



Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISMAR - Istituto di Scienze Marine

U.O.S. di Ancona

Largo Fiera della Pesca, 1 - 60125 Ancona, Italy

Tel +39 071 207881 Fax +39 071 55313

segreteria@an.ismar.cnr.it - www.ismar.cnr.it

C.F. 80054330586 - P.IVA 02118311006



STUDI DI CARATTERE AMBIENTALE VOLTI A VALUTARE LE DINAMICHE E GLI EFFETTI AMBIENTALI DEI SEDIMENTI MARINI PROVENIENTI DA ESCAVI PORTUALI



III RAPPORTO

DINAMICHE DI TRASPORTO DEI SEDIMENTI, VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DRAGAGGIO SUI SEDIMENTI MARINI E SU ORGANISMI SENTINELLA (FASE IN CORSO D'OPERA)

COORDINATORE: Dott.ssa Gianna Fabi (CNR-ISMAR, Ancona)

RESPONSABILE SCIENTIFICO: Dott.ssa Alessandra Spagnolo (CNR-ISMAR, Ancona)

Rapporto a cura di : Dott.ssa Gianna Fabi (CNR-ISMAR, ANCONA)
Dott. ssa Federica Grilli (CNR-ISMAR, Ancona)
Dott. Alessio Gomiero (IRIS, Norvegia)
Dott. Elio Paschini (CNR-ISMAR, Ancona)
Dott. Pierluigi Penna (CNR-ISMAR, Ancona)
Dott. Federico Spagnoli (CNR-ISMAR, Ancona)
Dott.ssa Alessandra Spagnolo (CNR-ISMAR, Ancona)

Preparato per: AUTORITÀ PORTUALE DI ANCONA

Febbraio 2016

INDICE

1. PREMESSA	1
2. MATERIALI E METODI	2
2.1. ACQUISIZIONE DATI OCEANOGRAFICI PER LA VALIDAZIONE DEL MODELLO IDRODINAMICO.....	2
2.1.1 Analisi dei dati	2
2.2. VERIFICA DELLE DINAMICHE SUL TRASPORTO DEI SEDIMENTI LUNGO LA FASCIA COSTIERA.....	2
2.2.1 Analisi dei dati	3
2.3. VERIFICA DELLE DINAMICHE SUL TRASPORTO DEI SEDIMENTI DEL LARGO.....	3
2.3.1 Attività di laboratorio e analisi dei dati.....	5
2.4. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DRAGAGGIO SUI SEDIMENTI MARINI.....	7
2.4.1 Attività di laboratorio e analisi dei dati.....	9
2.5. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DRAGAGGIO SUI ORGANISMI SENTINELLA.....	10
2.5.1 Attività di laboratorio e analisi dei dati.....	11
3. RISULTATI	22
3.1. ACQUISIZIONE DATI OCEANOGRAFICI PER LA VALIDAZIONE DEL MODELLO IDRODINAMICO.....	22
3.2. VERIFICA DELLE DINAMICHE SUL TRASPORTO DEI SEDIMENTI LUNGO LA FASCIA COSTIERA.....	24
3.2.1 Correntometro a Nord di Ancona (Senigallia)	24
3.3. VERIFICA DELLE DINAMICHE SUL TRASPORTO DEI SEDIMENTI DEL LARGO.....	26
3.3.1 Area di sversamento	26
3.3.2 Area di escavo.....	30
3.4. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DRAGAGGIO SUI SEDIMENTI MARINI.....	32
3.4.1 Nutrienti	32
3.4.2 Metalli	35
3.4.3 Parametri chimici e fisici.....	37
3.5. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DRAGAGGIO SUI ORGANISMI SENTINELLA.....	39
3.5.1 Biomarker	39
3.5.2 Bioaccumulo di Idrocarburi totali nel segmento C5-C40, idrocarburi policiclici aromatici e metalli pesanti.....	47
4. CONCLUSIONI	52
5. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	56
ALLEGATO A - SCHEDE TECNICHE DELLA STRUMENTAZIONE UTILIZZATA NELLE INDAGINI	i

PARTECIPANTI AL PROGRAMMA

G. Fabi	CNR-ISMAR UOS Ancona	Coordinatore
A. Spagnolo	CNR-ISMAR UOS Ancona	Responsabile Scientifico
E. Paschini	CNR-ISMAR UOS Ancona	Responsabile dati oceanografici e correntometrici
M. Betti	CNR-ISMAR UOS Ancona	Raccolta dati oceanografici, analisi di laboratorio
A. Campanelli	CNR-ISMAR UOS Ancona	Raccolta dati oceanografici, analisi di laboratorio ed elaborazione
E. Frapiccini	CNR-ISMAR UOS Ancona	Raccolta dati oceanografici, analisi di laboratorio
F. Grilli	CNR-ISMAR UOS Ancona	Elaborazione dati correntometrici
S. Guicciardi	CNR-ISMAR UOS Ancona	Elaborazione dati meteo
P. Penna	CNR-ISMAR UOS Ancona	Raccolta ed elaborazione dati correntometrici e dati meteo, realizzazione database
F. Spagnoli	CNR-ISMAR UOS Ancona	Responsabile dati flussi bentici
P. Giordano	CNR-ISMAR UOS Bologna	Elaborazione dati flussi bentici
L. Borgognoni	CNR-ISMAR UOS Ancona	Elaborazione dati flussi bentici
F. Acri	CNR-ISMAR UOS Venezia	Elaborazione dati flussi bentici
G. Caccamo	CNR-ISMAR UOS Ancona	Raccolta dati flussi bentici
A. Gomiero	IRIS Norvegia	Responsabile Mussel watch, raccolta ed elaborazione dati

Hanno inoltre collaborato allo svolgimento dei campionamenti in mare i Sigg.ri G. Gaetani e A. Marziali imbarcati sulla M/R TecnoPesca II del CNR – ISMAR di Ancona utilizzata per le indagini.

1. PREMESSA

Nel presente rapporto vengono riportati i risultati relativi alla fase “durante operam” degli studi di carattere ambientale condotti dal CNR-ISMAR UOS Ancona nell'ambito dell'Accordo tra codesto Istituto e l'Autorità Portuale di Ancona (Prot. 0021161 del 27/03/2015) e riguardano in particolare la verifica delle dinamiche sul trasporto dei sedimenti del largo e lungo la fascia costiera, gli effetti del dragaggio sui sedimenti marini e sugli organismi sentinella (*Mytilus galloprovincialis*).

Tali risultati sono confrontati con quanto rilevato con le indagini integrative relative alla fase di pre-survey condotta per le operazioni di escavo della Banchina 26 del Porto di Ancona (Fabi *et al.*, 2015).

2. MATERIALI E METODI

2.1. ACQUISIZIONE DATI OCEANOGRAFICI PER LA VALIDAZIONE DEL MODELLO IDRODINAMICO

Dal 1997 è in funzione una centralina meteo posizionata sul tetto del CNR-ISMAR UOS Ancona e gestita dall'Istituto. La stazione acquisisce in continuo in tempo reale dati di velocità e direzione del vento. Nella presente relazione sono riportati i dati acquisiti dal 23 giugno al 31 agosto 2015 (periodo di escavo).

I dati del livello di marea sono stati ottenuti mediante il sensore di livello posizionato all'interno del porto di Ancona. Tali dati sono stati forniti dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale – ISPRA.

I valori di altezza/direzione dell'onda della Boa Ondametrica Nazionale (RON/ISPRA) posta al largo di Ancona non sono disponibili in quanto il sistema è inattivo dal 2006.

2.1.1 Analisi dei dati

Dopo una fase di standardizzazione e post processing è stato realizzato ed è disponibile per l'Autorità Portuale di Ancona un database in MySQL per il periodo in esame. A richiesta è anche possibile fornire i dati in formato testo (ascii) leggibile da qualsiasi software (tipo Excel). Il Database contiene tutti i dati meteo della stazione CNR-ISMAR di Ancona e tutti i dati di marea (livello) messi a disposizione dalla stazione mareografica dell'ISPRA. I dati sono memorizzati con valori giornalieri ogni 10 minuti anziché ogni 60 minuti come riportato nella Specifica Tecnica.

2.2. VERIFICA DELLE DINAMICHE SUL TRASPORTO DEI SEDIMENTI LUNGO LA FASCIA COSTIERA

In base alla Specifica Tecnica durante i lavori di escavo oltre ai dati provenienti dai 2 correntometri costieri già posizionati nella fase di pre-survey (Nord del Porto di Ancona e Baia di Mezzavalle; Fabi *et al.*, 2016) era prevista l'immersione di altri 2 correntometri posizionati a partire dall'inizio delle operazioni di escavo per la misura in continuo delle correnti marine. Uno di questi (correntometro posizionato presso il terminale SPM API) non è stato posizionato per la difficoltà di individuare un punto

di immersione tale da garantire l'incolumità dello strumento. L'altro era invece da installare nell'area interessata dalle operazioni di escavo.

Lo strumento posizionato a Nord di Ancona (bianco; ADCP, Acoustic Doppler Current Profiler della Sontex; All. A1) presso la barriera artificiale di Cesano-Senigallia ha fornito dati dal 23/06/2015 al 02/07/2015, quando è avvenuto il recupero. Il correntometro è stato quindi immerso di nuovo e, attualmente, è ancora lì. Sono state programmate 3 celle dello spessore di 4 m ciascuna a partire da 1 m dal fondo. La cella più superficiale è stata scartata perché presentava un forte rumore di fondo dovuto all'azione delle onde superficiali. Quindi sono state considerate solo 2 celle (inferiore e superiore) i cui baricentri erano rispettivamente a 3 m e 7 m dal fondo.

Il correntometro nella Baia di Mezzavalle (mod. Aanderaa ricondizionato RC200; All. 2) è stato posizionato a Portonovo presso la barriera artificiale del CNR-ISMAR il giorno 03/06/2015 ed è stato recuperato l'11/11/2015; a causa di un allagamento dello strumento non vi sono dati disponibili per questo periodo.

Il correntometro posto nell'area di escavo (mod. Aanderaa RCM7; All. A2) è stato posizionato presso la diga foranea di Ancona il giorno 09/06/2015 ed è stato recuperato il 02/11/2015. A causa di problemi tecnici legati alla presenza di biofouling i dati non sono purtroppo disponibili.

I dati disponibili sono stati utilizzati per ottimizzare il modello idrodinamico di trasporto volto a valutare la dispersione sia dei sedimenti escavati all'interno dell'area portuale sia dei sedimenti sversati nell'area di immersione in mare aperto.

2.2.1 Analisi dei dati

I dati registrati dal correntometro posizionato a Nord di Ancona sono stati processati, validati e visualizzati mediante l'utilizzo del software MATLAB.

2.3. VERIFICA DELLE DINAMICHE SUL TRASPORTO DEI SEDIMENTI DEL LARGO

Durante le operazioni di escavo e sversamento relative ai lavori condotti dall'Autorità Portuale di Ancona presso la Banchina 26 sia nell'area portuale che nell'area di escavo sono state effettuate misurazioni basilari mediante sonda CTD per caratterizzare le diverse masse d'acqua.

Nell'area di sversamento sono state condotte due campagne di misura (7 e 13 luglio 2015). Nel corso del primo survey sono state campionate n. 19 stazioni dislocate lungo 4 transetti perpendicolari a costa al di fuori dell'area di sversamento e n. 9 stazioni all'interno dell'area per un totale complessivo di 28 stazioni (fig. 1; Tab. 1), mentre nel secondo survey il campionamento si è focalizzato nell'area adiacente alle operazioni di sversamento (pallini blu in fig. 1).

In entrambi i survey in prossimità della zona di sversamento è stato posizionato un correntometro ADCP (modello Sentinel Workhorse della ditta RDInstruments; All. A4) per l'acquisizione dei dati correntometrici lungo tutta la colonna d'acqua. Le coordinate del posizionamento dell'ADCP sono riportate in Tab. 1.

Nell'area portuale di escavo il giorno 13 luglio 2015 sono state campionate n. 13 stazioni (Stazioni "P"; fig. 2; Tab. 1) di cui 5 esterne al Porto di Ancona (P09, P07, P04, P10 e P11).

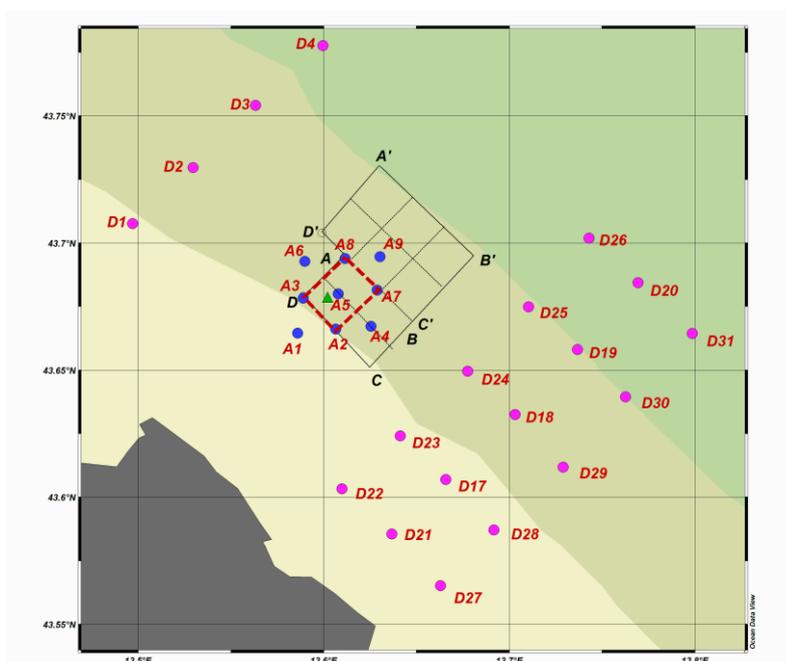


Fig. 1 - Schema delle stazioni di campionamento utilizzate durante i due survey nella zona individuata per lo sversamento dei sedimenti (area tratteggiata in rosso) e posizione del correntometro ADCP (triangolo verde).

La sonda utilizzata è della Ditta SeaBird modello SBE911plus (All. A3) equipaggiata, oltre che con i sensori standard di temperatura e conducibilità e pompa in duplice coppia, con un fluorimetro e torbidimetro ECO FLNTU della WETLabs per la misurazione della concentrazione di clorofilla a e del particolato sospeso (TSM: Total Suspended Matter), un sensore di ossigeno SBE43 per la misurazione della

concentrazione di ossigeno disciolto e un altimetro della Datasonics per la misurazione della profondità. La sonda era accoppiata a una “rosette” della General Oceanics da 12 bottiglie Niskin della capacità di 10 lt. Le sonde sono state periodicamente calibrate presso il centro di calibrazione del SACLANT della NATO di La Spezia.

Durante i tre monitoraggi sono stati misurati i seguenti parametri ambientali:

- Salinità/conducibilità;
- Temperatura;
- Ossigeno disciolto;
- Torbidità (misura del materiale sospeso);
- Fluorescenza.

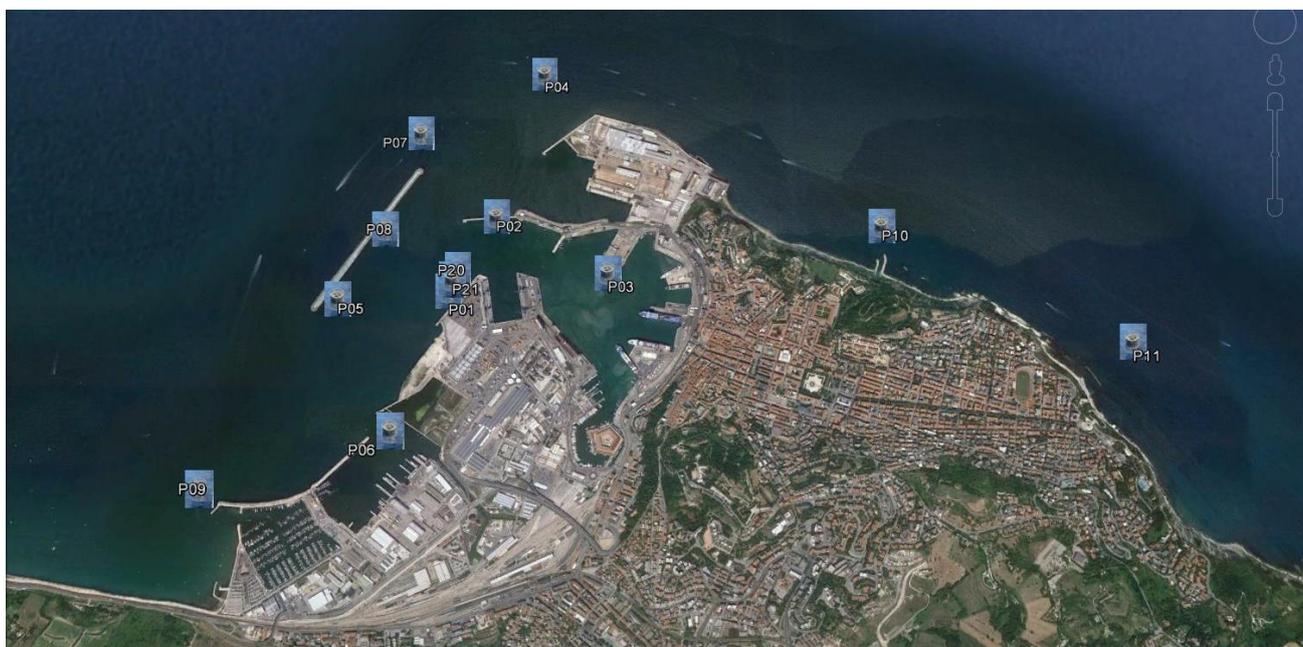


Fig. 2 - Posizione delle stazioni di campionamento effettuate durante il secondo survey (13 luglio 2015) dentro e fuori il porto di Ancona.

2.3.1 Attività di laboratorio e analisi dei dati

Per l’acquisizione e l’elaborazione dei dati registrati e raccolti tramite la sonda CTD è stato utilizzato un software fornito dalla casa produttrice seguendo le norme suggerite dall’UNESCO (UNESCO, 1988) e riportate sul manuale “Handbook of method protocols” (Artegiani, 1996); le grandezze derivate, come salinità e anomalie della densità, sono state calcolate secondo gli algoritmi dell’UNESCO (UNESCO,

1983). Infine, per l'analisi dei dati è stato utilizzato un apposito software sviluppato dal CNR-ISMAR di Ancona e la mappatura dei dati ricavati è stata effettuata con il software Ocean Data View 2015 v.4.7.4.

I dati registrati dal correntometro sono stati processati, validati e visualizzati mediante l'utilizzo del software MATLAB.

Tab. 1 – Coordinate geografiche delle stazioni di campionamento utilizzate nelle indagini idrologiche condotte sia nell'area di sversamento che di escavo e dell'ADCP.

Sito	Coordinate
A1	13°35',245 E – 43°39',987 N
A2	13°36',353 E – 43°39',898 N
D = A3	13°35',200 E – 43°40',700 N
A4	13°37',638 E – 43°40',018 N
A5	13°36',513 E – 43°40',806 N
A6	13°35',436 E – 43°41',650 N
A7	13°37',799 E – 43°40',925 N
A = A8	13°36',700 E – 43°41',700 N
A9	13°37',818 E – 43°41',676 N
D1	13°28',814 E – 43°42',462 N
D2	13°31',770 E – 43°43',782 N
D3	13°33',792 E – 43°45',246 N
D4	13°35',970 E – 43°46',662 N
D17	13°39',942 E – 43°36',426 N
D18	13°42',186 E – 43°37',956 N
D19	13°44',202 E – 43°39',486 N
D20	13°46',158 E – 43°41',064 N
D21	13°37',980 E – 43°34',540 N
D22	13°36',530 E – 43°35',490 N
D23	13°38',420 E – 43°37',150 N
D24	13°40',590 E – 43°39',040 N
D25	13°42',620 E – 43°40',480 N
D26	13°44',580 E – 43°42',090 N
D27	13°43',710 E – 43°43',960 N
D28	13°41',520 E – 43°35',090 N
D29	13°39',620 E – 43°33',590 N
D30	13°45',630 E – 43°38',540 N
D31	13°47',610 E – 43°40',110 N
P01	13 29'.600 E – 43 37'.310 N
P02	13 29'.770 E – 43 37'.520 N
P03	13 30'.220 E – 43 37'.340 N
P04	13 29'.940 E – 43 38'.010 N
P05	13 29'.170 E – 43 37'.260 N
P06	13 29'.420 E – 43 36'.870 N
P07	13 29'.440 E – 43 37'.800 N
P08	13 29'.330 E – 43 37'.480 N
P09	13 28'.740 E – 43 36'.710 N
P10	13 31'.310 E – 43 37'.490 N
P11	13 32'.240 E – 43' 37.130 N
P20	13 29'.630 E – 43'37.350 N
P21	13 29'.610 E – 43' 37.320 N
Correntometro ADCP	13 36',199 E – 43 40',857 N

2.4. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DRAGAGGIO SUI SEDIMENTI MARINI

Durante le operazioni di escavo della banchina 26 del Porto di Ancona è stata eseguita una misurazione dei flussi di sostanze disciolte naturali e/o di origine antropica (nutrienti e metalli pesanti) al fine di verificare eventuali variazioni rispetto al monitoraggio condotto durante il pre-survey (Fabi *et al.*, 2015). In fig. 3 sono riportate le stazioni di campionamento relative alle due fasi.

L'indagine è stata condotta immediatamente dopo l'azione del dragaggio (circa 12 ore dopo l'interruzione dell'attività di rimozione dei sedimenti superficiali nel punto di misura). I flussi bentici misurati in fase di escavo sono stati confrontati con quelli misurati durante il pre-survey e saranno successivamente confrontati con i flussi misurati al termine delle operazioni di dragaggio (entro 6 mesi). Lo scopo finale è di valutare le eventuali alterazioni indotte nella colonna d'acqua dal fondale del bacino interessato dal dragaggio. Da questo confronto si potranno infatti individuare e quantificare le variazioni dei flussi delle sostanze prese in esame e valutare la loro influenza sul chimismo della colonna d'acqua e sulle biocenosi dell'area portuale interessata al dragaggio.

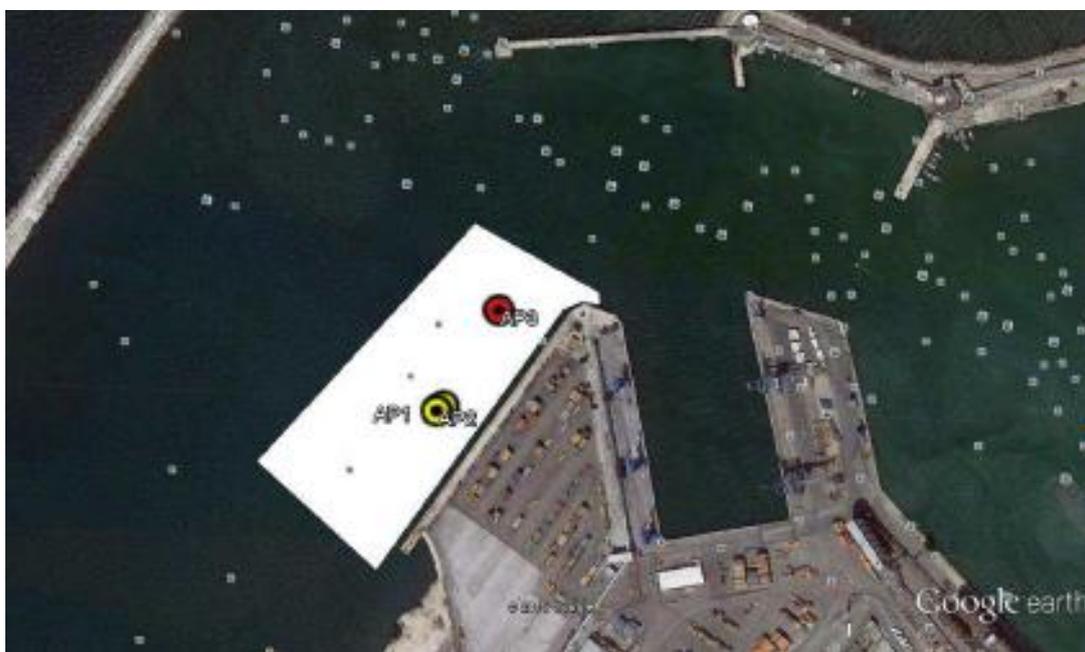


Fig. 3 - Stazioni di misura dei flussi bentici in fase ante-operam (AP1 e AP2, in giallo) e in fase di escavo (AP3, in rosso) all'interno dell'area di dragaggio.

La misura dei flussi bentici, analogamente al pre-survey, è consistita nella deposizione di una camera bentica automatica sul fondale (figg. 4 e 5) in una

stazione di misura (AP3) ubicata all'interno dell'area di escavo. Il campionamento è stato eseguito il 23/07/2015. In Tab. 2 sono indicate le coordinate delle stazioni campionate in entrambe le fasi (pre-survey e durante lavori di escavo).

Tab. 2 - Coordinate delle stazioni di campionamento AP3 (stazione di campionamento della fase di escavo) e AP1 e AP2 (stazioni di campionamento della fase ante-operam).

Stazioni	Coordinate geografiche	
	Latitudine	Longitudine
AP3	43°37.349'	13°39.641'
AP2	43°37.284'	13°29.587'
AP1	43°37.287'	13°29.593'

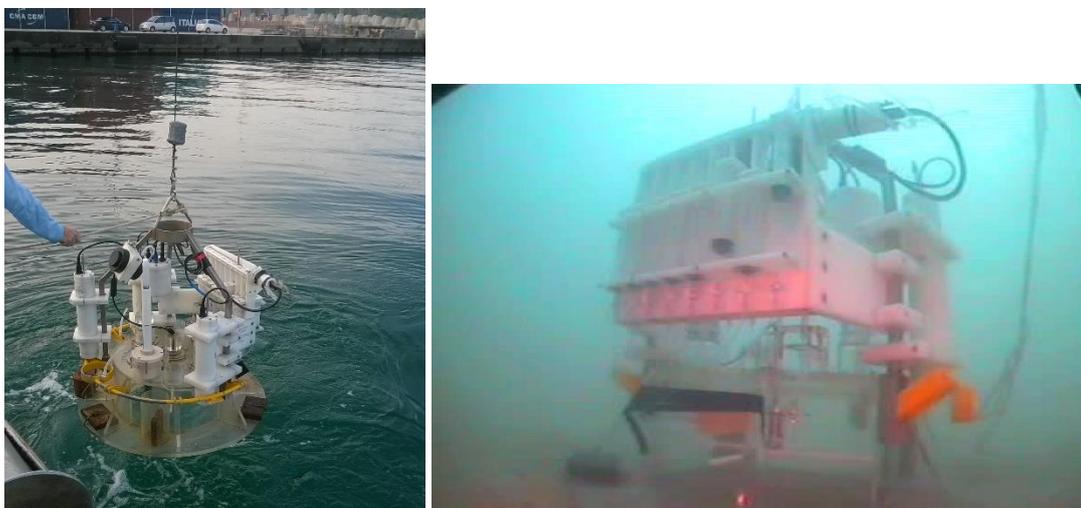


Fig. 4 - Camera bentonica automatica durante le operazioni di messa a mare (a sinistra) e in attività sul fondale (a destra).



Fig. 5 - Foto scattata dalla fotocamera installata sulla camera bentonica automatica durante l'attività sul fondale. La scarsa visibilità è dovuta all'abbondanza di materiale sospeso nella colonna d'acqua all'interno del Porto di Ancona.

La camera bentica automatica è stata posizionata sul fondale per circa 12 ore. I campioni di acqua all'interno della camera sono stati prelevati a intervalli di tempo prestabiliti (Tab. 3).

I parametri chimici e fisici (salinità, temperatura, ossigeno disciolto, pH, ORP) dell'acqua all'interno della camera bentica sono stati misurati per tutto il tempo di campionamento mediante sonda CTD Hydrolab MS5, solidale alla struttura della camera bentica automatica.

Tab. 3 - Tempi di campionamento della camera bentica automatica per la “fase di escavo”.

SIRINGHE	TEMPI INTERMEDI	TEMPI PROGRESSIVI	TEMPI PROGRESSIVI	TEMPI PRELIEVO	TEMPI PRELIEVO	TEMPO PRELIEVO	TEMPO DEPLOYMENT	AZIONI
	ORE	MIN	ORE	ORE	GIORNI	DATA	DATA	
		0	0			23/07/2014 07.01.00	23/07/2014 07.01.00	start
		0.17	0.00				23/07/2014 07.01.10	attesa 0
		0.33	0.01				23/07/2014 07.01.20	prova
	0.67	40.33	0.67				23/07/2014 07.41.20	attesa 2
0	0.10	46.33	0.77	0.00	0.00	23/07/2014 07.47.20	23/07/2014 07.47.20	prelievo 1
	1.12	113.33	1.89				23/07/2014 08.54.20	attesa 4
1	0.10	119.33	1.99	1.22	0.05	23/07/2014 09.00.20	23/07/2014 09.00.20	prelievo 2
	0.08	124.33	2.07				23/07/2014 09.05.20	attesa 6
2	0.10	130.33	2.17	1.40	0.06	23/07/2014 09.11.20	23/07/2014 09.11.20	iniezione
	1.62	227.33	3.79				23/07/2014 10.48.20	attesa 8
3	0.10	233.33	3.89	3.12	0.13	23/07/2014 10.54.20	23/07/2014 10.54.20	prelievo 3
	1.78	340.33	5.67				23/07/2014 12.41.20	attesa 10
4	0.10	346.33	5.77	5.00	0.21	23/07/2014 12.47.20	23/07/2014 12.47.20	prelievo 4
	1.78	453.33	7.56				23/07/2014 14.34.20	attesa 12
5	0.10	459.33	7.66	6.88	0.29	23/07/2014 14.40.20	23/07/2014 14.40.20	prelievo 5
	1.78	566.33	9.44				23/07/2014 16.27.20	attesa 14
6	0.10	572.33	9.54	8.77	0.37	23/07/2014 16.33.20	23/07/2014 16.33.20	prelievo 6
	1.78	679.33	11.32				23/07/2014 18.20.20	attesa 16
7	0.10	685.33	11.42	10.65	0.44	23/07/2014 18.26.20	23/07/2014 18.26.20	prelievo 7
	0.50	715.33	11.92				23/07/2014 18.56.20	attesa finale

2.4.1 Attività di laboratorio e analisi dei dati

I campioni raccolti con la camera bentica automatica sono stati divisi, in atmosfera inerte di N₂, in più aliquote per le determinazioni dei nutrienti (N-NH₃, N-NO₂, N-NO₃, P-PO₄, Si-Si(OH)₄), del carbonio inorganico totale disciolto (DIC), del metano e dei metalli (Al, As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Cu, V, Zn). I campioni destinati alle analisi dei nutrienti sono stati congelati a -20°C subito dopo la suddivisione in aliquote; i campioni per la determinazione del DIC sono stati avvelenati con HgCl (0,02% v:v di soluzione satura) e conservati a +4°C; i campioni per la determinazione dei metalli sono stati acidificati con acido nitrico suprapuro (0,5% v:v) e conservati a +4°C; il

metano è stato misurato al momento del campionamento con un sensore Franatech.

Dalle concentrazioni delle specie ioniche analizzate nei campioni di acqua raccolti in tempi diversi e rapportati al volume e all'area della camera bentica, sono stati calcolati i flussi bentici in termini di millimoli (mmol) per metro quadro (sqm) per giorno (d), per i nutrienti, e in termini di micromoli (μmol) per metro quadro per giorno, per i metalli.

La formula applicata è la seguente:

$$F_i = (C_f - C_0 \cdot h) / (T_f - T_0)$$

Dove:

F_i è il flusso del composto chimico i in millimoli per metro quadro per giorno ($\text{mmol}/\text{sqm} \cdot \text{d}$);

C_f è la concentrazione del composto chimico i misurata al tempo f ;

C_0 è la concentrazione del composto chimico i misurata al tempo 0;

h è l'altezza della camera bentica automatica;

T_f è il tempo f ;

T_0 è il tempo iniziale dell'esperimento.

La misura dei parametri chimici e fisici all'interno della camera bentica ha permesso di calcolare anche il flusso bentico di ossigeno disciolto.

Venezia. Le analisi per i nutrienti sono state eseguite con l'analizzatore colorimetrico automatico EasyChem Plus della Systea S.p.A., seguendo il metodo proposto da Hansen e Koroleff (1999).

I metalli sono stati analizzati nel laboratorio ACTLAB (Ontario, Canada) mediante ICP-MS.

Il DIC è stato analizzato seguendo il metodo proposto da Dickson (2007) e modificato da Spagnoli (dati non pubblicati).

2.5. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DRAGAGGIO SU ORGANISMI SENTINELLA

Al fine di verificare gli eventuali effetti indotti dalle operazioni di dragaggio sugli organismi sentinella, il giorno 13/05/2015 sono stati prelevati n. 3 campioni di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) dalla baia di Portonovo. Ogni campione era composto da circa 100 esemplari. Uno è stato utilizzato come "controllo" ed è stato subito analizzato per verificare lo stato degli organismi al "tempo 0" (T_0), mentre gli altri due sono stati trapiantati tramite gabbie all'interno del Porto di Ancona, uno in corrispondenza dell'area di escavo (banchina 26) e l'altro in un'area interna al porto non interessata dalle attività di dragaggio (banchina 4; fig. 6). Lo scopo di

quest'ultimo campione era di poter discriminare, nella fase dei lavori di escavo, tra gli eventuali impatti sugli organismi determinati dal dragaggio e quelli indotti invece da altre attività portuali indipendenti dalle operazioni previste.

Ogni campione è stato suddiviso in due subcampioni di circa 50 esemplari cadauno, uno per analisi biologiche e uno per analisi chimiche.

Dopo 30 gg dall'immersione (dunque durante le operazioni di escavo) i campioni immersi nel porto sono stati prelevati per le successive analisi di laboratorio. In contemporanea al prelievo sono stati anche campionati altri 100 esemplari da Portonovo (controllo "T30").

Le misure biometriche dei quattro campioni erano le seguenti:

Controllo "T0": $5,21 \pm 0,50$ cm LC

Controllo "T30": $5,30 \pm 0,55$ cm LC

Banchina 26: $5,26 \pm 0,55$ cm LC

Banchina 4: $5,73 \pm 0,56$ cm LC



Fig. 6 - Siti utilizzati per posizionare le gabbie contenenti gli esemplari di mitili presso banchine 26 e 4.

2.5.1 Attività di laboratorio e analisi dei dati

Biomarker

I Biomarker analizzati sono riportati in Tab. 4.

Tab. 4 - Lista di biomarker proposti su *M. galloprovincialis* per la valutazione degli effetti biologici associati alle attività di dragaggio nel Porto di Ancona.

Indice	Rilevanza ecologica	Livello biologico	Target biologico	Significato tossicologico
Mortalità	Endpoint di alto livello	Individuo	Intero organismo	Indice di effetto generico
Stabilità delle Membrane lisosomiali	Endpoint subletale di basso livello	Sub cellulare - istochimico	Ghiandola digestiva	Indice di effetto generico
Accumulo lisosomiale di Lipofuscine	Endpoint subletale di basso livello	Sub cellulare - istochimico	Ghiandola digestiva	Indice di esposizione a specie ossigeno reattive (stress ossidativo)
Accumulo lisosomiale di Lipidi Neutri	Endpoint subletale di basso livello	Sub cellulare - istochimico	Ghiandola digestiva	Indice di esposizione a sostanze organiche
Rapporto volume lisosomi/citoplasma	Endpoint subletale di basso livello	Sub cellulare	Ghiandola digestiva	Indice di effetto generico
Attività dell'enzima di catalasi	Endpoint subletale di basso livello	Sub cellulare - Biochimico	Ghiandola digestiva	Indice di esposizione a specie ossigeno reattive (stress ossidativo)
Livelli di proteine metallo-chelanti (metallotioneine)	Endpoint subletale di basso livello	Sub cellulare - Biochimico	Ghiandola digestiva	Indice di esposizione a metalli
Frequenza di micronuclei	Endpoint subletale	Individuo	Cellule dell'emolinfa	Indice di stress genotossico
Espressione genica dei geni codificanti induzione alla sintesi di metallotioneine	Endpoint subletale	Sub cellulare - genomico	Ghiandola digestiva	Indice di esposizione a metalli
Valutazione dei livelli di composti aromatici per via immunofluorescente	Endpoint subletale	Sub cellulare - Istochimico	Ghiandola digestiva	Indice di esposizione a composti aromatici

Mortalità – La mortalità nelle gabbie è stata misurata registrando il numero di conchiglie vuote e individui che, dopo il periodo di traslocazione di 30 gg e la successiva fase di prelievo, mantenevano aperte le valve anche in ambiente subaereo.

Stabilità delle membrane lisosomiali - Le ghiandole digestive di 5 mitili provenienti da ciascun sito sono state tagliate con criostato (All. A5) in modo tale da ottenere delle sezioni trasversali dei tubuli disposti parallelamente all'asse longitudinale della ghiandola stessa e poste in fila su apposito supporto in alluminio (chuck) precedentemente raffreddato in ghiaccio. Successivamente, il supporto con i frammenti è stato posto per 15" in un piccolo recipiente contenente N-esano, già raffreddato con azoto liquido. Il chuck è stato poi avvolto in 4-5 strati di Parafilm e posto immediatamente a -80°C. Al momento dell'analisi, per mezzo di un criostato, sono state ottenute sezioni di 10-20 µm di spessore con un'angolazione di taglio di 15°. Le sezioni sono state quindi trasferite su vetrini tenuti a temperatura ambiente. La stabilità della membrana lisosomiale è stata testata attraverso l'enzima N-acetylhexosaminidase che ha come substrato il naphthol As-BI N-acetyl-β-D-glucosaminide.

Le sezioni preparate come descritto in precedenza sono state trattate in una

vaschetta di Hellendal con un tampone destabilizzante le membrane lisosomiali a 37°C per tempi diversi (0, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40') in modo da determinare il tempo di trattamento richiesto per labilizzare interamente le membrane lisosomiali (periodo di labilizzazione). Il set di vetrini è stato trasferito nel mezzo di incubazione del substrato contenente naphthol As-BI N-acetyl- β -D-glucosaminide precedentemente disciolto in 2,5 ml di 2-metossietanolo e portato a volume con il tampone citrato contenente Polipep, un polipeptide a bassa viscosità che agisce come stabilizzante per le sezioni. L'incubazione con il substrato è stata di 20' a 37°C nella vaschetta di Hellendal in un bagno agitante. I vetrini sono stati successivamente risciacquati in acqua di mare filtrata a temperatura ambiente o in una soluzione di NaCl al 3% a 37°C per 2' prima del loro trasferimento per 10' a temperatura ambiente in un tampone fosfato pH 7,4 contenente il colorante diazoinico fast violet B blue. I vetrini, risciacquati in acqua corrente per 5', sono stati successivamente fissati con gelatina glicerinata. Le sezioni così ottenute sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine al microscopio ottico (All. A6) per la determinazione del periodo di labilizzazione lisosomiale. Le analisi sono state eseguite almeno in quintuplicato.

Accumulo lisosomiale di lipofuscine - Le sezioni di 5 individui provenienti da ciascun sito preparate al criostato (All. V) sono state fissate in calcio-formolo a 4°C, risciacquate in acqua distillata e poste nel mezzo di reazione contenente cloruro di ferro e potassio ferrocianuro per 5'. Successivamente, sono state lavate in acido acetico, risciacquate in acqua, montate su vetrino ed analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine al microscopio ottico (All. A6) per la determinazione della colorazione dei lisosomi dovuta all'accumulo di lipofuscine.

Accumulo lisosomiale di lipidi neutri - Le sezioni, derivanti da 5 individui per ciascun sito preparate al criostato (All. V) con la stessa modalità seguita per la valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali, sono state fissate in calcio-formolo per 15' a 4°C, risciacquate in acqua distillata e poste in una soluzione di trietilfosfato. Successivamente sono state colorate con una soluzione di oil red in trietilfosfato a 20°C per 15', lavate in trietilfosfato per 30", risciacquate in acqua distillata e montate con gelatina.

Le sezioni così ottenute sono state analizzate al microscopio ottico (All. A6) mediante un sistema di analisi d'immagine che determina la percentuale di colorazione dei lisosomi dovuta all'accumulo dei lipidi neutri insaturi.

Rapporto volume lisosomi / citoplasma - I dati ottenuti da analisi di tipo

quantitativo possono essere associati a quelli della citochimica qualitativa tramite l'analisi di immagine. Con questo sistema computerizzato, l'immagine del preparato in esame viene digitalizzata tramite un collegamento tra microscopio ottico e computer. Ciò permette di quantificare direttamente su sezioni istologiche il preparato in esame, preservando sia la localizzazione dell'enzima che le sue caratteristiche biochimiche.

La procedura si basa sulla legge di Lambert-Beer che mette in relazione la concentrazione del precipitato (c) con l'assorbanza (A):

$$A = \text{Log } I_0/I = klc$$

Dove I_0 ed I sono rispettivamente l'intensità del raggio incidente e di quello trasmesso, l il percorso del raggio nel campione e k la costante massima di assorbanza.

Il raggio incidente (I_0) colpisce il campione e viene trasmesso (I) a una telecamera che forma l'immagine. Questa viene poi digitalizzata da una convertitore analogico, cioè trasformata in un valore numerico discreto ed immagazzinata nel computer in un sistema binario che formerà una matrice. L'elemento di questa matrice è il pixel, cioè il più piccolo dettaglio rilevabile dell'immagine, e il suo valore rispecchia la densità ottica in quel punto.

La matrice che viene a formarsi è costituita da 600 pixel verticali e 800 orizzontali, che rispecchiano la risoluzione dell'immagine digitalizzata. Più pixel sono presenti in una matrice, maggiore sarà la risoluzione e quindi la nitidezza dell'immagine. Generalmente i pixel possono assumere valori compresi fra 0 e 255, rispecchiando in tal modo 256 toni di grigio.

Una volta scelta la soglia dei toni di grigio la relazione tra l'intensità della luce trasmessa e il livello di grigio permette di quantificare la densità del precipitato in esame, che risulta direttamente proporzionale alla sua concentrazione.

Per le analisi d'immagine necessarie alla quantificazione del rapporto lisosomi / citoplasma cellulare sono state sequenzialmente determinate le superfici (in pixels) del microtubulo della ghiandola digestiva dell'esemplare analizzato, rapportato alla superficie dei soli lisosomi (in pixel). Per ogni campione (sito) sono state analizzate almeno 10 immagini e un totale di 30-40 microtubuli.

Attività dell'enzima di catalasi - Tale attività è stata determinata in aliquote di ghiandola di mitilo (3 pool di 5 individui per ogni sito) preventivamente lavate con una soluzione di NaCl (0,9%), omogeneizzate in 4 volumi di tampone Tris-HCl pH 7,4 contenente saccarosio e infine centrifugate (All. A7), prima a 2.000 x g per 10'

per eliminare la frazione lipidica, e successivamente a 9.000 x g per 30' per ottenere la frazione citosolica. L'attività dell'enzima di catalasi è stata determinata per via spettrofotometrica (Aebi, 1974; All. A8) a 240 nm valutando la diminuzione in assorbanza dell'estratto dovuta al consumo di H₂O₂.

Livelli di proteine metallo-chelanti (metallotioneine) - Al momento dell'analisi i tessuti (3 pool di 5-7 individui per ogni sito) sono stati omogeneizzati in 3 volumi di Saccoroso/Tris-HCl addizionati di Leupeptina e β-mercaptoetanololo. L'omogenato è stato quindi centrifugato (All. A7) per ottenere una frazione solubile contenente le metallotioneine. Il sopranatante è stato successivamente precipitato con etanolo-cloroformio con il duplice scopo di rimuovere i tioli a basso peso molecolare e concentrare le metallotioneine; 1 ml di citosol è stato quindi addizionato con 1,05 ml di etanolo freddo e cloroformio e centrifugato a 6.000 x g per 10'. Il sopranatante così ottenuto è stato addizionato di 3 volumi di etanolo freddo e mantenuto a -20°C per 1 h e quindi centrifugato a 6.000 x g per 10' in rotore oscillante. Il pellet è stato lavato una volta con etanolo e cloroformio nel buffer di omogeneizzazione, ricentrifugato, insufflato con azoto e risospeso in NaCl 0,25 M addizionato di 150 µl di HCl e EDTA. Ai campioni così risospesi è stato aggiunto DTNB (acido ditiobisnitrobenzoico) preparato al momento dell'uso e quindi sono stati centrifugati a 3.000 x g. L'assorbanza è stata valutata per via spettrofotometrica (All. A8) misurandola a 412 nm.

Frequenza di micronuclei - L'allestimento dei preparati citologici è stato effettuato direttamente sul campione fresco lo stesso giorno di arrivo in laboratorio. L'emolinfia di ogni individuo (per un totale di 5 esemplari per campione) è stata prelevata dal muscolo adduttore posteriore con una siringa contenente Alsever (soluzione salina al 33‰ composta di NaCl, Na citrato x 2H₂O, acido citrico x 1H₂O e glucosio a pH fisiologico). Alcune gocce della sospensione cellulare, fissata in metanolo:acido acetico, sono state posizionate su vetrino e colorate con Giemsa.

Per ogni mitilo sono state osservate al microscopio ottico (All. A6) circa 2000 cellule di emociti e su queste sono state determinate le frequenze di micronuclei e delle anomalie nucleari (Ottaviani e Franceschini, 1997).

Espressione genica dei geni codificanti induzione alla sintesi di metallotioneine (Real Time PCR (q-PCR)) - L'amplificazione del DNA costituisce una tecnica d'indagine consolidata in campo biomedico e solo di recente è stata implementata con tecniche innovative per lo studio della qualità degli ambienti

marini. La tecnica di Real Time PCR consente di monitorare e quantificare una molecola target mentre la reazione biochimica che le produce la sua amplificazione è in corso. La metodologia prevede l'amplificazione selettiva e quantificazione in vitro di una sequenza di DNA target. Ciò è reso possibile dall'impiego di diversi prodotti chimici fluorescenti detti *reporter* che correlano l'amplificazione con l'intensità della fluorescenza (Higuchi *et al.*, 1993). La reazione di una classica PCR ad un certo numero di cicli giunge a plateau; ciò solitamente è indipendente dalla quantità iniziale di templati. Il sistema giunge a plateau per un ampio raggio di DNA di partenza. Grazie alla PCR quantitativa si può, quindi, monitorare la quantità di DNA prima del plateau, durante la fase esponenziale di crescita, per risalire alla quantità di template di partenza.

Con particolare riferimento all'ambiente marino la q-PCR può essere utilizzata per quantificare l'espressione di geni funzionali considerati bioindicatori.

In particolare nella presente esperienza di monitoraggio è stata prevista l'estrazione del RNA dalle cellule delle ghiandole digestive di mitilo, la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA e infine l'amplificazione del cDNA tramite PCR. In questo caso, rispetto alla sequenza completa rappresentata dall'intero RNA, il metodo di studio si è focalizzato sulla quantificazione di due sequenze geniche, MT₁₀ ed MT₂₀, responsabili della sintesi delle proteine metallo-chelanti "metallotioneine" (Dondero *et al.*, 2005).

La tecnologia di q-PCR adottata ha previsto:

- l'utilizzo di fluorocromi intercalanti del DNA tipo SYBR Green, una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA a doppio filamento (eccitazione/emissione massima a 494/521 nm);
- l'impiego di sonde a idrolisi tipo "TaqMan". Questa fase consiste in una sequenza oligonucleotidica che, come i primers della PCR, viene disegnata per essere complementare alla sequenza bersaglio del gene da amplificare. Tale sequenza presenta all'estremità 5' un fuorofooro "reporter" come HEX (esacloro-6-carbossifluorescina) e all'estremità 3' una molecola "quencher" rappresentata dal TAMRA (6-carbossitetrametilrodamina);
- l'uso di acqua RNA-se e DNA-se free.

Operativamente, 0,1 gr di ghiandola digestiva è stato omogenato in Trizol e incubato a temperatura ambiente per 5' per favorire la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Sono stati quindi aggiunti 100 µl di cloroformio e dopo 3' l'estratto è stato centrifugato (10.000 x g per 5' a 4°C; All. A7) realizzando una separazione in

due fasi: una inferiore arricchita in fenolo rosso e una superiore acquosa contenente l'RNA. La fase acquosa è stata trasferita in una eppendorf e l'RNA raccolto è stato concentrato mediante precipitazione per mezzo di trattamenti sequenziali a base di alcool isopropilico ed etanolo (75%) seguiti da centrifugazione a 10.000 x g per 10' a 4°C. Il surnatante ottenuto è stato quindi eliminato e il pellet depositato sul fondo della provetta è stato risospeso in 100 mM sodio acetato ed etanolo (100 %). Il passaggio successivo ha previsto la purificazione attraverso trattamento con LiCl (8M), incubato a -20°C per 30' e centrifugato a 20.000 x g per 30'; il surnatante è stato quindi eliminato. Il pellet così ottenuto è stato nuovamente risospeso in etanolo (75%) per la fase di analisi o conservato a -20°C. E' seguita la quantificazione dell'RNA ottenuto tramite lettura a diverse bande come $\lambda = 230, 260$ e 280.

Per la fase successiva di sintesi del cDNA sono stati prelevati 0,1 g di RNA totale, incubato a 70° C per 5' con appropriate quantità di oligoTprimers. Successivamente, sono stati aggiunti in rapida sequenza il tampone di reazione, il mix di desossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), l'acqua deionizzata nuclease free, e il RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase[®]. E' stato quindi impostato il seguente ciclo termico di PCR:

- 1 Incubazione della miscela a 37°C per favorire l'annealing degli oligo(d)T;
- 2 incubazione a 40°C per 40-60';
- 3 incubazione a 50°C per 20';
- 4 interruzione della reazione tramite riscaldamento a 70°C per 10';
- 5 raffreddamento;

Alla fine della reazione di amplificazione, l'analisi dei risultati è stata operata attraverso il metodo comparativo cicli soglia. Dall'analisi delle curve di amplificazione sono stati desunti i parametri fondamentali alla quantificazione delle molecole inizialmente presenti nel campione come il ciclo soglia e la linea soglia di reazione.

L'efficienza della reazione di PCR è stata valutata tramite i cambiamenti di espressione genica del campione sulla base di un controllo esterno attraverso un campione di riferimento e un gene di riferimento (house-keeping), la cui espressione mantiene gli stessi livelli indipendentemente da variazioni ambientali (Livak e Schmittingen, 2001).

Valutazione dei livelli di composti aromatici per via immunofluorescente - Le ghiandole digestive di 5 mitili provenienti da ciascun sito sono state tagliate in modo tale da ottenere delle sezioni trasversali dei tubuli disposti parallelamente all'asse longitudinale della ghiandola stessa e poste in fila su apposito supporto in alluminio.

Al momento dell'analisi, per mezzo di un criostato (All. A5), sono state ottenute sezioni di 25 μm di spessore con un'angolazione di taglio di 15°. Le sezioni sono state quindi trasferite su vetrini tenuti a temperatura ambiente. La presenza di composti aromatici nelle cellule delle ghiandole digestive dei mitili analizzati stata testata su sezioni di tessuto sciacquate tre volte da una soluzione di Hanks e stabilizzate in una soluzione di bloccaggio e permemabilizzazione costituita da 5% Triton X-100, 2% BSA, 0,5% siero di coniglio in soluzione di Hanks e successivamente incubate a 4 C con anticorpo primario monoclonale (Santa Cruz Biotechnology) 1/100 per 8h al buio e successivamente con anticorpo secondario anti IPA policlonale DyLight 594 (AbCAM) in concentrazione 1/100 per un ulteriore ora, al buio ed a 20 C. Le sezioni così trattate sono state risciacquate in soluzione di Hanks e montate in Mowiol. Dalle 10 alle 20 immagini per ogni vetrino sono state acquisite e analizzate tramite un software per l'analisi d'immagine. I risultati sono espressi come densità ottica / pixels².

Idrocarburi Policiclici Aromatici

Gli esemplari di mitilo sono stati scongelati e le parti molli sono state separate dalla conchiglia in maniera tale da ottenere circa 50 g di peso umido per ciascun sito. Gli organismi, così suddivisi e selezionati, sono stati pesati in un contenitore di vetro senza coperchio, previamente tarato, pulito con solventi (acetone, esano) e asciugato per evitare qualsiasi tipo di contaminazione. Successivamente, le parti molli in questi contenitori sono state liofilizzate fino a completa essiccazione (processo che avviene in circa 3-5 gg) e poi pesate.

L'intero processo analitico la determinazione degli IPA è stato diviso in tre fasi distinte: estrazione e isolamento dei contaminanti dalla matrice, purificazione dell'estratto, determinazione analitica finale del composto.

I campioni di mitili liofilizzati (3 g) sono stati sottoposti ad una tecnica basata su estrazione in apparato Soxhlet (All. A8) a 120°C per 8 h, evaporati a 50°C per la determinazione della Materia Organica Estratta (MOE) e successivamente ripresi e purificati su colonna allumina/gel di silice. La purificazione e la separazione degli estratti è stata effettuata su colonna di gel di silice e sodio solfato anidro (Na₂SO₄) (attivati a 130°C per 24 h). La colonna è stata eluita con 32 ml di esano, seguiti da 15 ml di una soluzione esano:diclorometano (1:1 v/v). Durante le analisi dei campioni sono state effettuate prove in bianco. La frazione contenente gli IPA è stata concentrata sotto blando flusso d'azoto per il raggiungimento di un volume

finale di circa 0,5 ml, trasferita in acetonitrile e impiegata per la determinazione analitica degli IPA. La determinazione qualitativa e quantitativa degli IPA è avvenuta mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) con rivelatore a serie di fotodiodi (Waters® PDA 996) e con rivelatore a fluorescenza (Waters® 474 Scanning Fluorescence Detector) in serie (All. A9). Per quanto riguarda le condizioni di corsa, la fase mobile iniziale è costituita da acetonitrile (40%) ed acqua (60%), fino al raggiungimento di un gradiente lineare al 100% di acetonitrile, ad una velocità di corsa di 1,5 ml min⁻¹ per 50'. È stata usata una colonna cromatografica Supelcosil LC-PAH HPLC (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) (All. A9a).

La formula finale per il calcolo della concentrazione degli analiti è la seguente:

$$C \text{ (ng/l)} = \frac{\text{Area picco} \times \text{Conc Std} \times \text{vol finale}}{\text{Area picco Std} \times \text{g. Peso secco}}$$

Con area si intende l'area dei picchi risultati nel cromatogramma. Il risultato finale è espresso in ng g⁻¹ di tessuto liofilizzato.

Le rette di taratura sono state ottenute iniettando quattro soluzioni a concentrazione nota dello standard TLC Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Mix (Supelco), contenente i 16 composti considerati inquinanti prioritari previsti dall'EPA: Naftalene, Acenaftilene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benzo(a)Antracene, Crisene, Benzo(b)Fluorantene, Benzo(k)Fluorantene, Benzo(a)Pirene, Dibenzo(a,h,)Antracene, Benzo(g,h,i,)Perilene e Indeno(1,2,3-c,d)Pirene.

Idrocarburi totali

La tecnica d'indagine si basa sull'applicazione integrale dei metodi USEPA 3550c rev. 3 – 2007 e 8015c rev. 3 – 2000.

Una quantità nota di campione (5-10 g di parti molli) è stata dapprima liofilizzata e successivamente estratta mediante sonicazione a freddo per 60' con 50 ml di acetone/n-eptano (1:1 v/v). Nella soluzione estraente è stata aggiunta la soluzione di riferimento per la finestra dei tempi di ritenzione contenente n-pentano (C₅), n-dodecano (C₁₂) e n-tetracontano (C₄₀). L'estratto è stato purificato su colonna di Florisil. Un'aliquota dell'estratto purificato è stato analizzato in GG-FID. In particolare, è stata misurata l'area totale dei picchi presenti nell'intervallo delimitato dalle tre soluzioni di riferimento C₅, C₁₂ e C₄₀. La quantità di idrocarburi è stata quindi

determinata mediante confronto con la soluzione di riferimento esterno costituito da quantità uguali di tre standard. Ulteriormente, sono state disposte prove in bianco per ogni serie di analisi al fine di identificare la baseline.

Metalli pesanti

Due aliquote di circa 2,5 g di campione liofilizzato per ogni sito di prelievo sono state mineralizzate a reflusso con 30 ml di acido nitrico concentrato. I campioni, posti in un apposito pallone da 250 ml, sono stati sottoposti a digestione a freddo per 20-30' e portati ad ebollizione per circa 2 h in forno a microonde *ETHOS 900*[®] della *Milestone* (All. A10). La mineralizzazione è stata eseguita secondo la procedura ICRAM (2001).

Le soluzioni risultanti sono state filtrate attraverso un filtro di cellulosa e portate a un volume di 100 ml con acqua MilliQ. Un simile procedimento è stato effettuato anche con un'uguale quantità di acido per ottenere il bianco da sottrarre ai valori dei campioni ottenuti per via strumentale.

La determinazione strumentale di **alluminio**, **vanadio**, **cadmio**, **cromo**, **nicel**, **rame** e **piombo** è avvenuta mediante spettrofotometria di assorbimento atomico in fornello di grafite (*GF-AAS*), una tecnica molto sensibile per la determinazione di questi elementi generalmente presenti in concentrazioni minori. Come gas di trasporto è stato utilizzato l'argon. Per le analisi ci si è avvalsi di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico *AAnalyst 700*[®] della Perkin Elmer in configurazione Autosampler AS40[®] – Mercury/Hydride System MHS-10[®] (All. A11). Lo **zinco** è stato analizzato direttamente in fiamma aria-acetilene (*F-AAS*) con lo stesso strumento e quantificato da una curva di calibrazione costruita da concentrazioni note dell'elemento. La temperatura della fiamma a cui avviene l'atomizzazione è di 2300°C.

Il **mercurio** è stato determinato mediante analisi dei vapori ottenuti per riduzione a freddo con NaBH₄ (*HG-AAS*) secondo la seguente reazione:



I campioni sono stati pre-trattati con H₂SO₄ e K₂MnO₄ in modo da ossidare la sostanza organica. La reazione con NaBH₄ riduce il mercurio presente in forma ionica a mercurio metallico il quale, assieme all'idrogeno gassoso liberato dalla reazione, viene trasportato dal flusso di gas inerte nella cella al quarzo dove è stata misurata la sua assorbanza tramite il *Flow Injection Mercury System FIMS 400*[®]

della Perkin-Elmer (All. A11a). Per evitare assorbimenti di tipo molecolare, nelle analisi che richiedono lunghezze d'onda nella zona dell'ultravioletto è stato impiegato il correttore di fondo al deuterio.

La metodica seguita per la determinazione di Hg, Cr, Cd e Pb è quella delle aggiunte, secondo la quale aliquote uguali di standard sono state addizionate ai campioni al fine di misurare l'assorbanza delle soluzioni così ottenute e calcolare il valore della concentrazione. Il dosaggio dell'**arsenico** è stato ottenuto in HG-AAS utilizzando il *Flow Injection Analysis System FIAS 400*[®] di Perkin Elmer con lettura in GF-AAS e correttore di fondo Zeeman, 4100 ZL, Perkin-Elmer (All. A11Bb).

Le lunghezze d'onda utilizzate per i singoli metalli analizzati sono riportate in Tab. 5.

Tab. 5 – Lunghezze d'onda utilizzate per i metalli analizzati.

	Lunghezze d'onda
Al	308,215
As	193,696
Cd	226,502
Cr	267,716
Hg	194,227
Ni	231,604
Pb	220,353
Cu	324,754
V	292,402
Zn	213,856

Composti organo stannici: Mono-, Di- e Tributil-stagno

La tecnica d'indagine si basa sull'applicazione integrale del metodo in Appendice I, "Metodo per la determinazione di composti organostannici in sedimenti e matrici biologiche tramite GC-MS e GC-FPD", ICRAM APAT (2001). In dettaglio, il metodo prevede il prelievo di 0,1-0,5 g di parti molli, trattamento con tropolone in metanolo e HCl 37%, separazione degli estratti mediante centrifugazione e ripartizione liquido-liquido con CH₂Cl₂ e NaCl, evaporazione del solvente mediante evaporatore rotante, trasferimento dell'estratto in fiala con diclorometano e isoottano, evaporazione del solvente sino quasi a secchezza sotto un debole flusso di azoto. Successivamente viene effettuata derivatizzazione con PeMgBr 2M in etere dietilico, distruzione dell'eccesso del reattivo con acqua con H₂SO₄ ed estrazione degli analiti con esano. Si procede con il lavaggio degli estratti con due aliquote di NaHCO₃, concentrazione a 0,5 ml sotto un debole flusso di azoto, successiva purificazione con gel di silice o Florisil, eluizione tramite una soluzione esano-toluene 1:1. Infine avviene la preconcentrazione e l'analisi in GC-MS.

3. RISULTATI

3.1. ACQUISIZIONE DATI OCEANOGRAFICI PER LA VALIDAZIONE DEL MODELLO IDRODINAMICO

Nel periodo precedente alle operazioni di escavo era stata registrata una netta prevalenza del vento di provenienza S e S-SW (vento da terra) con bassa intensità, per lo più inferiore a 2-4 m/s. Velocità del vento più elevate (inferiore a 8-10 m/s) erano state registrate nei settori NE-ENE ma con minore frequenza (Fabi *et al.*, 2016).

Il diagramma a rosa riferito al periodo durante le operazioni di escavo (fig. 7) ha mostrato, a differenza del periodo precedente, una mancanza di venti di intensità elevate compresi fra 6 e 10 m/s e una prevalenza del vento di provenienza S, S-SW e N.

L'andamento del livello idrometrico è risultato compreso fra -0,4 m e +0,2 m (fig. 8), mentre nel pre-survey era risultato compreso tra -0,4 m e +0,4 m con tre picchi registrati nel mese di marzo (fig. 9; Fabi *et al.*, 2016).

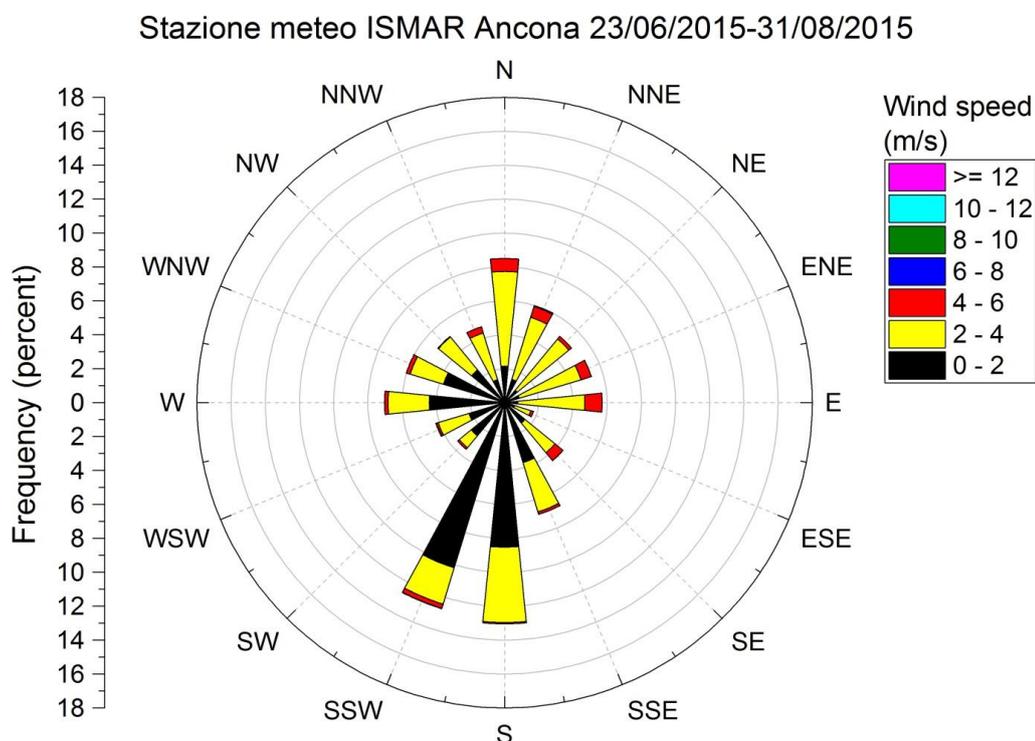


Fig. 7 – Diagramma a rosa della velocità e frequenza della direzione del vento (dati ogni 10 minuti) della stazione meteo di Ancona dal 23/06/15 al 31/08/15 (periodo durante le operazioni di escavo).

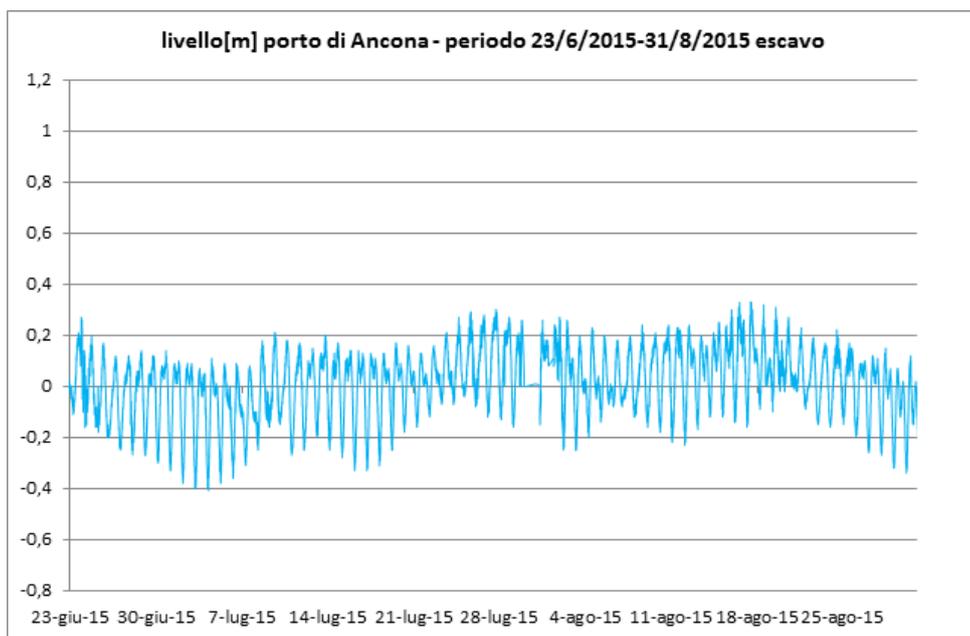


Fig. 8 – Variazione del livello idrometrico (m) all'interno del porto di Ancona dal 23/06/15 al 31/08/15 (dati ogni 10 minuti, fonte ISPRA), periodo durante le operazioni di escavo.

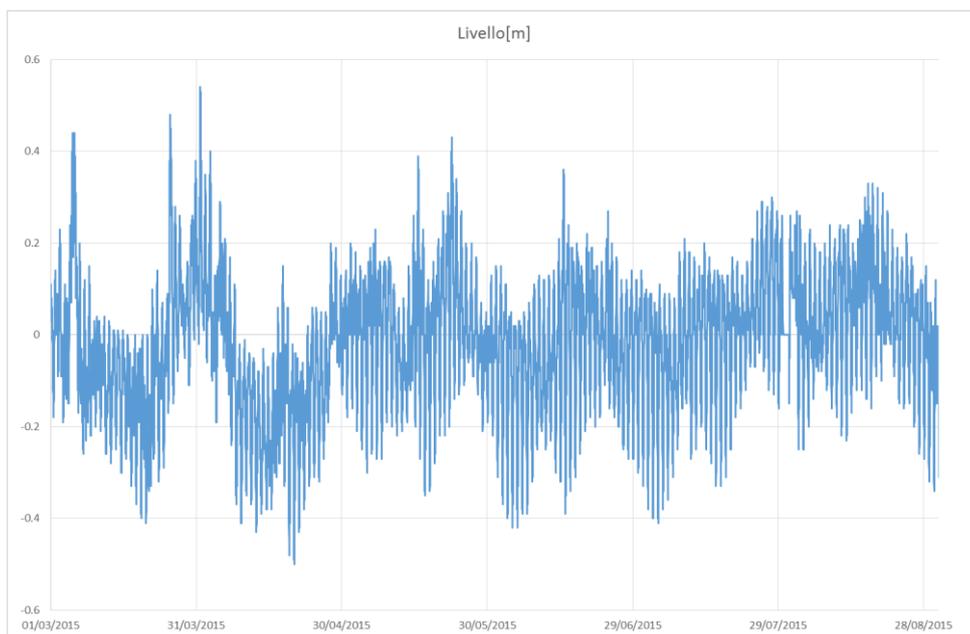


Fig. 9 – Variazione del livello idrometrico (m) all'interno del porto di Ancona dal 01/03/15 al 31/08/15 (dati ogni 10 minuti, fonte ISPRA), periodi di pre-survey e durante le operazioni di escavo.

3.2. VERIFICA DELLE DINAMICHE SUL TRASPORTO DEI SEDIMENTI LUNGO LA FASCIA COSTIERA

3.2.1 Correntometro a Nord di Ancona (Senigallia)

I dati di corrente registrati nelle due celle hanno mostrato un andamento piuttosto irregolare. La cella 2 (7 m dal fondo) ha mostrato un primo periodo (dal 23 al 27 giugno) in cui è prevalsa una corrente verso Sud di intensità non superiore a 40 cm/s, seguito da un secondo periodo in cui è prevalsa una corrente verso Nord sempre di intensità contenuta entro i 40 cm/s (fig. 10). La cella 1 ha registrato un andamento di corrente simile alla cella 2 ma di intensità più contenuta (fig. 11): infatti, nei primi 4 giorni l'intensità di corrente non ha mai superato i 30 cm/s, mentre nei restanti giorni l'intensità di corrente si è mantenuta entro i 20cm/s.

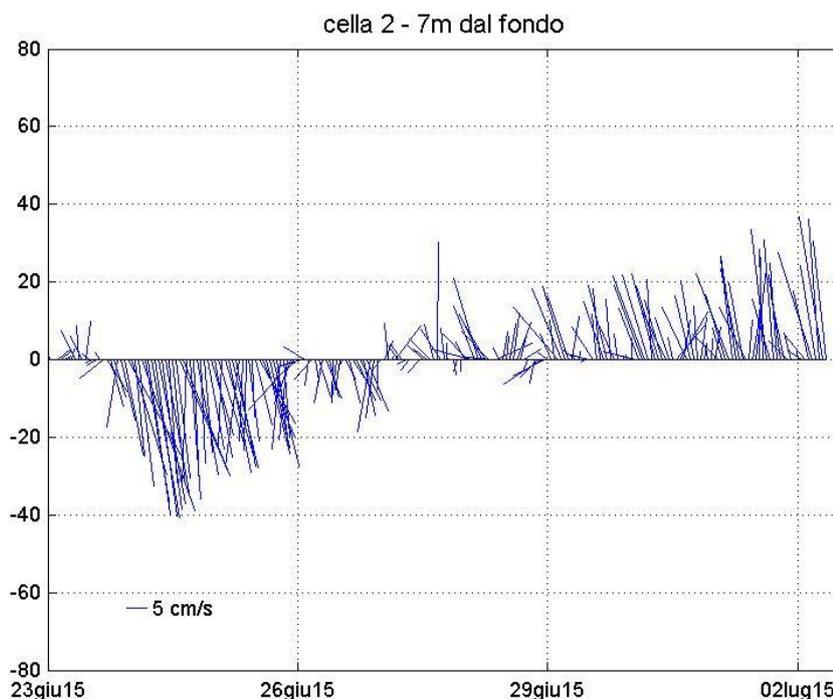


Fig. 10 – Stickplot in cm/s della corrente (dati ogni ora) a 7 m dal fondo registrata dal 23/06/15 al 02/07/15 dal correntometro ADCP immerso a Senigallia.

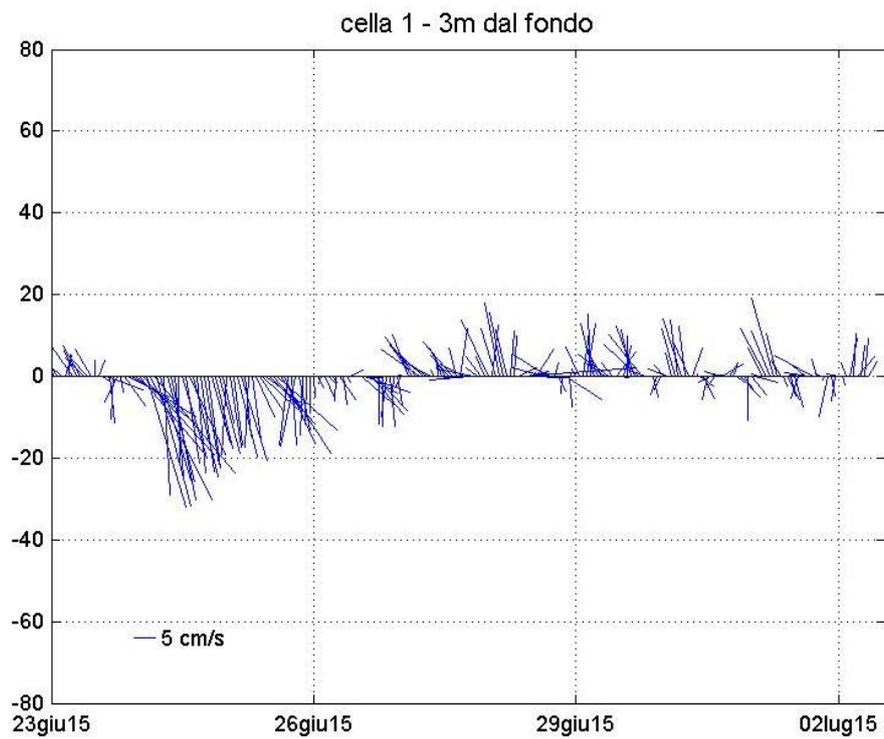


Fig. 11 – Stickplot in cm/s della corrente (dati ogni ora) a 3 m dal fondo registrata dal 23/06/15 al 02/07/15 dal correntometro ADCP immerso a Senigallia.

3.3. VERIFICA DELLE DINAMICHE SUL TRASPORTO DEI SEDIMENTI DEL LARGO

3.3.1 Area di sversamento

Nel 1° monitoraggio condotto il **7 luglio 2015**, a causa di un mal funzionamento della pompa del CTD, i dati di salinità, densità e ossigeno disciolto non sono risultati di buona qualità per cui non è stato possibile elaborarli. Comunque, da un'analisi generale (fig. 12) si è potuta notare una colonna d'acqua completamente stratificata. La **temperatura** ha mostrato uno strato superficiale (fino a 5 m) di acqua molto calda, con valori compresi fra 24,8°C e 27,5°C, rapidamente diminuiti fino a circa 20 m di profondità dove sono stati raggiunti 15°C circa. Sul fondo sono stati registrati valori intorno a 13,5°C. La clorofilla a misurata come **fluorescenza** indotta ha mostrato valori più alti sul fondo di tutte le stazioni con valori fino a 3 mg/m³, in particolare in tutte le stazioni interne alla cella di sversamento. La **torbidità** ha mostrato valori bassissimi, prossimi allo zero lungo tutta la colonna d'acqua delle stazioni campionate ad eccezione di quelle in prossimità della posizione dello sversamento della draga dove i valori osservati sul fondo hanno raggiunto anche 20 NTU.

In fig. 13 vengono rappresentati i profili di **torbidità** di 4 stazioni campionate subito dopo uno scarico della draga e dunque più interessanti. Il profilo grigio, corrispondente al punto di sversamento della draga, rappresenta la stazione campionata alle 10:46 dove si sono osservati bassi valori di torbidità su tutta la colonna d'acqua ad eccezione del fondo. La successiva stazione (in verde) monitorata 20 minuti dopo (11:03) ha mostrato una maggiore torbidità sempre in prossimità del fondo. La terza stazione (profilo in rosso) campionata alle ore 11:09 ha mostrato un massimo secondario a 15 m (4 NTU) seguito da un massimo principale a 20 m (20 NTU) e uno sul fondo (8 NTU). Infine, la stazione in viola campionata alle 11:21 ha mostrato un andamento simile alla stazione precedente ma con valori attenuati.

Per quanto concerne le misurazioni correntometriche effettuate con l'ADCP contemporaneamente al campionamento della colonna d'acqua dalle ore 06:00 alle ore 11:40 nelle quattro quote qui rappresentate (superficie, 11 m, 17 m e fondo) si è potuto notare una netta prevalenza della corrente in direzione NW (fig. 14), con maggiore intensità nella quota di superficie e a 11 m (valori fino a oltre 40 cm/s). Nelle due quote più profonde la corrente è risultata di intensità minore rispetto a quella superficiale (al di sotto di 15 cm/s).

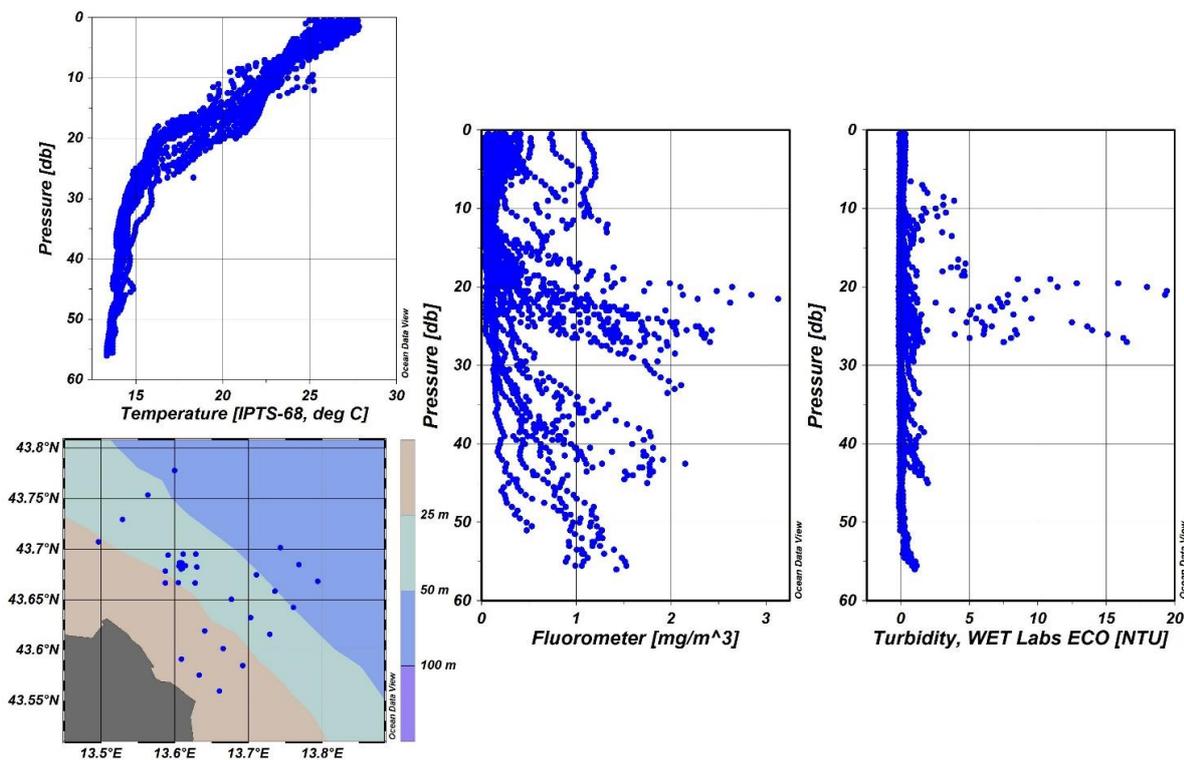


Fig. 12 - Profili verticali di tutte le stazioni visualizzate nella mappa rappresentanti la temperatura (°C), la fluorescenza (mg m^{-3}) e la torbidità (NTU).

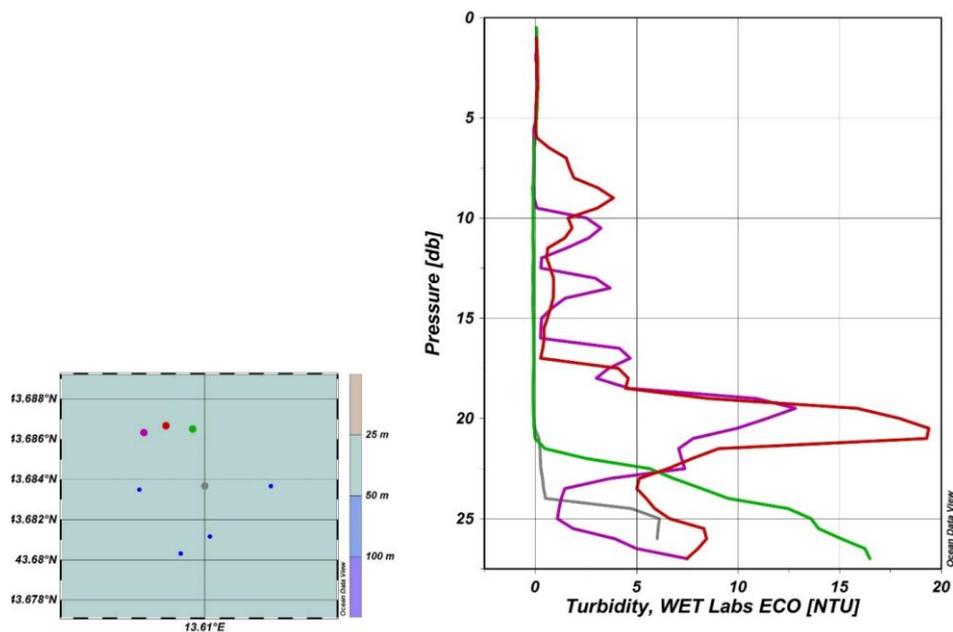


Fig. 13 - Profili verticali di torbidità (NTU) della stazioni ripetute nel tempo in prossimità della posizione dello sversamento della draga (pallino grigio).

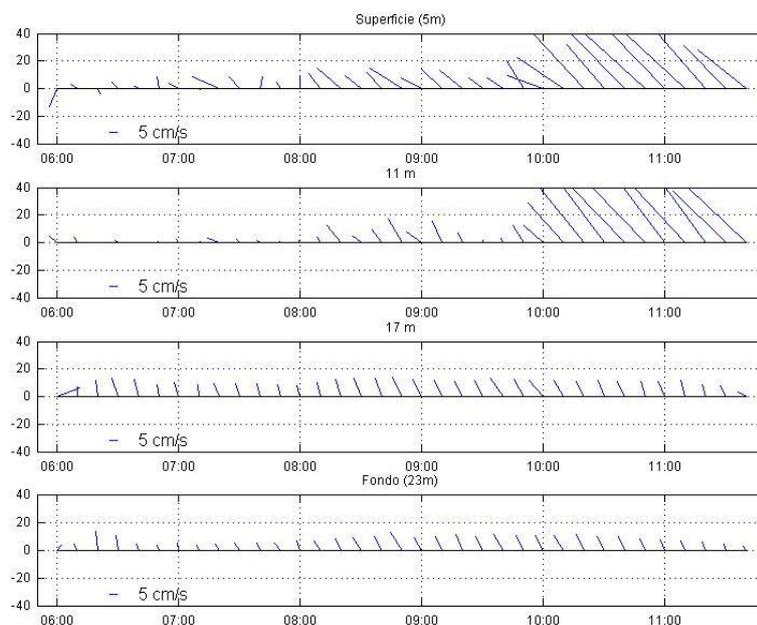


Fig. 14 - Stickplot in cm/s della corrente (dati ogni 10 minuti) alla superficie, a 11 m, a 17 m e sul fondo registrata dal correntometro ADCP il giorno 07/07/15 dalle ore 06:00 alle ore 11:40 GMT.

Durante il 2° survey effettuato il **13/07/2015** le stazioni interne poste nell'area di sversamento hanno mostrato caratteristiche fisiche simili fra loro ad eccezione della stazione centrale (A5) il cui profilo di torbidità si è discostato nettamente dagli altri negli ultimi 4 m di profondità mostrando valori piuttosto elevati (fig. 15). E' da tenere presente che il campionamento è stato effettuato pochi minuti dopo lo sversamento dei fanghi portuali e la stazione centrale ne ha probabilmente risentito maggiormente essendo quella posizionata più vicino all'area di attività.

I profili di **temperatura** hanno mostrato un andamento tipico della situazione estiva con tutta la colonna d'acqua completamente stratificata, essendo caratterizzata dalla presenza di un netto termocline posto a 10 m di profondità. I valori superficiali (circa 26°C) sono diminuiti dapprima bruscamente sino a 10 m di profondità, dove sono stati registrati 22°C, poi più gradatamente sino al fondo dove sono stati raggiunti 16°C. I profili di **salinità** hanno mostrato la presenza di un netto aloclino caratterizzato da bassi valori in superficie (intorno a 36-36,3 PSU) aumentati rapidamente a 38,3 a 10 m di profondità. Da qui la salinità si è mantenuta pressoché costante in tutta la colonna d'acqua con valori compresi fra 38 e 38,5 PSU fino al fondo. I profili di **densità** hanno mostrato un andamento simile alla salinità, con un evidente pycnocline che separava due masse di acqua diverse: una superficiale di 10 m dove la densità è passata da 23,8 a 26,6 kg/m³ e una sottostante caratterizzata da valori uniformi compresi fra 27 e 28 kg/m³ fino al fondo. Le

concentrazioni di **ossigeno disciolto** hanno presentato valori di saturazione superficiali intorno al 97%, aumentati fino al 102% nello strato compreso fra 10 m e 15 m e ridotti sino al 96% sul fondo delle stazioni A7, A8 e A9. I profili di clorofilla a misurata come **fluorescenza indotta** hanno mostrato bassi valori ($\leq 0,1 \text{ mg/m}^3$) nei primi 10 m di profondità per poi aumentare sino a raggiungere o superare $1,5 \text{ mg/m}^3$ sul fondo (stazioni A2, A5 e A7). I profili di **torbidità** hanno mostrato bassissimi valori (prossimi allo zero) su tutta la colonna d'acqua delle nove stazioni campionate ad eccezione del sito centrale in cui, come scritto in precedenza, i valori sono apparsi particolarmente elevati negli ultimi 4 m dal fondo (55 NTU).

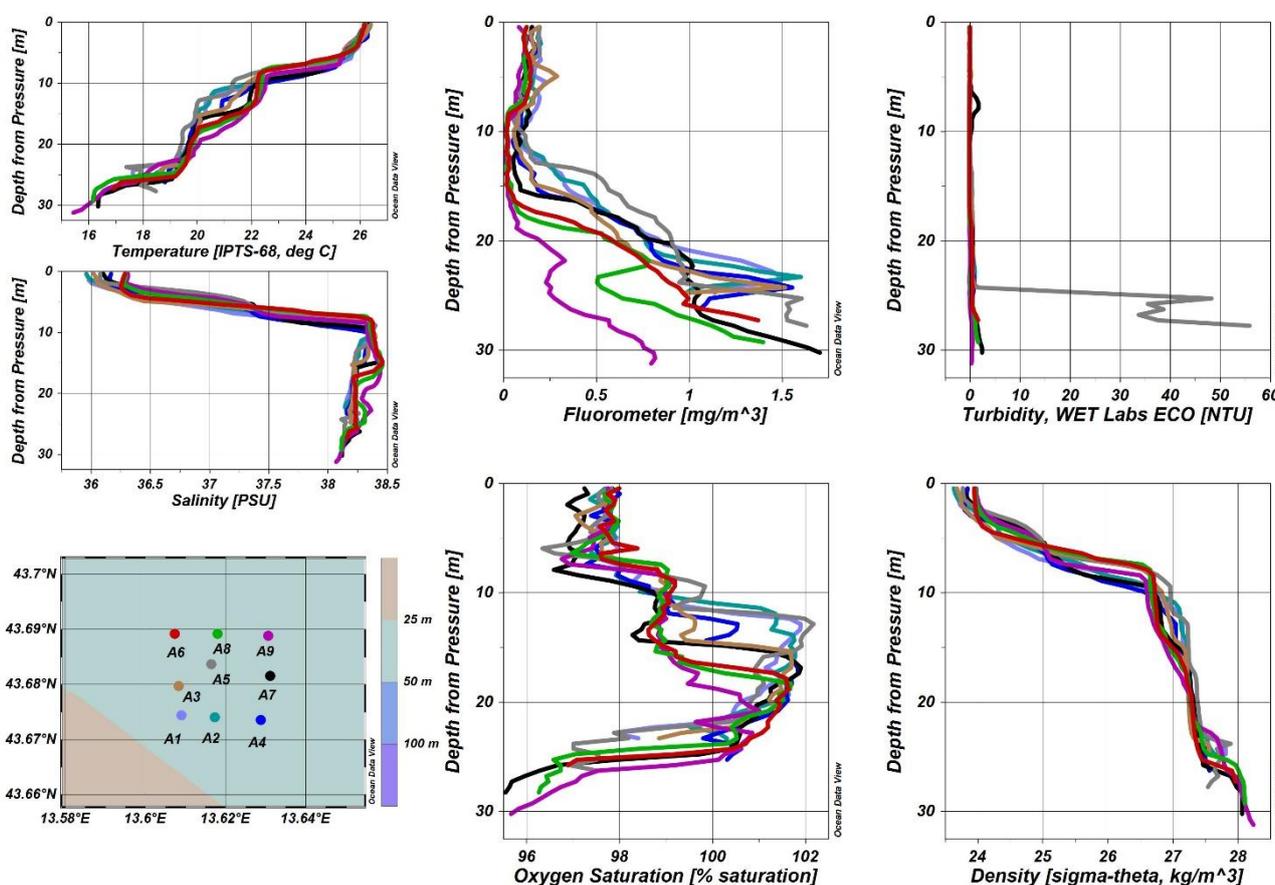


Fig. 15 - Profili verticali delle stazioni prossime e interne alla cella utilizzata per lo sversamento dei fanghi portuali (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8 e A9) rappresentanti la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), la salinità (PSU), fluorescenza (mg/m^3), la torbidità (NTU), la saturazione di ossigeno (%) e la densità (kg/m^3).

Le misurazioni correntometriche effettuate con l'ADCP dalle ore 08:10 alle ore 10:10 (fig. 16) hanno evidenziato la presenza di una corrente prevalente in direzione SE/SSE, con intensità maggiore in superficie e nella quota a 11 m, dove ha superato i 40 cm/s, e minore nelle due quote più profonde, dove sono stati registrati

valori inferiori a 10 cm/s (fondo).

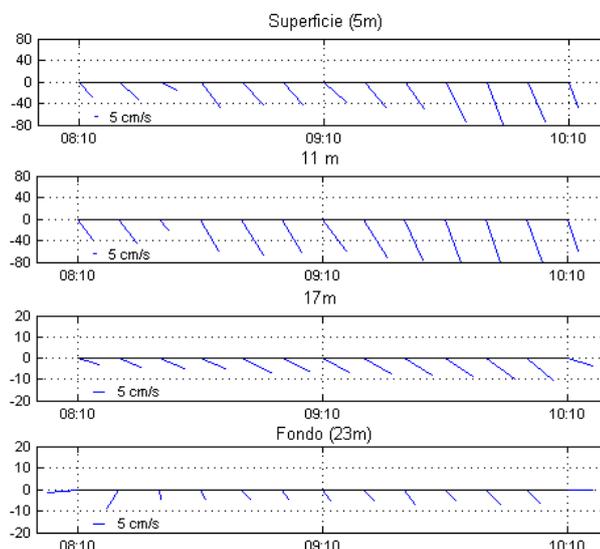


Fig. 16 - Stickplot in cm/s della corrente (dati ogni 10 minuti) alla superficie, a 11m, a 17m e sul fondo del correntometro ADCP dalle ore 08:10 alle ore 10:10 GMT del 13/07/15.

3.2.2 Area di escavo

I profili verticali delle stazioni effettuate dentro e fuori il porto di Ancona (fig. 17) hanno evidenziato una colonna d'acqua stratificata, con uno strato superficiale di 7 m caratterizzato da **temperature** intorno a 26°C, **salinità** di circa 36 PSU e **densità** 24 kg/m³, e uno strato più profondo con temperature inferiori (sino a 19°C sul fondo), ma con salinità e densità superiori (sino a 37 PSU e 26,5 kg/m³ rispettivamente). La **fluorescenza** è risultata più o meno omogenea lungo tutta la colonna d'acqua e compresa fra 1 e 2,5 mg/m³ (massimo presso la stazione P03 dentro il porto, linea rossa), ad eccezione della stazione P06 (imboccatura del bacino dei Cantieri Minori, linea grigia) che ha mostrato valori piuttosto alti in superficie (intorno a 6 mg/m³), diminuiti poi rapidamente fino ad arrivare a 2 mg/m³ sul fondo. La **torbidità** ha presentato valori più alti, compresi fra 5 e 30 NTU, nelle stazioni più vicine alla zona di escavo (banchina 26), precisamente nelle stazioni P01, P20 e P21 (rispettivamente profilo verde, celeste e blu). In particolare, la P01 è stata campionata subito dopo l'escavo, non appena il mezzo adibito alle operazioni di dragaggio ha liberato la banchina. Questa stazione è risultata ovviamente quella con valori più alti di torbidità (30 NTU) che si sono attenuati dopo circa 15 min.

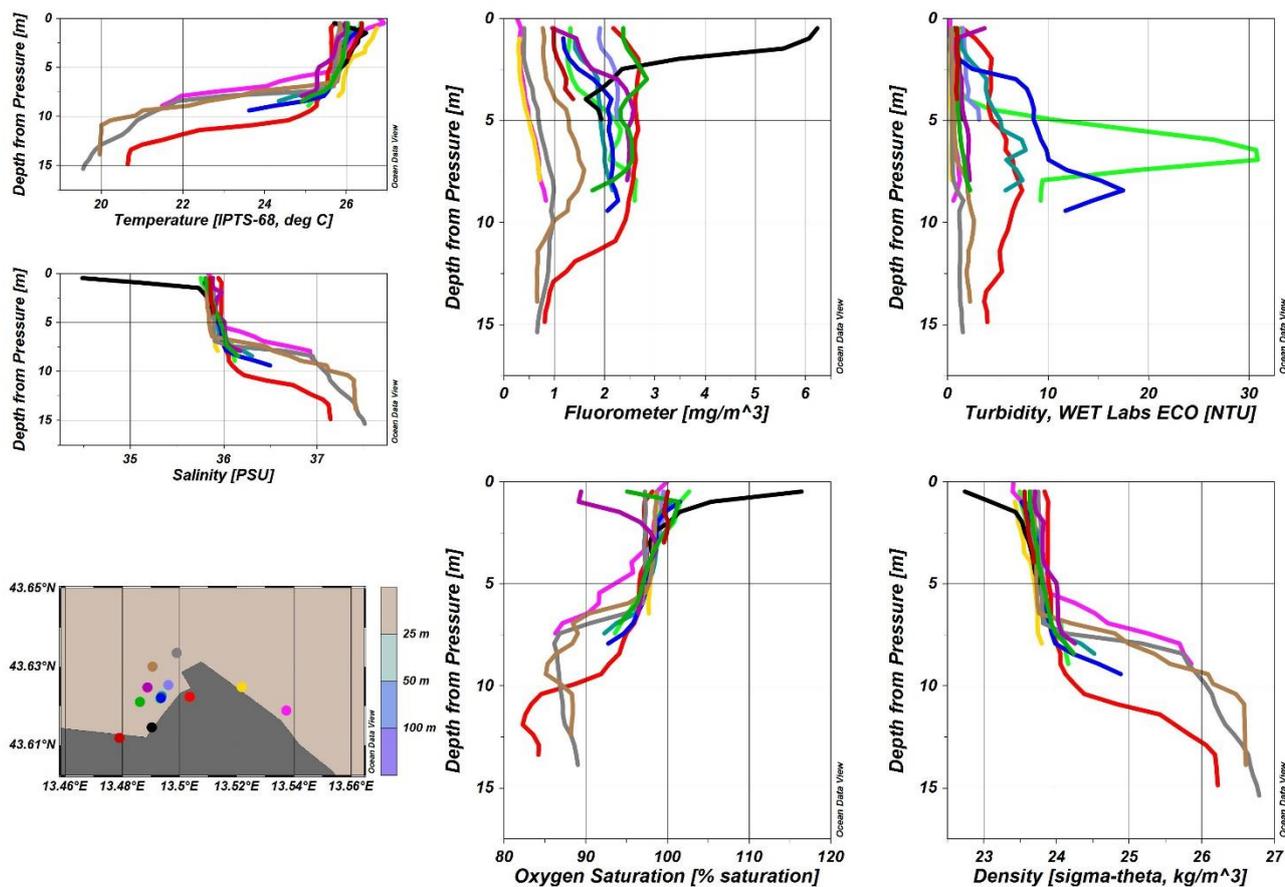


Fig. 17 - Profili verticali delle stazioni campionate il 13/07/2015 dentro e fuori il porto di Ancona rappresentanti la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), la salinità (PSU), fluorescenza (mg/m^3), la torbidità (NTU), la saturazione di ossigeno (%) e la densità (kg/m^3).

3.4. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DRAGAGGIO SUI SEDIMENTI MARINI

I flussi benthici misurati nella stazione nell'area di escavo in fase *operativa* e nella fase *ante-operam* sono riassunti in Tab. 6 e nelle figg. 18 e 19. Oltre ai metalli analizzati in base alla convenzione stipulata con l'Autorità Portuale, si è deciso di analizzare anche il Fe e il Mn, in quanto questi due elementi sono molto importanti per la comprensione dei processi di rilascio e/o assorbimento dal sedimento. I valori di metano sono risultati sempre inferiori al limite di rilevabilità.

3.4.1 Nutrienti

Nella stazione di misura dei flussi benthici (AP3) sono stati registrati flussi di rilascio dal sedimento (valori positivi) di ammoniaca (3,223 mmol/sqm*d) e di carbonio inorganico disciolto (DIC; 56,692 mmol/sqm*d), simili a quelli del pre-survey ma particolarmente attivi se confrontati con i dati di flusso delle zone pelitiche dell'Adriatico centrale (Tab. 6, fig. 18).

I flussi di fosfati hanno presentato un valore positivo (ovvero di rilascio dal sedimento) molto basso e prossimo allo zero (0,038 mmol/sqm*d), confrontabile con quelli registrati nel pre-survey (Tab. 6, fig. 18). Il valore del flusso benthico dell'ossigeno disciolto è risultato negativo, indicando un assorbimento da parte del fondale, ed è apparso più intenso del flusso negativo registrato nel pre-survey e di quelli misurati nell'Adriatico centrale pelitico (Tab. 6, fig. 18).

Il flusso di nitrato ha mostrato un valore positivo apprezzabile che differisce sostanzialmente dai valori negativi misurati prima delle operazioni di escavo, risultando superiore anche ai flussi medi misurati nelle aree adriatiche e indicando un rilascio di nitrati dai sedimenti verso la colonna d'acqua (Tab. 6, fig. 18).

Il valore del flusso della silice disciolta è apparso leggermente superiore rispetto al pre-survey, indicando una scarsa sensibilità di questo composto al processo di rimozione dei sedimenti superficiali. Il processo di dissoluzione dei gusci degli organismi silicei (diatomee) che produce la silice disciolta non è, infatti, influenzato dalle condizioni anossiche e riducenti del sedimento ma, principalmente, dalle concentrazioni di equilibrio della silice disciolta con la fase solida. I valori registrati in entrambe le fasi del monitoraggio, anche se in misura leggermente inferiore, sono comunque in linea con i flussi medi di silice disciolta misurati nell'Adriatico centrale pelitico (Tab. 6, fig. 18).

Per i nitriti sono stati ottenuti bassi valori di flusso in entrambe le fasi.

Tab. 6 - Valori e parametri statistici dei flussi benthici misurati nella stazione durante i lavori di dragaggio (AP3), nelle stazioni durante la fase di pre-survey (AP1 e AP2) e, ove i dati fossero disponibili, nell'Adriatico centrale su fondali pelitici. <DL: inferiore del limite di rilevabilità.

Stations	N-NH3	N-NO2	N-NO3	Si-SiO4	P-PO4	O2	DIC	Fe	Mn	Al	As	Cd	Cr	Hg	Ni	Pb	Cu	V	Zn
	mmol/sqm*d	μmol/sqm*d																	
AP3	3.223	0.003	0.841	6.741	0.038	-79.589	56.692	3343.20	531.05	< DL	< DL	< DL	< DL	18.54	31.64	2.48	22.48	< DL	331.60
AP1	3.458	0.381	-0.979	5.365	0.108	-60.527	109.588	865.00	44.65	< DL	-2.99	0.00	6.36	-0.33	< DL	-0.82	-1.07	-4.34	26.49
AP2	3.711	-0.041	-0.579	3.598	-0.301	-	73.809	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
media	3.464	0.114	-0.239	5.234	-0.052	-70.058	80.030	2104.10	287.85	-	-2.99	0.00	6.36	9.10	31.64	0.83	10.71	-4.34	179.04
Standard Deviation	0.144	0.213	0.370	0.985	0.206	6.739	19.116	876.18	171.97	-	-	-	-	6.67	-	1.17	8.33	0.00	107.87
difference between AP3 and AP1	-0.235	-0.378	1.819	1.376	-0.070	-19.062	-52.896	2478.200	486.404	-	-	-	-	18.868	-	3.307	23.556	-	305.112
Central Pelitic Adriatic Sea	1.500		0.050	7.300	0.270	-2.800	16.000	15.00	180.00	-	-	-	-						

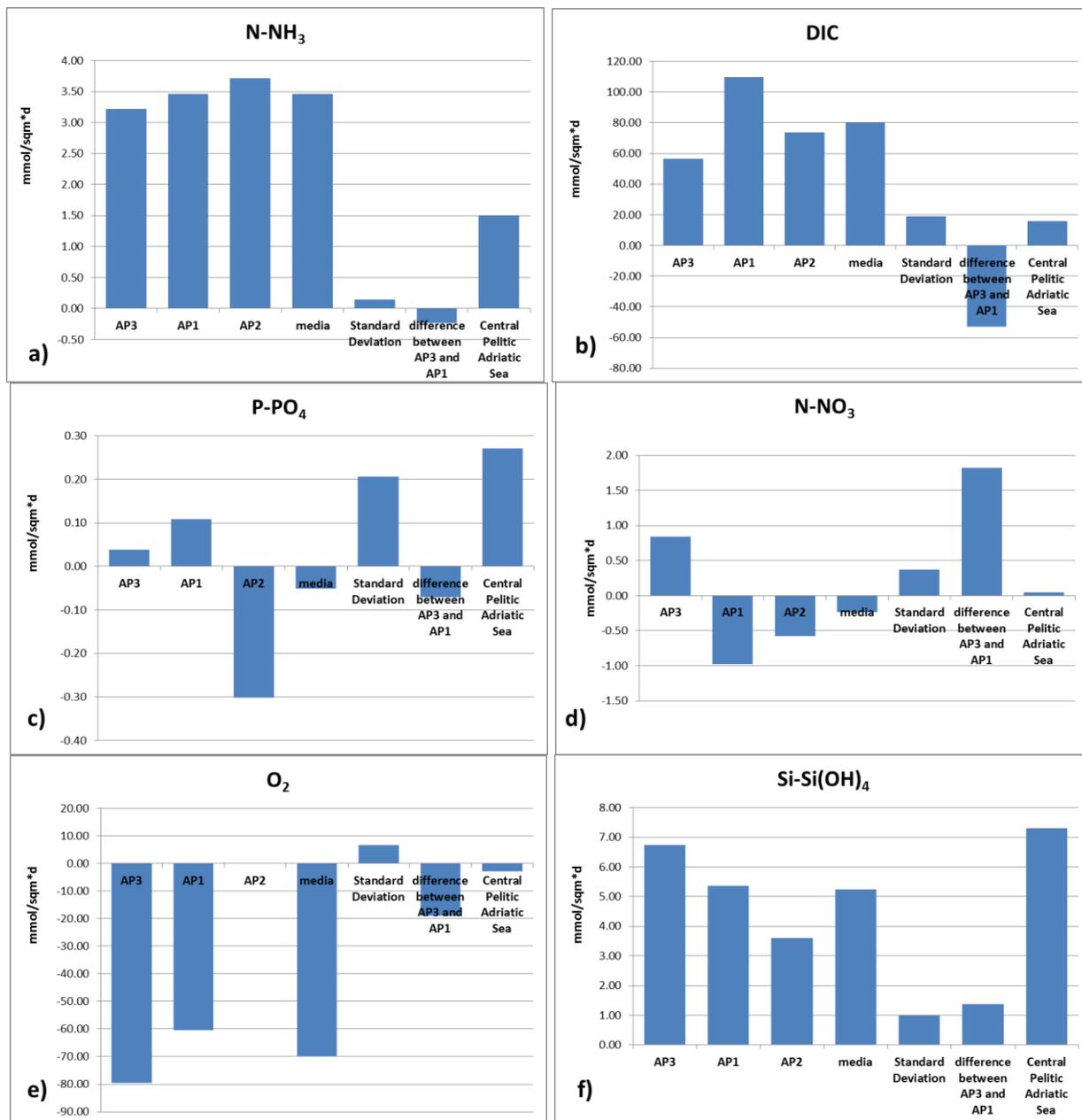


Fig. 18 - Grafici dei flussi misurati nelle stazioni AP3 (durante l'escavo), AP1 e AP2 (pre-survey) e, ove i dati fossero disponibili, nell'Adriatico centrale in corrispondenza di fondali pelitici. a) ammoniaca, b) carbonio inorganico disciolto, c) fosfati, d) nitrati, e) ossigeno disciolto, f) acido ortosilicico, g) nitrati.

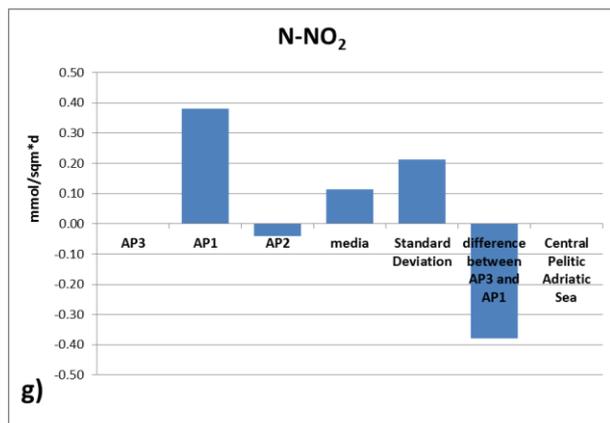


Fig. 18 - Continuo.

3.4.2 Metalli

Per ciò che riguarda i flussi bentici dei metalli, nella fase di escavo sono state riscontrate concentrazioni inferiori al limite di rilevabilità (<DL), e quindi dei flussi pari a zero, per Al, As, Cd Cr e V. Per tutti gli altri metalli i flussi sono stati positivi, indicando un rilascio da parte del sedimento (Tab. 6, fig. 19).

In ordine decrescente Fe, Mn, Zn, Ni, Cu, Hg e Pb hanno presentato flussi di rilascio dal sedimento, immediatamente dopo la rimozione dei sedimenti superficiali, notevolmente superiori rispetto ai flussi registrati nel pre-survey.

Per As e V l'escavo ha comportato un'interruzione del processo di assorbimento da parte del sedimento; questo comunque non ha prodotto incrementi importanti delle concentrazioni di questi due elementi nella colonna d'acqua all'interno del Porto di Ancona. I lavori di escavo hanno invece interrotto il processo di rilascio del Cr osservato nel pre-survey, suggerendo che vi possa essere stato un arricchimento temporaneo di questo elemento nei sedimenti superficiali davanti alla banchina 26 che è stato rimosso con l'escavo.

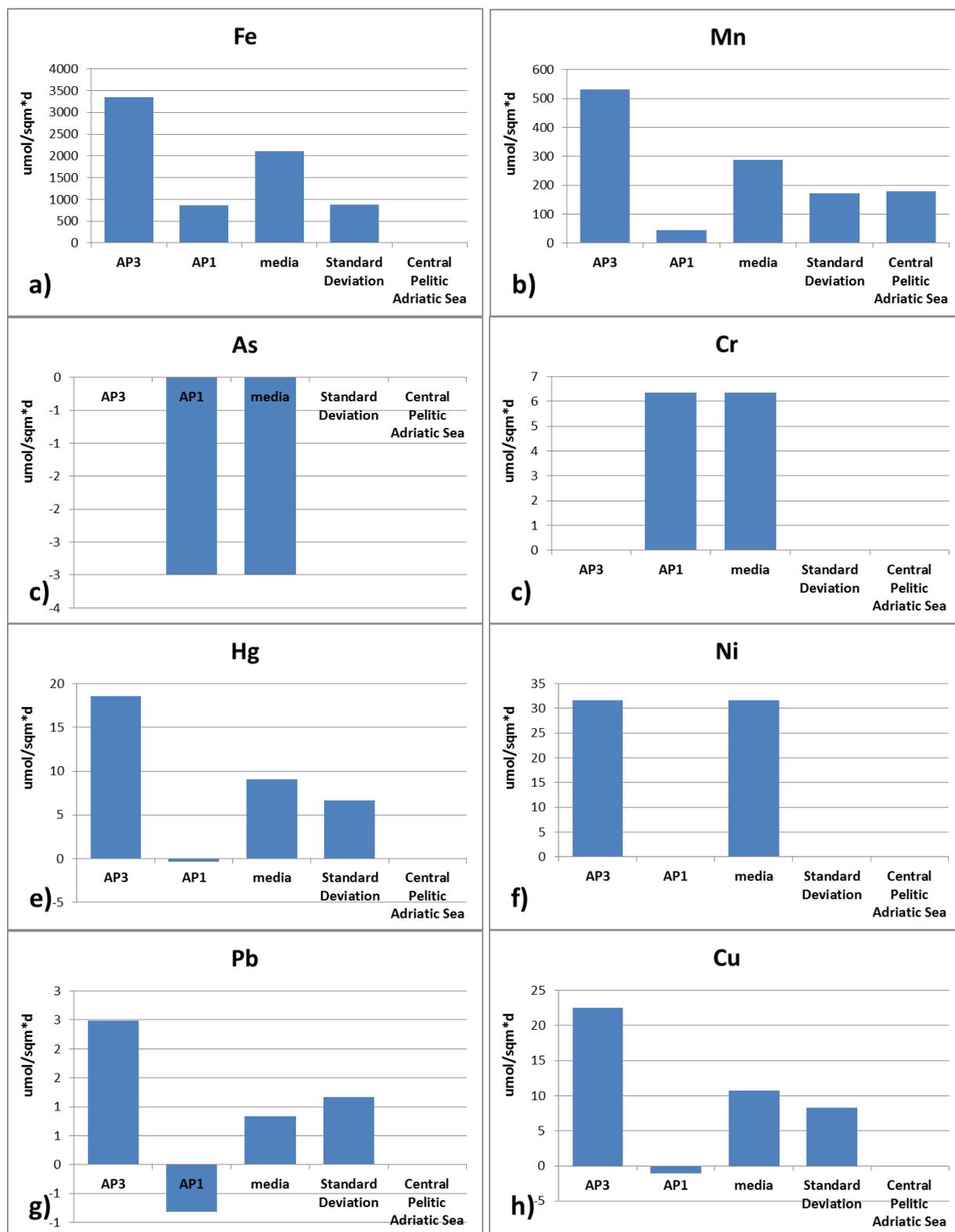


Fig. 19 - Flussi dei metalli misurati nella stazione AP3 (fase di escavo) e AP1 (pre-survey). Sono indicati solo i valori di riferimento adriatici di Fe e Mn non esistendo misure confrontabili per gli altri metalli indagati.

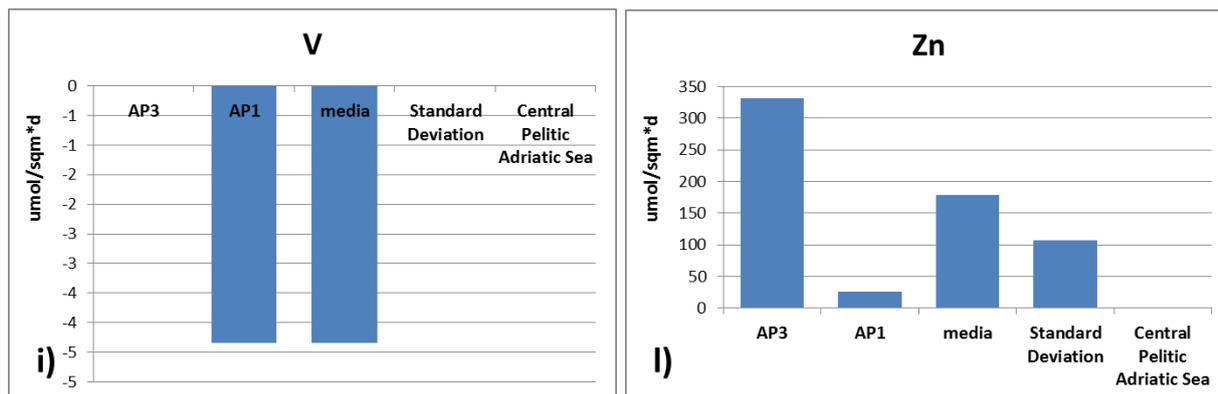


Fig. 19 - Continuo.

3.4.3 Parametri chimici e fisici

I parametri chimici e fisici registrati dalla sonda multiparametrica durante la fase di rimozione del sedimento del fondale nella stazione AP3, e nella stazione AP1 durante il pre-survey (fig. 20) indicano un consumo di ossigeno disciolto dovuto alla degradazione per via microbica della sostanza organica presente nel sedimento superficiale. Tale consumo è risultato più intenso rispetto al pre-survey e la maggiore intensità è attribuita all'affioramento, conseguente alla rimozione dei sedimenti superficiali dal fondale, di sedimenti ridotti e quindi tendenti a ossidarsi con maggiore intensità rispetto ai sedimenti superficiali già ossidati del pre-survey. Il valore del potenziale di ossidoriduzione (ORP) costante, dopo una diminuzione iniziale per l'assestamento dell'ambiente all'interno della camera bentica registrata in entrambe le fasi, è risultato inferiore rispetto al pre-survey indicando delle condizioni maggiormente anossiche durante l'escavo.

E' stato registrato un debole aumento del pH, legato al rilascio del DIC dal sedimento e quindi all'incremento della sua concentrazione nella camera bentica. Per quanto concerne la temperatura, sono state registrate deboli variazioni legate alle dinamiche della colonna d'acqua in prossimità del fondale, con valori maggiori durante la fase di escavo in conseguenza del periodo di misura che era in piena estate.

La salinità è apparsa costante con un gradino, legato all'immissione di un tracciante per la misura del volume della camera bentica, e con una differenza rispetto al pre-survey legata a dinamiche locali della colonna d'acqua. Infine, la variazioni di profondità durante il campionamento sono dovute al ciclo di marea; la differenza rispetto al pre-survey è una conseguenza della rimozione del fango superficiale.

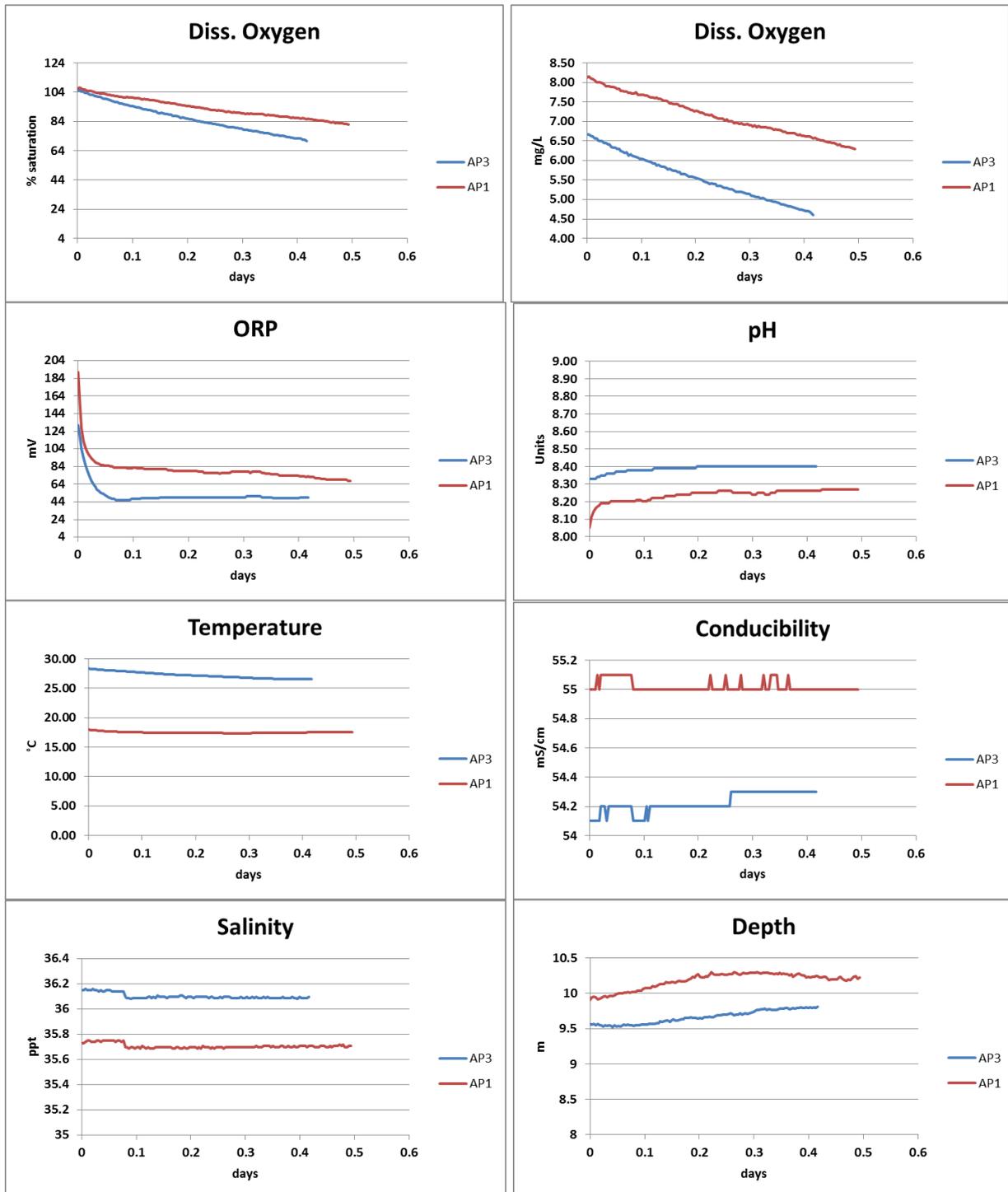


Fig. 20 - Parametri chimico-fisici registrati all'interno della camera bentica automatica nella stazione AP3 (fase di escavo) e nella stazione AP1 (fase di pre-survey).

3.5. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DRAGAGGIO SU ORGANISMI SENTINELLA

3.5.1 Biomarker

In Tab. 7 sono riportati i valori ottenuti per i biomarker nei quattro campioni analizzati durante la fase di escavo.

Tab. 7 - Valori medi dei biomarker (\pm dev.st.) determinati nei mitili traslocati presso i siti di monitoraggio nel corso dei lavori di approfondimento batimetrico della banchina 26 del Porto di Ancona.

Indice	Unità di misura	Controllo T0	Controllo T30 gg	Banchina 26 T30 gg	Banchina 4 T30 gg
Mortalità	n. individui %	5	3	5	8
Frequenza di micronuclei	frequenza ‰	0,9 \pm 0,5	1,0 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3	2,2 \pm 0,5
Accumulo lisosmiale di Lipofuscine	densità ottica / pixels ²	8831 \pm 443	8943 \pm 837	9932 \pm 720	12393 \pm 928
Accumulo lisosmiale di Lipidi Neutri	densità ottica / pixels ²	23549 \pm 4230	24324 \pm 2037	29038 \pm 1932	30261 \pm 2438
Stabilità delle Membrane lisosomiali	min	45,0 \pm 5,0	40,5 \pm 5,5	34,0 \pm 2,5	25,5 \pm 2,5
Rapporto volume lisosomi/citoplasma	densità ottica / pixels ²	0,21 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02	0,17 \pm 0,02
Attività delle enzima di catalasi	mmol/min/mg proteine di	0,024 \pm 0,005	0,026 \pm 0,006	0,030 \pm 0,005	0,035 \pm 0,005
Livelli di metallotioneine	µg MT/g	88,87 \pm 13,50	80,55 \pm 8,35	116,71 \pm 12,99	121,90 \pm 8,50
Espressione genica metallotioneine MT 10	Induzione	1,00 \pm 0,10	0,75 \pm 0,07	1,45 \pm 0,14	2,00 \pm 0,20
Espressione genica metallotioneine MT 20	Induzione	1,00 \pm 0,10	1,60 \pm 0,16	3,50 \pm 0,35	4,50 \pm 0,45
Valutazione dei livelli di composti aromatici per via immunofluorescente	densità ottica / pixels ²	335 \pm 65	260 \pm 55	601 \pm 73	721 \pm 45
Misure Biometriche	Lunghezza esemplari (cm)	5,21 \pm 0,50	5,30 \pm 0,55	5,26 \pm 0,55	5,73 \pm 0,56

Mortalità - Dei mitili prelevati presso i siti investigati, solo quelli traslocati per 30 gg presso la banchina 4 (8%) hanno evidenziato un modesto ma significativo aumento della mortalità rispetto a tutti gli altri campioni analizzati (fig. 21). Quanto osservato porta ad ipotizzare la presenza di una risposta biologica ristretta a livello subletale negli organismi analizzati. Confrontando i risultati ottenuti con quelli osservati nel pre-survey (Fabi *et al.*, 2015), non sono state osservate significative differenze dei tassi di mortalità.

Micronuclei - I risultati relativi alla fase di studio condotta durante i lavori di escavo hanno evidenziato una distribuzione di frequenze compresa tra 0,9 \pm 0,5‰, osservata presso il controllo T0 e 2,2 \pm 0,5‰ evidenziata per i bivalvi traslocati per 30 gg presso la banchina 4. Nel complesso, solo i bivalvi prelevati presso quest'ultimo sito hanno mostrato un aumento significativo delle frequenze di formazione dei micronuclei rispetto ai controlli (fig. 22). La distribuzione è risultata confrontabile a quella osservata in precedenza (Fabi *et al.*, 2015) e le frequenze osservate appaiono contenute rispetto a quanto riportato in aree simili interessate da fenomeni d'inquinamento più marcati (Bolognesi *et al.*, 1996; 2004; Daillanis *et al.*, 2003).

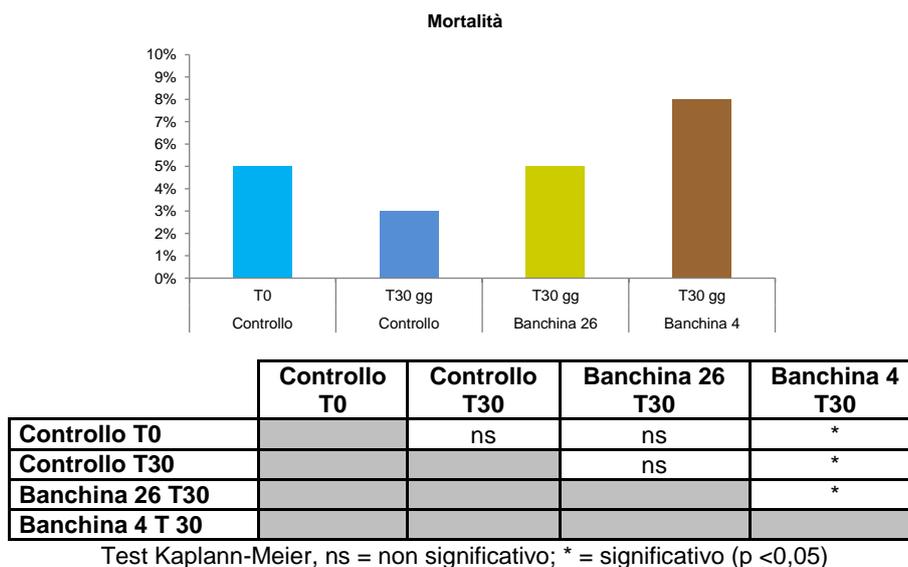


Fig. 21 - Distribuzione dei valori di mortalità rilevati negli esemplari di *M. galloprovincialis* analizzati prima dell’immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.

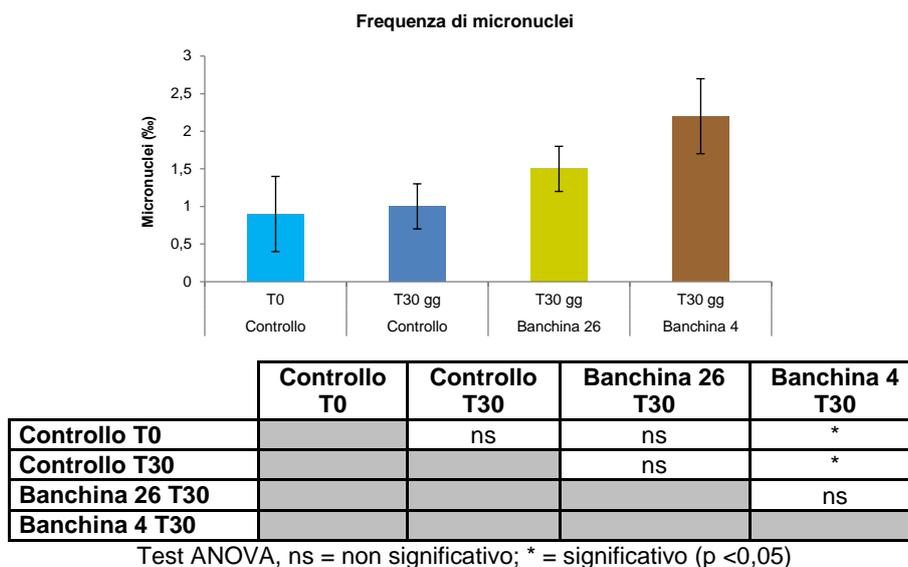


Fig. 22 - Distribuzione della frequenza media di micronuclei riscontrati nell’emolinfa di esemplari di *M. galloprovincialis* analizzati prima dell’immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.

Valutazione del contenuto di lipofuscine - I livelli di lipofuscine sono risultati compresi tra 8831±443 presso il controllo T0 e 12393±928 osservati presso la banchina 4. Solo presso quest’ultimo sito sono stati osservati incrementi significativi dei livelli intralisosomiali di lipofuscine rispetto ad entrambi i controlli (fig. 23). Nel complesso sia la distribuzione che i livelli medi assunti dal parametro presso la banchina 26 sono simili a quelli osservati nel pre-survey (Fabi *et al.*, 2015) e non

portano a ipotizzare alcuna criticità correlabile alla presenza di stress perossidativo a carico degli organismi analizzati. Se confrontati con quanto riportato in letteratura, i livelli ottenuti sono infatti inferiori a quelli evidenziati nel corso di precedenti esperienze di monitoraggio in aree costiere dell'Adriatico settentrionale (Petrovic *et al.*, 2004).

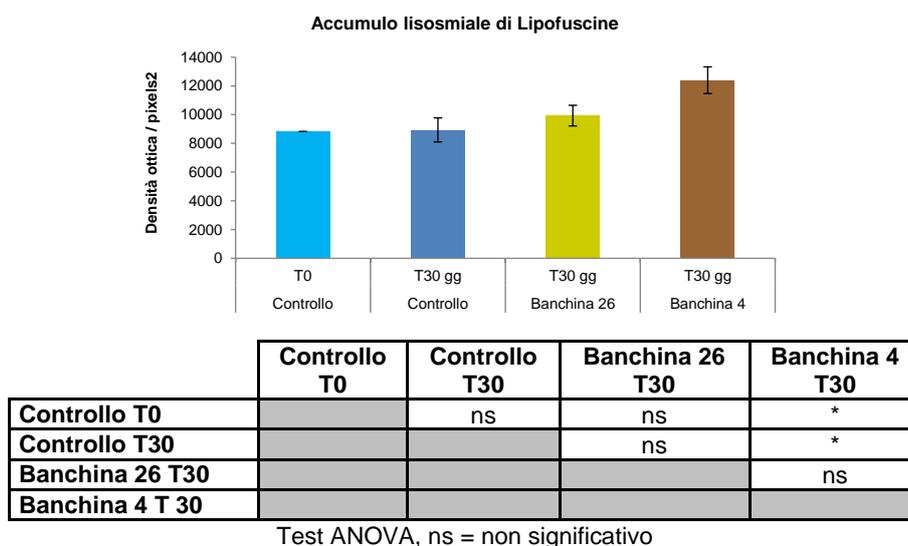


Fig. 23 - Valori medi di accumulo di lipofuscine espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* analizzati prima dell'immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.

Valutazione del contenuto di lipidi neutri - La distribuzione dei livelli di lipidi neutri ha evidenziato, durante i lavori di dragaggio, valori compresi tra 23549 ± 4230 unità di densità ottica/pixel (Controllo T0) e 30261 ± 2438 unità di densità ottica/pixel (banchina 4 dopo 30 gg di permanenza). In entrambi i siti portuali è stato registrato un accumulo significativo di lipidi neutri rispetto al controllo T30 (fig. 24). Ciò evidenzia un leggero peggioramento delle condizioni ambientali rispetto al pre-survey, quando solo al banchina 4 aveva presentato un incremento significativo rispetto ai mitili di riferimento. Comunque, nel complesso la distribuzione osservata presso la banchina 26 indica una modesta alterazione biologica, rappresentata dalla sintesi dei lipidi nell'organismo e correlata alla presenza di sostanze xenobiotiche biodisponibili, quali i composti organici, capaci di alterare il normale metabolismo lipidico di un organismo marino. Allo stesso modo, è stato osservato che, in organismi esposti a contaminanti organici (PCB, IPA, diossine), vi è un incremento sostanziale dell'accumulo di lipidi neutri associati ai lisosomi secondari. In ogni

caso, confrontando i risultati ottenuti con la letteratura si evidenziano risposte nella norma e assimilabili a organismi soggetti a una bassa pressione antropica (Petrovic *et al.*, 2004).

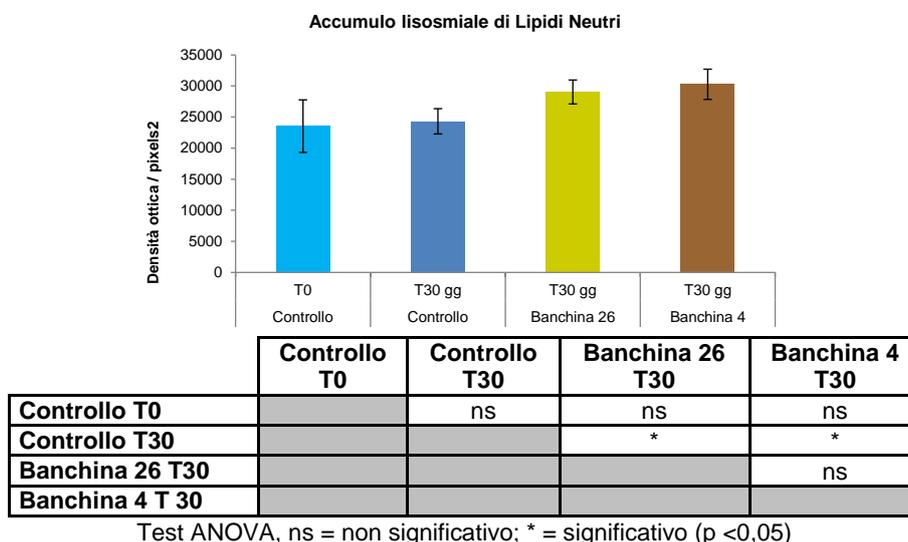


Fig. 24 - Valori medi di accumulo di lipidi neutri espressi in unità di densità ottica associati ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* analizzati prima dell'immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.

Stabilità delle membrane lisosomiali - Durante i lavori di dragaggio sono stati evidenziati tempi medi di destabilizzazione compresi tra $25,5 \pm 2,5$ min e $45,0 \pm 5,0$ min osservati rispettivamente presso la banchina 4 dopo 30 gg di esposizione e presso il controllo T0. Rispetto agli organismi di riferimento al tempo 0, i mitili posizionati presso entrambe le aree portuali hanno evidenziato un significativo seppur lieve abbassamento dei tempi necessari all'enzima per destabilizzare le membrane lisosomiali (fig. 25). Inoltre, i mitili traslocati presso la banchina 4 hanno mostrato una diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali anche rispetto al controllo T30 gg e alla banchina 26. I risultati ottenuti tendono a indicare un leggero aumento dello stato di stress nei bivalvi prelevati dalla banchina 4. Dal confronto con i dati relativi al pre-survey (Fabi *et al.*, 2015) da una parte viene confermato lo stato di alterazione osservato nei mitili prelevati presso la banchina 4 e, dall'altra, si evidenzia la leggera alterazione presso la banchina 26. Comunque, nel complesso i tempi di destabilizzazione osservati sono risultati confrontabili a quelli riscontrati su organismi in buono stato di salute (Petrovic *et al.*, 2004, Donnini *et al.*, 2007).

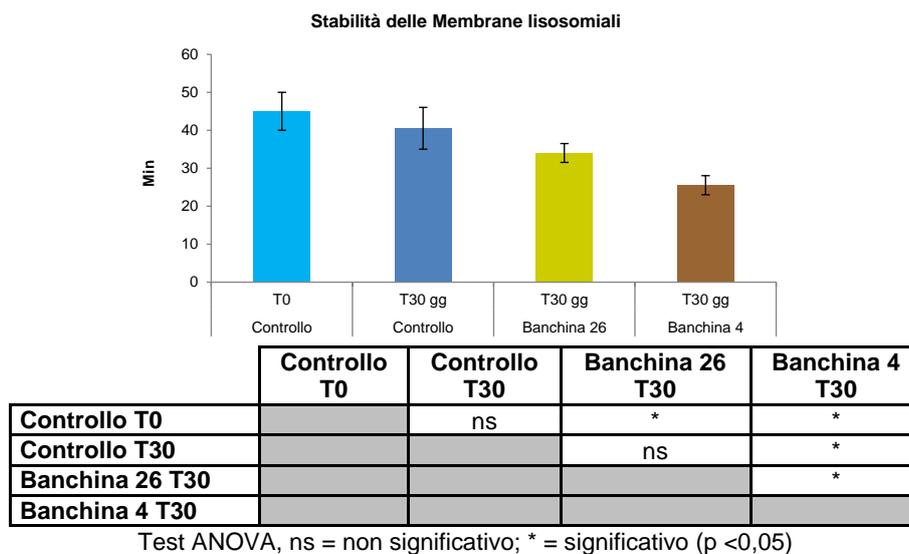


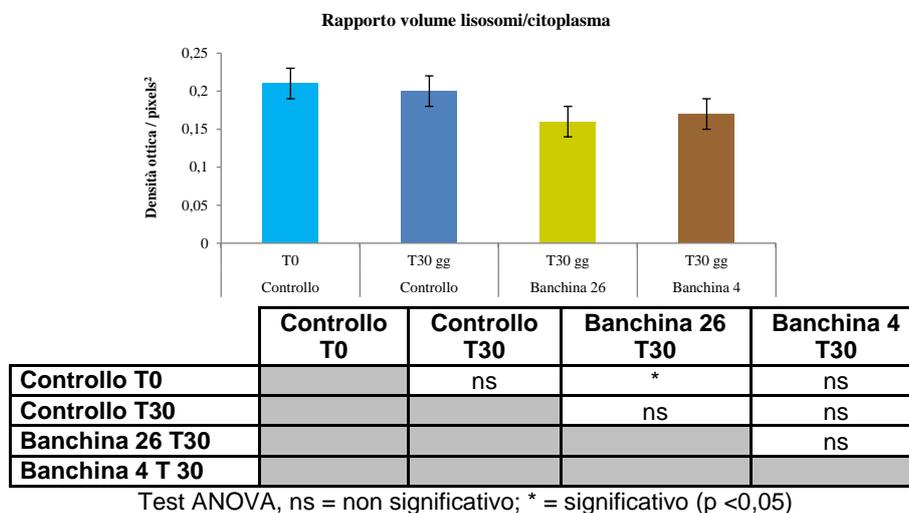
Fig. 25 - Valori medi dei tempi di destabilizzazione espressi in min ed associati alla fragilità dei lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* analizzati prima dell’immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.

Volume lisosomi/citoplasma - Durante la fase di escavo i mitili prelevati dalla banchina 26 hanno presentato un rapporto volume lisosomi/citoplasma significativamente differente rispetto al controllo T0 (fig. 26), mentre nel pre-survey non era stata rilevata alcuna differenza statistica (Fabi *et al.*, 2015). Ciò tende ad evidenziare un leggero stato di alterazione al comparto lisosomiale, anche se la distribuzione osservata non porta ad indicare alcuna diminuzione dello stato di salute dei bivalvi prelevati presso entrambe le aree portuali poiché in nessun caso i valori del rapporto lisosomi/citoplasma hanno evidenziato differenze significative con il controllo T30.

Stress ossidativo: determinazione dell’attività di catalasi - L’attività di catalasi, misurata nelle ghiandole digestive dei bivalvi, è risultata compresa tra $0,024 \pm 0,005$ mmoli/min/mg di proteine totali (controllo T0) e $0,035 \pm 0,005$ mmoli/min/mg (banchina 4 dopo 30 gg). I livelli hanno mostrato differenze significative solo tra la banchina 4 e il controllo T0 (fig. 27). Nel pre-survey, in cui la banchina 4 aveva presentato differenze significative anche rispetto al T30 gg e la banchina 26 rispetto al controllo T0 (Fabi *et al.*, 2015), si osserva un leggero miglioramento della qualità ambientale.

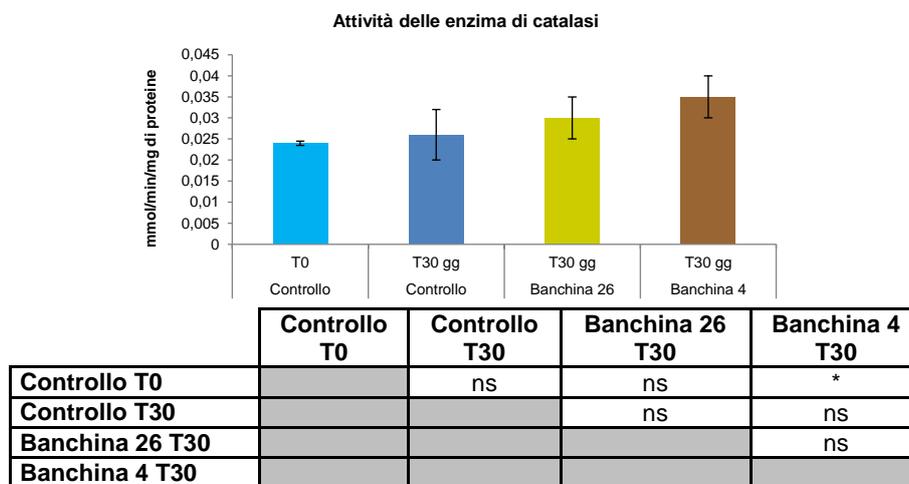
Nel complesso, sulla base anche della più recente letteratura disponibile, è possibile evidenziare solo una leggera forma di stress negli organismi sentinella utilizzati. I livelli di catalasi osservati appaiono infatti contenuti e assimilabili ad organismi

prelevati in aree marino-costiere soggette a un medio basso impatto antropico (Petrovic *et al.*, 2004).



Test ANOVA, ns = non significativo; * = significativo (p <0,05)

Fig. 26 - Distribuzione dei valori medi dei rapporti lisosomi / citoplasma nei mitili analizzati prima dell'immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.



Test ANOVA, ns = non significativo; * = significativo (p <0,05)

Fig. 27 - Valori medi dell'attività di catalasi (mmoli di catalasi/min. mg⁻¹ proteine totali estratte) associata alla ghiandola digestiva di mitili (*M. galloprovincialis*) analizzati prima dell'immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.

Livelli di metallotioneine - Gli organismi prelevati nel corso delle fasi di dragaggio hanno evidenziato livelli di metallotioneine nelle frazioni citosoliche comprese tra 80,55±8,35 µg MT/g del sito di controllo T30 e 121,90±8,50 µg MT/g degli organismi prelevati presso la banchina 4. Quanto rilevato indica un significativo seppur moderato aumento dei livelli rispetto al controllo T30 nei bivalvi prelevati presso

entrambe le banchine, con la banchina 4 superiore anche al controllo T0 (fig. 28). Tale risposta biologica indica un modesto aumento della biodisponibilità di metalli pesanti nell'area investigata rispetto al periodo di studio precedente, quando erano state riscontrate differenze significative solo tra la banchina 4 e il controllo T0 (Fabi *et al.*, 2015). Le risposte biologiche finora rilevate rimangono comunque contenute rispetto a quanto evidenziato in analoghe aree marino-costiere (Petrovic *et al.*, 2004).

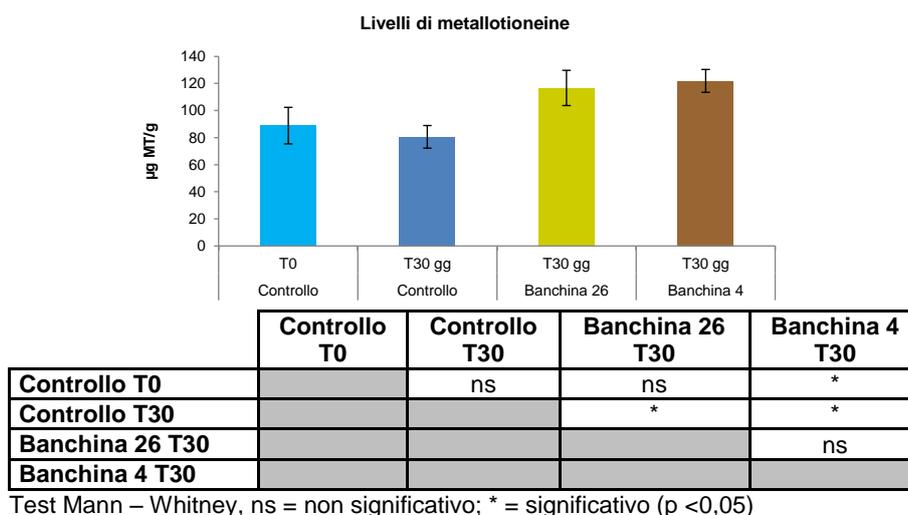
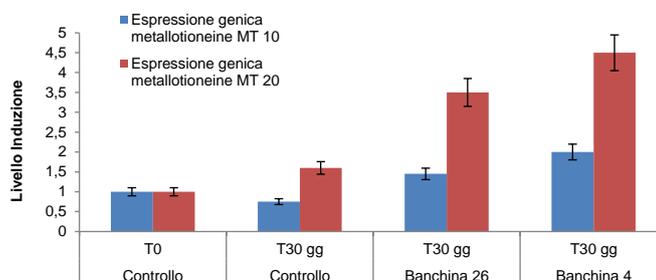


Fig. 28 - Concentrazione di metallotioneine rilevate nella ghiandola digestiva di mitilo (*M. galloprovincialis*) analizzati prima dell'immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.

Espressione genica metallotioneine (qPCR -Polymerase Chain Reaction) - I risultati relativi allo studio ambientale condotto durante l'esecuzione dei lavori di escavo tendono ad evidenziare una significativa, seppur moderata, induzione del MT₂₀ nei siti di traslocazione all'interno del porto (Banchina 26: 3,5 volte; Banchina 4: 4,5) rispetto al controllo T30 gg (Up-regulation; fig. 29). Tutti questi tre siti a 30 gg sono risultati significativamente maggiori del controllo T0. Diversamente, l'MT₁₀ appare stimolato nella banchina 26 rispetto al controllo al tempo T30 gg e nella banchina 4 rispetto a tutti gli altri siti (fig. 28). Anche il T30 ha presentato un valore statisticamente superiore al T0. Dal pre-survey (Fabi *et al.*, 2015) si evidenzia un peggioramento delle condizioni per quanto concerne l'induzione di MT₁₀, mentre vengono confermati i risultati relativi all'MT₂₀. L'espressione del gene MT₁₀ risulta correlata all'omeostasi di cationi tipicamente essenziali allo sviluppo e alla corretta funzionalità cellulare nel mitilo quali Ca, Mg, Zn, Fe e, in piccole quantità, Cu. Al contrario, il gene MT₂₀ risulta indotto in presenza di cationi non essenziali quali As,

Be, Cd, Cs, Hg e Pb.

I risultati osservati applicando la tecnica della PCR quantitativa tendono a confermare la risposta biologica associata a una moderata presenza biodisponibile di cationi metallici. Confrontando i risultati ottenuti nel corso della fase precedente all'inizio delle attività (Fabi *et al.*, 2015), quando i valori dell'MT₁₀ erano risultati tutti omogenei, si nota una leggera stimolazione dei meccanismi di protezione alla presenza di metalli non essenziali. La risposta risulta per lo più moderata e non tende a compromettere la salute degli organismi analizzati. I livelli d'induzione osservati all'interno del porto appaiono in tutti i casi simili a quelli osservati su mitili prelevati presso aree marine-costiere interessate da diverse attività tra cui industriali, agricole e urbane (+0,86 ÷ +1,65; Banni *et al.*, 2007).



MT 10	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		ns	ns	*
Controllo T30			*	*
Banchina 26 T30				*
Banchina 4 T30				

Test Mann – Whitney, ns = non significativo; * = significativo (p <0,05)

MT 20	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		*	*	*
Controllo T30			*	*
Banchina 26 T30				ns
Banchina 4 T30				

Test Mann – Whitney, ns = non significativo; * = significativo (p <0,05)

Fig. 29 - Livelli di induzione MT₁₀ ed MT₂₀ osservati nella ghiandola digestiva di mitili (*M. galloprovincialis*) analizzati prima dell'immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.

Valutazione dei livelli di composti aromatici per via immunofluorescente -

Durante i lavori di escavo la distribuzione dei livelli di composti aromatici ha evidenziato valori compresi tra 260±55 unità di densità ottica/pixel del sito di controllo T30 gg e 721±45 unità di densità ottica/pixel dei mitili prelevati presso la banchina 4 dopo 30 gg di permanenza. Analogamente a quanto osservato nel pre-

survey (Fabi *et al.*, 2015), sia i mitili posizionati presso la banchina 4 che quelli collocati presso la banchina 26 hanno presentato un aumento della risposta associata alla presenza di composti aromatici rispetto ai controlli (fig. 30).

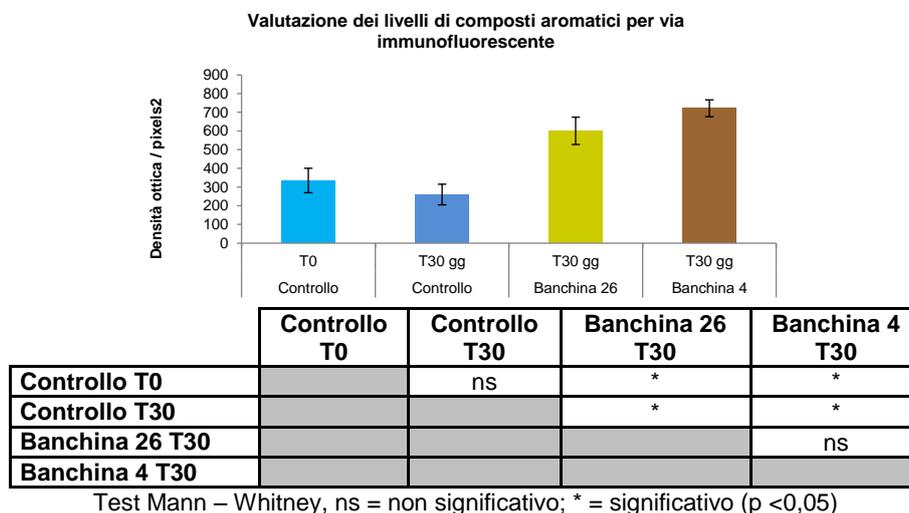


Fig. 29 - Livelli di composti aromatici per via immunofluorescente osservati nei mitili (*M. galloprovincialis*) analizzati prima dell'immersione delle gabbie (controllo T0) e in quelli prelevati dopo 30 gg. Survey durante le attività di dragaggio.

3.5.2 Bioaccumulo di idrocarburi totali nel segmento C5-C40, idrocarburi policiclici aromatici e metalli pesanti

Idrocarburi Totali - Analogamente a quanto osservato nel corso del pre-survey (Fabi *et al.*, 2015), anche nella fase durante lavori è stato osservato un accumulo di idrocarburi inferiore ai limiti di rilevabilità strumentale (<50 µg/kg) in tutti i siti investigati (Tab. 8).

Tab. 8 - Distribuzione degli Idrocarburi Totali (C10-C40) rilevati nei tessuti di mitili trapiantati presso le due aree interne al porto di Ancona e presso un sito di controllo nella fase di escavo del Porto di Ancona. Valori espressi in µg/kg p.s., LOD = limite di quantificazione strumentale.

	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Idrocarburi totali (C10-C40)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Idrocarburi Policiclici Aromatici - I livelli di IPA determinati nei tessuti dei bivalvi prelevati nel corso dell'attività di biomonitoraggio attivo presso le aree portuali di Ancona durante le attività di dragaggio sono risultati inferiori ai limiti di rilevabilità strumentale (<2 µg/kg) in tutti i siti (Tab. 9), confermando il trend già evidenziato nel

monitoraggio precedente (Fabi *et al.*, 2015).

Tab. 9 - Distribuzione di idrocarburi policiclici aromatici rilevati nei tessuti di mitili (media±dev.st.) trapiantati presso alcune aree interne al porto di Ancona e presso un sito di controllo durante le attività di dragaggio. < LOD = inferiore al limite di rilevabilità strumentale (<2 µg/kg), nc= non calcolabile.

	Controllo T0 gg	Controllo T30 gg	Banchina 26 T30 gg	Banchina 4 T30 gg
Naftalene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Acenaftene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Acenaftilene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Fluorene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Fenantrene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Antracene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Fluorantene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Pirene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
B[a]Antracene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Crisene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
B[b]Fluorantene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
B[k]Fluorantene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
B[a]Pirene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
DiB[a,h]A	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
BghiPerilene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Indeno [c,d] pirene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Σ ipa	nc	nc	nc	nc

Metalli - L'analisi della distribuzione dei metalli pesanti tende ad evidenziare la leggera biodisponibilità per alcune delle specie metalliche investigate. L'alluminio è risultato il metallo maggiormente accumulato, variando tra 42,0 mg/Kg osservati nei bivalvi prelevati presso la mitilicoltura al tempo 0 (controllo T0) e 3,5 mg/Kg rilevati presso in medesimo sito di controllo dopo 30 gg. Tutti i campioni prelevati dopo 30 gg di traslocazione sia nel controllo che nelle aree portuali hanno evidenziato decrementi significativi rispetto al controllo T0. Inoltre, il bioaccumulo nei mitili della banchina 4 è risultato superiore a quelli della banchina 26 e del controllo T30 (fig. 31; Tab. 10).

Il secondo elemento maggiormente presente negli organismi analizzati è risultato lo zinco, variato tra 15,0±0,05 mg/kg (banchina 4) e 26,0±0,05 mg/kg (banchina 26). Entrambi i siti portuali hanno evidenziato una differenza significativa rispetto ad entrambi i controlli (fig. 29; Tab. 10) ma, mentre il bioaccumulo negli organismi prelevati presso la banchina 4 è risultato inferiore rispetto a quelli di riferimento, i

mitili trapiantati presso la banchina 26 hanno evidenziato un livello significativamente maggiore. Una differenza significativa seppur lieve è stata osservata anche tra T0 e T30.

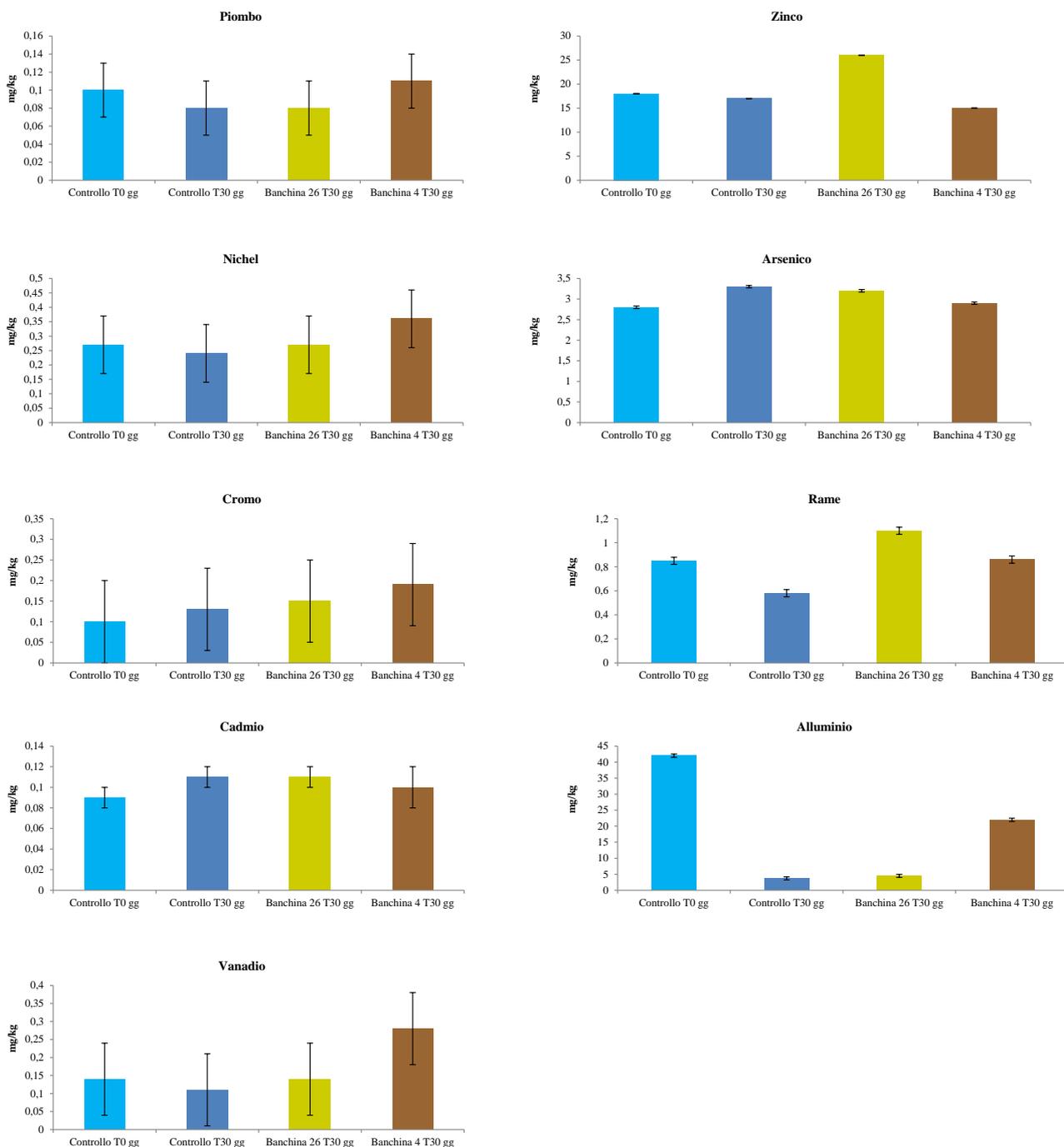


Fig. 31 - Distribuzione dei metalli in traccia (mg/kg p.s. (\pm dev. std.) rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso le aree portuali e un sito di controllo durante le attività di dragaggio presso il porto di Ancona. Ba, e Hg non sono riportati in quanto le concentrazioni sono risultate al di sotto del limite di rilevabilità strumentale.

Tab. 10 - Risultati dei confronti statistici relativi alla distribuzione dei metalli pesanti nei siti campionati presso le aree portuali e in un sito di controllo durante il dragaggio. (test U - Mann-Whitney). * = $p < 0,05$; ns = non significativo.

Piombo				
	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		ns	ns	ns
Controllo T30			ns	ns
Banchina 26 T30				ns
Banchina 4 T 30				

Zinco				
	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		*	*	*
Controllo T30			*	*
Banchina 26 T30				*
Banchina 4 T 30				

Nichel				
	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		ns	ns	ns
Controllo T30			ns	ns
Banchina 26 T30				ns
Banchina 4 T 30				

Arsenico				
	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		*	*	ns
Controllo T30			ns	*
Banchina 26 T30				*
Banchina 4 T 30				

Cromo				
	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		ns	ns	ns
Controllo T30			ns	ns
Banchina 26 T30				ns
Banchina 4 T 30				

Rame				
	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		*	*	ns
Controllo T30			*	*
Banchina 26 T30				*
Banchina 4 T 30				

Cadmio				
	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		ns	ns	ns
Controllo T30			ns	ns
Banchina 26 T30				ns
Banchina 4 T 30				

Alluminio				
	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		*	*	*
Controllo T30			ns	*
Banchina 26 T30				*
Banchina 4 T 30				

Vanadio				
	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
Controllo T0		ns	ns	ns
Controllo T30			ns	ns
Banchina 26 T30				ns
Banchina 4 T 30				

Un incremento significativo dei livelli di rame è stato osservato nei mitili prelevati

presso la banchina 26 ($1,10 \pm 0,03$ mg/kg) rispetto agli altri tre siti. La banchina 4, invece, è risultata significativamente superiore rispetto al controllo T30 gg ma confrontabile con il controllo T0 (fig. 30; Tab. 10).

Per quanto concerne l'arsenico, sono risultati statisticamente omogenei la banchina 26 con il controllo T 30 gg e la banchina 4 con il controllo T0, questi ultimi con valori inferiori rispetto ai primi due siti (fig. 30; Tab. 10).

Infine i livelli di Cr, Cd, Ni, V e Pb sono risultati tutti omogenei mentre Ba e Hg sono risultati ovunque non rilevabili (fig. 30; Tab. 10).

Rispetto al pre-survey (Fabi *et al.*, 2015) alcuni elementi (Pb, Ni, Cr e V) non hanno presentato variazioni degne di nota. Diversamente, As e in parte Zn, Cd e Cu hanno riportato leggeri aumenti presso la banchina 26 (Zn e Cd) o la banchina 4 (Cu). Infine, l'alluminio ha evidenziato un sostanziale decremento in tutti i siti investigati dopo 30 giorni dal trapianto.

Nel complesso i livelli osservati sono inferiori a quelli riportati da un precedente studio pluriennale condotto da Fattorini *et al.* (2008) e mirato a valutare la biodisponibilità di metalli pesanti evidenziata da mitili prelevati presso alcune aree marine. Livelli simili vengono osservati anche presso analoghe aree marino-costiere (Covelli *et al.*, 2001; Storelli *et al.*, 2001; Frontalini *et al.*, 2008; Giani *et al.*, 1994).

Composti Organostannici - A differenza di quanto osservato in alcuni studi condotti recentemente presso analoghe zone marino-costiere (Furdek *et al.*, 2012; Turja *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2015; Okoro *et al.*, 2015), anche durante i lavori di dragaggio non è stato osservato alcun accumulo dei tre composti ricercati sia ai controlli che presso le due banchine, analogamente alla fase di pre-survey (Fabi *et al.*, 2015).

Tab. 11 - Distribuzione dei composti organostannici (valori espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$) nei tessuti dei mitili di controllo e di quelli immersi nelle aree interne del porto di Ancona e prelevati dopo 30 giorni di permanenza durante la fase di dragaggio. $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ = limite di rilevanza strumentale.

	Controllo T0	Controllo T30	Banchina 26 T30	Banchina 4 T30
MBT	<100	<100	<100	<100
DBT	<100	<100	<100	<100
TBT	<100	<100	<100	<100

4. CONCLUSIONI

Verifica delle dinamiche sul trasporto dei sedimenti del largo - Nell'area di sversamento è stata evidenziata una stratificazione superficiale tipica del periodo estivo, con una lingua d'acqua dolce e calda estesa a tutta la zona investigata. I valori di torbidità sono apparsi maggiori solo presso la stazione dove era appena avvenuto lo sversamento della draga e in prossimità del fondo, mentre le stazioni limitrofe non sono apparse influenzate dalle attività.

Anche nell'area interna al porto la torbidità ha presentato valori più alti nelle stazioni più vicine alla zona interessata dai lavori di dragaggio (banchina 26) e soprattutto nella stazione P01 campionata subito dopo la fine delle operazioni di escavo, ma tali valori apparivano attenuati già dopo 15 minuti. La fluorescenza ha mostrato valori più elevati sul fondo, dove le comunità fitoplanctoniche si addensano durante i periodi di maggior irradiazione solare, senza evidenziare differenze sostanziali tra le diverse stazioni. Per l'ossigeno disciolto non sono mai stati rilevati valori di saturazione inferiori all'80%, escludendo la presenza di episodi ipossici.

Valutazione degli effetti del dragaggio sui sedimenti marini - I flussi positivi di ammoniaca e DIC, che sono i principali prodotti di degradazione della sostanza organica, indicano dei processi di degradazione superficiale della sostanza organica depositatasi sul fondale in seguito all'attività di produzione primaria e zooplanctonica. I flussi di questi due composti, misurati durante la fase di escavo, sono simili a quelli misurati nel pre-survey; ciò indica che i processi di degradazione e i rilasci dei sedimenti sub-superficiali, affioranti in seguito all'escavazione dei sedimenti superficiali nell'area di fronte alla banchina 26, non sono stati condizionati dalle attività di dragaggio eseguite sul fondale. I processi di degradazione della sostanza organica nella fase di escavo, al pari della fase di pre-survey, sono apparsi comunque particolarmente attivi se confrontati con i dati di flusso delle zone pelitiche dell'Adriatico centrale. Come già rilevato precedentemente (Fabi *et al.*, 2015), ciò indica la presenza di abbondanti processi di produzione primaria e deposizione di sostanza organica e di materiale fine nell'area portuale; ciò avviene solitamente in presenza di acque calme e ricche di nutrienti, tipiche delle aree portuali, che generano elevati flussi di ammoniaca e DIC all'interfaccia acqua-sedimento in seguito ai processi di degradazione dell'abbondante sostanza organica che si deposita sul fondale. I flussi di fosfati, risultati comparabili con quelli del pre-survey, indicano che il processo di rimozione del sedimento superficiale non ha influenzato il rilascio di fosfati verso la colonna d'acqua. I deboli valori di flusso

misurati prima e durante l'escavo sono dovuti al processo di precipitazione dei fosfati con gli idrossidi di ferro; ciò avviene quando i fosfati, prodotti dalla degradazione della sostanza organica e la solubilizzazione in ambiente anossico, raggiungono la superficie ossidata del fondale o entrano in contatto con l'ambiente ossico della colonna d'acqua in seguito alla rimozione dei sedimenti più superficiali. L'incremento dell'assorbimento dell'ossigeno da parte del fondale durante la fase di escavo è dovuto alla rimozione dei sedimenti superficiali e quindi all'affioramento del sedimento organico e inorganico anossico e ridotto; tale sedimento si forma negli strati sub-superficiali in conseguenza dei processi di degradazione della sostanza organica che consumano l'ossigeno libero e l'ossigeno legato ad altri composti chimici. Le sostanze organiche e inorganiche ridotte, una volta in contatto con l'ossigeno disciolto nella colonna d'acqua, tendono ad ossidarsi e quindi a consumare ossigeno. L'aumento del flusso negativo di ossigeno durante la fase di escavo non sembra comunque aver creato dei veri e propri fenomeni di anossia, come si osserva dai valori iniziali della concentrazione di ossigeno durante il campionamento che sono rimasti alti. I valori di flusso dell'ossigeno disciolto sono risultati comunque altamente negativi, sia prima che durante i lavori di escavo, rispetto ai valori di flusso dell'Adriatico pelitico centrale; ciò indica che i processi di degradazione che avvengono sul fondale e i processi di produzione della sostanza organica nella colonna d'acqua del Porto di Ancona sono molto elevati rispetto a quelli che avvengono nelle acque dell'Adriatico centrale.

Il rilascio di nitrati suggerisce l'instaurarsi di un processo di nitrificazione dell'ammoniaca rilasciata dal sedimento anossico affiorante in seguito al dragaggio e, quindi, al contatto con l'ambiente ossidante della colonna d'acqua. Il processo di nitrificazione sottintende un processo di rilascio leggermente superiore dell'ammoniaca (di quasi un'unità) e leggermente inferiore di ossigeno (3 unità) dei fondali oggetto del dragaggio.

I bassi valori di flusso di nitrito, sia in fase di escavo sia nel pre-survey, sono imputabili al processo di nitrificazione dell'ammoniaca prodotta dalla degradazione della sostanza organica quando questa viene in contatto con l'ambiente ossico della colonna d'acqua. Per tali motivi lo ione nitrito è poco considerato come risultato dei processi di degradazione della sostanza organica in quanto è un prodotto temporaneo di reazioni chimiche secondarie.

Complessivamente si può affermare che i flussi bentici dei nutrienti misurati davanti alla banchina 26 durante la fase di escavo (stazione AP3) sono in linea con i flussi

bentici misurati durante il pre-survey ad eccezione dell'ossigeno e del nitrato che presentano, rispettivamente, un flusso leggermente più negativo e positivo per il processo di ossidazione dei sedimenti affioranti in seguito al dragaggio.

Più in generale, i flussi dei nutrienti sono apparsi leggermente superiori ai valori medi misurati sui fondali dell'Adriatico centrale caratterizzati da sedimenti pelitici e quindi direttamente confrontabili con i sedimenti pelitici del Porto di Ancona. Tali valori elevati di flussi di nutrienti all'interno dell'area portuale non costituiscono comunque delle anomalie critiche, in quanto non hanno indotto veri e propri fenomeni di anossia o crisi distrofiche nell'ambiente circostante.

Per quanto concerne i metalli pesanti, il maggior rilascio di Fe, Mn, Zn, Ni, Cu, Hg e Pb durante i lavori di escavo rispetto al pre-survey indica che il sedimento sub-superficiale davanti alla banchina 26 ha rilasciato notevoli quantità di questi elementi in seguito all'escavo; come conseguenza si è verificato sicuramente un aumento, almeno temporaneo, delle concentrazioni di questi elementi nella colonna d'acqua di quest'area del Porto di Ancona.

In ogni caso, i flussi sinora misurati andranno confrontati con quelli relativi al post lavori per valutare il comportamento del fondale una volta terminato il processo di rimozione dei sedimenti superficiali.

Per quanto riguarda infine i parametri chimici e fisici, il maggiore consumo di ossigeno in conseguenza del dragaggio, qualora fosse esteso ad un'area ampia e per più giorni, potrebbe portare a una crisi anossica del fondale del porto interessato dal dragaggio. La situazione di maggiore anossia indicata dai valori dell'ORP durante l'escavo è dovuta alla rimozione dei fanghi superficiali e, come già detto, al conseguente maggior consumo di ossigeno nella colonna d'acqua da parte dei sedimenti anossici sub superficiali affioranti dopo la rimozione del sedimento superficiale.

Valutazione degli effetti del dragaggio su organismi sentinella - I risultati delle attività di biomonitoraggio finalizzato a determinare un'eventuale rimobilizzazione di sostanze tossiche confinate nei sedimenti dragati presso il Porto di Ancona hanno riportato solo sporadici segnali di stress ambientale. In particolare, dopo il periodo di traslocazione di 30 gg, negli organismi prelevati in entrambe le aree portuali (banchine 4 e 26) sono state osservate alcune alterazioni limitate a livello sub-letale. Tali alterazioni hanno interessato per lo più alcune funzionalità sub-cellulari come un aumento della fragilità delle membrane lisosomiali, l'accumulo di lipidi neutri e l'aumento di proteine metallo-chelanti. Nel complesso i risultati ottenuti da tali test

hanno evidenziato un moderato aumento della biodisponibilità di alcuni metalli pesanti, come ulteriormente confermato dalla distribuzione degli inquinanti osservati nei tessuti degli organismi prelevati presso le diverse aree portuali rispetto ai controlli e in accordo con quanto evidenziato dalle indagini sui flussi bentici. L'accumulo di tali sostanze appare da attribuirsi sia all'intenso traffico navale che contraddistingue l'area oggetto di studio, sia ai lavori di dragaggio che si stavano svolgendo nel periodo di campionamento. Più discontinua è apparsa la risposta alla presenza di molecole organiche poiché, seppur evidenziando alcune significative risposte biologiche, come ad esempio la risposta del sistema immunitario del mitilo, queste non hanno trovato conferma nei livelli di idrocarburi policiclici aromatici risultati al di sotto del limite di rilevabilità strumentale. Di maggiore intensità sono apparse le risposte biologiche osservate presso l'area più interna del porto (banchina 4), non influenzata dalle attività di escavo, ma contraddistinta tuttavia da un più lento ricircolo delle acque e da sorgenti multiple e diversificate d'impatto antropico. La scelta apposita di tale sito (controllo positivo) e le risposte ad esso associate confermano la sensibilità dei test adottati e validano l'efficacia della batteria di test adottati. Scarso è risultato il rischio genotossico, con frequenze di micronuclei simili a quelle riscontrabili naturalmente su popolazioni di bivalvi prelevati in ambienti marino costieri poco impattati (Bolognesi *et al.*, 2004).

5. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Aebi H. 1974. Catalase. Pagg. 671-684, in: Bergmeyer H.U. (Ed.), *Methods on enzymatic analysis*. Academic Press, London.
- Artegiani A. 1996. Temperature and salinity measurements of seawaters, Handbook of method protocols. *MAST II Mediterranean Targeted Project*. 34 pp.
- Banni M., Dondero F., Jebali J., Guerbej H., Boussetta H., Viarengo A. 2007 Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers*, 12(4): 369 – 383.
- Bolognesi C., Fenzilli G., Lasagna C., Perrone E., Roggeri P., 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* wild versus caged mussels. *Mutation Research*, 552: 153-162.
- Bolognesi C., Rabboni R., Roggeri P. 1996. Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C(2): 319-323.
- Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Brambati A. 2001. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic sea). *Applied Geochemistry*, 16(5): 541-558.
- Dailianis S., Domouhtsidou G.P., Raftopoulou E., Kaloyianni M., Dimitriandis V.K. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56: 443-470.
- Dickson A.G., Sabine C.L., Christian J.R. 2007. *Guide to best practices for ocean CO2 measurements*.
- Dong C.D., Chen C. , Chen C.W. 2015. Composition and source of butyltins in sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 156: 134-143.
- Dondero F., Piacentini L., Banni M., Reselo M., Burlando B., Viarengo A. 2005. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*, 345: 259–270.
- Donnini F., Dinelli E., Sangiorgi F., Fabbri E. 2007. A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). *Environment International*, 33(7): 919-928.
- Fabi G., Ferrarin C., Spagnolo A. 2015. *Modellizzazione della diffusione del materiale sedimentario risospeso durante i lavori di escavo e di sversamento in mare aperto - Lavori di escavo per adeguamento dei fondali antistanti il primo tratto della Banchina 26 del Porto di Ancona e simulazioni su tutte le celle dell'area di sversamento*. Rapporto per l'Autorità Portuale di Ancona. 46 pp.
- Fabi G., Grilli F., Paschini E., Penna P., Spagnolo A. 2016. *Studi di carattere ambientali volti a valutare le dinamiche e gli effetti ambientali dei sedimenti marini provenienti da escavi portuali. Il Rapporto - Dati correntometrici, meteorologici e di marea (pre-survey)*. Rapporto per l'Autorità Portuale di Ancona. 10 pp.
- Fattorini D., Notti A., Di Mento R., Cicero A.M., Gabellini M., Russo A. Regoli F. 2008. Seasonal, spatial and inter-annual variations of trace metals in mussels from the Adriatic sea: a regional gradient for arsenic and implications for monitoring the impact of off-shore activities. *Chemosphere*, 72: 1524–1533.
- Frontalini F., Coccioni R. 2008. Benthic foraminifera for heavy metal pollution monitoring: a case study from the central Adriatic Sea coast of Italy. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(2): 404-417.

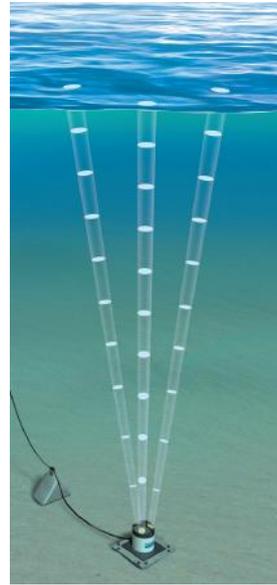
- Furdek M., Vahčić M., Ščančar J., Milačić R., Kniewald G., Mikac N. 2012. Organotin compounds in seawater and *Mytilus galloprovincialis* mussels along the Croatian Adriatic Coast. *Marine Pollution Bulletin*, 64(2), 189-199.
- Giani M., Gabellini M., Pellegrini D., Costantin S., Beccaloni E., Giordano R. 1994. Concentration and partitioning of Hg, Cr and Pb in sediments of dredge and disposal sites of the northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 158: 97-112.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, 11 (9): 1026-1030.
- ICRAM. 2001. *Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003)*.
- Okoro H.K., Snyman R.G., Fatoki O.S., Adekola F.A., Ximba B.J., Slabber M.Y. 2015. Lysosomal Membrane Stability of the Mussel, *Mytilus galloprovincialis* (L.), as a Biomarker of Tributyltin Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(5): 609-613.
- Ottaviani E., Franceschini C. 1997. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine system. *Immunology Today*, 18: 169-174.
- Petrovic S., Semencic L., Ozetic B., Orzetic M. 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10): 713-720.
- Storelli M.M., Storelli, A., Marcotrigiano G.O. 2001. Heavy metals in the aquatic environment of the Southern Adriatic Sea, Italy: macroalgae, sediments and benthic species. *Environment International*, 26(7): 505-509.
- Turja R., Soirinsuo A., Budzinski H., Devier M.H., Lehtonen K.K. 2013. Biomarker responses and accumulation of hazardous substances in mussels (*Mytilus trossulus*) transplanted along a pollution gradient close to an oil terminal in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 157(1): 80-92.
- UNESCO. 1983. Algorithms for computation of fundamental properties of seawater, by N.P. Fofonoff and R.C. Millard Jr. *Tech. Pap. Mar. Sci.*, 44. 53 pp.
- UNESCO. 1988. The acquisition, calibration, and analysis of CTD data. *Tech. Pap. Mar. Sci.*, 54. 59 pp.

ALLEGATO A

SCHEDE TECNICHE DELLA STRUMENTAZIONE

UTILIZZATA NELLE INDAGINI

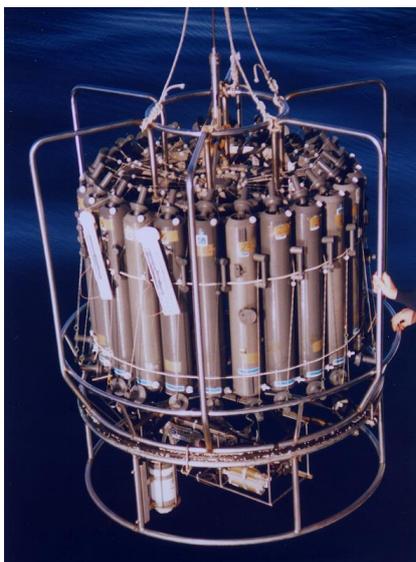
AII. A1 ACOUSTIC DOPPLER CURRENT PROFILER, Sontex



AII. A2 CORRENTOMETRO AANDERAA RCM7



AII. A3 SONDA MULTIPARAMETRICA CTD e “ROSETTE”



CTD: Sea Bird Electronics SBE911plus (frequenza di campionamento 24 Hz) dotato dei seguenti sensori:

Sensore	Costruttore	Modello	Accuratezza	Intervallo di misura
Temperatura	Sea Bird Electronics	SBE 3	$\pm 0,002$ °C	-5 : +35°C
Conducibilità	Sea Bird Electronics	SBE 4	$\pm 0,0003$ S m ⁻¹	0 : 7 S m ⁻¹
Pompa	Sea Bird Electronics	SBE 5	---	9 : 18 VDC
Ossigeno	Sea Bird Electronics	SBE 43	$\pm 0,1$ ml L ⁻¹	0 : 15 ml L ⁻¹
Fluorimetro	Turner Designs	SCUFA	$\pm 0,01$ µg L ⁻¹	0,02 : 100 µg L ⁻¹
Torbidimetro	Turner Designs	SCUFA	$\pm 0,01$ NTU	0,05 : 100 NTU
Back-scattering	Seapoint Turbidity Meter	Seapoint Turbidity Meter	< 5cm (approx.)	2 : 750 FTU
Altimetro	Datasonics	PSA-900	$\pm 0,75$ cm	0 : 300 m

Campionatore: Rosette General Oceanics equipaggiato con 12 bottiglie idrologiche Niskin da 10 lt.

All. A4

**ACOUSTIC DOPPLER CURRENT PROFILER, RDI
WORKHORSE SENTINEL ADCP 300 KHZ**



All. A5

CRIOSTATO Leica CM1900



Strumento	Costruttore	Serie	Cabina	Refrigerante
Criostato	Leica	1900	Refrigerata fino a -50C°	Freon

All. A6 MICROSCOPIO invertito Carl Zeiss AxioCam 135 motorizzato con telecamera Carl Zeiss Axiovert HS



Main features	Highly stable pyramid shape and low center of gravity for vibration-free work, min. 6 adaptation options (12 drilled holes) e.g. for micromanipulators Optovar revolver 3x motorized 6x objective nosepiece for HD DIC, motorized
Optics	ICS optics for finest image quality: special application objectives with long working distance
Objectives	Reflected light: Epiplan, Epiplan-Neofluar, EC Epiplan-Neofluar Transmitted light: Achroplan, Plan-Neofluar Special: LD-Epiplan, LD-EC Epiplan-Neofluar (reflected light objective with long working distance)
Modules	Polarization optical shearing interferometer (TIC) to measure reflected light-phase objects(levels, differences in height), MHT 10, DeepView
Illumination Reflected light	12V, 100W halogen HBO 50W mercury vapor short arc lamp HBO 100W mercury vapor short arc lamp XBO 75W xenon lamp
Reflected light/filter slider	3 positions for filters with 25 mm diameter
Reflector turret	5 positions, manual or motorized, exchangeable
Light Trap	High contrast, minimized stray light
Transmitted light	6V, 30W 12V, 100W LCD-display, light manager

TelecameraAxiovert HS

Sensore	Sony ICX 414, progressives readout
Risoluzione	660(H) x 494 (V) = 330 K Pixels
Pixel Size	9.9 µm (H) x 9.9 µm (V)
Dimensione sensore	6,5 mm x 4,9 mm, equivalent to ½
Sensibilità spettrale	HSc appr. 400 bis 720 nm con BG 40 IR-blocking filter HSm appr. 350 bis 1000 nm con BK7 protective cover glass
Dynamic Range	Typical SNR 65 dB = 1 : 1800
Noise	1 17 e
Dark Current	0,7 LSB/s, equivalenti a to 5,4 e / Pixel/s
Fotogrammi / sec	Appr. 54 fotogrammi/s in risoluzione normale fino a . 140 fotogrammi/s a
Tempo di esposizione	da 0,25 ms fino a 60 s
Color optimisation	Available for color model, default white point 3200 k

All. A7 CENTRIFUGA Beckman Allegra 25R



Strumento	Costruttore	Modello	Range velocità	Range temperatura (°C)	Precisione	Diametro rotore
Centrifuga	Beckman	Allegra 25R	100-25000 rpm	0 – 50 piena velocità -30-40 a veloc. ridotta	±1	215 mm

All. A8 ESTRAZIONE LIQUIDO-SOLIDO A FLUSSO tipo Soxhlet



Materiale: Apparato elevatore, isomantello, pallone da 250 ml, un apparato di Soxhlet con refrigerante apposito, un ditale di carta, pinze e morsetti, due tubi di gomma, moderatore di ebollizione (sfere di pyrex), cilindro graduato da 250 ml, solvente organico d'estrazione, cilindretto graduato da 10 ml, pipette Pasteur, cristallizzatore, piastra riscaldante, ancorretta magnetica, imbuto, tettarelle, cotone, provetta o protettone da 250 ml.

**All. A9 CROMATOGRAFIA LIQUIDA Waters 996 PDA HPLC System
(liquid chromatograph)**



TIPO DI STRUMENTO: **Cromatografo per cromatografia liquida ad alte pressioni (HPLC).**

COSTRUTTORE **Waters**

SERIE **996 PDA**

TIPO DI DETECTOR: **Fluorescenza (Waters® 474 Scanning Fluorescence Detector) e UV-Visibile (rivelatore a serie di fotodiodi Waters® PDA 996)**

VOLUME DI INIEZIONE: **5 µl**

CARRIER: **Acqua/Acetonitrile**

TIPO DI COLONNA: **Supelcosil LC-PAH**

LUNGHEZZA: **25 cm**

DIAMETRO: **4.5 mm**

FASE: **C-18**

PARTICLE SIZE: **5 µm**

INTEGRAZIONE ED ANALISI DEL DATO: **Waters Millennium software®**

**All. A9a SUPELCOSIL™ LC-PAH HPLC Column
(colonna per cromatografia liquida ad alte prestazioni-HPLC)**



CARATTERISTICHE FISICHE: **5 µm diametro granuli, lunghezza × I.D. 25 cm × 4.6 mm**

MATRICE (supporto): **gel di silice a forma sferica**

(Fase stazionaria): **octadecyl silice**

diametro granuli: **5 µm**

dimensione pori: **120 Å**

Al. A10 MINERALIZZATORE Milestone Ethos 900



TIPO DI STRUMENTO: Forno **Mineralizzatore /estrattore**

COSTRUTTORE **Milestone**

SERIE: **900**

VOLUME DI INIEZIONE: **6 posizioni da 200 ml**

POTENZA SORGENTE: **fino a 1600w**

SOFTWARE DI CONTRIOLLO: **EasyControl software®**

**All. A11 SPETTROFOTOMETRO AD ASSORBIMENTO ATOMICO
Perkin-Elmer AANALYST 700**



All. A11a

**Flow injection Mercury system
FIMS 400, Perkin-Elmer per il
dosaggio/analisi del Hg**



All. A11b

**Flow Injection Analysis
System (FIAS 400, Perkin Elmer)
per il dosaggio/analisi dell'As**

