414
ELU1:20 V5	0,254	ELU1:4 T5	-0,453
ELU1:20 P5	0,258	ELU1:20 T4	-0,624
ELU1:4 P3	0,309	ELU1:4 T4	-0,625
ELU1:20 R3	0,325	ELU1:4 V1	-0,717
PW S1	0,332	ELU1:4 P5	-0,787
ELU1:20 P1	0,385	ELU1:4 V4	-0,966
PW T2	0,418	ELU1:20 T3	-0,979
ELU1:20 T5	0,464	ELU1:4 V5	-1,480
PW R1	0,499	PW R2	-1,482
PW V1	0,615	PW P1	-1,541
ELU1:20 V4	0,632		
ELU1:20 V1	0,648		

ELU1:4 R4	0,675
ELU1:20 S1	0,679
ELU1:20 R1	0,729
PW P2	0,747
PW T1	0,914
ELU1:4 T3	0,927
ELU1:20 V3	1,318
ELU1:20 R5	1,517
ELU1:4 U1	1,564
ELU1:4 R5	1,700
PW V2	2,276
PW U1	15,392

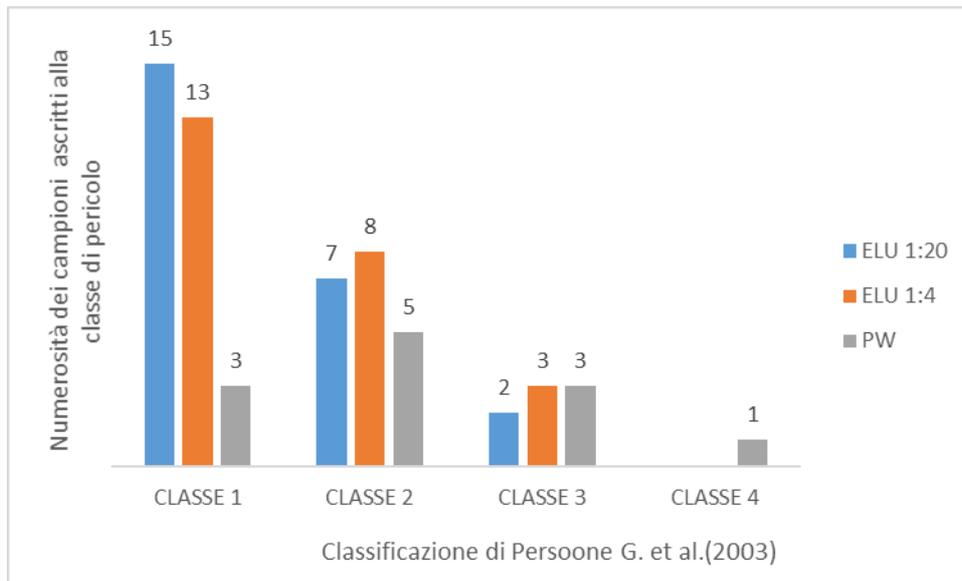
I risultati evidenziano come la maggior parte dei campioni si attestò all'interno della classe "medium" seppur tutte le 5 classi di tossicità siano state utilizzate per questi 60 campioni a dimostrazione di una certa variabilità nella risposta e quindi di una buona capacità discriminativa da parte del modello biologico utilizzato.



**Figura 26 – Istogramma che riassume i risultati della classificazione di Libralato G. et al.(2015)**

- Inoltre, i campioni sono stati classificati secondo lo schema di Persoone G. et al. (2003). I risultati sono riportati in Allegato 7 e rappresentati in Figura 27 mediante un istogramma che riporta la numerosità dei campioni ascritti alla rispettiva classe e suddivisi per matrice di campione. I campioni in biostimolazione sono stati considerati,

alla pari dei campioni in inibizione, come tossici ed il rispettivo valore di BU è stato preso in modulo ed ascritto alla rispettiva classe di pericolo.



**Figura 27 - istogramma che riassume i risultati della classificazione di Persoone G. et al.(2003)**

Dal grafico sopra stante (Fig. 27), si può desumere che i campioni di acque interstiziali (PW) confermano una maggior tossicità rispetto alle altre due matrici con il 25% di questi, ascritti alla classe 3 di pericolo (“tossicità acuta”), il 41,7 % appartenente alla classe 2 (“debole tossicità acuta”) e solo il 25% dei campioni risulta far parte della classe 1 (“assenza di tossicità acuta”). Il campione PW U1 è ascritto alla Classe 4 corrispondente ad “alta tossicità acuta”. Diversamente, i dati di tossicità per la matrice elutriato si concentrano maggiormente nella classe 1, con il 62,5% nel caso dei campioni 1:20 ed il 54,2% dei campioni 1:4. I rimanenti, li troviamo comunque in classe 2, e solo una minor parte del totale in classe 3.

I dati appena discussi sono stati interpretati sulla base di due differenti metodi di classificazione con l’obiettivo di discriminare i livelli di tossicità trovati. Gli approcci hanno valenza differente per l’interpretazione dei risultati del test e di seguito andremo a spiegare il motivo: la classificazione di Persoone G. et al. (2003) infatti, deriva dai risultati di una batteria di test che includevano saggi con 5 differenti specie (tra cui la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*) applicati per la valutazione di diverse matrici tra cui acque di scarico, acque fluviali, acque di miniera, ecc... .

Diversamente, la scala di Libralato G.et al. (2015) è stata creata a partire dai risultati ottenuti dal saggio di tossicità con *P. tricornutum*, applicato per la valutazione di campioni di acque di scarico raccolte in Laguna di Venezia e zone limitrofe. L’applicazione di entrambi i metodi

introduce inevitabilmente un'approssimazione nell'ambito di questo lavoro poiché derivate a partire da matrici di studio differenti. Tuttavia, la classificazione secondo Libralato G. et al. (2015) è stata sviluppata proprio sul target biologico utilizzato.

Partendo da questa premessa, i dati interpretati secondo l'approccio del 2015 si attestano perlopiù su classi di tossicità intermedie, assieme a pochi valori estremi. Questo fatto può esser dipeso da un insieme di concause. Di seguito, sono fatte due ipotesi in proposito:

1. Una prima ipotesi è che il test non riesca a discriminare adeguatamente la tossicità se non nel caso di matrici liquide particolarmente impattate e tossiche. Quest'ipotesi è supportata dai risultati della classificazione secondo Libralato G. et al. (2015).
2. La seconda ipotesi riguarda il fatto che le stazioni di campionamento abbiano realmente delle caratteristiche chimico-fisiche ed un grado di contaminazione simile. Quest'ipotesi è sostanzialmente supportata dalle analisi chimiche che confermano valori di ammoniaca e solfuri perlopiù omogenei, fatta eccezione per alcuni campioni hot spot. Questo, tra l'altro, considerando che i campionamenti sono stati eseguiti in una zona abbastanza circostanziata e caratterizzata da una tessitura del substrato sedimentario simile stando ai dati presenti nel Piano di Gestione della Laguna (Autorità di bacino - Reg. Veneto, 2010) da cui possiamo ipotizzare che la contaminazione si distribuisca abbastanza omogeneamente nel tempo nell'area antistante la zona industriale di Porto-Marghera. Ulteriori indagini, per esempio sulla sostanza organica presente nelle stazioni di campionamento, potrebbero essere utili per supportare quanto detto.

I dati di tossicità presentati in Tabella 12, sono il riassunto dei risultati della classificazione con i due approcci scientifici, uniti all'approccio normativo imposto dalla DM 260/2010, che sancisce in  $TU/BU \leq 0,6$  (valore in modulo), il limite tra un campione tossico ed uno non tossico per test di tossicità cronici o a lungo termine.

**Tabella 12 – schema riassuntivo dei risultati ottenuti dall'applicazione dei diversi sistemi di classificazione**

<b>Campione</b>	<b>Persoone G. et al.(2003)</b>	<b>Libralato G. et al.(2015)</b>	<b>DM 260/2010</b>
PW P1	3	High	Tossico
PW P2	2	Medium	Tossico
PW Q1	1	Absent	Non tossico
PW R1	2	Medium	Non tossico
PW R2	3	High	Tossico

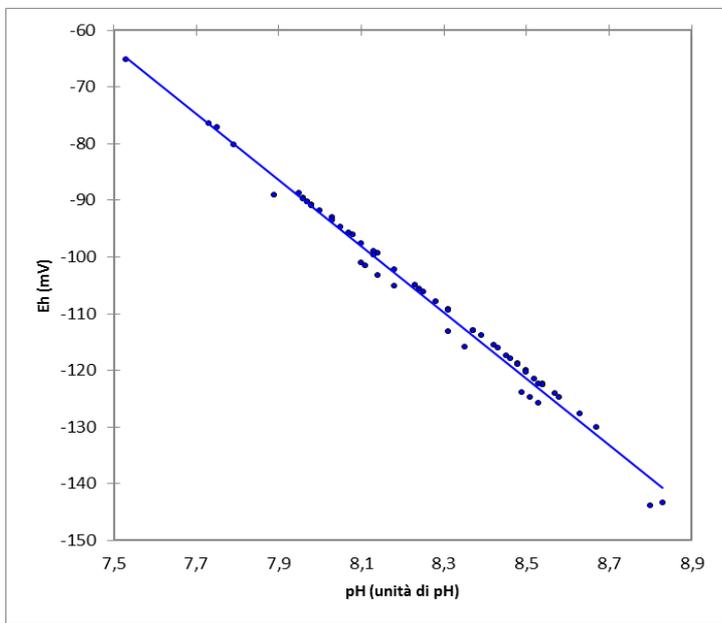
PW S1	1	Medium	Non tossico
PW T1	2	Medium	Tossico
PW T2	2	Medium	Non tossico
PW U1	4	Very High	Tossico
PW V1	2	Medium	Non tossico
PW V2	3	Medium	Tossico
PW Z1	1	Medium	Non tossico
ELU1:4 P1	1	Low	Non tossico
ELU1:4 P2	1	Low	Non tossico
ELU1:4 P3	1	Medium	Non tossico
ELU1:4 P4	1	Medium	Non tossico
ELU1:4 P5	2	Medium	Tossico
ELU1:4 Q1	2	Medium	Non tossico
ELU1:4 R1	1	Low	Non tossico
ELU1:4 R2	1	Low	Non tossico
ELU1:4 R3	1	Low	Non tossico
ELU1:4 R4	2	Medium	Tossico
ELU1:4 R5	3	Medium	Tossico
ELU1:4 S1	1	Medium	Non tossico
ELU1:4 T1	1	Medium	Non tossico
ELU1:4 T2	1	Low	Non tossico
ELU1:4 T3	2	Medium	Tossico
ELU1:4 T4	2	Medium	Non tossico
ELU1:4 T5	2	Medium	Non tossico
ELU1:4 U1	3	Medium	Tossico
ELU1:4 V1	2	Medium	Tossico
ELU1:4 V2	1	Low	Non tossico
ELU1:4 V3	1	Medium	Non tossico
ELU1:4 V4	2	Medium	Tossico
ELU1:4 V5	3	High	Tossico
ELU1:4 Z1	1	Low	Non tossico
ELU1:20 P1	1	Medium	Non tossico
ELU1:20 P2	1	Medium	Non tossico
ELU1:20 P3	1	Low	Non tossico
ELU1:20 P4	1	Low	Non tossico
ELU1:20 P5	1	Medium	Non tossico
ELU1:20 Q1	1	Medium	Non tossico
ELU1:20 R1	2	Medium	Tossico
ELU1:20 R2	1	Low	Non tossico
ELU1:20 R3	1	Medium	Non tossico
ELU1:20 R4	1	Medium	Non tossico
ELU1:20 R5	3	Medium	Tossico
ELU1:20 S1	2	Medium	Tossico
ELU1:20 T1	1	Low	Non tossico
ELU1:20 T2	1	Medium	Non tossico

ELU1:20 T3	2	Medium	Tossico
ELU1:20 T4	2	Medium	Non tossico
ELU1:20 T5	2	Medium	Non tossico
ELU1:20 U1	1	Low	Non tossico
ELU1:20 V1	2	Medium	Non tossico
ELU1:20 V2	1	Medium	Non tossico
ELU1:20 V3	3	Medium	Tossico
ELU1:20 V4	2	Medium	Non tossico
ELU1:20 V5	1	Medium	Non tossico
ELU1:20 Z1	1	Low	Non tossico

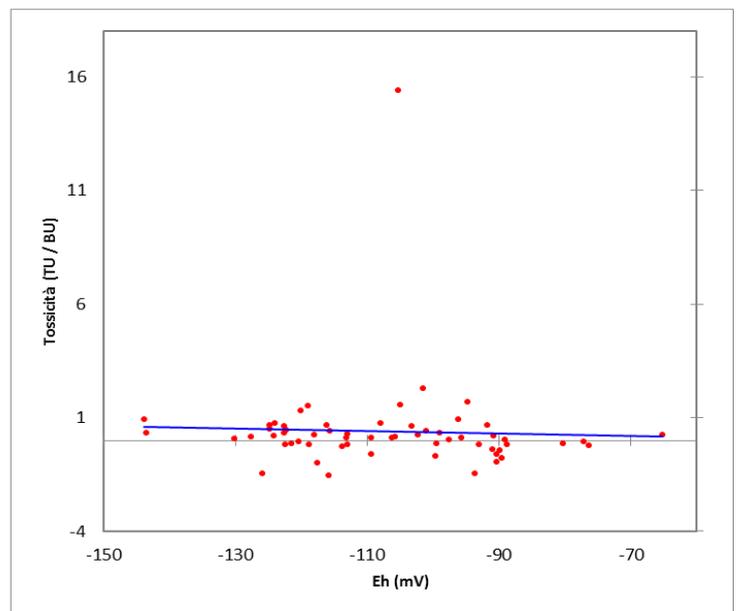
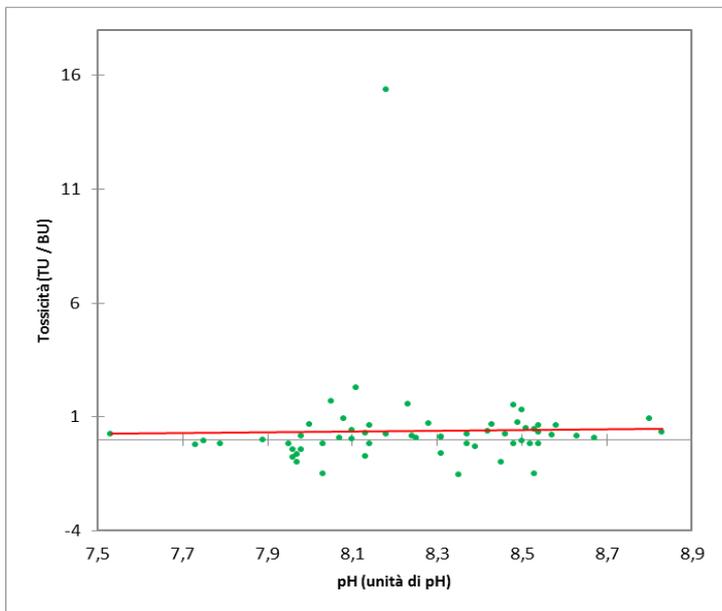
### 3.2.2 pH, Eh e tossicità

I successivi grafici derivano dal confronto dei risultati per le due variabili pH e potenziale redox (Eh) con quelli ecotossicologici:

- in Figura 28, sono state messe a confronto le due variabili pH ed Eh con i dati di tossicità (TU e BU) in una serie di grafici a dispersione (disposti secondo una matrice quadratica) che riassumono i dati provenienti dall'intero pool di campioni (n=60).



	pH	Eh	Toxicity
pH	-	Eh/Toxicity	Toxicity/pH
Eh	pH/Eh	-	Toxicity/Eh
Toxicity	pH/Toxicity	Eh/Toxicity	-



**Figura 28 – diagrammi a dispersione per confrontare i risultati di pH, Eh e tossicità**

Il grafico tra pH ed Eh, già commentato in precedenza, mostra una diretta correlazione tra queste due variabili.

Proseguendo verso il basso, sono confrontate le variabili pH e tossicità, ottenendo l’equazione della retta riportata sotto (Eq. 11).

$$\text{Tossicità} = 0,167 * \text{pH} - 0,989 \quad (R^2 = 0,0005) \quad \text{Eq. 11}$$

In equazione 11, il coefficiente angolare assume valore vicino a 0, da cui avremo una relazione che assume la forma di  $y = C$  (costante), il che sottolinea come non vi sia

correlazione lineare tra queste due variabili, come rimarcato anche dal valore assunto da  $R^2$ .

Analogamente, dal confronto tra potenziale redox (Eh) e dati di tossicità (grafico in basso a dx) abbiamo ottenuto l'equazione 12, con le medesime conclusioni ( $y = C$ ).

$$\text{Tossicità} = - 0,005 * \text{Eh} - 0,190 \quad (R^2 = 0,0017) \quad \text{Eq. 12}$$

- In Figura 29 e 30, invece, sono stati creati dei grafici a dispersione per le singole stazioni di campionamento (P, R, T, V), considerando in queste i risultati delle analisi sulle carote di sedimento prelevate a differenti profondità (es. P1, P2, P3, P4 e P5) per evidenziare l'esistenza o meno di trend di sviluppo verticale per le variabili considerate nell'ambito dei test con la matrice elutriato (questo discorso decade nel caso delle acque interstiziali in quanto, per ragioni economiche, i campionamenti hanno interessato solo i primi due metri di profondità).

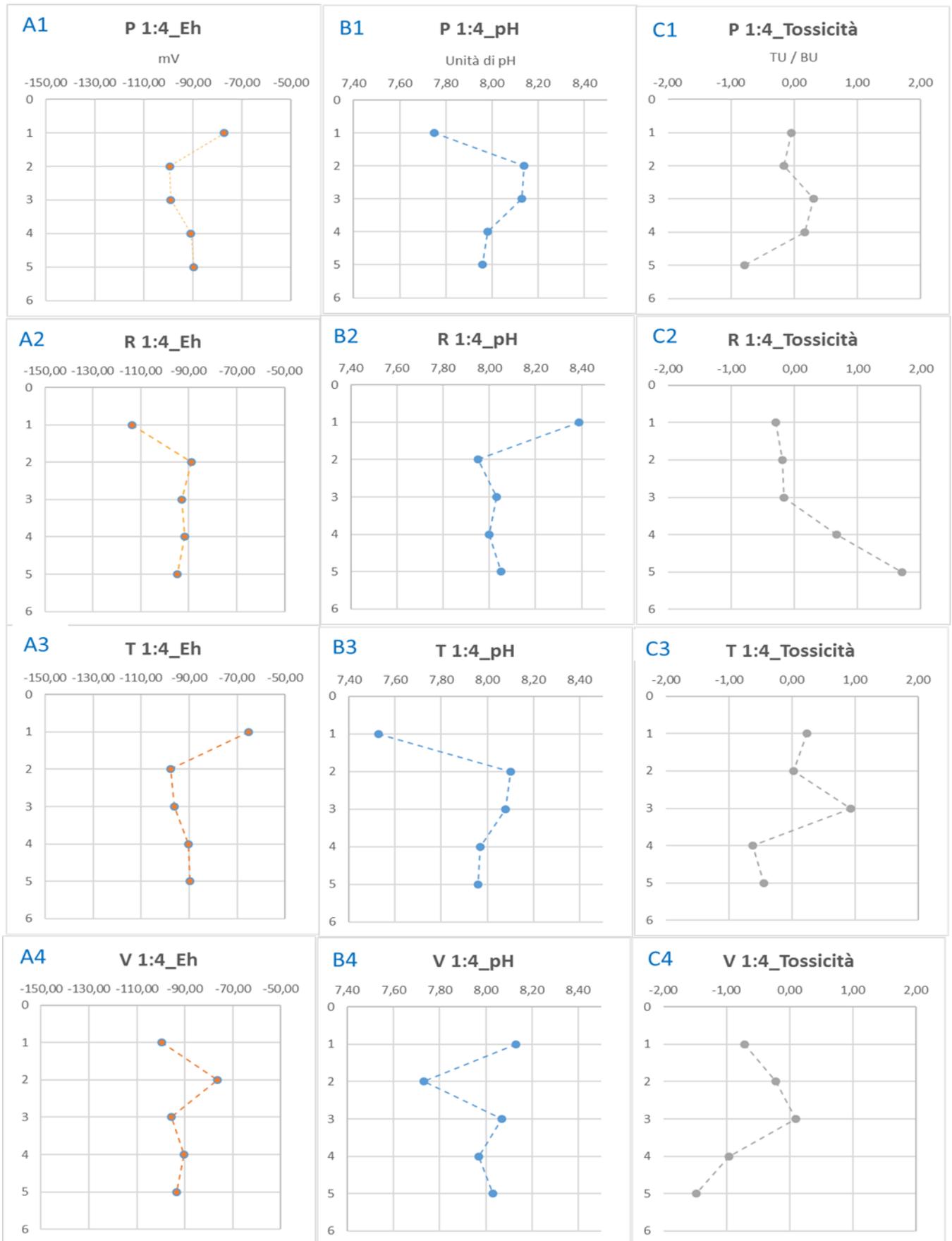


Figura 29 - grafici a dispersione suddivisi per stazioni di campionamento, con i risultati ottenuti dalle analisi sulla matrice liquida elutriato nel rapporto 1:4

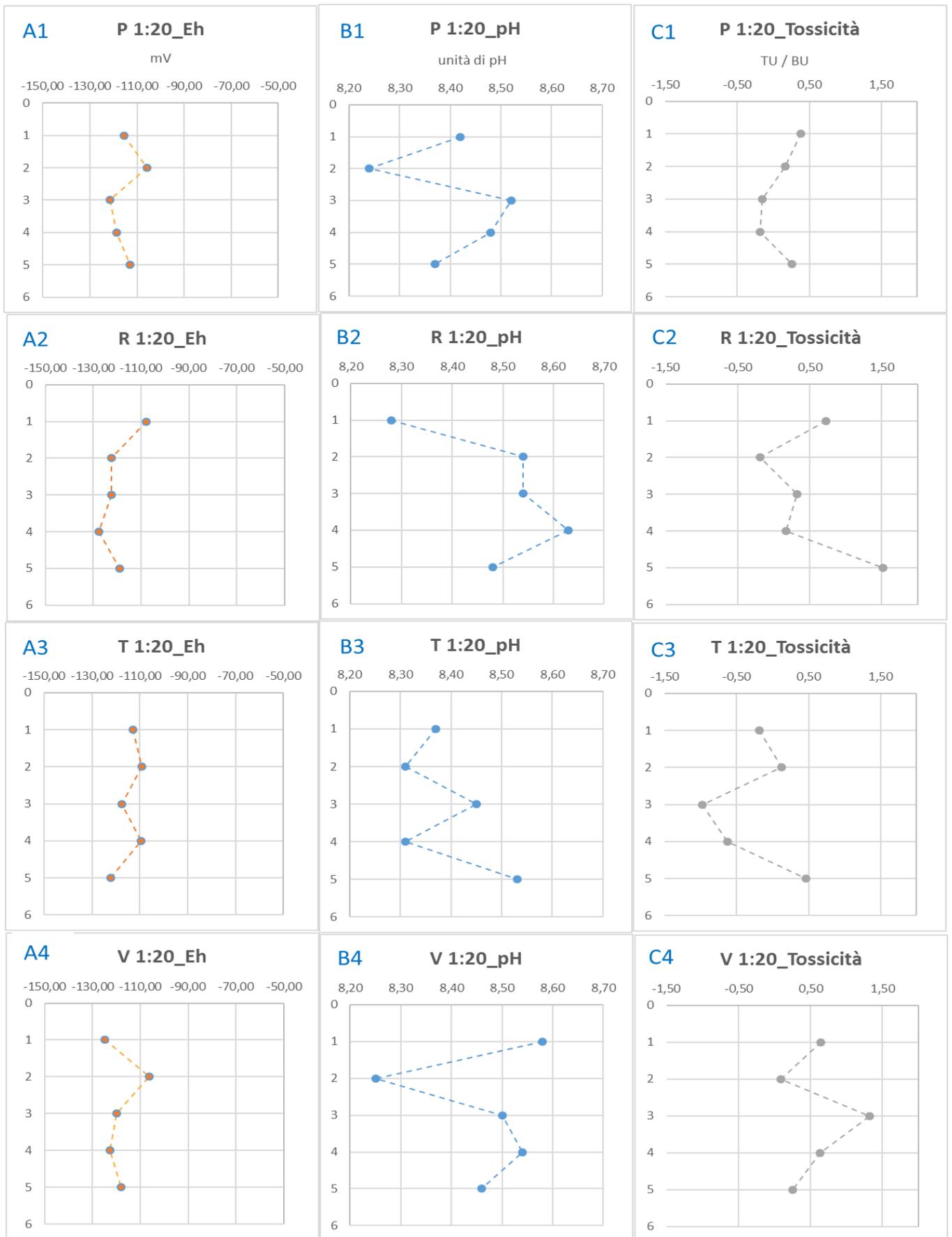


Figura 30 - grafici a dispersione suddivisi per stazioni di campionamento, con i risultati ottenuti dalle analisi sulla matrice liquida elutriato nel rapporto 1:20

Da un'analisi di base dei grafici per gli elutriati 1:4 (Fig. 29), la variabile Eh ha un profilo verticale simile in tutte e quattro le stazioni con divergenze che riguardano perlopiù il primo metro di sedimento, più influenzato dalle dinamiche presenti in colonna d'acqua. Discorso analogo si può fare per il pH, peraltro correlato con il potenziale redox come dimostrano anche in questi grafici parziali. Nei grafici per la tossicità abbiamo diverse casistiche: il profilo della stazione P (Fig. 29, C1) si presenta piuttosto regolare con un incremento vistoso della variabile solo nel campione più profondo in cui si ha come risultato il fenomeno di biostimolazione, probabilmente imputabile ad una zona inalterata e leggermente arricchita di nutrienti; analogamente, nella stazione R, abbiamo un profilo regolare per i primi metri ma che poi aumenta di tossicità con un effetto inibitorio nei confronti della crescita algale e da cui si può ipotizzare che il sedimento risenta di un inquinamento storico; il profilo verticale della stazione T (Fig. 29, C3) è caratterizzato sostanzialmente da un picco di tossicità (comunque in classe "medium" secondo Libralato G. et al., 2015) nella porzione intermedia della colonna sedimentaria, probabilmente dovuto a contaminazioni storiche; la stazione V è caratterizzata da un'iniziale effetto di stimolazione che decresce fino alle profondità intermedie campionate per poi tornare a crescere fino ad attestarsi ad un valore di tossicità importante nello strato più profondo. Differentemente, per gli elutriati 1:20 (Fig. 30) abbiamo ottenuto dei profili che possiamo così interpretare: i grafici per la variabile Eh conservano sostanzialmente profili piuttosto omogenei, con una meno marcata variazione della variabile anche nei primi metri di profondità, conseguenza presumibilmente dovuta alla maggior diluizione operata sulla matrice; allo stesso modo per il pH. Di seguito, per i profili verticali di tossicità abbiamo: nella stazione P, un profilo di decrescita piuttosto regolare, interrotto solo nello strato più profondo in cui si registra un lieve aumento della variabile; il profilo della stazione R è caratterizzato da uno sviluppo decrescente per i primi metri, che poi resta pressoché costante fino all'ultimo strato campionato dove, è registrato un valore nuovamente crescente della variabile; nella stazione T si individua un profilo piuttosto irregolare in cui avviene un aumento di tossicità dovuta a biostimolazione in corrispondenza dello strato intermedio campionato ed un ultimo strato in cui la variabile torna nuovamente a crescere per il fenomeno d'inibizione; l'ultima stazione di campionamento (V, in Fig. 30, C4) è qui contraddistinta da un profilo decrescente per i primi metri ma che torna a crescere nello strato intermedio con una naturale diminuzione della contaminazione procedendo verso l'ultimo strato campionato. Analizzando le differenze tra i grafici riportati per le due matrici, possiamo constatare come quelle più marcate

riguardino i profili della variabile tossicità e questo è riconducibile al fatto che, un maggior rapporto di diluizione (1:20), in casi in cui la miscela tossica è molto eterogenea, consente il passaggio in soluzione di composti meno solubili che si rendono biodisponibili, con la possibilità di espletare il loro eventuale effetto tossico nei confronti del target biologico. Questo è visibile ad esempio nel caso della stazione P in cui, confrontando i due grafici (Fig. 29, C1 e Fig. 30, C1) si nota un effetto inibitorio medio (Libralato G. et al.,2015) per i primi due metri di profondità nei risultati del test con l'elutriato 1:20 rispetto invece al grafico nel rapporto 1:4, in cui il campione è in bassa stimolazione secondo Libralato G. et al.,2015.

### 3.2.3 Ammoniaca, Solfuri e tossicità

Di seguito, sono confrontati i dati di concentrazione per ammoniaca e solfuri con i risultati del test di tossicità. I dati sono rappresentati in grafici parziali suddivisi per matrice di studio. Nei grafici per l'ammoniaca (Fig. 31,32 e 33) è riportato, indicativamente, il valore di NOEC per le forme ridotte di ammoniaca e ioni ammonio e pari a 57 mg/L. Esso può essere utile per un'ottimale interpretazione dei risultati.

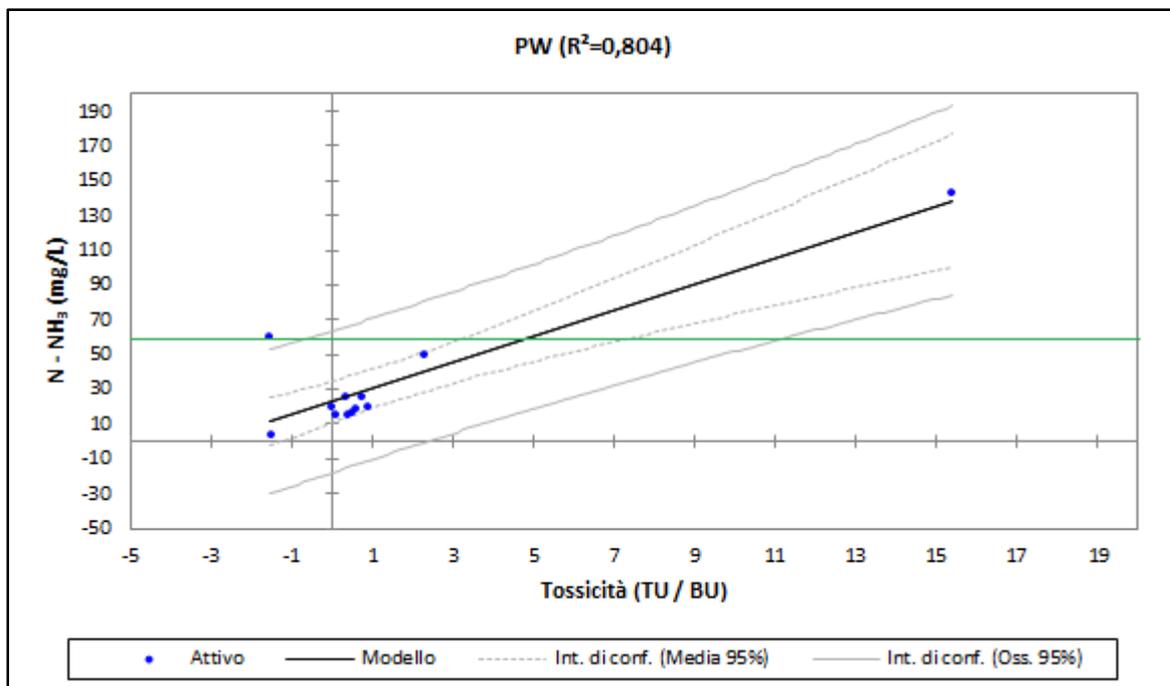
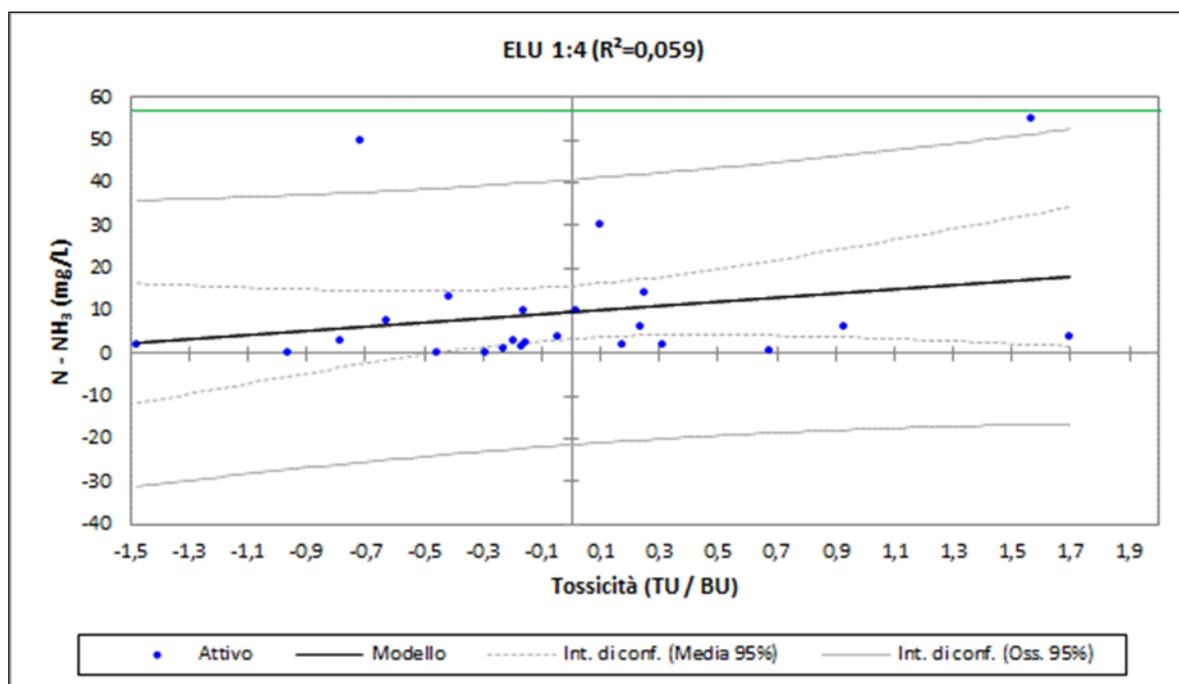


Figura 31 – regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione di l'ammoniaca per le acque interstiziali; la linea verde rappresenta il valore di NOEC per N-NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

**Tabella 13 - parametri del modello di regressione (tossicità-ammoniaca) per le acque interstiziali**

Fonte	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	Equazione
Intercetta	22,839	5,359	4,262	0,002	10,899	34,779	$Y = 22,839 + 7,540 * X$
X	7,537	1,176	6,406	< 0,0001	4,916	10,158	



**Figura 32 - Regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione dell'ammoniaca per la matrice elutriato 1:4; la linea verde rappresenta il valore di NOEC per N-NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**

**Tabella 14 - parametri del modello di regressione (tossicità-ammoniaca) per l'elutriato in rapporto 1:4**

Parametro	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	Equazione
Intercetta	9,620	3,002	3,204	0,004	3,393	15,846	$Y = 9,620 + 4,934 * X$
X	4,934	4,213	1,171	0,254	-3,803	13,671	

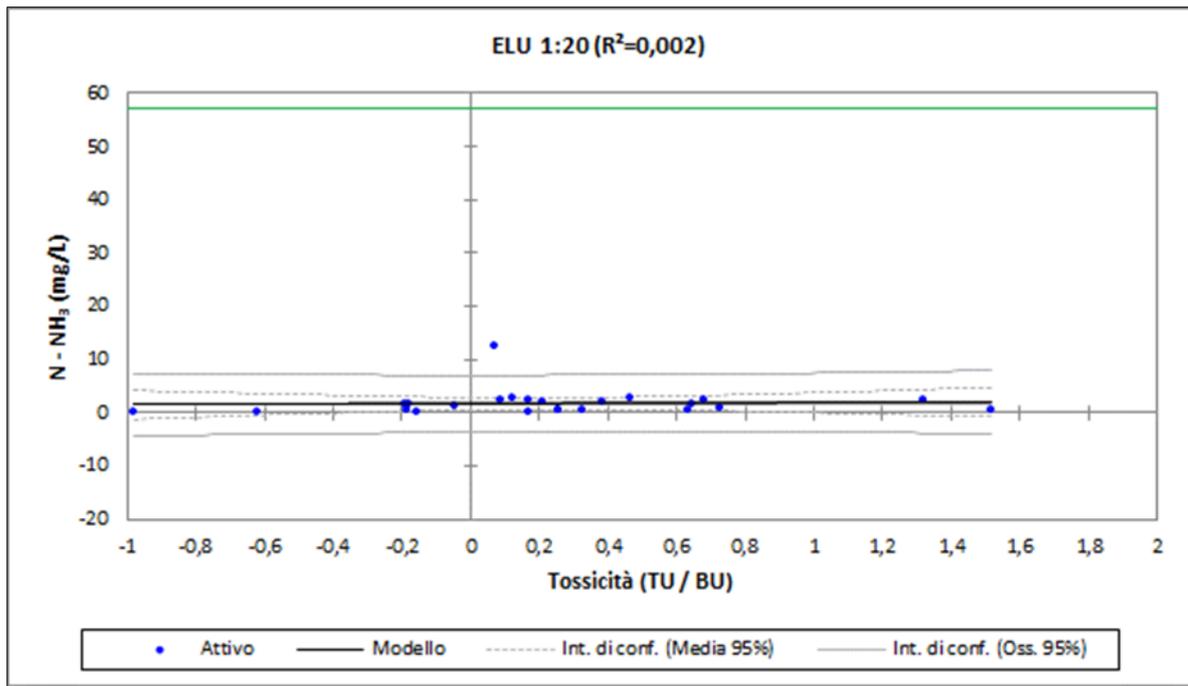


Figura 33 - regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione di l'ammoniaca per la matrice elutriato 1:20; la linea verde rappresenta il valore di NOEC per N-NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Tabella 15 - parametri del modello di regressione (tossicità-ammoniaca) per l'elutriato in rapporto 1:20

Parametro	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	Equazione
Intercetta	1,646	0,565	2,913	0,008	0,474	2,817	Y = 1,646+0,203*X
X	0,203	0,975	0,208	0,837	-1,819	2,226	

In Tabella 13, 14 e 15 sono riportate le statistiche descrittive per i tre modelli matematici.

I dati, così espressi, mostrano una relazione lineare positiva che è verificata solo per i dati di ammoniaca e tossicità per le acque interstiziali. La correlazione, va comunque presa con cautela in quanto dovuta ad un solo punto che si discosta dagli altri, fermo restando che, la posizione del punto citato è certamente ben giustificata da una concentrazione di ammoniaca che eccede a più del doppio del valore di NOEC (N-NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) per questa specie, come evidenzia la Figura 31.

Di seguito sono riportati i grafici sul confronto tra solfuri e tossicità (Fig. 34,35 e 36) e le rispettive Tabelle riassuntive con i parametri dei modelli di regressione applicati (Tab. 15,16 e 17).

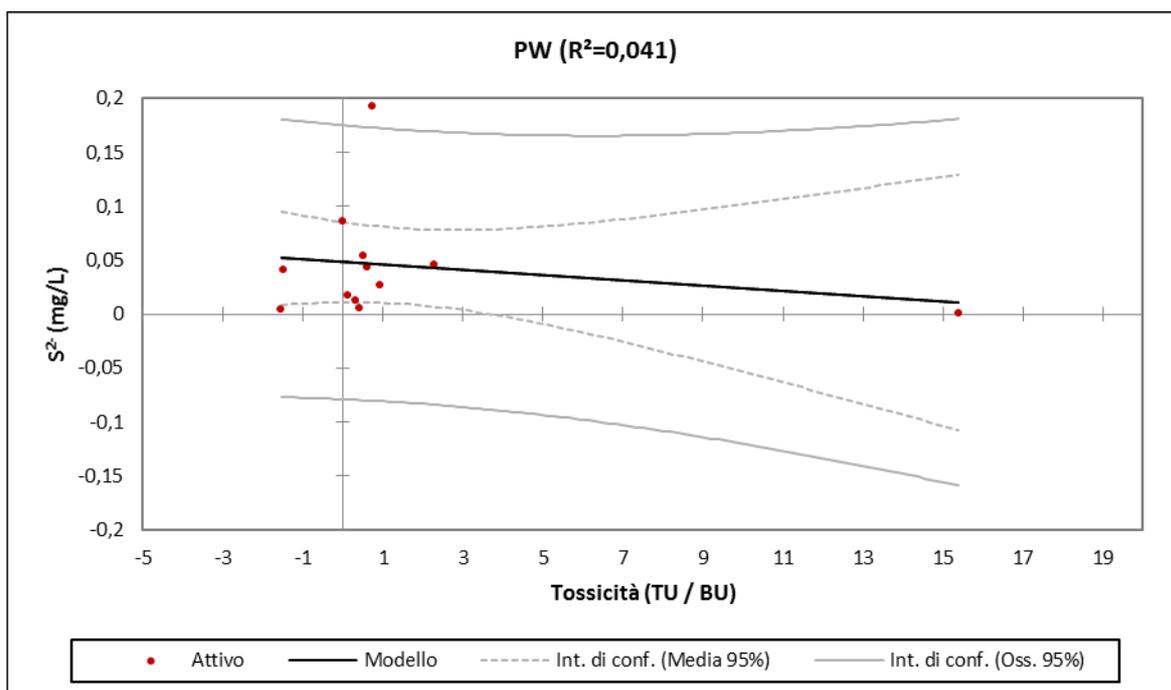


Figura 34 - regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione dei solfuri per le acque interstiziali

Tabella 16 - parametri del modello di regressione (tossicità-solfuri) per le acque interstiziali

Fonte	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	Equazione
Intercetta	0,048	0,017	2,891	0,016	0,011	0,086	$Y = 4,830E-02 - 2,407E-03 * X$
X	-0,002	0,004	-0,656	0,526	-0,011	0,006	

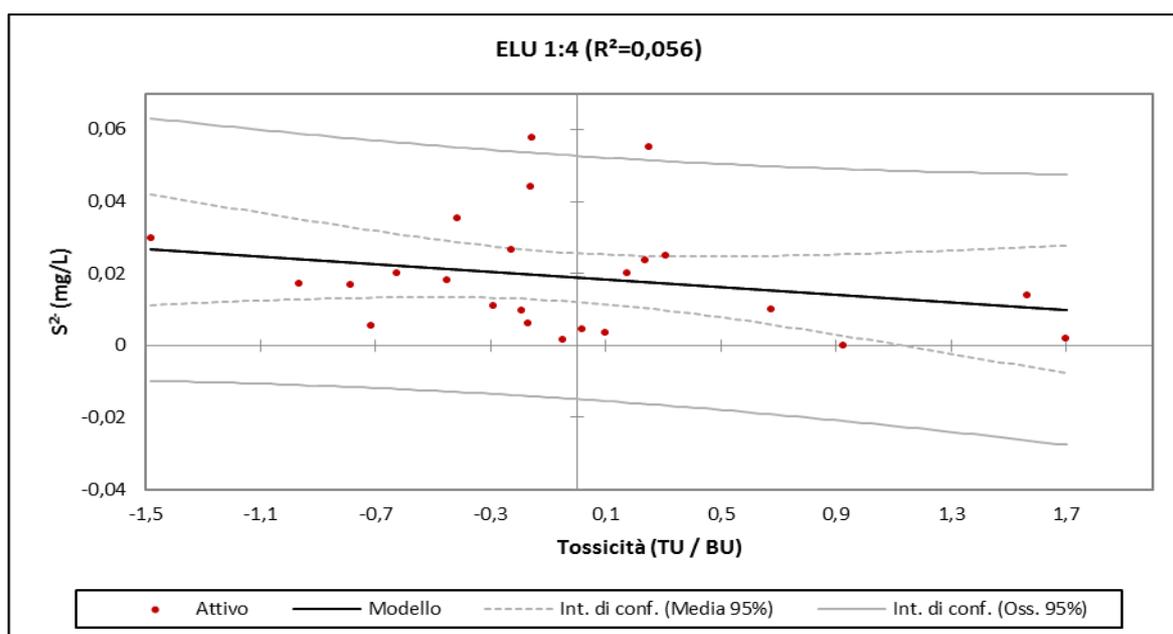
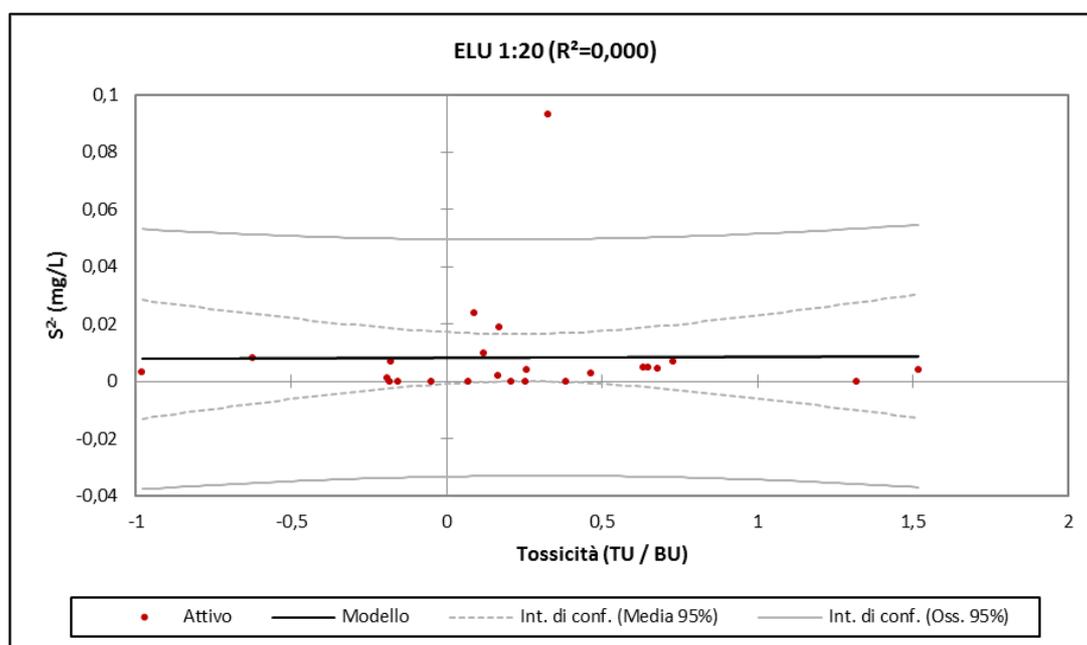


Figura 35 - regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione dei solfuri per la matrice elutriato in rapporto 1:4

**Tabella 17 - parametri del modello di regressione (tossicità-solfuri) per l'elutriato in rapporto 1:4**

Fonte	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	Equazione
Intercetta	0,019	0,003	5,782	< 0,0001	0,012	0,026	$Y = 1,885E-02 - 5,244E-03 * X$
X	-0,005	0,005	-1,146	0,264	-0,015	0,004	



**Figura 36 - regressione lineare dei dati di tossicità e di concentrazione dei solfuri per la matrice elutriato in rapporto 1:20**

**Tabella 18 - parametri del modello di regressione (tossicità-solfuri) per l'elutriato in rapporto 1:20**

Fonte	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	Equazione
Intercetta	0,008	0,004	1,878	0,074	-0,001	0,017	$Y = 8,188E-03 + 4,439E-04 * X$
X	0,000	0,008	0,059	0,953	-0,015	0,016	

L'output derivante dai tre grafici parziali per tossicità e solfuri indica una mancanza di linearità nella relazione tra queste due variabili per tutte le matrici qui considerate.

### 3.3 Retta di taratura (Assorbanza/Densità algale)

Una retta di taratura tra i parametri assorbanza e densità algale (cell/mL) ha permesso, in ambito sperimentale, di diminuire le tempistiche dedicate alla lettura del test, avendo la

possibilità di leggere i campioni allo spettrofotometro e poi ricondurre il dato assorbanza alla quantità di alghe presenti nella sospensione.

In letteratura, sono già presenti esperienze positive e simili in tal senso, come il lavoro di Rodrigues L.H.R. et al. (2011), in cui è stata creata una curva di calibrazione Assorbanza/Densità algale per la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, con letture dell'assorbanza eseguite a  $\lambda=684$  nm.

Nel grafico riportato in Figura 37 viene mostrata la relazione ricavata dalle letture spettrofotometriche e dalle letture al microscopio tramite camere di conta di Bürker per la specie *P. tricornutum*. I valori così ricavati, sono stati inseriti in un foglio Excel (2015) e tramite il software Microsoft® Excel 2016/ XLSTAT-Pro (Version 2015.6.01.25106, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA) è stata fatta una regressione lineare dei dati. Di seguito viene riportata la statistica descrittiva del modello:

**Tabella 19 - statistiche descrittive del modello di regressione tra assorbanza e densità algale**

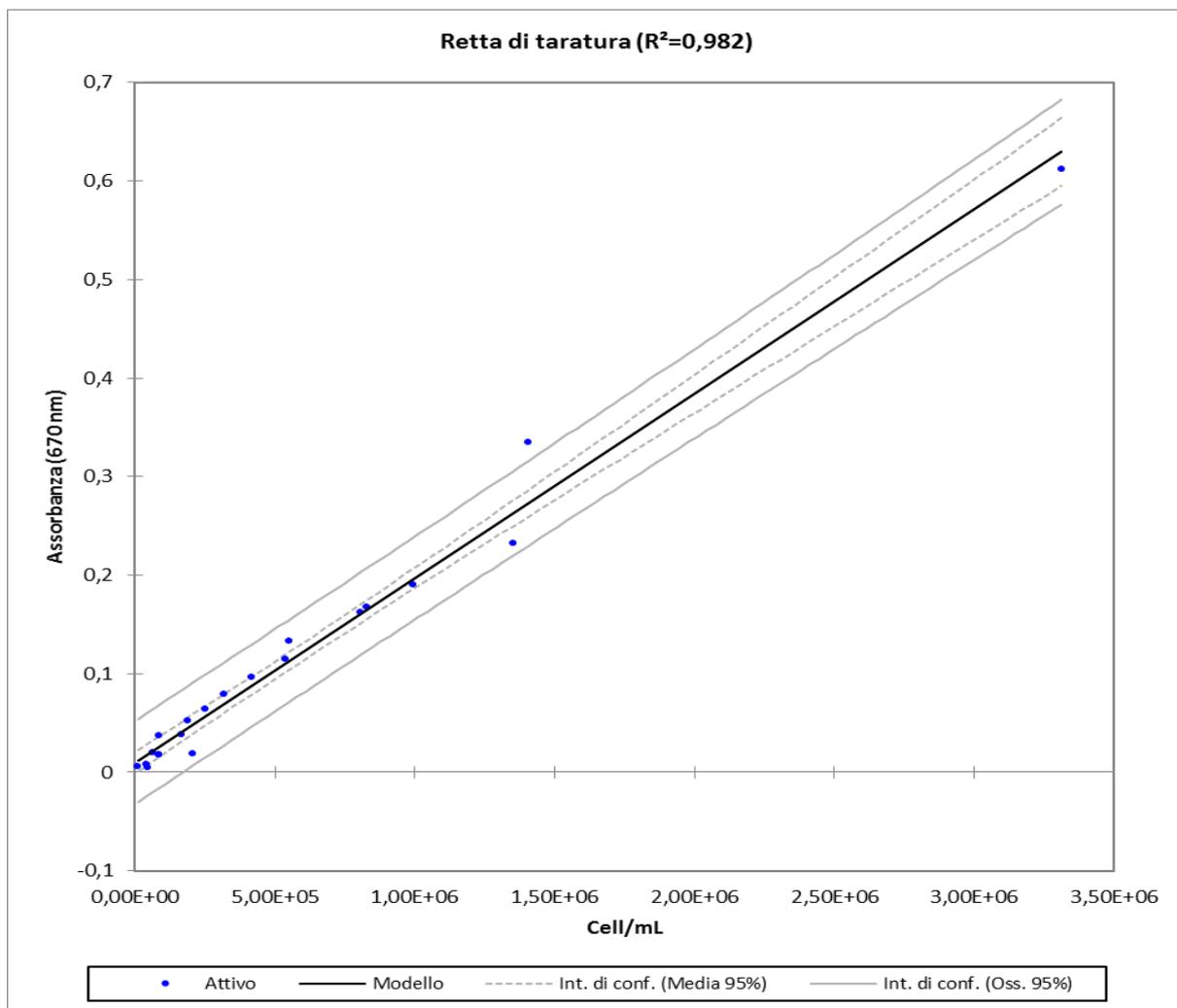
Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Dev. std.
Assorbanza	21	0,005	0,612	0,115	0,144
Cell/mL	21	10555,556	3312500,000	560026,455	761376,368

Fonte	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)
Intercetta	0,010	0,005	1,875	0,076	-0,001	0,021
Cell/mL	0,000	0,000	32,616	< 0,0001	0,000	0,000

L'output derivante è una funzione lineare di primo grado (Eq.13) con un coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) pari a 0,982.

$$\text{Assorbanza} = 1,000\text{E-}02 + 1,870\text{E-}07 * \text{Cell/mL}$$

Eq. 13



**Figura 37 – Retta di taratura per le variabili: densità algale (cell/mL) ed assorbanza misurata a 670 nm di lunghezza d'onda**

## 4. CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi ci si è posti l'obiettivo di verificare l'efficacia di procedure standard di saggio ecotossicologico con microalghe (lo standard ISO per la diatomea bentonica *P. tricornutum*) nell'evidenziare possibili diversi gradi di impatto di sedimenti lagunari.

Sono state caratterizzate sperimentalmente da un punto di vista fisico-chimico (pH, Eh, T, salinità, N-NH<sub>3</sub> e S<sup>2-</sup>) ed ecotossicologico (test con *P. tricornutum*) due diverse matrici ambientali liquide (elutriati ed acque interstiziali) ottenute a partire da carote di sedimento prelevate in Laguna di Venezia. A partire dalle fasi iniziali di trattamento delle carote, per finire con l'elaborazione statistica dei dati, l'attività si è svolta interamente presso le strutture del DAIS.

I risultati prodotti dall'applicazione del saggio di tossicità con *P. tricornutum* sono stati valutati sulla base del principio di precauzione. Per questo motivo, non solo gli effetti di inibizione della crescita, ma anche i dati di stimolazione sono stati considerati come indesiderati e posti alla stessa stregua degli stessi effetti inibitori.

Secondo il DLgs 260/2010, per valori di PE>30% (TU/BU>0,6) i campioni sono da considerarsi tossici. Dai risultati derivanti dal test con *P. tricornutum* sono risultati tossici 19 campioni su 60 totali pari al 31,7%. Tale risultato andrà ad integrare le evidenze derivanti dagli altri saggi di tossicità (batteria di test) necessari per caratterizzare in modo completo la matrice ambientale sedimento.

L'analisi dei profili verticali eseguita sui dati di tossicità, ha evidenziato una contaminazione talvolta profonda del sedimento. Tuttavia, memore delle peculiarità del campionamento eseguito a monte, mediante il prelievo di carote di 1 metro di lunghezza e del successivo trattamento di omogeneizzazione cui sono andate incontro, si suppone che il dato finale risenta comunque di un possibile effetto diluizione tale da ridurre gli effetti complessivi dell'eventuale livello di impatto dei sedimenti.

I dati derivanti dalle analisi fisico-chimiche hanno confermato una presenza maggiore delle componenti ammoniacale e solfuri nella matrice acque interstiziali, confermando i risultati presenti in letteratura. Dai dati a disposizione, una valutazione sugli effetti dei "confounding factors" è stata possibile solo per l'ammoniacale. Dalle evidenze dei risultati (confronto con il

valore di NOEC) è sostanzialmente emerso che vi è un unico campione che certamente risentirà di quest'interferenza (precisamente il PW U1).

I dati di pH ed Eh sono stati modellizzati (regressione lineare) restituendo un'ottima correlazione lineare negativa tra queste due variabili.

La ricerca ha previsto inoltre una fase metodologica preliminare volta all'implementazione della procedura del test. La messa a punto di un modello matematico (Eq. 13) tale da consentire la lettura del test algale con la misura dell'assorbanza a 670 nm al posto del conteggio tramite camere di conta, permetterà infatti, in futuro di ridurre le tempistiche legate alla lettura del test con *P. tricornutum*.

A tal proposito, l'esperienza di lavoro ha dimostrato alcune criticità legate al metodo di lettura allo spettrofotometro per una delle due tipologie di matrici. Nello specifico, per i campioni di acque interstiziali le letture dell'assorbanza sono state più difficoltose e questo perché i campioni ricavati da questa matrice conservano una certa presenza di particellato anche dopo il secondo ciclo in ultracentrifuga. Entrando nel merito delle fasi operative, durante la fase di lettura del test algale si è tentato di tarare lo strumento sul campione "tal quale", prima della lettura dei campioni in piastra, così da ridurre l'interferenza della presenza di particellato sul valore finale letto. Tuttavia, questo ha introdotto un errore ulteriore in quanto, mentre il particolato sospeso e presente nel campione "tal quale" era di facile movimentazione, il particolato all'interno del campione posto in piastra, sedimentava durante le 72 h d'incubazione, ed era poi di difficile risospensione. Di conseguenza, è capitato non di rado, di eseguire letture con valori negativi dei campioni contenenti l'inoculo algale. A questo va poi aggiunto il fatto che la taratura eseguita sul "tal quale" risultasse meno rappresentativa per i campioni in diluizione. Per questo motivo, le letture su questa matrice liquida sono state eseguite soprattutto con la camera di conta in modo da avere dati più precisi ed accurati.

Per concludere, nel presente lavoro si è tentato di arricchire le conoscenze su questo saggio biologico standardizzato (ISO 10253:2006), previsto da diverse normative italiane (DM 7/2008, D.lgs 260/2010) per valutazioni sulla tossicità della matrice sedimento in ambiente marino-costiero e di transizione e per il quale, esistono attualmente pochi dati disponibili.

I dati ottenuti andranno a costituire un primo database per le matrici liquide derivate dal sedimento (Allegato 9) in Laguna di Venezia. L'implementazione del suddetto va certamente

nella direzione delle normative presenti in materia. Sempre in ottica futura, è auspicabile l'approfondimento dei dati a disposizione per le medesime stazioni, eseguendo carotaggi profondi e mirati che considerino sezioni minori di sedimento (20-50 cm) tali da consentire l'acquisizione di informazioni più puntuali per meglio chiarire il trend verticale di contaminazione.

Il test ha infine, dimostrato una certa utilità perché permette di evidenziare, non solo effetti d'inibizione della crescita algale, ma anche effetti di biostimolazione, rivelando la presenza di componenti in grado di favorirne la crescita.

L'utilizzo dei dati di tossicità permette, infine, di valutare con più ampi margini di realismo lo stato di qualità dei sedimenti stessi, fornendo indizi sugli effetti sul comparto biotico. A partire da questo poi, sarà possibile formulare delle previsioni sulle attività di gestione dei sedimenti quali dragaggio, movimentazione, ripascimenti che rientrano ormai nella manutenzione ordinaria di porti industriali, commerciali, turistici e i relativi canali a servizio.

## Bibliografia

- Acri F. et al. (2004). Plankton communities and nutrients in the Venice Lagoon. Comparison between current and old data. *Journal of Marine System*, 51:321– 329.
- Allen A.E. et al. (2011). Evolution and metabolic significance of the urea. *Nature*, 473(7346): 203-207.
- Arizzi Novelli A. et al. (2006). Is the 1:4 elutriation ratio reliable? ecotoxicological comparison of four different sediment:water proportions. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 66; 306:313.
- ARPAT G. Sbirilli et al. (1998). *Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico*.
- ARPAV - Reg. Veneto. (2014). *Classificazione dello stato ecologico e chimico dei corpi idrici della Laguna di Venezia*. Allegato A alla Dgr n.140 del 20 febbraio.
- ASTM. (1990). *Standard guide for collection, storage, characterisation and manipulation of sediment for ecotoxicological testing*.
- ASTM. (s.d.). *Standard guide for collection, storage, characterisation and manipulation of sediment for ecotoxicological testing*. 1990.
- Autorità di bacino - Reg. Veneto. (2010). *Piano di Gestione - Subunità idrografica bacino scolante, laguna di Venezia e mare antistante*. Vol 1/2.
- Baudo R. et al. - ISPRA. (2011). Batterie e saggi tossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. *i manuali di ecotossicologia*.
- Bellucci L. G. et al. (2002). Distribution of heavy metals in sediments of the Venice Lagoon: the role of the industrial area. *The science of the Total Environment*, 295: 35–49.
- Botter M. (2012). *Studio della distribuzione di microinquinanti inorganici nei sedimenti della laguna di Venezia*.
- Botter M. (2012). *Studio della distribuzione di microinquinanti inorganici nei sedimenti della laguna di Venezia*. Università Cà Foscari di Venezia: Tesi di dottorato.
- Bowler C. et al. (2008). *The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes*.
- Carr and Nipper. (2003). Historical overview of porewater toxicity testing. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, 1-10.
- Cesari A. (2006). *Decreto Legislativo 3/4/2006 n. 152 Norme in materia ambientale*.
- Chapman P.M. et al. (2002). *Porewater testing and analysis: the good, the bad, and the ugly*.
- Cheung Y.H. et al. (1997). Assessment of Sediment Toxicity Using Different Trophic Organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 32, 260–267.
- Cimbala J.M. (2011). *Statistical Notions*. Penn State University.
- Consorzio Venezia Nuova. (2008). *La qualità delle matrici ambientali nelle aree lagunari tra Porto Marghera e Venezia e nei canali portuali*. Min. delle Infrastrutture e dei Trasporti.

- Facca C. et al. (2014). Natural Recovery and Planned Intervention in Coastal Wetlands: Venice Lagoon (Northern Adriatic Sea, Italy) as a Case Study. *The Scientific World Journal*.
- Falciatore A. & Bowler C. (2002). Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annual Review of Plant Biology*, 53:109-130.
- Falkowski et al. (2008). Diatom genomes come of age. *Genome biology*, 9:245.
- Falkowski P.G. et al. (1998). Biogeochemical controls and feedback on ocean primary production. *Science*, 281: 200-206.
- Francius G. et al. (2008). Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environmental microbiology*, 10(5): 1344-1356.
- Garrido M. (2007). *Estuarine sediments toxicity test on diatoms: sensitivity and comparison for three species*.
- Ghezzi M. et al. (2011). *Modeling The Inter-Annual Variability Of Salinity In The Lagoon Of Venice In Relation To The Water Framework Directive Typologies, Ocean and Coastal Management*.
- Horvatic J. & Persic C. (2007). The Effect of Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> on the Growth Rate of Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: Microplate Growth Inhibition Test. *Bull Environ Contam Toxicol*, 79:494–498.
- Kegley S.E. et al. (2014). *Pesticide Database*. North America, Oakland: Pesticide Action Network.
- Kim K.Y. et al. (2004). *Phytoplankton dynamics in Pomquet Harbour, Nova Scotia: a lagoon in the southern Gulf of St. Lawrence*.
- Knezovich J.P. et al. (1996). Sulfide Tolerance of Four Marine Species Used to. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 57:450-457.
- Lewin J.C. et al. (1958). Observation on *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of general microbiology*, 18: 418-426.
- Libralato G. et al. (2015). *Wastewater effects on Phaeodactylum tricornutum (Bohlin): setting a classification system*.
- Losso C. & Volpi Ghirardini A. (2010). Overview of ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy). *Environ. Int.*, 36:92-121.
- Losso C. et al. (2004). Sulfide as a confounding factor in toxicity test with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparison with chemical analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 2, pp. 396–401.
- Losso C. et al. (2009). Porewater as a matrix in toxicity bioassays with sea urchins and bivalves: Evaluation. *Environ. Int.*, 35; 118:126.
- MacIntyre H.L et al. (1996). *Microphytobenthos: the ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats*.
- Marvin W. Fawley and Arthur R. Grossman. (1986). Polypeptides of a Light-Harvesting Complex of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Are Synthesized in the Cytoplasm of the Cells as Precursors. *Plant Physiol.*, 81, 149-155.

- Mayer P. et al. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurement in algal growth inhibition test. *Water Research*, 31,2525-253.
- Min. dell'Ambiente e della tutela del territorio e del mare. (2016). *modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare di materiali di escavo dei fondali marini*.
- Minetto D. (2012). *Studio dell'ecotossicità di ENP ed ENM per organismi acquatici marini*. Tesi di dottorato: Università Cà Foscari di Venezia.
- Moreno-Garrido I. et al. (2007). Sediment toxicity tests involving immobilized microalgae (*Phaeodactylum tricornutum*). *Environ. Int.*, 33,481–485.
- Mucha A.P. et al. (2003). Comparison of the response of three species exposed to elutriates of estuarine sediments based on growth and chemical speciation. *Eviron.Toxicology and Chemistry*, 3:576-585.
- Neu T.R. and Lawrence J.R. (1997). Development and structure of microbial. *FEMS Microbiol Ecol*, 24:11–25.
- Nichols M.N. & Bonn J.D. (1994). *Sediment transport processes in coastal lagoon*.
- Norton T.A. et al. (1996). Algal biodiversity. *phycologia*, 35: 308-326.
- Othman HB et al. (2012). *Toxicity of benz(a)anthracene and fluoranthene to marine phytoplankton in culture: Does cell size really matter?*
- Pavoni B. et al. (1987). Historical Development of the Venice Lagoon Contamination as Recorded in Radiodated Sediment Cores. *Marine Pollution Bulletin*, 18 : 18-24.
- Pellegrini D. et al. - APAT e ICRAM. (2006). *Manuale per la movimentazione di sedimenti marini*.
- Pellegrini D. et al. (2002). *aspetti tecnico-scientifici per la salvaguardia ambientale nelle attività di movimentazione dei fondali marini: dragaggi portuali*.
- Persoone G. et al. (2003). A Practical and User-Friendly Toxicity Classification System with Microbiotests for Natural Waters and Wastewaters.
- Postma J.F. et al. (2002). Confounding Factors in Bioassays with Freshwater and. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226 - 237.
- Ragni M. & D'Alcalà M. (2007). Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricornutum*: pigment content. *Journal of Plankton Research*, 29(2): 141-156.
- Readon J. et al. (1966). New reactants for the colorimetric determination of ammonia. *Clin. Chim. acta*, 14; 203-205.
- Renzi M. et al. (2014). *Early warning tools for ecotoxicity assessment based on Phaeodactylum tricornutum*.
- Rodrigues L.H.R. et al. (2011). Algal density assessed by spectrophotometry: A. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, Vol. 3(8), pp. 225-228.
- Round F.E. et al. (2007). *The Diatoms. Biology & Morphology of the Genera*.
- Rumeau A. & Coste M. (1988). *Initiation à la systématique des diatomées*.
- Sacchi CF. (1995). Le lagune costiere come elementi di transizione. *Proceedings of the Italian Society of Ecology*, 16:149-154.

- Sarni A. et al. (2007). Valutazione ecotossicologica dei sedimenti dei canali industriali del sito di interesse nazionale di Porot-Marghera (VE). *Biol. mar. mediterr.*, 14: 213-216.
- Sbirilli G. (2000). *I saggi tossicologici nella normativa per il controllo delle acque*.
- Scala S. et al. (2002). Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*, 129(3): 993-1002.
- Tagliapietra D. & Volpi Ghirardini A. (2006). Notes on coastal lagoon typology in the light of the EU Water Framework Directive: Italy as a case of study. *Acquatic conserv: Mar. Freshw. Ecosyst*, 16:457-467.
- Tesson B. et al. (2009). Surface chemical composition of diatoms. *Chem BioChem*, 10(12): 2011 – 2024.
- Tolun L.G. et al. (2001). The pollution status and the toxicity of surface sediments in Içzmit Bay. *Environ. Int.*, 26, 163–168.
- UNI EN ISO 10253. (2006). *Water quality - Marine algal growth inhibition test with Skeletonema costatum and Phaeodactylum tricornutum*.
- USEPA. (1997). Ecological evaluation of proposed discharge of dredged material into ocean waters.
- Vardi A. et al. (2008). diatom genomes come of age. *genome biology*, 9-245.
- Volpi Ghirardini et al. (2005). Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Env. Int.*, 31 : 1065 – 1077.
- Widdows J. & Brinsley M. (2002). Impact of biotic and abiotic processes on sediment dynamics and consequences to the structure and functioning of the intertidal zone. *Journal of Sea Research*, 48, 143-156.
- Zonta R. et al. . (1992). *Geochemical and Chemical-Physical Characterization of a Polluted Mud Flat in the Venice Lagoon*.
- Zonta R. et al. (1994). Heavy Metal and Grain-Size Distributions in Estuarine Shallow Water Sediments of the Cona Marsh (Venice Lagoon). *Sci.Tot.Env*, 151: 19-28.
- Zonta R. et al. (2007). *Sediment chemical contamination of a shallow water area close to the industrial zone of Porto Marghera (Venice Lagoon, Italy)*.
- Zonta R. et al. (2011). *Progetto QSEV: Qualità dei sedimenti della laguna di Venezia. Indagine per l'aggiornamento e l'integrazione dei dati sulla qualità dei sedimenti lagunari*.

# Allegati

Allegato 1: dati di pH, Eh, T e salinità suddivisi per matrice di studio

Campioni		pH	Eh (mV)	T (°C)	Salinità (‰)		
H2O marina filtrata		8,28	-106,7	17	35		
Bianco procedurale		8,07	-95,3	18,6	35		
PW	P	1	8,35	-115,8	23,8	31	
		2	8,49	-123,9	24	34	
	Q	1	7,89	-89,1	22,4	30	
		1	8,51	-124,7	23,7	35	
	R	2	8,53	-125,8	23,7	32	
		1	8,83	-143,4	23,7	25	
	T	1	8,8	-143,8	22	31	
		2	8,1	-101,1	22	31	
	U	1	8,18	-105,2	21,8	33	
	V	1	8,14	-103,2	22,1	31	
		2	8,11	-101,5	22,4	31	
	Z	1	8,31	-113,1	22,4	32	
	Elutriato 1:4	P	1	7,75	-77,2	19,6	35
			2	8,14	-99,4	20,2	35
3			8,13	-99	20	35	
4			7,98	-90,8	21,4	35	
5			7,96	-89,6	20,4	36	
Q		1	7,98	-90,9	22,7	35	
R		1	8,39	-113,8	21	35	
		2	7,95	-88,8	20,6	35	
		3	8,03	-93	20,5	36	
		4	8	-91,8	21,2	35	
		5	8,05	-94,8	21,4	36	
S		1	8,18	-102,3	22,5	34	
T		1	7,53	-65,2	20,9	35	
		2	8,1	-97,6	21,7	35	
		3	8,08	-96,1	21,7	34	
		4	7,97	-90,3	21,1	35	
		5	7,96	-89,8	21,4	35	
U		1	8,23	-104,9	22,5	35	
V		1	8,13	-99,6	22,2	35	
		2	7,73	-76,4	22,2	34	
		3	8,07	-95,7	21,6	33	

		4	7,97	-90,3	22,5	35
		5	8,03	-93,6	22	35
	Z	1	7,79	-80,3	22,8	35
Elutriato 1:20	P	1	8,42	-115,6	22,2	35
		2	8,24	-105,7	22,3	35
		3	8,52	-121,5	22,4	34
		4	8,48	-118,8	22,1	34
		5	8,37	-113	22,4	36
	Q	1	8,57	-124,1	22,7	35
	R	1	8,28	-107,9	21,9	33
		2	8,54	-122,4	22	35
		3	8,54	-122,5	21,9	35
		4	8,63	-127,6	22	35
		5	8,48	-118,9	22,1	35
	S	1	8,43	-116,1	22,5	35
	T	1	8,37	-113	22,3	35
		2	8,31	-109,3	22,5	35
		3	8,45	-117,5	23,4	35
		4	8,31	-109,4	22,6	26
		5	8,53	-122,3	22,8	27
	U	1	8,67	-130,1	22,9	35
	V	1	8,58	-124,8	22,3	35
		2	8,25	-106,2	22,1	35
		3	8,5	-120	22,3	35
		4	8,54	-122,6	22,6	34
		5	8,46	-118	22,8	35
	Z	1	8,5	-120,4	22,5	35

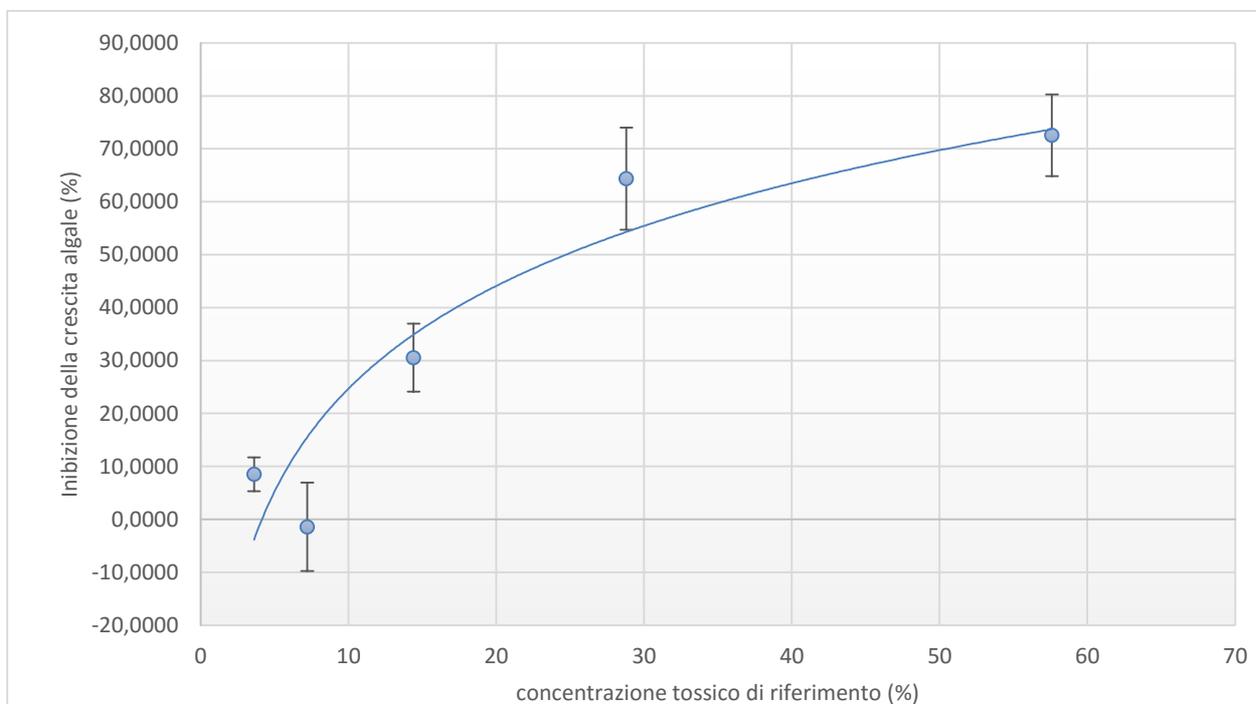
Allegato 2: dati di ammoniaca e solfuri suddivisi per matrici di studio

Campioni		Solfuri (mg/L)	Dev. St.	Ammoniaca (mg/L)	Dev. St.	
PW	P	1	0,005	0,000	60,000	0,000
		2	0,193	0,001	25,000	0,000
	Q	1	0,087	0,001	20,000	0,000
	R	1	0,055	0,002	16,500	0,000
		2	0,042	0,001	4,000	0,000
	S	1	0,013	0,000	25,000	0,000
	T	1	0,027	0,000	20,000	0,000
		2	0,006	0,000	15,000	0,000
	U	1	0,001	0,000	143,333	2,887

	V	1	0,044	0,000	18,000	0,000	
	V	2	0,046	0,001	50,000	0,000	
	Z	1	0,017	0,001	15,000	0,000	
Elutriato 1:4	P	1	0,002	0,001	4,000	0,000	
		2	0,044	0,002	10,000	0,000	
		3	0,025	0,001	2,000	0,000	
		4	0,020	0,000	1,800	0,000	
		5	0,017	0,001	3,167	0,289	
	Q	1	0,035	0,001	13,333	0,289	
	R	1	0,011	0,000	0,020	0,000	
		2	0,010	0,001	3,000	0,000	
		3	0,006	0,000	1,433	0,058	
		4	0,010	0,000	0,537	0,006	
		5	0,002	0,000	4,000	0,000	
	S	1	0,055	0,000	14,000	0,000	
	T	1	0,024	0,001	6,000	0,000	
		2	0,004	0,001	10,000	0,000	
		3	0,000	0,000	6,000	0,000	
		4	0,020	0,000	7,500	0,000	
		5	0,018	0,000	0,030	0,000	
	U	1	0,014	0,000	55,000	0,000	
	V	1	0,005	0,001	50,000	0,000	
		2	0,027	0,001	1,000	0,000	
		3	0,004	0,001	30,000	0,000	
		4	0,017	0,000	0,005	0,000	
		5	0,030	0,001	1,933	0,058	
	Z	1	0,058	0,001	2,500	0,000	
	Elutriato 1:20	P	1	0,000	0,000	1,800	0,000
			2	0,019	0,000	2,333	0,058
			3	0,000	0,000	0,150	0,000
			4	0,000	0,000	0,320	0,000
			5	0,004	0,000	0,280	0,000
		Q	1	0,000	0,000	2,100	0,000
		R	1	0,007	0,000	0,967	0,058
			2	0,001	0,000	1,600	0,000
3			0,093	0,002	0,480	0,000	
4			0,002	0,000	0,005	0,000	
5			0,004	0,000	0,417	0,006	
S		1	0,004	0,001	2,500	0,000	
T		1	0,007	0,000	1,533	0,058	
		2	0,010	0,000	2,800	0,000	
		3	0,003	0,001	0,020	0,000	
		4	0,008	0,000	0,005	0,000	

	5	0,003	0,001	2,767	0,058
U	1	0,000	0,000	12,400	0,000
V	1	0,005	0,001	1,500	0,000
	2	0,024	0,001	2,300	0,000
	3	0,000	0,000	2,167	0,289
	4	0,005	0,000	0,500	0,000
	5	0,000	0,000	0,287	0,006
Z	1	0,000	0,000	1,400	0,000

Allegato 3: controllo positivo per *P. tricornutum* sulla matrice elutriato 1:4



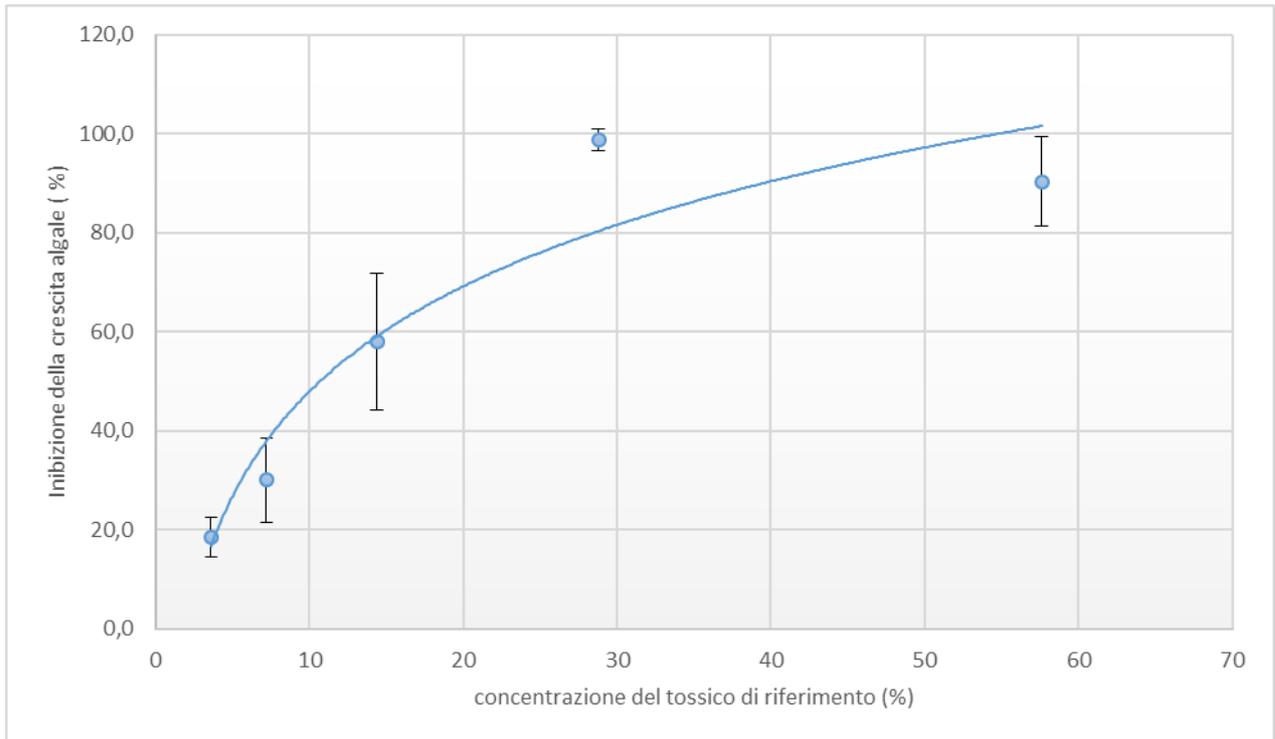
Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Dev. std.	R <sup>2</sup>
Y	5	-1,433	72,572	34,912	32,878	0,870
X	5	1,281	4,054	2,667	1,096	

Equazione del modello:  $Y = -39,721 + 27,981 * X$

Valore IC<sub>50</sub> = 24,690 %

Allegato 4: controllo positivo per *P. tricornutum* sulla matrice elutriato 1:20



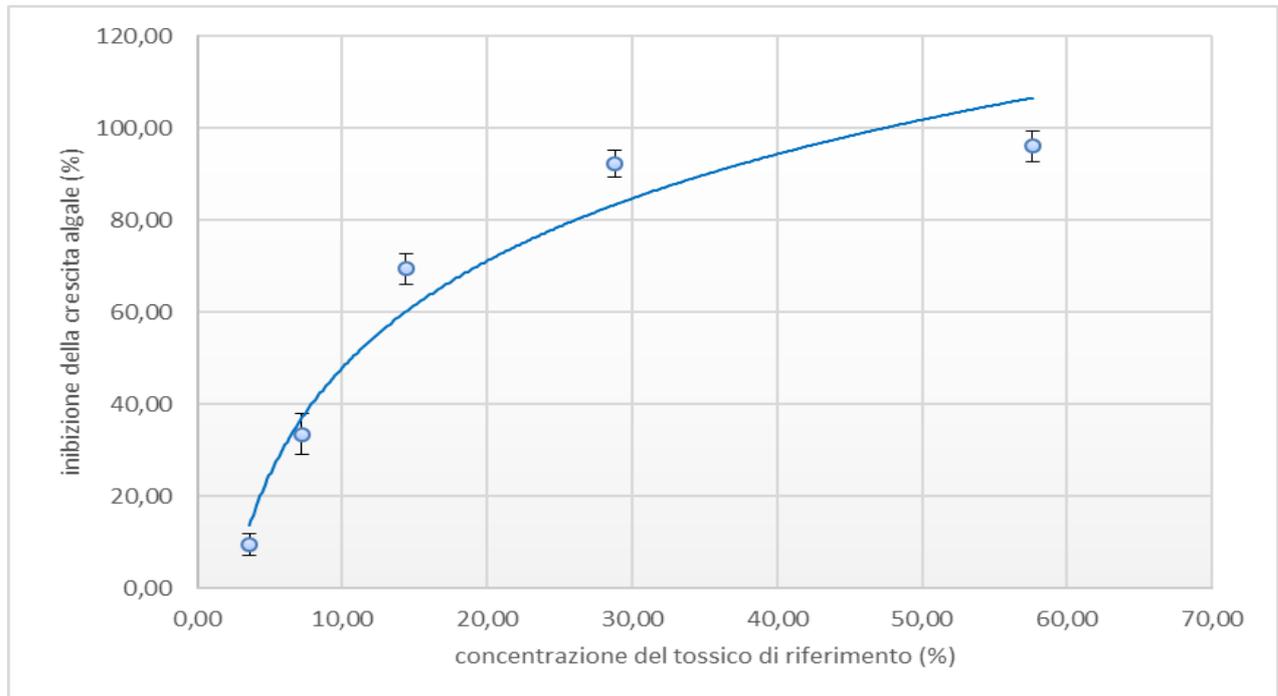
Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Dev. std.	R <sup>2</sup>
Y	5	18,588	98,709	59,128	35,448	0,894
X	5	1,281	4,054	2,667	1,096	

Equazione del modello:  $Y = -22,459 + 30,589 * X$

Valore IC<sub>50</sub> = 10,684 %

Allegato 5: controlli positivi per *P. tricorutum* sulla matrice acque interstiziali (test per questa matrice eseguito in due momenti da cui la necessità di avere due controlli positivi)

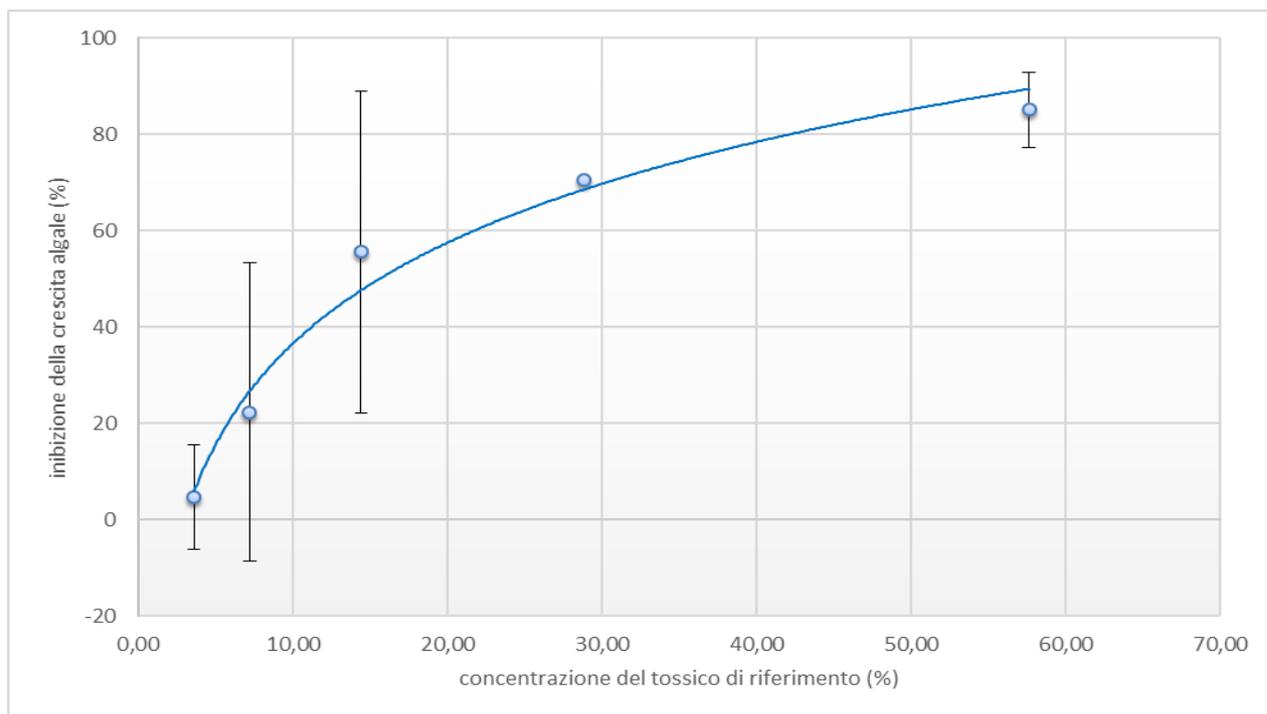


Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Dev. std.	R <sup>2</sup>
Y	5	9,500	96,052	60,174	37,705	0,946
X	5	1,281	4,054	2,667	1,096	

Equazione del modello:  $Y = -29,075 + 33,461 * X$

Valore IC<sub>50</sub> = 10,624 %

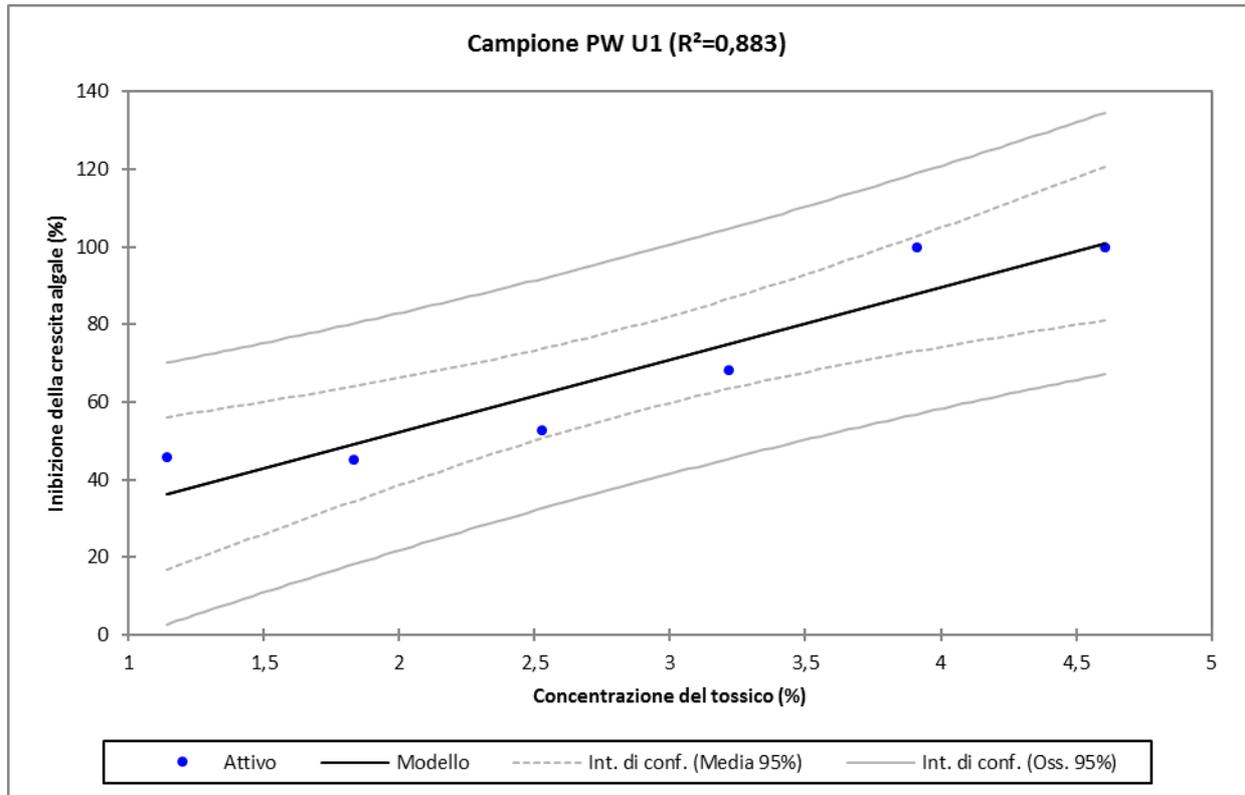


Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Dev. std.	R <sup>2</sup>
Y	5	4,635	85,081	47,634	33,469	0,976
X	5	1,281	4,054	2,667	1,096	

Equazione del modello:  $Y = -32,842 + 30,172 * X$

Valore IC<sub>50</sub> = 14,575 %

Allegato 6: regressione lineare per i due campioni di acque interstiziali (PW U1 e PW V2)

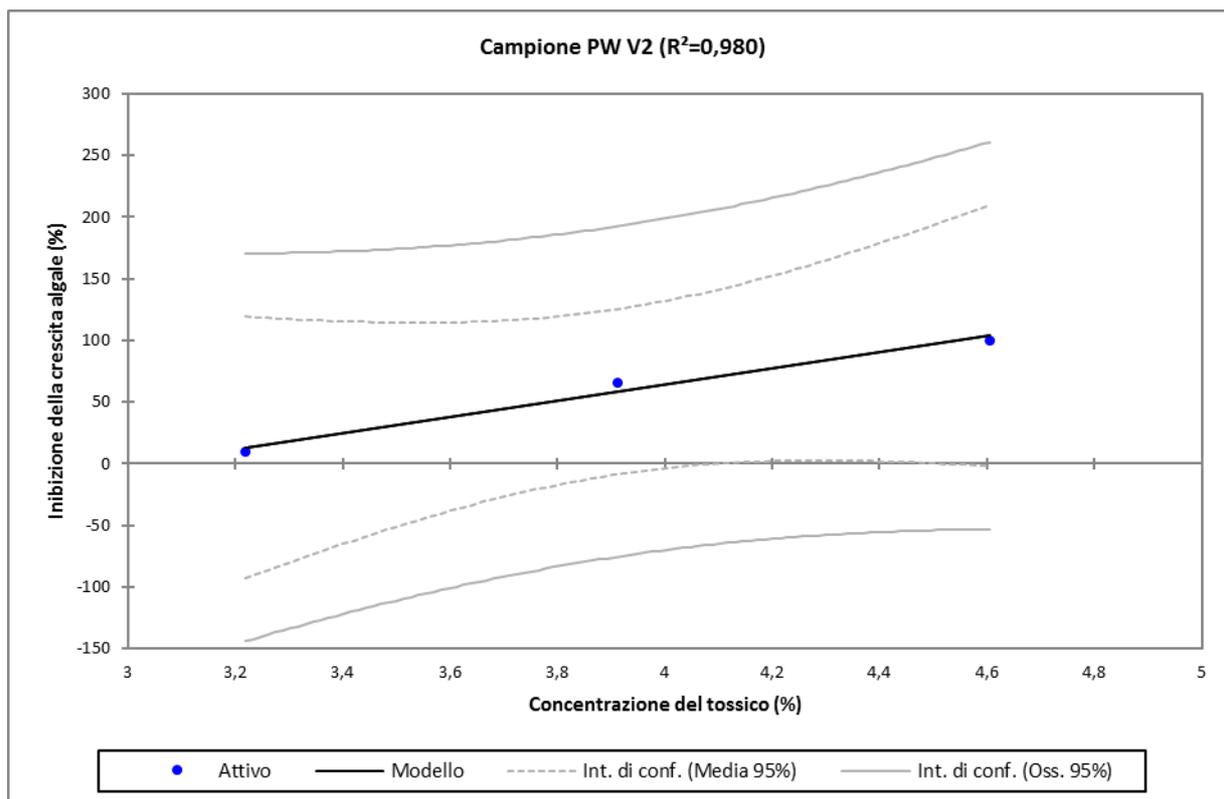


Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Dev. std.
Y	6	45,226	100,000	68,630	25,672
Ln(X)	6	1,141	4,605	2,873	1,296

Parametri del modello:

Fonte	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	Equazione
Intercetta	15,180	10,529	1,442	0,223	-14,055	44,414	Y = 15,179+18,607*X
Ln(X)	18,607	3,389	5,490	0,005	9,197	28,017	

Valore IC<sub>50</sub> = 6,497 % (campione PW U1)



Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Dev. std.
Y	3	9,418	100,000	58,439	45,750
Ln(X)	3	3,219	4,605	3,912	0,693

Fonte	Valore	Errore standard	t	Pr >  t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	Equazione
Intercetta	-197,179	36,840	-5,352	0,118	-665,280	270,923	Y = -197,178+65,341*X
X1	65,341	9,320	7,011	0,090	-53,083	183,766	

Valore IC<sub>50</sub> = 43,944 % (campione PW V2)

Allegato 7: risultati dell'interpretazione dei dati di tossicità con il sistema di classificazione di Persoone G. (2003)

Campione	TU / BU	Classe di pericolo
PW P1	-1,541	3
PW P2	0,747	2
PW Q1	0,003	1
PW R1	0,499	2
PW R2	-1,482	3
PW S1	0,332	1
PW T1	0,914	2
PW T2	0,418	2
PW U1	15,392	4
PW V1	0,615	2
PW V2	2,276	3
PW Z1	0,107	1
ELU1:4 P1	-0,047	1
ELU1:4 P2	-0,160	1
ELU1:4 P3	0,309	1
ELU1:4 P4	0,174	1
ELU1:4 P5	-0,787	2
ELU1:4 Q1	-0,414	2
ELU1:4 R1	-0,291	1
ELU1:4 R2	-0,193	1
ELU1:4 R3	-0,169	1
ELU1:4 R4	0,675	2
ELU1:4 R5	1,700	3
ELU1:4 S1	0,250	1
ELU1:4 T1	0,237	1
ELU1:4 T2	0,018	1
ELU1:4 T3	0,927	2
ELU1:4 T4	-0,625	2
ELU1:4 T5	-0,453	2
ELU1:4 U1	1,564	3
ELU1:4 V1	-0,717	2
ELU1:4 V2	-0,227	1
ELU1:4 V3	0,098	1
ELU1:4 V4	-0,966	2
ELU1:4 V5	-1,480	3
ELU1:4 Z1	-0,156	1
ELU1:20 P1	0,385	1
ELU1:20 P2	0,168	1
ELU1:20 P3	-0,157	1
ELU1:20 P4	-0,183	1
ELU1:20 P5	0,258	1

ELU1:20 Q1	0,207	1
ELU1:20 R1	0,729	2
ELU1:20 R2	-0,190	1
ELU1:20 R3	0,325	1
ELU1:20 R4	0,167	1
ELU1:20 R5	1,517	3
ELU1:20 S1	0,679	2
ELU1:20 T1	-0,181	1
ELU1:20 T2	0,121	1
ELU1:20 T3	-0,979	2
ELU1:20 T4	-0,624	2
ELU1:20 T5	0,464	2
ELU1:20 U1	0,071	1
ELU1:20 V1	0,648	2
ELU1:20 V2	0,088	1
ELU1:20 V3	1,318	3
ELU1:20 V4	0,632	2
ELU1:20 V5	0,254	1
ELU1:20 Z1	-0,047	1

Allegato 8: Database con i risultati (dati grezzi) del test di tossicità con *P. tricornutum*

Elutriati 1:4		REPLICHE	Conc. Iniziale (cell/mL)	Conc. Finale (cell/mL)
P	1	1	10000	126667
		2	10000	121667
		3	10000	146667
		4	10000	168333
		5	10000	160000
	2	1	10000	153333
		2	10000	168333
		3	10000	155000
		4	10000	193333
		5	10000	165000
		6	10000	165000
	3	1	10000	141667
		2	10000	96667
		3	10000	73333
		4	10000	95000
		5	10000	103333
		6	10000	55000
	4	1	10000	96667

		2	10000	110000
		3	10000	128333
		4	10000	123333
		5	10000	138333
		6	10000	66667
	5	1	10000	363333
	5	2	10000	370000
	5	3	10000	375000
	5	4	10000	381667
	5	5	10000	393333
	5	6	10000	373333
Q	1	1	10000	250000
	1	2	10000	238333
	1	3	10000	226667
	1	4	10000	225000
	1	5	10000	200000
	1	6	10000	251667
	1	1	10000	221667
	1	2	10000	208333
	1	3	10000	230000
	1	4	10000	161667
	1	5	10000	186667
	1	6	10000	183333
	2	1	10000	170000
	2	2	10000	145000
	2	3	10000	250000
	2	4	10000	153333
	2	5	10000	163333
	2	6	10000	176667
	3	1	10000	221667
	3	2	10000	155000
	3	3	10000	183333
	3	4	10000	148333
	3	5	10000	173333
	3	6	10000	140000
	4	1	10000	36667
	4	2	10000	100000
	4	3	10000	56667
	4	4	10000	60000
	4	5	10000	68333
	4	6	10000	36667
	5	1	10000	20000
	5	2	10000	33333
	5	3	10000	13333
	5	4	10000	11667

S	1	1	10000	80000
		2	10000	158333
		3	10000	125000
		4	10000	75000
		5	10000	73333
		6	10000	98333
T	1	1	10000	106667
		2	10000	81667
		3	10000	111667
		4	10000	101667
		5	10000	91667
		6	10000	105000
	2	1	10000	113333
		2	10000	103333
		3	10000	130000
		4	10000	163333
		5	10000	171667
		6	10000	123333
	3	1	10000	25000
		2	10000	45000
		3	10000	35000
		4	10000	51667
		5	10000	53333
		6	10000	40000
	4	1	10000	310000
		2	10000	346667
		3	10000	268333
		4	10000	281667
		5	10000	280000
		6	10000	350000
5	1	10000	225000	
	2	10000	246667	
	3	10000	233333	
	4	10000	241667	
	5	10000	273333	
	6	10000	243333	
U	1	1	10000	30000
		2	10000	40000
		3	10000	25000
		4	10000	10000
V	1	1	10000	375000
		2	10000	356667
		3	10000	361667
		4	10000	348333
		5	10000	350000

		6	10000	276667
	2	1	10000	190000
		2	10000	176667
		3	10000	176667
		4	10000	178333
		5	10000	180000
		6	10000	186667
	3	1	10000	151667
		2	10000	151667
		3	10000	118333
		4	10000	128333
		5	10000	93333
		6	10000	86667
	4	1	10000	598333
		2	10000	490000
		3	10000	468333
		4	10000	458333
		5	10000	535000
		6	10000	340000
	5	1	10000	913333
		2	10000	870000
		3	10000	958333
		4	10000	953333
		5	10000	918333
		6	10000	950000
Z	1	1	10000	193333
		2	10000	141667
		3	10000	170000
		4	10000	160000
		5	10000	196667
		6	10000	140000
<b>Elutriati 1:20</b>		<b>REPLICHE</b>		
P	1	1	10000	76667
		2	10000	63333
		3	10000	80000
		4	10000	115000
		5	10000	90000
		6	10000	73333
	2	1	10000	118333
		2	10000	133333
		3	10000	111667
		4	10000	70000
		5	10000	118333
		6	10000	110000
	3	1	10000	155000

		2	10000	131667
		3	10000	171667
		4	10000	181667
		5	10000	180000
		6	10000	176667
	4	1	10000	145000
		2	10000	730000
		3	10000	125000
		4	10000	133333
		5	10000	111667
		6	10000	125000
	5	1	10000	91667
		2	10000	108333
		3	10000	91667
		4	10000	101667
		5	10000	95000
		6	10000	90000
Q	1	1	10000	110000
		2	10000	86667
		3	10000	110000
		4	10000	86667
		5	10000	121667
		6	10000	106667
R	1	1	10000	76667
		2	10000	70000
		3	10000	58333
		4	10000	91667
		5	10000	70000
	2	1	10000	176667
		2	10000	165000
		3	10000	198333
		4	10000	151667
		5	10000	200000
		6	10000	148333
	3	1	10000	90000
		2	10000	113333
		3	10000	68333
		4	10000	83333
		5	10000	91667
		6	10000	88333
	4	1	10000	115000
		2	10000	105000
		3	10000	115000
4		10000	98333	
5		10000	91667	

		6	10000	128333
	5	1	10000	33333
		2	10000	13333
		3	10000	83333
		4	10000	11667
S	1	1	10000	26667
		2	10000	41667
		3	10000	61667
		4	10000	86667
		5	10000	70000
		6	10000	71667
T	1	1	10000	210000
		2	10000	220000
		3	10000	201667
		4	10000	208333
		5	10000	100000
		6	10000	125000
	2	1	10000	141667
		2	10000	166667
		3	10000	95000
		4	10000	121667
		5	10000	68333
		6	10000	123333
	3	1	10000	493333
		2	10000	506667
		3	10000	511667
		4	10000	353333
		5	10000	513333
		6	10000	530000
	4	1	10000	320000
		2	10000	198333
		3	10000	276667
		4	10000	365000
		5	10000	348333
		6	10000	343333
5	1	10000	41667	
	2	10000	100000	
	3	10000	50000	
	4	10000	81667	
	5	10000	95000	
	6	10000	98333	
U	1	1	10000	121667
		2	10000	121667
		3	10000	131667
		4	10000	120000

		5	10000	111667
		6	10000	130000
V	1	1	10000	48333
		2	10000	60000
		3	10000	65000
		4	10000	66667
		5	10000	51667
		6	10000	58333
	2	1	10000	101667
		2	10000	111667
		3	10000	145000
		4	10000	135000
		5	10000	116667
		6	10000	115000
	3	1	10000	41667
		2	10000	60000
		4	10000	36667
		5	10000	13333
		6	10000	16667
	4	1	10000	65000
		2	10000	40000
		3	10000	60000
		4	10000	83333
		5	10000	61667
		6	10000	53333
	5	1	10000	116667
2		10000	83333	
3		10000	90000	
4		10000	86667	
5		10000	80000	
6		10000	135000	
Z	1	1	10000	136667
		2	10000	120000
		3	10000	143333
		4	10000	135000
		5	10000	120000
		6	10000	225000
<b>PW</b>		<b>REPLICHE</b>		
P1	100	1	10000	1433333
		2	10000	1400000
P2	3,13	1	10000	1433333
		2	10000	1400000
	12,5	1	10000	1033333
		2	10000	700000
	25	1	10000	66667

		2	10000	100000
	50	1	10000	66667
		2	10000	100000
	100	1	10000	100000
		2	10000	33333
Q1	12,5	1	10000	2733333
		2	10000	3033333
	25	1	10000	1633333
		2	10000	1666667
	50	1	10000	166667
		2	10000	266667
	100	1	10000	133333
		2	10000	200000
R1	25	1	10000	2333333
		2	10000	2866667
	50	1	10000	300000
		2	10000	433333
	100	1	10000	100000
		2	10000	66667
R2	50	1	10000	3833333
		2	10000	3300000
	100	1	10000	1133333
		2	10000	1500000
S1	100	1	10000	135000
		2	10000	63333
		3	10000	128333
T1	100	1	10000	43333
		2	10000	40000
T2	100	1	10000	76670
		2	10000	83333
U1	3,13	1	10000	40000
		2	10000	43333
	6,25	1	10000	53333
		2	10000	33333
	12,5	1	10000	40000
		2	10000	30000
	25	1	10000	20000
		2	10000	26667
	50	1	10000	10000
		2	10000	10000
	100	1	10000	5000
		2	10000	5000
V1	100	1	10000	63333
		2	10000	76667
		3	10000	48333

V2	25	1	10000	116670
		2	10000	100000
	50	1	10000	30000
		2	10000	20000
	100	1	10000	10000
		2	10000	10000
Z1	100	1	10000	143333
		2	10000	110000
		3	10000	110000