



PORTI
di ROMA
e del LAZIO

AUTORITA' PORTUALE DI
CIVITAVECCHIA, FIUMICINO E GAETA

OPERE STRATEGICHE PER IL PORTO DI CIVITAVECCHIA

1° LOTTO FUNZIONALE:
PROLUNGAMENTO ANTEMURALE C. COLOMBO
DARSENE SERVIZI E TRAGHETTI

PROGETTO DEFINITIVO

VERIFICA DI ATTUAZIONE

(ai sensi art. 185 comma 6 e 7 D.Lgs. 163 / 06)

DELLE PRESCRIZIONI CONTENUTE NEL PARERE DEL MINISTERO DELL'AMBIENTE E
DELLA TUTELA DEL TERRITORIO E DEL MARE
(prot.DSA_2006_0021173 del 08-08-2008)

ALL. 6.3

MONITORAGGIO AMBIENTE MARINO
FASE DI ESERCIZIO

Committente:

Autorità Portuale di Civitavecchia, Fiumicino e Gaeta

IL RESPONSABILE DEL PROCEDIMENTO

Dott. Ing. Maurizio Ievolella

IL DIRIGENTE DELL'UFFICIO AMBIENTE

Dott. Ing. Calogero G. Burgio



Prof. Marco Marcelli

COMMESSA			CATEGORIA	LIVELLO	REV	
9	3	5	0	1	1	
			M	A		
				P	E	
					ALL.6	0
	NOV/2011	0	PRIMA EMISSIONE			
Rif. Dis.	Data	Rev.	DESCRIZIONE			

1. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ

Una volta terminate le attività relative alla realizzazione delle opere oggetto del monitoraggio ambientale marino, di cui alle premesse, tale monitoraggio verrà continuato durante la messa in esercizio delle suddette opere.

Il monitoraggio dell'ambiente marino, come prescritto e come descritto nei capitoli successivi, prevede lo svolgimento delle seguenti attività:

- monitoraggio delle acque attraverso stazioni di monitoraggio fisse;
- monitoraggio delle acque attraverso campionamenti in situ;
- monitoraggio delle praterie di *Posidonia oceanica* e degli ecosistemi bentonici.

2. MONITORAGGIO DELLA COLONNA D'ACQUA ATTRAVERSO LE STAZIONI FISSE

L'acquisizione dei dati avverrà attraverso pacchi strumentali, che saranno oggetto di attività di manutenzione e calibrazione. Tali attività si protrarranno per il primo anno di esercizio delle opere, con le frequenze di seguito descritte.

ATTIVITA'	FREQUENZA OPERAZIONI	DURATA
Stazione fissa Banchina n.26	quindicinale	1 anno
Stazione fissa Boa Oceanografica	quindicinale	1 anno

L'Autorità Portuale di Civitavecchia ha installato una rete di monitoraggio in continuo costituita da due stazioni fisse di misura:

- la stazione di prossimità: presso la banchina n.26, in posizione baricentrica rispetto ai confini portuali;
- la stazione di zero: ubicata al largo del porto, sull'area oggetto della concessione demaniale rilasciata dalla Regione Lazio.

Entrambe le stazioni permetteranno di acquisire serie temporali di dati per l'analisi delle variabili fisico-chimico-biologiche a lungo termine.

Lo studio delle dinamiche oceanografiche necessita di misure in continuo al fine di poter comprendere le scale spaziali e temporali dei processi ad essi legati, in particolar modo in ambiente costiero, dove i processi sono molto veloci ed influenzati dalle condizioni meteomarine e dalla morfologia della costa.

Per questo motivo la presenza di una rete di monitoraggio, composta da stazioni di misura fisse, è di fondamentale importanza per la comprensione dei sistemi ecologici ed oceanografici.

Il Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina del DEB, attraverso l'installazione e la gestione di queste stazioni di misura, avrà la possibilità di integrare la strumentazione oggetto del presente Allegato con strumentazione che permetterà di studiare fenomeni quali la propagazione della luce lungo la colonna d'acqua ed i flussi energetici nell'interfaccia aria-acqua.

E' inoltre di fondamentale importanza la presenza di stazione di misura fisse, in quanto

rappresentano un punto di calibrazione dei modelli numerici di simulazione della propagazione di sostanze conservative e non conservative, nonché di simulazione delle principali dinamiche oceanografiche. Le attività di ricerca potranno portare alla pubblicazione di articoli scientifici in riviste di rilievo nazionale ed internazionale.

2.1 Stazione di prossimità

La stazione di prossimità ha una struttura di supporto in acciaio inox (AISII 316) ancorata presso la banchina 26 del porto di Civitavecchia, banchina che risulta essere prospiciente ai fondali interessati dagli interventi previsti dal “1° stralcio”; tale stazione è dotata delle seguenti componentistiche:

- acquirente dati;
- sistema di trasmissione dati;
- sonda multiparametrica (conducibilità, salinità, temperatura, densità, ossigeno disciolto, pH, torbidità e fluorescenza della clorofilla *a*).



Fig 2.1-1 Stazione di prossimità

La sonda multiparametrica, integra sensori per la misura della qualità chimico-fisico-biologica delle acque di ultima generazione sviluppati presso il Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina (DEB-Università della Toscana).

I sensori sono connessi ad un datalogger che acquisisce le misure eseguite dalla strumentazione, le trasforma in grandezze fisiche e le memorizza nella propria memoria di massa. I dati acquisiti, a mezzo del sistema GSM Wavecom, sono trasmessi al Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina (DEB-Università degli Studi della Toscana), che provvederà ad elaborarli ed ad inviarli al Centro Elaborazione Dati dell'Autorità Portuale di Civitavecchia, al fine di poter essere visualizzati, come serie temporali, all'interno del Portale Informatico.

2.2 Stazione di zero

Sulla stazione di zero sono installati sensori per la misura delle stesse variabili, di seguito descritte, misurate dalla stazione di prossimità.



Fig. 2.2-1 Stazione di zero

2.3 Parametri oggetto del monitoraggio marino attraverso le stazioni fisse

Le attrezzature descritte nei precedenti capitoli verranno utilizzati al fine di acquisire parametri di significativa importanza.

Tali misure saranno utili per la definizione delle potenziali influenze delle opere che costituiscono il primo lotto degli interventi funzionali di potenziamento dell'hub portuale di Civitavecchia (I° stralcio) sulla qualità dell'ambiente marino.

2.3.1 Temperatura

La temperatura insieme ad altri fattori come la salinità è molto importante nella determinazione dei movimenti delle masse di acqua del mare, che a loro volta influiscono direttamente sui processi di riossigenazione delle acque e sulla rimessa in circolo dei nutrienti. Inoltre la temperatura influenza altri parametri come la densità, la viscosità, l'ossigeno ed pH dell'acqua di mare. La parte più superficiale del Mediterraneo è interessata da una variazione termica stagionale con temperature invernali di 14-16°C e temperature estive di 24-27°C mentre nella parte più profonda al di sotto di questo sottile strato (oscillante fra i 25 e i 40 m) le acque presentano una temperatura quasi costante di circa 13-14°C. Lo scalino che separa lo strato superficiale più caldo dalla massa d'acqua sottostante più fredda prende nome di termoclino. La temperatura, è fondamentale per il calcolo di altre variabili e grandezze (es. densità, pH, salinità, ossigeno) che sono influenzate dalla temperatura stessa. La temperatura inoltre influenza i processi vitali degli organismi degli ecosistemi marini condizionandone i processi metabolici e la distribuzione spaziale. Poiché ciascun organismo tollera un campo di temperatura, la presenza di variazioni di temperatura anomale può alterare i processi metabolici portando, in casi limite, l'organismo alla morte. L'osservazione della variazione della temperatura superficiale serve anche per definire la diffusione di masse d'acqua a caratteristiche fisiche differenti nel corpo recettore, e quindi ci consente di controllare l'inquinamento di tipo fisico che si verifica quando processi industriali utilizzano acqua di mare per raffreddare gli impianti produttivi.

2.3.2 Conducibilità

La conducibilità è una misura del movimento delle cariche elettriche in un corpo solido, liquido o gassoso sottoposto a un campo elettrico. Nei liquidi che contengono elettroliti (sali, acidi, basi) dissociati in soluzione, le cariche sono rappresentate da ioni. I liquidi puri come l'acqua distillata hanno una conducibilità molto bassa, mentre l'acqua di mare essendo una soluzione di acqua e sali disciolti, ha una conducibilità piuttosto elevata. L'unità di misura di tale variabile è il microsiemens che equivale a 10^{-6} siemens. La misurazione della conducibilità dell'acqua di mare è molto importante, perché su di essa si basa la determinazione del valore di salinità. La salinità infatti è legata principalmente alla temperatura ed alla conducibilità. Per misurare la salinità si utilizzano quindi sensori di conducibilità che sfruttano la proprietà di conduttore di elettricità dell'acqua di mare ed attraverso i quali si possono apprezzare variazioni anche piccole di salinità.

2.3.3 Salinità

La salinità esprime la quantità in grammi di sali contenuti in un chilogrammo di acqua di mare. La misura si fornisce in per mille (‰) e si riferisce ad acqua di mare filtrata per eliminare ogni tipo di sospensione. Il Mediterraneo presenta dei valori che variano dal 37‰ nella parte occidentale, al 39‰ nella parte orientale. Questi valori sono piuttosto alti se confrontati con quelli registrati nell'oceano Atlantico con cui il Mediterraneo comunica per mezzo dello Stretto di Gibilterra. Ciò è dovuto allo scarso ricambio delle sue acque ed alla forte evaporazione cui è soggetto. La salinità è determinata da un numero relativamente piccolo di costituenti, i quali ad eccezione degli ioni carbonico e bicarbonato, mantengono costante il loro rapporto con il cloro, pertanto la salinità può essere collegata alla clorinità, attraverso la relazione: $S=1,80655Cl^-$. La determinazione della salinità si può fare misurando per via chimica il contenuto in Cl e risalendo da questa alla salinità. Il metodo più usato per misurare la salinità è però quello basato sulla conducibilità elettrica. La salinità è un fattore molto importante per la vita degli organismi marini e per la loro distribuzione, in quanto ogni organismo può tollerare variazioni di questo parametro solo entro certi limiti. Da ciò risulta che ogni forma di inquinamento che alteri questo parametro produrrà modificazioni sulla composizione faunistica e floristica dell'area interessata.

La misurazione della salinità è molto importante, infatti attraverso la sua misurazione possono

essere evidenziati scarichi di acqua dolce a causa della stratificazione che si verrà a creare tra le masse di acqua aventi densità differente.

2.3.4 Ossigeno disciolto

L'ossigeno è un gas fondamentale per la vita in quanto è il gas indispensabile per la respirazione. La massima quantità di O_2 si trova presso la superficie e diminuisce andando in profondità. Ciò è dovuto all'equilibrio tra produzione di O_2 per attività fotosintetica e consumo di O_2 per la respirazione. In superficie prevale la produzione, mentre in profondità non c'è più produzione ma solo consumo. La profondità a cui l' O_2 prodotta e quella consumata sono uguali è detta profondità di compensazione. La quantità di O_2 contenuta nell' H_2O aumenta al diminuire della temperatura e con il diminuire della salinità. Considerando che la concentrazione massima (livello di saturazione) di un gas in un liquido è determinata principalmente dalla temperatura (oltre che dalla salinità e pressione) è molto più utile che il dato di concentrazione venga espresso anche in percentuale di saturazione. In presenza di fenomeni di eutrofizzazione si ha inizialmente una forte produzione di O_2 , seguita da un rapido consumo di O_2 , in particolare negli strati più profondi dove si possono avere situazioni di anossia. Una forte diminuzione del valore di O_2 si ha anche nei casi di inquinamento da idrocarburi, a causa sia dell'intensa attività batterica che comporta consumo di O_2 sia per la presenza dello strato di petrolio che impedisce lo scambio di O_2 tra aria ed acqua. Diminuzioni del valore di O_2 avvengono anche nei casi di inquinamento organico a causa dell'attività batterica. Da ciò risulta come la misura di questo parametro sia molto importante per la caratterizzazione dello stato di trofia del mare e nelle valutazioni di alterazioni a carico dell'ambiente marino.

2.3.5 Concentrazione idrogenionica (pH)

Misura l'acidità o basicità del mezzo. Nell'acqua di mare il valore del pH si aggira fra 7.5 ed 8.4 ed i valori massimi si trovano in superficie dove la CO_2 viene continuamente rimossa dai vegetali per la fotosintesi. Il pH è influenzato dalla temperatura, pressione e salinità. L'aumento di temperatura e pressione determinano una leggera diminuzione del pH. L'acqua di mare comunque ha una notevole capacità tampone e pertanto contiene le oscillazioni di pH in limiti relativamente

ristretti. Questo fa sì che significative differenze dei valori di questo parametro si hanno solo in presenza di particolari situazioni di alterazione ambientale, come nei casi di inquinamento chimico o nelle zone dove sono presenti immissioni di acqua dolce. In questi casi infatti si possono avere delle modificazioni delle concentrazioni di sostanze chimiche, o variazioni della densità tali da modificare in maniera più o meno marcata i valori del pH.

2.3.6 Torbidità

La radiazione luminosa principale che si propaga dalla superficie del mare è quella proveniente dal sole e produce oltre all'effetto termico diretto, le reazioni fotochimiche indispensabili per la vita degli organismi autotrofi.

Nell'ambiente acquatico la luce subisce notevoli modificazioni sia nell'intensità, che nella composizione spettrale. Le radiazioni più assorbite sono quelle al di sopra di 620 nm e al di sotto di 400 nm. Il materiale sospeso non solo fa diminuire l'intensità luminosa complessiva condizionando la trasparenza dell'acqua, ma fa anche variare l'assorbimento delle singole componenti.

L'assorbimento varia in funzione della trasparenza delle acque; in acque costiere poco trasparenti la luce è ridotta all'1% del suo valore di superficie a circa 25 m di profondità, mentre nelle acque trasparenti della platea continentale tale valore è raggiunto a -60 m. Nel Mediterraneo in media (anche se le differenze possono essere molto marcate a seconda del luogo, delle stagioni e delle condizioni meteorologiche) a circa 5-7 m. di profondità la luminosità è ridotta del 50% di quella registrata in superficie ed a 40-50 m. si riduce a poco più dell'1%.

La luce ha numerosi effetti biologici; infatti la produzione primaria è legata alla penetrazione della luce e quindi è limitata agli strati superficiali che costituiscono la zona eufotica (sino a 100-150 m.) al di sotto della quale si trova la zona afotica dove la luce penetra molto poco e che non consente quindi lo sviluppo della vita vegetale. La conoscenza della profondità di penetrazione della luce rappresenta un dato molto utile per individuare il grado di trofia di un ambiente al momento della misura. Insieme ad altri elementi consente la conoscenza delle potenzialità produttive dell'ambiente marino. L'osservazione della torbidità dell'acqua di mare permette di valutare l'intorbidimento dell'acqua stessa, che può dipendere da fenomeni di eutrofizzazione collegati ad inquinamento di tipo organico.

*2.3.7 Fluorescenza della Clorofilla *a**

In ambienti acquatici la misura della clorofilla *a* è utilizzata come indicatore di biomassa autotrofa in quanto rappresenta il pigmento indispensabile per il processo di fotosintesi per tutti gli organismi autotrofi. La clorofilla *a* costituisce l'1-2% del peso secco della sostanza organica delle alghe. Dalla misura della clorofilla è così possibile risalire al contenuto di sostanza organica utilizzando fattori di conversione. Il rapporto tra carbonio organico e clorofilla varia tra le specie, in funzione delle diverse condizioni fisiologiche ed ambientali. I metodi generalmente utilizzati per l'analisi della clorofilla sono quello spettrofotometrico e quello fluorimetrico. I metodi spettrofotometrico e fluorimetrico sono largamente utilizzati per indagini di campo. La tecnica fluorimetrica, fino a 50 volte più sensibile di quella spettrofotometrica, consente l'utilizzo di volumi ridotti di campione e la misura della clorofilla in vivo.

2.4. Attività di manutenzione e calibrazione

2.4.1 Attrezzatura

Al fine di assicurare il corretto funzionamento della strumentazione installata nelle stazioni di misura fisse in banchina n.26 ed in boa oceanografica, il personale del Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina del DEB effettuerà una serie di attività finalizzate alla calibrazione della strumentazione installata. Con cadenza quindicinale i pacchi strumentali verranno sostituiti con pacchi strumentali calibrati e la strumentazione sostituita verrà portata presso il Laboratorio per poter essere calibrata e manutenzionata. Durante le operazioni verranno effettuati dei profili verticali lungo la colonna d'acqua con la sonda multiparametrica Idronaut 316/317, munita di sensori di pressione, temperatura, conducibilità, pH, ossigeno disciolto e fluorescenza della clorofilla *a*. I dati acquisiti serviranno come controcalibrazione rispetto alla strumentazione installata sulle stazioni di misura fisse (banchina n.26 e boa oceanografica).

2.4.2 Modalità di campionamento

Durante le operazioni di sostituzione dei pacchi strumentali verranno raccolti dei campioni di

acqua al fine di calibrare la strumentazione: in particolare verranno raccolti campioni per l'analisi della clorofilla *a* per la corretta calibrazione dei fluorimetri, campioni per l'analisi del solido sospeso per la corretta calibrazione dei sensori di torbidità e campioni per l'analisi dell'ossigeno disciolto per la corretta calibrazione dei sensori di ossigeno. I campioni verranno prelevati per mezzo di bottiglia Niskin a differenti quote lungo la colonna d'acqua.

Torbidità

Il campione d'acqua, che servirà per la calibrazione del sensore di torbidità e per avere la stima della quantità di solido sospeso, verrà prelevato dalla bottiglia di campionamento e travasato in bottiglie di plastica da 2L. E' necessario avvinare le bottiglie due volte prima della raccolta del campione.

Ossigeno disciolto

Il prelievo per la determinazione dell'ossigeno disciolto viene effettuato ponendo il tubo della bottiglia Niskin alla base di una bottiglia di pyrex da 60-90 ml con tappo smerigliato a becco di flauto o a terminazione troncoconica arrotondata. E' necessario avvinare due volte la bottiglia prima della raccolta del campione e riempire la bottiglia completamente evitando di far rimanere aria all'interno.

Clorofilla *a*

Il campione d'acqua da prelevare per la determinazione della concentrazione di clorofilla *a* viene travasato dalla bottiglia di campionamento in una bottiglia di plastica scura da 5L, interponendo il retino da plancton in modo da trattenere lo zooplankton e le macroalghe eventualmente presenti. E' necessario avvinare la bottiglia due volte prima della raccolta del campione.

2.5. Operazioni di calibrazione in laboratorio

Una volta trasferiti i pacchi strumentali delle due stazioni di misura fisse (banchina n.26 e boa oceanografica) si procederà alla pulizia e calibrazione dei sensori in essi installati, al fine di preparare i pacchi strumentali per il successivo periodo operativo.

Il Laboratorio è provvisto di sensori standard ad elevata risoluzione e di una vasca per la calibrazione dei pacchi strumentali. Una volta sostituiti i liquidi e le parti consumabili di ciascun sensore, i pacchi strumentali subiranno un processo di calibrazione in vasca.

I dati acquisiti verranno confrontati con i dati acquisiti dai sensori standard e con i dati acquisiti per mezzo delle analisi dei campioni d'acqua raccolti in situ.

Di seguito si riportano le attività di laboratorio ed i metodi di riferimento adottati per l'analisi dei parametri indicati

Torbidità

Apparecchiature

- Stufa a convezione naturale, munita di termostato capace di mantenere costante la temperatura entro $\pm 1^\circ\text{C}$.
- Essiccatore
- Bilancia analitica di 200 g di capacità con risoluzione di 0,1 mg.
- Apparecchio per filtrazione sotto vuoto, adeguato al tipo di filtro prescelto.
- Membrane filtranti con pori di diametro medio di 0,45 μm .

Procedura analitica

Porre il filtro per 1 ora in stufa alla temperatura di 105°C ; lasciarlo raffreddare in essiccatore per 30 minuti e pesarlo al decimo di milligrammo. Collocare il filtro nell'apparecchio di filtrazione. Prelevare un'opportuna aliquota del campione da analizzare e, dopo preventiva omogeneizzazione, effettuare la filtrazione sotto vuoto, avendo cura di lavare il dispositivo di prelievo (cilindro graduato o altro) con il liquido filtrato. Per campioni a bassa torbidità il volume prelevato deve essere almeno di un litro, mentre per valori di torbidità più elevati deve essere tale da fornire da 20 a 100 mg di solidi sospesi. Lavare per tre volte il filtro con acqua deionizzata (10 mL per volta) e, a filtrazione completata, mantenere il vuoto per tre minuti.

Ultimata la filtrazione, trasferire il filtro con il suo contenuto in una stufa alla temperatura di 105°C . Dopo 1 ora lasciar raffreddare il filtro in essiccatore per 30 minuti e pesare.

Calcoli

Il contenuto di solidi totali disciolti alla temperatura scelta è dato da:

$$\text{Solidi totali disciolti (mg/L)} = \frac{(M_1 - M_0) \cdot 1000}{V}$$

dove:

M1 = peso (mg) del filtro e del residuo dopo essiccamento;

M0 = peso (mg) del filtro;

V = volume (mL) di campione sottoposto a filtrazione.

Ossigeno disciolto

Apparecchiature

- Matracci tarati da 1 L
- Microburetta di vetro o a pistone da 1 ml o da 5 ml
- 5 bottiglie di pyrex dello stesso tipo di quelle adoperate per il campionamento
- Micropipetta di precisione da 0,500 ml; micropipetta da 0,200 ml
- Agitatore magnetico
- Ancorette magnetiche
- 2 dispenser o micropipette automatiche o siringhe di polietilene con tacche ogni 0,5 ml (per reattivi ossigeno)
- Dispenser da 1 ml (per l'acido solforico concentrato).

Procedura analitica

Preparazione dei reagenti

a. Solfato di manganese:

Sciogliere 365 g di solfato di manganese monoidrato $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in acqua distillata e portare il volume ad 1L

b. Soluzione alcalina ioduro:

Sciogliere 500g di idrossido di sodio in 500 ml di acqua distillata.

Sciogliere 300g di potassio ioduro in 450ml di acqua distillata e mescolare le due soluzioni.

c. Soluzione standard di tiosolfato 0.01N

d. Soluzione di amido solubile

Sospendere 2g di amido solubile in 300-400 ml di acqua. Aggiungere una soluzione di

idrossido di sodio 20% in modo vigoroso. Aggiungere acido cloridrico fino a che la soluzione è acida alla cartina tornasole e dopo aggiungi 2ml di acido acetico. Alla fine diluire la soluzione a 1 litro di acqua distillata. Escludere la soluzione quando il colore finale non è più lungo di un blu e tende al verde.

Analisi dei campioni

1. Rimuovere il tappo dalla bottiglia Pyrex ed aggiungere 1 ml di solfato manganese, ponendo la pipetta giusto al di sotto del livello del campione. Subito dopo aggiungere 1ml di soluzione alcalina iodata. Richiudere immediatamente la bottiglia e mescolare il contenuto fino a che il precipitato idrossido manganese-manganico non risulta disperso in modo uniforme.

2. Quando il precipitato si è depositato (in 2-3 minuti) agitare nuovamente fino a che la parte solida risulta ben separata dalla soluzione. Lasciare il campione fino a quando il precipitato non si deposita completamente lasciando una soluzione supernatante chiara.

3. Aggiungere 1 ml di acido solforico concentrato, richiudere la bottiglia e mescolare così da sciogliere tutto il precipitato senza far entrare aria nella bottiglia.

4. Ad un'ora dall'acidificazione trasferire 50 ml di soluzione in un flacone conico colorato attraverso una pipetta. Titolare con una soluzione standard di tiosolfato 0.01N fino a quando non rimane un colore paglia molto pallido. Aggiungere 5 ml dell'amido indicatore e terminare la titolazione.

Calcoli

Sottrarre la correzione del bianco alla titolazione per ottenere la corretta titolazione, V ml, e calcolare il contenuto di ossigeno del campione dalla formula:

$$\text{mg-atomo O}_2/\text{L} = 0.1006 * f * V$$

nel caso in cui venga prelevata un'aliquota di 50 ml, oppure

$$\text{mg-atomo O}_2/\text{L} = (Y/Y-2) * 5.00/X * f * V$$

quando una aliquota X ml viene prelevata da una bottiglia Y-ml.

I millilitri di ossigeno presenti in un litro di acqua può essere calcolato come segue:

$$\text{ml O}_2(\text{NTP})/\text{L} = 11.20 * \text{mg-atomo O}_2/\text{L}$$

$$\text{mg O}_2/\text{L} = 16.00 * \text{mg-atomo O}_2/\text{L}$$

Calcolo del fattore f

Riempire una bottiglia Pyrex con acqua di mare o acqua distillata ed aggiungere 1ml di acido solforico concentrato, 1ml di soluzione iodata alcalina e mescolare. Alla fine aggiungere 1ml di solfato di manganese e mescolare di nuovo. Porre circa 50ml all'interno del contenitore per la titolazione e titolare con 0.1N tiosolfato sodico o 0.001 tiosolfato sodico.

Fare 3 o 5 repliche e calcolare il valore di f come:

$$f = 5.00/v$$

Clorofilla a

Apparecchiature

- Apparato per la filtrazione
- Pompa da vuoto
- Filtri in fibra di vetro Whatman GF/F 25 mm
- Provette da centrifuga da 10 ml
- Cilindri graduati da 1L
- Spettrofotometro

Procedura analitica

Preparazione dei reagenti

a. Acetone neutralizzato

Aggiungere all'acetone puro carbonato di sodio anidro in eccesso ed agitare vigorosamente. Filtrare, dopo almeno 24 ore, su carta da filtro e travasare nella spruzzetta.

b. Acetone neutro al 90 %

Mescolare 100ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone.

c. Acetone neutro all'80%

Mescolare 200ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone.

d. Acido cloridrico 0.66 mol/L

Versare lentamente e sotto agitazione 55 ml di acido cloridrico concentrato in 950 ml di acqua grado reagente.

Analisi dei campioni

Filtrare un volume noto (da 1 a 4L) di un campione d'acqua su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F (25 mm di diametro). Utilizzare una pompa da vuoto assicurandosi che la pressione sia di circa 150 mmHg, per evitare la rottura delle cellule vegetali ed il conseguente passaggio dei pigmenti attraverso il filtro.

Conservare i filtri in provette da 10 mL in 5mL di Acetone disidratato 100% (inibisce le clorofillasi) al buio ad una temperatura di -20°C (i pigmenti sono fotolabili e termolabili) se si desidera posticipare il dosaggio spettrofotometrico. Nel caso in cui questo venga effettuato subito dopo la filtrazione riporre le provette a 4°C.

Triturare i filtri con un pestello ed aggiungere un volume di Acetone 80% pari al volume di Acetone 100% con lo scopo di ottenere un estratto al 90%. Riporre i campioni ad una temperatura di circa 4°C per 24h per completare l'estrazione. Nel caso in cui il dosaggio spettrofotometrico venga effettuato subito dopo la filtrazione, riporre a 4°C per un'ora.

Centrifugare le provette chiuse per 15 minuti a 4000 giri/min in modo da separare il filtro dalla soluzione. Prelevare il sopranatante mediante pipetta e riempire la cuvette per la lettura allo spettrofotometro.

Procedere con la lettura dell'estratto allo spettrofotometro.

Calcoli

Tre sono i metodi più ampiamente utilizzati per la stima dei pigmenti fotosintetici:

- metodo della stima della clorofilla a (con feopigmenti) (Jeffrey & Humphrey, 1975);
- metodo per la stima delle clorofille a,b e c (Lorenzen & Jeffrey, 1980);
- metodo per la stima separata della clorofilla a e dei feopigmenti (Lorenzen, 1967).

3. MONITORAGGIO DELLA COLONNA D'ACQUA ATTRAVERSO CAMPIONAMENTI IN SITU

Le attività oggetto del presente capitolo sono relative alla realizzazione di campagne *in situ* per la raccolta di campioni di acqua durante la fase *post operam*, al fine di monitorare gli eventuali inquinanti e la torbidità nella colonna d'acqua relativi alle attività di dragaggio.

A tal fine verranno effettuate, nelle tre stazioni del transetto in Fig.3-1, campagne di misura con cadenza bimestrale per i quattro anni successivi al termine delle attività di dragaggio, per un totale di 72 campioni.

Sui suddetti campioni saranno effettuate le analisi dei seguenti parametri: coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali, salmonella, spore di clostridi solfito riduttori, enterovirus, idrocarburi totali, IPA, PCB, pesticidi organoclorurati, azoto totale; fosforo totale, alluminio, mercurio, cadmio, antimonio, arsenico, berillio, cromo, nichel, piombo, rame, selenio, vanadio, zinco, cianuri, composti organostannici, torbidità, ossigeno disciolto, clorofilla a.

Le procedure che verranno adottate per l'analisi dei parametri sopra indicati sono conformi ai metodi riportati nei Manuali e Linee Guida APAT/CNR IRSA n. 29/2003 e successivi aggiornamenti, nei Quaderni IRSA e in 'Metodologie Analitiche di Riferimento-Programma di Monitoraggio per il controllo dell'Ambiente marino costiero/ Triennio 2001.2003', MATTM, ICRAM, Roma 2001 e successivi aggiornamenti.



Fig.3-1 Piano di campionamento

Ad integrazione delle attività di campionamento previste dal monitoraggio della colonna d'acqua, verranno effettuati dei profili verticali mediante sonde multiparametriche dotate, tra l'altro, di sensore di torbidità, al fine di misurare le caratteristiche fisico-chimico-biologiche della colonna d'acqua. Verranno inoltre utilizzati dei modelli matematici di simulazione numerica al fine di evidenziare la propagazione di sostanze conservative e non conservative presenti nella colonna d'acqua, in modo da analizzare in maniera quasi sinottica i fenomeni che avvengono nel sistema costiero. I dati raccolti durante il monitoraggio dei dragaggi verranno utilizzati nell'ambito di specifiche indagini scientifiche finalizzate allo studio dell'interazione tra i processi chimico-fisici e quelli biologici in ambiente marino costiero. La localizzazione del transetto su cui verranno effettuati i campionamenti permetterà un'efficace analisi quali-quantitativa della distribuzione verticale e orizzontale delle variabili oceanografiche lungo un gradiente costa-largo. Le attività di ricerca potranno portare alla pubblicazione di articoli scientifici in riviste di rilievo nazionale ed internazionale.

3.1. Operazioni in mare

3.1.1 Modalità di campionamento

Le modalità di campionamento vengono di seguito descritte in funzione delle tipologie di parametri oggetto dell'analisi:

- parametri microbiologici (coliformi totali, coliformi fecali; streptococchi fecali; salmonella; spore di clostridi solfito riduttori, enterovirus): il prelievo dei campioni d'acqua verrà effettuato utilizzando contenitori sterili monouso; i campioni saranno prelevati nello strato d'acqua superficiale (come da normativa vigente per le acque di balneazione);
- parametri organici (idrocarburi totali, IPA; PCB, pesticidi organoclorurati, composti organostannici): il prelievo dei campioni d'acqua verrà effettuato utilizzando una bottiglia in vetro; i campioni saranno prelevati nello strato d'acqua superficiale;
- azoto totale e fosforo totale: il prelievo dei campioni d'acqua verrà effettuato utilizzando una bottiglia Niskin; i campioni saranno prelevati nello strato d'acqua superficiale ;
- metalli pesanti e composti inorganici (alluminio, mercurio, cadmio, antimonio, arsenico, berillio, cromo, nichel, piombo, rame, selenio, vanadio, zinco, cianuri): il prelievo dei

campioni d'acqua verrà effettuato utilizzando una bottiglia Niskin; il campione ottenuto sarà dato da una media di più prelievi effettuati lungo la colonna d'acqua;

- clorofilla a, solido sospeso, ossigeno disciolto: al fine di calibrare la sonda multiparametrica verranno prelevati dei campioni puntuali ad una quota fissa, tramite bottiglia Niskin.

Di seguito si riportano le procedure di campionamento che verranno adottate per l'analisi dei parametri indicati nel capitolo 1.

Coliformi totali

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 100 ml all'interno di un recipiente sterile.

Coliformi fecali

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 100 ml all'interno di un recipiente sterile.

Streptococchi fecali

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 100 ml all'interno di un recipiente sterile.

Salmonella

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 1000 ml all'interno di un recipiente sterile.

Spore di clostridi solfito-riduttori

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 100 ml all'interno di un recipiente sterile.

Enterovirus

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di almeno 10 L all'interno di un recipiente sterile. Per campioni di tali dimensioni si può provvedere ad una concentrazione preliminare direttamente su campo (concentrazione primaria) e trasportare in laboratorio, in condizioni refrigerate, la membrana o cartuccia utilizzata che va successivamente eluita in laboratorio (concentrazione secondaria).

Idrocarburi totali

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline. I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro a collo e tappo smerigliato.

IPA

Il campionamento e la conservazione del campione vengono eseguiti rispettando le norme generali riportate nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA. Il campionamento deve essere effettuato in bottiglie di vetro della capacità 1-2 L. Le bottiglie e i tappi (possibilmente con sotto-tappi in teflon) devono essere risciacquati con acetone e seccati prima dell'uso.

PCB

I campioni devono essere prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1L, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Prima del riempimento, le bottiglie (precedentemente lavate in laboratorio con acqua distillata e quindi con esano ed acetone) devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. Occorre evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. È buona norma campionare almeno due aliquote per ciascun campione.

Pesticidi organoclorurati

I campioni vanno prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1 L con chiusura a smeriglio oppure a vite. Prima del riempimento le bottiglie devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. Evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. È buona norma prelevare due aliquote per ciascun campione.

Azoto e fosforo totali

Tutti i contenitori per il campionamento dell'Azoto e del Fosforo totali devono essere lavati accuratamente, trattati con acido cloridrico diluito (10%) e risciacquati con acqua grado reagente prima dell'uso. Il campione viene raccolto direttamente dalla bottiglia primaria di campionamento ed introdotto in contenitori plastici in polietilene ad alta densità (HDPE), in teflon o borosilicato con tappo a tenuta e di volume di 200 ml. Prima della raccolta del campione i contenitori vengono avvinati 2-3 volte con il campione stesso.

Metalli pesanti

Per l'analisi dei metalli pesanti il campionamento viene eseguito rispettando le norme generali riportate nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA, in base alla procedura indicata per ciascun analita.

Cianuri

Il prelievo e la conservazione dei campioni per l'analisi dei cianuri vengono effettuati in accordo con quanto riportato nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA.

Composti organostannici

La raccolta dei campioni in campo va effettuata attraverso l'utilizzo di bottiglie di vetro da 3 o 4 L che dovranno poi essere sigillate con parafilm.

Torbidità

Il campione d'acqua per la determinazione dei solidi sospesi viene prelevato dalla bottiglia di campionamento e travasato in bottiglie di plastica da 2L. E' necessario avvinare le bottiglie due volte prima della raccolta del campione.

Ossigeno disciolto

Il prelievo per la determinazione dell'ossigeno disciolto viene effettuato ponendo il tubo della bottiglia Niskin alla base di una bottiglia di pyrex da 60-90 ml con tappo smerigliato a becco di flauto o a terminazione troncoconica arrotondata. E' necessario avvinare due volte la bottiglia prima della raccolta del campione e riempire la bottiglia completamente evitando di far rimanere aria all'interno.

Clorofilla a

Il campione d'acqua da prelevare per la determinazione della concentrazione di *Clorofilla a* viene travasato dalla bottiglia di campionamento in una bottiglia di plastica scura da 5L, interponendo il retino da plancton in modo da trattenere lo zooplankton e le macroalghe eventualmente presenti. E' necessario avvinare la bottiglia due volte prima della raccolta del

campione.

3.1.2 Conservazione dei campioni

Di seguito si riportano le modalità di conservazione dei campioni, che verranno adottate per l'analisi dei parametri sopra riportati.

Coliformi totali

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni prelevati per l'analisi dei coliformi totali siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 12 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi dei Coliformi dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Coliformi fecali

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni per l'analisi dei coliformi fecali siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 12 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi dei Coliformi dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Streptococchi fecali

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni per l'analisi degli streptococchi fecali siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 12 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi degli Streptococchi dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Salmonella

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 12 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi di Salmonella dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Spore di clostridi solfito-riduttori

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C.

Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 48 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi dei batteri e spore di Clostridi solfito-riduttori dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Enterovirus

Il trasporto della membrana o cartuccia utilizzata per la concentrazione del campione deve avvenire nel più breve tempo possibile e in condizioni refrigerate. Il campione deve essere concentrato al suo arrivo in laboratorio o conservato a circa +4°C sino al momento dell'esame (massimo 24 ore, tempo massimo consigliato per l'analisi di Enterovirus dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Idrocarburi totali

Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con Acido Cloridrico diluito 1:1 e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a +4°C.

IPA

Il campionamento e la conservazione del campione vengono eseguiti rispettando le norme generali riportate nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA. I campioni vanno conservati al buio ed in frigorifero a +4°C fino al momento delle operazioni di estrazione, le quali devono essere effettuate il più presto possibile e comunque non oltre 48 ore.

PCB

Il campionamento e la conservazione del campione vengono eseguiti rispettando le norme generali riportate nella sezione “Metodi di Campionamento” (Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA). I campioni possono essere conservati in frigorifero per una settimana; eventuali degradazioni microbiche possono essere bloccate dall'aggiunta di acido cloridrico concentrato (1

mL/L di campione).

Pesticidi organoclorurati

I campioni possono essere conservati in frigorifero per una settimana. Eventuali degradazioni microbiche possono essere bloccate dall'aggiunta di acido cloridrico concentrato (1 mL/L di campione); è comunque necessario accertare in via preliminare che l'aggiunta di acido cloridrico non causi alterazioni quali-quantitative di altri composti eventualmente contenuti nel campione da analizzare.

Azoto e Fosforo Totali

Tutti i contenitori e le attrezzature da laboratorio utilizzate per il campionamento dell'Azoto e del Fosforo totali devono essere lavati accuratamente, trattati con acido cloridrico diluito (10%) e risciacquati con acqua grado reagente prima dell'uso. Una volta raccolti, i campioni vengono congelati immediatamente a -20°C , fino all'analisi in laboratorio. La loro conservazione può protrarsi anche per diversi mesi senza causare alterazione dei risultati.

Metalli pesanti

La conservazione dei campioni per l'analisi dei metalli pesanti viene eseguita rispettando le norme generali riportate nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA, in base alla procedura indicata per ciascun analita.

Cianuri

Il prelievo e la conservazione del campione per l'analisi dei cianuri devono essere effettuati in accordo con quanto riportato nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA. La conservazione del campione viene effettuata aggiungendo al campione una soluzione concentrata di NaOH (10 M) fino a $\text{pH} \approx 12$. È bene conservare il campione in bottiglia ben chiusa e in luogo fresco e buio.

Composti organostannici

L'elevata tendenza alla degradazione dei composti organostannici rende necessaria la conservazione del campione in opportune condizioni. Per minimizzare tale rischio è necessario

conservare i campioni a +4°C immediatamente dopo il loro prelievo ed analizzarli entro 24 ore.

Torbidità

I campioni d'acqua prelevati dalla bottiglia di campionamento vengono riposti in contenitori di plastica da 2L. E' necessario analizzare i campioni nel più breve tempo possibile al fine di ridurre al minimo la possibilità di variazioni chimiche o fisiche o biologiche durante la conservazione.

Ossigeno disciolto

L'analisi per la determinazione della concentrazione dell'ossigeno disciolto dovrà essere effettuata entro un'ora dal campionamento. Nel caso in cui si renda necessaria una posticipazione delle attività di laboratorio i campioni prelevati in situ verranno fissati mediante l'aggiunta di manganese solfato e potassio iodato.

Clorofilla a

La conservazione dei campioni prelevati per la determinazione della concentrazione di *Clorofilla a* viene effettuata ponendo le bottiglie di raccolta del campione al fresco, lontano dai raggi solari, fino al momento della filtrazione, che dovrà avvenire non oltre le 6-8 ore successive alla raccolta del campione.

3.2 Operazioni in laboratorio

Di seguito si riportano le attività di laboratorio ed i metodi di riferimento adottati per l'analisi dei parametri sopra riportati

Coliformi totali

La tecnica utilizzata per l'analisi dei coliformi totali è quella del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) riportata nei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Tale metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, permette di calcolare la densità dei coliformi totali in campioni di acqua tramite una stima statistica, determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti

inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- reattivi e terreni di coltura;
- brodo Lattosato (per la prova presuntiva);
- brodo Lattosato Bile Verde Brillante (per la prova di conferma).

Procedura analitica

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua. Si articola in due prove, una “presuntiva” e una “di conferma”.

Prova presuntiva

- Agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell’acqua.
- Seminare aliquote scalari del campione (e/o sue diluizioni) in più serie di matracci o tubi multipli contenenti terreno colturale liquido (Brodo Lattosato).
- Dopo l’inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all’incubazione in termostato a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ entro 30 minuti.
- Dopo 24 ± 2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore.
- Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo.
- La produzione di gas entro le 48 ± 3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva: sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

Prova di conferma

- Prelevare sterilmente 0.1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo della prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo Lattosato Bile Verde Brillante per la prova di conferma.
- Incubare i tubi a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per $24+24$ ore.
- Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una

reazione positiva per i coliformi totali. Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi.

Calcoli

Sulla base delle combinazioni ottenute, il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$MPN / 100 ml = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{ml di campione nei tubi negativi} \cdot \text{ml di campione in tutti i tubi}}}$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, consultando la tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Essa riporta il valore dell'indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemenzati con l'acqua in esame.

Il risultato ottenuto va riportato come valore MPN/100 mL di campione (numero più probabile di microrganismi per volume di campione).

Coliformi fecali

La tecnica utilizzata per l'analisi dei coliformi fecali è quella del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) riportata nei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Tale metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, permette di calcolare la densità dei coliformi fecali in campioni di acqua tramite una stima statistica, determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- reattivi e terreni di coltura:
- brodo Lattosato (per la prova presuntiva);
- EC Medium (per la prova di conferma).

Procedura analitica

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua. Si articola in due prove, una “presuntiva” e una “di conferma”.

Prova presuntiva

Agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell’acqua. Seminare aliquote scalari del campione (e/o sue diluizioni) in più serie di matracci o tubi multipli contenenti terreno colturale liquido (Brodo Lattosato).

Dopo l’inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all’incubazione in termostato a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ entro 30 minuti. Dopo 24 ± 2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48 ± 3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva: sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

Prova di conferma

Prelevare sterilmente 0.1 mL di brodo-coltura dai tubi positivi del brodo della prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il brodo per la prova di conferma (EC-Medium). Incubare i tubi a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi fecali. Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi. Sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003, calcolare, considerando l’eventuale diluizione, il valore dell’indice MPN.

Calcoli

Sulla base delle combinazioni ottenute, il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$MPN / 100 ml = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{ml di campione nei tubi negativi} \cdot \text{ml di campione in tutti i tubi}}}$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, dalla tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Essa riporta il valore dell'indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemminati con l'acqua in esame.

Il risultato ottenuto va riportato come valore MPN/100 ml di campione (numero più probabile di microrganismi per volume di campione).

Streptococchi fecali

La tecnica utilizzata per l'analisi degli streptococchi fecali è quella del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) riportata nei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Con questo metodo è calcolata la densità degli streptococchi/enterococchi in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- reattivi e terreni di coltura;

- brodo all’Azide Destrosio (per la prova presuntiva);
- brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio (per la prova di conferma).

Procedura analitica

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua. Si articola in due prove, una “presuntiva” e una “di conferma”.

Prova presuntiva

Agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell’acqua. Seminare aliquote scalari del campione (e/o sue diluizioni) in più serie di matracci o tubi multipli contenenti terreno colturale liquido (Brodo all’Azide Destrosio). Dopo l’inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all’incubazione in termostato a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ entro 30 minuti per 48 ± 3 ore. Dopo incubazione, agitare ciascun tubo per verificare la presenza di torbidità (risultato positivo). Quindi registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano intorbidimento del brodo e sottoporre i tubi positivi alla prova di conferma.

Prova di conferma

Prelevare sterilmente 0.1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo della prova presuntiva (torbidità entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio per la prova di conferma. Incubare i tubi a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per $24+24 (\pm 3)$ ore. Alla fine del periodo di incubazione, considerare positivi i tubi che presentano intorbidimento accompagnato da un deposito grigio-violetto sul fondo del tubo. Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la tabella 1 riportata nella Sezione 6020 dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA, calcolare il valore dell’indice MP.

Calcoli

Sulla base delle combinazioni ottenute, il risultato si ottiene calcolando il valore dell’indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$MPN / 100 \text{ ml} = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{ml di campione nei tubi negativi} \cdot \text{ml di campione in tutti i tubi}}}$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, dalla tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Essa riporta il valore dell’indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemenzati con l’acqua in esame. Il risultato ottenuto va riportato come valore MPN/100 ml di campione (numero più probabile di microrganismi per volume di campione).

Salmonella

Il metodo che verrà adottato per l'analisi della concentrazione di batteri del genere *Salmonella* è quello riportato nel Manuale APAT – IRSA/CNR 29/2003 “Metodi Analitici per le acque”. La tecnica utilizzata consente di valutare la Presenza/Assenza di microorganismi appartenenti al genere *Salmonella* in un determinato volume noto di acqua. Consiste in una serie di fasi successive che possono comprendere prearricchimento, arricchimento, isolamento ed eventualmente, conferma biochimica e conferma sierologica.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio
- Reattivi e terreni di coltura:
- Substrato di prearricchimento: Acqua Peptonata Tamponata;
- Substrato di arricchimento → Scegliere tra:
 - Brodo di arricchimento di Rappaport Vassiliadis;
 - Brodo di base al Tetrationato ;
- Substrati di isolamento → Scegliere tra:
 - Hektoen Enteric Agar;
 - Xilosio Lisina Desossicolato;
 - Rambach Agar;

- Substrato di crescita: Triptone Soia Agar (Prova citocromossidasi);
 - Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato:
 - Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%;
- Substrato per la prova della fermentazione dei carboidrati:
 - Agar al ferro di Kligler;
- Substrato per la prova della decarbossilazione della lisina;
 - Agar al ferro e lisina.

Procedura analitica

Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo; è una fase che può essere omessa sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti modifiche dei risultati ottenuti. La procedura di seguito riportata tuttavia propone lo svolgimento di tutte le fasi.

- Filtrare 1000 mL di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 μm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se è necessario per presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane.
- Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua Peptonata Tamponata contenuta in beuta e incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

Fase di arricchimento

- Eseguire l'inoculo di un'aliquota del campione in Brodo di arricchimento di Rappaport Vassiliadis;
- Incubare il Brodo di Rappaport Vassiliadis a $42\pm 1^\circ\text{C}$ per 24+24 ore.

Fase di isolamento ed identificazione delle colonie

- Dal brodo di arricchimento eseguire, prelevando un'ansata, 2 subcolture per strisci multipli sui terreni di isolamento: la prima dopo 24 ± 2 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ± 2 ore.
- Incubare le piastre a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.
- Su Hektoen Enteric Agar le colonie sospette di Salmonella si presenteranno verdi con margini

netti con o senza centro nero, su Xilosio Lisina Desossicolato le colonie sospette di Salmonella si presenteranno rosse con centro nero, lucide, convesse e con margini netti, su Rambach Agar il 97-99% delle colonie di Salmonella si presentano rosse (*S. paratyphi* e *S. typhi* cresceranno invece come colonie incolori. Alcuni stipiti di Pseudomonas possono crescere come colonie rosse; tuttavia la loro presenza può essere messa in evidenza con la prova della citocromossidasi).

Conferma biochimica

Qualora si ritenga opportuno, è possibile procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere Salmonella delle colonie sospette eseguendo la prova della citocromossidasi, della fermentazione dei carboidrati e della decarbossilazione della lisina (metodi APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003).

Successivamente l'identificazione biochimica può essere completata con i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.

Prima di effettuare ciascuna prova è opportuno, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar e incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 2 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

a. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere Salmonella da quelli appartenenti al genere Pseudomonas che possono produrre colonie simili sul terreno di isolamento. Le salmonelle sono ossidasi-negative.

Dal terreno Triptone Soia Agar prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia cresciuta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro 10 secondi una colorazione blu-violetto.

b. Prova della fermentazione dei carboidrati

Dal terreno Triptone Soia Agar prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kligler. Incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo 18-24 ore

di incubazione. Per la interpretazione dei risultati si devono annotare le reazioni riportate nel metodo 7080 del manuale APAT – IRSA/CNR – 29/2003 “Metodi Analitici per le Acque”.

c. Prova della decarbossilazione della lisina

Dal terreno Triptone Soia Agar prelevare con un’ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro e lisina. Incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

I microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* producono una reazione alcalina (violetta) sia del becco, sia del cilindro; una colorazione gialla (acida) indica una reazione negativa. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno.

Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica.

Calcoli

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella*, Assente o Presente nel volume esaminato e, se del caso, il sierotipo individuato.

Spore di clostridi solfito riduttori

La tecnica che verrà adottata per la determinazione delle spore di clostridi solfito-riduttori è quella del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) riportata nel manuale APAT – IRSA/CNR “Metodi Analitici per le acque”– 29/2003. Il metodo consente di valutare la concentrazione delle spore dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* presenti in campioni d’acqua preventivamente trattati al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, favorendo contemporaneamente la germinazione delle forme sporali. La stima statistica è determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno culturale.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- Giara per anaerobiosi;
- Reattivi e terreni di coltura: 1 a scelta tra
 - Agar al Triptone Solfito e Neomicina;
 - Olio di vaselina sterile;
 - Agar nutritivo base al sangue di coniglio;
 - Sangue defibrinato di coniglio;
 - Agar Columbia con 5% di sangue di montone;
 - Perossido di idrogeno 3%.

Procedura analitica

Pretrattamento del campione

- Mantenere il campione per 15 ± 1 minuti a $75 \pm 5^\circ\text{C}$ in bagno termostato per l'inattivazione delle forme vegetative;
- Raffreddare il campione sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

Isolamento

- Inoculare aliquote del campione in concentrazioni scalari in tubi contenenti il terreno;
- Effettuare l'inoculo nei tubi con il terreno disciolto e mantenuto tale alla temperatura di circa 45°C , avendo cura di distribuire bene il campione nel terreno evitando la formazione di bolle d'aria;
- Lasciar raffreddare ed aggiungere in ogni tubo alcuni millilitri di olio di vaselina;
- Incubare a $46 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

Conteggio ed identificazione delle colonie

- Considerare positivi i tubi con crescita di colonie nello spessore dell'agar che provocano annerimento del terreno.

Conferma

- Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Clostridium*, è necessario eseguire sulle colonie rilevate la colorazione di Gram e la prova della catalasi (metodi APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003).

Calcoli

Sulla base delle combinazioni ottenute, il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$MPN / 100 ml = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{ml di campione nei tubi negativi} \cdot \text{ml di campione in tutti i tubi}}}$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, dalla tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Essa riporta il valore dell'indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemenzati con l'acqua in esame.

Il risultato ottenuto va riportato come valore MPN/100 ml di campione (numero più probabile di microrganismi per volume di campione).

Dal numero di colonie caratteristiche contate e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di spore di clostridi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula :

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t}$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V_t = volume (mL) di campione analizzato;

V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

F = fattore di diluizione.

Enterovirus

Il metodo che verrà adottato per la determinazione degli Enterovirus è il metodo 7120 del Manuale APAT – IRSA/CNR– 29/2003, “Metodi Analitici per le acque”.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- apparecchi per la produzione di acqua ultrapura;
- apparecchio per la produzione di acqua ultrapura per colture cellulari;
- bagnomaria;
- cappe a flusso laminare tipo “biohazard”;
- centrifughe refrigerate a 6.000 rpm e 20.000 rpm;
- congelatori -20°C e -80°C ;
- contenitori per azoto liquido;
- microscopio rovesciato;
- sistema di filtrazione per membrane piane di diverso diametro e relativa pompa da vuoto;
- sistema di ultrafiltrazione;
- termostati.
- Reattivi e terreni di coltura:
 - Sodio tiosolfato;
 - Estratto di carne al 3% pH 7,2 (2.2a) e pH 9,5 (2.2b);
 - Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,1M;
 - Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,1M;
 - Soluzione di Formaldeide allo 0,1%;
 - Soluzione salina fosfatata con o senza Calcio e Magnesio (PBS);
 - Soluzione fosfato di sodio bibasico anidro (Na_2HPO_4) allo 0,15 M pH 7,2;
 - Soluzione di polietilenglicol 6000 (PEG) al 50% (p/v);
 - Agar all'1,8%;
 - Soluzione di Rosso neutro all'1%;
 - “Pool” di antibiotici;

- Terreni per colture cellulari.

Procedura analitica

Procedura di filtrazione e concentrazione del campione

Filtrazione su membrane piane o cartuccia a carica superficiale elettropositiva (operano in un campo di pH estremamente ampio, non necessitano di preacidificazione ed aggiunta di sali, e possono essere collegate ad una pompa per la filtrazione del campione direttamente su campo).

a. Procedura di concentrazione primaria

Fase in campo

Montare la cartuccia e/o membrana a carica superficiale elettropositiva nell'apposito supporto e collegare direttamente il contenitore al rubinetto di prelievo o alla pompa.

Regolare il flusso d'acqua in uscita, in base alle indicazioni della casa produttrice le membrane e/o cartucce, applicando un regolatore del flusso idrico in entrata. In uscita è consigliabile applicare un contalitri. Dopo il prelievo, mettere la cartuccia e/o membrana in una busta di plastica ed etichettarla indicando luogo, data del prelievo e il volume filtrato. Porre la cartuccia in una borsa termica o in frigorifero portatile sino al ritorno in laboratorio.

Fasi in laboratorio

Eluizione del virus adsorbito alla cartuccia e/o membrana:

In laboratorio è preferibile eluire la cartuccia e/o membrana immediatamente o comunque entro le 24 h conservandola a circa +4°C. L'eluente utilizzato per favorire il distacco del virus dal supporto solido può essere variato secondo le proprie necessità. Per eluire correttamente una cartuccia da 10 pollici sono necessari 1,2-1,5 L di eluente in ricircolo continuo con l'ausilio di una pompa da laboratorio (in breve, va collegata l'uscita della pompa all'entrata del contenitore per cartucce. Il tubo di entrata della pompa deve pescare nella beuta contenente l'eluente. A sua volta l'uscita del contenitore deve ritornare, mediante un tubo flessibile, alla beuta). Far fluire l'eluente per almeno 15 minuti e alla fine raccoglierlo svuotando completamente la cartuccia. Per membrane piane da 142 mm verranno utilizzati 90 mL di eluente facendolo passare lentamente goccia a goccia.

Neutralizzare l'eluato con acido cloridrico (HCl) prestando attenzione che il pH sia intorno a $7,0 \pm 0,2$.

b. Procedura di concentrazione secondaria

Al fine di ridurre il volume da seminare su colture cellulari, che deve essere estremamente ridotto, è necessario procedere ad una seconda fase di concentrazione che può differenziarsi secondo i virus che si intendono ricercare o dell'eluente utilizzato per eluire la cartuccia e/o membrana. La stessa metodica descritta nella prima fase di concentrazione (cartuccia o membrana elettropositiva) può essere anche utilizzata nella seconda fase, utilizzando membrane o cartucce di superficie inferiore. Altri sistemi prevedono una precipitazione degli enterovirus eventualmente presenti. Le tre metodiche più comunemente utilizzate sono: l'ultrafiltrazione, la flocculazione organica e la precipitazione con Polietilenglicol 6000. Una di queste tre metodiche, come consigliato dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003 “Metodi Analitici per le acque”, verrà utilizzata in questa fase.

Isolamento ed identificazione di enterovirus

Le tecniche utilizzate in questa fase sono legate alla diversa tipologia degli enterovirus.

Alcuni virus, capaci di moltiplicarsi su sistemi cellulari, sono in grado di indurre un tipico effetto citopatico (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus), altri (Epatite A) possono moltiplicarsi senza indurre alcuna alterazione evidente. In quest'ultimo caso la loro presenza può essere svelata solo con tecniche immunologiche (immunofluorescenza diretta o indiretta, “test” immunoenzimatici, “test” radioimmunologici) o di biologia molecolare (ibridazione, reazione a catena della polimerasi).

a. Colture cellulari

Le linee cellulari da utilizzare sono diverse per i diversi tipi di virus. Sono classificabili in tre gruppi: cellule di primo espanto, linee cellulari continue e cellule diploidi.

Le cellule vengono fatte crescere su supporti solidi (fiasche) in plastica speciale per colture cellulari di dimensioni variabili da 12,5 cm² sino a 175 cm², o in “roller” (fiasche tonde in rotazione continua) da 500 cm² (le cellule possono essere anche coltivate in tubi, in piastre da 2 a 96 pozzetti o in capsule di Petri in genere da 45 a 90 mm di diametro).

I monostrati cellulari ad intervalli regolari e variabili, secondo le diverse linee cellulari, devono essere separati nelle loro singole cellule da utilizzare per la preparazione di altri monostrati cellulari.

I campioni comunque concentrati presentano una notevole quantità di batteri che debbono essere eliminati prima dell'inoculo su cellule.

Inoculare 0,5 mL di campione per fiasche da 25 cm² ed aggiungere uguale volume di terreno di mantenimento (diluizione finale 1:2). La quantità di campione che può essere inoculato su monostrati cellulari dipende strettamente dalla tossicità del campione ed in alcuni casi è consigliabile ricorrere a diluizioni superiori (1:7-1:10).

L'isolamento su monostrato cellulare può essere effettuato, dopo inoculo del campione sul monostrato cellulare e successivo adsorbimento del virus, aggiungendo terreno per colture cellulari in soluzione liquida o addizionato ad agar.

b. Isolamento di virus che non provocano effetto citopatico: sistemi immunologici e tecniche di biologia molecolare

Alcuni virus, come l'Epatite A, crescono con estrema difficoltà e con tempi di incubazione lunghi anche diverse settimane. Questi possono essere messi in evidenza con tecniche immunologiche di immunofluorescenza diretta o indiretta, “radio-immuno focus assay” (RIFA) e tecniche immunoenzimatiche (ELISA) dove l'anticorpo specifico verso un determinato antigene è adeso alla fase solida (piastre per “test” ELISA a 96 pozzetti).

Ogni “test” deve sempre comprendere controlli negativi e controlli positivi. Un'altra possibilità per identificare questi virus è fornita dalle tecniche di biologia molecolare, applicabili sia al campione concentrato che dopo passaggio su cellule. Tali sistemi comprendono le sonde molecolari o “probes” sia a DNA sia a RNA (“test” di ibridazione) e la reazione a catena della polimerasi (“Polymerase Chain Reaction”, PCR). Uno di questi metodi, consigliati dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003 “Metodi Analitici per le acque”, verrà utilizzato per identificare la presenza di questo tipo di enterovirus.

Calcoli

La procedura descritta permette di determinare la presenza di Enterovirus sia attraverso tecniche qualitative, che danno un'indicazione della sola presenza o assenza dei virus, che quantitative, effettuando il conteggio in un volume noto di acqua delle Unità Formanti Placche (UFP/Volume).

Idrocarburi totali

Il metodo utilizzato per l'analisi degli idrocarburi totali è il Metodo 5160 del Manuale APAT – IRSA/CNR– 29/2003, “Metodi Analitici per le acque”. Il metodo di riferimento per l'analisi degli idrocarburi totali è il Metodo 5160 del Manuale APAT – IRSA/CNR– 29/2003. Esso propone la tecnica gravimetrica per concentrazioni superiori a 10 mg/L e quella spettrofotometrica all'infrarosso, di cui si riporta la procedura analitica, per basse concentrazioni (> 0.05 mg/L).

Apparecchiature

- Normale attrezzatura di laboratorio.
- Bottiglia di campionamento in vetro a collo largo, da 500-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione in teflon.
- Imbuti separatori di volume adeguato, muniti di rubinetto e tappo in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro dello stesso volume con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon.
- Spettrofotometro FT-IR o IR, doppio raggio, munito di celle in quarzo con cammino ottico di 1 cm e di 4 cm.
- Colonnine di percolazione in vetro, d.i. 10 mm, con rubinetto in teflon.
- Bilancia analitica.
- Bilancia tecnica.

Procedura analitica

Ottimizzazione delle condizioni strumentali

Lo spettrofotometro IR (o FT-IR) rimane normalmente acceso anche nel caso di prolungata inattività. Prima di avviare il ciclo di misure, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli di riferimento.

Taratura

Quando la natura dell'inquinante è nota, è auspicabile impiegare per la taratura lo stesso composto, preparando soluzioni diluite in 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Tuttavia, poiché nella

maggior parte dei casi la natura della miscela di idrocarburi presente nel campione non è nota, si ricorre ad una miscela di riferimento. Per molti anni si è utilizzata come soluzione di riferimento una miscela di esadecano (37,5%), iso-ottano (37,5%) e benzene (25%). Tuttavia, la maggiore attenzione prestata in questi ultimi anni alle problematiche concernenti la salute degli operatori addetti al controllo, in particolar modo in presenza di sostanze, come il benzene, di accertata cancerogenicità, suggerisce di eliminare, in accordo con quanto previsto dal metodo ASTM, il benzene dalla suddetta miscela. Tale eliminazione ha, peraltro, scarsa rilevanza sul piano della qualità del dato ottenuto in quanto i diversi protocolli di riferimento prevedono la misura dell'assorbanza in una regione dello spettro IR in cui il benzene non fornisce alcun contributo (come altezza di picco a 2930 cm^{-1} o come area integrata nell'intervallo $3015\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$).

Alla luce delle considerazioni esposte si suggerisce l'impiego di una soluzione di riferimento costituita da n-esadecano (50% in volume) e iso-ottano (50% in volume).

Registrare lo spettro IR delle soluzioni diluite nella regione compresa tra 3200 cm^{-1} e 2700 cm^{-1} utilizzando il 1,1,2-triclorotrifluoroetano come riferimento. Misurare l'integrale dell'area sottesa dai picchi compresi nella regione $3015\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$.

Trattamento del campione

Estrazione: Trasferire un quantitativo noto del campione in esame, compreso tra 0,5 L e 2,0 L, in adatto imbuto separatore e procedere all'aggiunta di 5 mL di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤ 2 , in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1. Aggiungere, operando sotto cappa, 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano con cui si è lavata la bottiglia di raccolta del campione e, qualora sia stata usato, il contenitore in vetro dell'apposito dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Lasciare separare le due fasi e far percolare la fase organica attraverso una colonnina di vetro, munita di rubinetto in teflon e riempita con 0,5 g di gel di silice e 0,3 g di Na_2SO_4 disposti su strati sovrapposti.

La colonnina va preventivamente lavata con 1,1,2-triclorotrifluoroetano e l'eluato analizzato all'IR per controllare l'assenza di bande idrocarburiche nell'intervallo spettrale di interesse analitico. Generalmente sono sufficienti per il lavaggio 15 mL. Raccogliere il percolato in un matraccio tarato da 50 mL, avendo cura di scartare i primi 2 mL circa. Ripetere l'estrazione con altri 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano; l'estratto, assieme alle tracce di emulsione eventualmente

presenti, viene percolato attraverso la colonnina e raccolto nello stesso matraccio precedente. Portare a volume a 50 mL.

Analisi

Effettuare uno spettro preliminare per rendersi conto dell'ordine di grandezza del valore di area da misurare. Registrare lo spettro IR della soluzione ottenuta dall'estrazione del campione seguendo le modalità già indicate per le soluzioni diluite.

Misurare l'area sottesa dai picchi compresi nella regione 3015-2800 cm⁻¹.

Calcoli

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le quantità (in mg) delle soluzioni diluite in ascissa e le unità di area corrispondenti in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

La concentrazione di idrocarburi totali viene ricavata dalla seguente formula:

$$C = \frac{A \cdot f}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di idrocarburi totali;

A = quantità (mg) ricavata utilizzando l'equazione della retta di regressione;

f = fattore di diluizione (eventuale) dell'estratto;

V = volume (L) di campione.

IPA

Apparecchiature

Normale vetreria di laboratorio che dopo il lavaggio deve essere sciacquata con acqua bidistillata, con acetone e seccata prima dell'uso e comprende:

- Bottiglie di vetro da 1 o 2 L;
- Imbuti separatori di vetro Pyrex di varie capacità con rubinetto e tappi di teflon;
- Matracci e pipette (classe A) di varie capacità ed accuratamente pulite;
- Flaconi di vetro di varie capacità con tappi in gomma teflonata;
- Microsiringhe per liquidi di varie capacità;

- Palloni da 250 mL in Pyrex con cono normalizzato;
- Bilancia analitica;
- Evaporatore rotante;
- Colonne per cromatografia in vetro (1 cm d.i., 30 cm lunghezza) dotate di setto poroso G0, rubinetto in teflon e serbatoio da 50 mL;
- Gascromatografo, equipaggiato con colonne capillari e rivelatore a selezione di massa con sistema di integrazione dati (HRGC/LRMS).

In alternativa può essere utilizzato l'HPLC che consiste in uno strumento dotato di rivelatore UV (a lunghezza d'onda variabile) e/o fluorescenza e di colonna a fase inversa. La fase mobile è costituita da una miscela di acetonitrile/acqua o metanolo/acqua. L'analisi viene effettuata in gradiente la cui composizione e durata, così come il flusso di lavoro, dipende dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

- Colonna capillare per GC e colonna per HPLC.

Procedura analitica

Estrazione

a. Estrazione liquido/liquido

Trasferire quantitativamente il campione di acqua in un imbuto separatore da 2 L. Risciacquare accuratamente la bottiglia con 50 mL di diclorometano.

Aggiungere il riferimento interno 0,1 mL (SI acetone) agitando per una accurata distribuzione.

Aggiungere il solvente di estrazione diclorometano (50 mL), agitare vigorosamente per 2 minuti.

Lasciare decantare e trasferire l'estratto ottenuto in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione altre due volte con uguali aliquote di solvente (50÷60 mL). Riunire gli estratti e anidrificarli con solfato di sodio anidro.

Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) l'estratto organico con evaporatore rotante; la temperatura del bagno termostatico non deve essere superiore a 40°C.

Dopo aver concentrato l'estratto a circa 1 mL sotto flusso di azoto trasferirlo quantitativamente in una fiala da 4 mL con diclorometano.

Fare attenzione durante le fasi di concentrazione a non andare a secco con l'estratto per non perdere gli IPA più volatili.

b. Estrazione su fase solida

Gli analiti vengono estratti tramite estrazione su fase solida (SPE) utilizzando Empore disk C18 (o cartuccia C18). Lavare il disco con 10 mL di diclorometano e condizionarlo aggiungendo metanolo (10 mL) sotto vuoto. Rimuovere l'eccesso di solvente con acqua esente da contaminanti organici (10 mL). Far passare 2 litri di campione contenente 10 mL di metanolo attraverso il disco sotto un vuoto di 10 cm di Hg. Durante questa operazione è necessario prevenire che il disco vada a secco controllando il vuoto e chiudendolo al momento opportuno.

Alla fine della filtrazione, far passare aria attraverso la membrana per alcuni minuti per rimuovere l'eccesso di acqua. Eluire gli analiti facendo passare diclorometano (10 mL) con un vuoto moderato (circa 0,5 cm di Hg). Raccogliere l'eluato in provetta graduata e concentrare sotto flusso di azoto a temperatura ambiente a piccolo volume (esattamente misurato). Purificazione dell'estratto su colonna di gel di silice

Purificazione dell'estratto su colonna di gel di silice

a. Preparazione della fase stazionaria

Purificare il gel di silice con diclorometano in Soxhlet per 12 ore. Evaporare il solvente residuo con evaporatore rotante e successivamente in stufa a 35°C. Attivare il gel di silice in stufa a 250°C per 16 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto. Attivare il sodio solfato a 400°C per 8 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto. Le fasi stazionarie, conservate in essiccatore sotto vuoto, sono attive per 5 giorni.

b. Preparazione della colonna cromatografica

Pesare in una beuta da 50 mL, munita di tappo smeriglio, 6,0 g di gel di silice, aggiungere 5 mL di una miscela esano/acetone 8:2 (v:v) e chiudere la beuta. Agitare e lasciare la beuta immersa in un bagno ad ultrasuoni per 5 minuti.

Introdurre nella colonna cromatografica pochi millilitri di esano. Trasferire nella colonna parzialmente riempita con esano, il gel di silice avendo cura che non si formino bolle d'aria. Aggiungere 2,0 g di solfato di sodio mantenendo la colonna sempre bagnata da esano. Condizionare la colonna con 10 mL di esano degassato mediante ultrasuoni.

c. Eluizione cromatografica

Portare l'estratto del campione ad un volume di 0,5 mL in esano mediante leggero flusso di azoto (prepurificato per passaggio su setacci molecolari) e caricare quantitativamente il campione

aiutandosi se necessario con una piccola quantità di esano. Eluire per gravità in successione con:

- 30 mL di esano (prima frazione di scarto contenente gli alifatici);
- 20 mL acetone/esano 1:1 (v/v) (seconda frazione contenente gli IPA).

Concentrare lentamente la seconda frazione in evaporatore rotante fino a 0,5 mL (evitando di andare a secco), quindi trasferirla in una fiala da 1,8 mL aiutandosi con esano. Aggiustare il volume fino ad una quantità nota compresa tra 0,5-1 mL (con esano o mediante leggero flusso di azoto, prepurificato per passaggio su setacci molecolari) a seconda delle concentrazioni attese. Fino al momento dell'analisi conservare l'estratto a 4°C al buio.

Analisi dell'estratto

a. Analisi in HRGC/LRMS

L'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione può essere analizzato direttamente in HRGC/LRMS oppure, nel caso di matrici complesse, sottoposto a purificazione su colonna di gel di silice (come descritto in "Purificazione dell'estratto su colonna di gel di silice") e poi analizzato. È opportuno prima di iniziare l'analisi porre il forno alla massima temperatura raggiunta dall'analisi e monitorare la linea di base fino a che questa resti costante.

b. Analisi in HPLC/fluorescenza

Per effettuare l'analisi in HPLC/fluorescenza l'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione (vedi § 3.8.2, Estrazione, punti *a* e *b*) deve essere reso compatibile con la fase mobile impiegata. Ciò viene realizzato concentrando a 100 µL l'estratto in diclorometano e aggiungendo acetonitrile fino ad un volume finale di 1 mL. Il rivelatore a fluorescenza viene usato per la determinazione simultanea dei differenti composti. Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione vengono variate in dipendenza del tipo di colonna e delle condizioni cromatografiche utilizzate.

Calcoli

Iniettare nel cromatografo volumi uguali di estratto e di soluzioni di riferimento diluite. Costruire quindi le rette di taratura per i singoli IPA, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento. La quantificazione viene effettuata mediante la tecnica del riferimento interno.

Riportare in grafico il rapporto area picco componente/area picco riferimento interno (A/Asi)

in funzione della concentrazione del componente stesso.

La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{\frac{A}{A_{si}} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di analita;

A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;

Asi = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;

b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;

Vf = volume (mL) dell'estratto finale;

Vi = volume (mL) del campione acquoso.

PCB

Apparecchiature

- Gascromatografo che consenta l'impiego di colonne capillari;
- Rivelatori: Rivelatore di massa (MS) operante in SIM, che consente in alcuni casi l'analisi quantitativa di congeneri non separabili cromatograficamente. Se tale rivelatore non è disponibile si può utilizzare il rivelatore ECD;
- Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici;
- Evaporatore rotante, con possibilità di operare con il vuoto e con bagno termostatico ed opportuno sistema per il recupero dei solventi.
- Vetreria: Oltre la normale vetreria in uso nel laboratorio si indicano qui di seguito alcuni elementi indispensabili per l'analisi.
- Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza=10 cm, d.i.=3,5 cm), senza setto poroso, con gambo sfinato (d.i.=10 mm). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le

specifiche EPA (volume serbatoio=60 mL, lunghezza colonna 10 cm, d.i. 2 cm, gambo sfinato (d.i.=8 mm).

- Colonna cromatografica in vetro (h=30 cm, d.i.=4,2 mm), con parte inferiore sfinata (h=3,5 cm, d.i.=2 mm) e serbatoio di riserva solventi della capacità di circa 60 mL.
- Fiale o provette da concentrazione in vetro (preferibilmente con gambo sfinato graduato a 0,5 mL ed 1 mL) da 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL.
- Imbuti separatori da 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e rubinetto in teflon.
- Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante, aventi capacità di 50 mL, 100 mL e 250 mL.
- Matracci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.
- Pipette graduate di precisione (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL).
- Colonne gascromatografiche: si consiglia di utilizzare colonne con rapporto di fase (raggio/2 x spessore di fase) circa 250 e di lunghezza non inferiore a 30 m.
- Microsiringhe per gascromatografia (tipo Hamilton o equivalenti) da 5 e 10 μ L.
- Bilancia analitica, risoluzione 0.1 mg.

Procedura analitica

Trattamento preliminare

Se il campione è stato refrigerato, attendere che si equilibri a temperatura ambiente prima dell'estrazione. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità.

Estrazione

Trasferire 500 mL (o un volume minore) di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 60 mL (ridurre a 20-30 mL ed usare un imbuto separatore da 250 mL, se il volume di campione prelevato è di 100 mL) di miscela di diclorometano/n-esano 15:85 (v/v) ed agitare vigorosamente per almeno 3 minuti. Attendere la separazione tra le due fasi.

Nel caso di formazione di emulsione, aggiungere una soluzione satura di cloruro di sodio (50-100 mL), agitare ed attendere; se la quantità di emulsione rimane comunque elevata (volume di emulsione pari ad un terzo o più della fase organica) centrifugare o filtrare su lana di vetro.

Scaricare la fase acquosa (fase inferiore) in un secondo imbuto separatore e raccogliere la fase organica (fase superiore) per percolazione in colonna di disidratazione su sodio solfato anidro (circa 30 g) in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL della stessa miscela di solventi, raccogliendo le fasi organiche disidratate su sodio solfato anidro sempre nello stesso pallone da 250 mL. Lavare il sodiosolfato con circa 20 mL di n-esano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche. Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) mediante evaporatore rotante dotato di bagno termostatico, alla temperatura di 45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente l'estratto concentrato in una provetta da concentrazione aiutandosi con la minima quantità necessaria di n-esano per i lavaggi del pallone, aggiungere 1 mL di iso-ottano e concentrare sotto flusso di azoto a circa 1 mL, assicurandosi della completa eliminazione del diclorometano.

Purificazione

Di seguito sono descritte le tecniche di purificazione più idonee per l'eliminazione delle più probabili interferenze. L'analista dovrà decidere se sottoporre l'estratto ad una o più di una delle seguenti procedure. Si consiglia comunque di sottoporre sempre l'estratto alla ripartizione con acetonitrile.

a. Ripartizione con acetonitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi ed oli dall'estratto. Trasferire quantitativamente l'estratto in un imbuto separatore da 125 mL con un volume di n-esano sufficiente ad avere un volume finale nell'imbuto di 15 mL. Estrarre il campione per quattro volte con 30 mL di acetonitrile saturo di esano, agitando ogni volta vigorosamente per almeno 3 minuti. Riunire le fasi acetonitriliche in un imbuto separatore da 1000 mL già contenente 700 mL di una soluzione di NaCl al 2%. Mescolare ed estrarre con due aliquote successive di 100 mL di n-esano, agitando vigorosamente ogni volta per almeno 3 minuti. Riunire gli estratti esanici in un imbuto separatore da 1000 mL e lavare con due aliquote successive di 100 mL di acqua distillata. Scartare le acque di lavaggio e disidratare l'esano su solfato di sodio anidro in apposita colonna di disidratazione. Lavare l'imbuto separatore e il sodio solfato con tre porzioni di 10 mL di n-esano, riunendole all'estratto esanico. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Se è necessario procedere con altre tecniche di purificazione, ridurre

prima il volume sotto flusso di azoto fino a 1 mL.

b. Rimozione dello zolfo elementare

È consigliabile adottare questa purificazione anche se si sospetta una interferenza molto lieve. Riempire una colonna cromatografica con 7 g di agente desolforante, trasferire quantitativamente l'estratto concentrato in testa alla colonna ed eluire con 25 mL di esano. Concentrare l'eluato in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Se è necessario procedere con altre tecniche di purificazione, ridurre prima il volume, sotto flusso di azoto, fino a 1 mL.

c. Cromatografia su gel di silice attivato

L'estratto purificato può essere sottoposto a cromatografia su gel di silice attivato per la separazione dei PCB dai PCT.

Taratura dell'adsorbente: la cromatografia su gel di silice attivato (100-200 mesh) viene effettuata per completare il procedimento di purificazione dell'estratto e per ottenere la separazione dei PCB dai PCT in due frazioni in modo da facilitarne l'identificazione gascromatografica. È opportuno che ogni lotto di gel di silice ricevuto sia controllato per la riproducibilità della separazione secondo il procedimento seguente: da un lotto di gel di silice, conservato in un recipiente di vetro ermeticamente chiuso, prelevarne 60-80 g ponendoli in una larga capsula di porcellana e mantenerli in una stufa ad aria a 200°C per 8 ore (per l'attivazione dell'adsorbente è opportuno impiegare una stufa ad aria diversa da quella che si utilizza per il trattamento della vetreria). Il gel così attivato va conservato, in recipienti di vetro ermeticamente chiusi, in essiccatore e normalmente conserva le sue caratteristiche per 10-15 giorni.

Nella parte inferiore della colonna cromatografica pressare un batuffolo di lana di quarzo ed immettere 20 mL di n-pentano (chiudendo la parte inferiore della colonna) e poi 4 g di gel di silice attivato. Chiudere con un tappo a smeriglio la parte superiore della colonna, rovesciarla 2-3 volte e far depositare il gel di silice in modo da evitare la formazione di bolle d'aria. Iniziata la discesa del solvente, con piccoli quantitativi di n-pentano lavare le pareti della colonna per trasportare in basso tutto il gel di silice e successivamente, non appena il livello del solvente sta per raggiungere quello superiore dell'adsorbente, immettere nella colonna 2 mL del riferimento (in n-pentano) di PCB+PCT e far adsorbire. Collegare il serbatoio riserva solventi ed eluire con 130 mL di n-pentano

e, successivamente, con 60 mL di benzene. Il flusso dei solventi deve essere di circa 2-3 mL/minuto e può essere ottenuto applicando una lieve pressione nella colonna. Al termine della cromatografia concentrare le due frazioni in evaporatore rotante fino a pochi millilitri e portarle quasi a secchezza con debole flusso di azoto, a temperatura ambiente. Portare infine a un volume noto con n-esano ed esaminare i due eluati concentrati mediante gascromatografia. Per il corretto uso della colonna cromatografica l'efficacia della separazione (PCB nella prima frazione, PCT nella seconda) dovrebbe essere almeno del 95%. Se non si ottiene questo risultato variare opportunamente i volumi degli eluenti.

Cromatografia del campione: prima di procedere alla cromatografia su colonna del campione da analizzare, è opportuno ricavare almeno un tracciato gascromatografico complessivo dell'estratto diluito per avere un'idea orientativa delle sostanze presenti e delle loro quantità approssimative. Infatti, in caso di campioni molto contaminati l'estratto deve essere opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota della soluzione risultante dalla diluizione. Usando la stessa tecnica utilizzata per la taratura dell'adsorbente immettere nella colonna cromatografica la soluzione di 2 mL in n-pentano del campione in analisi e far adsorbire; quindi effettuare due lavaggi del contenitore, ognuno con 2 mL di n-pentano e far adsorbire anche queste quantità.

Eluire poi con n-pentano (130 mL) e benzene (60 mL), oppure con i volumi più opportuni determinati nelle prove di controllo dell'adsorbente (utilizzare sempre contenitori separati per ciascun solvente al fine di non alterare la polarità). Il flusso dei solventi deve essere di circa 2-3 mL/minuto e può essere ottenuto applicando una lieve pressione nella colonna. Al termine della cromatografia concentrare le due frazioni in evaporatore rotante fino a pochi millilitri e portare quasi a secchezza con debole flusso di azoto, a temperatura ambiente. Portare infine a volume noto con n-esano ed esaminare i due eluati concentrati mediante gascromatografia.

d. Procedura semplificata di purificazione (trattamento con acido solforico e silice)

Trasferire l'estratto esanico concentrato (circa 1 mL) in provetta da reazione, lavando con altre piccole aliquote di esano. Aggiungere 1 mL di acido solforico concentrato, chiudere accuratamente la provetta ed agitare vigorosamente. Separare le due fasi (preferibilmente per centrifugazione) e prelevare la fase esanica concentrandola ad 1 mL. Una ulteriore purificazione si può ottenere trasferendo l'estratto trattato con acido solforico su una colonna cromatografica

riempita con 3 g di silice ed eluendo con 20 mL di una miscela esano/ benzene 95:5 (v/v). L'eluato, concentrato al volume desiderato, viene analizzato per gascromatografia. In alternativa, la procedura descritta può essere semplificata trasferendo l'estratto esanico del campione in testa ad una colonna cromatografica riempita con 10 g di silice/acido solforico 60:40 (p/p) ed eluendo con 30 mL di esano. L'eluato, concentrato al volume desiderato, viene analizzato per gascromatografia.

Tecniche di perclorazione

Perclorazione dei PCB a DCB (decaclorobifenile).

Controllo dell'efficacia della perclorazione: l'efficacia della perclorazione (resa % della conversione dei PCB a DCB) può essere controllata sia a partire da soluzioni di riferimento di diversi Aroclor o da loro miscele a concentrazione nota, sia a partire da una soluzione di riferimento di bifenile. La perclorazione del solo bifenile, essendo più rapida di quella dei PCB, è utile anche per controllare il grado di purezza del pentacloruro di antimonio impiegato (assenza del corrispondente pentabromuro).

Perclorazione dei PCB: immettere in ogni tubo per perclorazione volumi di 1-2 mL delle soluzioni di riferimento in n-esano di PCB calcolando i quantitativi teoricamente equivalenti di DCB. Aggiungere ad ogni tubo da perclorazione 2 granelli di carburo di silicio e 4-5 gocce di cloroformio concentrando poi su bagno ad acqua, con cautela, a circa 0,1 mL (attenzione alla fuoriuscita dei solventi per ebollizione). Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, aggiungere 2 mL di cloroformio e concentrare ancora a 0,1 mL; raffreddare e ripetere un'altra volta questo procedimento. Occorre porre attenzione a tali fasi di evaporazione che portano anche ad eliminare il bifenile eventualmente presente nel campione. Se il campione è perclorato, è possibile falsare completamente il dosaggio dei PCB.

Immettere nei tubi di perclorazione, (sotto cappa), circa 0,2 mL di pentacloruro di antimonio; chiudere ermeticamente con le apposite valvole e lasciare per 15-18 ore nel bagno a secco a 175-180°C. Terminata la perclorazione, lasciar raffreddare prima a temperatura ambiente e poi, per qualche minuto, in bagno a ghiaccio procedendo poi, sotto cappa, all'apertura della valvola del tubo. Trasferire quantitativamente il campione perclorato in un imbuto separatore da 60 mL riprendendo con 5 mL di HCl 6 M e poi con 15 mL di n-esano. Agitare e lasciare separare le fasi, immettendo quella acida in un altro imbuto separatore e procedendo ad altre due estrazioni, ogni

volta con 15 mL di n-esano. Sottoporre gli estratti riuniti di n-esano ai seguenti lavaggi: per due volte con 20 mL di acqua distillata, poi con 20 mL di NaHCO_3 al 10% ed infine per due volte con 20 mL di acqua distillata, scartando sempre le soluzioni di lavaggio. Filtrare la soluzione di n-esano su una colonna per disidratazione contenente circa 10 g di Na_2SO_4 anidro e, al termine, lavare l'imbuto separatore e la colonna con 60-70 mL di n-esano, riunendo le soluzioni.

Concentrare le soluzioni riunite ad 1 mL, mediante l'apposito evaporatore rotante e sotto vuoto leggero, per le successive determinazioni gascromatografiche del DCB.

Perclorazione del bifenile: la resa esatta della perclorazione può essere controllata a partire da quantità note di bifenile in cloroformio, immettendo nel tubo da perclorazione 0,1 mL della soluzione di riferimento diluita di bifenile. In questo caso non si deve procedere alle successive diluizioni ed evaporazioni della soluzione, procedendo senz'altro con l'aggiunta del pentacloruro di antimonio e quindi con la reazione ed i lavaggi come riportato sopra e con la valutazione gascromatografica del DCB.

Perclorazione del campione: la prima frazione di eluizione del gel di silice (che contiene i PCB), evaporata e ripresa con un 1 mL di n-esano, viene immessa nel tubo per perclorazione (perclorazione dei PCB). Procedere quindi ai lavaggi ed all'analisi gascromatografica.

Determinazioni gascromatografiche

Si consiglia di utilizzare una colonna capillare con fase non polare ed un rivelatore di massa, o in assenza di questo, di un rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

Per la verifica della riproducibilità della risposta del rivelatore, ripetere almeno tre volte l'iniezione di una sostanza di riferimento (esempio: aldrina).

Determinazione gascromatografica con rivelatore di massa

L'uso della GC/MS per l'analisi quantitativa dei PCB presenta delle caratteristiche peculiari:

- possibilità di distinguere fra livelli di clorurazione differenti;
- maggiore uniformità dei fattori di risposta all'interno delle classi isomeriche in confronto con quanto avviene con il rivelatore ECD;
- maggiore sensibilità per i congeneri a basso livello di clorurazione (contrariamente all'ECD, la cui

risposta è ovviamente funzione del numero e posizione degli atomi di cloro).

L'uso della GC/MS consente quindi una semplificazione nel riconoscimento dei singoli isomeri, generando di converso una notevole mole di dati (spettri di massa) che necessita di adeguati mezzi e metodi di trattamento.

Nella letteratura più recente è possibile reperire informazioni dettagliate sul comportamento cromatografico dei PCB su molte colonne capillari così come diversi schemi di acquisizione ed interpretazione dei dati. In linea teorica è possibile l'identificazione di tutti i congeneri con l'uso di adeguati programmi di temperatura e di tecniche di accoppiamento di due colonne a polarità differente. È inoltre oggi possibile reperire il riferimento di ogni congenere e quindi, sempre in linea teorica, operare una analisi quantitativa molto accurata. Il sistema analitico più adeguato alle esigenze della presente metodica prevede l'uso di una colonna capillare non polare (tipo SE-54) e di una soluzione il riferimento di congeneri (ad esempio quella riportata per i metodi EPA 525 o 625) contenente un singolo congenere per ogni classe isomerica, scelto in modo da rappresentare adeguatamente il valore medio del fattore di risposta per la classe isomerica rappresentata. In questo caso la scelta oculata nonché ovviamente la purezza delle soluzioni di riferimento usate è maggiormente critica rispetto all'utilizzazione di miscele di Aroclor commerciali.

La tecnica di acquisizione dei dati è generalmente SIM (Selected Ions Monitoring), in cui vengono misurati soltanto alcuni valori di m/z caratteristici delle sostanze di interesse.

La modalità di frammentazione dei congeneri dei PCB in condizioni di impatto elettronico (EI) è piuttosto semplice. Il "cluster" isotopico dello ione molecolare è comunque il più abbondante, seguito da quello relativo alla perdita di due atomi di cloro (ovviamente a partire dai diclorurati). Per i congeneri aventi due o più atomi di cloro adiacenti è rilevabile un "effetto orto" con perdita di HCl.

La ionizzazione chimica (CI) in ioni positivi porta alla formazione dello ione molecolare protonato con scarsissima o nulla frammentazione e può risultare utile in presenza di rilevanti quantità di sostanze interferenti. Quella in ioni negativi (NICI), oltre alla scarsa frammentazione, presenta livelli di sensibilità comparabili con l'ECD per i composti con elevata affinità elettronica. Il tipo di rivelatore di massa più adatto in termini di praticità di utilizzo, facile manutenzione, robustezza e ridotti costi di esercizio è quello a quadrupolo, sia classico che in configurazione "ion-trap", operando in condizioni di ionizzazione per impatto elettronico a 70 eV. L'acquisizione dei dati in SIM dovrebbe essere ottimizzata sulla base delle informazioni ricavabili in letteratura sul

comportamento cromatografico dei PCB. La colonna capillare più usata per questa analisi è del tipo metil-5% fenilsiliconico (SE-54 ed equivalenti) ed esistono in commercio miscele di congeneri specificatamente formulate per la definizione delle “finestre” di eluizione delle singole classi isomeriche.

Le possibilità di scelta per le masse da acquisire in SIM sono varie ed esistono in letteratura schemi più o meno complessi in funzione del livello di confidenza desiderato per l'identificazione dei composti e dell'uso più o meno spinto delle informazioni cromatografiche pregresse (es. tRR).

In generale, il requisito minimo è che vengano acquisiti per ogni classe isomerica almeno due valori di m/z dal “cluster” isotopico dello ione molecolare: uno per la quantificazione e l'altro per la conferma della identificazione. In questo caso esiste la possibilità di interferenza positiva da parte di congeneri a più alto livello di clorurazione (in particolare con 2 atomi di cloro in più). Tale interferenza può essere eliminata facendo ricorso ai dati cromatografici noti in letteratura o acquisendo contemporaneamente altri m/z diagnostici: nel primo caso il sistema di interpretazione dei dati sarà dipendente dal sistema cromatografico adottato (con il vantaggio di una relativa semplicità di applicazione), nel secondo caso si avrà un sistema relativamente svincolato dalla parte cromatografica, con la conseguenza di una maggiore complessità interpretativa e di una riduzione di sensibilità (maggior numero di m/z da acquisire contemporaneamente).

Determinazione gascromatografica con rivelatore ECD

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento che contengano un congenere per ogni classe isomerica, in modo da poter valutare, in prima approssimazione, la risposta del rivelatore in relazione agli atomi di cloro presenti in molecola. Le concentrazioni delle soluzioni di riferimento utilizzate dovrebbero essere tali che ad 1 μL di soluzione iniettato corrispondano quantità di clorobifenile comprese nell'intervallo 20-500 pg, assunto preliminarmente come intervallo di linearità del rivelatore. Non è necessario per i PCB determinare la curva di taratura per ogni singolo congenere. È sufficiente che la miscela di taratura contenga un congenere per ogni classe isomerica: la loro risposta può essere considerata rappresentativa dell'intera classe isomerica (anche se la risposta dell'ECD varia anche all'interno della stessa classe isomerica). Alternativamente la curva di taratura si può costruire utilizzando i picchi più rappresentativi di soluzioni di riferimento di PCB (Aroclor 1242, 1254 e 1260). Scelte le condizioni operative, controllata la stabilità strumentale e la sensibilità del rivelatore si può passare all'analisi gascromatografica del campione estratto ed

opportunamente concentrato, in modo che i picchi delle sostanze da analizzare entrino nell'intervallo di linearità.

Calcoli

Iniettare 1 µL di estratto purificato e concentrato del campione analizzato. Valutare qualitativamente la presenza di PCB ed identificare orientativamente la miscela (esempio Aroclor 1242, 1254 o 1260) eventualmente presente. Iniettare quindi 1 µL di esano per verificare che non compaiano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare 1 µL della soluzione standard della/delle miscele di PCB eventualmente identificate nel campione. La concentrazione della soluzione di riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza della concentrazione valutata nel campione. Iniettare quindi tre volte il campione e successivamente altre due volte la soluzione di riferimento. I policlorobifenili si presentano nei campioni reali in miscele di varia complessità e con una distribuzione dei congeneri non sempre eguale a quella delle soluzioni di riferimento, per cui è impossibile descrivere un metodo semplice per la loro determinazione quali-quantitativa. Si riportano qui di seguito i criteri di base di alcuni dei metodi che possono essere utilizzati.

Caso 1

Il caso in cui è evidente nel campione la presenza di una sola miscela (ad esempio Aroclor 1260) con le stesse percentuali dei diversi congeneri della soluzione di riferimento, è il più semplice che si possa incontrare. In questo caso, si può confrontare il cromatogramma del campione con quello della soluzione di riferimento corrispondente e misurare la somma delle aree dei picchi dei diversi congeneri nel campione e nella soluzione di riferimento, calcolando il risultato nel seguente modo:

$$C = \sum_i \left(\frac{A_{c_i}}{A_{s_i}} \right) \frac{Q_s \cdot V_f}{V_i \cdot V_e}$$

dove:

C = concentrazione (µg/L) di PCB;

Asi = area del generico picco (i) nel riferimento;

Aci = area del corrispondente picco (i) nel campione;

Qs = quantità (ng) di soluzione di riferimento iniettata;

Vf = volume finale (µL) dell'estratto;

Vi = volume (µL) di campione iniettato;

V_c = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi.

Per il calcolo della concentrazione ("PCB totali") si può procedere anche nel seguente modo. Iniettare una quantità nota di una soluzione di riferimento di una miscela ("Aroclor x"), che si ritiene abbia il tracciato cromatografico più simile a quello del campione. Calcolare i tempi di ritenzione relativi (t_{RR}) rispetto al p,p'-DDE nella soluzione di riferimento. Misurare l'area di ciascun picco e calcolare il fattore di risposta (R) per ogni singolo picco (singolo congenere o somma di congeneri non separabili cromatograficamente) nel seguente modo:

$$R_i = \frac{Q_s \cdot \frac{M_i}{100}}{A_i}$$

dove:

R_i = fattore di risposta (ng/area) del/dei congeneri, relativi al picco (i);

Q_s = quantità (ng) di miscela di riferimento iniettata;

M_i = media ponderale (%) del/dei congeneri, relativi al picco (i) nella soluzione di riferimento;

A_i = area del picco (i).

Calcolare i t_{RR} e l'area di ciascun picco nel campione. Confrontare il cromatogramma del campione con quelli della soluzione di riferimento e calcolare la quantità relativa ad ogni picco preso in considerazione:

$$Q_i = R_i \cdot A_{ic}$$

dove:

Q_i = quantità (ng) relativa al picco (i) considerato;

R_i = fattore di risposta del congenere, relativi al picco (i);

A_{ic} = area del picco nel campione.

Addizionare le quantità (ng) relative a tutti i picchi considerati e calcolare la concentrazione nel campione:

$$C = \sum \frac{Q_i \cdot V_f}{V_c \cdot V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di PCB;

$\Sigma Q(i)$ = somma delle quantità relative ad ogni singolo picco considerato;

V_e = volume (μL) di estratto;

V_c = volume (mL) di campione estratto;

V_i = volume (μL) di estratto iniettato.

Caso 2

Nelle situazioni più complesse quali:

- la presenza nel campione di più miscele (esempio Aroclor 1242+1254+1260) con i singoli congeneri alle stesse percentuali con cui sono presenti nelle soluzioni di riferimento;
- la presenza nel campione di più miscele (esempio Aroclor 1242+1254+1260) con i singoli congeneri a percentuali diverse da quelle con cui sono presenti nelle soluzioni di riferimento;
- la combinazione dei due casi precedenti;

L'accuratezza del metodo di calcolo decresce quanto più è alto il grado di alterazione rispetto alla distribuzione dei congeneri nelle soluzioni di riferimento. Se il campione presenta la stessa distribuzione dei congeneri della/delle soluzioni di riferimento, il calcolo effettuato come nel Caso 1 è infatti relativamente accurato. In caso contrario, la variabilità del dato finale è elevata, soprattutto nel caso in cui si debba utilizzare, in assenza di spettrometri di massa, il rivelatore a cattura di elettroni (ECD), che presenta fattori di risposta estremamente variabili e relativi al numero e posizione di sostituzione degli atomi di cloro nella molecola. L'utilizzazione di un rivelatore di massa, aumentando la possibilità di identificare correttamente i singoli congeneri, aumenta di conseguenza l'attendibilità del dato quantitativo finale.

Occorre comunque tenere presente che se il dato viene espresso come concentrazione nel campione di un "Aroclor x", questo significa che l'analista ritiene che il tracciato cromatografico del campione è significativamente più simile a quello dell'"Aroclor x" che a quelli degli altri Aroclor e quindi l'analisi è stata effettuata prendendo come riferimento una soluzione di riferimento di "Aroclor x".

In alternativa, se è possibile operare con una colonna capillare con adeguato programma di temperatura e se sono disponibili le soluzioni di riferimento dei singoli congeneri più abbondanti si può procedere alla identificazione e quantificazione dei congeneri stessi nel campione analizzato ed esprimere il risultato sommandone le quantità.

Metodo basato sulla perclorazione

Il limite più evidente della tecnica di perclorazione è l'impossibilità di avere informazioni sulle concentrazioni dei singoli congeneri e sulla miscela responsabile della contaminazione. D'altra

parte, vi è il vantaggio che la determinazione non è influenzata da alcuna delle interferenze che si possono incontrare in un campione di acqua, ad eccezione della eventuale presenza del bifenile nel campione.

Si ricorda ancora che il dato quantitativo viene espresso come DCB (decaclorobifenile) originato dalla perclorazione di tutti i clorobifenili presenti nel campione ed è quindi necessario, per una sua corretta valutazione, specificare che è stata adottata la tecnica della perclorazione per l'analisi.

Pesticidi organoclorurati

Apparecchiature

- a) Gascromatografo che consenta l'impiego di colonne capillari.
- b) Rivelatori: Rivelatore a cattura di elettroni (ECD). Se disponibile, può essere vantaggiosamente adottato il rivelatore di massa (MS) operante in SIM, soprattutto per l'analisi quantitativa di composti non separabili cromatograficamente.
- c) Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici.
- d) Colonne gascromatografiche.
- e) Evaporatore rotante, con possibilità di operare con il vuoto, bagno termostatico e adatto sistema per il recupero dei solventi.
- f) Vetreria.
- g) Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza 10 cm; 3,5 cm d.i.) senza setto poroso, con gambo sfinato (10 mm d.i.). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le specifiche EPA.
- h) Microcolonna in vetro (lunghezza 30 cm; 4,2 mm d.i.), con estremità superiore munita di smeriglio per il collegamento con un serbatoio per l'eluente, per la cromatografia su gel di silice disattivato.
- i) Fiale o provette da concentrazione in vetro da 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL preferibilmente con gambo sfinato.
- j) Imbuti separatori da 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e

rubinetto in teflon.

- k) Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante aventi capacità 50 mL, 100 mL e 250 mL.
- l) Matracci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.
- m) Pipette tarate (volumi da 0,5 mL a 10 mL).
- n) Altra vetreria normalmente in dotazione in qualsiasi laboratorio chimico (beute con tappo smeriglio, cilindri graduati, imbuti, pipette Pasteur).
- o) Microsiringhe per gascromatografia (tipo Hamilton o equivalenti) aventi capacità di 5 μ L e 10 μ L.
- p) Microsiringhe per dosaggio di liquidi (tipo Hamilton o equivalenti per HPLC) da 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 250 μ L e 500 μ L.
- q) Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.

Procedura analitica

Trattamento preliminare

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo equilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità.

Estrazione

Trasferire 500 mL (od un volume minore) di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 60 mL (ridurre a 20-30 mL se la quantità di campione prelevata è di 100 mL) di miscela di diclorometano/n-esano 15:85 (v/v) ed estrarre per 3 minuti con forte agitazione. Attendere la separazione tra le due fasi. Nel caso di formazione di emulsione, aggiungere una soluzione satura di cloruro di sodio (50-100 mL), agitare ed attendere; se la quantità di emulsione rimane comunque elevata (volume di emulsione pari ad un terzo della fase organica) centrifugare o filtrare su lana di vetro. Scaricare la fase acquosa (fase inferiore) in un secondo imbuto separatore e raccogliere la fase organica (fase superiore) per percolazione su sodio solfato anidro (circa 30 g) in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL di miscela diclorometano/n-esano 15:85 (v/v). Riunire le fasi organiche disidratate su sodio solfato anidro; lavare il sodio solfato con circa 20 mL di n-esano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche.

Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico alla temperatura di 45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente l'estratto in una provetta da concentrazione aiutandosi con circa 5 mL di esano per i lavaggi, aggiungere 1 mL di iso-ottano e concentrare sotto flusso di azoto a circa 2 mL per assicurare la completa eliminazione del diclorometano.

Purificazione

Di seguito sono descritte le tecniche di purificazione più idonee per l'eliminazione delle più probabili interferenze. L'analista dovrà decidere se sottoporre l'estratto ad una o più di una delle seguenti procedure. Si consiglia comunque di sottoporre sempre l'estratto alla ripartizione con acetonitrile.

a. Ripartizione con acetonitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi ed oli dall'estratto. Trasferire quantitativamente l'estratto in un imbuto separatore da 125 mL con un volume di n-esano sufficiente ad avere un volume finale nell'imbuto di 15 mL. Estrarre il campione per quattro volte con 30 mL di acetonitrile saturo di esano, agitando ogni volta vigorosamente per 1 minuto. Riunire le soluzioni di acetonitrile in un imbuto separatore da 1000 mL già contenente 700 mL di soluzione al 2% di NaCl. Miscelare ed estrarre con due aliquote successive di 100 mL di n-esano, agitando ogni volta. Riunire gli estratti esanici in un imbuto separatore da 1000 mL e lavare con due porzioni successive di 100 mL di acqua distillata. Scartare le acque di lavaggio e disidratare l'esano su solfato di sodio anidro. Lavare l'imbuto separatore e il sodio solfato con tre porzioni di 10 mL di n-esano, riunendole all'estratto esanico. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Ridurre sotto flusso di azoto fino a 1 mL, se è necessario procedere alla purificazione successiva.

b. Rimozione dello zolfo elementare

È consigliabile adottare questa purificazione anche se si sospetta una interferenza molto lieve. Riempire una colonnina cromatografica (d.i. 7 mm) con 7 g di agente desolforante. Trasferire quantitativamente l'estratto concentrato nella colonnina ed eluire con 25 mL di esano. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Ridurre sotto flusso di azoto fino a 1 mL, se è necessario procedere alla purificazione successiva.

c. Cromatografia su gel di silice disattivato

La cromatografia su gel di silice viene effettuata per completare il procedimento di purificazione dell'estratto e per ottenere un frazionamento, anche se parziale, dei composti organoclorurati in due frazioni al fine di facilitare l'identificazione cromatografica.

Taratura dell'adsorbente

Prima di eseguire la cromatografia del campione, è indispensabile procedere alla taratura dell'adsorbente perché le caratteristiche possono variare ampiamente in relazione al tipo e al lotto di gel di silice. La taratura consiste nella definizione dei volumi di eluizione, utilizzando opportune soluzioni di riferimento dei pesticidi in esame, in modo da ottenere lo smistamento desiderato. I parametri indicati più avanti potranno dunque, dopo la fase di taratura dell'adsorbente, subire delle modifiche.

Preparazione della colonna

Chiudere la parte inferiore della microcolonna con un batuffolo di cotone sgrassato e versare nella colonna 2 g di gel di silice disattivato, in modo che la riempia fino ad una altezza di circa 20 cm (l'altezza è importante per la riproducibilità della separazione). Aggiungere un altro batuffolo di cotone sgrassato e uno strato di circa 1 cm di altezza di solfato di sodio anidro. Per il controllo dell'efficacia della colonna, senza prelavare il gel di silice aggiungere 1 mL di una soluzione di riferimento cumulativa, contenente i seguenti composti: aldrina, p,p'-DDT, p,p'-DDD e lindano.

Ciascun principio attivo dovrebbe essere ad una concentrazione di circa 0,1 ng/μL. Dopo adsorbimento, aggiungere 1 mL di esano (questa quantità serve per simulare il lavaggio del contenitore del campione). Dopo adsorbimento del solvente connettere il serbatoio alla colonna e quindi eluire, nell'ordine, con le seguenti miscele, cambiando il recipiente di raccolta quando il livello di un eluente raggiunge lo strato superiore del gel di silice:

- n-esano: 26 mL. Questa frazione deve contenere aldrina, p,p'-DDT e circa il 50% del p,p'-DDD;
- benzene/esano (60:40): 15 mL. Questa frazione deve contenere il residuo p,p'-DDD ed il lindano.

Il flusso degli eluenti deve essere di circa 1-2 mL/min e può essere ottenuto applicando una lieve pressione in testa alla colonna. Le due frazioni vengono concentrate con l'evaporatore rotante e sotto leggero vuoto, portate a volume noto con n-esano (<10 mL) ed analizzate in gascromatografia. Per l'eluizione del metossicloro e del captano occorre eluire con successivi 10 mL di benzene (frazione C). È indispensabile che la taratura dell'adsorbente sia effettuata nel laboratorio dove normalmente vengono effettuate le analisi; la riproducibilità della separazione dipende infatti oltre che dall'attività dell'adsorbente e dalla purezza dei solventi, anche dalla

temperatura e dall'umidità.

Cromatografia del campione

Prima di procedere alla cromatografia, nel caso di campioni molto contaminati, l'estratto va opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota dello stesso.

Usando la stessa tecnica utilizzata per la standardizzazione dell'adsorbente e nelle condizioni di disattivazione prima identificate, introdurre la soluzione del campione concentrato ad 1 mL nella microcolonna e far adsorbire. Quindi con 1 mL di esano lavare il contenitore del campione e introdurlo nella microcolonna. Eluire con i volumi più opportuni di n-esano e n-esano/benzene determinati nelle prove di taratura dell'adsorbente. Raccogliere separatamente le due frazioni e procedere secondo le modalità descritte per la standardizzazione dell'adsorbente. Eseguire l'analisi gascromatografica delle due frazioni per la determinazione dei pesticidi.

d. Cromatografia su gel di silice attivato

La prima frazione esanica proveniente dalla cromatografia su gel di silice disattivato può essere sottoposta a cromatografia su gel di silice attivato quando l'analisi gascromatografica mette in evidenza la presenza dei PCB oltre ai pesticidi clorurati. Questa tecnica, sviluppata da Snyder e Reinert e modificata da Leoni, permette la separazione dei PCB dal DDT e DDE.

Taratura dell'adsorbente

Nella colonna cromatografica, chiusa nella parte inferiore sfinata con un batuffolo di lana di quarzo, immettere 4 g di gel di silice attivato ricoprendoli quindi con n-pentano; chiudere con tappo a smeriglio e rovesciare più volte la colonna facendo infine depositare uniformemente l'adsorbente. Far percolare il solvente fino a circa 1 cm dal livello superiore dell'adsorbente e mettere nella colonna 1 mL di una soluzione in pentano di PCB e p,p'-DDE entrambi alla concentrazione di 5 µg/mL. Eluire la colonna nell'ordine con 140 mL di n-pentano e successivamente con 60 mL di benzene. Concentrare i due eluati a un volume opportuno: all'analisi cromatografica i PCB e il p,p'-DDE si devono rinvenire rispettivamente negli eluati A e B. Si richiama l'attenzione sul fatto che una buona preparazione della colonna è essenziale per la riproducibilità della separazione, in particolare deve essere evitata la formazione di bolle d'aria. L'efficienza della separazione è normalmente superiore al 90-95%. Se non si ottengono tali livelli di efficienza variare i volumi degli eluenti.

Analisi del campione

Evaporare la soluzione in n-esano del campione, che contiene i pesticidi cloro-organici e i policlorodifenili (cioè proveniente dal primo gruppo di eluizione del gel di silice disattivato) fino a secchezza. Riprendere il residuo con un piccolo volume di n-pentano (2-3 mL) e quindi eseguire una cromatografia su gel di silice attivato nelle condizioni descritte in precedenza al punto A).

Nella prima frazione si possono rinvenire i pesticidi HCB, aldrina, eptacloro ed i PCB, mentre nella seconda frazione sono presenti i due isomeri del DDT e del DDE. I due eluati possono quindi essere analizzati con le tecniche gascromatografiche di seguito illustrate.

Determinazioni gascromatografiche

Si consiglia di utilizzare una colonna capillare con fase non polare ed un rivelatore a cattura di elettroni.

a. Caratteristiche cromatografiche delle colonne consigliate e relativi cromatogrammi

Considerando l'elevato numero di composti organoclorurati presi in considerazione dal presente metodo e la variabilità delle prestazioni del rivelatore a cattura di elettroni si ritiene superfluo indicare i limiti di quantificazione per i singoli composti. D'altra parte, come già accennato, essi sono comunque abbondantemente sufficienti per il controllo delle acque di scarico in funzione dei limiti di legge esistenti. Per la verifica della riproducibilità della risposta del rivelatore, ripetere almeno tre volte l'iniezione di una sostanza di riferimento (esempio: aldrina).

b. Procedura per la taratura del rivelatore a cattura di elettroni

È necessario stabilire l'intervallo di linearità del rivelatore ed ottenere una curva di taratura per la verifica periodica della stabilità delle prestazioni del rivelatore e della stabilità delle soluzioni di lavoro. Per ogni composto da analizzare preparare soluzioni di lavoro ad almeno tre diverse concentrazioni. Le concentrazioni debbono essere tali che ad 1 μL di soluzione iniettato corrispondano quantità di pesticida comprese nell'intervallo 20-500 pg (questo è l'intervallo che può essere assunto preliminarmente come intervallo di linearità del rivelatore). Costruire una curva di taratura, riportando in diagramma il fattore di taratura (rapporto tra area del picco e massa iniettata) in funzione delle quantità iniettate. Stabilire l'intervallo di linearità di risposta del rivelatore (intervallo di massa di composto iniettato nel quale la curva ha un andamento parallelo all'asse delle ascisse). Per la verifica della stabilità delle condizioni gascromatografiche confermare quotidianamente l'andamento della curva di taratura con almeno una soluzione di riferimento

diluita. Se la risposta varia da quella attesa più del 10%, il “test” deve essere ripetuto, utilizzando eventualmente soluzioni di riferimento diluite appena preparate. Altrimenti costruire una nuova curva di taratura. Scelte le condizioni operative, controllata la stabilità strumentale e la sensibilità del rivelatore a cattura di elettroni, passare all’analisi gascromatografica del campione estratto opportunamente concentrato, in modo che i picchi delle sostanze da analizzare entrino nell’intervallo di linearità. L’analisi qualitativa si basa sul confronto dei tempi di ritenzione, relativi ad una sostanza di riferimento, dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento, iniettati nelle stesse condizioni. La sostanza generalmente presa come riferimento è l’Aldrina. Soluzioni di riferimento e campione devono essere preparate nello stesso solvente. Se la complessità del cromatogramma del campione (elevato rumore di fondo e/o presenza di numerosi picchi e/o bande) non permette alcuna identificazione, adottare le opportune tecniche di eliminazione delle possibili sostanze interferenti. Per l’analisi quantitativa procedere nel modo seguente. Iniettare 1 μL di esano per verificare che non vi siano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare le soluzioni di riferimento relative ai composti identificati nel campione. La concentrazione del riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza di quella del composto nel campione. Iniettare, quindi, il campione e confrontare l’area relativa al singolo composto nel cromatogramma del campione con quella relativa allo stesso composto nel cromatogramma delle soluzioni di riferimento.

Analisi di conferma

a. Qualora siano stati identificati nel campione uno o più pesticidi clorurati dell’elenco di Tab. 1 (IRSA), è opportuno procedere ad un’analisi di conferma utilizzando una colonna con polarità diversa da quella utilizzata per l’analisi. Poichè nel metodo è stato suggerito l’uso di una colonna capillare con fase non polare (tipo SE-54), si può ripetere l’analisi per la conferma della identità dei picchi. Poichè sulla colonna di conferma l’ordine di eluizione è differente, si debbono controllare i tempi di ritenzione relativi ai picchi dei pesticidi clorurati identificati con la prima colonna e se, iniettando standard e campione sulla colonna di conferma, i picchi vengono confermati, si ritiene l’identificazione soddisfacente.

b. Analisi gascromatografica con rivelatore di massa (GC/MS)

Il rivelatore di massa (GC/MS), costituisce un utilissimo mezzo di identificazione perchè la sua risposta è in relazione al peso molecolare ed alla struttura del composto.

Calcoli

Il calcolo della concentrazione di un generico pesticida organoclorurato, nel campione di acqua in esame si effettua applicando la seguente formula:

$$C = \frac{S \cdot A_c \cdot V_f}{A_s \cdot V_i \cdot V_c}$$

dove:

Ci = concentrazione (µg/L) del pesticida identificato nel campione;

S = quantità (ng) di riferimento iniettato;

Ac = area del picco relativo al pesticida nel campione;

Vf = volume finale (µL) dell'estratto;

As = area del picco relativo al pesticida nel riferimento;

Vi = volume (µL) di estratto iniettato;

Vc = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi (mL).

Azoto e Fosforo totali

Apparecchiature

Le attrezzature di laboratorio utilizzate per l'analisi dell'azoto e del fosforo totale sono riportate nelle schede relative all'analisi dei Nitrati e degli Ortofosfati del Manuale “Metodologie analitiche di riferimento” APAT-ICRAM 2001-2003.

E' inoltre necessario l'utilizzo di un' autoclave o normale pentola a pressione (in quest'ultimo caso può essere più pratico usare, come contenitori per i campioni, provettoni da circa 50 cm³ con tappi a vite e guarnizioni in teflon e utilizzare un volume ridotto di campione)

Procedura analitica

Preparazione delle soluzioni stock

a. Azoto totale

Per quanto riguarda la determinazione dell'azoto totale, occorre preparare le soluzioni stock indicate nella scheda Nitrati riportata nel Manuale “Metodologie analitiche di riferimento” APAT-ICRAM 2001-2003 e una soluzione di azoto organico.

Soluzione di azoto organico (10 mmol/L)

Disciogliere 186,2 mg di disodio-EDTA in 90 cm³ di acqua grado reagente. Portare a volume in un matraccio tarato da 100 cm³ (classe A). Conservare in frigorifero, in bottiglia di vetro scura. La soluzione è stabile per qualche mese.

b. Fosforo totale

Per la determinazione del fosforo totale occorre preparare le soluzioni di seguito elencate.

Acido solforico 4,5 mol/L

Aggiungere con cautela 250 cm³ di acido solforico concentrato a 750 cm³ di acqua grado reagente. Far raffreddare e portare a 1 L. Conservata in una bottiglia da reagente, la soluzione è stabile indefinitamente.

Reagente misto

Sciogliere 12,5 g di ammonio eptamolibdato tetraidrato cristallino in 125 cm³ di acqua grado reagente. Sciogliere separatamente 0,5 g di potassio antimonio tartrato in 20 cm³ di acqua grado reagente. Aggiungere, sotto agitazione, la soluzione di molibdato a 350 cm³ di acido solforico 4,5 mol/L. Aggiungere successivamente la soluzione di potassio antimonio tartrato e mescolare il tutto. Conservata in bottiglia di vetro scuro, la soluzione è stabile per parecchi mesi.

Reagenti da preparare al momento dell'uso

a. Soluzione acidificata di acido ascorbico

Sciogliere 10 g di acido ascorbico in 50 cm³ di acqua reagente ed aggiungere 50 cm³ di acido solforico 4,5 mol. Conservare in una bottiglia di vetro scuro, in frigorifero. La soluzione è utilizzabile finché rimane incolore (circa una settimana), ma è preferibile prepararla al momento dell'uso.

Preparazione delle soluzioni standard

Le soluzioni standard da preparare sono quelle indicate nella scheda dei Nitrati e degli Ortofosfati riportata nel Manuale "Metodologie analitiche di riferimento" APAT-ICRAM 2001-2003

Preparazione della soluzione per la verifica dell'efficienza del reagente ossidante

Preparare una soluzione 10 µmol/L in azoto, diluendo con acqua grado reagente, in un matraccio da 100 cm³ (classe A), 100 mm³ (misurati con una pipetta di precisione) di soluzione stock di azoto organico. Dividere la soluzione in due subcampioni da 50 cm³, travasandola nei

contenitori di reazione. Aggiungere 5 cm³ di reattivo ossidante. L'analisi deve portare alla determinazione di tutta la quantità di azoto presente nella soluzione (10 µmol/L). Nel caso ciò non si verificasse, occorre preparare di nuovo la soluzione ossidante.

Preparazione dei bianchi dei reagenti

- Trasferire 50 cm³ di acqua grado reagente in 3 contenitori di reazione ed inoculare 5 cm³ di reagente ossidante in ciascuno di essi.
- Autoclavare seguendo la procedura indicata per il trattamento analitico dei campioni.

Per preparare i bianchi dei reagenti relativi all'analisi dell'azoto totale (bIN):

- prelevare (con una pipetta automatica) 5 cm³ da ciascuno dei 3 contenitori, versarli in beaker da 100 cm³;
- aggiungere a ciascuno 45 cm³ di acqua grado reagente;
- trattare i bianchi dei reagenti dell'azoto con la stessa procedura applicata ai campioni ed illustrata in dettaglio nella scheda Nitrati del Manuale "Metodologie analitiche di riferimento" APAT-ICRAM 2001-2003.

Per preparare i bianchi dei reagenti relativi all'analisi del fosforo totale (bIP):

- aggiungere, a ciascuno dei 50 cm³ rimasti nei 3 contenitori, i reagenti (soluzione acidificata di acido ascorbico e reagente misto) così come indicato per il trattamento analitico dei campioni;
- procedere al dosaggio spettrofotometrico come indicato nella scheda Ortofosfati del Manuale "Metodologie analitiche di riferimento" APAT-ICRAM 2001-2003.

Trattamento analitico

- Mettere in autoclave o in pentola a pressione, per almeno 30 minuti a 120°C, i contenitori con i campioni e le soluzioni da analizzare.
- Portare i contenitori a temperatura ambiente e controllare che il volume dei campioni sia rimasto invariato. Eventualmente riportare il volume a 55 cm³ con acqua grado reagente, ma registrare il cambiamento di volume che può aver comportato un parallelo inquinamento del campione.
- Alla fine dello stadio di ossidazione tutto l'azoto del campione dovrebbe essere stato convertito a nitrato e tutto il fosforo a fosfato.
- Procedere secondo quanto indicato per la determinazione del nitrato e fosfato, tenendo conto delle integrazioni e modifiche che seguono.

Per l'analisi dell'azoto:

- prelevare (con una pipetta automatica) 5 cm³ di ogni campione e dei due campioni di controllo con EDTA. Versarli in beaker da 100 cm³ ed aggiungere 45 cm³ di acqua grado reagente;
- procedere alla determinazione della concentrazione di nitrati.

Per l'analisi del fosforo adoperare i restanti 50 cm³ di campione:

- aggiungere con un dispenser 1 cm³ di soluzione acidificata di acido ascorbico;
- agitare e, dopo circa 30 secondi, aggiungere 1 cm³ di reagente misto (misurato con un dispenser) agitando nuovamente;
- procedere al dosaggio spettrofotometrico.

Calcoli

- Determinare il bianco delle celle (blc,N e blc,P) come riportato nelle schede dei Nitrati e degli Ortofosfati del Manuale "Metodologie analitiche di riferimento" APAT-ICRAM 2001-2003.
- Calcolare il bianco dei reagenti, sia per il fosfato (blP) che per il nitrato (blN) come media dei valori di assorbanza delle tre soluzioni con acqua grado reagente.
- Determinare il fattore colorimetrico per i due componenti secondo la procedura indicata nelle metodiche per fosfati (fP) e nitrati (fN).
- Calcolare le concentrazioni secondo le formule:

$$[\text{NO}_3^-, \text{tot}] = (\text{ABSN} - \text{blc}, i, \text{N} - \text{blN}) fN$$

$$[\text{PO}_4^{3-}, \text{tot}] = (\text{ABSP} - \text{blc}, i, \text{P} - \text{blP}) fP$$

dove:

ABSN = assorbanza dei campione a 553 nm

ABSP = assorbanza del campione a 882 nm

blc,i,N = bianco della cella i-esima a 553 nm

blc,i,P = bianco della cella i-esima a 882 nm

blN = bianco dei reagenti dell'azoto

blP = bianco dei reagenti del fosforo

fN = fattore colorimetrico per i nitrati

fP = fattore colorimetrico per i fosfati

I risultati saranno espressi in µmol/L.

Per il fosforo totale il limite di determinazione è pari a 0,03 µmol/L, ovvero a 0,92 µg/L.

Per l'azoto totale il limite di determinazione è pari a 0,05 $\mu\text{mol/L}$, ovvero a 0,7 $\mu\text{g/L}$.

Metalli pesanti

L'analisi dei metalli pesanti verrà effettuata utilizzando una delle metodiche standard di seguito riportate.

Determinazione dei metalli pesanti mediante la tecnica della spettrofotometria ad assorbimento atomico

Il principio di funzionamento è concettualmente semplice ed è basato sull'esame dell'assorbimento di una radiazione elettromagnetica dopo che questa passa in un mezzo in cui il campione sia presente come atomi o ioni monoatomici.

E' applicabile solo ad elementi metallici e ciascun elemento richiede una diversa sorgente di radiazione (solitamente lampada a catodo cavo).

Per rendere un campione analizzabile in spettrofotometria di assorbimento atomico è necessario ridurre il campione solido in soluzione. Esistono diversi metodi per ottenere tale risultato a titolo di esempio viene schematicamente riassunta una metodologia spesso utilizzata dall'ENEA con riferimento a quanto proposto da Agemian e Chau (1975) e ampiamente collaudata e impiegata in Italia e in diversi paesi da decenni:

1 g di sedimento di granulometria minore 63 micron, ottenuto settacciando ad umido il sedimento da analizzare, dopo essiccamento a 50°C e omogeneizzazione (macinazione), viene disciolto in miscela di HF, HNO₃, HClO₄ concentrati (Agemian Chau, 1975) in contenitori di teflon e scaldato (forno a microonde o piastra termica).

La soluzione ottenuta una volta atomizzata viene colpita da una sorgente luminosa di opportuna lunghezza d'onda, solitamente utilizzando una lampada il cui catodo è formato con lo stesso elemento da analizzare, l'assorbimento dello spettro è proporzionale alla quantità di elemento presente nella soluzione atomizzata.

A seconda dei limiti di rivelabilità che si vogliono ottenere l'atomizzazione può essere eseguita in fiamma o in fornello di grafite, quest'ultimo permette di lavorare con poco materiale e permette una rivelabilità superiore anche di 3 ordini di grandezza rispetto all'atomizzazione in fiamma.

Il fornello di grafite è particolarmente indicato per metalli presenti in basse concentrazioni quali ad es. il Cd, viceversa elementi relativamente più abbondanti, come ad es. lo Zn, possono essere agevolmente determinati in fiamma con sufficiente precisione.

Per il Hg è spesso utilizzato il sistema dei vapori freddi. Il campione viene fatto reagire con un potente riducente (SnCl_2 o NaBH_4). Gli atomi di mercurio vengono allontanati dalla soluzione facendovi gorgogliare dell'aria, che viene successivamente essiccata e indirizzata sulla cella a tubo orizzontale di uno spettrofotometro attraversata dalla radiazione. Con questo metodo è possibile rilevare tracce di mercurio fino a 9 ng/l.

Determinazione dei metalli pesanti mediante la tecnica della spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)

La tecnica della spettrometria di massa a plasma (ICP-MS) accoppiato induttivamente presenta limiti di rivelabilità dell'ordine dei ppt (ng/l) per molti elementi della tavola periodica. Questa tecnica interfaccia una sorgente a plasma induttivamente accoppiato con uno spettrometro di massa a quadrupolo per quanto riguarda l'ICP-MS o con un rivelatore ottico (fotomoltiplicatore) nel caso dell'ICP-OES (ottico). Il principio di funzionamento prevede che un flusso di argon trasporta il campione vaporizzato in una torcia ICP, dove raggiunge la temperatura di 6000-8000°C e hanno luogo la ionizzazione e l'atomizzazione. Il plasma risultante viene aspirato e trasportato al rivelatore. Nel caso di un ICP-MS (Mass Spectrometer) è lo spettrometro di massa a rilevare i vari elementi in funzione della massa. In un ICP-OES (Optical Emission Spectroscopy) viene analizzata la composizione spettrale della luce emessa dalla sorgente tramite un monocromatore (reticolo di diffrazione) che scinde la luce entrante in spettri che vengono intercettati da un fotomoltiplicatore. L'ICP-AES (Atomic Emission Spectrometry) non è altro che un modo diverso per chiamare un ICP ottico. Il vantaggio principale della tecnica ICP è relativo alla sua efficacia rispetto agli effetti matrice.

Cianuri

Apparecchiature

- ÷ Materiale di uso comune di laboratorio
- ÷ Apparecchio di distillazione.

÷ Spettrofotometro idoneo per misure di assorbanza a 620 nm.

Procedura analitica

Reattivi

Utilizzare reattivi del tipo puro per analisi ed acqua distillata o deionizzata.

- Soluzione di idrossido di sodio 1 M: sciogliere 40 g di idrossido di sodio (NaOH) in 1000 mL di acqua.
- Acido solforico.
- Soluzione di cloruro di magnesio (510 g/L): sciogliere 51 g di cloruro di magnesio esaidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in acqua e diluire a 100 mL.
- Soluzione di acido acetico 1+4: aggiungere un volume di acido acetico concentrato a 4 volumi di acqua distillata.
- Soluzione di idrossido di sodio 0,2 M: aggiungere a 1 volume di idrossido di sodio 1 M, 4 volumi di acqua.
- Soluzione di clorammina T (10 g/L): sciogliere 10 g di clorammina T in 1000 mL di acqua. La soluzione è stabile per una settimana e va conservata in frigorifero.
- Soluzione di 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-one (5 g/L): preparare una soluzione satura (5 g/L) aggiungendo 0,25 g di pirazolone a 50 mL di acqua calda (circa 75°C); raffreddare agitando di tanto in tanto.
- Piridina
- Bis-pirazolone (3,3'-dimetil-1,1'-difetil-[4,4'-bi-2-pirazolina]-5,5'-dione).
- Reattivo misto piridina-pirazolone: miscelare 125 mL di soluzione filtrata di 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-one con la soluzione filtrata ottenuta sciogliendo 0,025 g di bis-pirazolone in 25 mL di piridina. Preparare questo reattivo giornalmente.
- Soluzione concentrata di cianuro (1 mL=1 mg): sciogliere 2,51 g di cianuro di potassio e 2,0 g di idrossido di potassio in 1000 mL di acqua. Controllare il titolo ogni settimana con una soluzione di nitrato di argento a titolo noto (metodo di Liebig modificato).
- Soluzione diluita I di cianuro (1 mL=10 µg): diluire 10 mL della soluzione a 1000 mL. La soluzione va preparata giornalmente.
- Soluzione diluita II di cianuro (1 mL=1 µg): diluire 10 mL della soluzione a 100 mL; la soluzione va preparata giornalmente.

- Acido ascorbico
- Carbonato di piombo
- Solvente per l'estrazione dei grassi (iso-ottano o n-esano o cloroformio)
- 1-butanolo
- Soluzione di indicatore al p-dimetilamminobenzilidenerodanina (0,2 g/L): sciogliere 0,02 g di p-dimetilaminobenzilidenerodanina in 100 mL di acetone.
- Soluzione di nitrato di argento: sciogliere 3,2467 g di nitrato d'argento (AgNO_3) seccato a 140°C , in 1000 mL di acqua. Il titolo di questa soluzione viene determinato con una soluzione a titolo noto di cloruro di sodio (NaCl) usando come indicatore K_2CrO_4 . Sulla base del titolo così determinato, diluire opportunamente 500 mL di soluzione per far sì che 1 mL equivalga a 1 mg di CN.
- Soluzione di idrogeno fosfato disodico: sciogliere 5 g di Na_2HPO_4 anidro in 100 mL di acqua.
- Soluzione di indicatore al blu di bromotimolo 0,4%
- Soluzione di indicatore al blu di bromotimolo 0,04%: diluire 10 mL della soluzione a 100 mL.

Procedimento

Solubilizzazione dei cianuri insolubili: nel caso di presenza di cianuri insolubili allo stato di piccole particelle solide sospese nel liquido portare il campione all'ebollizione per alcuni minuti (normalmente 10 minuti risultano sufficienti) curando che il pH si mantenga sul valore di 11. Raffreddare e filtrare.

Distillazione: introdurre il liquido, già sottoposto ai pretrattamenti ritenuti necessari, nel pallone da distillazione, tenendo presente che, per concentrazioni di CN^- non superiori a 10 mg/L, occorre distillare un campione di 500 mL mentre per concentrazioni superiori a 10 mg/L, occorre una quantità proporzionalmente inferiore, che si diluirà in ogni caso a 500 mL con acqua. Predisporre l'apparecchio di distillazione sotto cappa, ponendo in ciascun assorbitore 50 mL di NaOH 1 M, che possono essere diluiti con acqua al fine di assicurare un battente liquido sufficiente. Collegare l'apparecchio ad una pompa da vuoto ad acqua e regolare, tramite l'apposita pinza, il flusso dell'aria in modo che il gorgogliamento non sia superiore a $1 \div 2$ bolle al secondo. Assicurare la tenuta dei giunti utilizzando le relative pinze. Aggiungere 50 mL di acido solforico 1+1 e 10 mL di soluzione di cloruro di magnesio. Riscaldare il pallone per un'ora evitando, per

quanto possibile, che il vapor d'acqua superi metà dell'altezza del refrigerante, mentre si mantiene in funzione il passaggio di una corrente di aria che ha il compito di trasportare tutto l'acido cianidrico liberato nel recipiente di raccolta. Interrompere, quindi, il riscaldamento e lasciare raffreddare mantenendo il gorgogliamento di aria per altri 15 minuti; interrompere il flusso di aria e trasferire il contenuto degli assorbitori in un matraccio tarato di volume C a seconda della ipotizzata concentrazione in CN⁻. Lavare i tubi e gli assorbitori con acqua che viene aggiunta nello stesso matraccio tarato; portare a volume con acqua.

Determinazione volumetrica mediante titolazione di Liebig modificata: prelevare un volume B del distillato portato a volume; aggiungere 0,5 mL di soluzione di pdimetilamminobenzilidenerodaninae titolare con la soluzione di nitrato di argento finché il colore vira dal giallo al rosa. Eseguire anche una prova in bianco su un identico volume B di acqua contenente la stessa quantità di idrossido di sodio contenuto nella soluzione sottoposta a titolazione.

Determinazione spettrofotometrica

Taratura: porre in diversi cilindri graduati a tappo smerigliato da 50 mL rispettivamente 10 mL di almeno quattro soluzioni di taratura ottenute diluendo la soluzione più adatta affinché la misura del campione rientri nell'intervallo fissato dalla curva di taratura e porre in un altro matraccio 10 mL di acqua (bianco). Aggiungere 5 mL di idrossido di sodio 0,2 M e neutralizzare con acido acetico, in presenza di una goccia di blu di bromotimolo fino a colorazione gialla, cioè fino a circa pH 5. Aggiungere 0,2 mL di soluzione di cloramina T, tappare i cilindri, mescolare per rovesciamento due o tre volte; lasciare riposare per 1 o 2 minuti; aggiungere 5,0 mL di reattivo misto piridina-pirazolone, tappare di nuovo, mescolare per rovesciamento; lasciare sviluppare il colore per 20 minuti, diluire portando al volume di 25 mL con acqua, mescolare e determinare l'assorbanza delle soluzioni a 620 nm contro il bianco. Costruire una curva di taratura.

Dosaggio del campione: prelevare un volume B (di solito 15 mL) del liquido di assorbimento portato a volume e trasferirlo in un cilindro graduato a tappo smerigliato da 50 mL. Procedere come stabilito per la taratura.

Dosaggio previa concentrazione del complesso colorato: operare come al punto "Dosaggio del campione" fino al termine dei 20 minuti di sviluppo del colore. A questo punto aggiungere 1 mL

di soluzione di Na_2HPO_4 . Misurare esattamente 10 mL di butan-1-olo che vengono aggiunti in un cilindro a tappo smerigliato da 50 mL. Tappare e mescolare per rovesciamento. Se le due fasi non si separano entro 3 minuti, aggiungere altra soluzione di Na_2HPO_4 e mescolare ancora. Prelevare una parte della fase organica e misurare l'assorbanza a 620 nm contro un bianco ottenuto per estrazione del bianco dei reattivi.

Calcoli

Determinazione volumetrica: la concentrazione in cianuro del campione in esame viene calcolata con la seguente formula:

$$\text{C i a n u r i (m g / l C N } ^ -) = \frac{A}{B} \cdot \frac{C}{D} \cdot 1000$$

dove:

A = mg di CN^- corrispondenti ai mL di nitrato di argento impiegati nella titolazione dopo aver sottratto i mL consumati dal bianco dei reattivi;

B = volume (mL) di distillato utilizzato per la titolazione;

C = volume totale (mL) del distillato, raccolto in matraccio e portato con lavaggi a volume;

D = volume (mL) di campione sottoposto a distillazione.

Determinazione spettrofotometrica: la concentrazione in cianuro del campione in esame viene calcolata con la seguente formula:

$$\text{C i a n u r i (m g / l C N } ^ -) = \frac{A}{B} \cdot \frac{C}{D} \cdot 1000$$

dove:

A = mg di CN^- letti sulla curva di taratura;

B = volume (mL) del distillato, portato a volume, sottoposto a dosaggio spettrofotometrico;

C = volume totale (mL) del distillato raccolto in matraccio e portato con i lavaggi a volume;

D = volume (mL) di campione sottoposto a distillazione.

Composti Organostannici

Apparecchiature

- Bagno ad ultrasuoni.
- Centrifuga.
- Evaporatore rotante.
- Gas Cromatografo con rivelatore FPD (senza filtro ottico), colonna capillare in Silice fusa da 30 m di lunghezza e 0,53 mm di diametro interno con fase legata metilsiliconica e spessore del film 1.5 μm (DB-1 J&W Scientific o equivalente).
- Gas cromatografo con rivelatore MS, colonna capillare da 30 m di lunghezza, diametro interno 0,20 mm con fase legata metil-5% fenilsiliconica e spessore del film 0,25 μm ; rivelatore a selezione di massa a quadrupolo con ionizzazione ad impatto elettronico da 70 eV.

Procedura analitica

Il metodo di analisi che verrà utilizzato comprende una fase preliminare di trattamento del campione, costituita a sua volta da quattro stadi principali: l'estrazione, la derivatizzazione, la purificazione e la preconcentrazione finale del campione. Queste operazioni hanno lo scopo di estrarre gli analiti dal campione, di ridurre le interferenze e di trasformare i composti organostannici in una forma chimica più facilmente separabile, mediante gas-cromatografia, e poi quantificabile attraverso la tecnica analitica strumentale scelta per la determinazione finale.

Estrazione

La fase di estrazione degli analiti dalla matrice è la più critica dell'intera procedura di trattamento del campione, sia per la non elevata stabilità degli analiti, sia per le forti interazioni che essi instaurano con la matrice. Scarse rese di estrazione, infatti, indipendentemente da eventuali perdite occorrenti in altre fasi della procedura, portano a sottostimare la quantità di analita contenuta nel campione. La scelta del metodo è correlata alla tecnica di rivelazione e al tipo di strumentazione disponibile. Tra i metodi proposti possiamo distinguere i seguenti:

- metodi di estrazione "classica" con solventi organici, o in miscele di diversi solventi (di diversa polarità) in presenza o meno di acidi e/o di agenti complessanti (assistita mediante l'utilizzo di

diverse forme di energia, per facilitare il rilascio dei composti organostannici dalla matrice, quali: calore, ultrasuoni, microonde, agitazione meccanica ecc.);

- metodi di estrazione mediante idrolisi basica e enzimatica;
- metodi di estrazione in fluidi supercritici;
- metodi di estrazione “accelerata” con solvente.

Derivatizzazione

L'analisi gascromatografica di composti organostannici, la cui forma ionica ha una bassa volatilità, richiede necessariamente una fase di derivatizzazione nella procedura analitica affinché essi siano trasformati in composti più volatili. Nonostante la derivatizzazione comporti l'aumento della manipolazione del campione essa offre i grossi vantaggi di eliminare le interferenze di sostanze coestratte dalla matrice reale. La reazione di derivatizzazione viene effettuata generalmente con due tecniche differenti:

1. Formazione di idruri (reazione con composti boro-organici);
2. Alchilazione (reazione con reattivi di Grignard).

La derivatizzazione per alchilazione con reattivo di Grignard è l'approccio più seguito sia per l'analisi di sedimenti che per le matrici biologiche.

I reattivi di Grignard comunemente usati sono: il metilmagnesio bromuro (MeMgBr), l'etilmagnesio bromuro (EtMgBr), il pentilmagnesio bromuro (PeMgBr) e l'esilmagnesio bromuro (EsMgBr). La scelta del reagente alchilante dipende dal tipo di analita da analizzare e in particolare dalla sua volatilità.

Purificazione

È necessaria anche una fase di purificazione, da effettuare dopo la derivatizzazione e con lo scopo di eliminare sostanze coestratte dai campioni ed eccessi di reattivi utilizzati che potrebbero interferire nella determinazione analitica. Nonostante questo stadio aggiuntivo comporti un'ulteriore possibilità di perdite, si rende comunque necessario in quanto porta un aumento della sensibilità, un miglioramento della risoluzione dei picchi cromatografici, e quindi in generale un miglioramento della prestazione analitica.

Le procedure di purificazione più impiegate si basano su una separazione cromatografica liquidosolido su fase adsorbente. Gli adsorbenti più comunemente usati sono il gel di silice, il

florisil e l'allumina, mentre gli eluenti più utilizzati sono benzene, esano, toluene o miscele di questi solventi organici.

Preconcentrazione

Viene operata con le procedure convenzionali che, in genere, prevedono un'evaporazione del solvente.

Rivelazione

I sistemi di rivelazione proposti per l'analisi gascromatografica dei composti organostannici sono:

- rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID: "flame ionization detector");
- rivelatore a cattura di elettroni (ECD: "electron capture detector");
- spettrofotometro ad assorbimento atomico (AAS: "atomic absorption spectrometer");
- rivelatore fotometrico a fiamma (FPD: "flame photometric detector");
- rivelatore a emissione atomica (AED: "atomic emission spectrometer");
- spettrometro di massa (MS: "mass spectrometer").

Lo spettrometro di massa è, insieme al rivelatore a fotometria di fiamma, uno dei rivelatori più usati per l'analisi dei composti organostannici poiché presenta il grande vantaggio di permettere l'identificazione dei composti oltre ad essere caratterizzato da un'elevata sensibilità e selettività. Recentemente, nell'ambito delle tecniche accoppiate, sono state proposte delle applicazioni della tecnica a spettrometria di massa avente come sorgente di ioni il plasma indotto da microonde.

Torbidità

Apparecchiature

- Stufa a convezione naturale, munita di termostato capace di mantenere costante la temperatura entro $\pm 1^\circ\text{C}$.
- Essiccatore
- Bilancia analitica di 200 g di capacità con risoluzione di 0,1 mg.
- Apparecchio per filtrazione sotto vuoto, adeguato al tipo di filtro prescelto.
- Membrane filtranti con pori di diametro medio di 0,45 μm .

Procedura analitica

Porre il filtro per 1 ora in stufa alla temperatura di 105°C; lasciarlo raffreddare in essiccatore per 30 minuti e pesarlo al decimo di milligrammo. Collocare il filtro nell'apparecchio di filtrazione. Prelevare un'opportuna aliquota del campione da analizzare, dopo preventiva omogeneizzazione, ed effettuare la filtrazione sotto vuoto, avendo cura di lavare il dispositivo di prelievo (cilindro graduato o altro) con il liquido filtrato. Per campioni a bassa torbidità il volume prelevato deve essere almeno di un litro, mentre per valori di torbidità più elevati deve essere tale da fornire da 20 a 100 mg di solidi sospesi. Lavare per tre volte il filtro con acqua deionizzata (10 mL per volta) e, a filtrazione completata, mantenere il vuoto per tre minuti.

Ultimata la filtrazione, trasferire il filtro con il suo contenuto in una stufa alla temperatura di 105°C. Dopo 1 ora lasciar raffreddare il filtro in essiccatore per 30 minuti e pesare.

Calcoli

Il contenuto di solidi totali disciolti alla temperatura scelta è dato da:

$$\text{Solidi totali disciolti (mg/L)} = \frac{(M_1 - M_0) \cdot 1000}{V}$$

dove:

M1 = peso (mg) del filtro e del residuo dopo essiccamento;

M0 = peso (mg) del filtro;

V = volume (mL) di campione sottoposto a filtrazione.

Ossigeno disciolto

Apparecchiature

- Matracci tarati da 1 L.
- Microburetta di vetro o a pistone da 1 ml o da 5 ml.
- 5 bottiglie di pyrex dello stesso tipo di quelle adoperate per il campionamento.
- Micropipetta di precisione da 0,500 ml; micropipetta da 0,200 ml.
- Agitatore magnetico.
- Ancorette magnetiche.

- 2 dispenser o micropipette automatiche o siringhe di polietilene con tacche ogni 0,5 ml (per reattivi ossigeno).
- Dispenser da 1 ml (per l'acido solforico concentrato).

Procedura analitica

Preparazione dei reagenti

a. Solfato di manganese:

Sciogliere 365 g di solfato di manganese monoidrato $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in acqua distillata e portare il volume ad 1L

b. Soluzione alcalina ioduro:

Sciogliere 500g di idrossido di sodio in 500 ml di acqua distillata.

Sciogliere 300g di potassio ioduro in 450ml di acqua distillata e mescolare le due soluzioni.

c. Soluzione standard di tiosolfato 0.01N

d. Soluzione di amido solubile

Sospendere 2g di amido solubile in 300-400 ml di acqua. Aggiungere una soluzione di idrossido di sodio 20% in modo vigoroso. Aggiungere acido cloridrico fino a che la soluzione è acida alla cartina tornasole e dopo aggiungi 2ml di acido acetico. Alla fine diluire la soluzione a 1 litro di acqua distillata. Escludere la soluzione quando il colore finale non è più lungo di un blu e tende al verde.

Analisi dei campioni

1. Rimuovere il tappo dalla bottiglia Pyrex ed aggiungere 1 ml di solfato manganese, ponendo la pipetta giusto al di sotto del livello del campione. Subito dopo aggiungere 1ml di soluzione alcalina iodata. Richiudere immediatamente la bottiglia e mescolare il contenuto fino a che il precipitato idrossido manganese-manganico non risulta disperso in modo uniforme.

2. Quando il precipitato si è depositato (in 2-3 minuti) agitare nuovamente fino a che la parte solida risulta ben separata dalla soluzione. Lasciare il campione fino a quando il precipitato non si deposita completamente lasciando una soluzione supernatante chiara.

3. Aggiungere 1 ml di acido solforico concentrato, richiudere la bottiglia e mescolare così da sciogliere tutto il precipitato senza far entrare aria nella bottiglia.

4. Ad un'ora dall'acidificazione trasferire 50 ml di soluzione in un flacone conico colorato

attraverso una pipetta. Titolare con una soluzione standard di tiosolfato 0.01N fino a quando non rimane un colore paglia molto pallido. Aggiungere 5 ml dell'amido indicatore e terminare la titolazione.

Calcoli

Sottrarre la correzione del bianco alla titolazione per ottenere la corretta titolazione, V ml, e calcolare il contenuto di ossigeno del campione dalla formula:

$$\text{mg-atomo O}_2/\text{L} = 0.1006 * f * V$$

nel caso in cui venga prelevata un'aliquota di 50 ml, oppure

$$\text{mg-atomo O}_2/\text{L} = (Y/Y-2) * 5.00/X * f * V$$

quando una aliquota X ml viene prelevata da una bottiglia Y-ml.

I millilitri di ossigeno presenti in un litro di acqua può essere calcolato come segue:

$$\text{ml O}_2(\text{NTP})/\text{L} = 11.20 * \text{mg-atomo O}_2/\text{L}$$

$$\text{mg O}_2/\text{L} = 16.00 * \text{mg-atomo O}_2/\text{L}$$

Calcolo del fattore f

Riempire una bottiglia Pyrex con acqua di mare o acqua distillata ed aggiungere 1ml di acido solforico concentrato, 1ml di soluzione iodata alcalina e mescolare. Alla fine aggiungere 1ml di solfato di manganese e mescolare di nuovo. Porre circa 50ml all'interno del contenitore per la titolazione e titolare con 0.1N tiosolfato sodico o 0.001 tiosolfato sodico.

Fare 3 o 5 repliche e calcolare il valore di f come:

$$f = 5.00/v$$

Clorofilla a

Apparecchiature

- Apparato per la filtrazione
- Pompa da vuoto

- Filtri in fibra di vetro Whatman GF/F 25 mm
- Provette da centrifuga da 10 ml
- Cilindri graduati da 1L
- Spettrofotometro

Procedura analitica

Preparazione dei reagenti

a. Acetone neutralizzato

Aggiungere all'acetone puro carbonato di sodio anidro in eccesso ed agitare vigorosamente. Filtrare, dopo almeno 24 ore, su carta da filtro e travasare nella spruzzetta.

b. Acetone neutro al 90 %

Mescolare 100ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone.

c. Acetone neutro all'80%

Mescolare 200ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone.

d. Acido cloridrico 0.66 mol/L

Versare lentamente e sotto agitazione 55 ml di acido cloridrico concentrato in 950 ml di acqua grado reagente.

Analisi dei campioni

Filtrare un volume noto (da 1 a 4L) di un campione d'acqua su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F (25 mm di diametro). Utilizzare una pompa da vuoto assicurandosi che la pressione sia di circa 150 mmHg, per evitare la rottura delle cellule vegetali ed il conseguente passaggio dei pigmenti attraverso il filtro.

Conservare i filtri in provette da 10 mL in 5mL di Acetone disidratato 100% (inibisce le clorofillasi) al buio ad una temperatura compresa di -20°C (i pigmenti sono fotolabili e termolabili) se si desidera posticipare il dosaggio spettrofotometrico. Nel caso in cui questo venga effettuato subito dopo la filtrazione riporre le provette a 4°C.

Triturare i filtri con un pestello ed aggiungere un volume di Acetone 80% pari al volume di Acetone 100% con lo scopo di ottenere un estratto al 90%. Riporre i campioni ad una temperatura di circa 4°C per 24h per completare l'estrazione. Nel caso in cui il dosaggio spettrofotometrico venga effettuato subito dopo la filtrazione, riporre a 4°C per un'ora.

Centrifugare le provette chiuse per 15 minuti a 4000 giri/min in modo da separare il filtro

dalla soluzione. Prelevare il soprannatante mediante pipetta e riempire la cuvette per la lettura allo spettrofotometro.

Procedere con la lettura dell'estratto allo spettrofotometro.

Calcoli

Tre sono i metodi più ampiamente utilizzati per la stima dei pigmenti fotosintetici:

- metodo della stima della clorofilla a (con feopigmenti) (Jeffrey & Humphrey, 1975);
- metodo per la stima delle clorofille a,b e c (Lorenzen & Jeffrey, 1980);
- metodo per la stima separata della clorofilla a e dei feopigmenti (Lorenzen, 1967).

4. MONITORAGGIO DELLE PRATERIE DI *POSIDONIA OCEANICA* E DEGLI ECOSISTEMI BENTONICI

4.1 Descrizione delle attività

Di seguito si riporta il dettaglio del campionamento e delle metodologie da applicare per la caratterizzazione ed il monitoraggio della comunità bentonica, sia di fondo mobile sia di fondo roccioso, e della *Posidonia oceanica*.

Ai fini di ottemperare al Decreto di V.I.A. 2935/1997, il monitoraggio degli ecosistemi marini si basa sull'identificazione delle aree sensibili verso le quali possono migrare i sedimenti.

La strategia del monitoraggio degli ecosistemi marini costieri prende quindi in considerazione:

- la distribuzione delle biocenosi bentoniche ;
- i risultati delle simulazioni effettuate mediante modelli matematici nelle differenti condizioni meteomarine, che consentono di descrivere le traiettorie dei sedimenti e le zone di possibile deposizione;
- il monitoraggio a lungo termine del limite inferiore della *Posidonia oceanica*.

Ai fini del monitoraggio riguardante gli effetti sugli ecosistemi marini, sono state selezionate le stazioni più utili ottenute sovrapponendo la posizione delle stazioni del piano di caratterizzazione e dei risultati dei modelli. Il nuovo piano di campionamento sarà effettuato due volte: una al termine delle attività di dragaggio ed l'altra dopo 4 anni alla fine dei lavori.

Per ciascuna delle quattro grandi praterie di *Posidonia oceanica* precedentemente identificate, verrà controllato annualmente l'eventuale arretramento del limite inferiore mediante la tecnica del *balisage*.

Verrà inoltre introdotto come elemento aggiunto a carico del Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina (DEB), lo studio di un sito di particolare valore ecologico presente nell'area di interesse localizzato a circa un miglio a largo di P.ta Sant'Agostino; lo studio sarà basato sull'analisi di una comunità di fondo roccioso le cui metodiche di campionamento sono discusse nel paragrafo 2.2.

Come previsto dal DLGS 3 aprile 2006 n° 152 e sue modifiche apportate con Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del territorio e del Mare 14 aprile 2009 n° 56, per i metodi di

campionamento degli elementi di qualità biologica si fa riferimento al manuale APAT 46/2007, ai manuali ISPRA ed ICRAM per le acque marino-costiere e di transizione e alle “Metodologie Analitiche di Riferimento (Programma di Monitoraggio per il controllo dell'Ambiente marino costiero (Triennio 2001- 2003)” Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, ICRAM, Roma 2001 e successivi aggiornamenti).

4.1.1 Piano di campionamento delle comunità bentoniche di fondo mobile

Lo studio delle comunità di fondo mobile è un importante strumento per il monitoraggio dell'ambiente marino; le comunità bentoniche, infatti, si presentano con caratteristiche di persistenza e dinamiche tali da poter essere utilizzate come descrittrici dello stato dell'ecosistema.

Pertanto, anche in virtù della stabilità del *pattern* strutturale che manifestano lungo il gradiente batimetrico, esse assumono un'importanza fondamentale come descrittrici dell'ambiente marino e come indicatrici di eventuali sorgenti di disturbo. Una variazione anomala nella loro struttura fornisce indicazioni fondamentali nel monitoraggio ambientale.

Il campionamento prenderà in esame la componente macrobentonica, costituita da organismi di dimensioni superiori a 1 mm.

Ai fini di concentrare lo studio sulle aree sensibili e potenzialmente interessate dagli effetti della risospensione del materiale proveniente dalle attività di dragaggio, il numero delle stazioni del piano di caratterizzazione del 2005 è stato ridotto sulla base dei risultati delle simulazioni numeriche in differenti scenari meteomarini riprodotti attraverso modelli di dispersione e propagazione del materiale risospeso durante i lavori. Per ogni scenario sono state simulate la dispersione di materiali con granulometria pari a silt medio da un punto ubicato all'interno dell'area soggetta alle operazioni di dragaggio, la loro traiettoria nella zona di interesse e la deposizione nelle possibili aree di sedimentazione.

In tale ambito sono stati riprodotti quattro differenti scenari che riproducono le seguenti condizioni meteomarine:

- evento estremo : vento proveniente da Libeccio (225 °N) di 10 m/s a cui è stata associata un'onda dalla stessa direzione con altezza di 3 m (Fig. 4.1.1-1);
- evento estremo : vento proveniente da Maestrale (315 °N) di 10 m/s a cui è stata associata un'onda dalla stessa direzione con altezza di 3 m (Fig. 4.1.1-2);

- condizione reale estiva: dati di vento e onda relativi a una settimana nel mese di Luglio (Fig. 4.1.1-3);
- condizione reale invernale: dati di vento e onda relativi a una settimana nel mese di Dicembre (Fig. 4.1.1-4).

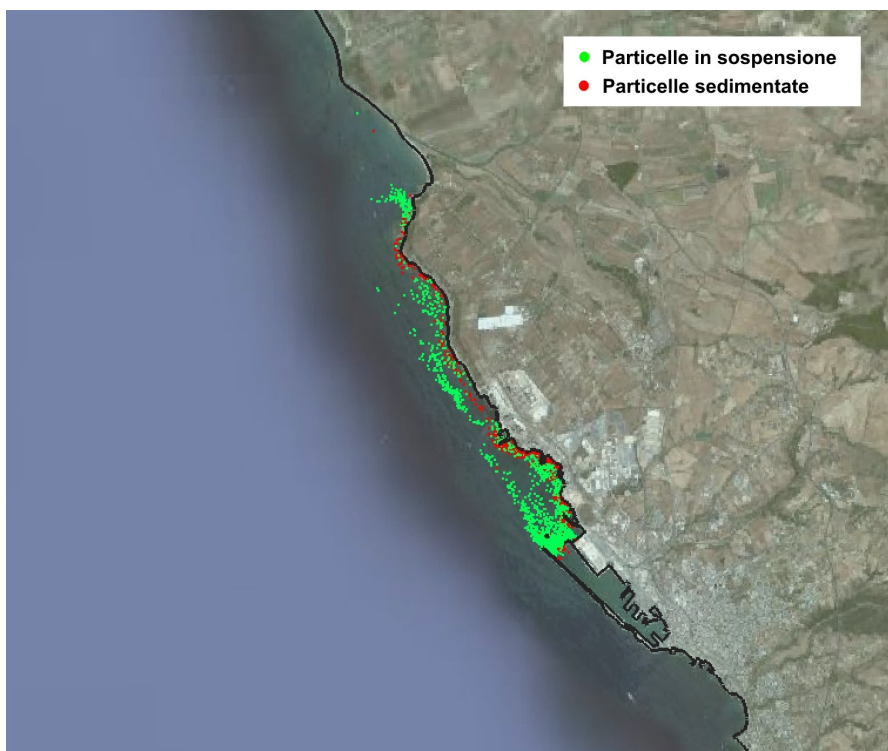


Fig. 4.1.1-1 : Dispersione del sedimento proveniente dal dragaggio portuale in condizioni di Libeccio (L'immagine descrive la situazione dopo quattro giorni dal rilascio del sedimento).



Fig. 4.1.1-12 : Dispersione del sedimento proveniente dal dragaggio portuale in condizioni di Maestrale (L'immagine descrive la situazione dopo quattro giorni dal rilascio del sedimento).



Fig. 4.1.1-3 : Dispersione del sedimento proveniente dal dragaggio portuale in una tipica settimana estiva (L'immagine descrive la situazione dopo quattro giorni dal rilascio del sedimento).

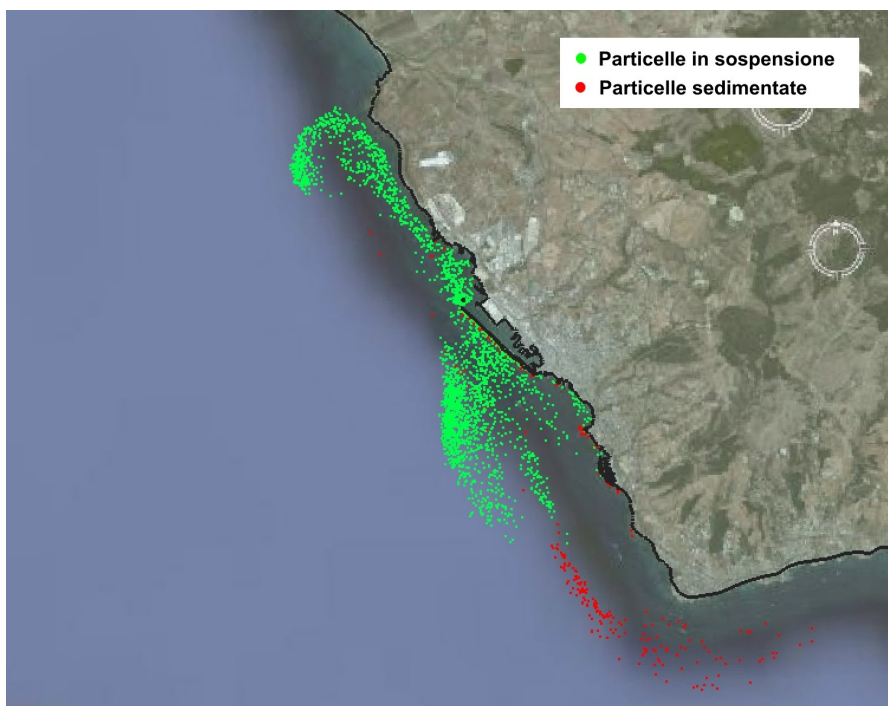


Fig. 4.1.1-4 : Dispersione del sedimento proveniente dal dragaggio portuale in una tipica settimana invernale (L'immagine descrive la situazione dopo quattro giorni dal rilascio del sedimento).

Le immagini evidenziano la presenza di aree critiche per quanto attiene alla deposizione del sedimento proveniente dalle operazioni di dragaggio portuali. Tali zone sono localizzate principalmente:

- a Nord del Porto di Civitavecchia nell'area antistante P.ta Mattonara, P.ta S.Agostino e P.ta della Quaglia (scenario estivo e di Libeccio);
- a Sud del Porto di Civitavecchia in corrispondenza di P.ta del Pecoraro e Capo Linaro (scenario invernale e di Maestrale).

Delle 70 stazioni del piano di campionamento del 2005 situato lungo il tratto costiero compresa tra Marina di Tarquinia e Santa Severa, ne sono state selezionate 30, le cui coordinate sono riportate nella tabella 4.1.1-1 e nelle figure 4.1.1-5, 4.1.1-6, 4.1.1-7 e 4.1.1-8.

Stazione	Coordinate geografiche WGS84 in gg° mm.mm'		Profondità (m)
	Latitudine	Longitudine	
B01	42° 12.926'	11° 40.585'	24.8
B02	42° 12.817'	11° 40.371'	28.2
B03	42° 12.673'	11° 40.042'	33.2
B04	42° 12.408'	11° 39.665'	37.9
B10	42° 10.731'	11° 42.208'	20.7
B11	42° 10.635'	11° 42.051'	28.8
B18	42° 10.017'	11° 43.686'	10.0
B19	42° 09.904'	11° 43.495'	14.1
B20	42° 09.735'	11° 43.187'	19.5
B21	42° 09.642'	11° 43.029'	24.1
B22	42° 09.561'	11° 42.867'	27.7
B23	42° 09.468'	11° 42.717'	35.7
B31	42° 06.859'	11° 44.952'	39.5
B32	42° 06.817'	11° 44.881'	41.3
B36	42° 04.493'	11° 47.657'	30.2
B37	42° 04.436'	11° 47.545'	34.1
B38	42° 04.015'	11° 46.806'	37.7
B48	42° 02.720'	11° 48.634'	29.6
B49	42° 02.450'	11° 48.152'	32.9
B50	42° 02.233'	11° 47.801'	38.8
B54	42° 01.539'	11° 49.287'	31.6
B55	42° 01.433'	11° 49.120'	34.0
B56	42° 01.355'	11° 48.981'	38.7
B57	42° 01.440'	11° 53.272'	24.0
B58	42° 01.034'	11° 52.504'	28
B59	42° 00.655'	11° 51.858'	33.7
B60	42° 00.444'	11° 51.500'	37.5
B67	42° 00.466'	11° 57.008'	13.5
B68	42° 00.073'	11° 56.334'	28.0
B69	41° 59.620'	11° 55.526'	23.1

Tab.4.1.1-1: Stazioni di campionamento selezionate per il monitoraggio delle biocenosi di fondo mobile

Al fine di caratterizzare la distribuzione spaziale delle biocenosi bentoniche dell'intera area di studio i transetti prospicienti Marina di Tarquinia e S. Severa non sono stati modificati rispetto al piano di caratterizzazione del 2005. Inoltre sono state mantenute le stazioni all'interno dei transetti che delimitano l'area di studio, ossia quella Nord in prossimità di Marina di Tarquinia e quello a Sud antistante S. Severa.

Il campionamento delle comunità bentoniche di fondo mobile verrà eseguito due volte: alla fine delle attività di dragaggio e dopo quattro anni dal termine dei lavori.

Nelle seguenti figure è rappresentato il Piano di campionamento previsto per il monitoraggio delle biocenosi bentoniche di fondo mobile.

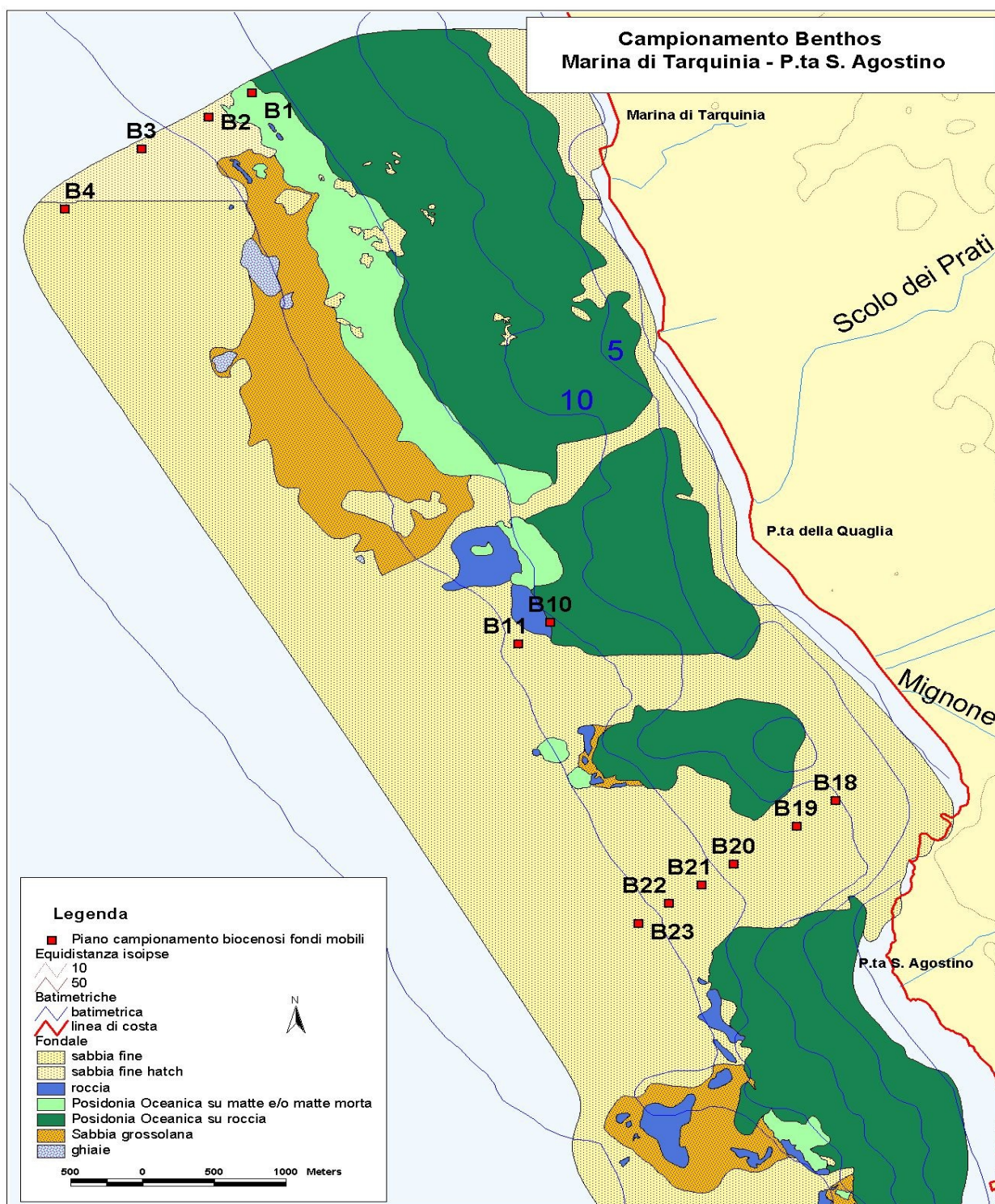


Fig. 4.1.1-5: Piano di campionamento delle biocenosi di fondo mobile per l'area compresa tra Marina di Tarquinia e Punta S. Agostino.

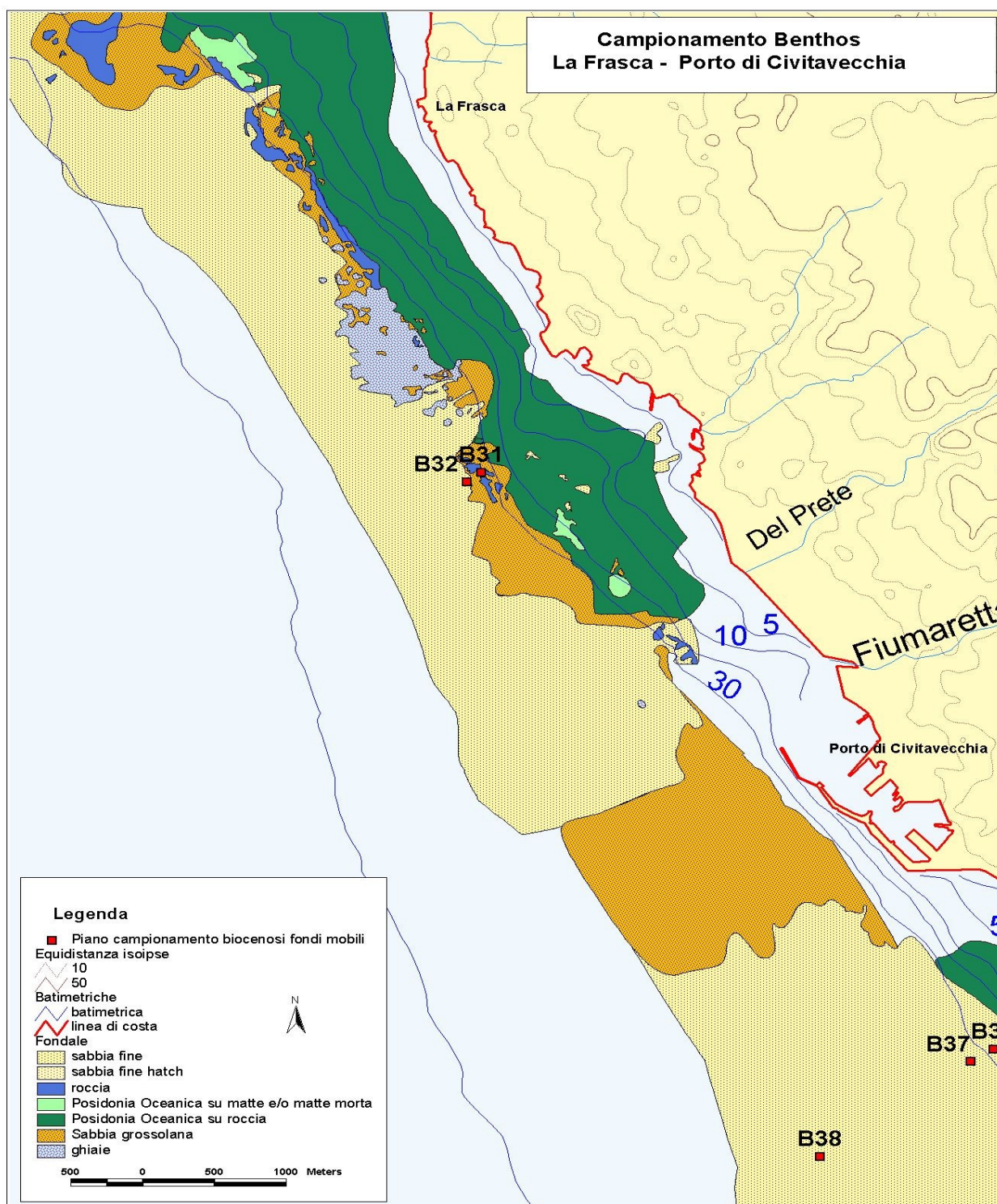


Fig. 4.1.1-6: Piano di campionamento delle biocenosi di fondo mobile per l'area compresa tra la località La Frasca e il Porto di Civitavecchia.

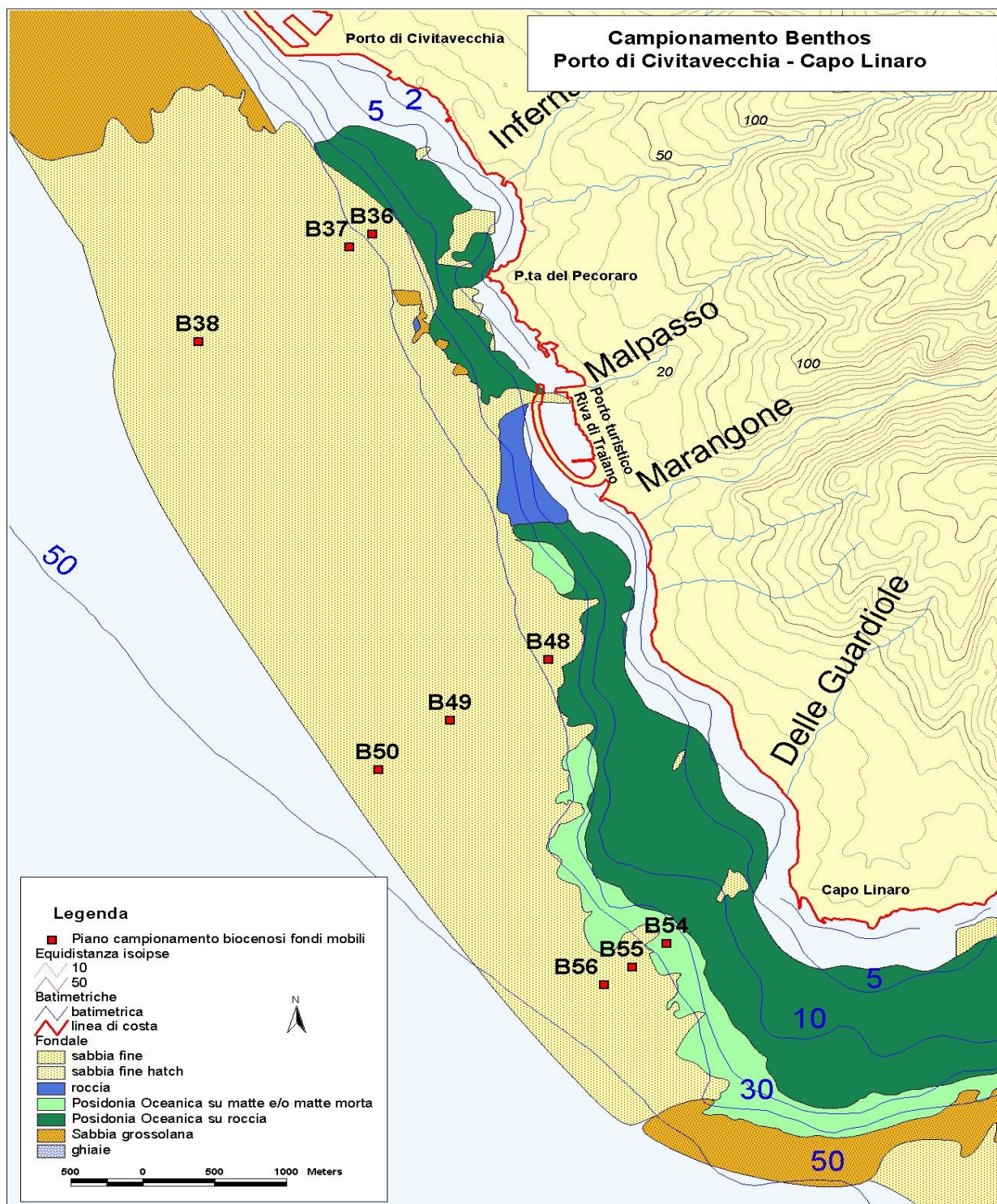


Fig. 4.1.1-7: Piano di campionamento delle biocenosi di fondo mobile per l'area compresa tra il Porto di Civitavecchia e Capo Linaro.

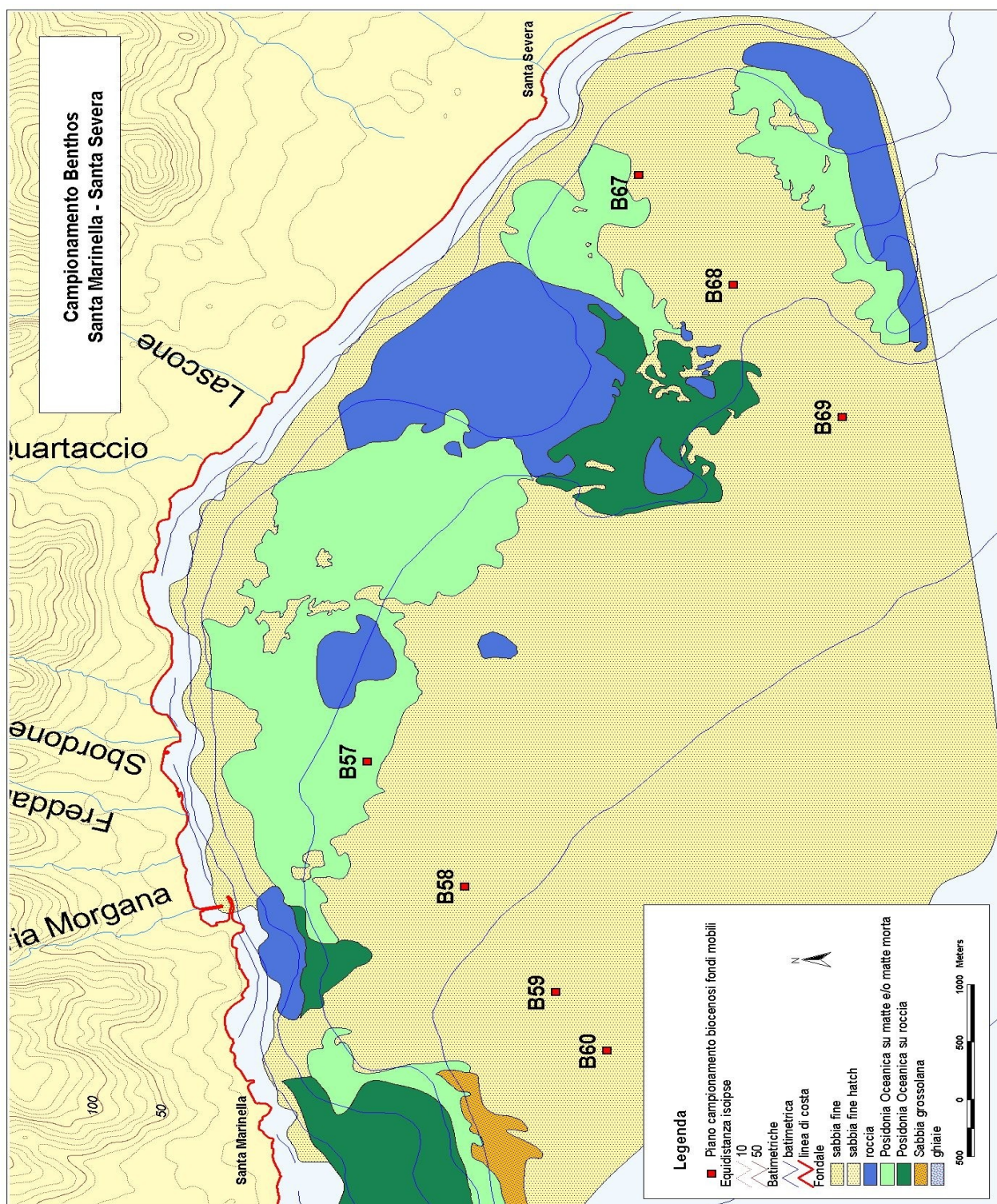


Fig. 4.1.1-8: Piano di campionamento delle biocenosi di fondo mobile per l'area compresa tra Santa Marinella e Santa Severa.

4.1.2 Piano di campionamento per il monitoraggio delle praterie di *Posidonia oceanica*

La *Posidonia oceanica*, per la sua sensibilità alle variazioni delle condizioni ambientali, è considerata un buon indicatore biologico della qualità delle acque e, attraverso lo studio delle praterie, è possibile ottenere un quadro della situazione ecologica dell'area costiera. Lo studio delle variazioni spazio-temporali della struttura delle praterie permette di diagnosticare eventuali eventi degenerativi e le tendenze evolutive. A tale scopo è necessario sottoporre a sorveglianza siti prescelti, fissando punti di riferimento permanenti, sulla base dei quali seguire, nel tempo, la dinamica della prateria e contemporaneamente l'evoluzione della sua vitalità.

Nel monitoraggio, oltre alla descrizione e caratterizzazione della prateria, attraverso la macroripartizione e la fenologia, verrà sia caratterizzato che monitorato il margine inferiore con l'utilizzo di picchetti metallici (definita tecnica del “*balisage*”).

Ai fini di concentrare lo studio sulle aree sensibili e potenzialmente interessate dagli effetti della risospensione del materiale proveniente dalle attività di dragaggio, il numero delle stazioni del piano di caratterizzazione effettuato dal 2003 al 2005 è stato ridotto sulla base dei risultati delle simulazioni numeriche in differenti scenari meteomarinari riprodotti attraverso modelli di dispersione e propagazione del materiale risospeso durante i lavori. Per ogni scenario sono state simulate la dispersione di materiali con granulometria pari a silt medio da un punto ubicato all'interno dell'area soggetta alle operazioni di dragaggio, la loro traiettoria nella zona di interesse e la deposizione nelle possibili aree di sedimentazione.

In tale ambito sono stati riprodotti quattro differenti scenari che riproducono le seguenti condizioni meteomarine:

- evento estremo : vento proveniente da Libeccio (225 °N) di 10 m/s a cui è stata associata un'onda dalla stessa direzione con altezza di 3 m (Fig. 4.1.2-1);
- evento estremo : vento proveniente da Maestrale (315 °N) di 10 m/s a cui è stata associata un'onda dalla stessa direzione con altezza di 3 m (Fig. 4.1.2-2);
- condizione reale estiva: dati di vento e onda relativi a una settimana nel mese di Luglio (Fig. 4.1.2-3);
- condizione reale invernale: dati di vento e onda relativi a una settimana nel mese di Dicembre (Fig. 4.1.2-4).

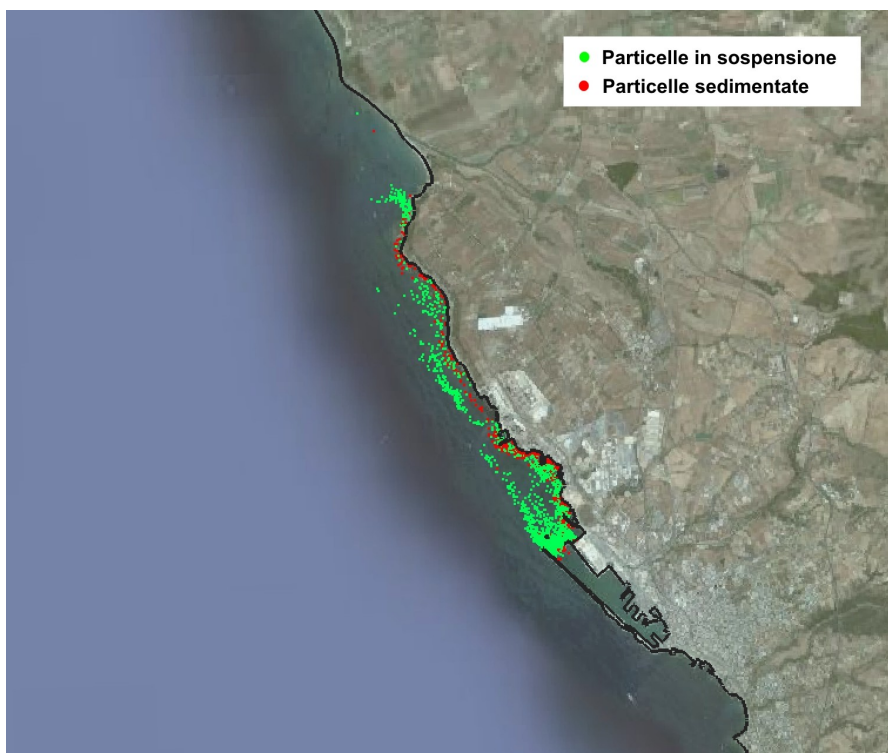


Fig. 4.1.2-1: Dispersione del sedimento proveniente dal dragaggio portuale in condizioni di Libeccio (L'immagine descrive la situazione dopo quattro giorni dal rilascio del sedimento).



Fig. 4.1.2-2 : Dispersione del sedimento proveniente dal dragaggio portuale in condizioni di Maestrale (L'immagine descrive la situazione dopo quattro giorni dal rilascio del sedimento).



Fig. 4.1.2-3 : Dispersione del sedimento proveniente dal dragaggio portuale in una tipica settimana estiva (L'immagine descrive la situazione dopo quattro giorni dal rilascio del sedimento).

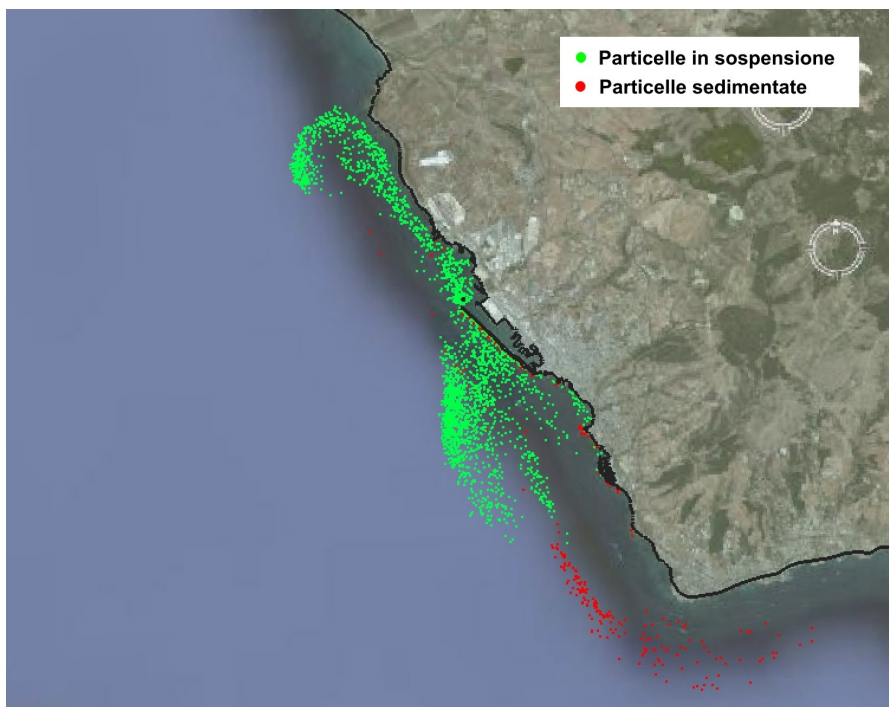


Fig. 4.1.2-4: Dispersione del sedimento proveniente dal dragaggio portuale in una tipica settimana invernale (L'immagine descrive la situazione dopo quattro giorni dal rilascio del sedimento).

Dalle immagini (Fig. 4.1.2-5, 4.1.2-6, 3 4.1.2-7 e 4.1.2-8) si evince che le praterie particolarmente soggette alla deposizione del sedimento proveniente dalle operazioni di dragaggio portuali sono:

- le praterie prospicienti le Saline di Tarquinia, P.ta Mattonara, P.ta S.Agostino e P.ta della Quaglia a Nord del Porto di Civitavecchia (scenario estivo e di Libeccio);
- le praterie prospicienti P.ta del Pecoraro e Capo Linaro a Sud del Porto di Civitavecchia (scenario invernale e di Maestrale).

Le stime dei descrittori strutturali e funzionali verranno eseguito due volte: alla fine delle attività di dragaggio e dopo quattro anni dal termine dei lavori.

Delle 40 stazioni del piano di monitoraggio effettuato dal 2003 al 2005, tra Marina di Tarquinia e S.Severa, situate intorno alla batimetrica dei 10 m, ne sono state selezionate 15 le cui coordinate sono riportate nella Tabella 4.1.2-1 e in Figure 4.1.2-9, 4.1.2-10, 4.1.2-11 e 4.1.2-12.

Stazioni	Coordinate geografiche WGS 84 in gg° mm.mm'		Profondità (m)
	Latitudine	Longitudine	
CV01	42°13.07'	11°41.42'	12
CV03	42°12.33'	11°42.27'	9
CV05	42°11.07'	11° 42.43'	9
CV09	42°08.82'	11°43.88'	9
CV10	42°08.08'	11°44.43'	7.5
CV14	42°07.10'	11°45.20'	11
CV18	42°03.03'	11°48.93'	8.5
CV19	42°01.88'	11°54.88'	10
CV21	42°01.98'	11°48.93'	16
CV23	42°02.43'	11°48.98'	11
CV25	42° 04.34'	11°48.05'	14
CV33	42°01.28'	11°50.68'	12
CV34	42°01.72'	11°51.27'	10
CV36	42°01.98'	11°52.60'	10
CV40	42°00.97'	11°56.68'	10

Tab. 4.1.2-1. Punti di campionamento selezionati per il monitoraggio delle praterie di *Posidonia oceanica*.

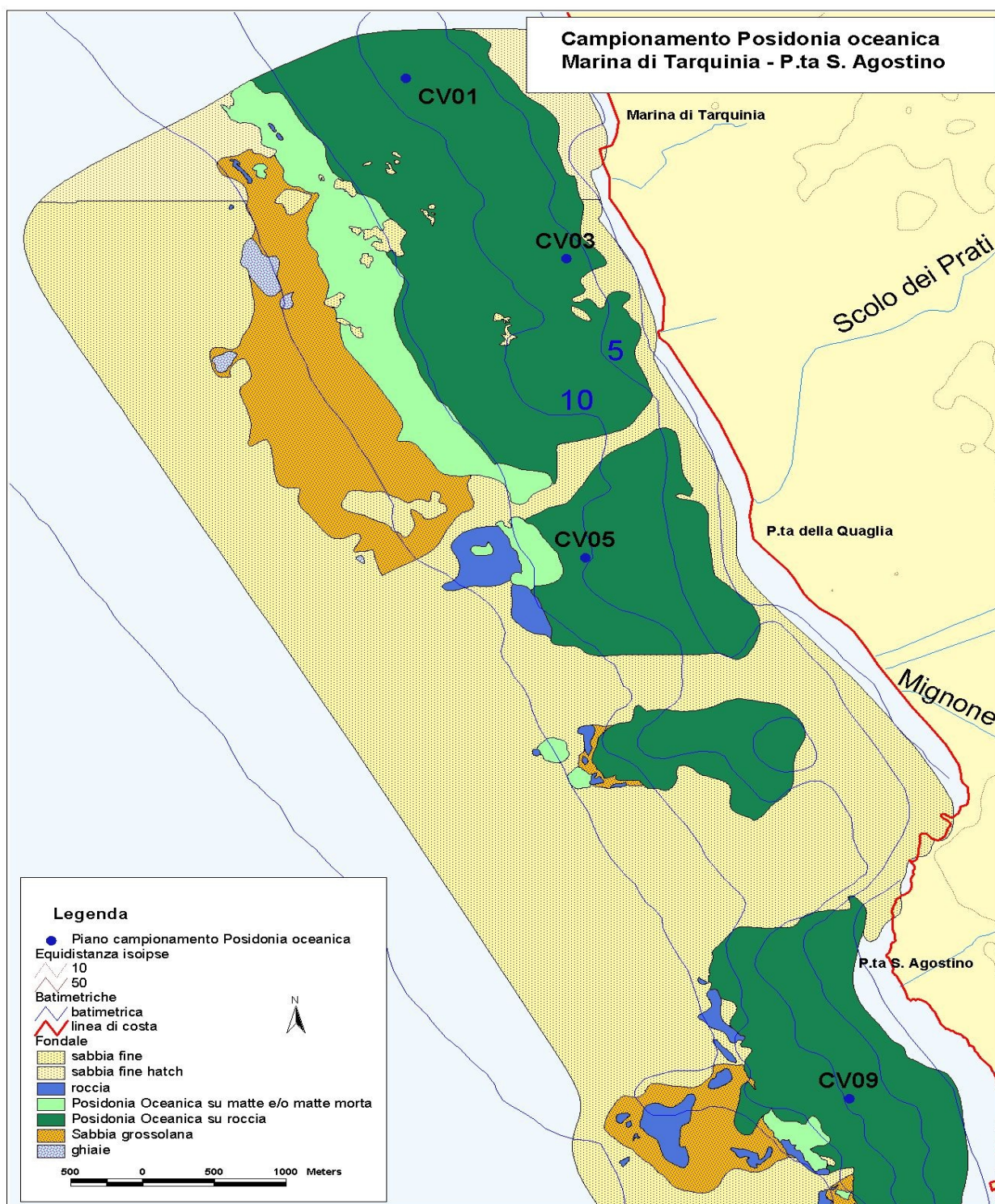


Fig. 4.1.2-9: Piano di campionamento di *Posidonia oceanica* per l'area compresa tra Marina di Tarquinia e Punta S. Agostino.

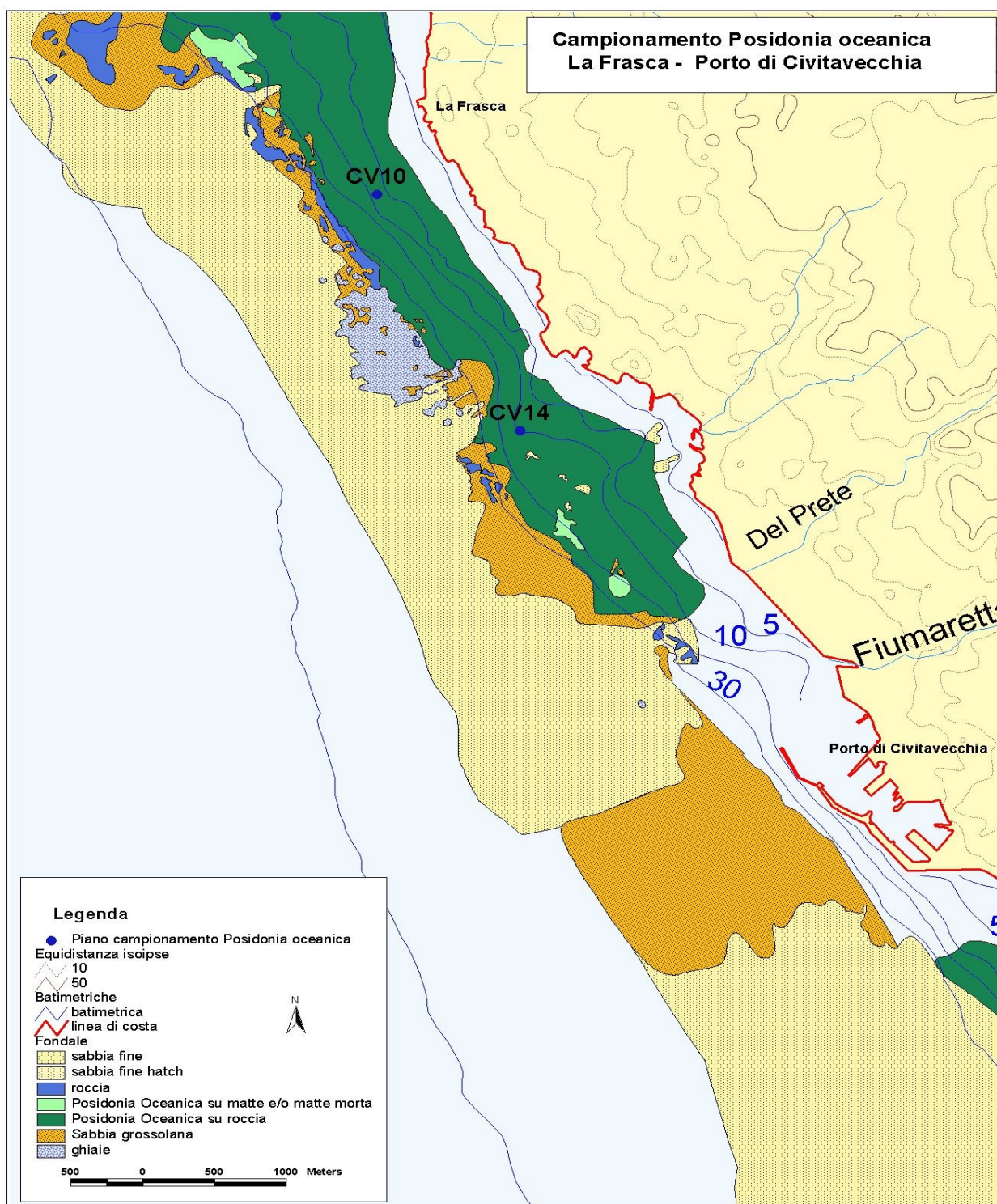


Fig. 4.1.2-10: Piano di campionamento di *Posidonia oceanica* per l'area compresa tra la località La Frasca e il Porto di Civitavecchia.

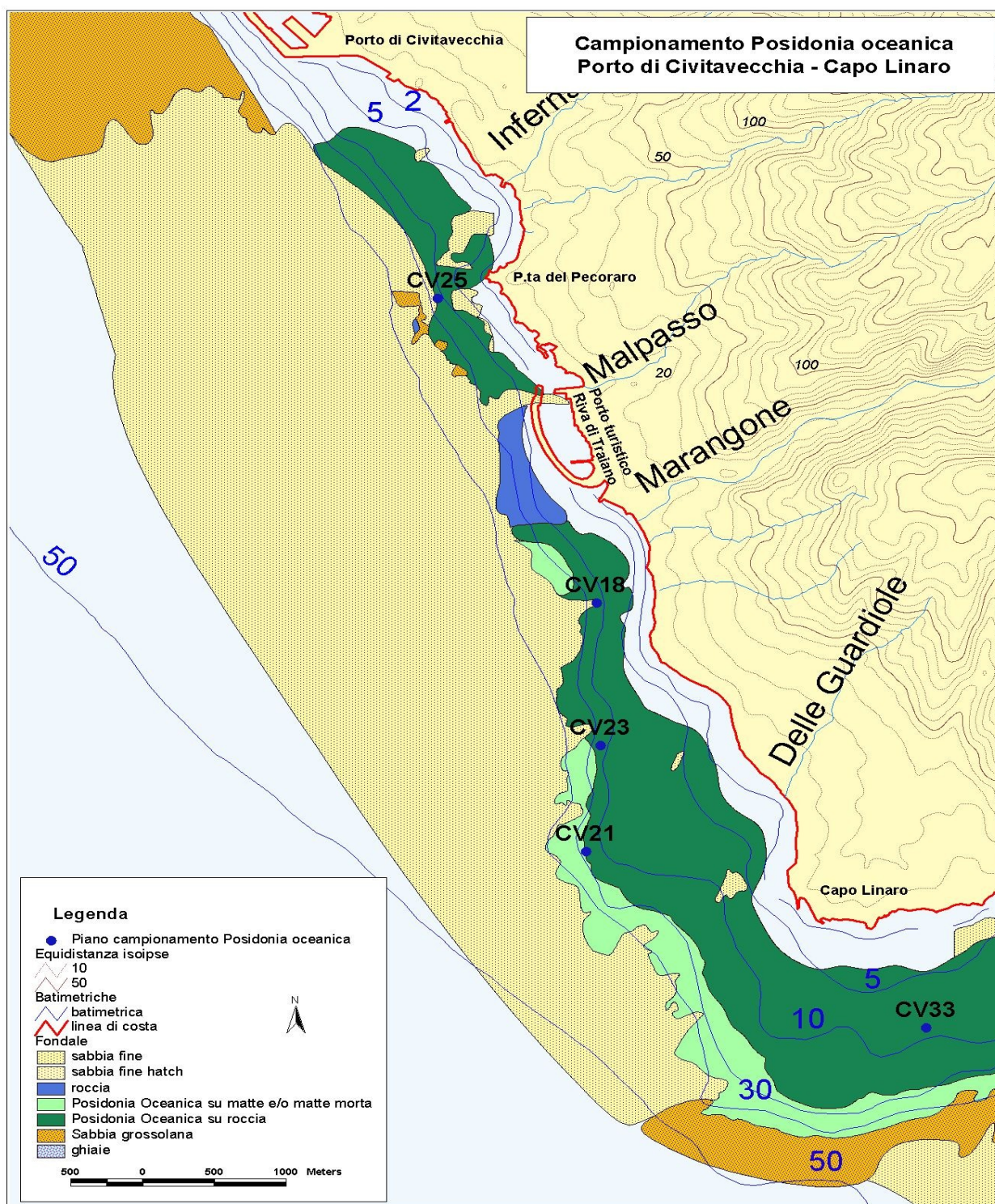


Fig. 4.1.2-11: Piano di campionamento di Posidonia oceanica per l'area compresa tra il Porto di Civitavecchia e Capo Linaro

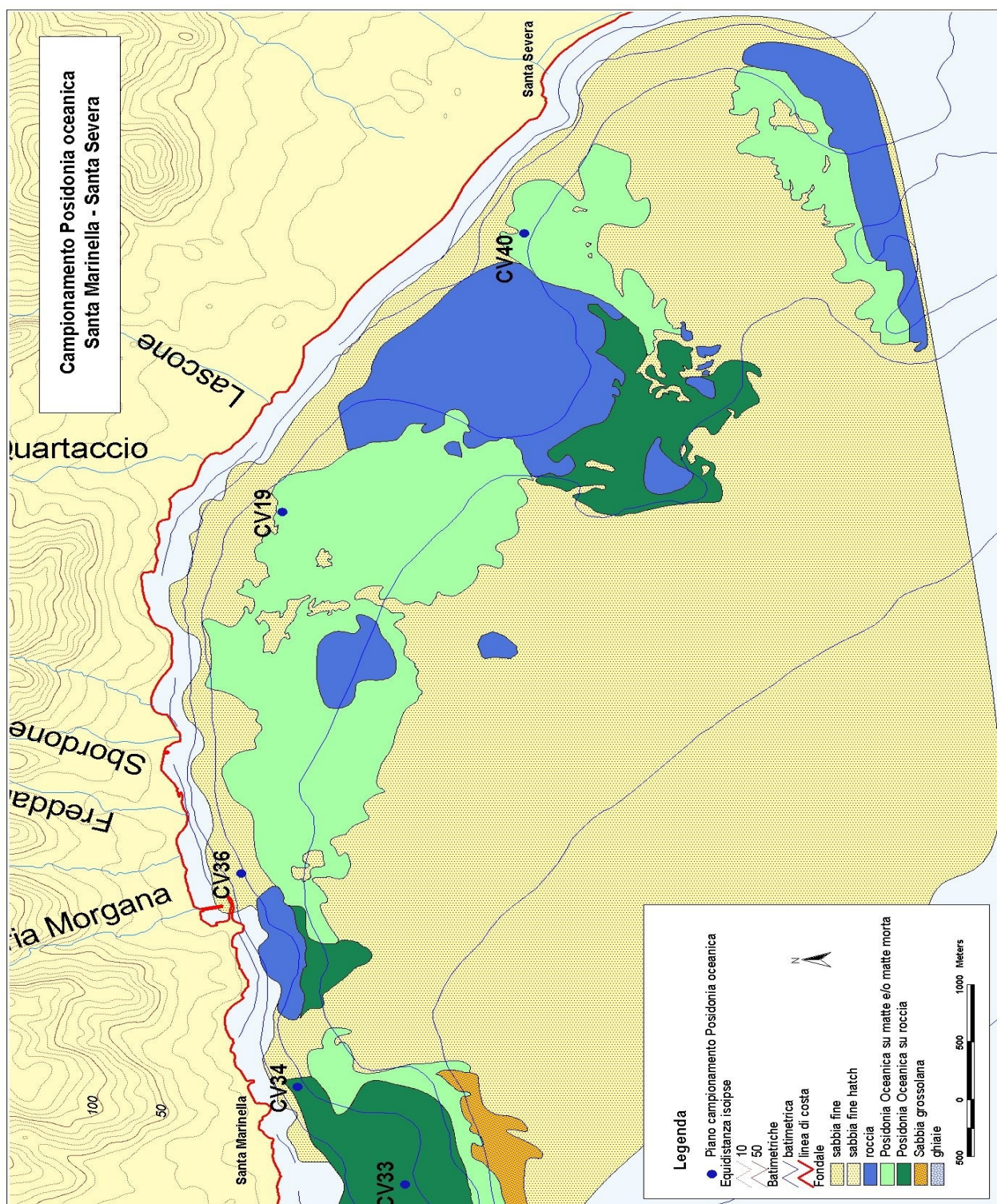


Fig. 4.1.2-12: Piano di campionamento di Posidonia oceanica per l'area compresa tra Santa Marinella e Santa Severa.

In corrispondenza di ognuna di queste praterie verranno posizionati picchetti per il monitoraggio del loro limite inferiore. Le coordinate dei punti di posizionamento di ciascuna asta metallica, appositamente minuta di galleggiante sommerso di riconoscimento (pedagno), verranno segnate tramite GPS per la successiva individuazione.

Il posizionamento dei picchetti verrà eseguito al termine dei lavori di dragaggio, a cui seguirà un monitoraggio annuale nei successivi quattro anni (per un totale di 4 volte) della dinamica del limite inferiore.

I dati raccolti durante il monitoraggio permetteranno di caratterizzare le biocenosi bentoniche e di valutare lo stato di salute delle praterie di *Posidonia oceanica*; il nuovo monitoraggio unito alle campagne di studio precedenti garantiscono una serie storica di dati di almeno 10 anni.

In tal modo si avrà l'opportunità di valutare la presenza di variazioni spaziali e temporali nella struttura delle comunità presenti e metterle eventualmente in relazione alle variazioni morfologiche e strutturali subite dalla linea di costa nell'arco degli ultimi 10 anni.

Nell'ambito del presente lavoro, accertata la presenza nell'area di studio di siti di particolare rilevanza scientifico-naturalistica, verranno individuati dei punti in corrispondenza dei quali sarà effettuato un campionamento per la caratterizzazione delle comunità di fondo roccioso (le cui metodiche verranno descritte in dettaglio nel paragrafo 2.2).

Molto spesso nella preparazione dei programmi di monitoraggio si tende a trascurare lo studio delle biocenosi di fondo duro (ad esclusione dello studio di *P. oceanica*) in ragione delle difficoltà insite nelle modalità di campionamento di tale substrato e dei costi che esse generano.

Tutto ciò porta all'adozione di metodiche di indagine spesso numerose e poco standardizzate.

Le comunità di fondo roccioso hanno notevole importanza sia a livello scientifico, poiché fortemente strutturate dal punto di vista trofico e da elevati valori di biodiversità, che a livello economico perché possono rappresentare importanti aree di nursery per molte forme giovanili di specie ittiche di interesse per il mercato, favorendo il loro sviluppo, garantendo il reclutamento e quindi il mantenimento degli stocks.

Le attività di ricerca potranno portare alla pubblicazione di articoli scientifici in riviste di rilievo nazionale ed internazionale.

4.2 Operazioni in mare

4.2.1 Strumenti e metodologie di campionamento delle comunità bentoniche di fondo mobile

Imbarcazione di appoggio

L'imbarcazione utilizzata per il prelievo dei campioni sarà dotata di:

- r) GPS per una precisa localizzazione dei punti di campionamento; la posizione delle stazioni verrà fornita in coordinate geografiche con sistema di riferimento UTM fuso 33.
- s) verricello elettrico che consenta di variare la velocità di discesa e risalita del campionatore a seconda delle operazioni da effettuare;
- t) verricello con braccio meccanico o archetto sufficientemente elevato da consentire l'utilizzo di strumenti campionatori;
- u) cavo di acciaio di diametro variabile tra 5 e 8 mm.

Strumentazione per il campionamento

Il campionamento del macrobenthos di fondo mobile verrà effettuato tramite una benna di tipo Van Veen con un volume di circa 18 litri. La scelta della benna è motivata dall'esigenza di effettuare prelievi puntiformi di volumi paragonabili di sedimento su superfici eguali; le caratteristiche tecniche dello strumento lo rendono altamente affidabile su substrati mobili a granulometria fine.

Prelievo dei campioni

Per ogni stazione di campionamento verranno eseguite 3 repliche, verificando per ogni replica che lo strumento abbia lavorato in condizioni ottimali e che non ci sia stata fuoriuscita di sedimento. Per ogni stazione di campionamento si effettuerà un'ulteriore quarta replica per le indagini relative alla granulometria.

Setacciatura e conservazione dei campioni in situ

Il campione verrà rimosso dal campionatore (quest'ultimo verrà accuratamente risciacquato da eventuali residui di campione con acqua di mare precedentemente filtrata con un filtro di maglia

inferiore ad 1 mm, per evitare eventuali contaminazioni) e posto in un contenitore di dimensioni adeguate. Per separare gli organismi macrobentonici dal sedimento, il campione verrà poi fatto passare attraverso un setaccio con apertura regolare di maglia 1 mm.

Il materiale biologico e non biologico che rimane dopo la setacciatura sarà trasferito in appropriati contenitori plastici opportunamente contrassegnati con le informazioni del campionamento (nome della campagna, codice della stazione, numero della replica, ecc.) e verrà fissato con una soluzione di formaldeide 4% (precedentemente neutralizzata) e acqua di mare filtrata. In caso di campioni con elevata presenza di materia organica (ad esempio resti di vegetali), la concentrazione di formalina sarà aumentata fino al 30 %.

Conservazione del campione di sedimento per l'analisi granulometrica

Il campione di sedimento preso in ogni stazione verrà conservato in contenitori di plastica o vetro a temperatura ambiente fino all'arrivo in laboratorio, dove saranno conservati a +4°C fino al momento delle analisi.

4.2.2 Strumenti e metodologie di campionamento delle comunità bentoniche di fondo roccioso

Per ogni sito, per la scelta casuale di ogni stazione di campionamento, verranno usati alternativamente uno dei due sistemi di seguito riportati:

- si porta sott'acqua una tabella plastificata con i numeri casuali, da sorteggiare direttamente sul fondo prima di eseguire il campionamento;
- si sorteggiano preventivamente percorsi e distanze a partire da un punto sul fondale che verrà scelto in corrispondenza di un riferimento agevole.

I metodi utilizzati saranno diretti (grattaggio) e/o indiretti (metodi fotografici e visivi), entrambi effettuati in immersione con autorespiratori.

Procedure di campionamento

Una volta giunti sul punto-stazione verranno annotati, su lavagnetta in PVC, i dati di copertura percentuale dei popolamenti presenti, l'esposizione e l'inclinazione del punto, la profondità e ogni altro elemento utile. Dopo aver delimitato il punto di campionamento con una

cornice metallica (quadrato di dimensioni 20 x 20 o 30 x 30 cm) questo verrà fotografato. Si provvederà quindi ad una prima aspirazione della superficie delimitata con la sorbona, seguito dal grattaggio completo della componente algale e asportazione completa della matrice biologica dal substrato, fino al raggiungimento della roccia nuda e quindi da una sorbonata finale, allo scopo di raccogliere la fauna vagile che può sfuggire al prelievo. Il punto di campionamento verrà, inoltre, fotografato e/o videofilmato, utilizzando una videocamera digitale ad alta definizione munita di scafandro. Il campionamento in immersione verrà effettuato da due biologi marini di comprovata esperienza nella raccolta di campioni biologici. Un operatore si occuperà del prelievo del materiale e l'altro effettuerà foto e riprese, annotando contemporaneamente su una lavagnetta subacquea tutte le osservazioni sull'ambiente. Contestualmente al prelievo del campione, sullo stesso punto d'indagine verranno effettuate 10 repliche fotografiche allocate random, che verranno successivamente utilizzate per la caratterizzazione biologica del campione.

Il materiale biologico raccolto verrà conservato e quindi studiato in laboratorio ed elaborato statisticamente seguendo lo stesso approccio metodologico riportato per il benthos dei fondi incoerenti, naturalmente verrà determinata anche la componente algale.

E' necessario evidenziare come lo schema di campionamento qui proposto sia da ritenersi migliorativo rispetto a quanto richiesto, perché:

- il prelievo utilizzerà entrambi i sistemi di raccolta, dati come alternativi nel capitolato (sorbona e grattaggio);
- il campionamento verrà integrato dalle osservazioni dirette e dalle riprese fotografiche, ottenendo un dato molto più robusto;
- l'utilizzo del protocollo Afrodite (repliche fotografiche) permette di ottenere dei dati sufficientemente descrittivi senza dover ricorrere al prelievo diretto di substrato, ed ha quindi impatto ambientale nullo.

4.2.3 Strumenti e metodologie di campionamento per la caratterizzazione e valutazione delle praterie di Posidonia oceanica

Sulle praterie di Posidonia oceanica interessate dalle attività di dragaggio verranno effettuati dei campionamenti per la stima dei descrittori strutturali (densità e copertura) e funzionali (fenologia) e per il monitoraggio del loro limite inferiore.

Stima dei descrittori strutturali (macroripartizione) e funzionali

La macroripartizione è un descrittore fondamentale della struttura della prateria di Posidonia oceanica, questa comprende la stima della copertura, della densità assoluta e della densità relativa. La densità della vegetazione, intesa come numero di fasci fogliari per m² (Giraud, 1977), rappresenta uno dei principali descrittori sintetici dello stato di salute delle praterie.

La copertura è espressa come percentuale (%) di substrato ricoperto dalle piante, rispetto a quello non ricoperto (sabbia, roccia “matte” morta etc.). Questo ricoprimento verrà valutato tramite stime visive al fine di misurare i parametri riportati in Tabella 3.

Le stime dei descrittori strutturali e funzionali verranno effettuate con due tempistiche; una prima serie di campionamenti durante l'opera di dragaggio ed una seconda dopo 4 anni, al termine del monitoraggio.

Strumentazione per il campionamento

I campionamenti si eseguiranno in immersione con autorespiratori, attraverso l'utilizzo di quadrati di riferimento 40x40 cm per la conta dei fasci fogliari che permetterà di stimare la densità fogliare assoluta della praterie, e di una cima metrata per la valutazione della copertura del substrato da parte delle piante.

Procedura di campionamento e prelievo dei campioni per le analisi fenologiche

Densità

Per la misura della densità assoluta e della copertura si effettueranno campionamenti al centro delle praterie; secondo il manuale di riferimento tali stazioni vengono poste ad una profondità di 15 metri, ma tale profondità verrà valutata in base alla morfologia di ogni sito. La strategia di campionamento utilizzata sarà di tipo gerarchico che permette di avere una confidenza statistica più elevata, e di ridurre la probabilità di includere errori di interpretazione dei dati dovuti alla variabilità naturale della prateria. Verranno definite 3 aree di 400m² circa ciascuna, distanziate di 10m tra loro e in ciascuna di esse verranno eseguite 3 repliche per le misure di densità. Le repliche in una stessa area devono essere distanziate tra loro di almeno 1 metro. L'ultima replica in un'area e la prima replica dell'area seguente, dovranno essere distanziate di circa 10 metri. In totale verranno effettuate quindi 9 misure di densità.

In alternativa al campionamento gerarchico verrà eseguito un campionamento casuale che

prevederà il lancio casuale del quadrato di riferimento 40 x 40 cm da parte dell'operatore subacqueo ad un'altezza di circa 1 m dal fondale.

Copertura

Per la percentuale di fondo ricoperto dalla pianta, in ogni stazione si effettuerà una stima visiva da due operatori che valuteranno indipendentemente la porzione di substrato ricoperto da *Posidonia oceanica* viva, all'interno di un'area di circonferenza di 5 metri di raggio (disegnata attorno a un punto fisso). I due operatori esprimono le loro stime (%) visive; la media tra le due stime fornisce il valore di ricoprimento (Buia et al., 2003).

Parametro	Unità di misura	Sintesi
Continuità della prateria	1=continuo 2=discontinuo	1-2
Copertura % matte morta	%	%
Copertura % <i>P. oceanica</i> viva	%	%
Copertura % <i>Caulerpa racemosa</i>	%	%
Copertura % <i>Cymodocea nodosa</i>	%	%
Tipo substrato	1= roccia 2= sabbia 3= matte	1-2-3
Fonti di disturbo evidenti	1= pres.za 2= ass.za	pres/ass
Composizione prateria	1= pura 2= mista	1-2
Presenza alghe alloctone	1= <i>Caulerpa racemosa</i> 2= <i>Caulerpa taxifolia</i> 3= entrambi	1-2-3

Tab. 4.2.3-1. Misure da effettuare all'interno e sul limite inferiore della prateria e relativi riferimenti MATTM

Fenologia

Le indagini fenologiche riguardano le strutture anatomiche visibili della pianta e saranno effettuate nelle 3 aree nelle quali è stata stimata la densità fogliare; per ogni area verranno prelevati 6 rizomi ortotropi (non terminali e non in divisione) per un totale di 18 rizomi per ogni stazione di campionamento. I rizomi verranno raccolti in sacchetti di plastica all'interno dei quali verranno inserite etichette prenumerate.

Conservazione dei fasci di *Posidonia oceanica* prelevati

I rizomi verranno conservati umidi e al buio fino all'arrivo in laboratorio in contenitori termici. Nel caso in cui non venisse subito effettuata l'analisi morfometrica, i campioni verranno conservati a -20°C.

Monitoraggio del limite inferiore delle praterie di Posidonia oceanica

Per le quattro maggiori praterie identificate nell'area di studio sarà necessario impiantare dei punti di riferimento permanenti per poter seguire la dinamica del limite inferiore della prateria, il quale, essendo ecologicamente più fragile rispetto a quello superiore, testimonia sinteticamente la dinamica dell'intera prateria.

Per tali fini si utilizzerà come modello il protocollo adottato dal Réseau de Surveillance Posidonies (Bertrand et al., 1986). Questo protocollo prevede l'uso di aste metalliche da collocare sul fondo e segnalate con galleggianti sommersi.

Procedura di posizionamento dei picchetti

Ciascuna asta metallica è munita di un anello centrale per l'installazione di un galleggiante numerato e reca alla sommità un'etichetta con il relativo numero e data di impianto.

Verrà valutato il numero di aste da posizionare lungo il limite inferiore in base alla profondità cui esso si trova e alla dimensione della prateria studiata. Tali aste saranno installate secondo la procedura di seguito descritta:

- ÷ identificazione del limite inferiore della prateria;
- ÷ marcatura con un picchetto del punto centrale scelto;
- ÷ posizionamento geografico del punto centrale con la migliore precisione possibile.

I picchetti verranno disposti ad una distanza reciproca compresa tra i 3 ed i 6 m e a stretto contatto con il limite inferiore. Per essere individuate più facilmente nelle successive immersioni di controllo, le aste sporgeranno dal fondo di circa 50-60 cm e saranno contrassegnate da targhettoni numerate. A circa 1,5 metri da ciascuna asta, a valle rispetto al limite della prateria, verrà installato un picchetto testimone che servirà da appoggio per le riprese fotografiche successive. Queste ultime si realizzeranno in tre fasi, una centrata sul picchetto e altre due rispettivamente a destra e a sinistra di questo. Le riprese si effettuano in orizzontale, ad un'altezza di 0,5 m rispetto al fondo con obiettivo da 35 mm.

In ogni sito, in una banda di 10 metri di larghezza a monte del limite lungo la linea dei picchetti, vengono rilevati dati elencati nella Tabella 4.2.3-2.

Parametro	Unità di misura	Sintesi
Scalzamento dei rizomi ortotropi	centimetri	cm
Scalzamento dei rizomi plagiotropi	centimetri	cm
Profondità limite inferiore	metri	m
Tipo di limite	1=netto 2=progressivo 3=erosivo 4=regressivo	1-2-3-4
Scalzamento della prateria	% n. rizomi scalzati/n. rizomi totali	%
Portamento rizomi (% rizomi plagiotropi)	% rizomi plagiotropi	%
Distanza dal picchetto n.1 al limite inf.	centimetri	cm
Distanza dal picchetto n.2 al limite inf.	centimetri	cm
Distanza dal picchetto n.3 al limite inf.	centimetri	cm
Distanza dal picchetto n.4 al limite inf.	centimetri	cm
Distanza dal picchetto n.5 al limite inf.	centimetri	cm
Distanza dal picchetto n.6 al limite inf.	centimetri	cm
Distanza dal picchetto n.8 al limite inf.	centimetri	cm
Distanza dal picchetto n.9 al limite inf.	centimetri	cm
Distanza dal picchetto n.10 al limite inf.	centimetri	cm

Tab. 4.2.3-2. Parametri rilevati per il monitoraggio del limite inferiore delle praterie di Posidonia oceanica

In dettaglio la misura di tali parametri prevede le seguenti procedure:

- profondità del limite inferiore: misurata all'altezza di ogni balise (10-11 repliche);
- tipo di limite inferiore: video o fotografia lungo il transetto. Il limite inferiore viene poi caratterizzato in uno dei 4 limiti definiti da Meinesz & Laurent (1978);
- scalzamento della prateria e portamento dei rizomi (% di rizomi plagiotropi): possono essere misurati direttamente nello stesso quadrato utilizzato per misurare la densità; contare il numero di rizomi scalzati e di rizomi plagiotropi presenti nel quadrato e rapportarlo al numero totale di rizomi (conte di densità);
- scalzamento dei rizomi in cm: definito da Boudouresque et al. (1984) è la distanza tra il sedimento e la base delle foglie per i rizomi ortotropi, o la distanza tra il sedimento e la parte inferiore dei rizomi per i rizomi plagiotropi. Lo scalzamento in cm è misurato per 6 singoli

rizomi ortotropi, selezionati casualmente, in corrispondenza del limite e a una distanza minima tra fasci di 1m. Questa distanza è misurata con l'aiuto di una distanza di riferimento (per esempio una porzione della lavagnetta graduata);

- distanza dall'asta metallica: Saranno effettuate le riprese fotografiche come specificato nelle Metodologie Analitiche di riferimento del Programma di Monitoraggio 2001-2007 (Cicero, Di Girolamo (Ed), 2001):

- 3 riprese in orizzontale (centrale, laterale destra e sinistra) ad altezza di 0,5 m dal fondo, utilizzando il picchetto già installato a circa 1,5 m dal balise, a valle rispetto al limite della prateria; una fotografia dall'alto, al di sopra del balise (perpendicolare), ad una distanza di circa 1,5 m da questo.

In corrispondenza di uno o due picchetti si esegue poi il prelievo di sedimento per le analisi granulometriche.

Sulla scheda di campo verranno riportate le indicazioni relative allo stato del litorale prospiciente la prateria studiata (presenza di opere portuali, insediamenti urbani e/o agricoli, foci di fiumi, presenza di banquettes ecc.).

Il monitoraggio del limite inferiore prevede rilievi con cadenza annuale durante il quale verranno eseguite tutte le procedure appena descritte.

Campionamento su transetto orizzontale (stazione sul limite inferiore)

Sul limite inferiore indagato, la strategia di campionamento dovrà essere realizzata lungo un transetto orizzontale, in corrispondenza dei balises (i.e. transetto di 50-60m).

Verranno effettuati:

- 6 repliche per le misure di densità,
- 6 prelievi di fasci ortotropi.

Le repliche saranno casuali lungo il transetto e distanziate tra loro minimo 1m (idealmente ogni replica è presa su una porzione diversa del balisage – i.e. una porzione è definita da 2 balises successivi). Verranno anche in questo caso valutate: la percentuale ricoprimento della P. oceanica, tipo di substrato, continuità della prateria, la percentuale di matite morta, la percentuale di *Caulerpa racemosa*, la percentuale di *Cymodocea nodosa*, lungo la totalità del transetto.

Durante il monitoraggio annuale del limite inferiore delle praterie verranno effettuate stime di densità assoluta e relativa e di copertura del substrato; non verranno, invece, prelevati campioni

per le analisi fenologiche per limitare l'impatto sulla prateria.

4.3. Operazioni in laboratorio

4.3.1 Analisi delle comunità bentoniche di fondo mobile e di fondo roccioso

Smistamento dei campioni

In laboratorio verranno svolte le operazioni di smistamento e identificazione specifica degli organismi campionati. Lo smistamento consiste nel separare gli organismi da identificare dal materiale inorganico residuo da eliminare. Ogni campione verrà risciacquato con acqua dolce su un setaccio certificato di maglia uguale o superiore a quello usato durante il campionamento al fine di eliminare la soluzione fissativa.

Il materiale risciacquato verrà successivamente posto in una vaschetta di plastica bianca di dimensioni adeguate alla grandezza del campione e verrà successivamente analizzato allo stereomicroscopio all'interno di capsule Petri. Il campione verrà smistato in maniera sistematica, separando gli organismi nei taxa prioritari (Policheti, Molluschi, Crostacei ed Echinodermi) che verranno poi identificati fino al raggiungimento del più basso livello tassonomico possibile.

Identificazione e quantificazione degli organismi

Per l'identificazione al livello tassonomico più basso si farà riferimento ai fascicoli della “Checklist delle specie della fauna italiana” relativi alla fauna bentonica marina (fascicoli nn. 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 108, 109) (Minelli et al. 1995). Per ogni specie verrà indicata l'appartenenza alle biocenosi-tipo mediterranee in base alla standardizzazione di Pérès & Picard (1964).

Gli organismi smistati verranno contati e poi conservati in contenitori di plastica contenenti etanolo al 70%; i contenitori avranno un'etichetta all'interno (carta da lucido con la scritta a matita) e all'esterno, in cui vanno indicate la sigla o nome del progetto, la data di campionamento, la sigla della stazione, la replica, il gruppo sistematico di appartenenza. Verrà inoltre compilata una “scheda laboratorio” in cui saranno riportate, oltre alle caratteristiche relative al campione (data campionamento, sigla stazione, replica), anche la data in cui si è effettuato lo smistamento, il tempo impiegato, il nome dell'operatore e qualunque nota relativa al campione ritenuta utile.

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua. Si articola in due prove, una “presuntiva” e una “di conferma”.

Analisi granulometriche dei campioni di sedimento

Per il protocollo di analisi granulometrica da effettuare sui campioni di sedimento raccolti si rimanda all' Allegato 5 riguardo il “Monitoraggio del dragaggio dei fondali”.

4.3.2. Analisi fenologiche dei campioni di Posidonia oceanica

I fasci fogliari raccolti in ognuna delle stazioni di campionamento saranno trasportati in laboratorio, dove saranno realizzate le analisi fenologiche. Tutti i campioni saranno sciacquati con acqua dolce prima di essere analizzati, qualora siano stati precedentemente congelati, dovranno essere scongelati il giorno precedente a quello di analisi per evitare l'eventuale lacerazione fogliare.

Le misurazioni, da effettuare su 18 ciuffi per punto di campionamento per le stazioni a 10m, e su 6 ciuffi per le stazioni del limite inferiore riguarderanno i descrittori morfometrici fondamentali delle foglie, ed in particolare:

- larghezza delle foglie giovanili;
- lunghezza totale delle foglie giovanili;
- lunghezza totale delle foglie intermedie;
- lunghezza tessuto bruno delle foglie intermedie;
- larghezza delle foglie adulte;
- lunghezza tessuto bruno foglie adulto;

Per effettuare tali misurazioni i ciuffi fogliari verranno aperti mediante l'utilizzo di una pinzetta procedendo dalla foglia più esterna a quelle più interne, alternativamente a destra e a sinistra e disponendo le foglie in successione di classe decrescente.

Dopo le misurazioni, le foglie verranno separate nelle seguenti categorie:

giovanili, lunghe meno di cinque centimetri e senza ligula;

intermedie, lunghe più di cinque centimetri e senza ligula;

adulte, con ligula.

Si ricava il numero di foglie sia totale che per categoria (foglie adulte, intermedie e giovanili).

4.4. Trattamento e restituzione dei dati

Qui di seguito vengono riportati i metodi di analisi statistica che verranno effettuati sulle comunità bentoniche campionate e sulle misurazioni dei parametri fenologici dei fasci di Posidonia oceanica. Al termine delle analisi statistiche verrà redatto un report finale con la descrizione delle attività svolte e dei risultati ottenuti.

4.4.1. Analisi dei dati delle comunità bentoniche dei fondi mobili e rocciosi

Analisi statistica

Per ogni stazione di campionamento verrà ricostruita separatamente la lista delle specie e l'abbondanza (numero di individui per bennata) di ciascuna specie per ognuna delle 3 repliche effettuate.

Le forme coloniali (poriferi, cnidari e briozoi), i foraminiferi, i platelminti, i nemertini, i nematodi, gli oligocheti e gli emicordati, possono non essere quantitativamente rappresentati nel campione; verranno comunque riportati nella lista specie ma esclusi dall'analisi statistica. A partire invece dalla lista di specie riferita al campione totale e al numero di individui totali riportati al m² (ottenuta unendo tra loro le 3 liste di specie e sommandole relative abbondanze) si calcoleranno i seguenti parametri strutturali della comunità:

- numero di specie;
- numero di individui di ogni specie;
- indice di diversità specifica (SHANNON & WEAVER, 1949);
- indice di ricchezza specifica (MARGALEF, 1958);
- indice di equiripartizione o “evenness” (PIELOU, 1966);
- indice di dominanza (SIMPSON, 1949).

Si tratta di parametri indicatori del grado di complessità delle biocenosi studiate che prescindono dalle caratteristiche e dalle esigenze delle singole specie che le compongono.

L'indice di diversità specifica , H' (SHANNON & WEAVER, 1949) tiene conto sia del numero di specie presenti che del modo in cui gli individui sono distribuiti fra le diverse specie.

Viene calcolato con la seguente formula:

$$H' = - \sum_{i=1}^N n_i \log_2 n_i$$

dove N è il numero di specie ed n_i rappresenta il rapporto tra il numero di individui della specie e il numero di individui totali del campione

L'indice di ricchezza specifica, D (MARGALEF, 1958), prende in considerazione il rapporto tra il numero di specie totali e il numero totale di individui in una comunità. Quante più specie sono presenti nel campione, tanto più alto sarà tale indice. Viene calcolato con la seguente formula:

$$D = (S - 1) / \log N$$

dove S è il numero totale di specie della comunità ed N il numero totale di individui.

L'indice di "evenness", J (PIELOU, 1966), risulta compreso tra 0 e 1 e prende in considerazione la distribuzione degli individui nell'ambito delle varie specie che compongono una comunità. Tale indice presenta il valore massimo nel caso teorico in cui tutte le specie siano presenti con la stessa abbondanza, mentre presenta un valore basso nel caso in cui ci sia una sola specie abbondante e numerose specie rare. Viene calcolato con la seguente formula:

$$J = H' / \log_2 S$$

dove H' è il valore dell'indice di Shannon-Weaver per quella comunità ed S il numero delle specie.

L'indice di dominanza, c (SIMPSON, 1949), misura la prevalenza di poche specie nella comunità ed ha un andamento inverso rispetto all'indice di "evenness". Un'elevata dominanza significa che una o poche specie hanno il monopolio delle risorse. Viene calcolato con la seguente formula:

$$c = \sum_{i=1}^S (n_i / N)^2$$

dove n_i è il valore di importanza di ogni specie ed N il numero totale dei valori di importanza (individui).

Per l'analisi dei dati relativi ai popolamenti bentonici possono essere impiegate due tecniche di analisi dei dati di natura prettamente descrittiva, in caso di mancanza di ipotesi specifiche da testare. In particolare, si potrà fare ricorso all'Analisi delle Corrispondenze per l'ordinamento dei dati ed ad un clustering gerarchico basato sull'algoritmo del legame completo per la classificazione.

L'Analisi Fattoriale delle Corrispondenze, o più semplicemente Analisi delle Corrispondenze, è una tecnica di ordinamento di grande interesse in ecologia (Benzecri et al., 1973). A differenza di altre tecniche, quali ad esempio l'Analisi delle Componenti Principali, l'Analisi delle Corrispondenze consente di rappresentare simultaneamente i punti-variabile ed i punti-osservazione, con coordinate tali da rendere massima la correlazione fra i due insiemi per ogni fattore.

La dualità di questo tipo di analisi, tuttavia, non è il suo unico pregio. Una caratteristica di enorme interesse dell'Analisi delle Corrispondenze è l'equivalenza distribuzionale. In pratica, poichè ad essere analizzati sono sostanzialmente dei profili, il risultato globale dell'analisi non cambia se, ad esempio, le osservazioni relative a due entità tassonomiche la cui separazione è dubbia vengono cumulate o mantenute separate. Analogamente, se un'osservazione è replicata con risultati coerenti, può essere indifferentemente cumulata alla precedente o trattata come una nuova osservazione.

L'Analisi delle Corrispondenze può essere effettuata in tre fasi principali: calcolo di una matrice simmetrica di prodotti scalari, calcolo degli autovalori e degli autovettori di tale matrice ed infine calcolo delle coordinate e dei contributi assoluti (cioè dei contributi delle osservazioni e delle variabili agli assi fattoriali) e relativi (cioè degli assi fattoriali alla descrizione di osservazioni e variabili).

La qualità della rappresentazione ottenuta nello spazio ridotto definito dagli assi fattoriali può essere stimata sulla base degli autovalori estratti, per quanto riguarda la qualità globale dell'ordinamento ed il grado di strutturazione del sistema, e sulla base dei contributi relativi per quanto riguarda i singoli taxa e le singole stazioni.

La matrice dei dati $A_{n \times p}$ sarà organizzata in modo tale che risulti $p \leq n$, al fine di ottimizzare le procedure di calcolo. Ciò implica, nella maggior parte dei casi, che le osservazioni corrispondano alle righe ed i descrittori alle colonne, poichè le prime dovrebbero essere comunque più numerose

dei secondi. Un caso tipico in cui ciò non si verifica, tuttavia, è quello, peraltro assai frequente, in cui si debbano trattare delle liste di specie osservate in un insieme di stazioni: in questo caso è del tutto normale che le specie (cioè i descrittori) siano molto più numerose delle stazioni (cioè delle osservazioni).

La matrice A, così organizzata, viene trasformata nella matrice U, in cui

$$u_{ij} = \frac{a_{ij}}{\sqrt{a_i a_j}} - \frac{\sqrt{a_i a_j}}{a}$$

La matrice U contiene dunque gli scarti degli elementi di A pesati sulla media geometrica delle somme marginali di riga e di colonna rispetto alla stessa media geometrica pesata sul totale generale.

La matrice dei prodotti scalari S, di rango p, si ottiene quindi moltiplicando la tale matrice per la sua trasposta U'

$$S = U'U$$

Si calcolano quindi gli autovalori λ_j [$j=1,2,\dots,m$; $m \leq p-1$] e gli autovettori v_{jh} [$j=1,2,\dots,p$; $h=1,2,\dots,m$] della matrice S. Si noti che, poichè non è strettamente necessario calcolare tutti gli autovalori e gli autovettori, spesso ci si limita ad estrarre solo i primi 2 o 3, i quali, peraltro, sono in generale largamente sufficienti ai fini dell'analisi.

Si calcolano quindi le coordinate delle osservazioni:

$$f_{ih} = \sum_{j=1}^p \frac{a_{ij} v_{jh}}{a_i \sqrt{\frac{a_j}{a}}}$$

per gli h assi fattoriali richiesti. Si passa poi alle coordinate delle variabili:

$$g_{jh} = \sum_{i=1}^n \frac{a_{ij} f_{ih}}{a_j \sqrt{\lambda_h}}$$

Successivamente si calcolano i contributi assoluti all'h-mo fattore da parte della i-ma osservazione e della j-ma variabile:

$$c_a(f_{ih}) = f_{ih}^2 \frac{a_i}{a \lambda_h}$$

$$c_a(g_{jh}) = g_{jh}^2 \frac{a_j}{a \lambda_h}$$

Infine, si calcolano i contributi relativi dell'h-mo fattore, all'i-ma osservazione ed alla j-ma variabile:

$$c_r(f_{ih}) = \frac{f_{ih}^2}{\sum_{h=1}^m f_{ih}^2}$$

$$c_r(g_{jh}) = \frac{g_{jh}^2}{\sum_{h=1}^m g_{jh}^2}$$

Va infine sottolineato il fatto che è anche possibile rappresentare in un secondo momento osservazioni e variabili supplementari nello spazio fattoriale definito dall'Analisi delle Corrispondenze.

Gli algoritmi di clustering gerarchico utilizzano una matrice di similarità (o distanza) fra gli oggetti come base per l'aggregazione di questi ultimi. E' importante sottolineare il fatto che la scelta del coefficiente di similarità (o distanza) risulta in molti casi addirittura più determinante di quella dell'algoritmo di clustering ai fini del conseguimento dei risultati desiderati. Tale scelta, dunque,

deve essere preceduta da una accurata esplorazione dell'informazione disponibile e da una chiara identificazione del tipo di relazione fra gli oggetti che si intende rappresentare.

I risultati di una procedura di clustering gerarchico possono essere rappresentati in diversi modi, anche se in prevalenza si preferisce utilizzare un dendrogramma. I legami orizzontali in un dendrogramma vengono chiamati nodi, mentre le linee verticali sono dette internodi. La distanza di un nodo dalla base del dendrogramma è proporzionale alla similarità (o distanza) fra i due oggetti o gruppi di oggetti di cui il nodo rappresenta la fusione. La similarità (o distanza) è di solito riportata su una scala al lato del dendrogramma. La disposizione relativa degli oggetti alla base del dendrogramma è vincolata solo in parte dalla struttura di quest'ultimo e, entro questi limiti, gli oggetti possono essere liberamente riarrangiati.

In molti casi è utile anche visualizzare l'andamento progressivo delle similarità (o distanze) a cui via via avvengono le fusioni fra oggetti o gruppi di oggetti. Questa rappresentazione è fornita dal diagramma di aggregazione, grazie al quale è possibile individuare facilmente le discontinuità più rilevanti incontrate nella procedura di clustering. Tali discontinuità, in molti casi, possono corrispondere a partizioni "naturali" dell'insieme di oggetti analizzati e costituiscono un utile riferimento laddove sia necessario ripartire questi ultimi in un certo numero di classi (es. se si usa la partizione ottenuta come un nuovo descrittore sintetico dell'insieme degli oggetti).

L'algoritmo del legame singolo (o nearest-neighbor) è certamente il più semplice fra quelli disponibili e deve il suo nome al fatto che la fusione fra due oggetti o gruppi di oggetti può avvenire se la distanza fra due oggetti non appartenenti allo stesso gruppo è la più bassa fra quelle possibili. Una soluzione affine a quella appena descritta da un punto di vista procedurale, ma completamente opposta per ciò che riguarda le regole di fusione dei gruppi è quella che prevede l'uso dell'algoritmo del legame completo (o farthest-neighbor), proposto da Sørensen (1948).

In questo caso, infatti, si ammette la fusione di due gruppi di oggetti soltanto se tutte le distanze fra coppie di oggetti non appartenenti allo stesso gruppo sono inferiori alla soglia che permetterebbe la fusione di un'altra coppia di gruppi.

Ciò garantisce una notevole omogeneità intra-gruppo, favorendo la formazione di gruppi a cui appartiene un numero non troppo variabile di oggetti, poichè quanto più un gruppo è numeroso, tanto più è difficile che esso sia nel suo interezza sufficientemente simile ad un altro gruppo. In contrapposizione a quanto avviene per l'algoritmo del legame singolo, in questo caso si verifica una dilatazione dello spazio di riferimento intorno ai gruppi già formati che è proporzionale alla loro

dimensione.

Le particolari caratteristiche dell'algoritmo del legame completo rendono quest'approccio particolarmente adatto ad applicazioni ecologiche, soprattutto quando si vogliono individuare le discontinuità più rilevanti in un insieme di dati.

Trattamento dei dati sedimentologici

I risultati analitici, espressi in percentuale (come rapporto tra il peso della frazione granulometrica ed il peso del campione totale), verranno rappresentati sotto forma tabellare, suddividendo il campione nelle classi granulometriche secondo la scala di Udden-Wentworth. Ogni campione, descritto secondo i principali parametri statistici relativi al phi medio, al coefficiente di cernita, allo Skewness e al Kurtosis, verrà classificato attraverso il diagramma triangolare proposto da Shepard (1954).

Valutazione dell'Elemento di Qualità Biologica “Macroinvertebrati di fondo mobile”

Attualmente la composizione e l'abbondanza degli invertebrati bentonici sono state inserite dalla direttiva europea sulle acque (Water Framework Directive, WFD, 2000/60/EC) come uno degli elementi biologici da utilizzare, in associazione agli elementi chimico-fisici per definire lo stato di qualità ecologica (EcoQS), degli ambienti acquatici. Questa direttiva obbliga gli stati membri a classificare tutte le tipologie di acque, interne e marine, in cinque categorie (classi ecologiche) comprese fra “alto” stato ecologico (condizioni prive di disturbo) e “pessimo” stato ecologico (condizioni di elevato disturbo).

Negli ultimi anni sono stati proposti ed esaminati numerosi indici bentonici come strumento per valutare la qualità ecologica nell'ambiente marino (Occhipinti-Ambrogi e Forni, 2004; Salas et al., 2006). La maggior parte di tali indici si basano su specie, o altre unità tassonomiche, tra questi l'indice AMBI (ATZI's Marine Biotic Index) sviluppato nell'ambito di studi condotti lungo la costa atlantica, e proposto come indice biotico per valutare lo stato ecologico dei fondi molli di acque costiere e salmastre.

Esso utilizza una lista di riferimento per la suddivisione delle specie in 5 gruppi ecologici in relazione a diversi gradi di tolleranza ad un progressivo incremento di stress dovuto principalmente ad un aumento di sostanza organica, come descritto da Grall & Glemarec (1997).

I 5 gruppi ecologici sono:

- Gruppo I: specie molto sensibili ad arricchimento organico, presenti in aree non impattate o leggermente impattate.
- Gruppo II: specie non influenzate dall'arricchimento organico, sempre presenti in basse densità, con variazioni non significative nel numero di individui.
- Gruppo III: specie che tollerano l'eccesso di sostanza organica; possono essere presenti anche in condizioni normali, di ambiente non stressato, ma i loro popolamenti sono stimolati dall'arricchimento organico.
- Gruppo IV: specie opportuniste di secondo ordine.
- Gruppo V: specie opportunistiche di primo ordine; detritivori, che proliferano nei sedimenti anossici.

L'indice viene calcolato mediante un apposito software, AMBI© ver.4.0, che si basa su una lista di specie e relativo gruppo ecologico di appartenenza continuamente aggiornata. In alcuni casi la specie non è presente nella lista di riferimento e ciò rende impossibile un'assegnazione precisa; tuttavia, se non sono presenti valori discordanti, le specie non riconosciute sono considerate come appartenenti alla stessa categoria ecologica delle congeneriche.

L'AMBI è calcolato con la seguente formula:

$$AMBI = [(0 \times \%GI) + (1.5 \times \%GII) + (3 \times \%GIII) + (4.5 \times \%GIV) + (6 \times \%GV)] / 100$$

in base ai valori assunti, compresi tra 0 e 6, è possibile classificare le aree di studio seguendo lo schema proposto dagli autori (Borja et al., 2000; Muxika et al., 2005) nella Tabella 4.4.1-1.

Valore di AMBI	Classificazione dell'area
$0 < AMBI \leq 1.2$	Alto
$1.2 < AMBI \leq 3.3$	Buono
$3.3 < AMBI \leq 4.3$	Moderato
$4.3 < AMBI \leq 5.5$	Povero
$5.5 < AMBI \leq 6$	Pessimo

Tab. 4.4.1-1: Intervallo dei valori dell'AMBI per la valutazione dello stato degli ecosistemi marini di fondi mobili

Negli ultimi anni è stato sviluppato un altro indice cumulativo in cui vengono combinati l'indice di diversità di Shannon, l'indice AMBI e la ricchezza specifica, con lo scopo di integrare in un unico indice più variabili descrittive delle comunità bentoniche in esame. Tale indice è chiamato m-AMBI (Multivariate AMBI) i cui valori assunti vengono partizionati nelle diverse classi di stato ecologico (Tabella 4.4.1-2).

Valore di m-AMBI	Classificazione dell'area
$0.82 < m\text{-AMBI}$	Alto
$0.62 < m\text{-AMBI} \leq 0.82$	Buono
$0.41 < m\text{-AMBI} \leq 0.61$	Moderato
$0.20 < m\text{-AMBI} \leq 0.40$	Povero
$0 < m\text{-AMBI} \leq 0.20$	Pessimo

Tab. 4.4.1-2. Intervallo dei valori del Multivariate AMBI

La modalità di calcolo dell'm-AMBI prevede l'elaborazione delle suddette metriche con tecniche di analisi statistica multivariata. Il valore dell'm-AMBI varia tra 0 ed 1 e corrisponde al Rapporto di Qualità Ecologica (RQE) richiesto dalla Direttiva 2000/60/CEE.

Tali indici verranno utilizzati per definire lo stato di qualità delle comunità bentoniche di fondo mobile campionate.

*4.4.2. Analisi dei dati delle praterie di *Posidonia oceanica**

Macroripartizione

La densità assoluta sarà ottenuta come valore medio dei dati rilevati nei singoli quadrati ed espressa in numero di fasci m^{-2} (Giraud, 1977), mentre la densità relativa sarà calcolata correggendo la densità assoluta in funzione del ricoprimento del substrato stimato in decimi. I dati di densità saranno rapportati anche alle 5 classi proposti da Giraud (1977). Sulla base di queste classi si può determinare lo stato di salute di una prateria e individuare la presenza di gradienti di densità al suo interno.

Calcolo dei parametri fenologici

Sulla base delle misurazioni effettuate sull'apparato fogliare, saranno calcolati i seguenti parametri fenologici:

- numero medio foglie per ciuffo delle varie categorie ed in totale;
- coefficiente A adulte (percentuale di apici rotti sul numero totale di foglie adulte);
- coefficiente A intermedie (percentuale di apici rotti sul numero totale di foglie intermedie);
- lunghezza media delle foglie per categorie ed in totale;
- larghezza media delle foglie per categorie ed in totale;
- indice fogliare (LAI) per fascio e per m^2 calcolato con la seguente formula:

$$\text{Indice fogliare per fascio} = \frac{\text{lunghezza del tessuto verde} \times \text{larghezza delle foglie}}{n^{\circ} \text{ di fasci analizzati}}$$

L'indice fogliare per m^2 sarà ottenuto moltiplicando l'indice fogliare per fascio per la densità dei fasci nella stazione di campionamento.

I parametri fenologici possono fornire una descrizione estremamente sintetica dello stato di vitalità delle piante che costituiscono la prateria. In particolare, gli indici fogliari esprimono la vitalità della pianta e soprattutto le sue variazioni nel tempo.

5. TRATTAMENTO E RESTITUZIONE DEI DATI

I dati provenienti dalle diverse attività di monitoraggio saranno processati ed elaborati dal personale del Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina della Toscana.

I risultati provenienti dall'analisi, dall'elaborazione e dalla caratterizzazione delle diverse matrici ambientali considerate saranno raccolti in rapporti tecnici dettagliati.

Tutti i dati acquisiti nel corso del monitoraggio saranno inoltre raccolti in un database informatico organizzato, messo a punto dal Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina, che verrà messo a disposizione dell'Autorità Portuale di Civitavecchia.