



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali

Valutazione e Gestione dei Sistemi Ambientali

Tesi di Laurea Magistrale

**Procedure di Toxicity Identification
Evaluation (TIE) per caratterizzare la
tossicità e identificare gli agenti causali in
acque interstiziali estratte da sedimenti
estuarini**

Relatore

Prof. Marco Picone

Laureando

Serena Vendramin

Matricola 850027

Anno accademico

2017/ 2018

Sommario

Abstract	3
1. Introduzione	4
1.1. Scopo del progetto.....	4
1.2. Metodologie ed evoluzione TIE	4
2. Area di studio	10
2.1. Inquadramento generale	10
2.2. Inquadramento storico e geografico	11
2.3. Studi pregressi dell'area	13
3. Materiali e metodi.....	18
3.1. Selezione del sito e campionamento del sedimento.....	18
3.2. Estrazione dell'acqua interstiziale	19
3.3. Classi di contaminanti target.....	20
3.3.1. Ammoniaca	20
3.3.2. Metalli	22
3.3.3. Contaminanti organici	23
3.4. Trattamenti di TIE proposti nella letteratura scientifica.....	25
3.4.1. Trattamento con <i>Ulva rigida</i> per la rimozione di NH ₃	25
3.4.2. Trattamento con zeolite per la rimozione di NH ₃	27
3.4.3. Trattamento con EDTA per la chelazione degli elementi in traccia ...	29
3.4.4. Trattamento tramite filtrazione per rimozione del particolato	30
3.4.5. Trattamento con colonne di scambio cationico per rimozione degli elementi in traccia.....	30
3.4.6. Trattamento con polimeri per estrazione degli organici.....	31
3.4.6.1. Trattamento con Amberlite® XAD®-2.....	32
3.4.6.2 Trattamento con Discovery® DPA- 6s	32

3.5. Procedura di TIE.....	32
3.6. Test di tossicità	36
3.6.1. Ecologia di <i>Crassostrea gigas</i>	37
3.6.2. Procedure del test di tossicità	39
3.7. Analisi chimiche	42
3.8. Analisi dei dati	43
4. Risultati.....	45
4.1. QA/QC	45
4.2. TIE.....	45
4.3. Analisi chimiche	52
5. Discussione	60
5.1. Identificazione dei contaminanti presenti	60
5.2. Confronto dell'efficacia dei trattamenti TIE utilizzati per l'analisi di acqua interstiziale	60
5.3. La presenza di ammoniaca come confounding factor e ricerche necessarie per migliorare la capacità diagnostica della TIE	65
6. Conclusioni.....	67
7. Ringraziamenti	69
8. Bibliografia	70
9. Sitografia.....	76

Abstract

La procedura di Toxicity Identification Evaluation (TIE) si pone come obiettivo la caratterizzazione della tossicità e l'identificazione di agenti causali, per svolgere azioni di monitoraggio ambientale.

La procedura predisposta prevede manipolazioni sequenziali e dicotomiche su acque interstiziali estratte da un campione di sedimento, prelevato da un'area ad elevata contaminazione della laguna di Venezia, usando due diversi trattamenti per identificare ciascuna delle principali classi di contaminanti che caratterizzano l'area di studio. In questo caso il campione è stato manipolato per l'identificazione di ammoniaca, metalli, particolato e microcontaminanti organici; tali azioni sono state accompagnate dall'analisi degli elementi in traccia e dell'ammoniaca per valutare l'efficacia dei trattamenti e gli analiti implicati nel determinare la tossicità. Si è infine impiegato il test di embriotossicità con il bivalve *Crassostrea gigas* per definire le variazioni dell'effetto tossico successive all'applicazione dei singoli trattamenti.

I risultati conseguiti dimostrano che la procedura è in grado di identificare le principali classi di contaminanti presenti nel campione e che questo approccio può essere fondamentale per analizzare il contributo di inquinanti secondari in acque interstiziali.

1. Introduzione

1.1. Scopo del progetto

Il progetto ha come obiettivo generale la predisposizione di procedure di Toxicity Identification Evaluation (TIE) per analizzare e valutare la tossicità dell'acqua interstiziale estratta da un campione di sedimento prelevato presso il Canale Brentelle, sito precedentemente analizzato e valutato come sito altamente contaminato della Laguna di Venezia.

In particolare, si è verificata l'efficacia di una procedura ibrida Phase I-Phase II sequenziale, ovvero con trattamenti eseguiti in sequenza sulla medesima aliquota di campione, comprendente nel complesso sette manipolazioni. A queste sono state aggiunte le analisi degli elementi in traccia e dell'ammoniaca, necessarie per avere concrete evidenze sull'effettiva efficacia della procedura (e dei singoli trattamenti relativi ad ammoniaca e metalli), e per evidenziare quali siano i contaminanti che provocano la tossicità.

Altri obiettivi dello studio sono:

1. verificare se la procedura attuata, con le relative manipolazioni selezionate, proposte in letteratura per i sedimenti marini, siano utilizzabili ed efficaci anche nelle aree estuarine;
2. identificare se e quali possano essere fattori limitanti (o confounding factors) che possano impedire l'identificazione delle sostanze tossiche nel campione.

1.2. Metodologie ed evoluzione TIE

La Toxicity Identification Evaluation è uno strumento diagnostico che permette di identificare il nesso di causalità tra esposizione ed effetti, il quale può risultare essenziale per definire le azioni di gestione soprattutto alla luce dell'attuale normativa vigente in materia ambientale, che richiede l'uso dei saggi di tossicità per azioni di monitoraggio al fine di attuare una valutazione dello stato chimico dei corpi idrici ai sensi della Direttiva 2000/60/CE (D.M. Ambiente n. 56 del 14 aprile 2009; D.M. Ambiente n. 260 del 8 novembre 2010) e per autorizzare lo scarico a mare dei materiali di escavo e dragaggio dei fondali marini (D.M. Ambiente n. 173 del 15 luglio 2016).

Infatti, mentre il constatare che i sedimenti sono tossici può suggerire la necessità di una migliore gestione delle fonti di contaminazione, il sapere quali sono probabilmente le sostanze chimiche specifiche che causano la tossicità dei sedimenti permette una definizione più accurata della fonte o delle sorgenti e quindi consente di concentrare le azioni correttive su quelle fonti che contribuiscono più direttamente al degrado dei sedimenti. Per questi motivi, lo sviluppo di metodi che collegano l'esistenza della tossicità nel sedimento alla causa specifica di tale tossicità è di grande beneficio per i progettisti ed i preposti incaricati della gestione della qualità dei sedimenti (U.S. EPA, 2007).

La TIE ha origine come conseguenza delle prescrizioni del Clean Water Act (CWA) del 1972, che stabilisce la struttura di base per la regolazione degli scarichi di sostanze inquinanti nelle acque degli Stati Uniti, regola gli standard di qualità per le acque superficiali e prescrive che i contaminanti non possano essere scaricati in corpi idrici recettori in quantità tali da generare effetti tossici. Questo mandato ha portato alla nascita del programma Whole Effluent Testing (WET) nell'ambito del sistema nazionale di eliminazione degli scarichi inquinanti (National Pollutant Discharge Elimination System, NPDES), previsto sempre nel contesto del CWA (EPA, <https://www.epa.gov>).

A metà degli anni '80, i risultati del NPDES hanno portato con successo alla caratterizzazione della quantità degli scarichi municipali e industriali, e alla quantificazione della tossicità derivante dai medesimi, attraverso l'impegno di test di tossicità su singole specie (whole-organism test).

Tuttavia, emerse presto la consapevolezza che la semplice quantificazione della tossicità di un effluente non era sufficiente per soddisfare i requisiti dell'NPDES, ma che si rendeva necessario identificare anche quale fosse la causa (o quali fossero le cause) della tossicità degli effluenti. Questa consapevolezza portò alla nascita e allo sviluppo delle procedure di TIE applicate agli effluenti, che raggiunse il suo apice negli anni '90 quando EPA (Environmental Protection Agency) iniziò a pubblicare manuali per eseguire semplici procedure su scarichi urbani ed industriali, che poi vennero adattate anche ai campioni ambientali.

Il programma WET, e quindi la TIE, definiva la tossicità come un effetto negativo di un effluente (trattato o non trattato) o di un campione di acqua ricevente nei confronti di un

bioindicatore predefinito, da scegliere tra quelli proposti nelle linee guida. Inoltre, il CWA riconobbe che lo sversamento di uno scarico o di un effluente in ambiente può influire sulla biodisponibilità dei contaminanti nel recettore ed indicò che l'attenzione doveva essere spostata dallo scarico verso il corpo idrico ricevente.

Queste condizioni hanno avuto implicazioni per l'evoluzione delle procedure TIE. In primo luogo, le procedure TIE sono diventate delle procedure in cui la rilevanza ecologica di trattamenti e manipolazioni ha un peso maggiore rispetto all'aspetto analitico (si lavora maggiormente sull'alterazione della biodisponibilità dei contaminanti piuttosto che nella loro totale estrazione dal campione), rispondendo al criterio per cui se una TIE identifica un contaminante come causa di tossicità in un campione di effluente, è probabile che la stessa sostanza causi effetti negativi nell'ambiente. In secondo luogo, la sempre maggiore necessità di eseguire studi di TIE ha portato all'impiego di un sempre maggiore numero di specie test, per eseguire correttamente l'analisi in contesti ambientali diversi e rispondere alle richieste normative.

L'applicazione su matrici ambientali è iniziata negli anni '90 sulle acque interstiziali, ma dagli anni 2000 il principale oggetto di interesse delle TIE è divenuto il sedimento, dato che è stato ipotizzato che l'uso dei metodi TIE sulle acque interstiziali, sebbene sia conveniente in quanto permette di non tener conto della differente granulometria dei sedimenti e consenta di utilizzare specie test, stadi vitali e procedure più sensibili rispetto a quelle applicabili ai sedimenti, potrebbe portare a conclusioni errate sulle cause di tossicità (R.M. Burgess et al., 2013). Questo perché l'esposizione alle acque interstiziali rappresenta sostanzialmente un artefatto, una condizione ecologicamente non rilevante, in quanto gli organismi bentonici e della colonna non sono mai esposti direttamente all'acqua interstiziale. A questo, si devono aggiungere tutte le potenziali modificazioni che l'estrazione dell'acqua interstiziale dal sedimento può comportare nella speciazione (e nella biodisponibilità) dei contaminanti.

Infatti, l'acqua interstiziale è una matrice poco realistica, nella quale manca la fase solida a fare da tampone, ed evitare che le componenti volatili vadano perse o che i contaminanti da analizzare vengano adsorbiti sulle superfici del contenitore. Inoltre, l'acqua interstiziale viene estratta tramite delle metodologie che possono introdurre delle alterazioni nel

campione ed è generalmente una matrice ricca di NH_3 e H_2S , soprattutto in ambienti estuarini.

Nonostante ciò, le TIE su acqua interstiziale sono ancora le procedure più applicate, in quanto consentono l'impiego di una più vasta gamma di trattamenti (derivanti dalle TIE su effluenti), di volumi ridotti di campione e di indicatori più sensibili (ad esempio gli stadi larvali).

Le procedure di TIE prevedono la manipolazione fisica o chimica del campione ambientale al fine di isolare o modificare la biodisponibilità di alcuni gruppi di contaminanti "potenzialmente" presenti nel campione, mentre i saggi biologici vengono utilizzati come "detector" dell'efficacia della manipolazione. È quindi una combinazione di metodi chimici ed ecotossicologici, che ha come obiettivo la caratterizzazione della tossicità e l'identificazione di agenti causali. Il processo può essere articolato in generale come in Figura 1.1.

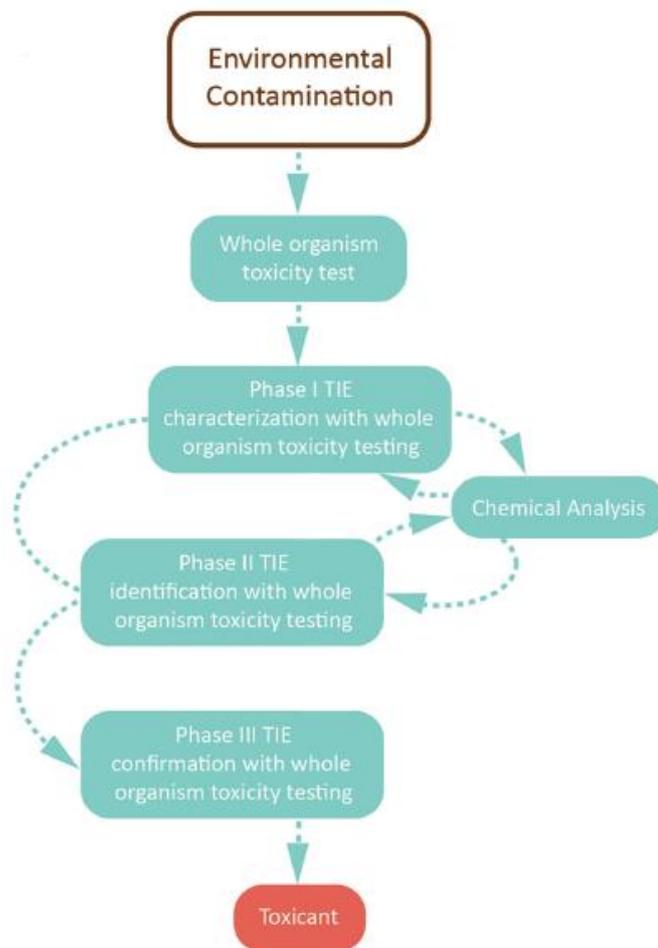


Figura 1.1. Panoramica delle fasi della TIE

Nello sviluppo di procedure TIE per la tossicità acquatica negli effluenti e nelle acque superficiali, USEPA (U.S. EPA, 2007) ha suddiviso il processo TIE in tre fasi:

- Phase I, *“Characterization”*: manipolazioni chimico-fisiche per costruire il profilo degli agenti causali, rimuovendo o limitando la biodisponibilità dei contaminanti; vengono valutate le potenziali classi di sostanze tossiche che causano tossicità osservata nel test di tossicità iniziale (ad es. metalli, sostanze organiche non polari, sostanze volatili, ammoniaca);
- Phase II, *“Identification”*: tecniche avanzate di analisi ed isolamento degli agenti causali evidenziati in Phase I, per determinare i contaminanti specifici che causano la tossicità osservata; vengono fatte analisi chimiche pre- e post- trattamento, confronti delle concentrazioni individuate con dati di riferimento, manipolazioni complementari o alternative a quelle usate in Phase I ed eluizione dei contaminanti delle colonne di estrazione in fase solida utilizzate per isolare metalli e contaminanti organici (B. M. Phillips *et al*, 2009; U.S. EPA,2007);
- Phase III, *“Confirmation”*: raccolta delle informazioni necessarie a costruire una valutazione *“Weight of Evidence”* che confermi le ipotesi costruite nelle Phase I e Phase II, ovvero che il contaminante indiziato sia effettivamente la causa degli effetti.

Tendenzialmente la fase più utilizzata è la Phase I, mentre la Phase II è utilizzata in un minor numero di studi; raramente si arriva alla Phase III che prevede un approccio meno scientifico e più gestionale.

Inoltre, per quanto riguarda le acque interstiziali, le procedure TIE si possono adoperare con un approccio *“in parallelo”*, metodo generale EPA di Phase I nel quale le manipolazioni sono singolarmente e indipendentemente eseguite su sub-campioni diversi, oppure con un approccio *“sequenziale”*, introdotto da NFESC del 2003, nel quale l'obiettivo è risolvere completamente tutte le fonti di tossicità in un unico sub-campione, eseguendo sul medesimo tutte le manipolazioni previste, in modo tale che, ad un certo punto della sequenza, si ottenga un campione completamente non tossico e quindi che le cause di tossicità siano state rimosse del tutto.

In genere tra i due approcci è preferibile quello sequenziale, in quanto questo limita i problemi che riguardano il "mascheramento" e l'"additività". Il mascheramento si verifica quando viene impedita la capacità di discernere l'effetto di rimozione di un tossico da parte delle rimanenti fonti di tossicità, che non sono caratterizzate dalle manipolazioni eseguite. L'approccio sequenziale limita la probabilità di mascheramento ad ogni fase della sequenza in quanto le sostanze tossiche eliminate dai trattamenti precedenti non sono più presenti nel campione. Dato che il mascheramento può comunque verificarsi nei primi passaggi della sequenza, in genere per eliminare queste problematiche si devono prevedere delle variazioni dei passaggi specifici nella sequenza. La messa a punto di queste manipolazioni iterate porta delle complicazioni dovute alla richiesta di molto tempo per eseguirle e l'impiego di ulteriore campione (NFESC, 2003).

Negli ultimi 30 anni sono stati eseguiti parecchi studi utilizzando metodologie TIE che hanno permesso di identificare le principali sostanze tossiche in sedimenti e acque interstiziali marine ed estuarine di tutto il mondo. Ad esempio, una revisione di studi sulla TIE effettuato da K.T. Ho et al. (2013) ha permesso di determinare che le 3 classi di tossicità più frequentemente caratterizzate sono: composti organici non ionici, metalli cationici e ammoniaca. Tramite le metodologie di TIE su acqua interstiziale si è identificata una incidenza della tossicità dei contaminanti organici non ionici leggermente più frequente rispetto all'incidenza della tossicità dei metalli cationici (67% rispetto al 49%). Al contrario, gli studi che utilizzano metodi TIE sul sedimento riportano una tossicità di contaminanti organici non ionici, singolarmente o in combinazione con altre sostanze tossiche, nel 90% dei casi. I metalli cationici giocano un ruolo minore come agente causale negli studi TIE su sedimenti: meno del 20% di tutti i sedimenti risulta essere interessato da metalli. La discrepanza tra i risultati ottenuti con le 2 matrici può essere attribuita alle diverse vie di esposizione cui sono soggetti gli indicatori biologici utilizzati su sedimento e acqua interstiziale. In entrambi i casi, l'ammoniaca in genere ricopre solo un ruolo secondario nella tossicità.

2. Area di studio

2.1. Inquadramento generale

La zona scelta per il campionamento del sedimento da utilizzare per la procedura di TIE si trova all'interno della Laguna di Venezia (Figura 2.1), zona collocata a Nord-Est dell'Italia sulle coste del Mar Adriatico. In particolare, il sito scelto è stato il Canale Brentelle (identificato con la sigla BR) (Figura 2.2), situato all'interno dell'area industriale di Porto Marghera.

Il sito in questione presenta sedimenti fini e molto inquinati, in quanto si trova all'interno di una zona industriale che già a partire dagli anni Settanta venne identificata come problematica per quanto riguarda le concentrazioni di inquinanti, dovuti allo scarico continuo di sostanze nei canali, scavati con lo scopo di permettere un migliore accesso alle merci trasportate via mare (L. G. Bellucci et al., 2009). Il sito in questione risulta essere rappresentativo della situazione di contaminazione tipica dei canali situati in zona industriale.



Figura 2.1. Ubicazione dell'area di campionamento (Laguna di Venezia)

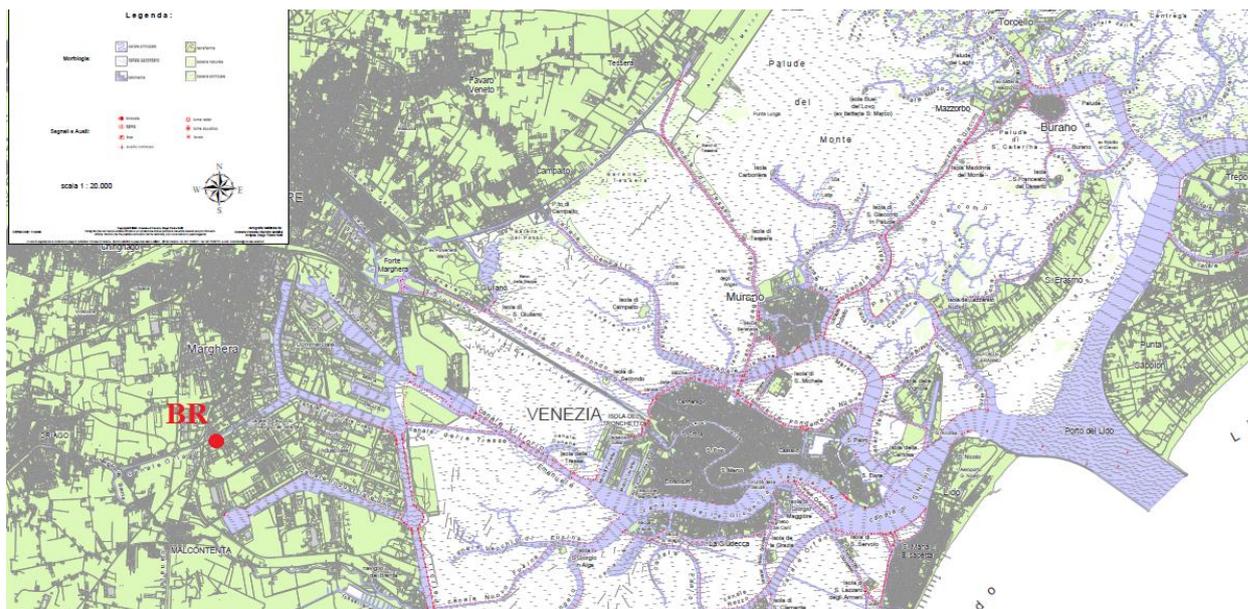


Figura 2.2. Ubicazione del Canale Brentelle, segnalato con la sigla BR, all'interno della Laguna centrale di Venezia (Comune di Venezia, Commissariato del Governo Delegato al Traffico Acqueo nella Laguna di Venezia).

2.2. Inquadramento storico e geografico

La zona di Porto Marghera è nata intorno alle metà del 1700 come piccola borgata utilizzata come luogo di sosta doganale per le merci da e per Venezia e successivamente nel 1805 è divenuta un complesso difensivo. Con gli anni la zona è stata convertita in una zona residenziale con annessa zona industriale che vi si è insediata durante la Prima guerra mondiale ed il seguente dopoguerra, per utilizzo delle materie prime trasportate dall'estero via mare (Sistema Venezia, <http://sistemavenezia.regione.veneto.it>).

Nel 1922 venne completato l'escavo del Canale di Grande Navigazione che allaccia Marghera alla stazione marittima e risulta essere quasi completa l'escavazione del Canale Industriale Nord per favorire i trasporti di materie prime. Inizialmente l'insediamento riguardava industrie di base che lavoravano materie prime povere, in seguito vennero realizzati impianti di distillazione del carbon fossile, produzione di vetro in lastre, produzione di acido solforico, di fertilizzanti fosfatici, di prodotti anticrittogamici, un cantiere navale, una raffineria ed una serie di depositi di oli minerali (Sistema Venezia, <http://sistemavenezia.regione.veneto.it>; M. Bellucci et al., 2010).

Negli anni '30, si svilupparono l'industria metallurgica, un grande impianto per la produzione di concimi azotati e stabilimenti alimentari. Si aggiunse inoltre nel 1935 la più

potente centrale termica d'Italia, oltre a svariate produzioni minori, quali profumi, lenti per occhiali, tessitura, feltri, lavorazione del malto per la birra e imprese di servizi.

Durante la Seconda guerra mondiale molti stabilimenti vennero colpiti da bombardamenti aerei e necessitarono di ricostruzione nel secondo dopoguerra. In seguito, fu costruita una seconda zona industriale, ampliamento tutt'oggi chiamato Penisola della Chimica, e venne scavato il canale Malamocco-Marghera per allontanare da Venezia la rotta delle navi dirette al porto industriale.

La zona della Penisola della Chimica sorse in zone della laguna interrate o rialzate grazie all'impiego di scarti industriali o derivati dallo scavo di nuovi canali e ospitava produzioni petrolchimiche, di refrattari, carpenteria di precisione, centrali elettriche e raffinerie di oli alimentari. Grazie alla crescita dell'attività industriale in poco tempo aumentò sia l'occupazione che il numero di abitanti.

L'espansione industriale ebbe però un decremento attorno agli anni '60 e '70, che si consolidò anche negli anni '80 con l'inizio di un periodo di stagnazione.

Negli ultimi decenni si è verificato un cambiamento degli assetti produttivi, che ha portato a chiusure e ristrutturazioni aziendali, variazioni di processi industriali e la contrazione delle attività di ricerca e sviluppo, con un conseguente calo occupazionale sostanziale (Sistema Venezia, <http://sistemavenezia.regione.veneto.it>).

Nonostante ciò sono rimaste nella zona le attività legate alla lavorazione del petrolio, dei fertilizzanti, dei metalli e dei prodotti chimici. Nel corso degli anni '90 però si è assistito a diversi progetti di riqualificazione dell'area come il primo lotto destinato a Parco Scientifico Tecnologico di Venezia (VEGA), a cui sono susseguiti altri progetti (A. Pozzan, 2014).

Proprio nella parte centrale dell'area industriale si trova il Canale Brentelle sopraccitato (Figura 2.3), canale di raccordo con il Naviglio del Brenta e diramazione del Canale Industriale Ovest tra il Porto Industriale e il Porto Commerciale di Porto Marghera; fa quindi parte della seconda zona industriale. La zona in questione ospita attualmente l'area petrolchimica di Porto Marghera (A. Pozzan, 2014).

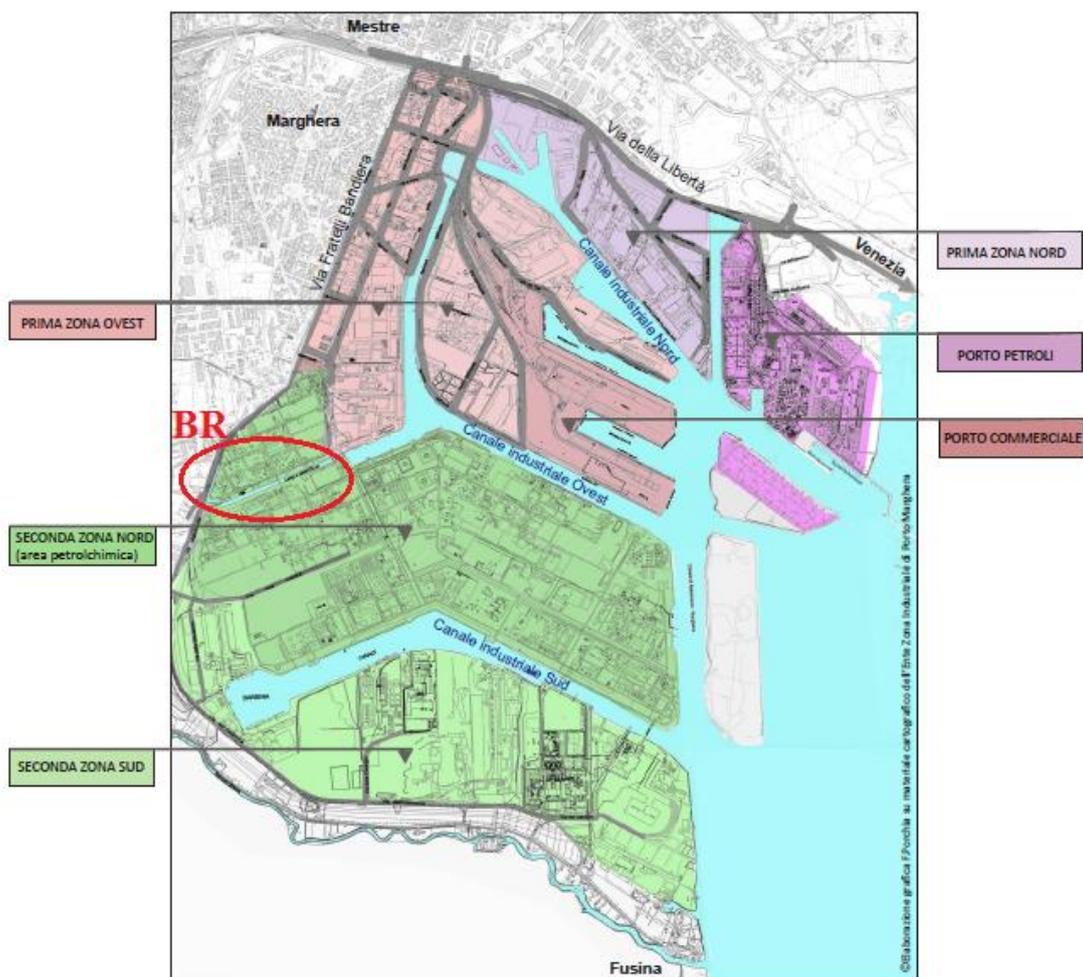


Figura 2.3. Ubicazione del Canale Brentelle all'interno della zona di Porto Marghera e principale divisioni dell'area (A. Pozzan, 2014).

2.3. Studi pregressi dell'area

La zona di Porto Marghera comprendente anche il Canale Brentelle è stata identificata nel 1998 come Sito di Interesse Nazionale (L426/98) al fine di poter avviare delle opere di bonifica ed è stata individuata come sito SIN sulla base della quantità e pericolosità degli inquinanti in essa presenti, alle loro caratteristiche e all'impatto che queste avevano sull'ambiente circostante (ISPRA, <http://www.isprambiente.gov.it>; Regione del Veneto, <https://www.regione.veneto.it>).

Il SIN è stato perimetrato per la prima volta con DMA del 23.02.2002, per poi subire diverse riperimetrizzazioni e proposte di modifica nel corso degli anni successivi (DMA 20 febbraio 2003; DGR Veneto 58/2013; Ministero dell'Ambiente, <http://www.bonifiche.minambiente.it>).

Secondo uno studio effettuato da L.G. Bellucci et al. (2009) nella zona di Porto Marghera la granulometria dei sedimenti profondi è in genere simile a quella dei sedimenti in superficie; una eccezione però si può ritrovare proprio nel Canale Brentelle dove è possibile notare una discontinuità ad una profondità di 28 cm, che indica la transizione dai sedimenti grossolani sottostanti a quelli più fini soprastanti. Questa caratteristica indica la presenza di una idrodinamica rallentata nel sito, che ha favorito il deposito di sedimenti fini e, potenzialmente, una maggiore stagnazione degli scarichi. Inoltre, in questo canale è possibile riscontrare elevati valori superficiali di carbonio organico (OC) e del rapporto C/N, maggiori rispetto a quelli riscontrati nel resto della laguna, il che testimonia un elevato input di materia organica da terraferma.

Frignani et al. (2001) hanno riscontrato che il canale Brentelle è caratterizzato da alti picchi di ^{137}Cs (Figura 2.4) alla profondità di circa 17 cm, corrispondenti ad un flusso di 1.55 cm/y; questo è stato ipotizzato essere collegato allo scarico di rifiuti da parte di una fabbrica della zona che produce reflui di gas liquidi contenenti ^{137}Cs .

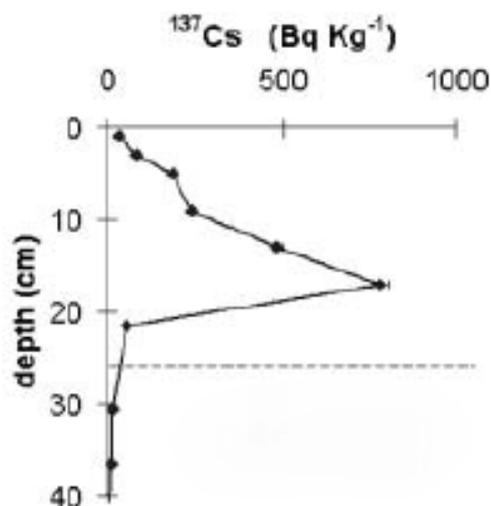


Figura 2.4. Profilo di attività-profondità di ^{137}Cs nel Canale Brentelle, la linea tratteggiata indica la transizione alla profondità di 28 cm dal sedimento grossolano al sedimento fine soprastante (L.G. Bellucci et al. (2009)).

Per quanto riguarda la distribuzione di metalli nei sedimenti, L.G. Bellucci et al. (2009) riportano (Figura 2.5) che le concentrazioni di metalli investigati nel Canale Brentelle (Ag, As, Ba, Cd, Hg, Pb, Zn) sono genericamente più basse nei sedimenti superficiali rispetto a quelli più profondi. Inoltre, Cd, Pb e Zn mostrano picchi significativi a diverse profondità con massimi sempre coincidenti l'uno con l'altro, mentre Ba e Hg raggiungono valori

eccezionalmente elevati in profondità (-40 cm) per poi diminuire rapidamente a concentrazioni relativamente basse nei primi 20 cm di profondità (Figura 2.5). Traducendo questi profili in termini temporali di deposizione, As, Ba e Hg mostrano una tendenza decrescente costante dai primi anni '70 fino all'anno della raccolta, invece Cd, Pb e Zn presentano uno o più massimi nel sottosuolo contemporanei alla fine degli anni '80 e ai primi anni '90.

Come si può vedere in Figura 2.5, valori molto elevati sono stati raggiunti da Ba e Hg (rispettivamente circa 10.000 e 5.500 $\mu\text{g/g}$), che corrispondono a flussi di 7.700 e 5.000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{y}$ (L.G. Bellucci et al., 2009). Secondo alcune fonti disponibili (Magistrato alle Acque di Venezia, 2004; Bloom et al., 2004), tali flussi potrebbero derivare per Ba dal suo uso come catalizzatore nella produzione di trielina e per Hg per il suo utilizzo in impianti di cloro/soda; le diminuzioni registrate in seguito sono quindi dovute a opere eseguite nell'ambito di progetti atti a ridurre il rilascio di contaminanti in ambiente.

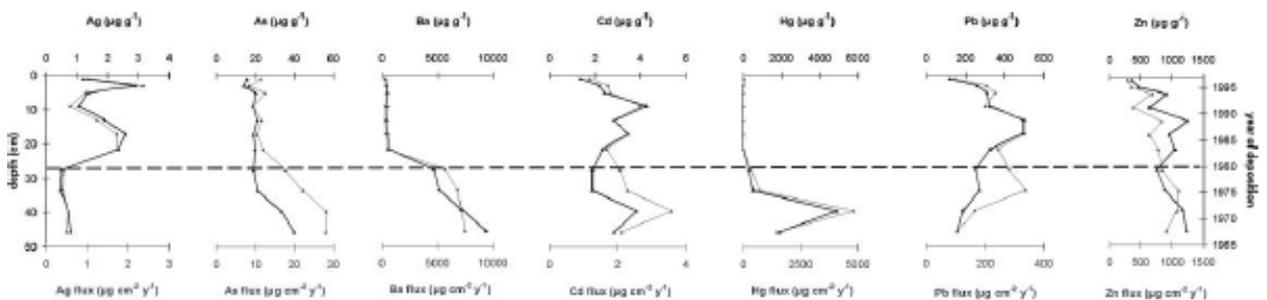


Figura 2.5. Profili concentrazione di metalli-profondità nel Canale Brentelle, mostrato insieme alla distribuzione del flusso nell'anno di datazione dello strato di sedimento (L.G. Bellucci et al. (2009)).

Nell'area del Canale Brentelle e dell'adiacente Darsena della Rana sono inoltre state condotte diverse indagini mirate alla valutazione degli effetti tossici, spesso in combinazione con rilievi della contaminazione.

Un progetto di A. Volpi Ghirardini et al. (2005b) ha valutato l'utilizzo di *Mytilus galloprovincialis* come bioindicatore per valutare la contaminazione dei sedimenti nella zona di Porto Marghera e da queste analisi è emersa una tossicità del sedimento nella zona del Canale Brentelle, che rientra in un range tra 1 e 5.8 UT_{50} (unità di tossicità), classificabile come da media a molto alta (considerando come sito a tossicità non evidente i siti che mostrano una percentuale di effetto minore del 5%, come tossicità media i siti con

percentuale di effetto tra il 20% ed il 30% e come tossicità medio-alta i siti a percentuale di effetto maggiore al 30%).

Uno studio effettuato da C. Losso et al. (2009), in cui vengono effettuati saggi biologici acuti e subcronici con *Paracentrotus lividus*, *M. galloprovincialis* e *Crassostrea gigas* su acqua interstiziale estratta dai sedimenti della zona di Porto Marghera, ha evidenziato la presenza di tossicità elevata nel Canale Brentelle e nella Darsena della Rana per gli indicatori utilizzati.

In entrambi i lavori sopracitati viene inoltre evidenziato che le concentrazioni di solfuro nelle acque interstiziali dell'area in oggetto sono inferiori ai limiti di sensibilità delle specie utilizzate nei test di tossicità, mentre si riscontrano alte concentrazioni di ammoniaca nell'acqua interstiziale e nell'elutriato della zona industriale di Porto Marghera, dove presumibilmente vengono scaricate grandi quantità di ammoniaca di origine antropica ogni anno, che si vanno ad aggiungere alla produzione naturale di ammoniaca nel sedimento, derivante dalla degradazione della sostanza organica.

Informazioni combinate su parametri chimico-fisici del sedimento ed effetti tossici sono riportati nello studio di A. Volpi Ghirardini et al. (2005a). La tossicità dell'elutriato estratto dai sedimenti del canale Brentelle è risultata alta sia con l'utilizzo del test di spermiotossicità che con l'utilizzo del test di embriotossicità su *P. lividus*. Lo studio fornisce inoltre informazioni sullo stato chimico-fisico del sedimento durante il campionamento (Tabella 2.1) e sulle concentrazioni di microinquinanti organici e metalli presenti all'epoca nei sedimenti del Canale Brentelle (Tabella 2.2).

Tabella 2.1. Coordinate geografiche e caratteristiche chimico fisiche del sedimento del Canale Brentelle; informazioni qualitative sull'aspetto (ossidazione superficiale, colore, odore), dimensione delle particelle, umidità, materia organica (OM%), carbonio organico totale (TOC%), zolfo totale (S%) (A. Volpi Ghirardini et al. (2005a)).

Stazione	Coordinate		Apparenza fisica			Frazioni granulometriche			Umidità (%)	OM (%)	TOC (%)	S (%)
	Latitudine	Longitudine	Ossid. sup.	Colore	Odore	Sabbia	Limo	Argilla				
BR	45°27'07"	12°12'55"	No	Nero	Idrocarburi	27.8	52.9	19.3	53	6.3	2.6	0.27

Tabella 2.2. Risultati delle analisi chimiche di metalli e microinquinanti organici nel Canale Brentelle; i valori dei metalli sono espressi in mg/kg; PCBs, POCs, HCB e PAHs sono espressi in µg/kg e PCDDs/PCDFs in ng/kg (A. Volpi Ghirardini et al. (2005a)).

Stazione	Metalli										Microinquinanti organici						
	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn	Somma PCBs	Aroclor PCB	POCs	HCB	PAHs	PCDDs	PCDFs
BR	20	0.8	35	82	22000	0.7	380	30	64	235	38.78	201.6	22.5	36.1	6436	231.7	269.1

Nel 2018 lo studio di M. Picone et al. (2018) ha utilizzato il tasso di sviluppo larvale (LDR) e la mortalità dei primi stadi larvali (ELS) dei copepodi (*Acartia tonsa*) come endpoint tossicologici per la valutazione della tossicità del sedimento. Per quanto riguarda l'area d'indagine lo studio ha evidenziato una tossicità significativa nei confronti degli stadi larvali dei copepodi con inibizione dello sviluppo pari al 96% rispetto alla condizione di controllo, ed un'elevata contaminazione da metalli (in particolare Hg con 7.3 mg/kg) e microcontaminanti organici (soprattutto PCB, idrocarburi policiclici aromatici e DDT).

Oltre a queste indagini ecotossicologiche, nel sito di canale Brentelle nel 2008 sono già state testate due differenti procedure sequenziali di TIE con applicazione dei test di spermiossicità con *P. lividus* e di embriossicità con *M. galloprovincialis* come detector dell'efficienza della procedura (M. Picone et al., 2009).

I risultati per quanto riguarda il sito d'indagine del canale Brentelle riportano delle evidenze solo per quanto riguarda una tossicità subcronica nei confronti delle larve di *C. gigas*, mentre non è stata evidenziata nessuna tossicità acuta nei confronti dei gameti di riccio di mare. Lo studio prevedeva l'utilizzo di due procedure TIE che differivano nell'ordine della sequenza dei trattamenti pianificati. Entrambe le procedure hanno ugualmente messo in evidenza che gli effetti tossici del sito indagato sono dovuti ad ammoniaca, metalli e particolato sospeso. I risultati di questo studio hanno evidenziato inoltre che l'utilizzo della prima procedura di TIE, nella quale l'esposizione ad *Ulva rigida* è pianificata come ultimo trattamento, porta alla incompleta caratterizzazione della tossicità. Infine, un altro importante aspetto emerso da questo studio è che l'aggiunta di tiosolfato di sodio, utilizzato nella prima procedura come trattamento iniziale, ha prodotto un aumento inatteso degli effetti tossici rispetto al test di riferimento, mentre le manipolazioni successive hanno fornito una importante riduzione della tossicità; questo indica la possibile presenza di contaminanti nel sito in grado di reagire con il tiosolfato.

3. Materiali e metodi

3.1. Selezione del sito e campionamento del sedimento

Come citato nel capitolo 2.1., l'area di campionamento scelta per il progetto è stata quella del canale Brentelle nella Laguna di Venezia. La scelta di questo sito è stata effettuata basandosi su alcuni criteri che lo rendono idoneo allo studio, quali:

- a) presenza di tossicità acuta e/o subcronica in studi svolti precedentemente (cfr paragrafo 2.3);
- b) presenza di più contaminanti al di sopra delle soglie di effetto riportate in letteratura, ad esempio Effect Range Low (ERL) e/o Effect Range Median (ERM) ovvero concentrazioni al di sotto delle quali effetti tossici sono raramente riscontrati (ERL) o concentrazioni al di sopra delle quali effetti tossici sono probabili (ERM) (E.R. Long et al., 1995);
- c) presenza di ammoniaca come possibile fattore di confusione, come è stato denotato in più studi pregressi svolti nell'area in questione a causa di scarichi di ammoniaca di origine antropica (A. Volpi Ghirardini et al., 2005a; C. Losso et al., 2009; M. Picone et al., 2009).

Per assicurare un buon campionamento del sedimento è necessario utilizzare metodi che garantiscano il prelievo di campioni rappresentativi delle condizioni ambientali dell'area di indagine, la buona conservazione dei campioni e la standardizzazione delle procedure per ottenere matrici di saggio per il test.

La raccolta *in situ* del campione è stata eseguita secondo una procedura di campionamento integrato e di controllo qualità (A. Volpi Ghirardini et al., 2005a). Lo strumento utilizzato per la raccolta del sedimento è stata una benna di Van Veen di superficie 600 cm². Con la benna sono stati raccolti sedimenti superficiali arrivando fino a 15 cm di profondità, i quali sono stati in seguito sub-campionati e conservati in contenitori di vetro da 2 L. Per evitare che il sedimento campionato fosse soggetto ad ossidazione, i contenitori sono stati riempiti senza lasciare spazi vuoti e sono poi stati chiusi ermeticamente. Una volta giunti in laboratorio i campioni prelevati sono stati conservati per 48 ore in cella frigorifera a 4°C in assenza di luce, prima di iniziare l'estrazione delle acque interstiziali. I campioni totali raccolti ammontavano ad un volume complessivo di otto litri di sedimento.

3.2. Estrazione dell'acqua interstiziale

Visto il consistente volume di acqua interstiziale necessario per eseguire la procedura di TIE (circa 2 litri di campione), si è optato per l'impiego della procedura di estrazione tramite centrifugazione, utilizzando una Ultracentrifuga Beckman 15-35 (rotore tipo 19).

Per poter utilizzare questo metodo di estrazione, la prima attività da svolgere consiste nella suddivisione del sedimento presente nel contenitore ermetico di vetro da 2 litri all'interno di sei flaconi in policarbonato da 250 ml, i quali sono stati successivamente inseriti all'interno della centrifuga. Per poter eseguire questa operazione evitando possibili modificazioni delle caratteristiche chimico-fisiche del substrato dovute all'esposizione all'ossigeno del campione, è necessario completare questo passaggio all'interno di un Glovebox, contenitore sigillato e provvisto di robusti e lunghi guanti che permettono all'operatore di effettuare le manipolazioni necessarie mantenendo il sedimento in un'atmosfera priva di ossigeno.

Infatti, una volta inserita nel Glovebox tutta la strumentazione necessaria al trasferimento del sedimento nei flaconi, il Glovebox è stato sigillato, l'aria è stata eliminata dall'atmosfera interna attraverso l'applicazione del vuoto, ed è stata sostituita da azoto per un primo lavaggio dell'ambiente interno. Una volta svuotato nuovamente il Glovebox attraverso una seconda applicazione del vuoto per eliminare l'azoto utilizzato per il lavaggio, il contenitore è stato definitivamente riempito di azoto. All'interno del Glovebox il sedimento presente nel contenitore ermetico di vetro è stato riversato in un recipiente di vetro per permetterne l'omogeneizzazione e l'eliminazione di corpi estranei ed organismi. In seguito, tramite delle spatole, il sedimento è stato inserito all'interno dei flaconi in policarbonato sopracitati. Considerando che i flaconi vanno posizionati all'interno della centrifuga a coppie opposte, in questa fase bisogna prestare attenzione che il peso dei flaconi opposti sia simile, in modo da evitare problemi di *"unbalancing"*, ovvero fenomeni di sbilanciamento nella rotazione che si possono riscontrare una volta azionata la centrifuga.

Una volta terminato il trasferimento di sedimento, i sei flaconi sono stati inseriti all'interno della centrifuga, prestando attenzione a mettere in posizioni opposte i flaconi di peso simile. La centrifuga è stata impostata a 12.000 rpm per 30 minuti a 4°C; ciò ha permesso

la separazione della fase liquida da quella solida, la quale per forza centrifuga si è posizionata nella parte esterna del flacone.

Terminata la centrifugazione, i flaconi sono stati reinserti all'interno del Glovebox ed è stata ripristinata l'atmosfera di azoto. Con l'utilizzo di una pipetta, l'acqua interstiziale ricavata dalla centrifugazione del sedimento è stata trasferita in bottiglie da 1 litro per lo stoccaggio. I campioni di acqua interstiziale ricavati da questa procedura sono stati immediatamente congelati, per venire poi scongelati a temperatura ambiente la sera prima di iniziare la procedura di TIE.

3.3. Classi di contaminanti target

Grazie allo studio M. Picone et al. (2009) si è venuti a conoscenza della presenza di ammoniaca, metalli e contaminanti organici nel sito prescelto, quindi anche la pianificazione del presente progetto è stata sviluppata ponendo particolare attenzione a questi tre contaminanti target.

3.3.1. Ammoniaca

L'ammoniaca è un sottoprodotto naturale dell'attività microbica nei sedimenti e spesso le alte concentrazioni trovate nei sedimenti e nelle acque vengono aumentate dall'inquinamento antropogenico (U.S. EPA, 2007). Quando l'ammoniaca si trova in soluzione acquosa, essa esiste in entrambe le forme, ionizzata e non ionizzata, in equilibrio secondo la reazione:



dove NH_3 è ammoniaca (non ionizzata) e NH_4^+ è ammonio (ionizzato). La speciazione dell'ammoniaca è una funzione diretta del pH della soluzione e, in misura minore, della temperatura, della salinità, della pressione e delle concentrazioni ioniche (B. L. Hampson, 1977a; B. L. Hampson, 1977b).

In natura l'ammoniaca deriva da piante ed animali come risultato della decomposizione di organismi e di acque reflue attuata da microrganismi, oppure può derivare dal rilascio di

fertilizzanti, da emissioni industriali e da attività vulcanica. Solitamente l'esposizione terrestre non è problematica, poiché, anche se una certa quantità di ammoniaca viene volatilizzata in continuazione dalla superficie terrestre, questa sale rapidamente nell'atmosfera e viene distrutta dalle reazioni fotolitiche così che solo una parte di ammoniaca atmosferica possa venire in seguito restituita alla superficie terrestre sotto forma di deposizione umida o secca. L'esposizione più problematica è quindi quella acquatica. L'ammoniaca è presente nell'ambiente acquatico a causa di svariate fonti quali scoli agricoli, deflussi di allevamenti, rifiuti industriali, decomposizione di rifiuti biologici, gassificazione del carbone, che vengono rilasciati nei fiumi e negli oceani. Pertanto, la principale preoccupazione per la tossicità dell'ammoniaca si riscontra in particolare nelle regioni con elevato insediamento umano e / o un numero elevato di animali da allevamento, come suini e bovini. (D.J. Randall et al., 2002; R. V. Thurston et al., 1981).

L'ammoniaca ad alte concentrazioni in habitat acquatici può portare ad effetti tossici sulla macro-fauna che sono generalmente attribuiti alla frazione non ionizzata (NH_3), piuttosto che alla componente ionizzata (NH_4^+), considerata non tossica o significativamente meno tossica di NH_3 (B. L. Hampson, 1977a; R. V. Thurston et al., 1981). Questo perché la maggior parte delle membrane biologiche è permeabile all'ammoniaca ma relativamente impermeabili agli ioni ammonio. (D.J. Randall et al., 2002).

Ulteriori studi inoltre hanno determinato che l'ammoniaca può avere effetti strettamente dipendenti dal pH su test di embriotossicità, mentre non intacca sensibilmente test di tossicità sugli spermatozoi (A. Arizzi Novelli et al., 2003).

Nonostante NH_3 sia la forma di gran lunga più tossica, a bassi valori di pH può diventare significativo anche il contributo dello ione ammonio (R. V. Thurston et al., 1981). Infatti, l'elevata presenza di NH_4^+ è tossica per tutti i vertebrati perché sposta gli ioni K^+ e depolarizza i neuroni, causando l'attivazione del recettore del glutammato di tipo NMDA, che porta a un afflusso eccessivo di Ca^{2+} e alla successiva morte cellulare nel sistema nervoso centrale, provocando potenzialmente convulsioni, coma e morte (D.J. Randall et al., 2002).

La tossicità dell'ammoniaca viene quindi espressa come azoto ammoniacale totale nell'ambiente, ovvero come somma di ammoniaca e ione ammonio ($[NH_3]$ $[NH_4^+]$, mg N/L).

3.3.2. Metalli

I metalli sono elementi naturali, ma non biodegradabili, la cui concentrazione nell'atmosfera aumenta a causa di attività antropiche. I metalli immessi in atmosfera, nel suolo ed in acqua hanno come destinazione finale il mare, dove giungono tramite trasporto sia atmosferico che fluviale, oppure legato al dilavamento dei suoli, scarichi diretti ed incidenti in mare. L'immissione di metalli in ambiente deriva principalmente dall'industria mineraria, metallurgica e siderurgica, ma alcuni contributi si hanno anche dall'agricoltura, dalla produzione di energia, da processi industriali, dai trasporti, dall'uso e produzione di solventi e dai rifiuti (D. Alvarez-Munoz et al., 2016)

Una volta giunti in ambiente marino i metalli subiscono delle trasformazioni che ne possono alterare la biodisponibilità; generalmente in questo ambiente i metalli, dato che non sono biodegradabili, tendono ad accumularsi nel sedimento. La maggiore forza ionica dell'acqua marina porta a dei cambiamenti nella speciazione dei metalli dovuta alla variazione della salinità dell'acqua, facendo sì che alcuni metalli precipitino ed altri rimangano in soluzione.

Anche il pH è un importante fattore che regola la speciazione dei metalli, favorendo generalmente la presenza di metalli in forma cationica, a bassi valori di pH, e la formazione di complessi se invece sono presenti alti valori di pH.

Un terzo parametro che può influenzare la speciazione dei metalli è il potenziale di ossidoriduzione Eh; infatti con valori di $Eh < 0$, ovvero in condizioni anossiche, i metalli vengono immobilizzati per via della tendenza a formare solfuri metallici amorfi insolubili; mentre con valori di $Eh > 0$, ovvero in condizioni ossidate, i metalli tornano liberi in soluzione in forma libera o di sali.

Generalmente un elemento è maggiormente tossico quando è presente in forma metallica libera, perché in questa forma può superare più facilmente le barriere cellulari, passando

attraverso i canali ionici legandosi alle proteine carrier presenti nella membrana fosfolipidica, oppure per endocitosi (C. H. Walker et R. M. Sibly, 2001).

La biodisponibilità dei cationi metallici è fortemente influenzata dalla composizione chimica della matrice di esposizione, questo fatto può complicare la valutazione della tossicità dei metalli presenti in acqua. Nella colonna d'acqua si ritiene che la loro biodisponibilità sia meglio rappresentata dalla concentrazione disciolta della loro forma ionica bivalente (ad esempio, Cd^{2+} e Ni^{2+}). Nei sedimenti la tossicità di questi metalli è correlata alla loro concentrazione nell'acqua interstiziale, che a sua volta dipende dalla presenza nel sedimento di fasi leganti che possano sequestrare i metalli, mantenendoli associati alla fase solida (U.S. EPA, 2007). Ad esempio, nei sedimenti anossici, il solfuro forma legami con i metalli creando composti di solfuro di metallo altamente insolubili che limitano la presenza del metallo nell'acqua interstiziale, questa capacità legante del solfuro è misurata come Acid Volatile Sulfide (AVS). Altro elemento capace di sequestrare metalli nei sedimenti è il carbonio organico. Inoltre, nei sedimenti ossidati anche idrossidi di ferro e manganese svolgono un ruolo preminente nel sequestro dei metalli nel sedimento (U.S. EPA, 2007).

3.3.3. Contaminanti organici

I contaminanti organici sono composti in cui uno o più atomi di carbonio sono uniti tramite legame covalente ad atomi di altri elementi, principalmente idrogeno, ossigeno ed azoto.

Alcune delle principali classi di contaminanti organici sono gli idroclorofluorocarburi, gli idrocarburi policiclici aromatici, i benzeni ed i polifenoli alogenati, i surfattanti, le diossine, i furani, i pesticidi organoclorurati, i pesticidi organofosforici, i carbammati, le piretrine, i piretroidi i neonicotinoidi, gli erbicidi, molti prodotti farmaceutici e alcuni endocrine disruptors.

I contaminanti organici hanno un diverso comportamento in ambiente in base ad alcune loro caratteristiche chimico-fisiche quali la solubilità in acqua, la lipofilicità, l'adsorbimento su matrici solide, il coefficiente di ripartizione carbonio organico/acqua, il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua, la volatilità e la persistenza in ambiente (C. H. Walker et R. M. Sibly, 2001).

Alcuni composti organici hanno la capacità di diffondere all'interno degli organismi come conseguenza della loro diffusione passiva attraverso le barriere naturali, dovuta al loro alto grado di solubilità. I contaminanti organici possono quindi essere assorbiti da diversi organismi in modi differenti, ad esempio attraverso il tratto alimentare, la pelle, i polmoni, le cuticole le branchie, le foglie e le radici.

Una volta che una sostanza chimica è entrata in un organismo, vengono identificati quattro tipi di sito che possono essere raggiunti:

- Siti di azione, dove la sostanza chimica agisce sull'organismo. Qui, la forma tossica di un inquinante interagisce con una macromolecola endogena o struttura e ciò porta alla comparsa di manifestazioni tossiche nell'intero organismo.
- Siti di metabolismo, dove l'organismo agisce sulla sostanza chimica. Qui si trovano enzimi che metabolizzano gli xenobiotici, provocando la disintossicazione e in rari casi l'attivazione.
- Siti di archiviazione, dove lo xenobiotico esiste in uno stato inerte dal punto di vista tossicologico.
- Siti di escrezione, che può essere dell'inquinante originale o, in gran parte dei casi, di un prodotto di biotrasformazione (C. H. Walker et R. M. Sibly, 2001).

Il destino di un composto organico è correlato alla sua tendenza a subire processi di trasformazione biotici ed abiotici quali idrolisi, fotolisi, ossidazione o degradazione microbica, che portano il composto ad essere più o meno persistente in ambiente (C. H. Walker et R. M. Sibly, 2001).

Si ritiene che le sostanze organiche, in particolare quelle che sono relativamente non polari, siano fortemente assorbite dalla fase di carbonio organico nei sedimenti. Nel lavoro di D. M. Di Toro et al. (1991) si è sostenuto che, tramite la partizione di sostanze chimiche tra il carbonio organico e l'acqua interstiziale, si possa valutare la tossicità delle sostanze chimiche organiche non polari nei sedimenti. Estendendo questa teoria, si potrebbe prevedere che la modifica della ripartizione relativa della sostanza chimica tra il carbonio organico e l'acqua interstiziale cambierebbe anche la tossicità del sedimento. Quindi se si modifica un sedimento contaminato con una resina o una fonte di carbonio ad alta affinità,

ci si può aspettare una riduzione della concentrazione di sostanze chimiche organiche non polari nell'acqua interstiziale e, di conseguenza, una riduzione della tossicità dei sedimenti, come confermato in diversi esperimenti svolti da B. S. Anderson et al. 2006; K. T. Ho et al. 2004; P. A. Kosian et al. 1998; P. A. Kosian et al. 1999 (U.S. EPA, 2007).

3.4. Trattamenti di TIE proposti nella letteratura scientifica

I trattamenti condotti nel corso del progetto hanno seguito le metodologie descritte da U.S. EPA per le acque interstiziali, con l'eccezione del trattamento con *Ulva* che ha seguito le indicazioni riportate in K. T. Ho et al. (2004) e M. Picone et al. (2009), come sarà descritto nei paragrafi seguenti.

Tutti i trattamenti proposti dalla letteratura, come previsto dalle linee guida U.S. EPA, presumono che l'acqua interstiziale da sottoporre a procedura di TIE sia tossica e che sia stato scelto per il successivo test di tossicità un organismo appropriato.

3.4.1. Trattamento con *Ulva rigida* per la rimozione di NH₃

L'*Ulva rigida* (Figura 3.1) è un'alga verde, della classe delle *Chlorophyceae* con tallo laminare, color verde smeraldo, rigido alla base e più delicato vicino ai margini di crescita, a volte con fori ellittici irregolari nella parte superiore; arriva fino a 30 cm di altezza. È presente in ambiente marino per tutto l'anno e cresce su fondali rocciosi o fangosi come epifita, spesso in zone portuali, inquinate e poco profonde, talvolta sviluppando "maree verdi". È un'alga comune e ampiamente distribuita, molto diffusa nel Mar Mediterraneo (Seaweed site, <http://www.seaweed.ie>).



Figura 3.1. Aspetto di *Ulva rigida* in ambiente marino

Il trattamento è stato svolto con *U. rigida* per la sua similarità in struttura e proprietà con *U. lactuca*, specie indicata nelle guide U. S. EPA, come dimostrato da M. Picone et al. (2009), in cui l'utilizzo di *Ulva rigida* è stato effettuato seguendo lo studio di K. T. Ho et al. (1999) con modifiche minori.

Nelle guide per TIE dell'U. S. EPA (2007) si indica che *U. lactuca* assume NH_3 dalla fase acquosa, riducendo così di molto le concentrazioni nell'acqua. Il trattamento con l'*U. lactuca* si è dimostrato efficace nel rimuovere l'ammoniaca sia dalle acque interstiziali marine che in esposizioni di sedimenti tal quali (K. T. Ho et al., 1999; M. Pelletier et al., 2001). L'uso di *Ulva* per la rimozione di NH_3 non è tuttavia esente da potenziali effetti collaterali. Infatti, secondo lo studio di M. Pelletier et al. (2001) il posizionamento di *U. lactuca* nell'acqua sovrastante di una camera di prova per sedimenti, in un test su fase solida, non altera in modo significativo le concentrazioni di contaminanti organici selezionati, ma può modificare la concentrazione e la tossicità dei metalli. K. T. Ho et al. (1999) hanno constatato che nelle miscele di ammoniaca e metalli, l'accumulo di metallo da parte della *U. lactuca* era generalmente inferiore (10%) rispetto alla sola esposizione ai metalli. Pertanto, durante un procedimento TIE, la manipolazione con *U. lactuca* rimuoverà meno metallo da miscele che contengono ammoniaca e metalli che da miscele complesse che non contengono ammoniaca. Altre ricerche (D. L. Rice et al., 1981; D. L. Rice, 1984) hanno riferito che *Ulva spp.* generalmente assimila metalli, ma che l'uptake dei metalli risulta significativo dopo un periodo di esposizione generalmente più lungo (6-7 giorni) rispetto alle 3-5 ore utilizzate nelle procedure TIE.

Secondo uno studio di R. M. Burgess et al. (2003), l'aggiunta di *U. lactuca* è stata efficace per la riduzione della tossicità osservata grazie al test di tossicità con il misidiaceo *Americamysis bahia*, il che indica che questo metodo funziona bene con le specie epibentoniche esposte all'ammoniaca nella colonna d'acqua.

In accordo con quanto previsto da U. S. EPA (2007) le alghe vengono raccolte da un sito pulito entro i quattro giorni prima del loro utilizzo nella TIE. Una volta in laboratorio, le alghe vengono ripulite da possibili epifite e dalla presenza di epifauna. Nel periodo di permanenza in laboratorio le alghe devono essere mantenute in acqua marina pulita, statica e aerata a bassa luminosità e temperatura, per evitarne il decadimento. Per la manipolazione, è necessario aggiungere l'alga alle acque del campione e mantenere il campione in esposizione con l'alga.

Una diminuzione della tossicità dopo l'aggiunta dell'alga suggerisce la presenza di tossicità da ammoniaca, anche se non si può escludere a priori la rimozione di alcuni metalli (M. Pelletier et al., 2001); questa possibilità si può definire soltanto dopo aver valutato i risultati delle analisi chimiche, dal momento che l'efficacia della manipolazione può essere definita solo se la stessa è accompagnata da analisi di ammoniaca ed elementi in traccia prima e dopo l'esposizione del campione all'*Ulva*.

3.4.2. Trattamento con zeolite per la rimozione di NH_3

La zeolite è un alluminosilicato idrato composto da atomi di alluminio simmetricamente impilati e tetraedri di silice, che formano una struttura tridimensionale aperta e stabile con una carica negativa (M. Rozic et al., 2000). Sono circa 30 le zeoliti naturali note, delle quali solo poche sono sufficientemente abbondanti e accettabilmente pure per essere di uso commerciale (S. Kesraoui-Ouki et al., 1994). La zeolite funziona come un materiale di scambio cationico e ha un'affinità relativamente elevata per l'ammoniaca. La carica negativa sulle zeoliti consente l'assorbimento di alcuni ioni caricati positivamente e, in soluzione acquosa, NH_4^+ è preferenzialmente adsorbito dalla zeolite. La rimozione di NH_4^+ dalla soluzione porta ad una riduzione proporzionale delle concentrazioni di NH_3 . Per via di questa capacità di rimozione dell'ammoniaca da una soluzione la zeolite viene spesso

utilizzata come manipolazione per rimuovere la tossicità dell'ammoniaca in TIE su sedimenti, in quanto l'aggiunta di zeolite granulata (aggiunta nell'ordine del 20%) a sedimenti arricchiti con ammoniaca riduce le concentrazioni di ammoniaca nell'acqua interstiziale (riduzione di ammoniaca di circa il 70%) e la tossicità dell'ammoniaca nei confronti degli invertebrati. (J. M. Besser et al., 1998; R. M. Burgess et al., 2003).

La zeolite come metodo per la rimozione di ammoniaca in TIE su acque marine non è stata molto esplorata e, a parte gli studi di R. M. Burgess, non sono stati trovati altri riferimenti bibliografici, nonostante il metodo sia contemplato nei manuali U.S. EPA.

Il trattamento delle acque interstiziali con zeolite presuppone la creazione di una colonna di zeolite, per forzare il campione di acqua interstiziale a passarci attraverso e quindi consentire l'adsorbimento di NH_4^+ . La dimensione delle particelle è importante per i trattamenti che utilizzano colonne; le particelle, oltre ad essere approssimativamente della stessa misura, devono essere sufficientemente piccole da fornire un buon contatto con le superfici reattive, ma non così piccole da causare l'intasamento della colonna.

Per riempire la colonna si utilizzano almeno 30 g di zeolite classata secca, che va miscelata con acqua deionizzata e successivamente versata nella colonna al fine di ottenere uno strato di almeno 10 cm. Prima dell'utilizzo con il campione, la colonna di zeolite va lavata con acqua Milli-Q e con acqua di diluizione (acqua marina naturale filtrata) al fine di eliminare eventuali residui di frazione fine (U.S. EPA, 1992; U.S. EPA, 2007).

Se dopo il passaggio attraverso la colonna di zeolite viene misurata una diminuzione della concentrazione di ammoniaca, insieme ad una concomitante diminuzione della tossicità, si ha una buona indicazione che un contributo alla tossicità del campione è dato dalla presenza di ammoniaca. Nel caso in cui invece si sapesse che la concentrazione di ammoniaca nell'acqua interstiziale è sufficientemente elevata da provocare tossicità, ma il trattamento con zeoliti non porta ad alcuna diminuzione della tossicità, bisogna considerare la possibilità che siano presenti ulteriori sostanze tossiche di maggiore potenza (U.S. EPA, 2007).

Come nel caso del trattamento con *Ulva*, per una corretta interpretazione dei risultati di questa manipolazione, è necessario accompagnarla con analisi di ammoniaca ed elementi in traccia prima e dopo il passaggio attraverso la colonna.

3.4.3. Trattamento con EDTA per la chelazione degli elementi in traccia

L'EDTA ovvero, l'acido etilendiamminotetraacetico, è un acido tetracarbossilico con formula bruta $C_{10}H_{16}N_2O_8$; si tratta di un forte agente chelante che produce complessi non tossici con molti metalli. Grazie a questa proprietà, con l'aggiunta di EDTA al campione di acqua interstiziale è possibile testare la presenza di tossicità dovuta ai metalli. I cationi chelati da EDTA includono alcune forme di alluminio, bario, cadmio, cobalto, rame, ferro, piombo, manganese, nichel, stronzio e zinco. L'EDTA non complessa forme anioniche di metalli e chela solo debolmente determinati metalli cationici, ad esempio, argento, cromo e tallio (W. Stumm e J. J. Morgan 1981). Le aggiunte di EDTA sono quindi efficaci nella rimozione di cationi bivalenti potenzialmente tossici in campioni acquosi di origine marina (W. Stumm and J. J. Morgan, 1981; U.S. EPA, 1996).

Nelle procedure di TIE su acque marina, si utilizza una singola concentrazione di EDTA, anziché un approccio di tipo fattoriale con diverse concentrazioni di EDTA, come previsto per le acque dolci (U.S. EPA, 1996). Questo perché il medium marino è un ambiente chimicamente più stabile rispetto alle acque dolci, in cui piccole variazioni di durezza possono modificare sostanzialmente la tossicità dell'EDTA. Tuttavia, per evitare effetti tossici nei confronti della specie indicatrice da utilizzare nei test di tossicità, è necessario scegliere la concentrazione da testare sulla base della sensibilità dell'indicatore. Le linee guida USEPA riportano le concentrazioni di EDTA da utilizzare per le specie più utilizzate (*Mytilus galloprovincialis*, *Ampelisca abdita*, varie specie di echinodermi); nel caso la sensibilità dell'indicatore all'EDTA sia ignota, allora si rende necessario effettuare dei test per valutare quali concentrazioni siano compatibili.

Una volta aggiunto EDTA al campione, è necessario lasciare il campione in esposizione per un periodo di tempo prestabilito di almeno 3 ore (U.S. EPA, 2007), al fine di consentire all'EDTA di interagire con gli elementi in traccia presenti in soluzione.

Le riduzioni della tossicità del campione derivante dall'aggiunta di EDTA sono per lo più specifiche e legate alla alterazione della biodisponibilità dei metalli cationici contenuti nel campione. Dal momento che il trattamento con EDTA non prevede una rimozione dei

metalli, ma la loro semplice chelazione, non sono mai previste analisi degli elementi in traccia prima e dopo il trattamento.

3.4.4. Trattamento tramite filtrazione per rimozione del particolato

La filtrazione è un trattamento di estrazione della frazione sospesa eseguito con lo scopo di ridurre la tossicità associata al particolato; è utilizzata per determinare se i contaminanti che generano effetti tossici sono solubili, quindi passano attraverso il filtro, oppure se sono associati al particolato solido organico ed inorganico. La filtrazione inoltre consente di eliminare le particelle più grossolane dal campione, che possono essere state introdotte da altre manipolazioni (ad esempio trattamento con *Ulva* o zeolite). I campioni devono essere filtrati prima delle manipolazioni tramite colonne, al fine di evitare l'occlusione delle stesse. Tuttavia, bisogna prestare attenzione, dato che la filtrazione può alterare il campione, ad esempio per assorbimento dei contaminanti disciolti sul filtro (NFESC, 2003; U. S. EPA, 1996). Essendo un trattamento sostanzialmente "non specifico", il suo impiego è stato a volte messo in discussione.

A questa manipolazione non è stata associata alcuna misura di tipo chimico-fisico.

3.4.5. Trattamento con colonne di scambio cationico per rimozione degli elementi in traccia

Le resine a scambio cationico sono generalmente costituite da silice o da una struttura polimerica rivestita con un gruppo funzionale specifico, progettato per formare forti associazioni con elementi metallici bivalenti. I gruppi funzionali possono includere acidi carbossilici con carica negativa ed imminodiacetato. Per essere considerati utili ai fini dell'impiego in TIE, i supporti a scambio cationico devono soddisfare determinati criteri tra cui non generare effetti tossici sul liquido post-colonna e funzionare efficacemente con campioni ambientali. (R. M. Burgess et al., 1997; U.S. EPA, 2007). I cationi metallici presenti nel campione formano un legame con la resina a scambio cationico, generando così una riduzione della concentrazione di metallo biodisponibile nel campione e, conseguentemente, della tossicità dovuta ai metalli nel campione (R. M. Burgess, 2000a, 2000b).

Per questo tipo di trattamento si utilizzano solitamente colonne di scambio cationico per analisi chimiche. Sia il campione di prova sia un bianco procedurale vengono preparati e testati (U.S. EPA, 2007). I campioni di acqua interstiziale vengono poi fatti passare attraverso la colonnina contenente la resina a scambio cationico ed il campione trattato viene recuperato con un becher. Prima dell'utilizzo la colonna deve comunque essere condizionata secondo le modalità riportate dal produttore (generalmente attraverso lavaggi alternati con metanolo e acqua deionizzata).

Secondo una ricerca di R. M. Burgess et al. (2000a), nella quale è stata comparata la capacità di una resina di ridurre la tossicità di metalli cationici, ammoniaca e endosulfan (esempio di una sostanza chimica organica non polare), è stato osservato che la resina induceva riduzioni molto maggiori nella tossicità del metallo, ma assieme a questo si vedeva una certa reattività incrociata sia con l'ammoniaca che con l'endosulfan. Pertanto, l'utilizzo di una colonna a scambio cationico può portare, oltre che alla riduzione della tossicità dovuta ai metalli bivalenti, anche un'interazione con ammoniaca e sostanze organiche non polari, particolare di cui tenere conto nell'interpretazione finale. È necessario però interpretare anche questo risultato sulla base delle manipolazioni globali fatte nel corso della TIE.

Per ottimizzarne l'interpretazione, questa manipolazione va accompagnata da analisi degli elementi in traccia prima e dopo il passaggio attraverso la colonna di scambio cationico.

3.4.6. Trattamento con polimeri per estrazione degli organici

Le procedure di TIE su acque interstiziali prevedono l'impiego di colonne per cromatografia in fase solida, per il sequestro dei contaminanti organici. Generalmente questo trattamento prevede l'impiego di colonne con sorbente octadecilico (C₁₈), che ha buona affinità per i composti organici non polari, anche se nel corso degli anni sono state utilizzate con successo altre resine e polimeri (Tenax[®], C8, Oasis[®]) (U.S. EPA, 2007). Due polimeri che hanno recentemente catalizzato l'attenzione per possibile impiego in TIE sono Amberlite[®] XAD[®]-2 e Discovery[®] DPA- 6s, che sono le colonne scelte per il presente lavoro.

3.4.6.1. *Trattamento con Amberlite® XAD®-2*

Amberlite® XAD®-2 è un copolimero stirene-divinilbenzene con grande affinità per i composti organici idrofobi e solubili, inclusi antibiotici, composti organici azotati, grassi, pesticidi e idrocarburi policiclici aromatici (IPA), come dimostrato dallo studio di H. Watanabe et al. (2013) in cui, analizzando polveri stradali tramite TIE, è emersa la capacità di questo copolimero di eliminare composti organici idrofobici. Come per le colonne di scambio cationico, prima di utilizzare le colonnine è necessario condizionarle facendo passare 2 ml di metanolo e 6 ml di acqua ultrapura Milli-Q attraverso la colonnina. In seguito, è possibile manipolare il campione, trattando prima l'acqua di diluizione e poi i campioni di acqua interstiziale.

3.4.6.2 *Trattamento con Discovery® DPA- 6s*

Discovery® DPA- 6s è una resina poliammidica, utilizzata per adsorbire composti organici polari, che mostra una buona capacità di ritenzione per gli *endocrine disrupting chemicals* (EDC) e le alchil-amine (P. Kusch et al. 2006; R. Liu et al., 2004). La metodologia di applicazione è la stessa prevista per Amberlite® XAD®-2, quindi include il condizionamento tramite 2 ml di metanolo e 6 ml di acqua ultrapura Milli-Q; per poi passare al trattamento dell'acqua di diluizione e dei campioni di acqua interstiziale.

3.5. Procedura di TIE

La procedura TIE scelta per il progetto è stata una procedura sequenziale ibrida di Phase I e Phase II, la cui struttura è riportata in Figura 3.2. Sulla base delle linee guida fornite dalle procedure U.S. EPA (1996; 2007), è stata pianificata una struttura di TIE composta da due trattamenti alternativi, per ciascuna delle tre classi di contaminanti target, ossia ammoniacca, metalli e contaminanti organici. A questi trattamenti verranno inoltre applicate simultaneamente delle analisi chimiche volte all'identificazione della concentrazione di metalli ed ammoniacca, dopo determinate manipolazioni.

La struttura TIE è quindi composta da quattro sequenze principali: le prime due sono identificate come sequenze U, in particolare sono state denominate U-I e U-II e sono le sequenze che presentano l'esposizione ad *Ulva rigida* come primo trattamento (in accordo

con M. Picone et al., 2009); le seconde due sono le sequenze Z, denominate nello specifico Z-I e Z-II, e sono le sequenze che presentano l'esposizione alla zeolite come primo trattamento.

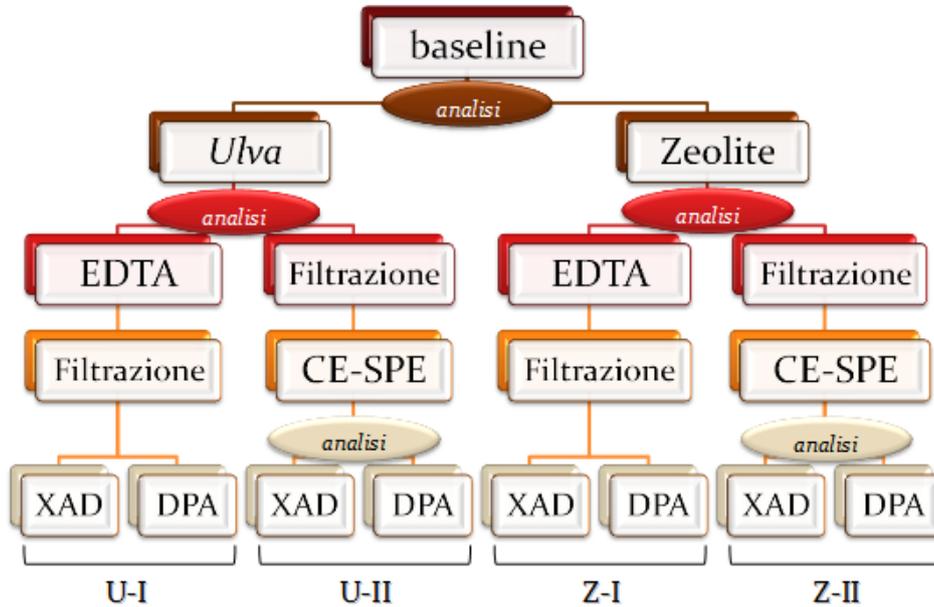


Figura 3.2. Framework della procedura sequenziale "ibrida" di TIE. U = Ulva rigida; Z = zeolite.

L'intera procedura è stata effettuata all'interno del Glovebox, per evitare che l'ossigeno entrasse in contatto con l'acqua interstiziale del campione facendola ossidare. Tutto il materiale necessario per l'intera procedura è stato inserito all'interno del Glovebox, che è stato in seguito sigillato, svuotato dall'aria in esso contenuta e, dopo un lavaggio con azoto, riempito definitivamente con azoto.

Le aliquote di campione di acqua interstiziale erano state congelate subito dopo l'estrazione e sono state scongelate la sera prima di iniziare la procedura TIE.

Tutte le manipolazioni previste sono state eseguite sia sul campione di acqua interstiziale che su un'aliquota di acqua di mare naturale (NSW) filtrata 0,45 µm, che funge da "controllo negativo", per permettere di valutare se ogni manipolazione effettuata aumenta o meno la tossicità del campione, e che verrà inoltre utilizzata come acqua di diluizione nel test di tossicità.

Per ogni manipolazione è stato necessario prelevare per il successivo test di tossicità 30 ml dal trattamento del campione e 50 ml dal trattamento dell'acqua NSW; in più, nei passaggi

nei quali è prevista l'analisi chimica, sono stati prelevati ulteriori 20 ml sia per il campione che per l'acqua marina manipolati.

Prima di iniziare le manipolazioni è stata prelevata un'aliquota di campione ed acqua marina tal quale per l'esecuzione del baseline test e una per l'analisi chimica dell'ammoniaca e dei metalli.

In seguito, si è passati ai trattamenti per la rimozione dell'ammoniaca tramite *Ulva* e zeolite; questi sono stati svolti per primi dato che precedenti lavori condotti su questo sito della Laguna di Venezia, documentati nello studio di M. Picone et al. (2009), hanno evidenziato che il contributo dell'ammoniaca alla tossicità complessiva è spesso predominante e può mascherare gli effetti dovuti ad altri contaminanti, se non viene rimosso all'inizio della TIE.

I trattamenti con *Ulva rigida* (U-I e U-II) sono stati effettuati utilizzando alghe raccolte in una zona della Laguna di Venezia lontana da potenziali fonti di contaminazione (foce del Canale Pordelio, Laguna Nord di Venezia) e conservate in laboratorio per almeno due giorni in acquari riempiti con acqua di mare artificiale (Ocean Fish®, Prodac International, Cittadella, Italia) e mantenuti a 18°C con fotoperiodo 14:10 luce:buio. Prima di utilizzarli per la procedura TIE, i talli sono stati risciacquati con acqua deionizzata ed acqua di mare artificiale e successivamente asciugati, per rimuovere le particelle ed i detriti dalle superfici e l'eccesso di acqua. L'*Ulva* è stata aggiunta a circa 400 ml di campione (circa la metà del totale); il campione è stato trasferito in un becher da 1 L e vi si è aggiunto 1 g di tallo di *Ulva* per ogni 15 ml di campione (quindi in totale sono stati pesati circa 26.6 g di *Ulva*). Una volta aggiunta l'*Ulva* nel becher il campione è lasciato in esposizione per tre ore.

Il trattamento parallelo per l'eliminazione dell'ammoniaca prevede il passaggio del campione e dell'acqua marina attraverso una colonna riempita di zeolite (Z) commerciale per acquari (Zeolite Bios, Mantovani srl, Crespellano, BO, Italia). La colonna di zeolite è stata creata sminuzzando la zeolite per acquari con mortaio e pestello, per poi classarla con setaccio in acciaio inossidabile in modo da ottenere una granulometria nell'intervallo 63-125 µm; è stata scelta una dimensione dei grani leggermente superiore rispetto a quella proposta da USEPA (2007), poiché azioni preliminari condotte in laboratorio hanno dimostrato che particelle più fini causano l'intasamento della colonna dopo il trattamento

di pochi ml di acqua deionizzata o campione. Si sono utilizzati circa 30 g di zeolite classata, che sono stati miscelati con acqua deionizzata in un becher da 1 L e poi versati nella colonna; la colonna così creata è stata lasciata a riposare per almeno 1 ora. Dopo questo periodo di riposo dell'impasto, è stato possibile filtrare l'acqua del campione e il bianco procedurale attraverso la colonnina, grazie all'impiego di un imbuto dosatore sulla colonna di zeolite.

Si è passati in seguito alla caratterizzazione dei metalli tramite il trattamento con Na-EDTA e il passaggio del campione attraverso una colonnina di scambio cationico.

Per il trattamento con Na-EDTA (di seguito EDTA) si è aggiunta al campione ed al bianco procedurale una soluzione di Na-EDTA 0,075 M; per ogni ml di campione sono stati aggiunti 2,4 ml di EDTA. La concentrazione finale ottenuta nel pozzetto in cui è stato eseguito il test è inferiore alla concentrazione massima utilizzabile nei test di sviluppo larvale con molluschi, in accordo con le procedure USEPA (1996; 2007). Per consentire all'EDTA di fare effetto ed interagire con i metalli in soluzione, i campioni sono stati lasciati equilibrare con EDTA per almeno due ore.

Il secondo trattamento per la caratterizzazione dei metalli è il passaggio del campione attraverso colonnine a resine a scambio cationico (indicate con SPE). La colonnina a scambio cationico in questione è una cartuccia SupelClean LC-WCX SPE monouso da 3 ml (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA). Prima dell'uso la colonna SPE è stata attivata facendovi passare attraverso 2 ml di metanolo (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) ed è stata poi risciacquata facendovi passare attraverso circa 6 ml di acqua ultrapura Milli-Q (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Il campione è stato quindi fatto passare attraverso la colonna ad una velocità di circa 10 ml min^{-1} , grazie all'aiuto di una pompa peristaltica per forzare il campione a passare attraverso la colonna con una velocità adeguata.

Il processo di filtrazione del campione e del bianco procedurale è stato effettuato in momenti differenti in base a quale manipolazione è stata effettuata per la caratterizzazione dei metalli.

Nel caso del trattamento con EDTA, la filtrazione è stata effettuata dopo il completamento del periodo di stabilizzazione della soluzione. Invece, nel caso del trattamento con le colonne SPE la filtrazione del campione e del bianco procedurale è stata fatta prima, per

eliminare i solidi sospesi e le particelle che avrebbero potuto causare tossicità o intasare la colonna. La filtrazione è stata eseguita grazie ad un apparato costituito da una beuta con beccuccio, collegata alla pompa a vuoto, sulla quale viene posto, su di un apposito sostegno, il filtro ed il bicchiere per contenere il campione da filtrare. Il filtro utilizzato è stato un filtro in microfibra di vetro (GF / F, Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, Regno Unito) con porosità di 0,7 mm.

Per la caratterizzazione dei contaminanti organici sono state utilizzate due diverse colonne monouso per estrazione in fase solida: una cartuccia Amberlite® XAD®-2 da 3 ml (indicata con XAD) e una cartuccia Discovery® DPA-6 da 6 ml (indicata con DPA) (Supelco Analytical, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Per questi trattamenti è stata utilizzata la stessa metodologia per entrambe le cartucce. Le colonnine sono state condizionate facendovi passare attraverso 2 ml di metanolo (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) e 6 ml di acqua ultrapura Milli-Q (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). In seguito, sono state fatte eluire attraverso le colonnine i campioni e le acque di diluizione, grazie all'aiuto di una pompa peristaltica che permette un più rapido passaggio attraverso la colonna.

Una volta completate tutte le manipolazioni, le aliquote prelevate dal campione di acqua interstiziale e dal bianco procedurale precedentemente manipolati sono state congelate fino al momento del test di tossicità e delle analisi chimiche.

3.6. Test di tossicità

I test di tossicità sono parte integrante delle procedure di Phase I e Phase II di TIE in quanto "detector" dell'efficienza delle manipolazioni effettuate. È molto importante quindi la scelta della specie da utilizzare per il test di tossicità, della quale si deve ben conoscere biologia ed ecologia. È stato deciso di utilizzare i molluschi bivalvi come indicatori per il test di tossicità, poiché questi organismi si prestano allo studio degli effetti sugli stadi larvali (ELS), sono rappresentativi degli ambienti estuarini come il sito analizzato e ne sono una componente chiave, inoltre i test con molluschi sono in genere semplici da eseguire. Per questo test di tossicità è stata scelto di utilizzare *Crassostrea gigas*.

3.6.1. Ecologia di *Crassostrea gigas*

La specie *Crassostrea gigas* (Figura 3.3), detta anche ostrica giapponese, fa parte della classe dei bivalvi, ordine dei Ostreoida e famiglia delle Ostreidae. Questa specie di ostrica ha origine dall'Oceano Pacifico, ma è ormai molto diffusa nel Mediterraneo e nella Laguna di Venezia, nella quale è stata introdotta nel 1966 adattandosi perfettamente alle locali condizioni ambientali (MUVE, <http://msn.visitmuve.it>).



Figura 3.3. *Crassostrea gigas* utilizzate per il test di tossicità; a destra gli individui femmine, a sinistra gli individui maschi.

La conchiglia è inequivalve ed inequilaterale, fortemente variabile nella forma in dipendenza di molti fattori ambientali e biologici, ma soprattutto del tipo di substrato: la forma delle valve è arrotondata e con marcate scanalature quando l'individuo si trova su fondali solidi, ovaliforme e liscia quando si trova su substrati incoerenti, robusta e con margini irregolari quando si trova invece su scogliere. L'ostrica aderisce al substrato con la valva sinistra, la quale si presenta più piccola e appiattita della destra, detta invece coperchio. La regione umbonale spesso è ipersviluppata. Questa specie di ostrica ha una colorazione biancastra con macchie rosso-violacee disposte in fasce, in particolare sulla valva destra. Da adulta può raggiungere dimensioni in media tra i 80 e i 300 mm in lunghezza (MUVE, <http://msn.visitmuve.it>).

La specie si rinviene su substrati duri, anche artificiali, in acque basse e frequentemente in zone lagunari, dove viene anche attivamente allevata. Conducono un'esistenza sedentaria adese a rocce, detriti e altre conchiglie. È un organismo filtratore e sospensivoro molto attivo. La conchiglia spesso funge da substrato per altre specie di alghe ed invertebrati epibionti (FAO, <http://www.fao.org>).

È una specie altamente tollerante ad un ampio intervallo di temperature che vanno circa da -1,8°C a 35°C; la temperatura però risulta il principale fattore limitante per la riproduzione, non potendo scendere al di sotto dei 17-18°C. L'intervallo salino ottimale è compreso tra 20 e 25 ‰, valori di salinità inferiori al 18‰ si traducono in una mortalità del 98%, pur trattandosi di specie eurialina; sopporta però notevoli sbalzi di ossigenazione e pH.

L'ostrica giapponese è un ermafrodita, che frequentemente matura prima come maschio (ermafroditismo proterandrico). Nelle aree con buona disponibilità di cibo, le femmine dominano il rapporto tra i sessi nelle popolazioni di ostriche più grandi, mentre il contrario si verifica in aree con meno disponibilità di cibo. La gametogenesi inizia a circa 10 ° C e nelle salinità tra 15 e 32 ‰ ed è raramente completata a salinità più elevate. La deposizione delle uova si verifica a temperature superiori a 20 ° C e raramente sotto i 17-18 ° C. La specie è molto fertile, con femmine lunghe 8-15 cm che producono tra 50 e 200 milioni di uova in una singola progenie. Lo sviluppo larvale dei bivalvi si divide in diverse fasi, illustrate in Figura 3.4, ossia, dopo la fase di fecondazione dell'uovo (visibile grazie alla presenza del globulo polare) e di segmentazione, il nuovo individuo si sviluppa come blastula, gastrula, gastrula ciliata, trocofora fino ad arrivare alla fase di veliger, importante per il test di tossicità dato che è la fase in cui si riscontra la classica forma D-shape nelle larve normoformate. Le larve sono planctotrofiche e sono distribuite attraverso la colonna d'acqua (FAO, <http://www.fao.org> ; MUVE, <http://msn.visitmuve.it>).

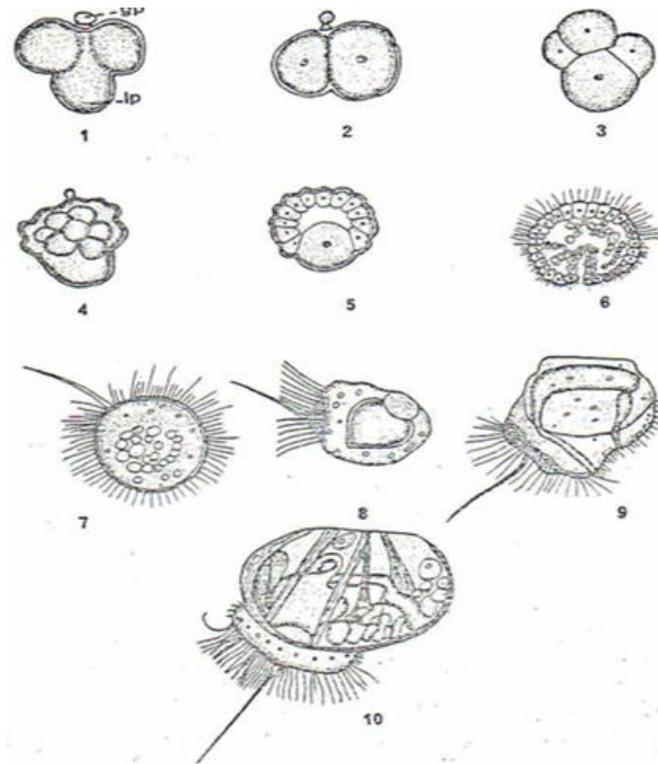


Figura 3.4. Fasi dello sviluppo larvale dei mitili: 1,4: segmentazione, 5: blastula, 6: gastrula, 7: gastrula ciliata, 8,9: trocofora, 10: veliger (D-shape)

3.6.2. Procedure del test di tossicità

Il test di tossicità si basa sulla verifica della percentuale di larve normalmente sviluppate in seguito all'esposizione per 48 ore degli zigoti a diverse diluizioni del campione di acqua interstiziale. La valutazione della tossicità viene effettuata confrontando la risposta ottenuta nel campione rispetto ad un controllo.

Per l'esecuzione del test sono state utilizzate delle ostriche adulte (*Crassostrea gigas*) appositamente acquistate presso la Guernsey Sea Farms Ltd (Vale, Guernsey, Regno Unito). Queste sono state utilizzate immediatamente dopo il loro arrivo, circa 24 ore dopo la spedizione, senza acclimatazione e stabulazione. Il test di sviluppo larvale è stato eseguito su 4 individui maschi e 6 individui femmine arrivati tramite spedizione, seguendo le indicazioni dello studio di A. Volpi Ghirardini et al. (2005b). Le ostriche adulte sono state indotte ad emettere i gameti tramite stimolazione termica, ovvero immergendo gli adulti in acqua di mare filtrata a $0,45 \mu\text{m}$, alternando cicli di temperatura a 18°C e 28°C ogni 30 minuti. I cicli vanno ripetuti fino a che gli adulti non emettono una quantità di gameti sufficiente all'esecuzione del test.

L'emissione di un individuo maschio la si nota dalla fuoriuscita di un fluido biancastro dalle valve dell'adulto, mentre l'emissione di un individuo femmina la si nota dalla fuoriuscita di una serie di corpuscoli granulari dalle valve dell'adulto. Nel momento in cui si nota l'emissione di un individuo femmina, questo viene prelevato e trasferito in un becher da 300 ml con poca acqua di mare per raccoglierne i gameti emessi; quando invece si nota l'emissione di un individuo maschio, questo viene prelevato e chiuso con un elastico fino al momento dell'effettiva fecondazione, che avverrà quando si avrà sufficienti gameti sia maschili che femminili. Questo accorgimento è effettuato in quanto i gameti maschili una volta emessi perdono efficacia per la fecondazione dopo poche ore, mentre i gameti femminili rimangono vitali più a lungo.

Una volta ottenuti sufficienti gameti per l'esecuzione del test, questi sono stati controllati per verificare la motilità degli spermatozoi e la maturità delle uova utilizzando un microscopio ottico invertito (mod DM-IL, Leica Microsystems, Wetzlar, Germania). Sono in seguito stati utilizzati per il test i gameti ottenuti dai migliori 3 individui per sesso. I gameti maschili sono stati uniti tra loro e raccolti in cristallizzatori da 500 ml, dopo essere stati filtrati utilizzando un setaccio di acciaio inossidabile con maglie da 32 μm ; allo stesso modo anche i gameti femminili sono stati uniti e raccolti in cilindri graduati da 1000 ml, dopo essere stati filtrati utilizzando un setaccio di acciaio inossidabile con maglie da 100 μm .

La fase di fecondazione è stata ottenuta attraverso l'inoculo di 10 ml di sospensione di spermatozoi filtrati nel cilindro contenente le uova e mantenendo il contenuto del cilindro in agitazione per permettere la fecondazione.

Si è poi effettuata una valutazione delle uova fecondate tramite il conteggio di quattro sub-campioni da 100 μl ciascuno di sospensione di embrioni prelevata dal cilindro tenendo il contenuto in agitazione. Il conteggio è stato fatto al microscopio invertito ed il risultato è stato poi riportato a 1 L di soluzione.

In seguito, si è passati alla preparazione delle micropiastre per l'esecuzione del test. Sono state utilizzate micropiastre di polistirene a 24 pozzetti, utilizzando pozzetti da 3 ml come unità sperimentali. Ogni micropiastro è stata utilizzata per ospitare le diverse diluizioni del campione di ogni singolo trattamento effettuato. In ogni pozzetto sono state inoculate aliquote note di zigoti alle soluzioni di campione, al fine di ottenere una densità finale di

60-70 uova ml⁻¹. Si sono utilizzate sei diverse concentrazioni di campione per ogni trattamento, inoculando diverse quantità di campione in ogni pozzetto e diluendo con l'acqua di mare naturale (NSW) trattata con il medesimo trattamento del campione in questione, fino ad arrivare ad un totale di 3 ml. Le concentrazioni utilizzate per ogni micropiastra sono state del 100%, 50%, 25%, 12%, 6% e 3%, ogni concentrazione è stata preparata in triplice replica.

Oltre a ciò è stata anche preparata una piastra come controllo negativo ed una come controllo positivo. La piastra del controllo negativo è stata eseguita trasferendo 3 ml di bianco procedurale per ogni trattamento effettuato all'interno dei pozzetti (per tre repliche). La piastra del controllo positivo è stata eseguita utilizzando come sostanza di riferimento il rame (Cu); sono state create nei pozzetti diverse concentrazioni di rame (6%, 12%, 18%, 24%, 30%, 36%, 42% e 48%), diluendo con acqua di mare artificiale.

In accordo con il programma di controllo qualità (QA/QC), i controlli negativi con acqua di mare naturale e il controllo positivo con la sostanza di riferimento (Cu) sono stati eseguiti simultaneamente con i test sull'acqua interstiziale.

Il conteggio dello sviluppo larvale è stato fatto utilizzando il microscopio invertito, contando per ogni replica le prime 100 larve e distinguendo tra queste le larve normalmente sviluppate a D-shape (prodissoconchs I) e larve anormali/ritardate (larve prodissoconch I anormali, trocofore, gastrule) come indicato nella guida ASTM (2004). Alcune possibili conformazioni ritrovate nei pozzetti analizzati sono illustrate in Figura 3.5.

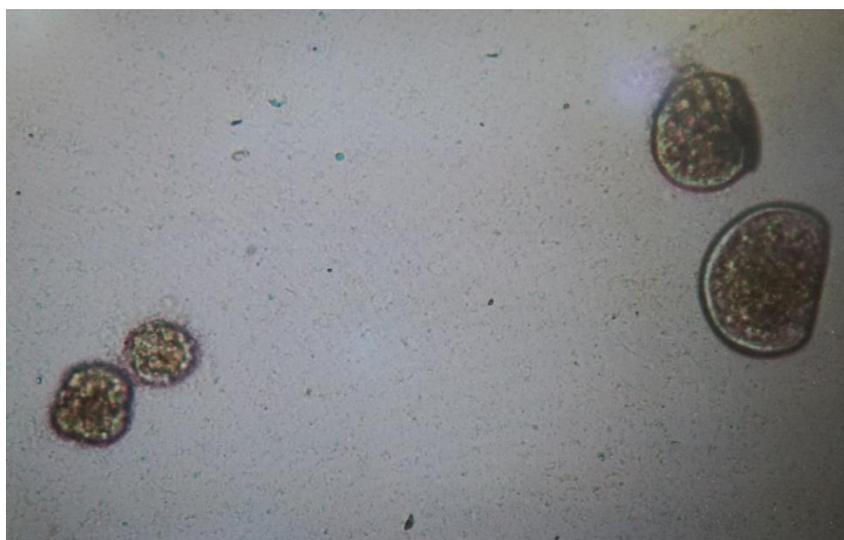


Figura 3.5. Esempio di larve ritardate (sinistra) e di larve normoformate (destra).

3.7. Analisi chimiche

Le analisi chimiche sono state effettuate per determinare lo stato iniziale di contaminazione del campione e per verificare l'efficacia della rimozione dei contaminanti dei trattamenti effettuati.

Le analisi degli elementi in traccia sono state eseguite presso il Laboratorio di Chimica Analitica del CNR-IDPA in via Torino, grazie alla collaborazione con la Dr.ssa Fabiana Corami, che ha curato tutta la parte analitica.

Le analisi di pH e ammoniaca sono invece state eseguite presso il laboratorio di Ecotossicologia di via Torino.

Per misurare temperatura e pH si è utilizzata una sonda portatile multimetro HACH HQ40d (HACH, Loveland, Colorado, USA), mentre la salinità dei campioni è stata misurata tramite un rifrattometro portatile ATAGO S / Milli-E (ATAGO, Tokyo, Giappone).

La concentrazione di ammoniaca è stata misurata nel campione non trattato (baseline test) e nelle aliquote trattate con U e Z per verificare l'efficacia della rimozione dell'ammoniaca durante la TIE. L'ammoniaca totale è stata quantificata in base al metodo proposto da J. Reardon et al. (1966), che utilizza il salicilato come reagente per misurare l'assorbanza a 660 μm ; per questa operazione è stato utilizzato uno spettrofotometro HACH DR-2800 (HACH, Loveland, Colorado, USA).

La concentrazione degli elementi in traccia è stata misurata nel campione non trattato (baseline test) e nelle aliquote trattate con U, Z e SPE per verificare la capacità di rimuovere metalli di Z e SPE (ed eventualmente anche U) ed il possibile rilascio di elementi da parte di *Ulva* e zeolite.

L'assorbimento/rilascio di elementi in traccia da parte di Z è stato verificato eluendo la colonna di zeolite con acqua ultrapura Milli-Q e NSW. La concentrazione degli elementi in traccia (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sn, Sr, Tl, V, Zn) è stata determinata seguendo le medesime metodologie proposte per l'applicazione della TIE in Laguna di Venezia (C. Turetta et al., 2004; M. Picone et al., 2009), con alcuni adattamenti. Tutti i campioni sono stati diluiti 10 volte, utilizzando il sistema di acqua

ultrapura Purelab-Ultra (ELGA Vivendi Water Systems, Bucks UK) e acidificati (2% v/v) con HNO₃ di grado ultrapuro (Plasma Pure Plus, SCP Science, Quebec, CND). Le analisi sono state eseguite con ICP-MS (Agilent 7500), dotato di un nebulizzatore a V-groove, una camera di nebulizzazione di tipo Quartz Scott e una torcia al quarzo (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

La sensibilità del metodo è stata ottimizzata utilizzando prima dell'analisi una soluzione di sintonizzazione multi-elementi in acqua ultrapura (Li, Y, Ce, Tl e Co, 10 ng ml⁻¹). Per verificare e correggere i cambiamenti di sensibilità dello strumento, è stata aggiunta una soluzione standard interna di Rh (20 ng ml⁻¹). Inoltre, prima delle analisi, è stata eseguita la calibrazione di massa utilizzando soluzioni a diverse concentrazioni, contenenti elementi con valori m/z che coprono l'intero intervallo di massa di interesse.

La precisione ($\geq 90\%$ dell'intervallo di confidenza) e l'accuratezza dei dati sono state stimate dalla ripetizione di misure (n = 5) su materiale certificato CRM NASS-5, diluito secondo le medesime modalità utilizzate per i campioni analizzati. I valori misurati erano in buon accordo con i valori certificati, essendo la percentuale di deviazione standard relativa (% di RSD) tra il 5% e il 10%; per gli elementi le cui concentrazioni non erano certificate, i valori ottenuti sono risultati in accordo con i valori attesi per l'acqua di mare di aree costiere.

Per ogni elemento in traccia analizzato, l'errore è stato espresso come percentuale della deviazione standard relativa (σ^* , RDS); RDS% variava generalmente tra il 5% e il 10%; solo per alcuni elementi (ad esempio Hg) questo è risultato superiore al 10%.

3.8. Analisi dei dati

I risultati dei test sono stati espressi in unità di tossicità (TU) \pm deviazione standard (SD). Le TU sono state calcolate come $TU_{50} = 100/EC_{50}$ (dove EC_{50} = concentrazione efficace 50). I valori di EC_{50} sono stati calcolati usando il metodo Trimmed Spearman-Kärber (U.S. EPA, 2001).

L'analisi della varianza a una via (ANOVA) e il test *post-hoc* di Fisher su dati trasformati in \log_{10} sono stati utilizzati per verificare eventuali differenze tra i trattamenti e per identificare i trattamenti che influiscono in modo significativo sulle risposte del test.

I test di Kolmogorov-Smirnov e Bartlett sono stati usati per verificare, rispettivamente, la normalità e l'omogeneità della varianza. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software StatSoft Statistica v 6.0.

4. Risultati

4.1. QA/QC

I risultati del controllo negativo, con acqua di mare filtrata a 0,45 μm , hanno riportato una percentuale di larve normalmente sviluppate (D-shaped) pari a $74,5 \pm 1,9$. Questo risultato rientra nei parametri del controllo per il test di sviluppo larvale con molluschi, ovvero in una percentuale di larve sviluppate $> 70\%$, in accordo con A. Volpi Ghirardini et al. (2005a) e E. His et al. (1999).

I risultati del controllo positivo, effettuato con Cu come sostanza di riferimento, ha fornito un EC_{50} di 13 $\mu\text{g l}^{-1}$ di Cu con un intervallo di confidenza al 95%: 11-15 $\mu\text{g l}^{-1}$; questo valore rientra nei limiti della carta di controllo intralaboratorio per *C. gigas* di 5-29 $\mu\text{g l}^{-1}$ (G. Librato et al, 2010).

Per quanto riguarda invece i risultati ottenuti dai bianchi procedurali, hanno tutti soddisfatto i criteri di accettabilità di presenza di una percentuale $> 70\%$ di larve normosviluppate, ad eccezione del trattamento Z nel quale si è riscontrata una percentuale di larve normalmente sviluppate $< 60\%$.

4.2. TIE

I trattamenti utilizzati durante la procedura di TIE hanno tutti modificato la tossicità del campione, in maniera variabile secondo il tipo di manipolazione eseguita. I risultati del test sono inizialmente stati acquisiti come EC_{50} , calcolato tramite il metodo Trimmed Spearman-Kärber, come detto nel Paragrafo 3.8. In Tabella 4.1 possiamo vedere nello specifico tutte le EC_{50} acquisite.

In un secondo momento i dati EC_{50} sono stati convertiti in TU_{50} , tramite la formula $100/\text{EC}_{50}$, per semplificare la comprensione del risultato in termini di tossicità eliminata dal campione. I risultati convertiti in TU_{50} sono elencati in Tabella 4.2, mentre in Figura 4.1 possiamo vedere in maniera più schematizzata i valori medi dei risultati ottenuti in TU_{50} per ogni trattamento.

Tabella 4.1. Raccolta dei risultati EC_{50} ottenuti dal test TIE per ogni trattamento effettuato. EC_{50} = concentrazione efficace 50; R1-R2-R3 = replica 1-2-3; μ = media aritmetica delle 3 repliche; media = media di EC_{50} calcolato tramite software utilizzando in seguito a pooling dei dati delle 3 repliche.

	EC_{50}				
	R1	R2	R3	μ	media
Baseline	3,85	4,18	3,94	3,99	4,03 (3,37 – 4,82)
U	5,01	6,33	5,94	5,76	5,75 (3,63 – 9,11)
U-EDTA	27,2	30,2	31,5	29,6	30,0 (27,3 – 33,0)
U-filt	5,39	5,41	7,15	5,98	7,21 (6,53 – 7,97)
U-EDTA-filt	31,1	29,7	25,6	28,8	29,7 (26,5 – 33,4)
U-filt-SPE	15,2	15,4	17,3	16,0	16,0 (14,6 – 17,4)
U-EDTA-filt-XAD	22,0	23,4	28,2	24,5	24,7 (19,4 – 31,4)
U-EDTA-filt-DPA	22,6	28,4	21,7	24,2	24,3 (21,0 – 28,0)
U-filt-SPE-XAD	7,8	6,76	8,77	7,78	7,57 (6,45 – 8,89)
U-filt-SPE-DPA	29,9	25,1	25,5	26,8	26,5 (21,2 – 33,1)
Baseline	3,85	4,18	3,94	3,99	4,03 (3,37 – 4,82)
Z	7,12	9,26	7,79	8,06	7,97 (4,27 – 14,9)
Z-EDTA	17,4	18,9	20,6	19,0	18,5 (11,8 – 29,1)
Z-EDTA-filt	36,5	33,1	24,2	31,3	32,4 (18,4 – 57,2)
Z-EDTA-filt-XAD	29,6	22,4	23,3	25,1	25,3 (20,2 – 27,4)
Z-EDTA-filt-DPA	30,1	28,9	28,1	29,0	29,7 (22,2 – 32,4)
Z-filt	15,3	23,9	25,7	21,6	20,5 (18,3 – 23,0)
Z-filt-SPE	22,2	25,2	23,6	23,7	23,3 (20,0 – 27,1)
Z-filt-SPE-XAD	33,4	47,1	37,7	39,4	38,4 (28,2 – 52,3)
Z-filt-SPE-DPA	28,2	31,1	45,7	35,0	32,1 (26,1 – 39,5)

Tabella 4.2. Raccolta dei risultati TU_{50} per ogni trattamento effettuato. TU_{50} = unità di tossicità 50; R1-R2-R3 = replica 1-2-3; μ = media aritmetica delle 3 repliche; media = EC_{50} calcolato tramite software utilizzando in seguito a pooling dei dati delle 3 repliche; Dev. St. = deviazione standard.

	TU_{50}					
	R1	R2	R3	μ	Dev. St.	media
Baseline	26,0	23,9	25,4	25,1	1,1	24,8
U	20,0	15,8	16,8	17,4	2,2	17,4
U-EDTA	3,7	3,3	3,2	3,4	0,3	3,3
U-filt	18,6	18,5	14,0	16,7	2,6	13,9
U-EDTA-filt	3,2	3,4	3,9	3,5	0,4	3,4
U-filt-SPE	6,6	6,5	5,8	6,3	0,4	6,3
U-EDTA-filt-XAD	4,5	4,3	3,5	4,1	0,5	4,0
U-EDTA-filt-DPA	4,4	3,5	4,6	4,1	0,6	4,1
U-filt-SPE-XAD	12,8	14,8	11,4	12,9	1,7	13,21
U-filt-SPE-DPA	3,3	4,0	3,9	3,7	0,4	3,8

Baseline	26,0	23,9	25,4	25,1	1,1	24,8
Z	14,0	10,8	12,8	12,4	1,6	12,5
Z-EDTA	5,7	5,3	4,9	5,3	0,4	5,4
Z-EDTA-filt	2,7	3,0	4,1	3,2	0,7	3,1
Z-EDTA-filt-XAD	3,4	4,5	4,3	4,0	0,6	4,0
Z-EDTA-filt-DPA	3,3	3,5	3,6	3,4	0,1	3,4
Z-filt	6,5	4,2	3,9	4,6	1,4	4,9
Z-filt-SPE	4,5	4,0	4,2	4,2	0,3	4,3
Z-filt-SPE-XAD	3	2,1	2,7	2,5	0,4	2,6
Z-filt-SPE-DPA	3,5	3,2	2,2	2,9	0,7	3,1

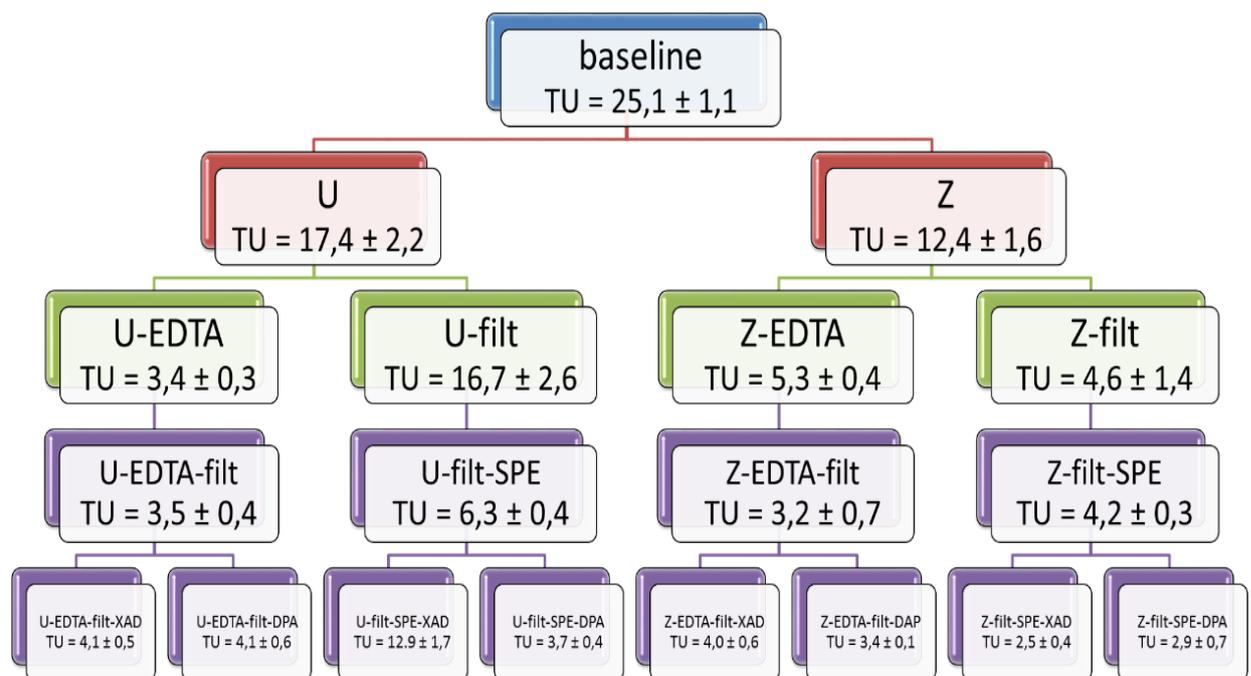


Figura 4.1. Framework della procedura sequenziale di TIE con i risultati delle medie aritmetiche (μ) \pm deviazione standard in TU_{50} .

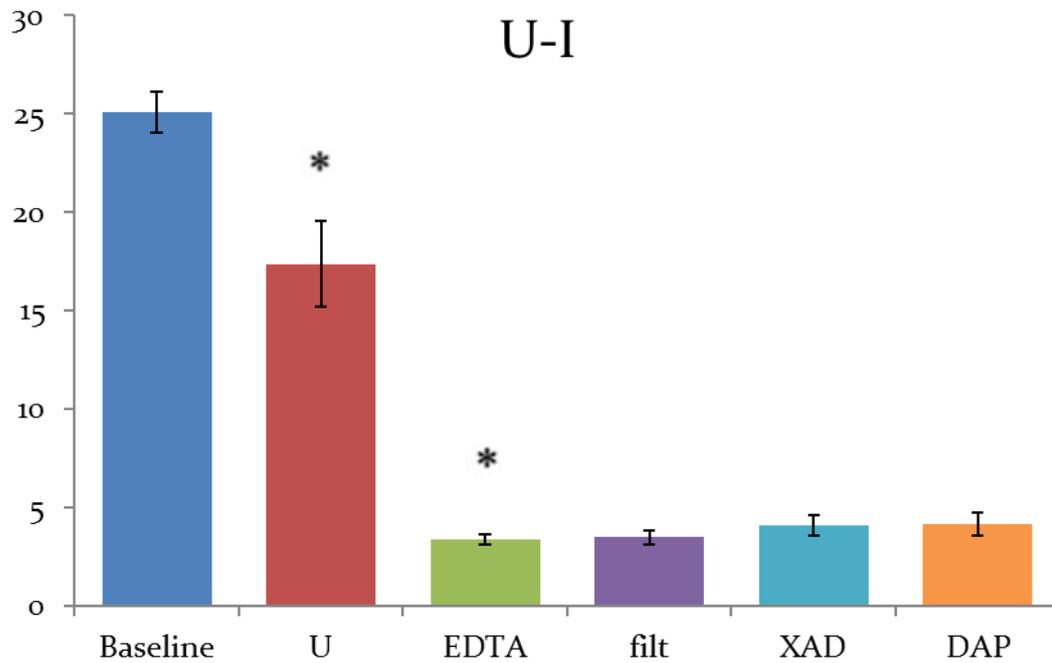


Figura 4.2. Rappresentazione dei risultati dei test di tossicità applicati al campione non diluito (baseline) ed ai campioni trattati per la sequenza U-I. Gli asterischi evidenziano i trattamenti significativamente diversi ($p < 0.05$) rispetto a quelli che li precedono nella sequenza riportata in Figura 4..

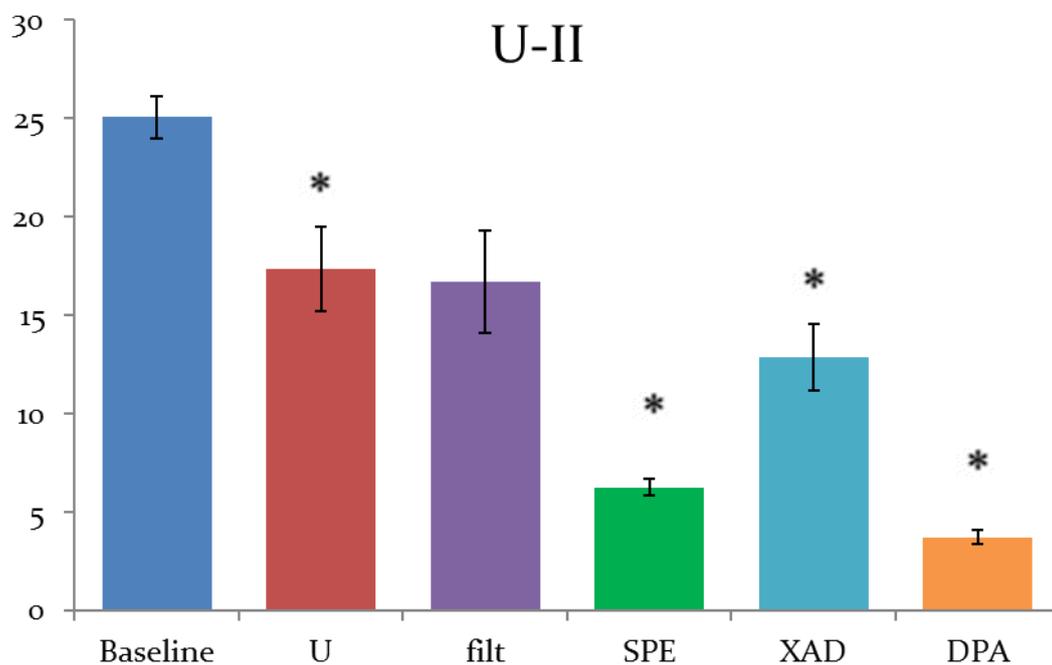


Figura 4.3. Rappresentazione dei risultati dei test di tossicità applicati al campione non diluito (baseline) ed ai campioni trattati per la sequenza U-II. Gli asterischi evidenziano i trattamenti significativamente diversi ($p < 0.05$) rispetto a quelli che li precedono nella sequenza riportata in Figura 4..

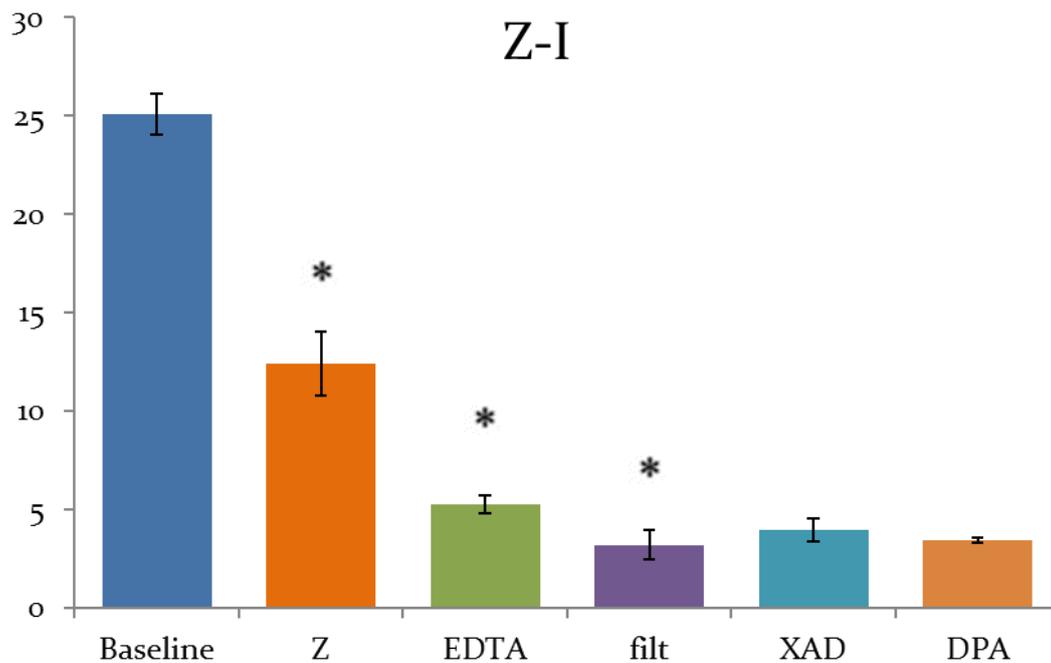


Figura 4.4. Rappresentazione dei risultati dei test di tossicità applicati al campione non diluito (baseline) ed ai campioni trattati per la sequenza Z-I. Gli asterischi evidenziano i trattamenti significativamente diversi ($p < 0.05$) rispetto a quelli che li precedono nella sequenza riportata in Figura 4..

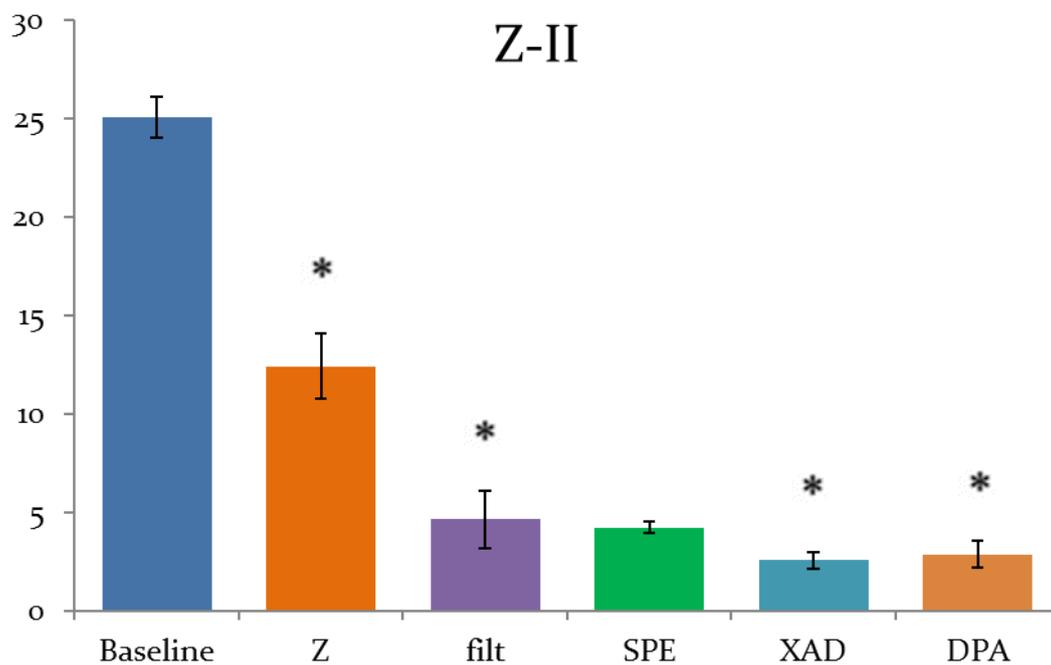


Figura 4.5. Rappresentazione dei risultati dei test di tossicità applicati al campione non diluito (baseline) ed ai campioni trattati per la sequenza Z-II. Gli asterischi evidenziano i trattamenti significativamente diversi ($p < 0.05$) rispetto a quelli che li precedono nella sequenza riportata in Figura 4..

Come si vede dalla Tabella 4.2, il risultato del baseline test mostra una TU_{50} media (μ) pari a $25,1 \pm 1,1$, questo valore rientra nella classificazione di C. Losso et al. (2007) all'interno della categoria di tossicità "molto alta".

Dalla Figura 4.1 possiamo vedere che l'andamento generale della tossicità tende a diminuire con il procedere dei trattamenti sul campione. Si nota infatti che sia per la sequenza U che per la Z i valori di tossicità sono per lo più minori con il procedere della sequenza; una eccezione più consistente si ritrova nel trattamento U-filt-SPE-XAD che raddoppia il suo valore di tossicità rispetto al suo precedente trattamento. Si può però notare che, nonostante la ridotta tossicità generale, è comunque presente alla fine di ogni trattamento una tossicità residua. La riduzione di tossicità è risultata significativa (ANOVA ad una via: $F_{1,18}=8105$, $p < 0,001$).

Focalizzando più nello specifico le 4 sequenze individuate, si possono notare diminuzioni della tossicità maggiori in seguito all'applicazione di alcuni trattamenti piuttosto che in altri; nei grafici, le differenze significative ($p < 0.05$) rispetto al trattamento precedente nella sequenza, sono state identificate con un asterisco.

Per quanto riguarda la rimozione di NH_3 , è stato riscontrato che entrambi i trattamenti applicati (esposizione ad *U. rigida* e passaggio attraverso una colonna di zeolite) hanno portato ad una significativa riduzione della tossicità iniziale; tramite il test *post-hoc* di Fisher si è calcolato un valore $p = 0,004$ per il trattamento con *U. rigida* e un valore $p < 0,001$ per il trattamento con zeolite. Questo risultato conferma la presenza di NH_3 come principale agente causale.

L'eliminazione dell'ammoniaca tramite *Ulva* ha portato ad una riduzione della tossicità del 31%, mentre la rimozione dell'ammoniaca tramite zeolite ha portato ad una riduzione della tossicità del 51% (test *post-hoc* di Fisher: $p = 0,008$). Questo risultato suggerisce la maggiore efficacia nell'utilizzo della zeolite per la rimozione di NH_3 dall'acqua interstiziale.

Nell'ambito dei trattamenti per la rimozione dei metalli, il trattamento con EDTA si è dimostrato significativamente efficace (test *post-hoc* Fisher: $p < 0,001$ per entrambe le manipolazioni) sia nella sequenza U-I (Figura 4.2), passando da una tossicità di $TU = 17,4 \pm 2,2$ ad una tossicità di $TU = 3,4 \pm 0,3$, che nella sequenza Z-I (Figura 4.4), in cui si è passati da una tossicità di $TU = 12,4 \pm 1,6$ a $TU = 5,3 \pm 0,4$. Il trattamento SPE invece si è dimostrato

molto più efficace nella sequenza U-II (Figura 4.3) (test *post-hoc* di Fisher: $p < 0,001$) nel quale ha abbassato la tossicità da $TU = 16,7 \pm 2,6$ a $TU = 6,3 \pm 0,4$. Nella sequenza Z-II (Figura 4.5) invece non ha fornito una diminuzione significativa della tossicità (test *post-hoc* di Fisher: $p = 0,346$) passando da $TU = 4,6 \pm 1,4$ dopo filtrazione a $TU = 4,2 \pm 0,3$ dopo il trattamento SPE.

Il trattamento di filtrazione ha portato ad una diminuzione della tossicità più o meno consistente in base alle sequenze in cui è stato utilizzato (U piuttosto che Z). Infatti, il trattamento di filtrazione nelle sequenze U-I (Figura 4.2) e U-II (Figura 4.3) non ha portato a nessun cambiamento significativo, lasciando la tossicità pressoché inalterata. Invece, il trattamento di filtrazione nelle sequenze Z-I e Z-II ha portato ad una riduzione della tossicità da $TU = 5,3 \pm 0,4$ a $TU = 3,2 \pm 0,7$ nella sequenza Z-I (Figura 4.4) e da $TU = 12,4 \pm 1,60$ a $TU = 4,6 \pm 1,4$ nella sequenza Z-II (Figura 4.5), con $p < 0,001$ in entrambi i casi nel test *post-hoc* di Fisher.

Infine, per i trattamenti per l'eliminazione dei contaminanti organici non si sono ottenuti risultati molto omogenei. Un risultato piuttosto simile si è ottenuto nelle sequenze in cui il trattamento per gli organici è stato effettuato dopo EDTA e filtrazione. Ad esempio, nelle sequenze U-I e Z-I, l'impiego delle resine XAD e DPA non ha comportato nessuna riduzione significativa della tossicità ($p > 0,05$). Nella sequenza U-II, invece, si è ottenuta una risposta particolare per quanto riguarda l'utilizzo di XAD, infatti l'applicazione del trattamento in questo caso ha portato ad un aumento della tossicità del campione da un valore di $TU = 6,3 \pm 0,4$ dopo il trattamento con SPE, ad un valore finale di $TU = 12,9 \pm 1,7$ (test *post-hoc* di Fisher: $p < 0,001$). L'uso di DPA nella stessa sequenza invece ha ridotto significativamente la tossicità fino ad un valore finale di $TU = 3,7 \pm 0,4$ (test *post-hoc* di Fisher: $p < 0,001$). Infine, nella sequenza Z-II entrambi i trattamenti riducono significativamente la tossicità del campione e portandolo da un valore di $TU = 4,2 \pm 0,3$ ottenuto dopo il trattamento SPE, ad un valore di $TU = 2,5 \pm 0,4$ con l'utilizzo di XAD (test *post-hoc* di Fisher: $p < 0,001$) ed un valore di $TU = 2,9 \pm 0,7$ con l'utilizzo di DPA (test *post-hoc* di Fisher: $p = 0,003$).

4.3. Analisi chimiche

Tramite le analisi chimiche effettuate è stato possibile verificare a posteriori l'efficacia dei trattamenti applicati al campione di acqua interstiziale ed identificare eventuali effetti imprevisti derivati dall'utilizzo delle manipolazioni pianificate, come il rilascio o l'assorbimento di molecole dall'agente utilizzato.

Come già riportato, le analisi chimiche sono state effettuate su un'aliquota di campione non trattato (baseline), dopo il trattamento per l'eliminazione dell'ammoniaca fatto con *Ulva* (U) e zeolite (Z) e dopo i trattamenti per eliminare i metalli eseguito con resine a scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE). Le analisi chimiche hanno esaminato il contenuto di ammoniaca e di elementi in traccia nelle aliquote prelevate.

Per quanto riguarda il contenuto di ammoniaca, il campione non trattato (baseline) ha riportato un valore di 20 mg l⁻¹ di ammoniaca totale (NH₃ + NH₄⁺). Considerando che il valore NOEC indicato da ASTM (2004) per il test di sviluppo larvale con *C. gigas* è pari a 4,7 mg l⁻¹, si può affermare che prima del trattamento la concentrazione di ammoniaca può aver pesantemente influito sullo sviluppo larvale delle ostriche utilizzate nel test. Il trattamento per la rimozione dell'ammoniaca ne ha ridotto notevolmente la concentrazione con entrambi le manipolazioni effettuate, ma non è stato però sufficiente a portare la concentrazione di ammoniaca a valori inferiori alla NOEC, quindi bisogna ancora considerare probabili degli effetti dovuti all'ammoniaca. Infatti, il trattamento con *Ulva* ha abbassato la concentrazione di ammoniaca fino a 13 mg l⁻¹; mentre il trattamento con zeolite, che si è rivelato maggiormente efficiente rispetto a quello con le macroalghe, ha abbassato i valori di ammoniaca fino a 12 mg l⁻¹. Le medesime analisi effettuate sull'acqua marina naturale filtrata utilizzata come acqua di diluizione e bianco procedurale, hanno evidenziato che la concentrazione di ammoniaca totale è risultata inferiore a 0,5 mg l⁻¹ sia nei campioni non trattati che nei campioni trattati, a dimostrazione del fatto che i trattamenti effettuati non producono un rilascio di ammoniaca.

Per quanto riguarda le analisi degli elementi in traccia, si sono effettuate analisi per Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sn, Sr, Tl, V, Zn. Di seguito sono riportati i grafici di tutte le analisi chimiche fatte sul campione di acqua interstiziale del canale Brentelle (BR) e sull'acqua marina naturale filtrata (NSW).

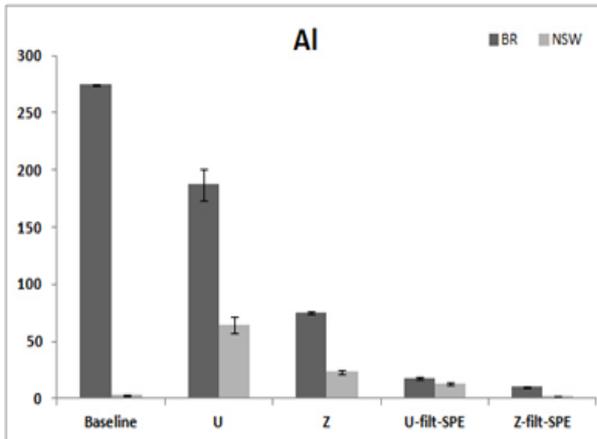


Figura 4.6. Concentrazione di alluminio (Al); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

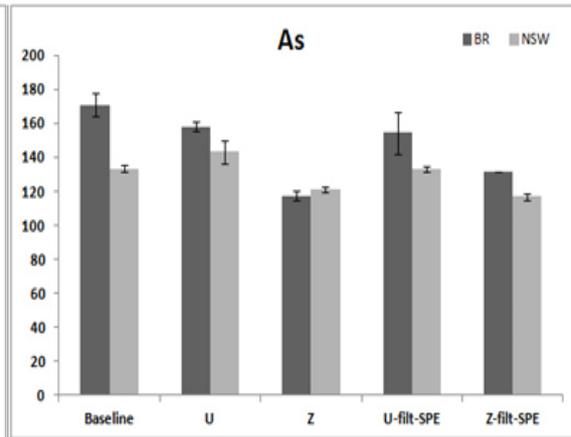


Figura 4.7. Concentrazione di arsenico (As), misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

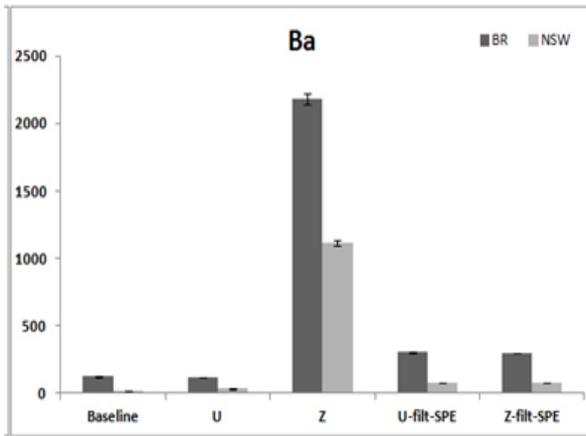


Figura 4.8. Concentrazione di bario (Ba); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

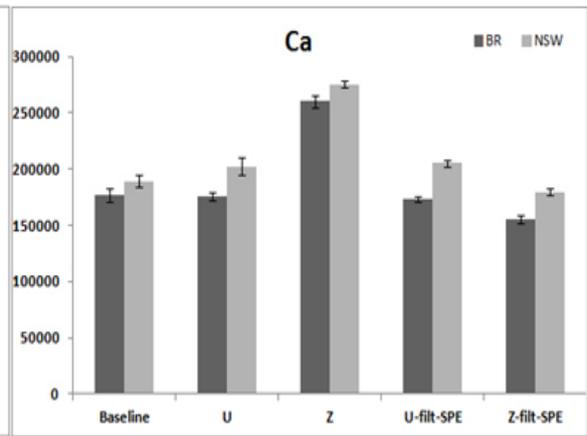


Figura 4.9. Concentrazione di calcio (Ca); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

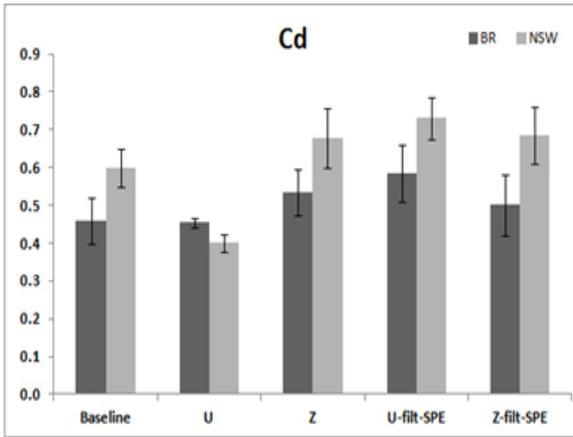


Figura 4.10. Concentrazione di cadmio (Cd); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

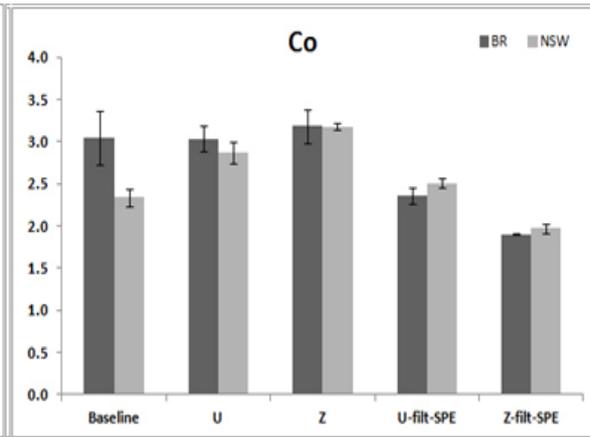


Figura 4.11. Concentrazione di cobalto (Co); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

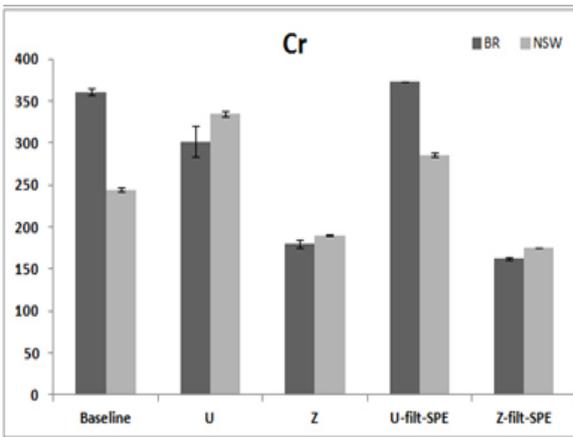


Figura 4.12. Concentrazione di cromo (Cr); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

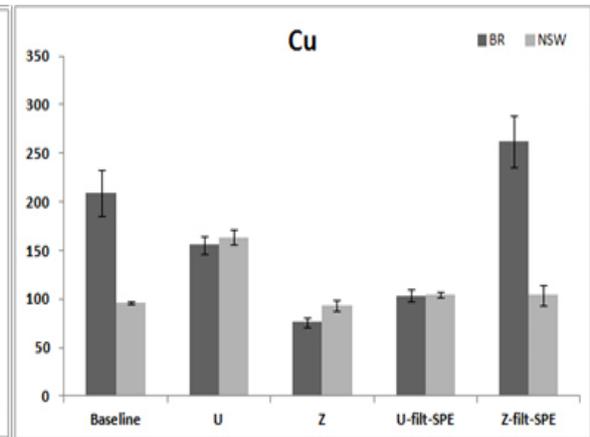


Figura 4.13. Concentrazione di rame (Cu); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

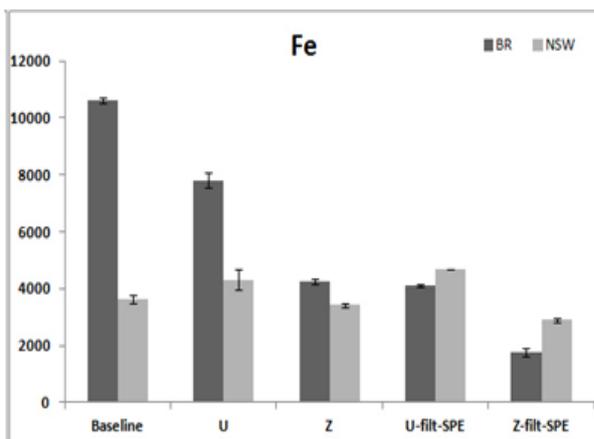


Figura 4.14. Concentrazione di ferro (Fe); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

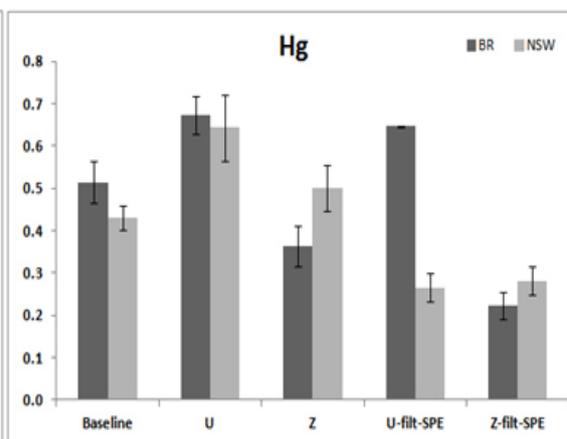


Figura 4.15. Concentrazione di mercurio (Hg); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

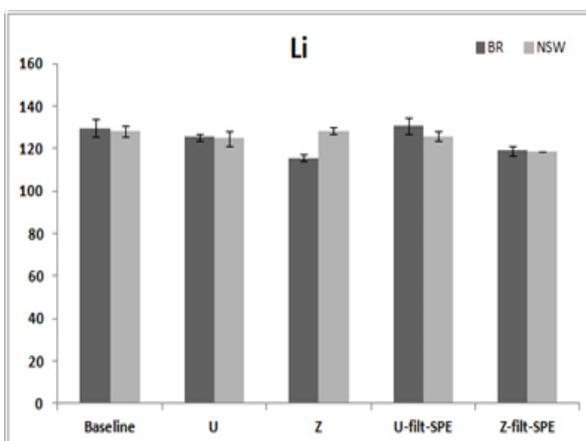


Figura 4.16. Concentrazione di litio (Li); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

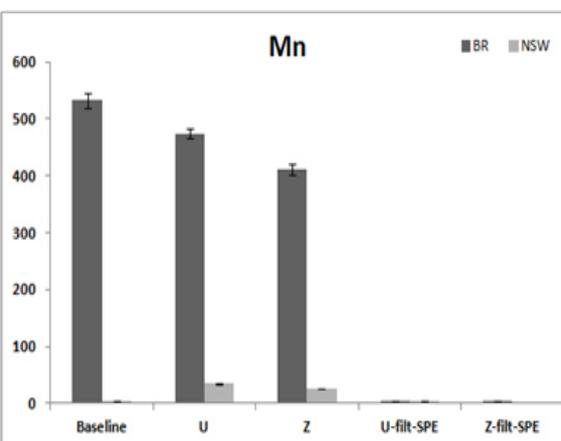


Figura 4.17. Concentrazione di manganese (Mn); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

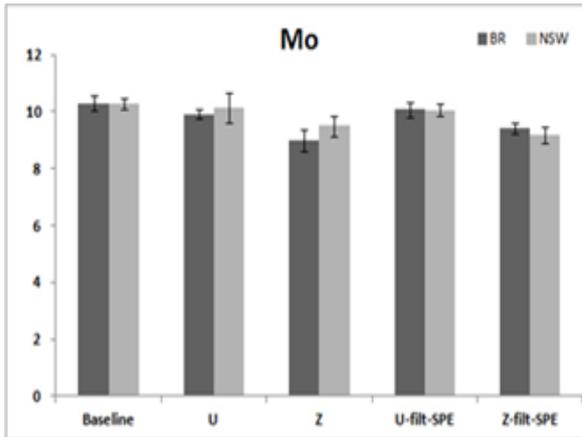


Figura 4.18. Concentrazione di molibdeno (Mo); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

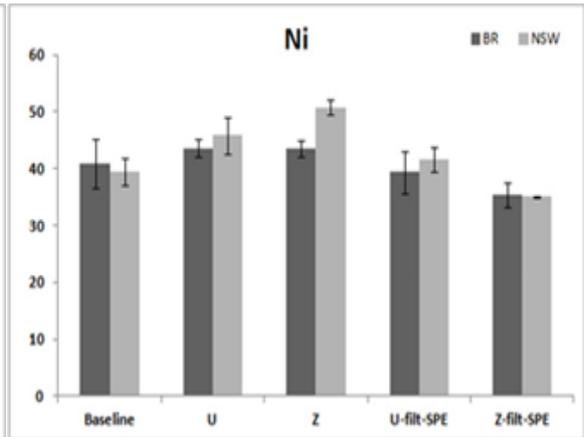


Figura 4.19. Concentrazione di nickel (Ni); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

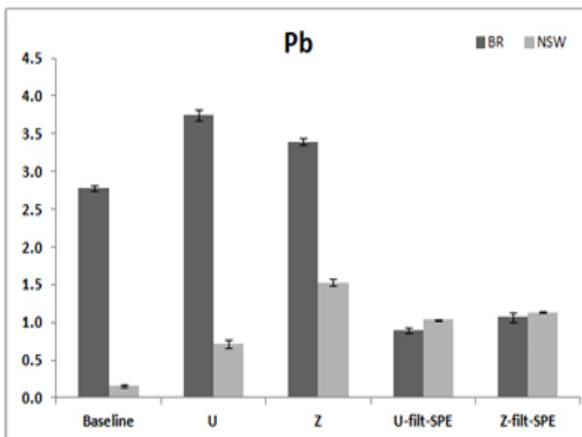


Figura 4.20. Concentrazione di piombo (Pb); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

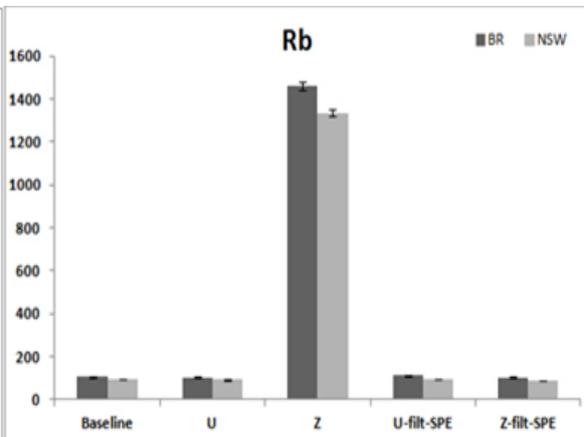


Figura 4.21. Concentrazione di rubidio (Rb); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

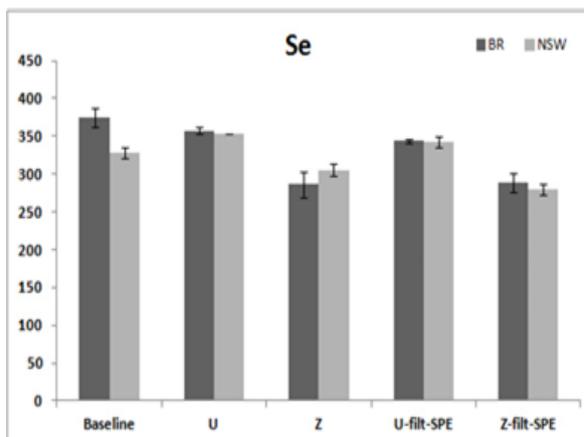


Figura 4.22. Concentrazione di selenio (Se); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

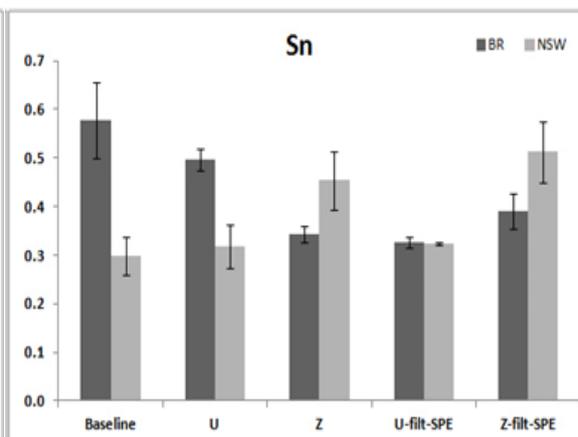


Figura 4.23. Concentrazione di stagno (Sn); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

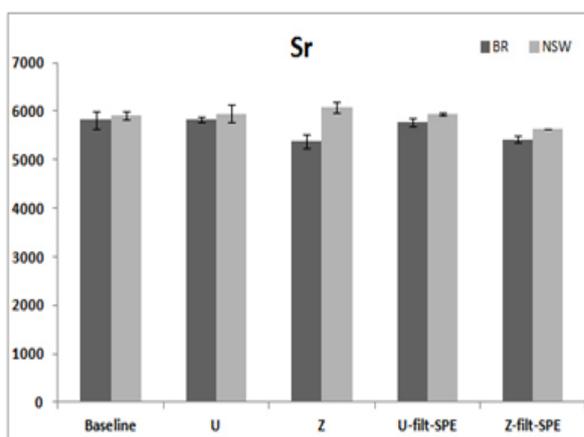


Figura 4.24. Concentrazione di stronzio (Sr) ; misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

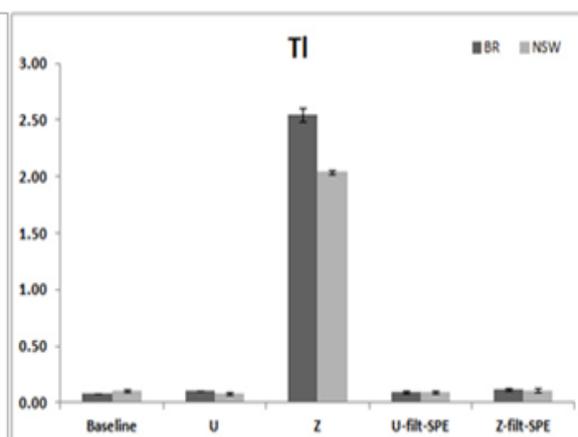


Figura 4.25. Concentrazione di tallio (Tl); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con Ulva (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

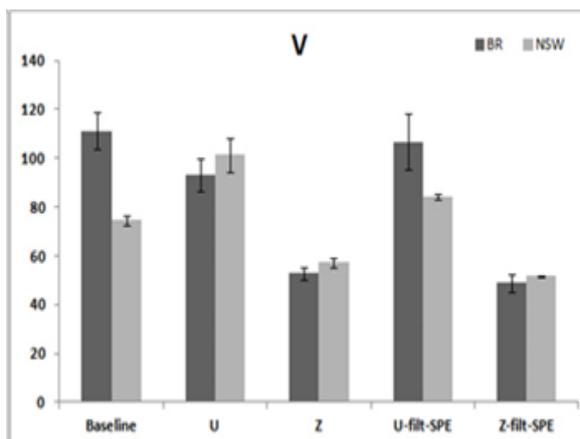


Figura 4.26. Concentrazione di vanadio (V); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con *Ulva* (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

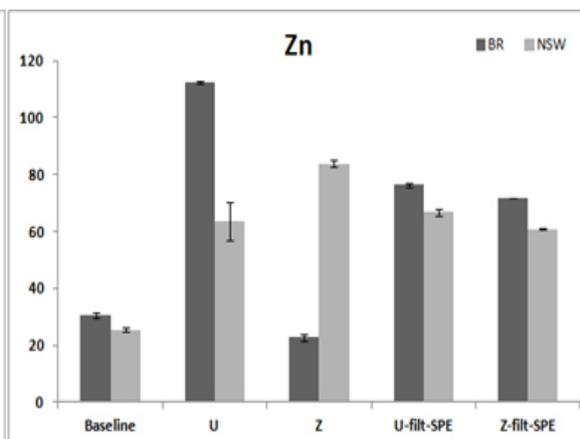


Figura 4.27. Concentrazione di zinco (Zn); misure su campione non trattato (baseline) e su campioni trattati con *Ulva* (U), zeolite (Z) e resine di scambio cationico (U-filt-SPE e Z-filt-SPE) ($\mu\text{g l}^{-1}$).

Da come di può vedere dalle immagini il trattamento con *Ulva* ha portato a delle variazioni delle concentrazioni dei metalli in tracce nelle aliquote del campione di acqua interstiziale; in particolare si può vedere un abbassamento di più del 20% delle concentrazioni di Al, Cu e Fe (Figure 4.6, 4.13 e 4.14) e un incremento di Hg, Pb e Zn dopo le 3 ore di esposizione alle macroalghe (Figure 4.15, 4.20 e 4.27), anche se solo nel caso di Zn l'incremento è di rilievo. Anche nelle aliquote di acqua marina naturale (NSW) è stata analizzata una variazione delle concentrazioni degli elementi in tracce; infatti è stato riscontrato un rilascio di Al, Mn, Pb e Zn. Gli altri elementi analizzati non hanno avuto significative variazioni di concentrazione nelle aliquote di acqua del campione e NSW.

Cambiamenti non trascurabili nella concentrazione degli elementi in traccia sono stati provocati dal trattamento con zeolite. Per alcuni degli elementi analizzati nell'aliquota prelevata dopo l'eluizione del campione attraverso la colonna di zeolite si è riscontrata una riduzione della concentrazione superiore al 25% rispetto al campione non trattato (baseline), è questo il caso di As, Cr, Cu, Fe, Hg, Se, Sn e V (Figure 4.6, 4.7, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.22, 4.23 e 4.26). Altre concentrazioni, invece, hanno riportato un aumento rilevante dopo lo stesso trattamento con zeolite, è questo il caso di Ba, Ca, Rb e Tl (Figure 4.8, 4.9, 4.21 e 4.25). Comportamenti particolarmente rilevanti sono stati quelli di Ba la cui concentrazione è aumentata da 124 a 2177 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 4.8), di Rb che è aumentato da 108 a 1460 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 4.21) e di Tl per cui si è analizzato un aumento da 0,08 a 2,55 $\mu\text{g l}^{-1}$

¹ (Figura 4.25). Anche le analisi effettuate su NSW e acqua Milli-Q (queste ultime non riportate in grafico) hanno riscontrato un aumento sostanziale rispetto ai campioni non trattati delle concentrazioni di Ba, Ca, Rb e Tl (Figure 4.8, 4.9, 4.21 e 4.25), questo però è avvenuto in misura minore rispetto a quanto osservato nelle acque interstiziali. Oltre a ciò si è riscontrato un aumento in NSW anche delle concentrazioni di Mn, Cd e Pb (Figure 4.10, 4.17 e 4.20) nel campione post-colonna.

Tramite la manipolazione con la resina a scambio cationico (SPE) si è potuto eliminare efficientemente diversi elementi in traccia dal campione. Questa manipolazione ha apportato differenze rilevanti in base alla sequenza in cui è stata utilizzata. Infatti, applicata dopo il trattamento con *Ulva* (U-filt-SPE), il trattamento ha potuto ridurre le concentrazioni di Al del 90%, di Cu del 33%, di Fe del 48%, di Mn del 99%, di Pb del 76% e di Zn del 32% (Figure 4.6, 4.13, 4.14, 4.17, 4.20 e 4.27); allo stesso tempo però il medesimo trattamento ha arricchito l'acqua interstiziale del 151% di Ba e del 29% di Cd. Come già accennato invece il trattamento SPE effettuato dopo l'eluizione del campione attraverso la colonna di zeolite (Z-filt-SPE) ha portato a risultati differenti. Infatti, oltre ad aver ridotto nell'acqua interstiziale le concentrazioni di Al del 87%, di Co del 40%, di Fe del 58%, di Hg del 39%, di Mn del 99% e di Pb del 69% (Figure 4.6, 4.11, 4.14, 4.15, 4.17 e 4.20), ha anche riportato le concentrazioni di tutti gli elementi in traccia introdotti nel campione dal trattamento con zeolite, ovvero Ba, Ca, Rb e Tl (Figure 4.8, 4.9, 4.21 e 4.25), approssimativamente agli stessi valori presenti nel campione non trattato (baseline). Inoltre, è stato anche osservato un incremento rilevante delle concentrazioni di Cu e Zn nel campione post-colonna. Anche l'aliquota di acqua marina naturale analizzata (NSW) ha riportato un trend analogo a quanto osservato nel campione di acqua interstiziale.

Le concentrazioni di alcuni elementi in traccia analizzati, come Li, Mo, Ni e Sr (Figure 4.16, 4.18, 4.19 e 4.24) hanno mostrato variazioni trascurabili dopo le manipolazioni con U, Z e SPE, sia nell'acqua interstiziale sia in NSW.

Per quanto riguarda temperatura, salinità e pH le misurazioni hanno riportato che la temperatura è rimasta costante durante tutto il procedimento, la salinità è risultata variabile nell'intervallo di 31-34 psu (con una media di 33.4 ± 1.3), mentre i valori di pH hanno oscillato tra 7.86 e 8.62 (con una media di 8.30 ± 0.30).

5. Discussione

5.1. Identificazione dei contaminanti presenti

Tramite le procedure TIE effettuate è stato possibile caratterizzare ed identificare i principali contaminanti presenti nel campione di acqua interstiziale analizzato. I risultati ottenuti hanno identificato l'ammoniaca ed i metalli disciolti come i principali contaminanti che agiscono come agente causale per la tossicità osservata, confermando quanto già osservato nel precedente studio del sito Canale Brentelle di M. Picone et al. (2009), che mostrò un contributo dell'ammoniaca e dei metalli di circa il 35% e il 27% alla tossicità iniziale del campione allora raccolto.

In particolare, la concentrazione di ammoniaca presente nel campione è risultata così elevata da rendere insufficienti i trattamenti utilizzati per la sua rimozione; ciò ha confermato che la scelta di rimuovere l'ammoniaca come prima azione è l'opzione più efficace per evitare effetti di mascheramento sugli altri elementi, ed anzi risulta indispensabile per la corretta caratterizzazione ed identificazione degli agenti causali.

Un'informazione in più che si è potuta evidenziare al termine di questo studio è stata l'identificazione di un possibile coinvolgimento di composti organici idrofobi e solubili ipotizzato grazie al trattamento con XAD, e di composti polari messo in evidenza grazie al trattamento con DPA; questo studio ha quindi evidenziato la possibilità di un contributo degli organici alla tossicità del campione, che negli studi precedenti (M. Picone et al., 2009) non erano stati classificati come contaminanti potenzialmente di interesse.

5.2. Confronto dell'efficacia dei trattamenti TIE utilizzati per l'analisi di acqua interstiziale

Sulla base dei risultati ottenuti a conclusione della procedura TIE si è potuto confrontare i diversi trattamenti utilizzati per eliminare ammoniaca, metalli ed organici e ricavarne delle informazioni che consentano di identificare le procedure più efficaci per studi di questo tipo.

La prima fase, ovvero quella dedicata alla rimozione dell'ammoniaca dal campione tramite i trattamenti con *U. rigida* (U) e zeolite (Z), è stata quella più complessa da affrontare, anche

a causa della grande quantità di ammoniaca contenuta nel campione. Entrambi i trattamenti (U e Z) sono risultati efficaci nella caratterizzazione ed identificazione dell'ammoniaca così come nella riduzione della concentrazione di ammoniaca totale, ma nonostante ciò la tossicità da questa indotta non è stata del tutto eliminata, dato che il potere di assimilazione dei due trattamenti non è stato sufficiente per la rimozione dell'intera concentrazione di NH_3 presente nel campione. Questo ha portato alla presenza di una tossicità residua dovuta all'ammoniaca dopo la conclusione dei trattamenti U e Z, che può mascherare gli altri contaminanti con il procedere delle manipolazioni e portare a conclusioni fuorvianti riguardo la causalità.

Tra i due trattamenti quello con zeolite sembra essere leggermente più efficace nella rimozione di ammoniaca; nonostante ciò il trattamento U è risultato preferibile per questa fase. Il trattamento Z ha mostrato la capacità di assorbire un maggiore numero di elementi in traccia rispetto ad U; infatti, se con U è stato riscontrato un rilevante assorbimento solo per quanto riguarda Al, Cu e Fe, ridotte di oltre il 20%, per Z un assorbimento importante è stato osservato per Al, As, Cr, Cu, Fe, Hg, Se, Sn e V che hanno subito una riduzione superiore al 25%. La ritenzione di elementi da parte di questi trattamenti era già stata messa in evidenza in passato.

I pregressi studi sull'assorbimento di elementi da parte di *Ulva* (D. L. Rice et al, 1981; D. L. Rice, 1984) si sono focalizzati sull'assorbimento di ferro, manganese, zinco, cadmio e rubidio a diverse condizioni di luce, azoto nitrico e altri fattori di crescita; i dati hanno evidenziato che il sequestro degli elementi in traccia può essere controllato dal contenuto di azoto (per Zn e Fe), ma soprattutto dal tasso di crescita algale (per Mn, Cd, Rb). Si è quindi ipotizzato che l'uptake dei metalli risulti significativo dopo un periodo di esposizione di circa 6-7 giorni, periodo di tempo molto maggiore di quello utilizzato nelle procedure TIE (< 8 ore) durante il quale l'assorbimento di metalli da parte di *Ulva* è stimato essere < del 15% per la maggior parte dei metalli e del 18% per Cu e Zn (K.T. Ho et al., 1999).

Tuttavia, anche se i dati di letteratura suggeriscono che l'uptake da parte delle macroalghe in un intervallo di 3 ore sia generalmente trascurabile, non si può escludere che possa avvenire una rimozione degli elementi in traccia per adsorbimento sul tallo. Nel caso specifico di questo lavoro, gli elementi per cui questo processo potrebbe essersi verificato

sono Al, Fe e Cu; nel precedente lavoro di M. Picone et. al (2009) simili risultati si erano osservati per Fe.

Il trattamento con zeolite è stato precedentemente studiato in alcuni lavori di R. M. Burgess et al. (2003; 2004) nei quali è stata verificata, oltre la sua efficacia nella riduzione dell'ammoniaca, anche la sua capacità di assorbimento di metalli in breve tempo (30-60 minuti), in particolar modo Cu, Pb e Zn (per cui si è osservata una riduzione del 100%) ed in misura minore anche Cd e Ni (- 15% e - 20%).

Quindi sia gli studi pregressi che i risultati ottenuti in questo lavoro confermano che, per un'esposizione di breve durata, per la rimozione di NH₃ sia preferibile l'utilizzo di *Ulva* a zeolite, per ottenere una minore probabilità di assorbimento dei metalli.

Oltre a ciò il trattamento con U risulta preferibile Z, in quanto quest'ultimo può comportare un aumento di tossicità del campione dopo il trattamento. Questa constatazione è stata fatta nello studio di R. M. Burgess et al. (2004) in cui si è osservato un aumento degli effetti nei confronti dei misidiacei; gli autori non hanno identificato una causa certa, ma hanno ipotizzato che la causa si potesse ritrovare in contaminanti rilasciati dalla zeolite o nella presenza di particelle di zeolite nel campione trattato. I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi portano informazioni a favore di questa ipotesi, in quanto le analisi chimiche effettuate nel campione trattato con Z evidenziano un significativo aumento delle concentrazioni di Ba, Rb e Tl. In particolare, l'incremento nella concentrazione di Ba può comportare alterazioni nello sviluppo larvale dei molluschi bivalvi a partire da concentrazioni di appena 100 µg l⁻¹ (J. V. Spangenberg et al., 1996), concentrazione ampiamente superata dai risultati di questo lavoro per quanto riguarda le analisi di Ba dopo il trattamento con Z. In questo caso, la tossicità residua dovuta a NH₃, rimasta anche dopo il trattamento con U e Z, potrebbe aver mascherato l'effetto di Ba. Tuttavia, nel caso di campioni con minor presenza di NH₃, il rilascio di Ba avvenuto dopo il trattamento con zeolite potrebbe rappresentare un "confounding factor" per l'interpretazione dei risultati di una procedura TIE.

Diversamente, non essendo stata studiata la tossicità di Rb e Tl nei confronti dei bivalvi, non può essere fatta alcuna ipotesi relativamente ai possibili effetti introdotti dal rilascio di questi elementi della zeolite.

Anche il trattamento con *Ulva* comporta dei rilasci di elementi in traccia nei campioni. Infatti, tramite le analisi chimiche è stato rilevato un aumento di Hg, Pb (anche se di pochi $\mu\text{g l}^{-1}$) e soprattutto Zn. Purtroppo, non sono stati fatti molti studi che consentano di valutare e quantificare i meccanismi di rilascio da parte delle alghe. Tra le ipotesi prese in considerazione vi sono il rilascio di particolato adesivo al tallo (anche se risulta poco probabile, viste le operazioni di risciacquo eseguite sia post campionamento che prima dell'impiego delle alghe per il test) e la produzione di essudati extracellulari da parte della macroalga, quali glutatione, cisteina o fitochelatine, utilizzati dall'alga per mantenere l'omeostasi degli elementi in traccia (M. T. S. Vasconcelos et al., 2002).

La fase per l'eliminazione della tossicità dovuta ai metalli, tramite i trattamenti con Na-EDTA e con la colonna SPE, ha portato in entrambi i casi ad una significativa riduzione della tossicità indotta dai metalli. Il trattamento con EDTA permette la chelazione di metalli cationici bivalenti, ma non delle forme anioniche complesse di As e Cr (U.S. EPA, 2007). Il suo utilizzo ha portato ad una riduzione della tossicità leggermente superiore rispetto a SPE e non ha fatto riscontrare alterazioni dello sviluppo larvale nel bianco procedurale eseguito con NSW.

Anche il trattamento con SPE permette la riduzione della tossicità indotta da metalli bivalenti a carica positiva, ma risulta inefficace nella rimozione di As, Cr e Se (U.S. EPA, 2007). In questo caso, l'impiego della colonna SPE sembra non aver portato a rilasci significativi di sostanze tossiche nel campione che vi è passato attraverso. Sulla base di queste considerazioni e dei risultati ottenuti, si può ipotizzare che i soli problemi di identificazione della tossicità dei metalli in traccia possa essere dovuta alla eventuale presenza di metalli e/o metalloidi in forma anionica che non vengono chelati o rimossi dai trattamenti con EDTA e SPE. Per risolvere questo tipo di problema un'alternativa potrebbe essere la sostituzione del trattamento EDTA e/o SPE con delle resine a scambio anionico. Queste resine sono state studiate da R. M. Burgess et al. (2007) per la rimozione di As e Cr da sedimento tal quale ed è stata dimostrata anche una buona capacità di riduzione delle concentrazioni di metalli cationici, quali Cd, Cu, Ni, Pb e Zn, dal campione con interferenze minime su pesticidi e organoclorurati.

Per quanto riguarda l'eliminazione di contaminanti organici, l'utilizzo dei trattamenti XAD e DPA ha permesso di identificare il contributo degli organici che negli studi precedenti non era stato rilevato (M. Picone et al., 2009). Questo è stato possibile grazie ad una diversa scelta di resine e polimeri utilizzati rispetto al passato; infatti con l'utilizzo di XAD si è puntato all'individuazione di composti idrofobi e solubili come antibiotici, composti organici azotati, grassi, pesticidi e idrocarburi policiclici aromatici (IPA), mentre con DPA si è mirato all'individuazione di eventuali composti organici polari, come gli *endocrine disrupting chemicals* (EDC) e le alchil-amine.

In passato, come nel caso del precedente studio di M. Picone et al. (2009), nonostante i contaminanti organici siano una delle principali classi di sostanze tossiche per le acque interstiziali (K. T. Ho et al., 2013), la loro caratterizzazione è stata fortemente limitata dalla co-presenza di altri contaminanti (ad es. ammoniaca e metalli) che ne mascherano la tossicità, nonché dalla scelta di resine e polimeri che non hanno un potere di ritenzione sufficiente per eliminare molte delle categorie di contaminanti organici potenzialmente presenti nel campione. Infatti, le procedure standard U.S. EPA (2007) suggeriscono l'impiego di colonne C-18 che hanno come target principale i contaminanti organici non polari come idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB) e pesticidi organoclorurati (OCP) (K. T. Ho et al., 2013; U.S. EPA 1996; U.S. EPA, 2007), questo trattamento è stato abbondantemente utilizzato nei decenni passati come unico trattamento per organici. In seguito, si è visto il diffondersi di altre resine e polimeri quali XAD, Tenax® e Oasis®, testati con successo per la rimozione di una più ampia gamma di contaminanti organici da effluenti e acque interstiziali, comunque principalmente appartenenti alla classe degli organici non polari (IPA, PCB, CB) (G. Cornelissen et al., 2001; T. Norbeng-King, 2005).

Il vantaggio ricavato dall'aggiunta del trattamento con DPA, non utilizzato in genere come manipolazione standard in procedure TIE, è stato il poter riscontrare il possibile coinvolgimento di composti organici polari, inclusi EDC e alchil-ammine (P. Kusch et al., 2013; R. Liu et al., 2006), i quali non possono essere ritenuti né da XAD né da colonne C-18. È stato quindi risolutivo per determinare la presenza di organici nel campione, utilizzare polimeri con affinità per diverse classi di contaminanti organici.

Si è infine ipotizzato che la sequenza più adatta per discernere gli effetti dovuti a metalli in tracce rispetto a quelli dovuti ai contaminanti organici fosse la sequenza che, dopo la filtrazione, utilizza l'eluizione del campione attraverso la colonna SPE, a cui segue il trattamento con XAD o DPA (filt-SPE-XAD/DPA). Questa ipotesi è stata formulata in quanto gli effetti dovuti ai composti organici sono stati rilevati solo nelle sequenze in cui il trattamento con i metalli è stato fatto con SPE.

5.3. La presenza di ammoniaca come confounding factor e ricerche necessarie per migliorare la capacità diagnostica della TIE

Una caratteristica di cui tenere conto per la pianificazione e l'esecuzione di procedure di TIE in ambiente estuarino è l'abbondante presenza di ammoniaca nei sedimenti estuarini, dato che la dinamica dell'azoto in queste aree è importante per determinare i livelli e i modelli di produttività degli estuari, in quanto la produzione primaria in molti sistemi costieri è generalmente limitata da azoto (N. B. Weston et al., 2010).

I trattamenti attualmente proposti dalla letteratura e applicati in questo lavoro non sempre sono sufficientemente efficaci nella rimozione di NH_3 e la presenza residua di concentrazioni potenzialmente tossiche nel campione trattato può compromettere l'intero processo di caratterizzazione ed identificazione degli inquinanti.

Per risolvere questo problema è necessario migliorare l'efficacia nella fase di rimozione dell'ammoniaca, in modo particolare in quei campioni in cui si ipotizza che la concentrazione di ammoniaca sia così alta da superare la capacità di rimozione di U e/o Z, in modo da evitare di lasciare nel campione dell'ammoniaca residua.

Le migliorie che potrebbero portare a questo aumento dell'efficacia di assorbimento potrebbero essere, nel caso del trattamento con zeolite, l'utilizzo di una colonna più grande e/o tempi di esposizione più lunghi; nel caso del trattamento con *Ulva*, si potrebbe testare un trattamento con un tempo di esposizione maggiore delle 3 ore utilizzate in questo caso, che permettono una rimozione massima di circa 7 mg l^{-1} di N-NH_3 (M. Picone et al. 2009), oppure valutare diverse temperature.

In entrambi i casi però, poiché sia U che Z sono manipolazioni non specifiche che hanno mostrato capacità di rimuovere anche elementi in traccia dall'acqua interstiziale, bisogna valutare con attenzione il tempo massimo di esposizione per evitare eccessivi fenomeni di assorbimento di elementi in traccia nel corso di questi trattamenti e quindi provocare ulteriore incertezza nell'attribuzione della causalità. Inoltre, viste le problematiche emerse in seguito all'uso di Z sia in questo lavoro di tesi che nelle precedenti applicazioni in letteratura (rilascio di particolato, rilascio di Ba in concentrazioni potenzialmente tossiche, aumento delle larve malformate nel controllo post colonna), si ritiene che tali approfondimenti dovrebbero essere maggiormente sviluppati sull'impiego di U, dal momento che Z non sembra essere un trattamento affidabile per gli ambienti marini ed estuarini, in cui la forza ionica del mezzo favorisce lo scambio cationico mediato dalle zeoliti.

I trattamenti per metalli e composti organici non presentano criticità e possono considerarsi pienamente applicabili agli ambienti estuarini. Alcuni miglioramenti potrebbero essere introdotti dall'impiego di resine anioniche (qualora vi sia indicazione che gli anioni possano essere contaminanti di interesse) e dalla valutazione di ulteriori tipi di polimeri per gli organici. In ogni caso si tratta di miglioramenti legati alle caratteristiche del sito di indagine piuttosto che alle possibili performance della procedura di TIE.

6. Conclusioni

La procedura TIE svolta in questo lavoro si è posta come obiettivo di identificare i trattamenti più efficaci per la caratterizzazione dei principali contaminanti di un campione di acqua interstiziale raccolto in ambiente estuarino, più nello specifico nel Canale Brentelle (BR) della Laguna di Venezia.

Sono stati coniugati i metodi di Phase I e Phase II per creare una procedura ibrida che utilizzasse un approccio sequenziale nella somministrazione dei vari trattamenti.

I trattamenti selezionati per la rimozione dei contaminanti target e la sequenza con la quale sono organizzati costituiscono gran parte dell'efficacia della procedura TIE, che in questo caso si è dimostrata uno strumento efficace per la caratterizzazione del campione BR prelevato, nonostante la tossicità residua pervenuta alla fine della procedura e causata in gran parte dall'abbondanza di ammoniaca nel campione iniziale.

Proprio per via dell'abbondanza di ammoniaca che si può riscontrare in un campione di acqua interstiziale estuarina di questo tipo, è preferibile effettuare le fasi per la rimozione di NH_3 come primo trattamento; questo accorgimento è necessario per evitare fenomeni di mascheramento delle tossicità dovuta ad altri contaminanti.

Tra i trattamenti di rimozione dell'ammoniaca è preferibile quello con *Ulva*, anche se sono necessari ulteriori approfondimenti per chiarire i meccanismi di uptake degli elementi in traccia, di adsorbimento di elementi sul tallo e di rilascio di essudati. Il trattamento con zeolite non è consigliabile, per via di diversi svantaggi che comporta, come la scarsa selettività per l'ammoniaca con relativa rimozione degli elementi in traccia ed il rilascio di particolato e di elementi potenzialmente tossici come Ba, Rb e Tl.

Per quanto riguarda i trattamenti per la caratterizzazione dei metalli, i risultati ottenuti ci hanno confermato che i trattamenti con SPE e con EDTA si equivalgono come riduzione degli effetti dei metalli; SPE è preferibile perché sembra portare ad un migliore risultato dopo i trattamenti effettuati per gli organici con XAD e DPA.

L'uso di due o più resine a diversa affinità per le varie classi di contaminanti organici è essenziale per identificare il contributo dei prodotti organici agli effetti tossici complessivi;

infatti grazie all'utilizzo di resine a diversa affinità, come XAD e DPA, si è potuta effettuare l'identificazione sia di composti organici idrofobici che di composti polari.

Quindi la struttura della TIE ibrida più funzionale può essere identificata con le sequenze aventi *Ulva* come primo trattamento per la rimozione dell'ammoniaca e che proseguono con l'utilizzo di SPE per la rimozione dei metalli, in quanto questo trattamento porta ad un più efficace risultato dei trattamenti con XAD e DPA nella caratterizzazione dei contaminanti organici. In conclusione, quindi la sequenza che presenta il miglior compromesso di affidabilità e capacità di caratterizzare ed identificare è:

Ulva -> filtrazione -> SPE -> XAD/DPA

Alcuni approfondimenti proponibili per studi futuri potrebbero riguardare il miglioramento della rimozione di NH₃, valutando in maniera più approfondita i tempi di esposizione ideali ed il rapporto massa/campione più adatto al trattamento di rimozione dell'ammoniaca, l'approfondimento dei meccanismi di *uptake* e possibile rilascio di elementi in traccia da parte di *Ulva* e la valutazione dell'efficacia di resine di scambio anionico per identificare effetti legati ad anioni di As, Cr e Se.

7. Ringraziamenti

Alla conclusione di questa mia carriera universitaria voglio porgere i miei più sentiti ringraziamenti a chi mi ha sostenuto durante questa esperienza, che mi ha portato ad una crescita intellettuale ed emotiva.

Ringrazio la mia famiglia che ha saputo sostenermi in molti modi durante questi anni, anche nei momenti in cui i risultati non erano quelli attesi, spingendomi sempre a dare il meglio di me stessa.

Ringrazio il mio ragazzo Leo, per essere stata la persona che ha creduto nelle mie capacità sostenendomi in ogni momento e per aver compreso e condiviso le difficoltà di un percorso di studi universitario.

Ringrazio tutte le persone che hanno saputo essere di conforto o hanno condiviso con me momenti belli e brutti in questi anni.

Infine, ringrazio il Professor Marco Picone per la disponibilità espressa nell'aiutarmi durante la stesura di questa tesi e nel precedente tirocinio.

8. Bibliografia

1. A. Arizzi Novelli, M. Picone, C. Losso, A. Volpi Ghirardini. Ammonia as confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Toxicol. Environ. Chem.* 85,183–191 (2003).
2. A. Pozzan et al., Marghera900, Itinerari e laboratori didattici sulla storia di Porto Marghera, Fondazione Gianni Pellicani (2014).
3. A. Volpi Ghirardini, A. Arizzi Novelli, D. Tagliapietra, Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Environ. Int.* 31, 1065–1077 (2005a).
4. A. Volpi Ghirardini, C. Losso, A. Arizzi Novelli, A. Baù, H. Edouard, P. F. Ghetti, *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the Lagoon of Venice (Italy). *Chem. Ecol.* 21, 455–463 (2005b).
5. ASTM, Standard guide for conducting acute toxicity test starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. E 724 – 98, 21 (2004).
6. B. L. Hampson, The analysis of ammonia in polluted seawater. *Water Res.* 11: 305-308 (1977b).
7. B. L. Hampson. Relationship between total ammonia and free ammonia in terrestrial and ocean waters. *Cons. Int. Explor. Mer.* 37(2): 117-122 (1977a).
8. B. M. Phillips *et al.*, Evaluation of phase II toxicity identification evaluation methods for freshwater whole sediment and interstitial water. *Chemosphere.* 74, 648–653 (2009).
9. B. S. Anderson, J. W. Hunt, B. M. Phillips and R. S. Tjeerdema. Navigating the TMDL Process: Sediment Toxicity. Alexandria, VA.: *Water Environment Research Foundation (WERF)* (2006).
10. C. H. Walker, S. P. Hopkin, R. M. Sibly, D. B. Peakall. Principles of Ecotoxicology, second edition. *Taylor & Francis Group* (2001).
11. C. Losso et al., Developing toxicity scores for embryotoxicity tests on elutriates with the sea urchin *Paracentrotus lividus*, the oyster *Crassostrea gigas*, and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53 (2007).

12. C. Losso, A. A. Novelli, M. Picone, P. F. Ghetti, A. V. Ghirardini, Porewater as a matrix in toxicity bioassays with sea urchins and bivalves: Evaluation of applicability to the Venice lagoon (Italy). *Environ. Int.* 35 (2009).
13. C. Turetta, G. Cozzi, C. Barbante, G. Capodaglio, P. Cescon, Trace element determination in seawater by ICP-SFMS coupled with a microflow nebulization/desolvation system. *Anal. Bioanal. Chem.* 380, 258–268 (2004).
14. D. Alvarez-Munoz, M. Llorca, J. Blasco, D. Barcelò. Contaminants in the Marine Environment. *Marine Ecotoxicology.* 1-34 (2016).
15. D. J. Randall, T. K. N. Tsui, Ammonia toxicity in fish, *Marine Pollution Bulletin* 45: 17–23 (2002).
16. D. L. Rice, B. E. Lapointe. Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile. II. Trace metal chemistry. *J Exp Mar Biol Ecol* 54:1–11 (1981).
17. D. L. Rice, B. E. Lapointe, Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile. II. Trace metal chemistry. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 54, 1–11 (1981).
18. D. L. Rice. A simple mass transport model for metal uptake by marine macroalgae growing at different rates. *J Exp Mar Biol Ecol* 82:175–182 (1984).
19. D. M. Di Toro, C. S. Zarba, D. J. Hansen, W. J. Berry, R. C. Swartz, C. E. Cowan, S. P. Pavlou, H. E. Allen, N. A. Thomas and P. R. Paquin. Technical basis for establishing sediment quality criteria using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.* 10(12): 1541-1583 (1991).
20. D.M. Ambiente n. 173 del 15 luglio 2016.
21. D.M. Ambiente n. 260 del 8 novembre 2010.
22. D.M. Ambiente n. 56 del 14 aprile 2009.
23. DMA “Perimetrizzazione Sito di Interesse Nazionale Venezia (Porto Marghera)”, Ministero dell’Ambiente, 23.02.2000.
24. E. His, R. Beiras, M. Seaman. The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve larvae. *Adv. Marine Biol.*, 37, 1–178 (1999).
25. E. R. Long, D. D. Macdonald, S. L. Smith, F. D. Calder, Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Manage.* 19, 81–97 (1995).

26. G. Cornelissen, H. Rigterink, D. E. ten Hulscher, B. A. Vrind, P. C. van Noort, A simple Tenax extraction method to determine the availability of sediment-sorbed organic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 706–11 (2001).
27. G. Libralato, A. Volpi Ghirardini, F. Avezzù. How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 1602–1611 (2010).
28. H. Watanabe, F. Nakajima, I. Kasuga, H. Furumai, Application of whole sediment toxicity identification evaluation procedures to road dust using a benthic ostracod *Heterocypris incongruens*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 245–251 (2013).
29. ISPRA, Ministero dell'ambiente, Si.Di.Mar., Identificazione e distribuzione nei mari italiani di specie non indigene, *Crassostrea gigas* Thumberg, 1793.
30. J. M. Besser, C. G. Ingersoll, E. N. Leonard and D. R. Mount. Effect of zeolite on toxicity of ammonia in freshwater sediments: Implications for toxicity identification evaluation procedures. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(11): 2310-2317 (1998).
31. J. Reardon, J. A. Foreman, R. L. Searcy, New reactants for the colorimetric determination of ammonia. *Clin. Chim. Acta.* 14, 403–405 (1966).
32. J. V. Spangenberg, G. N. Cherr, Developmental effects of barium exposure in a marine bivalve (*Mytilus californianus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1769–1774 (1996).
33. K. T. Ho, A. Kuhn, M. C. Pelletier, R. M. Burgess, A. Helmstetter, Use of *Ulva lactuca* to distinguish pH-dependent toxicants in marine waters and sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 207–212 (1999).
34. K. T. Ho, R. M. Burgess, M. C. Pelletier, J. R. Serbst, H. Cook, M. G. Cantwell, S. A. Ryba, M. M. Perron, J. A. Lebo, J. N. Huckins and J. D. Petty. Use of powdered coconut charcoal as a TIE manipulation for organic toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(9): 2124-2131 (2004).
35. K. T. Ho, R. M. Burgess. What's causing toxicity in sediments? Results of 20 years of toxicity identification and evaluations. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2424–2432 (2013).
36. L 426/98, "Nuovi interventi in campo ambientale", pubblicata nella *Gazzetta Ufficiale* n. 291 del 14 dicembre 1998.
37. L. G. Bellucci et al., Anthropogenic Metal Delivery in Sediments of Porto Marghera and Venice Lagoon (Italy). *Soil Sediment Contam. An Int. J.* 19, 42–57 (2009).

38. M. Frignani, M., Bellucci, L.G., Carraro, C., and Favotto, M. 2001. Accumulation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in sediments of the Venice Lagoon and the industrial area of Porto Marghera. *Mar. Poll. Bull.* 42, 544–553.
39. M. Pelletier, K. T. Ho, M. G. Cantwell, A. Kuhn-Hines, S. Jayaraman and R. M. Burgess. Use of *Ulva lactuca* to identify ammonia toxicity in marine and estuarine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(12): 2852-2859 (2001).
40. M. Picone et al., Assessment of sediment toxicity in the Lagoon of Venice (Italy) using a multi-species set of bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 123 (2016).
41. M. Picone *et al.*, Sequential toxicity identification evaluation (TIE) for characterizing toxicity of Venice Lagoon sediments: Comparison of two different approaches. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009).
42. M. Picone, M. Bergamin, E. Delaney, A. V. Ghirardini, K. O. Kusk, Testing lagoonal sediments with early life stages of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): An approach to assess sediment toxicity in the Venice Lagoon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147 (2018).
43. M. Rozic, S. Cerjan-Stefanovic, S. Kurajica, V. Vancina and E. Hodzic. Ammoniacal nitrogen removal from water by treatment with clays and zeolites. *Water Res.* 34: 675-3681 (2000).
44. M. T. S. . Vasconcelos, M. F. C. Leal, C. M. Van Den Berg. Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliana huxleyi* in natural seawater. *Mar. Chem.* 77, 187–210 (2002).
45. Magistrato alle Acque di Venezia. 2004. Qualità delle acque e degli scarichi idrici dell'area di Porto Marghera. Dati relativi al 2001–2002. MAV, Venice.
46. N. B. Weston, A. E. Giblin, G. T. Banta, C. S. Hopkinson, J. Tucker. The Effects of Varying Salinity on Ammonium Exchange in Estuarine Sediments of the Parker River, Massachusetts. *Estuaries and Coasts*, 33:985–1003 (2010).
47. N. S. Bloom, L. M. Moretto, P. Scopece, P. Ugo. Seasonal cycling of mercury and monomethyl mercury in the Venice Lagoon (Italy). *Mar. Chem.* 91, 85–99 (2004).
48. NFESC, "Guide for Planning and Conducting Sediment Pore Water Toxicity Identification Evaluations (TIE) to Determine Causes of Acute Toxicity at Navy Aquatic Sites" Newport, RI 02840, (2003)

49. P. A. Kosian, C. W. West, M. S. Pasha, J. S. Cox, D. R. Mount, R. J. Huggett and G. T. Ankley. Use of nonpolar resin for reduction of fluoranthene bioavailability in sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(2): 201-206 (1999).
50. P. A. Kosian, E.A. Makynen, P.D. Monson, D.R. Mount, A. Spacie, O.G. Mekenyan, and G.T. Ankley. Application of toxicity-based fractionation techniques and structure-activity relationship models for the identification of phototoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment pore water. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1021- 1033 (1998).
51. P. Kusch, G. Knupp, M. Hergarten, M. Kozupa, M. Majchrzak, Solid-phase extraction-gas chromatography and solid-phase extraction-gas chromatography–mass spectrometry determination of corrosion inhibiting long-chain primary alkyl amines in chemical treatment of boiler water in water-steam systems of power plants. *J. Chromatogr. A.* 1113, 198–205 (2006).
52. R. Liu, J. L. Zhou, A. Wilding, Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1022, 179–189 (2004).
53. R. M. Burgess *et al.*, Marine sediment toxicity identification evaluation methods for the anionic metals arsenic and chromium. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 61 (2007).
54. R. M. Burgess *et al.*, Use of zeolite for removing ammonia and ammonia-caused toxicity in marine Toxicity Identification Evaluations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 440–447 (2004).
55. R. M. Burgess, J. B. Charles, A. Kuhn, K. T. Ho, L. E. Patton and D. G. McGovern. Development of a cation exchange methodology for marine toxicity identification (TIE) application. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(6): 1203-1211 (1997).
56. R. M. Burgess, K.T. Ho, W. Brack, M. Lamoreex, Effects-Directed Analysis (EDA) and Toxicity Identification Evaluation (TIE): Complementary but Different Approaches for Diagnosing Causes of Environmental Toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9), 1935-1945, (2013).
57. R. M. Burgess, M. G. Cantwell, M. C. Pelletier, K. T. Ho, J. R. Serbst, H. F. Cook and A. Kuhn. Development of a toxicity identification evaluation (TIE) procedure for characterizing metal toxicity in marine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(4) (2000a).

58. R. M. Burgess, M.C. Pelletier, K.T. Ho, J.R. Serbst, S.A. Ryba, A. Kuhn, M.M. Perron, P. Raczewski, M.G. Cantwell. Removal of ammonia toxicity in marine sediment TIEs: a comparison of *Ulva lactuca*, zeolite and aeration methods. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 607–618 (2003).
59. R. M. Burgess. Characterizing and identifying toxicants in marine waters: A review of marine Toxicity Identification Evaluations (TIEs). *Int. J. Environment and Pollution* 13(1-6): 2-33 (2000b).
60. R. V. Thurston, R. C. Russo, and G. A. Vinogradov, Ammonia toxicity to fishes. Effect of pH on the toxicity of the unionized ammonia species, *Environ. Sci. Technol.*, 1981, 15 (7), pp 837–840 (1981).
61. S. Kesraoui-Ouki, C. R. Cheeseman and R. Perry. Natural zeolite utilization in pollution control: A review of applications to metals' effluents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 59: 121-126 (1994).
62. T. Norberg-King, Toxicity reduction and toxicity identification evaluations for effluents, ambient waters, and other aqueous media (Society of Environmental Toxicology and Chemistry, (2005).
63. U.S. EPA, "Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE). Phases I, II and III Guidance Document" (Washington, D.C., 2007).
64. U.S. EPA, Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod *Letpochirus plumulosus* (2001).
65. U.S. EPA. Marine toxicity identification evaluation (TIE) procedures manual: Phase I guidance document. Washington, DC: Office of Research and Development. EPA/600/R-96/054 (1996).
66. U.S. EPA. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase II. Toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity. Duluth, MN: Environmental Research Laboratory. EPA/600/6-92/080 (1992).
67. W. Stumm and J. J. Morgan. *Aquatic Chemistry*. Chichester, NY: John Wiley and Sons. Inc (1981).

9. Sitografia

- a. EPA, Summary of the Clean Water Act, 33 U.S.C. §1251 et seq. (1972), <https://www.epa.gov/laws-regulations/summary-clean-water-act> .
- b. FAO, Dipartimento di Pesca ed Acquacoltura, Programma di informazione sulle specie acquatiche, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es (2006).
- c. ISPRA, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (2014), <http://www.isprambiente.gov.it/it/temi/siti-contaminati/siti-di-interesse-nazionale-sin>.
- d. Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Direzione Generale per la Salvaguardia del Territorio e delle Acque, Archivio Documenti sulle Bonifiche, http://www.bonifiche.minambiente.it/page_home.html.
- e. MUVE, Fondazione Musei Civici Venezia, Museo di Storia Naturale di Venezia, elenco specie, <http://msn.visitmuve.it/it/ricerca/schede-tematiche/specie/crassostrea-gigas/>.
- f. Regione del Veneto, Ambiente e Territorio, Tutela del Territorio e dell’Ambiente del Veneto, Sito di Interesse Nazionale di Venezia Porto Marghera, <https://www.regione.veneto.it/web/ambiente-e-territorio/sin-venezia-porto-marghera>.
- g. Sistema Venezia, <http://sistemavenezia.regione.veneto.it/content/la-storia>.
- h. The Seaweed Site: information on marine algae, http://www.seaweed.ie/descriptions/ulva_rigida.php .