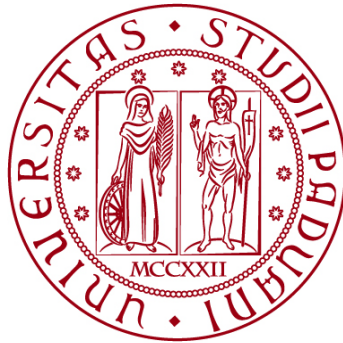


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Scienze Naturali



ELABORATO DI LAUREA

**CARATTERIZZAZIONE DI SEDIMENTI MARINI MEDIANTE
SAGGI ECOTOSSICOLOGICI E ANALISI MICROBIOLOGICHE
SECONDO IL DECRETO LEGISLATIVO 173/2016**

Tutor: Prof. Valerio Matozzo
Dipartimento di biologia

Co-tutor: Dott.ssa Martina Lorenzetto
AGROLAB Italia SRL

Laureanda: Michela Pianalto

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

1. Introduzione.....	1
1.1 I sedimenti marini.....	1
1.2 La normativa italiana	2
2. Scopo della tesi.....	3
3. Materiale e metodi.....	4
3.1. Modalità di campionamento e conservazione	4
3.2 Analisi Microbiologica: <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	5
3.2.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	5
3.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
3.3. Analisi ecotossicologica: <i>Paracentrotus lividus</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	8
3.3.1 Preparazione dell'elutriato	8
3.3.3 Saggi con <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	16
3.4 SediquaSoft.....	18
4. Risultati e discussione.....	19
4.1 Saggi microbiologici.....	19
4.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	19
4.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
4.2 Saggi ecotossicologici	23
4.2.1 <i>Paracentrotus lividus</i>	23
4.2.2 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	25
4.3 Analisi dei risultati con SediquaSoft	28
5. Conclusioni	29
6. Letteratura citata.....	30
7. Sitografia	34
Appendice	35

1. Introduzione

Per adempiere alle normative vigenti in campo ambientale per le terze parti che necessitano di movimentare sedimenti marini (es. costruzione di porti, ripascimento ecc.), è indispensabile effettuare determinate operazioni, tra cui in primis la caratterizzazione del sedimento. Questo processo permette di descrivere le caratteristiche del campione prelevato, mediante operazioni che rispettano protocolli e linee guida certificati. L'applicazione di una batteria selezionata di analisi biologiche di tossicità, nota anche come profilo di tossicità, è stata proposta come strumento integrato basato sugli effetti a carico degli organismi per la valutazione della qualità ambientale (Vethaak et al., 2017).

Secondo le indicazioni di ISPRA (Istituto superiore per la protezione e la ricerca ambientale), affinché l'analisi sia efficace, la batteria minima deve essere composta da almeno tre organismi. Nel seguente studio, infatti, sono state usate quattro specie di organismi in saggi differenti. Per i test ecotossicologici si utilizzano in genere i seguenti organismi: larve del riccio di mare *Parecentrotus lividus* e la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum*. Le analisi biologiche con microrganismi si effettuano su sedimenti contaminati da *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Eseguendo la caratterizzazione si può osservare come reagiscono i diversi organismi a contatto con il sedimento in studio. Tutti i risultati ottenuti alla fine, si elaborano tramite il software Sediqualssoft che fornisce il livello di pericolosità dei sedimenti in esame. Tali operazioni possiedono una grande importanza ambientale, in quanto permettono di monitorare lo stato e la qualità dei sedimenti, al fine di salvaguardare l'ambiente circostante.

1.1 I sedimenti marini

Secondo la definizione di ISPRA, con il termine sedimento si intende materiale di composizione variabile proveniente dalla frantumazione di rocce e depositato in seguito ad un trasporto di durata variabile dal luogo di origine. La causa della disgregazione delle rocce affioranti può essere dovuta all'alterazione delle sue caratteristiche originarie a causa di fenomeni fisici (erosioni, variazioni di temperatura...), chimici (lisciviazione, carsismo) e biologici (organismi che incidono sullo stato della roccia) che agiscono per lo più in concomitanza fra loro. Il risultato di queste azioni, è la formazione di detriti solidi e di materiale in soluzione nell'acqua. Ciò che si deposita in occasioni di piene, di conseguenza derivante da corsi d'acqua effimeri, in questo contesto non è considerato sedimento, in quanto prevalentemente soggetto ad alterazioni fisica, chimica, biologica, ed antropica sub-aerea (ISPRA, 2009)

La granulometria delle particelle di sedimento risulta essere fine con diametro minore di 2 mm e spesso si tratta di materiale sommerso, a contatto con una fase liquida. I sedimenti vengono sottoposti ad analisi per verificare la presenza, la quantità e la distribuzione di eventuali costituenti chimici presenti nelle acque superficiali. Il vantaggio nell'utilizzare i sedimenti nelle analisi ambientali è la loro stabilità temporale. A differenza della colonna d'acqua, dove le concentrazioni di inquinanti possono variare di ora in ora, nei sedimenti possono rimanere stabili anche per mesi (APAT, documento online). La distribuzione delle caratteristiche fisiche dei sedimenti è correlata alla distribuzione spaziale dei contaminanti; è assodato che nella frazione di sedimento fine (<0,063 mm), costituita principalmente da argille/limi, vi è una concentrazione più elevata di contaminanti. Il sedimento di granulometria fine, si accumula nelle zone a bassa-energia, come in bacini e in aree profonde, invece la frazione con una granulometria grossolana tendono a depositarsi in acque a rapido scorrimento o soggette a particolari processi idrodinamici, come moti turbolenti. La conoscenza del contesto idrodinamico e sedimentario è fondamentale per la scelta dei siti di campionamento (ISPRA, 2009). La comunità scientifica utilizza la caratterizzazione dei sedimenti allo scopo di verificare la contaminazione degli ecosistemi marini e i conseguenti effetti sulla componente biologica. Si effettuano, di conseguenza, analisi tramite movimentazioni dei sedimenti, soprattutto quelli portuali che risultano essere più inquinanti. È un'attività gestionale effettuata periodicamente, ma che può alterare l'ambiente marino. L'art. 109 del D.Lgs. 152/06 "Norme in materia ambientale" disciplinato in modo dettagliato dall'allegato tecnico D.M. 173/16, autorizza la movimentazione dei sedimenti portuali al fine di regolamentare tali operazioni (Renzi e Provenza, 2020).

1.2 La normativa italiana

Il nuovo assetto normativo nazionale sulle caratteristiche del trattamento dei sedimenti marini è definito dal D.M. 173/16 del 15 luglio 2016, entrato in vigore il 21 settembre 2016 e rappresenta l'allegato tecnico all'art. 109 del D. Lgs 152/2006 che riassume le procedure operative. Tali procedure illustrano:

- i materiali occorrenti;
- la loro gestione nelle aree costiere marine;
- la definizione degli aspetti tecnici relativi al campionamento, all'analisi, alla gestione dei materiali, alla definizione dei programmi di monitoraggio ambientale per gli scavi a mare e operazioni di sversamento.

L'allegato tecnico è predisposto da ISPRA, CNR e Istituto Superiore di Sanità, con l'appoggio di CoNISMa, Regioni e ARPA ed è suddiviso in tre capitoli. Questi

descrivono in modo dettagliato la procedura tecnica per presentare l'istanza di autorizzazione.

1. Capitolo 1: raccolta di informazioni relative all'area interessata all'operazione tramite la "Scheda di inquadramento dell'area di escavo"
2. Capitolo 2: procedure per la caratterizzazione e classificazione dei materiali dell'area di escavo di fondali marini
3. Capitolo 3: indicazioni tecniche per la gestione dei materiali (modalità di escavo, trasporto, monitoraggio ambientale...) (Sito 1 in sitografia)

Si passa dal monitoraggio ambientale alla valutazione completa della qualità identificando la risposta ecotossicologica come un elemento chiave della valutazione relativa alla classificazione della qualità del materiale (Renzi e Provenza, 2020).

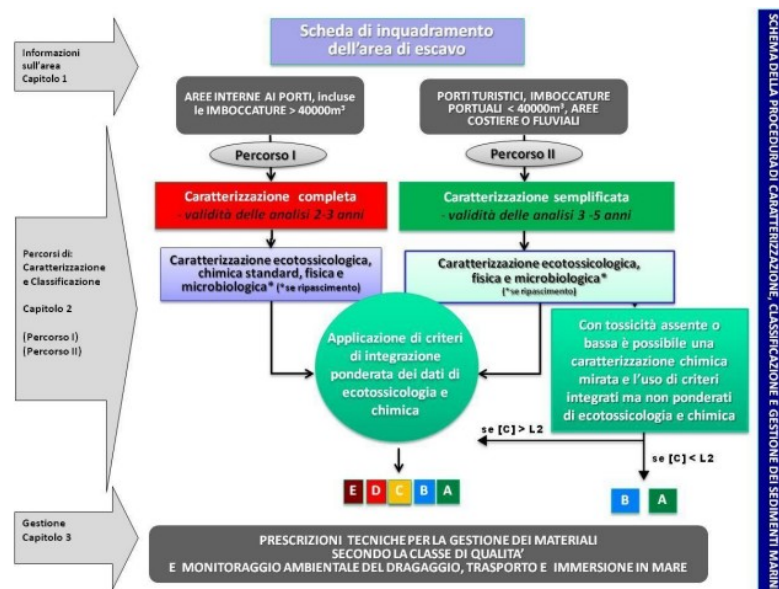


Figura 1: Quadro generale per la caratterizzazione, classificazione e gestione dei materiali (allegato tecnico DM 173, 2016).

In base alle linee guida dell'allegato si otterranno prescrizioni tecniche per la gestione dei materiali, secondo la classe di qualità ed un opportuno monitoraggio ambientale del dragaggio, trasporto e immissione in mare.

2. Scopo della tesi

Il laboratorio *Agrolab* Italia di Altavilla Vicentina si occupa di analisi ambientali. Durante il mio tirocinio di laurea sono state effettuate analisi su campioni rappresentativi di sedimento marino. Tale studio prevede:

- Allestimento di test ecotossicologici e microbiologici

- Svolgimento dei test, variabili in base all'organismo sottoposto allo studio
- Analisi dei risultati
- Screening ecotossicologico: definizione di eventuali rischi ambientali, a causa della presenza di patogeni o sostanze contaminanti

L'obiettivo è dunque la caratterizzazione di sedimenti marini, ossia il complesso di operazioni da attuare, vincolate da obiettivi, limiti di tempo, di spesa, disponibilità e attrezzatura. A. Mudroch e M. Azcue definiscono "caratterizzazione" come "raccolgere, nella maniera più efficiente possibile, campioni che rappresentano realmente le caratteristiche dei sedimenti nell'area di studio". In questo modo sarà possibile ricavare qualità e caratteristiche che rappresentano e descrivono al meglio il campione in esame (Pascarella, 2009). Sarà inoltre possibile identificare la classe di qualità dei sedimenti in dotazione all'azienda ospitante, operando analisi di tipo microbiologico ed ecotossicologico.

3. Materiale e metodi

3.1. Modalità di campionamento e conservazione

Il sedimento deve essere prelevato in un punto rappresentativo dell'area unitaria, ovvero la maglia quadrata di campionamento. La tecnica di campionamento utilizzata principalmente è quella del carotaggio, operazione che permette di prelevare tramite una carotiera una porzione di campione. Quest'ultimo deve rappresentare l'intero corpo al fine di valutare i volumi da sottoporre ad una eventuale procedura di intervento. Occorrono attenzione e precisione nella procedura, rispettando le specifiche richieste per il campionamento di un sedimento.

Qui di seguito si riportano le indicazioni principali:

- il sedimento deve essere indisturbato sia nella fase di recupero e prelievo sia in quella di estrusione del campione;
- la quantità di campione deve essere sufficiente a garantire tutte le analisi previste, compresa l'aliquota di riserva da conservare per eventuali approfondimenti e/o verifiche;
- il campione non deve essere contaminato dalla strumentazione o dall'equipaggiamento e per tale motivo si deve porre attenzione alla pulizia e alle sostanze detergenti utilizzate. Le attrezzature impiegate devono essere ripulite prima del loro rimpiego;
- la carota, ossia il campione prelevato, deve essere recuperata per intero, possibilmente in un'unica operazione senza essere miscelata e deve preventivamente essere decorticata dalla parte più esterna, a contatto con le pareti interne al carotiere, per evitare la contaminazione da trascinamento (ISPRA, documento online).

Prima di eseguire le analisi, dal campione devono essere rimosse manualmente possibili componenti di origine antropica (frammenti di plastica, vetro, metallo, ecc.) e naturale (ciottoli, organismi del macrobenthos) di dimensioni superiori a 5 mm. Durante il campionamento inoltre deve essere compilata una scheda di campo con tutte le informazioni riguardanti il prelievo (profondità, colore, consistenza).

Dopo il carotaggio il campione deve essere omogeneizzato e suddiviso in un determinato numero di aliquote in base al numero di analisi da effettuare.

In laboratorio si può procedere con le metodologie analitiche da utilizzare per la determinazione dei parametri fisici, chimici, microbiologici ed ecotossicologici conformi ai protocolli nazionali e/o internazionali standardizzati o riportati su Manuali e Linee Guida del Sistema Nazionale delle Agenzie (ISPRA, documento online).

Per quanto riguarda lo studio preso in considerazione al laboratorio Agrolab, non è stato eseguito il campionamento, poiché i sedimenti giungono al laboratorio ospitante già campionati da ditte geotecniche specializzate.

3.2 Analisi Microbiologica: *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*

Le analisi biologiche effettuate con microrganismi, sono utilizzate per determinare il potenziale rischio di un sedimento. Vengono quindi allestiti saggi biologici differenti in base alle caratteristiche dei diversi microrganismi, poiché ognuno presenta delle specifiche condizioni di crescita ottimale che sono rispettate preparando e allestendo i loro specifici terreni e test di seguito descritti.

3.2.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis è un microrganismo Gram positivo che vive solitamente nel tratto gastrointestinale dei mammiferi. Comunemente è disposto a catenella, ma si può trovare anche singolarmente o a coppie. Come tutto il genere *Enterococcus*, è anaerobio facoltativo e catalasi negativo. Negli ultimi anni sono stati adottati metodi rapidi per la ricerca di *E. faecalis*, che si basano sull'idrolisi enzimatica di sostanze cromofore o fluorofore, senza che vengano effettuate prove di conferma, in modo tale da ridurre i tempi di risposta delle analisi. Il metodo adoperato è ISSF 003B rev. 00 del rapporto ISTISTAN 14/18, che utilizza la tecnica MPN (Most Probable number) a multipozzetto su substrato definito a 97 pozzetti, ovvero una tecnica di conteggio con tubi multipli utilizzata per contare la carica microbica di un campione che si sviluppa con la produzione di fluorescenza blu dal pozzetto. Il presente metodo consente di determinare la concentrazione di *Enterococcus faecalis* presente in 10 gr di sedimento. L'analisi è stata applicata a 5 diversi sedimenti per verificare la variabilità microbica.

Come prima cosa, il sedimento viene omogeneizzato e diluito: 10 gr (peso umido) di campione sono stati posti in un apposito sacchetto sterile dotato di rete, necessaria per separare il liquido dalla fase solida. A quest'ultimo vengono aggiunti 90 mL di acqua peptonata, preparata dagli operatori, la quale viene in

seguito omogenizzata manualmente al sedimento. Si sono eseguite delle diluizioni in funzione della concentrazione stimata di *E. faecalis* presente nel campione in esame. Queste vengono preparate unendo 1 mL di sospensione primaria con 9 mL di soluzione salina, creando una concentrazione $1 * 10^{-3}$. Per le diluizioni successive si preleva 1 mL dall'ultima diluizione effettuata e aggiunti ulteriori 9 mL di soluzione salina. Dopo tale allestimento, si preleva 1 mL dalla soluzione primaria e da tutte le diluizioni create in precedenza. I prelievi sono posti in contenitori sterili contenenti agenti antischiuma, a cui vengono aggiunti 99 mL di acqua sterile autoclavata. Al contenitore si unisce in modo asettico il contenuto di una bustina monodose del terreno Enterolert Quanti-Tray, per poi essere chiuso, agitato e versato nella busta multipozzetto, sigillata successivamente tramite la termosigillante automatica Quanti-Tray predisposta dall'azienda (RAPPORTI ISTISTAN 14/18, documento online).



Figura 2: buste multipozzetto (foto Pianalto).

Le buste sono etichettate con la soluzione/diluizione contenute e incubate a $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Solo dopo 24h, le buste possono essere esaminate alla luce ultravioletta. In tale modo sarà possibile registrare i pozzetti che manifestano la fluorescenza azzurra, ovvero quelli positivi.

3.2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus è un microrganismo appartenente alla famiglia Staphylococcaceae. Si presenta come Gram positivo, catalasi positivo e assume una forma di cocco, disposto spesso in ammassi irregolari a grappolo. La maggior parte dei ceppi è in grado di crescere in presenza di NaCl al 10% e ad una temperatura compresa tra i 18°C e i 40°C . Gli stafilococchi possono generare malattie, sia per la loro capacità di moltiplicarsi e di diffondersi nei tessuti, sia per la loro caratteristica di produrre sostanze extracellulari, in particolare proteine ad attività enzimatica. Inoltre possono produrre esotossine, come α , β , γ , δ , leucocidina, tossina epidermolitica ed enterotossine, esoenzimi (iarulonidasi, stafilocinasi), enzimi lipolitici e coagulasi. Le ghiandole della pelle e le mucose degli animali a sangue caldo e dell'uomo possono ospitare tali organismi. Inoltre sono presenti in una ampia varietà di prodotti animali come carne, latte e formaggio e

in ambienti come suolo, sabbie, polvere, aria e acque naturali. Insieme ad altre specie, lo *Staphylococcus aureus* interviene in patologia umana in qualità di agente eziologico di numerose infezioni della cute e delle mucose.

Il metodo seguito è il ISSN 1123-3117 rapporti ISTISAN 06/31, tuttavia alcune procedure si sono modificate nel laboratorio ospitante, poiché ritenute imprecise, di conseguenza viene stilato un protocollo personale aziendale. Il nuovo metodo si basa sulla tecnica dello spatolamento, ovvero lo spargimento omogeneo del campione su tutta la piastra tramite una spatola sterile. La prima operazione eseguita è la preparazione del terreno di coltura, che ci permette di ottenere un isolamento selettivo del microrganismo, se risulta presente. Il terreno in questione è il Baird Parker Agar (BPA), acquistato presso fornitori qualificati, in forma disidratata e preparato in laboratorio seguendo le istruzioni del fornitore. Il terreno contiene agenti selettivi come il cloruro di litio e tellurito di potassio che inibiscono la crescita di microrganismi contaminanti, invece la glicina e il piruvato di sodio facilitano la crescita del microrganismo (Sito 2 in sitografia). Dopo la sua preparazione, viene autoclavato e posto a bagnomaria per raffreddarlo e fargli raggiungere la temperatura di $50 \pm 5^\circ\text{C}$. Prima che il terreno venga posto in piastre da 90 cm di diametro, si aggiunge il supplemento, ovvero un'emulsione di tuorlo d'uovo e tellurito di potassio concentrato al 3,5%. In seguito all'omogeneizzazione è possibile riempire le piastre che si lasciano raffreddare sotto cappa. Nel mentre, si allestiscono gli omogenati: sono prelevati 10 gr (peso umido) da 5 sedimenti diversi, posti in appositi sacchetti sterili dotati di una rete, a cui si aggiungono 90mL di acqua distillata autoclavata. Dopo aver eseguito una buona omogeneizzazione manuale dei 5 diversi omogenati, con un apposito diluente, le soluzioni vengono diluite di 1000 volte. L'operazione è ripetuta per ogni omogenato. Dalle diluizioni è prelevato 1 mL, posto su piastre da 90 cm di BPA e accuratamente spatolato su tutta la superficie. Dalla soluzione madre invece sono prelevati sia 0,5 mL e 1 mL e posti su due piastre differenti. Dopo l'asciugatura, le piastre vengono poste pronte in incubatore a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Le letture si effettuano il terzo e quinto giorno successivi (ISS, 2017).

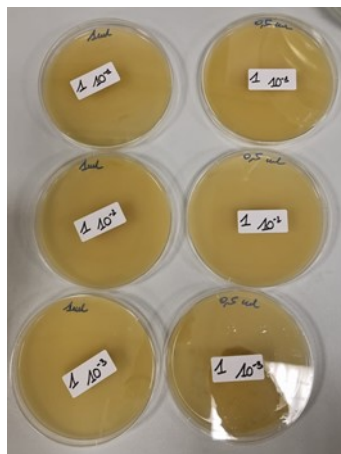


Figura 3: piastre con TSA da 90 cm di diametro (foto Pianalto).

3.3. Analisi ecotossicologica: *Paracentrotus lividus* e *Phaeodactylum tricornerutum*

L'ecotossicologia è una disciplina scientifica di recente sviluppo, il cui nome è stato proposto per la prima volta nel 1969. Si tratta di una disciplina trasversale, derivante dall'incontro tra tossicologia, l'ecologia applicata e della chimica ambientale (Fent, 2003). Il suo obiettivo è quello di studiare le interazioni tra i contaminanti ambientali e il biota, spiegare e prevedere gli effetti e i fenomeni dell'esposizione a diversi livelli di scala gerarchica dell'organizzazione biologica (Klaassen et al., 2014).

Lo svolgimento della analisi ecotossicologiche è sempre più frequente e ciò ha determinato un progressivo inserimento dei saggi ecotossicologici nel contesto normativo nazionale. I test ecotossicologici consentono la valutazione qualitativa e quantitativa degli effetti biologici causati da contaminanti ambientali ed elementi in traccia. Devono essere quindi seguiti dei protocolli metodologici standardizzati che consentono un'elevata rappresentatività ambientale (ISPRA, documento online).

Un saggio di tossicità è un esperimento biologico di esposizione di una determinata specie ad una sostanza pura o ad una miscela di sostanze pure oppure a campioni ambientali. Queste esposizioni permettono di evidenziare la concentrazione alla quale si osservano effetti tossici misurabili.

In base alla risposta dell'organismo, si possono stilare delle relazioni dose-risposta in misura alla quantità esposta della sostanza. Possiamo distinguere tre categorie diverse di test di tossicità: acuto, subacuto e cronico.

- Acuto: rileva effetti avversi che si manifestano in un breve arco temporale successivo alla somministrazione di una dose singola di sostanza;
- Subacuto: evidenzia effetti dovuti all'esposizione ad una sostanza per un periodo inferiore o uguale ad un decimo della vita dell'organismo;
- Cronico: stima gli effetti che si manifestano in seguito a esposizioni per un tempo superiore, che spesso coincide con più della metà dell'aspettativa di vita dell'organismo test (APAT, 2006);

3.3.1 Preparazione dell'elutriato

Per i saggi ecotossicologici effettuati con *Paracentrotus lividus* e *Phaeodactylum tricornerutum*, risulta importante la preparazione dell'elutriato, il quale permette di simulare la mobilitazione del sedimento e prevede la sua miscelazione con acqua di mare. Ciò permette il rilascio di possibili inquinanti presenti nel sedimento.

Il saggio effettuato con *P. tricornerutum*, una microalga marina, è acuto a breve termine; quindi, il rapporto per la preparazione dell'elutriato corrisponde a 1:4. Vengono quindi miscelate 4 parti di acqua e una parte di sedimento in peso secco. Per i saggi a lungo termine o cronici, come quello per *P. lividus*, la preparazione dell'elutriato è invece in rapporto 1:10, in cui si miscela una parte di sedimento in peso umido con 10 parti di acqua. Entrambi i saggi, cronico e acuto, sono effettuati su 10 diversi sedimenti.

Per l'analisi cronica non è necessario calcolare il peso secco del sedimento, essendo un dato che serve solo per conoscere le caratteristiche del campione originario e non influisce sull'esecuzione dell'analisi. Gli elutriati vengono preparati su opportuni contenitori, come ad esempio pet di plastica da 500 mL, in cui vengono inseriti, per i test cronici, 20 gr di sedimento e 180 mL di acqua di mare microfiltrata, ottenendo in questo modo un rapporto 1:10. I dati scritti in precedenza sono stati calcolati in base alla soluzione di campione necessaria per lo svolgimento di 3 saggi, in caso l'analisi dovesse essere ripetuta. Il contenitore è in seguito posto in un rotore, che permette la perfetta miscelazione delle due fasi solido-liquido. Questa procedura si effettua a temperatura ambiente per 1h. Dopo aver estratto il contenitore dal rotore, lo si lascia decantare per un'altra ora (si può utilizzare anche una centrifuga per 20 min a 1200 g impostata a 4°C). Questa procedura concede al sedimento di depositarsi completamente sul fondo. Completata la centrifugazione, la parte liquida detta surnatante viene prelevata e può essere centrifugata ulteriormente. Infine, il surnatante è trasferito in appositi contenitori di conservazione dell'elutriato.

Per la preparazione dell'elutriato di un saggio acuto la procedura è uguale a quella del test cronico, ma la quantità di sedimento e acqua è diversa, poiché viene considerato il peso secco del campione. Questo dato è ricavato pesando un determinato valore di sedimento umido (10-15 gr) in una navicella. Dopo aver annotato il peso umido e il peso della navicella, si esegue l'essiccamento del campione in stufa a 105°C per 24 h. Successivamente si pesa nuovamente il composto, a cui è stato sottratto il peso della navicella. L'umidità presente nel sedimento è calcolata tramite la seguente formula:

$$Umidità = 100 - \left(\frac{\text{peso secco netto}}{\text{peso umido netto}} \right) * 100$$

Tramite un foglio Excel viene annotato il peso secco di ogni campione e in base a quel valore è fornita la quantità di acqua da utilizzare per la creazione dell'elutriato e i grammi di sedimento da unire (ISPRA, 2021).

Tabella 1: calcolo delle componenti per la preparazione dell'elutriato 1:4

CAMPIONE	PESO SECCO	GR DI SEDIMENTO	H2O PER ELUTRIATO
A	73	200	530
B	74	200	540
C	73	200	530
D	75	200	550
MIX	74	200	540
1	69	230	564
2	80	190	570
3	80	180	540
4	75	200	550
5	76	200	560

Dopo aver unito la componente solida e liquida seguendo le quantità riportate nella Tabella 1, si esegue il procedimento spiegato precedentemente per il test cronico.

L'allegato tecnico del D.M. 173/2016 specifica che: "Salvo specifiche indicazioni del metodo adottato, il sedimento intero o la frazione solida del sedimento deve essere saggiata a fresco (non congelata, non essiccata né liofilizzata) prima possibile e comunque non oltre 15 giorni di conservazione a 4 – 6 °C al buio; la frazione liquida (acqua interstiziale o elutriato 1:4 p/v) deve essere preparata entro 10 giorni dal sedimento tal quale conservato a 4°C al buio e, se non saggiata entro le 24 h dalla preparazione, conservata a -20°C fino al momento dell'analisi".

3.3.2 Saggi con *Paracentrotus lividus*

Paracentrotus lividus, o comunemente chiamato riccio di mare, appartiene al phylum Echinodermata (classe Echinoidea, ordine Diademantoida). Il nome assegnato alla specie è di derivazione greca e si riferisce al fatto che questi animali sono quasi sempre rivestiti da spine lunghe e robuste. È ampiamente diffuso nel piano infralitorale, preferibilmente roccioso del mar Mediterraneo, ma popola anche le praterie di *Posidonia oceanica*. Questa specie ha trovato larga applicazione in campo ecotossicologico e il suo saggio risulta essere uno dei più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino e appartiene ai pochi "short chronic tests" per acque marine ed estuarine per i quali l'USEPA (1994) ha prodotto protocolli standardizzati.

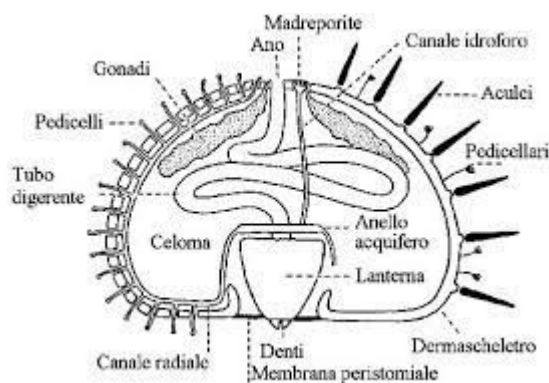


Figura 4: Morfologia ed organizzazione strutturale di un echinoide regolare (Tortonese, 1965; modif.).

Sono organismi stenoalini, caratterizzati da un dermascheletro rigido, costituito da piastre di natura calcarea, le quali formano una teca, al cui interno si trovano i visceri e che può raggiungere i 7,5 cm (Bonnet, 1925; Boudouresque et al., 1989; Lozano et al., 1995) (Fig. 4). Hanno una simmetria pentamera, in cui ogni settore è suddiviso in una zona radiale e in una interradianale. Sono dotati di scarsa mobilità e la locomozione avviene tramite i pedicelli aventi anche funzione tattile e prensile, presenti solo nella zona radiale. In condizioni normali giacciono con la

bocca rivolta verso il basso, rivestita da piastre esterne e da una membrana peristomale. La bocca è costituita da un sistema di ossicoli che costituiscono la Lanterna di Aristotele. Al polo opposto del corpo troviamo l'ano circondato da 5 piastre genitali (che presentano le gonadi) e 5 piastre terminali più piccole. L'organismo è dotato di un sistema nervoso non centralizzato e da un sistema acquifero derivato dal celoma: tali sistemi derivano da un anello presente vicino alla bocca, dal quale si sviluppano i canali radiali che si diffondono nelle aree ambulacrali (ISPRA, 2017).

La distribuzione geografica di *P. lividus* comprende la costa atlantica dall'Irlanda al Marocco, incluse le isole Canarie, Azzorre e le coste di tutto il Mar Mediterraneo (Hayward and Ryland, 1990; San Martìn, 1995). Alcuni organismi hanno affinato la capacità di scavare nel substrato creando delle tane allo scopo di proteggersi dal moto ondoso e dai predatori.

I ricci di mare utilizzati per il saggio sono stati presi direttamente dallo stabulario presente nell'azienda ospitante (Fig. 5), provvisto di sistema di areazioni, filtrazione e refrigerazione.

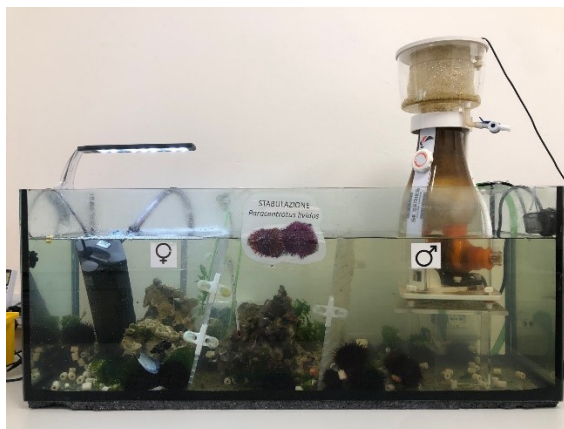


Figura 5: stabulario di Agrolab Italia (foto Pianalto).

Quotidianamente, oltre ad un'opportuna pulizia, sono stati monitorati parametri come pH, O₂ e conducibilità per garantire un habitat il più idoneo possibile alla riproduzione. Sono stati alimentati con *Ulva lactuca* presa direttamente da acque marine, e da carote, mais e mitili. Questi cibi sono un buon apporto energetico e contengono un alto valore nutrizionale a causa della massiccia presenza di carotenoidi, un elevato contenuto di carboidrati e un discreto apporto di proteine. In mare *P. lividus* è un grande consumatore di *P. oceanica*, una fanerogama che può costituire fino al 40% del contenuto stomacale del riccio. La scelta del cibo da parte dell'organismo si basa sulle sue dimensioni, sulla facilità con la quale questo può essere manipolato, ma anche dal contenuto di azoto. Il consumo di *P. oceanica* si intensifica quando gli organismi si trovano in ambienti inquinati e quando il loro contenuto di azoto è elevato. Risulta avere, soprattutto in condizioni

di limitata disponibilità alimentare, un comportamento generalista e opportunistico, capace di sfruttare qualsiasi fonte di cibo. Durante le osservazioni allo stabulario presso l'azienda ospitante, si è potuto osservare che *P. lividus* tende a coprirsi con conchiglie, sassi o alghe per proteggere l'apertura apicale del sistema acquifero, dall'occlusione da parte di sabbia o altre particelle presenti. Si tratta di covering behavior, comportamento che assume anche per trasportare le alghe di cui si successivamente nutre.

Vi sono organismi di *P. lividus* maschi e femmine, ma non vi sono segni di dimorfismo sessuale (Gianguzza et al., 2009). L'apparato riproduttore è composto da cinque gonadi, che sono presenti all'interno dei seni genitali circondati dal peritoneo. Le gonadi sono collegate da filamenti mesenterici nell'area interambulacrale e terminano nelle placche genitali. Troviamo quindi una serie pentagonale di gonopori lungo le piastre genitali che circondano l'ano. Il ciclo riproduttivo di *P. lividus* è influenzato da diversi fattori come: temperatura, disponibilità di cibo, condizioni idrodinamiche, valori dell'acqua...

Le gonadi femminili producono uova mature di tipo isolecitico, ovvero contengono un basso contenuto di tuorlo. La divisione meiotica si svolge nell'ovario e successivamente avviene il rilascio in mare di cellule uovo mature aploidi inerti (Spinelli e Albanese, 1990).

Gli spermatozoi vengono conservati nelle gonadi e sono immobili a causa del basso pH del liquido seminale. Non appena entrano in contatto con l'acqua, si attivano e si legano ad una proteina recettrice, che innalza la membrana di fecondazione. Questo produce una risposta elettrica, che impone un blocco veloce alla polispermia. La fecondazione è quindi di tipo esterno e va a produrre una segmentazione di tipo oblastica a simmetria radiale.

Le divisioni cellulari alla fine danno origine a un pluteo (Fig. 6O) dove la regione circumorale, un sistema nervoso, presenta quattro espansioni lobate, ovvero le braccia sostenute da spicole di tipo scheletrico e calcareo (Fig. 6O). In questo stadio le larve dotate di uno scheletro differenziato, di un apparato digerente, di cellule contrattili e nervose, iniziano a cibarsi. I plutei (Fig. 6P) hanno la capacità di nuotare ruotando su sé stessi e fanno ciò utilizzando i battiti delle ciglia presenti nelle braccia (Garner et al., 2016). Dopo due giorni dalla fecondazione, il pluteo risulta essere completo e possiede una simmetria bilaterale. Questa evolverà durante la metamorfosi in una simmetria di tipo pentaradiale. La larva di *P. lividus* ha un periodo di vita stimato di 23 - 29 giorni (Lozano et al., 1995). In seguito a questo periodo, le larve si modificano strutturalmente e funzionalmente generando un adulto di riccio di mare (Fig. 6Q).

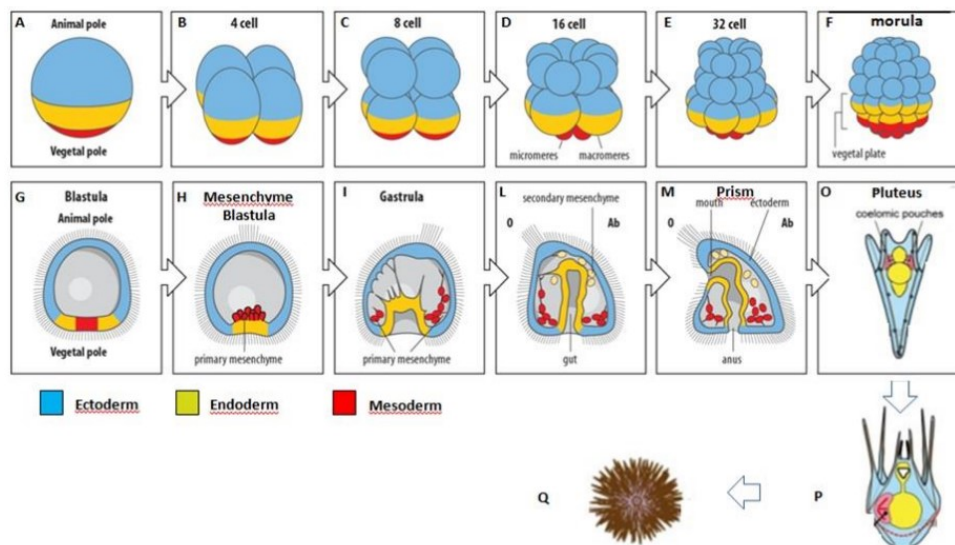


Figura 6: Fase iniziali dello sviluppo del riccio di mare *Paracentrotus lividus*. In ogni riquadro è rappresentato uno stadio di sviluppo. A) uovo; B) 4 cellule; C) 8 cellule; D) 16 cellule; E) 32 cellule; F) morula; G) blastula; H) blastula con mesenchima primario; I) gastrula precoce; L) gastrula tardiva; M) prisma; O) pluteo a 4 braccia; P) echinopluteo; Q) riccio di mare alla fine della metamorfosi (http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_06/ch06f19.jpg, modif.).

Vi sono dense popolazioni di ricci presenti in aree altamente inquinate, poiché alcuni composti favoriscono la crescita dell'organismo (Tortonese, 1965; Allain, 1975; Zavodnik, 1987; Delmas, 1992). Gli organismi invece molto sensibili a composti come l'ammoniaca (Lawrence et al., 2003) e a tollerare e accumulare metalli pesanti in alte concentrazioni (Augier et al., 1989; Delmas, 1992; San Martín, 1995). Il nostro saggio infatti si basa sulla osservazione dello sviluppo embrionale, in seguito all'esposizione a elutriati di sedimenti marini. Come abbiamo detto in precedenza gli adulti sono poco sensibili agli inquinanti rispetto agli embrioni. In campo ecotossicologico i gameti di *P. lividus* presentano numerosi vantaggi, in quanto appartenenti a un livello avanzato della scala evolutiva degli invertebrati (Arizzi Novelli et. al., 2001), risultano facili al mantenimento in laboratorio, possiedono un'elevata sensibilità, facilità e velocità nell'esecuzione del test, inoltre è possibile analizzare la tossicità da diversi end-points (Pagano et al., 1993; Pinto et al., 1995; Giuliani et al., 2002).

Per il saggio sono stati utilizzati 4 organismi diversi presenti nello stabulario, per avere una variabilità gametica. Per il mantenimento della maturità sessuale sono stati nutriti con mais e alghe, dato che l'assunzione di β -carotene determina un incremento della crescita gonadica, del tasso di sviluppo larvale e migliorano la qualità delle uova. Il primo step previsto dal metodo è la raccolta di gameti maschili e femminili. Presso la struttura ospitante vige l'idea che l'emissione venga effettuata senza recare danni gravi all'organismo. I ricci infatti vengono estratti

dall'acquario e manualmente si scuotono allo scopo di confonderli e infine sottoposti a shock termico: si adagiano su un becker e vengono cosparsi di acqua marina fredda. Questa tecnica funziona per la maggior parte delle volte, solo in casi estremi si utilizza un'iniezione, effettuata con una siringa da insulina, di 0,5 ml di KCl 0,5 M attraverso la membrana peristomale. Una volta iniziata l'emissione (Fig. 7), i gameti devono essere raccolti nel più breve tempo possibile. Quelli maschili si raccolgono a secco direttamente dal gonoporo animale, tramite una micropipetta e conservati in frigorifero a 4°C in una eppendorf. Le uova invece si lasciano depositare (Fig. 8) nel becher in cui è stato adagiato il riccio e in seguito vengono filtrate. La qualità delle uova si controlla al microscopio.



Figura 7: fotografia di due individui di *P. lividus* in seguito all'emissione dei gameti maschili (a sinistra) e femminili (a destra) (foto Pianalto).

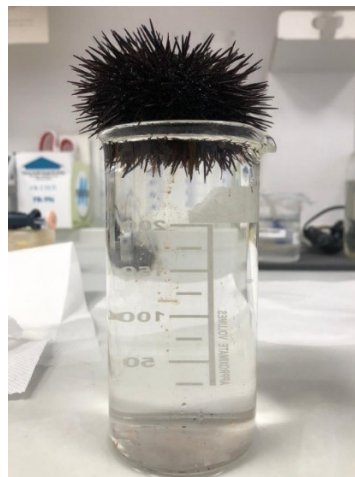


Figura 8: femmina di *P. Lividus* durante l'emissione delle uova (foto Pianalto).

Lo sperma, dopo essere stato diluito con una piccola quantità di acqua di mare, è aggiunto nel becker contenente le uova. Poiché la quantità di gameti deve rappresentare il rapporto volumetrico spermatozoi/uova di 10:1 si effettuano delle conte. La fecondazione avviene in 20 minuti lasciando il Becker con entrambi i gameti a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Con il passar del tempo, si osserva al microscopio per verificare

l'avvenuta fecondazione, evidenziata dalla membrana di fecondazione, la quale si stacca dalla cellula uovo. La parte centrale risulta ora più densa.



Figura 9: due uova di *P. lividus*; quella in alto è fecondata, quella in basso non è fecondata (foto Pianalto).

Per lo svolgimento del saggio, vengono preparate le vaschette contenenti i 10 diversi elutriati. Le vaschette contengono 6 pozzetti (Fig. 10) ognuna e ogni pozzetto è riempito da 9 mL di campione e 1 mL di soluzione con le uova fecondate. Di ogni elutriato è stato effettuato il saggio sul campione tal quale e sulle sue diluizioni 50%, 25%, 12% e 6%, come prevede il metodo. Dopo aver aggiunto in tutti i pozzetti il millilitro di uova fecondate, le vaschette si chiudono e si inseriscono nell'incubatore al buio. Gli zigoti si sviluppano e raggiungono lo stadio larvale in 48 h, ma il periodo di esposizione scelto è di 72 h in quanto si garantisce il raggiungimento dello stadio di pluteo da parte di tutti gli zigoti presenti nelle vaschette. È allestita anche una vaschetta di bianco contenente gli embrioni e acqua di mare, per confrontare quanti plutei si formeranno rispetto ai campioni in esame (ISPRA, 2017).



Figura 10: vaschette contenenti il campione A e le rispettive diluizioni.

3.3.3 Saggi con *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum è una microalga unicellulare della classe delle Diatomee, la cui tassonomia non è stata ancora determinata. La sua classificazione ha infatti subito varie controversie, perché l'organismo è siliceo rispetto a qualsiasi altra diatomea. È polimorfa e di conseguenza presenta diverse morfologie: ovale, fusiforme e triradiale, da cui il nome *tricornutum* (Simonazzi, aa 2016-2017) (Fig. 11).

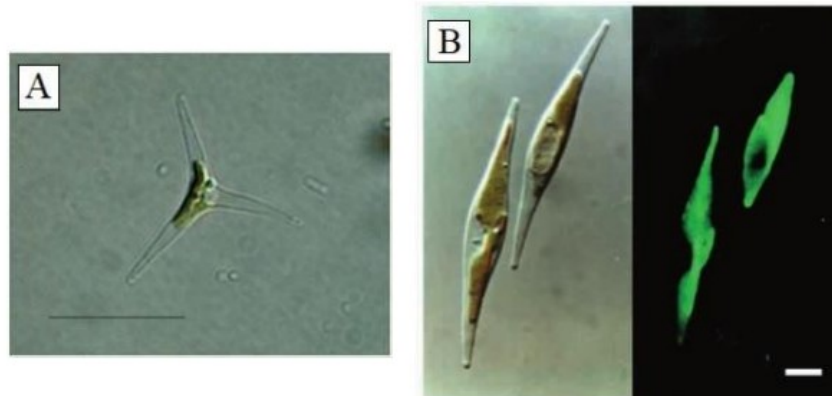


Figura 11 – Fotografia di *P. tricornutum* al microscopio ottico in cui sono evidenziati i morfotipi triradiato (11.a) e fusiforme (11.b) (Apt, 2002; Tesson et al., 2009).

La caratteristica struttura silicea esiste solo nella conformazione ovale a livello del rafe (Borowitzka e Volcani, 1978). Descritto per la prima volta dallo scienziato Bohlin nel 1897 come un nuovo genere di alghe unicellulari, lo stato tassonomico di *P. tricornutum* non fu dichiarato fino al 1958. Come detto in precedenza, la microalga presenta tratti attribuibili alle diatomee, ma è stata richiesta la creazione di un nuovo genere a causa dell'assenza della parete silicea nella morfologia fusiforme e triradiata (Lewin, 1958). L'attuale posizione tassonomica è riportata nella tabella sottostante (Guiry and Guiry, 2017):

REGNO:	<i>Eukaryota</i>
DOMINIO:	<i>Chromista</i>
PHYLUM:	<i>Bacillariophyta</i>
CLASSE:	<i>Bacillariophyta classis incertae sedis</i>
ORDINE:	<i>Bacillariophyta ordo incertae sedis</i>
FAMIGLIA:	<i>Phaeodactylaceae</i>
GENERE:	<i>Phaeodactylum</i>
SPECIE:	<i>tricornutum</i>

Figura 12: classificazione Guiry and Guiry, 2017 di *P. tricornutum*.

P. tricornutum è stata coltivata presso l'azienda ospitante in beute, ognuna provvista di un magnete e posta su un agitatore, che garantisce 24 ore su 24 il

movimento circolare. Per coltivare le alghe bisogna preparare l'Algal Culturing medium ovvero un liquido per il mezzo del quale l'alga avrà una crescita ottimale. Si esegue unendo all'acqua di mare sintetica una soluzione madre nutritiva contenente 3 diversi tipi di vitamine. In seguito si prendono due provette contenenti l'inoculo di microalghe, che vengono versate in una beuta, a cui si aggiunge il mezzo di cultura algale preparato in precedenza. La beuta viene in seguito incubata a temperatura di $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con una temperatura costante fornita da lampade bianche fredde.

Prima di procedere all'allestimento per l'analisi, bisogna controllare la densità ottica della beuta. Si riempie una cuvetta e si controlla l'assorbanza tramite spettrofotometro impostato a 670 nm, dotato di un supporto per le celle da 10cm. Si segna il valore in un apposito foglio Excel fornito dall'azienda, in base al quale si stabilisce l'adeguatezza del valore.

Si effettuano una serie di diluizioni dei 10 elutriati, che vengono preparate mediante diluizione seriale, ovvero diluizioni successive della metà dell'effluente originale. Sono quindi necessari 6 matracci da 200 mL, in cui il primo corrisponde al campione (100% di campione) e l'ultimo contiene invece il 6% di esso.



Figura 13: fotografia dei matracci usati durante le diluizioni (foto Pianalto).

Al primo matraccio vengono aggiunte le vitamine di accrescimento e in seguito 100 mL sono trasferiti nel secondo matraccio, si aggiungono altri 100 ml di mezzo di crescita. In questo modo, dopo aver mescolato, si ottiene una concentrazione del 50%. Si procede con la medesima modalità per le diluizioni successive. Alla fine si eliminano 100 mL dall'ultimo matraccio. Si aggiunge 1 mL di sospensione algale in ciascun matraccio e si agita bene. Ogni matraccio è sufficiente per riempire tre cuvette, in totale se ne ottengono 18 (in cui sono comprese 3 di bianco) per ogni campione e poste in un apposito contenitore trasparente. Il vassoio di contenimento viene posizionato per tre giorni in incubatore con illuminazione uniforme e costante a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.



Figura 14: fotografia di tutte le cuvette disposte in contenitori trasparenti (foto Pianalto).

L'inibizione della crescita algale rispetto al bianco è determinata tramite controllo quotidiano della densità ottica delle sospensioni algali presenti in tutte le cuvette: dopo 24h, 48h e 72h di esposizione al campione.

3.4 Sediqualsoft

Sediqualsoft è il software fornito da ISPRA per la gestione dei sedimenti marini costieri da dragare, viene infatti utilizzato per la gestione dei dati ambientali seguendo l'Allegato tecnico al DM 173/2016. Questo strumento è in grado di fornire una classificazione qualitativa dei sedimenti da noi in analisi, secondo criteri di integrazione ponderata stabiliti in Allegato tecnico. Ciò garantisce una maggiore facilità nell'individuazione della classe di qualità dei sedimenti (Sito 3 in sitografia).



Figura 15: software Sediqualsoft di ISPRA.

4. Risultati e discussione

4.1 Saggi microbiologici

4.1.1 *Enterococcus faecalis*

Il test per *Enterococcus faecalis* dimostra la sua presenza manifestando una fluorescenza blu del substrato (Fig. 16), causata dalla scissione enzimatica del 4-metilumbellifenil- β -D-glucoside.

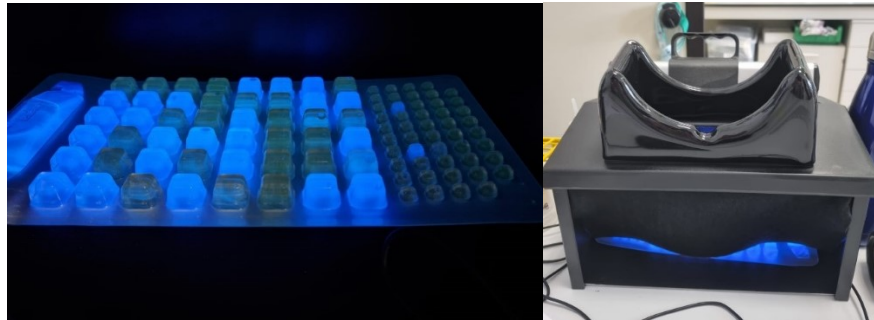


Figura 16: busta multipozzetto con presenza di fluorescenza e a dx fotografia del dispositivo utilizzato (foto Pianalto).

Si contano e registrano il numero di pozzetti grandi e piccoli positivi. Questo dato permette di calcolare la concentrazione di *E. faecalis* in MPN (Most Probable Number) utilizzando una tabella probabilistica fornita dalla ditta. Il dato viene inserito nel sistema insieme alle rispettive diluizioni in modo tale che venga calcolato il numero di *E. faecalis* in 1gr di campione secondo la formula:

$$Cu = N * b * d/a$$

Dove:

Cu: quantità di Enterococchi presenti in un grammo di campione umido

N: indice MPN fornito dalla tabella probabilistica

b: diluizione iniziale di fattore 10 della sospensione primaria

d: fattore di diluizione seriale

a: volume inoculato di campione (RAPPORTI ISTISTAN 14/18, 2014)

L'azienda ospitante fornisce di un foglio Excel con le formule citate integrate all'interno. In seguito vengono riportati i risultati ottenuti degli omogenati dei 5 sedimenti.

Tabella 2: conta enterococchi tramite rapporti ISTISAN 2014/18 ENTEROLERT; campioni

1-5

ID sample	NR	N° pozzetti grandi positivi	N° pozzetti piccoli positivi	Indice tabulato	Fattore diluizione seriale	Volume inoculato	Calcolo	Risultato (MPN/g)	Parametro
1		42	48	290,5	4	1	29060000	29060000	Enterococchi MPN
1		41	48	263,1	5	1	263100000	263100000	Enterococchi MPN
1		49	48	2419,6	6	1	24196000000	24196000000	Enterococchi MPN
1		42	22	201,1	7	1	20110000000	20110000000	Enterococchi MPN
1		12	7	21,7	8	1	21700000000	21700000000	Enterococchi MPN
1		11	7	20,2	9	1	20000000000	20000000000	Enterococchi MPN
1		2	0	2	10	10	20000000000	20000000000	Enterococchi MPN
1	1				11	1	0	0	Enterococchi MPN
2		49	48	2419,6	4	1	2419600000	2419600000	Enterococchi MPN
2		49	42	1299,7	5	1	1299700000	1299700000	Enterococchi MPN
2		46	12	156,5	6	1	1565000000	1565000000	Enterococchi MPN
2		32	27	121,4	7	10	1214000000	1214000000	Enterococchi MPN
2		9	2	12	7	1	1200000000	1200000000	Enterococchi MPN
2		7	3	10,7	8	10	1070000000	1070000000	Enterococchi MPN
2		7	0	1,2	8	1	1200000000	1200000000	Enterococchi MPN
2	1				9	10	0	0	Enterococchi MPN
3		49	48	2419,6	4	1	241960000	241960000	Enterococchi MPN
3		41	38	209,1	5	1	209100000	209100000	Enterococchi MPN
3		14	2	23,3	6	1	233000000	233000000	Enterococchi MPN
3		1	2	3	7	1	300000000	300000000	Enterococchi MPN
4		41	37	204,2	4	1	20420000	20420000	Enterococchi MPN
4		5	14	20,1	5	1	20100000	20100000	Enterococchi MPN
4		2	0	2	6	1	20000000	20000000	Enterococchi MPN
4	1				7	1	0	0	Enterococchi MPN
5		45	45	309,8	4	1	39980000	39980000	Enterococchi MPN
5		26	2	39,9	5	1	39900000	39900000	Enterococchi MPN
5		4	0	4,1	6	1	41000000	41000000	Enterococchi MPN
5	1				7	1	0	0	Enterococchi MPN

Come possiamo osservare dalla tabella, nello stesso campione, la quantità di *E. faecalis* rimane all'incirca la stessa nonostante le diluizioni eseguite. Emerge inoltre che l'omogenato numero 1 rileva la maggiore quantità di microrganismi patogeni rispetto al quarto, il quale risulta essere il meno inquinato.

4.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus produce colonie di colore nero a causa della riduzione del tellurito a tellurio metallico. In seguito all'incubazione le colonie appaiono brillanti, convesse e lisce con la presenza di margini netti. Spesso sono circondate da un alone chiaro creatosi dall'attività lecitinasica. Dopo 24 ore hanno comunemente un diametro di 1-1,5 mm, invece dopo 48 ore si presentano con un diametro di 1,5-2,5 mm. Nel presente studio, non sono risultate delle colonie classiche di *S. aureus* (Fig. 17), in quanto non sono brillanti e presentano un margine non uniforme. Si sono quindi eseguite delle prove di conferma per verificare se di trattasse di *Staphylococcus* o di un altro microrganismo.

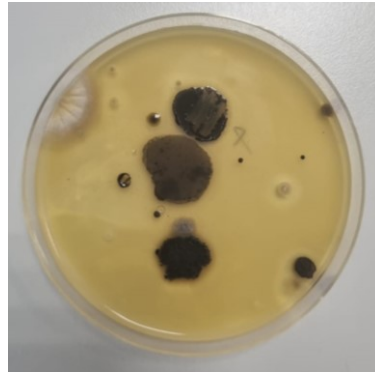


Figura 17: colonie cresciute su TSA (foto Pianalto).

Le prove di conferma si effettuano sulle colonie cresciute su un terreno generico chiamato TSA (Tryptic Soy Agar). Si prelevano dal BPA, le colonie che più assomigliavano a quelle di *S. aureus*, si strisciano sul terreno di cultura TSA tramite un'ansa sterile, e si incubano per 24h a $32 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

La prima prova effettuata è la catalasi. *S. aureus* è un microrganismo catalasi positivo, di conseguenza possiede l'enzima catalasi, capace di neutralizzare gli effetti battericidi delle forme tossiche dei metaboliti dell'ossigeno come il perossido di idrogeno. Quest'ultimo se messo in contatto con una colonia di microrganismi catalasi positivi, viene scomposto in ossigeno e acqua, producendo delle bolle evidenti (Sito 4 in sitografia). Di conseguenza, viene prelevata tramite un'ansa sterile, una colonia dal terreno TSA, posta in un vetrino portaoggetti e messa in contatto con delle gocce di perossido di idrogeno.

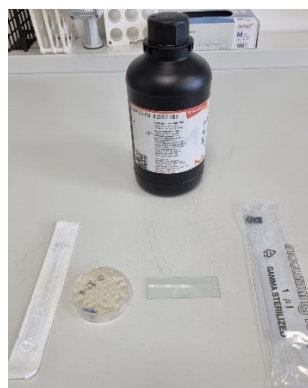


Figura 18: allestimento per la catalasi (foto Pianalto).

In tutte le colonie da me analizzate, vi è la produzione di bolle e di conseguenza, sono risultate positive al test della catalasi. La prova eseguita tuttavia, non fornisce la conferma che si tratti di *S. aureus*, ma ci informa di una caratteristica appartenente alla la maggior parte dei microrganismi aerobi.

In seguito è stata eseguita la stafilasi (Fig. 19), tecnica che si basa sulla capacità di produrre coagulasi libera di *S. aureus*. Il laboratorio è fornito di una scatola

chiamata Staphylase Test”, in cui si presentano all’interno due reagenti: uno di controllo, che presenta globuli rossi di pecora e il reagente, che consiste in globuli rossi di pecora sensibilizzati con fibrogene di coniglio.

Qui di seguito la procedura standard del Staphylase Test, fornita ad *Agrolab*:

- Agitare bene entrambi i reagenti per ottenere una sospensione omogenea. Rimettere in sospensione anche le parte di reagente eventualmente trattenuto nel contagocce.
- Usando un’ansa, strisciare da 1 a 3 colonie del ceppo in esame su due aree distinte di un cartoncino compreso nel kit.
- Aggiungere una goccia di Staphylase Test Reagent ad un’area e una goccia di Staphylase Control Reagent all’altra.
- Mescolare bene con l’ansa il contenuto dell’area in cui è stato aggiunto lo Staphylase Test Reagent.
- Flambare l’ansa e ripetere l’operazione nell’altra area.
- Osservare se nel frattempo interviene agglutinazione.

Il risultato positivo si manifesta con l’agglutinazione dei globuli rossi dello Staphylase Test Reagent mentre si mescola il materiale prelevato con l’ansa, ma non si deve ottenere agglutinazione con lo Staphylase Control Reagent.

Lo Staphylase Test, prima di essere messo in commercio, ha fornito pertanto un risultato positivo in modo corretto in 1662 su 1662 casi di *Staphylococcus aureus*, evidenziando così una sensibilità del 100% e una specificità del 99.5% (Sito 5 in sitografia).

Per quanto riguarda l’analisi da me effettuata presso l’azienda, tutti i ceppi prelevati sono risultati negativi al Staphylase Test.



Figura 19: allestimento del test della stafilasi (foto Pianalto).

Ulteriori test vengono effettuati, come la colorazione di Gram: tecnica e metodo di classificazione che permette di distinguere i batteri presenti all’interno di un campione. Ciò è possibile grazie alla permeabilità della parete cellulare, che risulta essere diversa se l’organismo è gram negativo (Gram -) o gram positivo (Gram +). In quest’ultimo caso, risulta essere più rigida e ricca in peptidoglicano e di conseguenza, è capace di trattenere meglio il colorante primario, il cristalvioletto, a differenza della parete dei Gram-, molto più sottile (Sito 6 in sitografia).

L'analisi consiste in:

- Prelevare le colonie dal TSA e porle su un vetrino da microscopio;
- Aggiungere il cristalvioletto, colorante con elevata affinità con le cellule batteriche;
- Unire il Reattivo di Lugol, una soluzione acquosa iodo-iodurata che fissa il colore;
- Lavare il vetrino con etanolo per rimuovere l'eccesso di colorante e decolorare le cellule

A questo punto i microrganismi Gram+, si colorano di viola/porpora, invece i Gram- non sono in grado di trattenere il colorante, risultando delle cellule incolore. Per evidenziarli, si utilizza la Safranina, colorante di contrasto che rende le cellule di colore rosa/rosso.

Viene effettuata quindi l'osservazione al microscopio per verificare la morfologia e la colorazione trattenuta dalla parete cellulare del batterio.

Le cellule da me osservate, presentano una forma allungata a bacillo di colore rosso, mentre gli stafilococchi dovrebbero presentare una colorazione viola e forma rotondeggiante.

Un ultimo test eseguito è la DNAsi, in cui viene utilizzato il DNase Test Agar, un terreno di coltura che mostra la presenza di attività desossiribonucleasica in un microrganismo. Questa caratteristica è stata scoperta in *S. aureus* nel 1956 da Weckman e Catlin. Il cui procedimento del test prevede:

- Preparare il terreno e porlo nelle piastre petri
- Strisciare le colonie cresciute nel TSA nelle nuove piastre
- Incubare a 36°C per 24 h
- Ricoprire le piastre con acido cloridrico 1M

L'analisi risulta essere positiva se il microrganismo è in grado di depolimerizzare i frammenti di DNA, creando un alone nella piastra e rendendo il terreno di coltura opaco (Sito 7 in fotografia).

Nel mio saggio, tutte le piastre non hanno subito modifiche nel colore/torbidità, di conseguenza il test risulta essere negativo.

Tutte le prove di conferma, tranne la coagulasi, sono risultate negative, quindi possiamo affermare che il ceppo in esame, non si tratta di *Staphylococcus aureus*.

4.2 Saggi ecotossicologici

4.2.1 *Paracentrotus lividus*

In seguito alle 72h di incubazione si sono eseguite le letture, effettuate ponendo delle gocce di Lugol in ogni pozzetto. Questo procedimento è servito per fissare gli embrioni di *P. lividus* e garantire una semplice lettura. In base alla numerosità di malformati il campione risulta tossico o meno per l'organismo. Si contano almeno 100 larve tramite microscopio elettronico e di queste si annotano tutti gli embrioni

anomali, ovvero gli organismi che risultano malformati (Fig. 20A), con apparato digerente fuoriuscito (Fig. 20B), con spicole che risultano essere non allineate o incrociate (Fig. 20C), fasi pre-larvali che non si sono sviluppate (Fig. 20D) ...



Figura 20: plutei di *P. lividus* malformati; A: organismi mal formati; B: apparato intestinale fuoriuscito; C: spicole incrociate; D: fasi pre larvali (foto Pianalto).

Dopo aver effettuato la conta di osservano le variazioni presenti tra il bianco e i campioni testati tramite la “correzione di Abbot” riportata in seguito:

$$\text{Abbott} = (X - Y)/(100 - Y) \cdot 100$$

Dove:

X è la % di embrioni non normoformati nel campione in esame

Y è la % di embrioni non normoformati nel bianco

I valori ottenuti sono utilizzati nel calcolo dell'EC50. L'IRSA, l'Istituto di Ricerca Sulle Acque, definisce l'EC₅₀ come la concentrazione che produce nel 50% degli individui un effetto diverso dalla morte, in questo caso il tasso di malformazione. La prova effettuata è considerata valida poichè la percentuale di plutei normoformati nel bianco è maggiore dell'80% (Gaion et al., 2013; Sartori et al., 2016b), come dev'essere da metodo. In caso contrario si deve ripetere l'operazione. Anche la deviazione standard rispetta un limite, ossia non deve essere maggiore del 5%.



Figura 21: pluteo di *P. lividus* ben formato fissato con Lugol (foto Pianalto).

Tabella 3: risultati di plutei di *P. lividus* campione A

Replicate	Control	C5	C4	C3	C2	C1
1	20	23	29	41	52	67
2	19	33	37	48	57	59
3	21	27	28	46	64	65
Total number of dead	60	83	94	135	173	191
Total number of living	240	217	206	165	127	109
%mortality	20,00%	27,67%	31,33%	45,00%	57,67%	63,67%

Osservando la Tabella 3, riguardante il campione A, si deduce che all'aumentare della concentrazione del campione in esame, la mortalità dei plutei aumenta, raggiungendo il 63,67%. Nella C5, ovvero dove il campione è presente solo al 6%, la mortalità risulta essere inferiore. Calcolando l'EC₅₀ tramite il foglio Excel, risulta essere pari a 67,14, valore minore di 100 e che definisce il campione tossico. Vengono riportati in seguito i valori di EC₅₀ di 5 elutriati:

Tabella 4: valori EC50 per *P. lividus*

CAMPIONE	EC50
A	67,14
B	186,64
C	1538,88
D	105,01
MIX	130,27

Come possiamo notare, solo il campione A presenta un EC₅₀ minore a 100, risulta essere di conseguenza, l'unico campione tossico per *P. lividus*.

4.2.2 *Phaeodactylum tricornutum*

I risultati giornalieri vengono registrati per ogni cuvetta su un apposito foglio Excel e ci permettono di osservare, tramite un opportuno grafico, l'andamento di crescita di *P. tricornutum* ogni 24 ore per tre giorni. La lettura si effettua tramite spettrofotometro (Fig. 22) impostato a 670 nm di lunghezza d'onda.



Figura 22: fotografia dello spettrofotometro dotato di supporto per le celle da 10 cm (foto Pianalto).

In parallelo alle analisi del campione è stato allestito un controllo positivo, in cui si mette in contatto la microalga con il dicromato di potassio in concentrazione crescente. Questa operazione si effettua per verificare la letalità subita dall'organismo. Le letture, infatti, confermano l'inibizione della crescita di *P. tricorutum* all'aumentare della quantità di dicromato di potassio messo in contatto con l'organismo (Tabella 4).

Tabella 5: densità ottica del controllo positivo

Time:	Replicate	Control	C5	C4	C3	C2	C1
24 h	1	0,107	0,036	0,014	0,01	0,024	0,031
	2	0,115	0,044	0,015	0,017	0,022	0,034
	3	0,102	0,039	0,016	0,022	0,017	0,029
48 h	1	0,155	0,042	0,019	0,041	0,015	0,034
	2	0,161	0,041	0,015	0,049	0,021	0,035
	3	0,158	0,038	0,012	0,041	0,023	0,032
72 h	1	0,371	0,201	0,159	0,114	0,082	0,055
	2	0,351	0,211	0,162	0,117	0,079	0,059
	3	0,353	0,203	0,155	0,124	0,085	0,056

Tabella 6: quantità di dicromato di potassio presente nella soluzione

Concentration C5		1,87	%
Concentration C4		3,75	
Concentration C3		7,5	
Concentration C2		15	
Concentration C1		30	

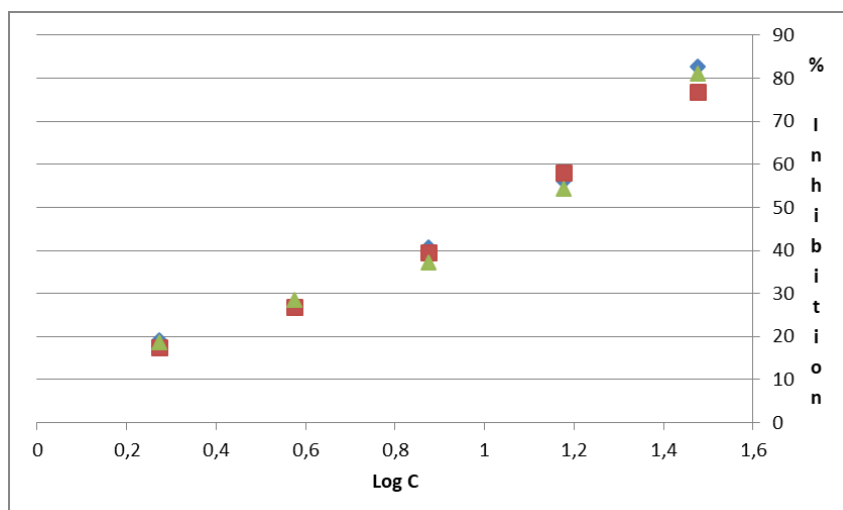


Grafico 1: andamento della crescita algale del controllo positivo.

Nel grafico 1, è mostrato l'effetto del dicromato di potassio su *P. tricornutum*: un'inibizione che supera l'80%, quando questo è presente alla maggiore concentrazione, ovvero 30%.

Nei campioni in esame non sono rivelate inibizioni di crescita algale considerevoli. A differenza degli altri, vi è un campione in cui la crescita di *P. tricornutum* risulta troppo eccessiva rispetto al bianco. Sembra un fattore positivo, tutta via le sue componenti hanno causato il fenomeno di eutrofizzazione.

Questo evento è causato dal sedimento che possiede la capacità di arricchire di nutrienti l'acqua, soprattutto se inquinato. Può rilasciare elementi come fosforo e azoto e influenzare quindi la vita acquatica. Infatti provoca una crescita eccessiva algale, che riduce la luce aumentando l'attività dei batteri anaerobi. Di conseguenza, questi organismi consumano la maggior parte dell'ossigeno presente, rendendolo meno disponibile e danneggiando la vita acquatica impossibile agli altri organismi.

Il foglio Excel fornito permette di calcolare anche l'EC50 di ogni campione (Tabella 7), ovvero la concentrazione a cui una sostanza tossica ha un'incidenza pari al 50% dell'effetto preso in esame, in questo caso l'inibizione. Quando l'EC50 ha un valore inferiore a 100, il campione risulta essere tossico per l'organismo.

Tabella 7: EC50 e % di inibizione degli elutriati

	INIBIZIONE	EC50
1	-13%	5643,6
2	5%	9502,3
3	12%	2159,2
4	6%	9732,4
5	-20%	2549,6
A	-6%	1357,9
B	12%	1416,9
C	-20%	928,4
D	-10%	54,63
MIX	60%	62,31

Come possiamo notare, i campioni D e MIX presentano un'EC50 minore di 100 e pertanto risultano essere tossici per *P. tricornutum*.

4.3 Analisi dei risultati con Sediqualssoft

I risultati ottenuti da tutte le analisi sono stati elaborati in laboratorio utilizzando il software Sediqualssoft, con lo scopo di determinare la classe di gravità del pericolo ecotossicologico dei sedimenti in esame che vediamo riportata nella Tabella 8.

Tabella 8: classe di qualità dei campioni in esame

CAMPIONE	CLASSE DI GRAVITA'
1	Assente
2	Assente
3	Assente
4	Assente
5	Assente
A	Assente
B	Basso
C	Assente
D	Assente
MIX	Alto

Il software, per riuscire a determinare la classe di qualità, deve essere in possesso dei seguenti dati: specie, durata di esposizione, matrice (sedimento), endpoint, media del controllo, deviazione standard del controllo, numero di repliche effettuate, media campione, deviazione standard campione e numero repliche del campione. In questo modo riesce a fornire: effetto pesato, effetto*Z, HQ, soglia HQ, max HQ e infine la classe di gravità del pericolo ecotossicologico. Secondo la definizione di ISPRA, HQ (Hazard quotient) è l'indice di pericolo individuale, ovvero il rischio dovuto ad un singolo contaminante per una o più vie d'esposizione (APAT, 2008).

The screenshot displays the 'Caratterizzazione ecotossicologica dei sedimenti' interface. On the left, input fields are filled with: ID: 481, Specie: Vibrio_fischeri, Durata esposizione: Acuta, Matrice: Sedimento_intero, Endpoint: Bioluminescenza, Media controllo: 41,01, Dev St controllo: 1,775706, N. repliche controllo: 3, Media campione: 0,01, Dev St campione: 0,01, N. repliche campione: 2, and Cod. campione: MIX. The right panel shows 'Risultati singolo saggio' with: Tipologia Saggio: 1, Effetto: 410000 %, Effetto pesato: 0, Effetto * Z: 410000 %, HQ (specifico): 0, Soglia HQ (specifico): 2,4 (Effetto=Soglia), Max HQ (specifico): 12 (Effetto=100%). Below this, 'RISULTATI BATTERIA DEI SAGGI' shows: N. saggi: 3, HQ batteria: 11,72, Soglia HQ Batteria: 4,36, Max HQ Batteria: 28,5, Contributo % elutriato: 100. At the bottom right, the 'Classe di gravità del pericolo ecotossicologico' is displayed as 'ALTO' in a red box, accompanied by a color-coded gauge.

Figura 23: caratterizzazione ecotossicologica sedimento "MIX".

Caratterizzazione ecotossicologica dei sedimenti			
ID:	478	Specie:	Vibrio_fischeri
Latitudine:		Durata esposizione:	Acuta
Longitudine:		Matrice:	Sedimento_intero
Area:		Endpoint:	Bioluminescenza
Sito:		Media controllo:	25,36
Data campionamento:		Dev St controllo:	0,160404
Cod. campionamento:		N. repliche controllo:	3
Cod. carota:		Media campione:	0,4167123
Cod. livello:		Dev St campione:	0,6382535
Cod. campione:	B	N. repliche campione:	2
Note:			

Risultati singolo saggio	
Tipologia Saggio:	1
Effetto	5985,73 %
Effetto pesato	0
Effetto * Z	5985,73 %
HQ (specifico)	0
Soglia HQ (specifico)	2,4 (Effetto-Soglia)
Max HQ (specifico)	12 (Effetto=100%)

RISULTATI BATTERIA DEI SAGGI		
N. saggi	3	Scala 1:10
HQ batteria	5,52	1,43
Soglia HQ Batteria	4,36	1
Max HQ Batteria	28,5	10
Contributo % elutriato	100	

Classe di gravità del pericolo ecotossicologico: **BASSO**

Figura 24: caratterizzazione ecotossicologica sedimento "B".

5. Conclusioni

Tutte le analisi eseguite presso il laboratorio *Agrolab* Italia sono elaborate tramite il software *Sediquasoft*, che ha definito il grado di pericolosità dei campioni di sedimento marino in analisi. Si è constatato che i campioni 1, 2, 3, 4, 5, A, C e D, sono risultati non pericolosi per gli organismi utilizzati nello studio, definendoli innocui. Il campione B, presenta una classe di gravità del pericolo di tipo bassa, che è definita dall'effetto tossico del campione, soprattutto su *P. lividus* (Appendice). Al campione MIX, invece, è stata assegnata una classe di tossicità di tipo alto, risultando così il più pericoloso di tutti i sedimenti analizzati.

Le analisi di questo tipo, al giorno d'oggi risultano essere fondamentali, in quanto consentono la definizione della qualità ambientale e dello stato di salute degli organismi. Grazie a ciò, test di tipo tossicologico o ecotossicologico, in futuro risulteranno essenziali per la tutela del territorio e la prevenzione dall'inquinamento ambientale. Per questo motivo, risulta necessario effettuare test periodici sulle diverse matrici ambientali, con l'obiettivo di salvaguardare e tutelare il patrimonio idrico (APAT, 2006).

6. Letteratura citata

APAT, 2006. L'Ecotossicologia negli ambienti acquatici. Prima ricognizione dello stato dell'arte nelle Agenzie. <https://www.isprambiente.gov.it/contentfiles/00003700/3710-rapporto-71-2006.pdf/>

APAT, 2008. Criteri metodologici per l'applicazione dell'analisi assoluta di rischio ai siti contaminati. Revisione 2.

APAT. Gli ecosistemi e i sedimenti: CARATTERIZZAZIONE DEI SEDIMENTI Linee guida. Protocolli operativi. Attività sperimentali. Documento online: [17 irsa.pdf](#)

Arizzi Novelli A., Volpi Ghirardini A, Giuliani S, Falugi C, Pagano G, Iaccarino M, 2001. Valutazione della tossicità di acque e sedimenti costieri su gameti ed embrioni di specie autoctone di ricci di mare utilizzando metodiche differenziate. *Biol Mar Medit* 8: 41-59.

Augier H., Ramonda G., Rolland J., Santimone M, 1989, Teneurs en métaux lourds des oursins comestibles *Paracentrotus lividus* (Lamarck) prélevés dans quatre secteurs tests du littoral de Marseille (Méditerranée, France). *Vie Mar HS* 10: 226–239.

Bonnet A., 1925. Documents pour servir à l'étude des variations chez les Echinides. *Bull Inst Oceanogr (Monaco)* 462: 1-28.

Borowitzka M.A., Volcani B.E., 1978. The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: ultrastructure of its morphotypes. *J. Phycol.* 14, 10–21. doi:10.1111/j.1529-8817.1978.tb00625.x

Boudouresque C.F., Verlaque M., Azzolina J.F., Meinesz A., Nédélec H., Rico V., 1989. Evolutions des populations de *Paracentrotus lividus* et d'*Arbacia lixula* (Echinoidea) le long d'un transect permanent à Galeria (Corse). *Trav Sci Parc Nat Rég Rés Nat Corse* 22: 65-82.

DECRETO 15 luglio 2016, n. 173. Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini.

Delmas P., 1992. Etude des populations de *Paracentrotus lividus* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea) soumises à une pollution complexe en Provence nord-occidentale: densités, structure, processus de détoxication (Zn, Cu, Pb, Cd, Fe). Thèse Doct, Univ Aix- Marseille 3.

D.lgs. 3 aprile 2006, n. 152 “Norme in materia ambientale” Supplemento Gazzetta Ufficiale del 14 aprile 2006, n. 88. Art. 109. Immersione in mare di materiale derivante da attività di escavo e attività di posa in mare di cavi e condotte.

Fent K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. lett.* 140-141: 353-365.

Gaion A., Scuderi A., Pellegrini D., Sartori D., 2013. Arsenic exposure affects embryo development of sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Bull Environ Contam Toxicol* 9: 565–570.

Garner S., Zysk I., Byrne G., Kramer M., Moller D., Taylor V. e Burke RD, 2016. Neurogenesi negli embrioni di riccio di mare e diversità dei meccanismi neurogenici del deuterostomo. *Sviluppo* , 143 (2), 286-297.

Gianguzza P., Bonaviri C., Guidetti P., 2009. Predazione schiacciante della stella spinosa *Marthasterias glacialis* sul riccio di mare *Paracentrotus lividus*. *Mar Biol* 156, 1083–1086. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1153-x>

Giuliani S., Ennas C., Pellegrini D., Kozinkova L., 2002. The bioassay with sea urchin *Paracentrotus lividus*: different end-points to be applied to different environmental studies. *Fres Environ Bull* 11(10): 806–809

Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2017. AlgaeBase. World-wide Electron. Publ. Natl. Univ. Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; Consult. 5 Giugno 2023

Hayward P.J., J.S. Ryland (eds.), 1990. The marine fauna of the British Isles and North-West Europe: 1. Introduction and protozoans to arthropods. Clarendon Press: Oxford, UK. 627 pp.

ISPRA, 2009. Proposta per la valutazione dello stato qualitativo dei sedimenti fluviali nel sito di interesse nazionale, 13.

ISPRA, 2015. Criticità nel percorso di accreditamento dei saggi ecotossicologici. *Manuli e Linee Guida* 88/2013, 56 pp

ISPRA, 2017. Saggio di fecondazione e saggio di sviluppo embrionale con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). Ricerca Marina 11/2017, 60pp.

ISPRA, 2021. Aspetti metodologici finalizzati all'applicazione dei saggi biologici previsti dall'allegato tecnico al D.M. 173/16: protocollo per la preparazione dell'elutriato. 19-22.

ISPRA. Decreto attuativo dell'art. 109, comma 2 lettera a), D.lgs. 152/2006 e ss.mm.ii. Allegato Tecnico. Documento online: <https://www.isprambiente.gov.it/files/software/decreto-15-luglio-2016-n173/ALLEGATO TECNICO DM 173 2016.pdf>

Istituto Superiore di Sanità. Rischio microbiologico e qualità delle sabbie marine costiere: due campagne di monitoraggio a confronto. 2006, iii, 26 p. Rapporti ISTISAN 06/31. A cura di Laura Mancini, Stefania Marcheggiani, Elisabetta Cara e Lucia Venturi

Klaassen, C. D.; Watkins, J. B. III. Elementi di Tossicologia. CEA; 2013.

Lawrence J.M., McBride S.C., Plank L.R., Shpigel M., 2003. Ammonia tolerance of the sea urchins *Lytechinus variegatus*, *Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus franciscanus*, and *Paracentrotus lividus*. In: Féral JP, David B (eds) Echinoderm research 2001. AA Balkema, Lisse, pp 233–236.

Lewin, J.C., 1958. The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. J. Gen. Microbiol. 18, 427–432. doi:10.1099/00221287-18-2-427

Lozano J., Galera J., López S., Turon X., Palacin, C. 1995. Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 122, 179-191.

Pagano G., Anselmi B., Dinnel P.A., Esposito A., Guida M., Iaccarino M., Melluso G., Pascale M., Trieff N.M, 1993. Effects on sea urchin fertilization and embryogenesis of water and sediment from two rivers in Campania, Italy. Arch Environ Contam Toxicol 25: 20-26.

Pascarella F., 2009. Criteri generali di caratterizzazione sedimenti acque interne. <https://www.isprambiente.gov.it/contentfiles/00004300/4338-c2897-m1-u4.pdf>

Pinto B., Pellegrini D., Gabellini M., Ausili A., 1995. Harbour and coastal sediments chemistry and toxicology: a preliminary study in dredging activities. *J Aquat Ecosyst Health* 4: 1-17.

RAPPORTI ISTISTAN 14/18, 2014. Metodi analitici di riferimento per la valutazione microbiologica dei fanghi di depurazione e di matrici ad essi assimilabili. 153p. https://www.iss.it/documents/20126/45616/14_18_web.pdf/b80c94d3-50d2-9009-6901-393dee1934a6?t=1581099008223

Renzi M., Provenza F., 2020. L'ecotossicologia nella movimentazione dei sedimenti portuali: assetto normativo italiano e sua evoluzione. *Journal of the Siena Academy of Sciences*, 11(2020).

San Martín G.A., 1995. Contribution à la gestion des stocks d'oursins: etude des populations et transplantations de *Paracentrotus lividus* à Marseille (France, Méditerranée) et production de *Loxechinus albus* à Chiloe (Chili, Pacifique). Ph. D. Thesis, Université d'Aix – Marseille, 166 pp.

Sartori D., Pellegrini D., Gaion A., 2016b. Analysis of variability in Embryological response of two sea urchin species to spatial and temporal features-can these factors influence responses in standardized Ecotoxicological assays? *Expert Opin. Environ. Biol.* <https://doi.org/10.4172/2325-9655.S1-002>. S1.

Simonazzi Mara, aa 2016-2017. Crescita della diatomea *Phaeodactylum tricornutum* in acque reflue da impianto di digestione anaerobica (tesi di laurea magistrale). Università di Bologna.

Spinelli G., Albanese I., 1990. Echinodermata: Molecular and cellular biology of the sea urchin embryo. *Reproductive Biology of invertebrates*. Adiyodi KG, Adiyodi R. (Eds.). John Wiley & sons, 283-391.

Tortonese E., 1965. Fauna d'Italia; Echinodermata. Edizioni Calderini, pp. 422. Bologna.

Vethaak AD, Hamers T, Martínez-Gómez C, Kamstra JH, de Weert J, Leonards PE, Smedes F, 2017. Toxicity profiling of marine surface sediments: A case study using rapid screening bioassays of exhaustive total extracts, elutriates and passive sampler extracts. *Mar Environ Res.* 2017 Mar;124:81-91. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.03.002. Epub 2016 Mar 16. PMID: 27083484.

Zavodnik D., 1980. Distribution of Echinodermata in the north Adriatic insular region. *Acta Adriat* 21 (2):437-468.

7. Sitografia

Sito 1: <https://www.certifico.com/ambiente/356-news-ambiente/6700-decreto-173-2016-escavo-di-fondali-marini-documenti> Ultimo accesso: 22/06/2023

Sito 2: https://it.wikipedia.org/wiki/Baird-Parker_agar Ultimo accesso: 01/08/2023

Sito 3: <https://www.isprambiente.gov.it/it/archivio/notizie-e-novita-normative/notizie-ispra/2022/05/il-software-per-la-gestione-dei-sedimenti-marino-costieri-da-dragare-sediqualsoft-109-0-da-oggi-on-line-sul-sito-web-ispra>
Ultimo accesso: 29/07/2023

Sito 4: <https://microbeonline.com/catalase-test-principle-uses-procedure-results/> Ultimo accesso: 29/07/2023

Sito 5: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/MBD/Instructions/X4042C-IT.pdf>
Ultimo accesso: 29/07/2023

Sito 6: <https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia/colorazione-di-gram-distinguere-e-classificare-i-batteri/> Ultimo accesso: 29/07/2023

Sito 7: <https://www.microbiologiaitalia.it/test-microbiologici/dnase-test-agar/>
Ultimo accesso: 29/07/2023

Appendice

Tabella A: concentrazioni a cui fare riferimento per i saggi

concentration 1 :	100	%
concentration 2 :	50	
concentration 3 :	25	
concentration 4 :	12,5	
concentration 5 :	6,25	

Tabella B: risultati *P. lividus* campione B

Replicate	Control	C5	C4	C3	C2	C1
1	20	24	36	42	45	52
2	19	22	39	40	41	48
3	21	28	35	30	39	59
Total number of dead	60	74	110	112	125	159
Total number of living	240	226	190	188	175	141
%mortality	20,00%	24,67%	36,67%	37,33%	41,67%	53,00%

Tabella C: risultati *P. lividus* campione C

Replicate	Control	C5	C4	C3	C2	C1
1	20	13	19	21	22	22
2	19	12	22	27	26	29
3	21	7	24	23	24	25
Total number of dead	60	32	65	71	72	76
Total number of living	240	268	235	229	228	224
%mortality	20,00%	10,67%	21,67%	23,67%	24,00%	25,33%

Tabella D: risultati *P. lividus* campione D

Replicate	Control	C5	C4	C3	C2	C1
1	20	6	21	24	27	63
2	19	9	23	22	33	52
3	21	15	20	26	33	56
Total number of dead	60	30	64	72	93	171
Total number of living	240	270	236	228	207	129
%mortality	20,00%	10,00%	21,33%	24,00%	31,00%	57,00%

Tabella E: risultati *P. lividus* campione MIX

Replicate	Control	C5	C4	C3	C2	C1
1	20	21	35	40	42	54
2	19	24	33	34	46	60
3	21	27	30	38	38	52
Total number of dead	60	72	98	112	126	166
Total number of living	240	228	202	188	174	134
%mortality	20,00%	24,00%	32,67%	37,33%	42,00%	55,33%

Tabella F: risultati *P. tricornutum* campione 1

Time:	Replicate	OPTICAL DENSITY AT 670 nm					
		Control	C5	C4	C3	C2	C1
24 h	1	0,107	0,054	0,057	0,079	0,19	0,257
	2	0,115	0,05	0,051	0,105	0,2	0,205
	3	0,07	0,034	0,063	0,082	0,146	0,257
48 h	1	0,155	0,075	0,076	0,097	0,204	0,294
	2	0,125	0,088	0,074	0,115	0,208	0,22
	3	0,158	0,082	0,098	0,095	0,16	0,255
72 h	1	0,371	0,233	0,259	0,295	0,336	0,414
	2	0,351	0,222	0,249	0,281	0,349	0,442
	3	0,353	0,219	0,262	0,278	0,328	0,399
Validity criteria		average growth rate in the control $\geq 0,9 \text{ d}^{-1}$				YES	
		variation coefficient growth rate control $\leq 7\%$				YES	
		the pH increase in the controls should not exceed 1 unit					

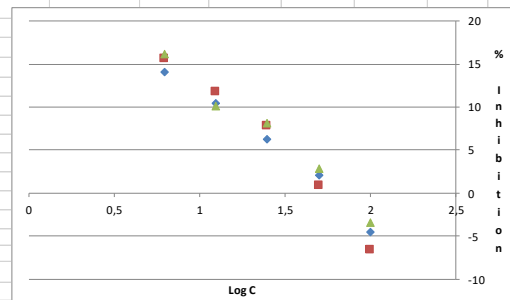


Tabella G: risultati *P. tricornutum* campione 2

Time:	Replicate	OPTICAL DENSITY AT 670 nm					
		Control	C5	C4	C3	C2	C1
24 h	1	0,107	0,031	0,072	0,058	0,047	0,087
	2	0,115	0,117	0,061	0,083	0,075	0,109
	3	0,07	0,034	0,11	0,066	0,056	0,096
48 h	1	0,155	0,044	0,085	0,075	0,066	0,114
	2	0,125	0,135	0,072	0,083	0,088	0,13
	3	0,158	0,065	0,12	0,075	0,086	0,102
72 h	1	0,371	0,341	0,334	0,328	0,319	0,309
	2	0,351	0,344	0,337	0,327	0,317	0,311
	3	0,353	0,342	0,332	0,325	0,315	0,312
Validity criteria		average growth rate in the control $\geq 0,9 \text{ d}^{-1}$ variation coefficient growth rate control $\leq 7 \%$ the pH increase in the controls should not exceed 1 unit					YES YES

Tabella H: risultati *P. tricornutum* campione 3

Time:	Replicate	OPTICAL DENSITY AT 670 nm					
		Control	C5	C4	C3	C2	C1
24 h	1	0,107	0,064	0,051	0,09	0,091	0,126
	2	0,115	0,051	0,028	0,04	0,027	0,081
	3	0,07	0,057	0,032	0,046	0,062	0,158
48 h	1	0,155	0,082	0,076	0,118	0,095	0,148
	2	0,125	0,06	0,104	0,045	0,09	0,119
	3	0,158	0,075	0,051	0,062	0,062	0,155
72 h	1	0,371	0,354	0,321	0,298	0,272	0,251
	2	0,351	0,363	0,324	0,295	0,277	0,254
	3	0,353	0,356	0,312	0,299	0,269	0,256

Tabella I: risultati *P. tricornutum* campione 4

Time:	Replicate	OPTICAL DENSITY AT 670 nm					
		Control	C5	C4	C3	C2	C1
24 h	1	0,107	0,027	0	0,017	0,078	0,103
	2	0,115	0,122	0,04	0,027	0,051	0,125
	3	0,07	0,012	0,37	0,023	0,103	0,113
48 h	1	0,155	0,114	0,062	0,082	0,136	0,116
	2	0,125	0,203	0,082	0,063	0,097	0,118
	3	0,158	0,068	0,079	0,047	0,124	0,114
72 h	1	0,371	0,392	0,368	0,346	0,322	0,307
	2	0,351	0,398	0,356	0,339	0,323	0,306
	3	0,353	0,387	0,362	0,342	0,318	0,302

Tabella J: risultati *P. tricornutum* campione 5

Time:	Replicate	OPTICAL DENSITY AT 670 nm					
		Control	C5	C4	C3	C2	C1
24 h	1	0,107	0,074	0,074	0,141	0,212	0,35
	2	0,115	0,065	0,067	0,099	0,16	0,345
	3	0,07	0,072	0,063	0,105	0,65	0,345
48 h	1	0,155	0,133	0,194	0,163	0,25	0,398
	2	0,125	0,128	0,153	0,168	0,216	0,325
	3	0,158	0,116	0,147	0,212	0,268	0,349
72 h	1	0,371	0,528	0,564	0,622	0,675	0,684
	2	0,351	0,498	0,57	0,593	0,658	0,72
	3	0,353	0,512	0,559	0,612	0,666	0,664

Tabella K: risultati *P. tricornutum* campione A

Time:	Replicate	OPTICAL DENSITY AT 670 nm					
		Control	C5	C4	C3	C2	C1
24 h	1	0,107	0,113	0,102	0,142	0,172	0,329
	2	0,115	0,074	0,113	0,153	0,189	0,285
	3	0,07	0,109	0,098	0,142	0,194	0,295
48 h	1	0,155	0,157	0,126	0,147	0,139	0,235
	2	0,125	0,124	0,126	0,122	0,222	0,258
	3	0,158	0,135	0,126	0,127	0,152	0,268
72 h	1	0,371	0,332	0,347	0,365	0,395	0,412
	2	0,351	0,325	0,342	0,372	0,391	0,415
	3	0,353	0,319	0,33	0,366	0,388	0,417

Tabella L: risultati *P. tricornutum* campione B

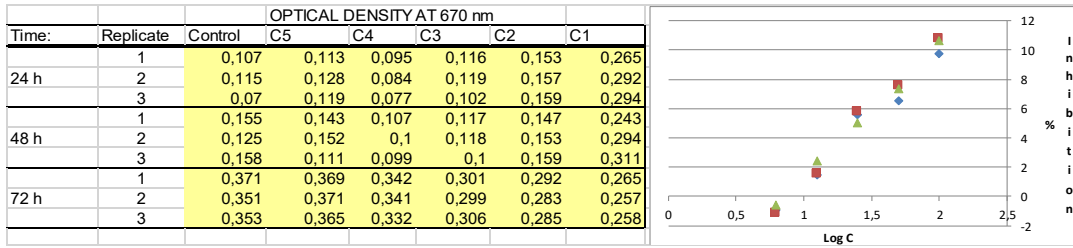


Tabella M: risultati *P. tricornutum* campione C

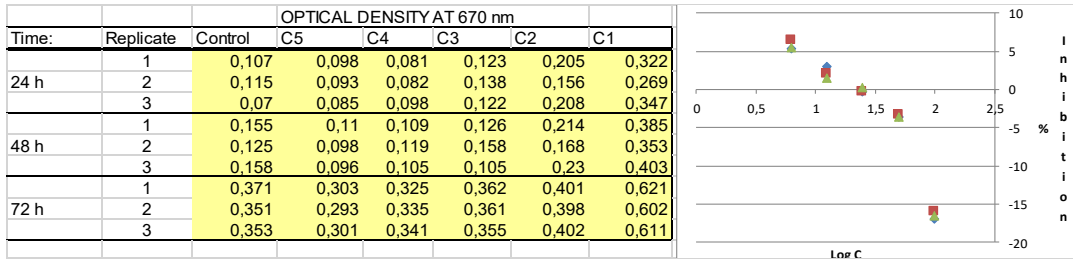


Tabella N: risultati *P. tricornutum* campione D

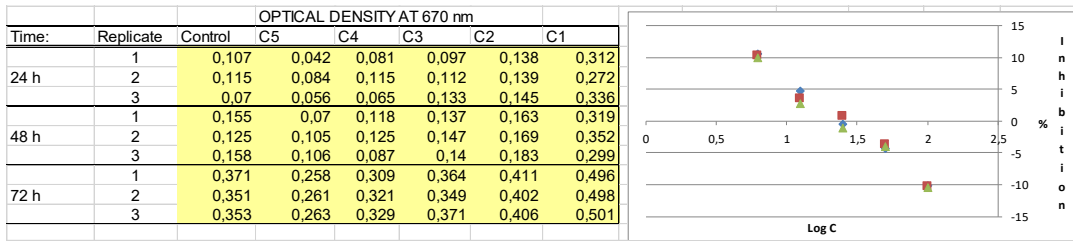


Tabella O: risultati *P. tricornutum* campione MIX

