



**ASPETTI METODOLOGICI FINALIZZATI
ALL'APPLICAZIONE DEI SAGGI BIOLOGICI
PREVISTI DALL'ALLEGATO TECNICO
AL D.M.173/16: PROTOCOLLO
PER LA PREPARAZIONE DELL'ELUTRIATO**

QUADERNI DI ECOTOSSICOLOGIA



**ASPETTI METODOLOGICI FINALIZZATI
ALL'APPLICAZIONE DEI SAGGI BIOLOGICI
PREVISTI DALL'ALLEGATO TECNICO
AL D.M.173/16: PROTOCOLLO
PER LA PREPARAZIONE DELL'ELUTRIATO**

QUADERNI DI ECOTOSSICOLOGIA

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132.

Le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo quaderno.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma

www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Quaderni- Ricerca Marina 16/2021

ISBN 978-88-448-1079-5

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

Grafica di copertina:

Alessia Marinelli - ISPRA - Area Comunicazione Uff. Grafica

Foto di copertina: (un'idea di) Lorenzo Morroni

ISPRA - CN-COS - Sezione sperimentale per la valutazione del rischio ecologico in aree marino costiere

Coordinamento pubblicazione online:

Daria Mazzella

ISPRA - Area Comunicazione

NOVEMBRE 2021

Autori

David PELLEGRINI, (ISPRA, CN-COS)

Cristian MUGNAI, (ISPRA, CN-COS)

Lorenzo MORRONI, (ISPRA, CN-COS)

Valentina VITIELLO, (ISPRA, CN-COS)

Davide SARTORI, (ISPRA, CN-COS)

Giuseppe D'ERRICO, (Università Politecnica delle Marche)

Daniele FATTORINI, (Università Politecnica delle Marche)

Stefano FERRARI, (ISPRA, CN-COS)

Isabella BUTTINO, (ISPRA, CN-COS)

Fulvio ONORATI, (ISPRA, CN-LAB)

Alessandra ARIZZI NOVELLI, (ARTA Abruzzo)

Veronica PIAZZA, (IAS-CNR Genova)

Tristano LEONI, (ARPA Marche)

Francesco REGOLI, (Università Politecnica delle Marche)

Marco FAIMALI, (IAS-CNR Roma)

Il presente Quaderno, aperto ai contributi di esperti del settore appartenenti a laboratori pubblici e privati del territorio nazionale, ha raccolto in particolare i suggerimenti di ricercatori e tecnici dell'Università di Napoli Federico II, di ARPA Emilia-Romagna, dell'Università di Trieste e, tra i laboratori privati, di Consula Ambiente, di Thetis S.p.A., di Biochemie Lab S.r.l, di Bioscience Research Center e di Ecotox LDS.

Prima della sua pubblicazione il Quaderno è stato presentato e discusso nell'ambito dei lavori dell'Osservatorio esperto istituito con Decreto Direttoriale PNM n. 19983 del 07.08.2019 in collegamento con il D.M. n. 173/2016 (Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini), ed è stato condiviso con le Agenzie per la protezione dell'ambiente delle Regioni costiere che partecipano al GdL SNPA di supporto all'Osservatorio. Inoltre è stato trasmesso nella sua versione finale al Consiglio del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente istituito dall'art. 13 della legge n. 132/2016, dal quale non sono pervenute osservazioni.

PRESENTAZIONE

L'utilizzo sempre più frequente delle analisi ecotossicologiche quale specifica "linea di evidenza" per la valutazione degli effetti sugli organismi viventi dovuti all'eventuale presenza di agenti inquinanti nelle matrici naturali, ha determinato un progressivo inserimento dei saggi ecotossicologici nel contesto normativo nazionale.

Al fine di garantire una maggiore confrontabilità dei risultati è necessario poter disporre di protocolli metodologici standardizzati che assicurino, unitamente alla significatività scientifica, una elevata rappresentatività ambientale e una efficace manualità esecutiva. L'interazione sinergica e funzionale tra CN-LAB e CN-COS all'interno di ISPRA, con il supporto dell'intero SNPA e delle migliori esperienze scientifiche nazionali (CNR ed Università), ha portato nel 2017 alla pubblicazione del Quaderno di Ecotossicologia: "Saggio di fecondazione e saggio di sviluppo embrionale con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea)" (Quaderni Ricerca Marina 11/2017) e nel 2019 al Quaderno di ecotossicologia sul "Saggio di sviluppo larvale in presenza di sedimento con il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848)" (Quaderni Ricerca Marina 13/2019), quali proposte metodologiche per un impiego sempre più uniforme dei metodi ecotossicologici, in particolare in riferimento ai saggi biologici indicati dall'Allegato tecnico al DM173/2016.

Il presente Quaderno fornisce un ulteriore e specifico protocollo metodologico da utilizzare nella preparazione degli elutriati per l'esecuzione dei saggi biologici sui sedimenti marini costieri, in riferimento al medesimo Allegato tecnico, anche in risposta alle diverse sollecitazioni istituzionali (audizione alla Camera dei Deputati del maggio 2021) e da parte degli operatori di settore a vario titolo coinvolti nella gestione dei sedimenti marino costieri da movimentare.

Il presente Quaderno, al fine di ottimizzare la fruibilità e la chiarezza del testo, è stato realizzato anticipando i contenuti a tutti gli operatori pubblici e privati di settore che ne avessero fatto richiesta (tramite annuncio su nostro sito web), in un clima di massima trasparenza e collaborazione, riscontrando numerosi apprezzamenti e suggerimenti.

Maurizio Ferla CN-COS

Alessandro Bratti CN-LAB

INDICE

PREMESSA	p.6
INTRODUZIONE	p.7
1. Parametri chimico-fisici di controllo	p.9
1.1 Le diverse forme chimiche dell'azoto	p.10
1.2 Tossicità di nitriti e nitrati per gli organismi acquatici	p.10
1.3 L'ammonio e la sua tossicità, con particolare riferimento alle specie test indicate nell'Allegato tecnico al D.M. 173/2016	p.12
1.4 La problematica dell'ammonio nei sedimenti in relazione alle attività di dragaggio	p.17
2. Protocollo per la preparazione degli elutriati e misura dei principali parametri	
2.1 Preparazione dell'elutriato	p.19
2.1.1 <i>Materiali</i>	p.19
2.1.2 <i>Attività preliminari</i>	p.19
2.1.3 <i>Procedura di preparazione dell'elutriato</i>	p.21
2.1.4 <i>Conservazione dell'elutriato</i>	p.22
2.2 Misura dei principali parametri chimico fisici e indicazioni operative	p.24
2.3 Valori soglia dell'ammonio totale e dei nitriti - indicazioni operative per i saggi della "terza tipologia" dell'Allegato	p.27
2.3.1 <i>Valori soglia</i>	p.27
2.3.2 <i>Indicazioni operative per i saggi della "terza tipologia"</i>	p.28
2.3.3 <i>Esempio di procedura per l'abbattimento dei livelli di ammonio</i>	p.29
BIBLIOGRAFIA	p.30

PREMESSA

L'Allegato Tecnico al D.M. 173/2016 indica la necessità di seguire specifici protocolli metodologici riguardo la determinazione dei parametri ecotossicologici: *“Le metodologie analitiche da utilizzare per la determinazione dei parametri fisici, chimici, microbiologici ed ecotossicologici devono essere conformi a protocolli nazionali e/o internazionali standardizzati o riportati su Manuali e Linee Guida del Sistema Nazionale delle Agenzie.”*

Il presente quaderno descrive il protocollo metodologico da utilizzare nella preparazione degli elutriati nell'esecuzione dei saggi biologici sui sedimenti marini costieri da movimentare, al fine di ridurre alcune possibili fonti di interferenza legate alle tecniche e alle metodologie in uso nei diversi laboratori pubblici e privati, nonché alla necessità di rispettare adeguate condizioni chimico-fisiche della matrice da testare più aderenti al campo di applicazione, in particolare per l'esecuzione dei saggi biologici appartenenti alla “terza tipologia” di cui all'Allegato tecnico del citato D.M.

Vengono fornite indicazioni di dettaglio su come gestire il contributo di fattori di alterazione delle caratteristiche naturali del sedimento, tra cui in particolare la presenza di composti dell'azoto (ammonio e nitriti) che possono compromettere la corretta valutazione dei risultati.

La rilevazione di questi parametri chimico-fisici di controllo è nota da tempo nella letteratura scientifica e nella manualistica di settore, e alcuni protocolli metodologici nazionali ed internazionali ne richiedono la misura, indicandone le modalità di trattamento per la corretta conduzione dei saggi biologici.

Le indicazioni riportate nel presente Quaderno sono state supportate da verifiche sperimentali condotte in ambito SNPA, con la collaborazione dell'Università Politecnica delle Marche e del IAS-CNR, ed emerse in realtà locali soggette a fonti antropiche di materiali organici. Una prima serie di dati utilizzati proviene infatti dallo studio dei fondali del Porto di Ancona nell'ambito di una collaborazione tra ISPRA, ARPA Marche, Università Politecnica delle Marche e Autorità di Sistema Portuale del Mar Adriatico Centrale, e da alcuni approfondimenti tecnico-scientifici su campioni di sedimenti del Porto di Ravenna forniti da ARPA Emilia-Romagna ed eseguiti da ISPRA, Università Politecnica delle Marche e IAS-CNR di Genova.

INTRODUZIONE

L'Allegato tecnico al D.M. 173/2016 prevede 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”.*

Un aspetto di fondamentale importanza nell'applicazione dei saggi ecotossicologici sui sedimenti marini soggetti a movimentazione è quindi la preparazione dell'elutriato.

Il processo di elutriazione permette di simulare la mobilitazione dei sedimenti (Shuba et al., 1978), particolarmente rilevante durante i dragaggi (ASTM, 1990; USACE, 1991) e le operazioni di immersione in mare dei sedimenti.

La procedura di preparazione dell'elutriato prevede la miscelazione del sedimento con acqua di mare (naturale o sintetica), al fine di permettere il rilascio degli inquinanti potenzialmente presenti nel sedimento; tale miscela viene posta in agitazione e poi comunemente centrifugata (Ludwig et al., 1988; ASTM, 1991; Burton and MacPherson, 1995).

L'utilizzo di saggi biologici su elutriato è raccomandato nell'ambito delle linee guida sulla caratterizzazione e monitoraggio previsti da convenzioni internazionali sulla tutela dell'ambiente marino, quale il London Protocol 1996, nonché dalle linee guida ISPRa sull'utilizzo delle batterie per la valutazione dei sedimenti di dragaggio (ISPRa, 2011). In particolare, nelle linee guida per la conduzione del monitoraggio a basso costo e a basso livello tecnologico (IMO, 2016) viene proposta la preparazione di un elutriato utilizzando il rapporto 1:4 in volume.

In letteratura vengono utilizzate anche differenti proporzioni sedimento/acqua, ovvero il rapporto 1:2 (Meador et al., 1990; Vashchenko and Zhada, 1993), 1:3 (Matthiessen et al., 1998), 1:5 (Lee and Nicol, 1978; Da Ros et al., 1997), 1:10 (Daniels et al., 1989; Da Ros et al., 1997), 1:20 (Lee and Nicol, 1978; Daniels et al., 1989), 1:25 (Lee and Nicol, 1978), 1:50 (Long et al., 1990; Van den Hurk et al., 1997; Da Ros et al., 1997), 1:200 (Da Ros et al., 1997) e 2:1 (Williams et al., 1986; Arizzi Novelli et al., 2006). Alcuni lavori mostrano come rapporti 1:20 o 1:50, in taluni casi, siano quelli che mostrano maggiori effetti biologici rispetto a 1:4, e che a diluizioni più spinte (es. 1:200), al contrario, tali effetti si diluiscono eccessivamente (Arizzi Novelli et al., 2006). Considerando le metodiche standard, USACE ha sviluppato protocolli per la preparazione degli elutriati in funzione della destinazione finale del sedimento, prendendo in considerazione vari rapporti di elutriazione e diverse modalità di agitazione della miscela acqua-sedimento, simulando la risospensione nella colonna d'acqua (Di Giano et al., 1995; USACE, 2008; Vicinie et al., 2011). Anche certi protocolli ISO trattano i sedimenti di dragaggio come matrice per la conduzione di saggi biologici, indicando diverse modalità di agitazione e utilizzando un rapporto 1:10 sedimento (peso secco)/acqua (ISO, 2019).

Approfondimenti tecnico-scientifici effettuati recentemente circa alcune criticità emerse in ambito nazionale nell'applicazione dei saggi ecotossicologici alla matrice elutriato dei sedimenti da movimentare suggeriscono, in talune circostanze, di utilizzare indicazioni operative diverse da quelle riportate nell'Allegato al D.M. 173/2016 riguardo la preparazione dell'elutriato che, coerentemente recita in premessa *“...salvo specifiche indicazioni del metodo adottato...”* e *“...conformi a protocolli nazionali e/o internazionali standardizzati o riportati su Manuali e Linee Guida del Sistema Nazionale delle Agenzie.”*

In particolare, in relazione alla associazione tra effetti osservati (a breve e lungo termine) e rapporto di elutriazione è necessario evidenziare quanto segue:

- una miscela acqua-sedimento molto concentrata, quale quella ottenuta con un rapporto 1:4 peso/volume (una parte di sedimento “tal quale” misurata in peso e 4 parti di acqua misurate in volume), è maggiormente associabile alla rilevazione di effetti a breve termine o acuti;
- un rapporto a maggiore diluizione, quale 1:10 (una parte di sedimento “tal quale” misurata in peso e 10 parti di acqua misurate in volume), è più associabile alla rilevazione di effetti a lungo termine o cronici e rappresenta l’approccio più adatto, nell’ambito della classificazione e nella gestione della risorsa sedimento, per una simulazione del rilascio dei contaminanti nella colonna d’acqua durante le attività di movimentazione.

Una miscela molto concentrata è infatti riscontrabile solamente nei primi istanti del rilascio in mare del sedimento dragato e solo nello specifico punto di rilascio, mentre una miscela più diluita si può riscontrare in tempi anche successivi ed in zone limitrofe al sito, oltre a rappresentare la diluizione “tipica” di un sedimento dragato con modalità idraulica (si parla infatti mediamente di una miscela di pompaggio di 100 g/litro di sedimento). Questa ultima condizione è quindi quella più realistica in tutti i casi di gestione del sedimento dragato in ambito marino: ripascimenti costieri, immersione in mare oltre le 3 miglia nautiche o immersione in ambienti conterminati.

La scelta dell’elutriato 1:10 è quindi preferibile per le seguenti motivazioni:

- maggiore coerenza con alcuni protocolli internazionali relativi ai sedimenti da dragare;
- aderenza con il concetto di saggio a lungo termine che registra effetti non immediati, sia riguardo alla vicinanza della fonte di potenziale impatto che al tempo di contatto con la matrice;
- migliore simulazione delle condizioni di miscelazione che avvengono durante l’attività di dragaggio (idraulico – pompaggio miscela solido/liquido).

In riferimento alla maggiore aderenza alla variabilità delle condizioni che possono avvenire durante l’attività di dragaggio, l’elutriato 1:10 può essere preparato entro 14 giorni dal campionamento del sedimento tal quale conservato a 4 °C al buio.

In definitiva, per i saggi a lungo termine/cronici indicati nella “terza tipologia” dell’Allegato tecnico al D.M. 173/2016, la preparazione preferibile dell’elutriato ai fini della classificazione e della successiva gestione è quella che utilizza lo specifico rapporto “sedimento tal quale–acqua” di 1:10¹.

Per i saggi acuti e a breve termine indicati nella “seconda tipologia” dell’Allegato tecnico al D.M. 173/2016, la preparazione dell’elutriato del sedimento, salvo specifiche indicazioni del protocollo, deve essere effettuata entro 10 giorni dal campionamento del sedimento tal quale conservato a 4 °C al buio, con un rapporto “sedimento tal quale (espresso in peso secco)–acqua” di 1:4.

L’elutriato così ottenuto, se non saggiato entro le 24 h dalla preparazione, deve essere conservato a -20 °C fino al momento dell’analisi.

¹ Ai fini delle attività di monitoraggio (che non coinvolge sedimenti da dragare), la preparazione dell’elutriato relativa alla terza tipologia di saggio biologico sarà ordinariamente effettuata con rapporto 1:4, fatto salvo quanto indicato nel Quaderno ISPRA n.11/2017 ed ogniqualvolta si superino le concentrazioni dei valori soglia dei parametri di controllo.

1. PARAMETRI CHIMICO-FISICI DI CONTROLLO

L'applicazione dei saggi biologici rappresenta un approccio largamente utilizzato in campo ecotossicologico per la valutazione della tossicità di acque e sedimenti marini. Questi strumenti hanno lo scopo di rilevare effetti tossici su specie-test attraverso la misura della variazione di un *endpoint* biologico considerato come target.

Affinché la risposta del saggio sia affidabile risulta fondamentale il rispetto di alcuni criteri, primo dei quali la qualità del materiale biologico utilizzato, valutabile grazie ai controlli, positivo (con almeno un tossico di riferimento) e negativo, che devono ricadere all'interno di specifici intervalli di riferimento.

Tuttavia, il rispetto dei valori stabiliti dai controlli non è l'unico criterio di accettabilità, dal momento che le risposte biologiche rilevate potrebbero non essere necessariamente dovute alla sola presenza di inquinanti, ma anche alle caratteristiche chimico-fisiche del campione da testare. Tale aspetto assume particolare rilevanza nel caso di elutriati derivanti da sedimenti marini in condizioni di forte riduzione, i quali possono presentare parametri ambientali divergenti dai valori ottimali per le specie da utilizzare nei saggi biologici. Di conseguenza, il controllo e l'eventuale correzione di parametri quali salinità e pH assumono una fondamentale importanza durante le fasi di preparazione dell'elutriato, così come la temperatura durante il periodo di esposizione, al fine di garantire una buona performance dei saggi biologici (Saco-Alvarez et al., 2010).

Per la salinità e il pH si tratta di parametri critici che devono essere controllati, ma relativamente semplici da correggere durante la preparazione dell'acqua di elutriazione. In particolare, per alcune specie-test stenohaline, la salinità deve essere controllata anche dopo la fase di scongelamento dell'elutriato, per evitare una distribuzione non omogenea dei sali.

Anche per i solfuri è stata dimostrata un'ampia varietà di effetti tossici per gli organismi acquatici, non solo invertebrati, ma anche-pesci, sia a livello cellulare che molecolare (Bagarinao, 1992).

Altro parametro ritenuto causa di possibile criticità è l'ammonio, nella sua forma dissociata e indissociata come ammoniaca, nonché altri composti ridotti che possono essere la causa di "*falsi positivi*" nella valutazione della tossicità di elutriati di sedimenti marini, con concentrazioni generalmente più alte all'aumentare del tempo di stoccaggio del sedimento (Cardwell et al., 1976; Matthiessen et al., 1998; Postma et al., 2002; Losso et al., 2007). In generale l'ammonio non viene trattato come un vero e proprio contaminante nella valutazione normativa del materiale dragato, poiché subisce una rapida ossidazione e diluizione durante il dragaggio e le operazioni di ricollocazione del materiale (USACE, 1995). Tuttavia, poiché la qualità del materiale dragato viene valutata anche in funzione degli effetti misurati con saggi di tossicità (su sedimenti interi ed elutriati), è possibile che la presenza di valori elevati di ammonio possa risultare tossica per alcune specie-test e confondere il processo decisionale.

L'ammonio è riconosciuto come un composto tossico per gli invertebrati marini, in particolar modo durante le fasi larvali (Losso et al., 2007; Saco-Alvarez et al., 2010), quindi con una maggiore influenza sui saggi appartenenti alla "terza tipologia" dell'allegato tecnico del D.M. 173/2016.

I protocolli internazionali raccomandano che le concentrazioni di queste sostanze nelle matrici da testare non superino i limiti di sensibilità dei saggi biologici (ASTM, 2021); ma negli elutriati di sedimenti marini i valori possono essere notevolmente superiori a quei limiti, soprattutto in sedimenti provenienti da ambienti ricchi di materiale organico, come in alcune aree costiere dell'Alto e Medio Adriatico, nei porti-canale e in gran parte degli ambienti lagunari (Losso et al., 2004). Di conseguenza la preparazione della

matrice con il controllo e l'eventuale correzione dei parametri d'interferenza risulta di fondamentale importanza per una corretta applicazione della batteria di saggi biologici prevista dall'Allegato tecnico al D.M. 173/2016, al fine di evitare una sovrastima degli effetti dovuti agli eventuali inquinanti dei sedimenti.

Vengono di seguito riportati alcuni approfondimenti sulle diverse forme chimiche dell'azoto, tra i principali parametri da considerare.

1.1 - Le diverse forme chimiche dell'azoto

Nell'ambiente marino l'azoto, oltre che nella sua forma elementare (N_2) e nelle forme di composti organici azotati, è presente anche come composti inorganici quali: l'ammonio (NH_4^+) e l'ammoniaca (NH_3), il cui equilibrio dipende largamente dalle condizioni di pH e temperatura, lo ione nitrito (NO_2^-) e lo ione nitrato (NO_3^-) (Camargo and Alonso, 2006; Wetzel, 2001). Questi composti possono essere naturalmente presenti negli ecosistemi acquatici e originano da fonti puntuali e diffuse di emissione tra cui: processi di deposizione atmosferica, deflussi di acque superficiali e sotterranee, dissoluzione di deposizioni geologiche, processi di fissazione dell'azoto ad opera di cianobatteri, decomposizione naturale della materia organica e dei sottoprodotti del catabolismo proteico, scarichi urbani ed industriali, reflui di allevamento o di attività legate all'acquacoltura (Hargreaves, 1998; Seitzinger and Kroeze, 1998; Constable et al., 2003; Jensen, 2003; Neal and Davies, 2003; Camargo et al., 2005; Nixon et al., 2007; Cutrofello and Durant, 2007; Sigleo and Frick, 2007; Wear and Tanner, 2007; Bouwman et al., 2011).

Negli ambienti acquatici la nitrificazione aerobica per mezzo di batteri chemioautotrofi dei generi *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* trasforma naturalmente l'ammonio totale ($NH_4^+ + NH_3$) in nitrito (NO_2^-) e poi in nitrato (NO_3^-), come schematizzato di seguito (Camargo and Alonso, 2006):

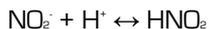


Il processo di nitrificazione è fortemente influenzato dalle condizioni ambientali quali le variazioni di pH e temperatura, la concentrazione dei batteri nitrificanti, la presenza di composti inibitori (Russo and Thurston, 1991) e i livelli di ossigeno disciolto che a concentrazioni $< 1,0 \text{ mg L}^{-1}$ inibisce il processo (Sharma and Ahlert, 1977; Wetzel, 2001). Tali parametri di controllo contribuiscono ad influenzare la quantità di ammoniaca non ionizzata (NH_3), che rappresenta il termine della degradazione batterica dell'azoto in ambienti con ossigeno limitato, come i sedimenti anossici (ANZECC-ARMCANZ, 2000).

1.2 - Tossicità di nitriti e nitrati per gli organismi acquatici

I nitriti rappresentano la forma intermedia di ossidazione dell'azoto e generalmente originano dall'ossidazione dell'ammonio totale (ammoniaca + ione ammonio) nei processi di biodegradazione; più raramente possono derivare da processi di riduzione dei nitrati e, in ambienti non inquinati, sono presenti in concentrazioni che variano tra $0,001$ e $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ (NO_2^- -N) (Kelso et al., 1997; Wiesche and Wetzel, 1998; Wetzel, 2001).

In acqua lo ione nitrito e l'acido nitroso non ionizzato (HNO_2) sono collegati da uno stretto equilibrio chimico:



Le concentrazioni relative di NO_2^- e HNO_2 dipendono dal pH dell'acqua: se il valore del pH sale la concentrazione di NO_2^- tende ad aumentare. A pH 7,5 - 8,5 la concentrazione di HNO_2 è di 4 - 5 ordini di grandezza minore rispetto alla concentrazione di NO_2^- (Russo et al., 1981). In queste condizioni è principalmente il nitrito il responsabile di fenomeni di tossicità, con danni gravi ed elevata mortalità per gli organismi acquatici (Svobodova et al., 2005).

In letteratura sono disponibili molte informazioni sulla tossicità del nitrito per pesci, gamberi e altri organismi acquatici. I valori di LC50 a 96h per il nitrito variano tra 10 e 30 mg L^{-1} per invertebrati di acqua dolce e tra 0,25 e 100 mg L^{-1} per i pesci di acqua dolce. I rispettivi range di LC50 a 96h per gli organismi marini variano tra 10 e 300 mg L^{-1} per gli invertebrati e tra 100 e 1.000 mg L^{-1} per i pesci.

La tossicità del nitrito è fortemente influenzata dalla concentrazione del cloro nell'acqua e diminuisce all'aumentare di quest'ultimo.

Nel range di temperatura tra 22 e 30 °C, con un pH compreso tra 7,0 e 8,1, la tossicità dei nitriti non sembra subire sostanziali variazioni (Colt and Tchobanoglous, 1976); per temperature superiori a 30 °C la tossicità dei nitriti aumenta (con produzione di metaemoglobina nei pesci), mentre le basse temperature (10 °C) riducono la loro tossicità (Huey et al., 1984).

Per i nitriti come per l'ammonio non sono disponibili concentrazioni limite di riferimento per le matrici ambientali marine. Nelle linee guida canadesi per la protezione della vita acquatica (CSQG) è riportato, infatti, solo un valore limite per gli ambienti acquatici di acqua dolce di 0,06 mg L^{-1} (espresso come NO_2^-).

Indicazioni ulteriori derivabili dalle informazioni sulla corretta gestione degli acquari, suggeriscono una concentrazione cautelativa di 0,05 mg L^{-1} o comunque una concentrazione limite di 0,1 mg L^{-1} per la sopravvivenza degli invertebrati marini ritenuti più sensibili.

Lo ione nitrito in ambiente acquatico non presenta forme non ionizzate (HNO_2 in acqua è completamente dissociato in H^+ e NO_2^-). La principale azione tossica del nitrito, soprattutto su pesci e gamberi, si esplica attraverso la sua capacità di convertire il pigmento che trasporta l'ossigeno (emoglobina o emocianina) in una forma incapace di legare l'ossigeno (metaemoglobina o metemocianina) (Jensen, 1996; Scott and Crunkilton, 2000). Per esplicare questa azione tossica il nitrito deve essere convertito in nitrito all'interno dell'organismo (Cheng and Chen, 2002). Inoltre, i nitrati possono trasformarsi in nitrosammine, sostanze ritenute a possibile rischio cancerogeno. Per questo motivo la legislazione europea ed italiana ha posto in 50 mg L^{-1} la concentrazione massima ammissibile dei nitrati nelle acque potabili.

Il nitrito (NO_2^-) risulta essere poco tossico per i pesci a causa della sua bassa permeabilità a livello dell'epitelio branchiale (Jensen, 1996; Scott and Crunkilton, 2000; Cheng e Chen, 2002; Alonso and Camargo, 2003) e generalmente la sua tossicità negli ecosistemi acquatici è considerata irrilevante (Camargo et al., 2005). Le concentrazioni soglia dei nitrati per la tutela della vita acquatica riportate nelle CSQG sono di 16 e 13 mg L^{-1} , rispettivamente per le acque dolci e per le acque salate.

Per gli stadi giovanili di *Haliotis tuberculata* e *Paracentrotus lividus* (Basuyaux and Mathieu, 1999) sono state determinate concentrazioni di *safe level* a 15 giorni (nessuna influenza sulla crescita), rispettivamente di 250 e 100 mg L^{-1} .

1.3 - L'ammonio e la sua tossicità, con particolare riferimento alle specie test indicate nell'Allegato tecnico al D.M. 173/2016

L'ammonio totale si trova generalmente in due forme, indissociata (NH_3) e ionizzata (NH_4^+), il cui equilibrio è espresso dalla seguente relazione chimica:



Tale equilibrio dipende dalle condizioni di temperatura e di pH dell'acqua: all'aumentare della temperatura e del pH (quest'ultimo in Figura 1), la concentrazione di NH_3 tende ad aumentare, mentre quella di NH_4^+ a diminuire.

Nelle condizioni naturali dell'ambiente marino, caratterizzato da pH inferiori a 9, la stragrande maggioranza dell'ammonio è presente come NH_4^+ (Ip et al., 2006).

L'aumento della temperatura favorisce la formazione di ammoniaca (Morris, 1987), mentre l'incremento della salinità ne determina una riduzione a scapito dello NH_4^+ . Tuttavia, l'effetto della salinità sull'equilibrio $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ è quantitativamente assai meno rilevante rispetto a quello esercitato dal pH e dalla temperatura.

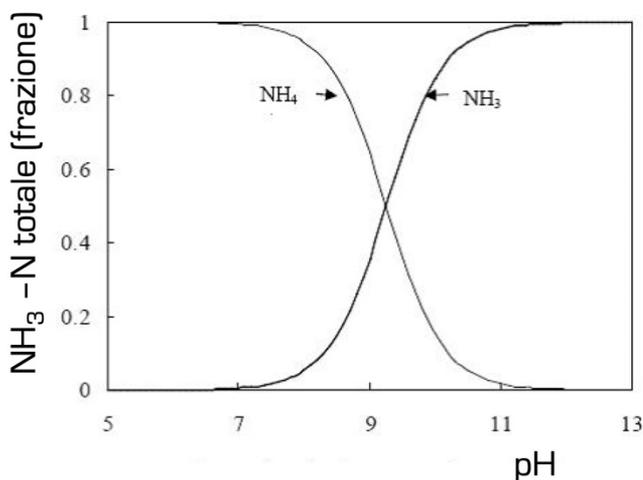


Figura 1. Speciazione chimica dell'azoto ammoniacale in funzione del pH (adattato da Jiang et al., 2015)

Per risalire alla percentuale di ammonio indissociato, data la temperatura, il pH e la concentrazione di ammonio totale disciolto, è possibile utilizzare la relazione di Emerson et al. (1975) [Tabella 1].

Tabella 1. Percentuale di ammonio indissociato (NH_4) in soluzione acquosa (Emerson et al., 1975), in funzione del pH e della temperatura.

pH	TEMPERATURA														
	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
7,0	0,11	0,13	0,16	0,18	0,22	0,25	0,29	0,34	0,39	0,46	0,52	0,60	0,69	0,80	0,91
7,2	0,18	0,21	0,25	0,29	0,34	0,40	0,46	0,54	0,62	0,82	0,83	0,96	1,10	1,26	1,44
7,4	0,29	0,34	0,40	0,46	0,54	0,63	0,73	0,85	0,96	1,14	1,31	1,50	1,73	1,96	2,26
7,6	0,45	0,53	0,63	0,73	0,86	1,00	1,16	1,34	1,55	1,79	2,06	2,36	2,71	3,10	3,53
7,8	0,72	0,84	0,99	1,16	1,35	1,57	1,82	2,11	2,44	2,81	3,22	3,70	4,23	4,82	5,48
8,0	1,13	1,33	1,56	1,82	2,12	2,47	2,86	3,30	3,81	4,38	5,02	5,74	6,54	7,43	8,42
8,2	1,79	2,10	2,45	2,86	3,32	3,85	4,45	5,14	5,90	6,76	7,72	8,80	9,98	11,29	12,72
8,4	2,80	3,28	3,83	4,45	5,17	5,97	6,88	7,90	9,04	10,31	11,71	13,26	14,95	16,78	18,77
8,6	4,37	5,10	5,93	6,88	7,95	9,14	10,48	11,97	13,61	15,41	17,37	19,50	21,78	24,22	26,80
8,8	6,75	7,85	9,09	10,48	12,04	13,76	15,66	17,73	19,98	22,41	25,00	27,74	30,62	33,62	36,72
9,0	10,30	11,90	13,68	15,65	17,82	20,18	22,73	25,46	28,36	31,40	34,56	37,83	41,16	44,53	47,91
9,2	15,39	17,63	20,08	22,73	25,58	28,61	31,80	35,12	38,55	42,02	45,57	49,09	52,58	55,99	59,31
9,4	22,38	25,33	28,47	31,80	35,26	38,84	42,49	46,18	49,85	53,48	57,02	60,45	63,73	66,85	69,79
9,6	31,36	34,96	38,38	42,49	46,33	50,16	53,94	57,62	61,17	64,56	67,77	70,78	73,58	76,17	78,55
9,8	42,00	46,00	50,00	53,94	57,78	61,47	64,99	68,31	71,40	74,28	76,92	79,33	81,53	83,51	85,30
10,0	53,44	57,45	61,31	64,98	68,44	71,66	74,63	77,35	79,83	82,07	84,08	85,88	87,49	88,92	90,19
10,2	64,53	68,15	71,52	74,63	77,46	80,03	82,34	84,41	86,25	87,88	89,33	90,60	91,73	92,71	93,58

Nelle zone costiere la variabilità della concentrazione di azoto ammoniacale è in genere molto alta e strettamente legata ad una varietà di fattori quali gli apporti fluviali, gli insediamenti costieri e gli impianti di acquacoltura. Nelle acque di fondo, invece, l'azoto ammoniacale si origina principalmente dalla sedimentazione e mineralizzazione della sostanza organica. In particolar modo nella stagione estiva, in presenza di una marcata stratificazione delle acque, con l'aumento delle temperature e la presenza di condizioni anossiche, si possono avere nelle acque di fondo valori di azoto ammoniacale superiori a quelli rilevati nelle acque superficiali (ARPA-Regione Emilia-Romagna, 2002).

La tossicità dell'azoto ammoniacale è generalmente attribuita alla sua forma indissociata (NH_3) che per la sua natura lipofila è in grado di diffondere attraverso le membrane degli organismi acquatici molto più facilmente dello ione ammonio (Russo, 1985).

Tuttavia, anche lo ione NH_4^+ ha un ruolo determinante nella tossicità complessiva dell'azoto ammoniacale, come dimostrato da Kater et al. (2006) che, in una serie di esperimenti a pH controllato, ha evidenziato una combinazione di effetti tossici dovuti a NH_4^+ e NH_3 per *Corophium volutator* a pH inferiori a 8,3.

La tossicità acuta dell'azoto ammoniacale totale aumenta con l'aumentare del pH, sia nei pesci (Camargo and Alonso, 2006), che negli invertebrati acquatici (Hickey and Martin, 1999); mentre alle basse temperature gli invertebrati hanno evidenziato una notevole tolleranza all'azoto ammoniacale (Arthur et al., 1987). I meccanismi che regolano il rapporto temperatura-tossicità non sono noti, ma è stato ipotizzato che la temperatura possa alterare la tossicità dell'azoto ammoniacale attraverso un effetto sulla permeabilità delle membrane, sulla produzione endogena di ammoniaca e/o su altri processi biochimici e fisiologici.

L'interazione tra ammoniaca e ossigeno disciolto è un altro importante fattore nel determinare la tossicità dell'ammonio in ambiente acquatico. La tossicità acuta dell'azoto ammoniacale aumenta quando i livelli di ossigeno disciolto diminuiscono (Thurston et al., 1981). Una forte diminuzione del contenuto di ossigeno (ipossia o anossia) infatti, crea condizioni ambientali riducenti che favoriscono la formazione di NH_3 .

Nella guida EPA - *Ambient Water Quality Criteria for Ammonia (Saltwater)* (1989) sono riportati dati sulla tossicità acuta di NH_3 per 21 organismi di acqua salata appartenenti a 18 generi differenti, con valori di LC50 che variano da 0,23 a 43 mg L^{-1} (la specie più sensibile è risultata la passera di mare, *Pseudopleuronectes americanus*, ma sono riportate prove anche su crostacei e su molluschi che si sono dimostrati tra gli organismi più resistenti).

In Tabella 2 vengono riportate le concentrazioni di effetto riscontrate per alcuni dei saggi indicati nell'Allegato tecnico al D.M. 173/2016, derivate dalla letteratura scientifica o determinate sulla base di prove di laboratorio effettuate dal gruppo dei ricercatori autori della presente pubblicazione.

Tabella 2. Concentrazioni di effetto dell'ammonio totale riscontrate per alcuni dei saggi indicati nell'Allegato tecnico al D.M. 173/2016

SPECIE	ENDPOINT	AMMONIO TOTALE (mg L ⁻¹)			RIFERIMENTO
		NOEC (mg L ⁻¹)	LOEC (mg L ⁻¹)	EC50 (mg L ⁻¹)	
<i>Aliivibrio fischeri</i>	Bioluminescenza		256 ± 83 (a)	1194 (a); > 1000 (b)	a: Onorati et al., 2007 b: dati UNIVPM 2020 non pubblicati
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Crescita algale		17,86		Onorati et al., 2007
<i>Pheodactylum tricornutum</i>	Crescita algale		20,44 (NH ₃) (c)	20,0 (d)	c: Azov Y. and Goldman J.C., 1982 d: dati UNIVPM 2020 non pubblicati
<i>Skeletonema costatum</i>	Crescita algale	> 1703 (NH ₃) (e)		14,1 (d) 1,7 (EC20) (f)	e,f: Suksomjit et al., 2009 d: dati UNIVPM 2020 non pubblicati
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	Mortalità [48 h]	<20	-	38,33 [35,95-40,87]	dati IAS CNR 2021 non pubblicati
<i>Corophium spp</i>	Mortalità			126	Picone et al., 2008
<i>Acartia tonsa</i>	Mortalità [48 h]	0,03 (NH ₃) (g); 13,67 (h)	0,081 (NH ₃) (g)	1,257 (NH ₃) (g) 0,18-0,22 (NH ₃) (i) 14,18 (10,67-18,85)(h)	g: Jepsen et al., 2015 h: dati ISPRA 2020 non pubblicati i: Sullivan e Ritacco, 1985
	Mortalità [7 gg]			20,37 (16,71-24,82)	dati ISPRA 2021 non pubblicati
<i>Tigriopus fulvus</i>	Mortalità		44,5 - 49,3		Onorati et al., 2007
<i>Crassostrea gigas</i>	Sviluppo larvale	4,7 (m;q)		3,5 (n)	m: Losso et al., 2007 n: dati UNIVPM 2021 non pubblicati q: ASTM, 2004
<i>Paracentrotus lividus</i>	Fecondazione	0,5 (m)	1 (m)	0,271 (h); 25,4 (m)	m: Losso et al., 2007 h: dati ISPRA 2020 non pubblicati
	Sviluppo larvale	0,04 (NH ₃) (p); 1 (h); 2,23 (l)	0,08 (NH ₃) (p) 2,54 (l)	0,179 (NH ₃) (p) 2,5 (h); 4,2 (o)	o: Arizzi Novelli et al., 2003; p: Saco-Alvarez 2010; h: dati ISPRA 2020 non pubblicati l; dati ISPRA 2021 non pubblicati
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Sviluppo larvale	0,120 (NH ₃)	0,090 (NH ₃)	0,152 (NH ₃)	Phillips et al., 2005

In particolare, riguardo le specie test della “terza tipologia” vengono di seguito riportate alcune ulteriori informazioni.

Per il saggio di embriotossicità con il riccio di mare *P. lividus* sono riportati in letteratura valori di EC50 per l'ammonio totale pari a 4,2 mg L⁻¹ (3,9 – 4,6) ad un pH di 8,0, ed una EC50 per l'ammoniaca indissociata pari a 0,108 mg L⁻¹ (Arizzi Novelli et al., 2003). Valori simili sono stati registrati anche per *Strongylocentrotus purpuratus*, con una EC50 per l'ammonio totale di 2,98 (2,65 – 3,26) ad un pH di 8,1 (Greenstein et al., 1996). Losso et al. (2007), valutando gli effetti di ammonio e solfuri negli elutriati di sedimenti della laguna di Venezia, riportano per il test di spermiotossicità con *P. lividus*, a pH 8, una EC50 per l'ammonio di 25,4 mg L⁻¹, una NOEC di 0,5 mg L⁻¹ e una LOEC pari a 1 mg L⁻¹; mentre per il test di embriotossicità con l'ostrica *Crassostrea gigas* riportano un valore di NOEC pari a 4,7 mg L⁻¹ a pH 7,8 – 8,1.

L'ammoniaca indissociata è altamente tossica per gli embrioni di riccio di mare, con una soglia di tossicità individuata (NOEC) di appena 0,04 mg L⁻¹ e con una LOEC di 0,08 mg L⁻¹ (Saco-Álvarez et al., 2010). Il valore di EC10 per NH₃, calcolato sulla base di un modello logistico, è risultato 0,068 mg L⁻¹ (0,053 - 0,088), mentre l'EC50 è risultata pari a 0,179 mg L⁻¹ NH₃ (0,161 – 0,199). Questi valori sono simili a quelli trovati per *Arbacia punctulata*, con NOEC e LOEC per NH₃, rispettivamente di 0,03 mg L⁻¹ e 0,09 mg L⁻¹ (Carr et al., 1996) e a quelli riscontrati per *S. purpuratus*, con valori di NOEC che variano tra 0,038 e 0,066 mg L⁻¹ di NH₃ per un range di pH di 7,7 - 8,4 (Greenstein et al., 1996).

Analogamente a quanto riportato per gli echinodermi, anche per i saggi di embriotossicità con i bivalvi sono indicate concentrazioni limite per l'ammonio oltre le quali non è assicurato il buon esito del test. Il protocollo ISO 17244:2015 riporta una concentrazione di ammonio totale nell'acqua di mare non superiore a 1,8 mg L⁻¹. Il protocollo ASTM (2021) per l'esecuzione del test sul sedimento con l'ostrica *C. gigas* riporta, tra le condizioni di accettabilità del test, una concentrazione di ammonio indissociato (NH₃) nell'acqua di esposizione (*overlying water*) ad un pH compreso tra 7,8 e 8,1, inferiore a 0,13 mg L⁻¹. Sempre nell'ambito dei molluschi bivalvi, *Tapes philippinarum* presenta invece una discreta tolleranza all'azoto ammoniacale (Borgatti et al., 1998), con valori di LC50 pari a 18,0 mg L⁻¹ in forme giovanili e adulte, dopo esposizione all'azoto ammoniacale per 7 giorni (Wang, 1989).

Riguardo la sensibilità dei copepodi calanoidi all'ammonio, i primi studi condotti su differenti stadi vitali risalgono agli anni '80. Sullivan and Ritacco (1985) hanno condotto il saggio acuto a 48h esponendo all'ammonio uova di *A. tonsa* e *A. hudsonica* (concentrazioni tra 0,05 e 3,71 mg L⁻¹ NH₄⁺ per *A. tonsa*, e tra 0,018 e 4,46 mg L⁻¹ NH₄⁺ per *A. hudsonica*). Jepsen et al. (2013) riportano che i valori di EC50 a 48h ottenuti da Sullivan e Ritacco sono compresi tra 0,18 e 0,224 mg L⁻¹ NH₃ per i nauplii di *A. tonsa* e tra 0,18 e 0,26 mg L⁻¹ NH₃ per *A. hudsonica* (Tabella 2).

Buttino (1994) ha registrato un valore di LC50 pari a 0,91 mg L⁻¹ (endpoint mortalità) per l'ammonio, esponendo per 24h femmine adulte di *Acartia clausi* a concentrazioni comprese tra 0 e 1 mg L⁻¹. Una esposizione a 0,12 mg L⁻¹ di ammonio causava un significativo incremento della produzione di uova ed una significativa riduzione del successo di schiusa fino al 50 % rispetto al controllo, dopo 9 giorni di esposizione.

In uno studio più recente l'esposizione di nauplii di *Acartia tonsa* a concentrazioni di NH₃ fino a 5,127 mg L⁻¹ ha fatto registrare una NOEC di 0,03 mg L⁻¹ NH₃, una LOEC di 0,081 mg L⁻¹ NH₃ con LC50 a 48 e 72h di 1,257 e 0,22 mg L⁻¹ NH₃, rispettivamente. Adulti di *Acartia tonsa* esposti a concentrazione di NH₃ fino a 8,48 mg NH₃ L⁻¹, hanno registrato una NOEC di 0,477 mg NH₃ L⁻¹ e una LOEC di 1,789 mg NH₃ L⁻¹, con LC50 di 2,37, 0,972 e 0,77 mg NH₃ L⁻¹, rispettivamente a 24h, 48 h e 72 h (Jepsen et al., 2015) (Tabella 2).

Il valore di EC50 di ammonio di 10 ± 6 mg è stato registrato per adulti di *A. sinjiensis* di età superiore a 10 giorni, esposti per 48 h in condizioni statiche e in assenza di cibo a concentrazioni comprese tra 1 e 30 mg L⁻¹ (end-point immobilizzazione/mortalità) (Gissi et al., 2013), confermando quanto riportato per la stessa specie da Rose et al. (2006) e Rose (2004) (EC50 11 ± 2 mg L⁻¹, NOEC di 6 mg L⁻¹).

1.4 - La problematica dell'ammonio nei sedimenti in relazione alle attività di dragaggio

L'ammonio nelle sue forme dissociata e indissociata (NH₄⁺ + NH₃) si trova naturalmente nelle acque interstiziali dei sedimenti in concentrazioni tendenzialmente più elevate nei sistemi ricchi di sostanza organica, formati dalla degradazione batterica e dalle reazioni denitrificanti in condizioni anossiche.

Tale arricchimento di sostanza organica e nutrienti è tipico degli ambienti di sedimenti degradati in cui le normali reazioni del ciclo dell'azoto vengono interrotte.

Le concentrazioni di ammonio riportate per i sedimenti sono generalmente misurate su acque interstiziali separate mediante centrifugazione, spremitura o altre tecniche e riportate rispetto a differenti intervalli di profondità. Sappiamo, tuttavia, che la concentrazione di ammonio nei sedimenti aumenta tipicamente con la profondità al di sotto della zona ossidata superficiale, dove i batteri nitrificanti ossidano l'ammoniaca in nitrato. In un intervallo di 10 cm, la concentrazione di ammonio può aumentare, infatti, di oltre un ordine di grandezza (Lohse et al., 1993).

In letteratura è disponibile un numero considerevole di dati sul contenuto di ammonio totale nei sedimenti estuari e marini. Ad esempio, uno studio sulle concentrazioni di ammonio nelle acque interstiziali in 322 campioni di sedimenti estuari e/o marini negli Stati Uniti ha mostrato una distribuzione log-normale dei dati, con una concentrazione media (\pm scarto tipo) di ammonio totale che varia tra 10,9 mg L⁻¹ (\pm 15,24) e 49,4 (\pm 38,93), rispettivamente per i sedimenti marini e il solo materiale dragato (Moore et al., 1997).

Sims and Moore (1995) in una review sulle concentrazioni di ammoniaca nelle acque interstiziali di sedimenti provenienti da 152 siti di tutto il mondo riportano valori di ammonio indissociato (NH₃) che variano tra 0,12 e 25,7 μ M L⁻¹, per i siti di acqua dolce; 0,12 e 70,5 μ M L⁻¹ per gli ambienti estuarini e 0,04 e 63,4 μ M L⁻¹ per gli ambienti marini. Studi riguardanti siti australiani mostrano risultati simili. In 68 campioni di sedimenti provenienti da 17 aree (4 repliche/area) nel porto di Sydney, sono state rilevate concentrazioni di ammonio totale (media \pm scarto tipo), nelle acque interstiziali di 3,7 \pm 2,4 mg L⁻¹, con un valore massimo di 13,6 mg L⁻¹. Nonostante queste osservazioni, nella maggior parte delle situazioni la condizione ecologica e lo stato di salute delle comunità bentoniche dei sedimenti è apparsa non influenzata dalle elevate concentrazioni di ammonio nelle acque interstiziali (Chariton et al., 2010).

Simpson et al., (2013), a revisione delle linee guida Australiane e Neozelandesi (ANZECC/ARMCANZ) suggeriscono un valore limite per l'ammonio totale nelle acque interstiziali di 4,86 mg L⁻¹; valore ottenuto dall'80° percentile dei valori di fondo del porto di Sydney, sulla base delle indicazioni riportate nelle guide ANZECC/ARMCANZ (2000). È evidente che le concentrazioni di ammonio nelle acque interstiziali della maggior parte degli estuari naturali e dei sedimenti marini possono superare il valore limite delle linee guida sulla qualità dell'acqua senza apparenti impatti negativi sull'ecosistema. Questo superamento è tipico dei sistemi anossici ricchi di sostanze organiche.

Studi sulla qualità dei sedimenti prima delle operazioni di dragaggio per i porti di Victoria, New South Wales e Queensland hanno riscontrato concentrazioni medie di ammonio totale nelle acque interstiziali comprese tra 2 e 50 mg L⁻¹ (Batley et al., 2009).

Stronkhorst (2003) ha riportato concentrazioni di ammonio totale nell'acqua interstiziale maggiori di 100 mg L^{-1} in sedimenti portuali olandesi destinati al dragaggio. Proprio in funzione delle attività di movimentazione sono stati valutati i possibili impatti dell'ammonio rilasciato dai sedimenti durante le operazioni di dragaggio e di immersione al largo del materiale dragato. In particolare, un esame dettagliato del rilascio di ammonio presso l'area di deposizione dei sedimenti in un porto del Queensland ha rilevato una diminuzione delle concentrazioni nell'acqua interstiziale dei sedimenti scaricati da $30\text{-}40 \text{ mg L}^{-1}$ di ammonio totale nei campioni prelevati nella chiatta prima dello scarico, a $0,022 \text{ mg L}^{-1}$ entro 10 minuti dalla loro deposizione, fino a valori $< 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ entro un'ora dal rilascio in mare. Gli effetti sulla colonna d'acqua sono da considerarsi a breve termine, nell'ordine di ore dal momento delle attività, mentre gli effetti a lungo termine si verificherebbero fino a 24 ore dopo la deposizione in mare o il dragaggio; il monitoraggio della qualità dell'acqua durante il dragaggio e la deposizione a mare dei sedimenti non ha comportato il superamento del valore guida di $0,46 \text{ mg L}^{-1}$ di ammonio totale nella colonna d'acqua (Batley et al., 2009). Sempre in ambito australiano, per gli effetti tossici che si verificano nel breve periodo (poche ore o meno), il valore limite di ammonio totale disciolto nelle acque suggerito e determinato sulla base dei valori di LC50 acuti ottenuti su 49 specie test estuarine e marine è di $1,55 \text{ mg L}^{-1}$ (Batley et al., 2009).

A questo proposito si ricorda che i limiti previsti dalla normativa italiana per la concentrazione di azoto ammoniacale ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) nelle acque di scarico sono di 15 mg L^{-1} per gli scarichi in acque superficiali e di 30 mg L^{-1} per gli scarichi in fognatura.

2. PROTOCOLLO PER LA PREPARAZIONE DEGLI ELUTRIATI E MISURA DEI PRINCIPALI PARAMETRI

2.1 - Preparazione dell'elutriato

Riguardo la conduzione dei saggi in fase liquida di cui all'Allegato tecnico al D.M. 173/2016 finalizzati alla classificazione del materiale da movimentare (Cap. 2 dell'Allegato), è determinante la preparazione dell'elutriato da utilizzare nei saggi delle cosiddette "seconda" e "terza tipologia".

Per i saggi acuti a breve termine che vengono indicati nella seconda tipologia, la preparazione dell'elutriato dal sedimento deve essere effettuata con lo specifico rapporto **sedimento tal quale – acqua di 1:4, miscelando una parte di sedimento (calcolata in peso secco) e 4 parti di acqua (in volume)** entro 10 giorni dal campionamento dal sedimento tal quale conservato a 4 °C al buio.

Per i saggi a lungo termine/cronici che vengono indicati nella terza tipologia, la preparazione dell'elutriato del sedimento deve essere prioritariamente effettuata con lo specifico rapporto **sedimento tal quale – acqua di 1:10, miscelando una parte di sedimento (in peso umido) e 10 parti di acqua (in volume)**.

In riferimento alla maggiore aderenza alla variabilità delle condizioni che possono avvenire durante l'attività di dragaggio, l'elutriato 1:10 può essere preparata entro 14 giorni dal campionamento dal sedimento tal quale conservato a 4 °C al buio.

Gli elutriati così ottenuti, se non saggiati entro 24 h dalla preparazione, devono essere conservati a -20 °C fino al momento dell'analisi.

2.1.1 – Materiali

Vengono di seguito elencati i materiali e la strumentazione utili per la preparazione dell'elutriato secondo il presente protocollo:

- Campione di sedimento fresco o congelato (paragrafo 2.1.4);
- Acqua di mare (secondo lo specifico protocollo metodologico del saggio biologico);
- Spatola o cucchiaio in PET o acciaio inox;
- Bilancia di precisione, con almeno 3 cifre decimali;
- Navicella per pesata/vaschette in plastica, alluminio, ceramica, in grado di resistere a temperature di almeno 105 °C;
- Bottiglia, barattolo, beaker per miscelazione acqua e sedimento;
- Piastra magnetica, piastra basculante/orbitante o rotativa, sistema a ribaltamento o altra apparecchiatura in grado di garantire la perfetta miscelazione delle due fasi solido-liquido;
- Ancoretta magnetica (se la miscelazione è effettuata su agitatore magnetico);
- Cilindro graduato/pipette sierologiche;
- Centrifuga refrigerata;
- Tubi/contenitori per centrifuga;
- Pipette e pipettatore (manuale o automatico);
- Contenitori per lo stoccaggio degli elutriati.

2.1.2 - Attività preliminari

Definizione del quantitativo di elutriato necessario per l'esecuzione dei saggi:

- a. Stabilire quali saggi ecotossicologici condurre;

- b. Stabilire i quantitativi di elutriato necessario per la conduzione di ciascun saggio, includendo almeno una aliquota per la misura dei parametri di controllo ed ulteriori aliquote da utilizzare come riserve;
- c. Considerare la tipologia e le caratteristiche dell'acqua da utilizzare per la preparazione dell'elutriato secondo il protocollo metodologico indicato per ciascun saggio (acqua naturale o artificiale, salinità, ecc.);
- d. Una volta stabilito il volume complessivo di elutriato necessario per l'esecuzione dei diversi saggi (punti b e c) e conoscendo il rapporto di elutriazione 1:4 e 1:10, definire il quantitativo di sedimento necessario per la preparazione dell'elutriato.

Determinazione del contenuto d'acqua del sedimento per la preparazione dell'elutriato da utilizzare nei saggi della seconda e terza tipologia

La percentuale di umidità è un dato necessario per la preparazione dell'elutriato 1:4, in quanto il peso del campione tal quale deve essere considerato rispetto al peso secco; per la preparazione dell'elutriato 1:10 è invece un dato di supporto, poiché il peso del campione deve essere considerato come peso umido. In questo ultimo caso è comunque utile determinarla per conoscere le caratteristiche del campione originario. Tale valore risulta infatti espressione di alcune caratteristiche generali del campione di sedimento prelevato "tal quale", quali la tessitura e la presenza di sostanza organica, nonché conferma dell'applicazione di una corretta procedura di prelievo e omogeneizzazione. E' opportuno che tale dato venga, in entrambi i casi, riportato nei risultati delle prove.

Poiché la preparazione dell'elutriato viene effettuata con il campione tal quale, occorre conoscere la percentuale di umidità presente nel campione:

1. Preparare una scheda in cui registrare i dati per ciascun campione, ad esempio utilizzando lo schema di Tabella 3;
2. Omogeneizzare il campione di sedimento con una spatola o un cucchiaino;
3. Preparare le navicelle/vaschette/contenitori etichettandole con il codice del campione;
4. Pesare la navicella/vaschetta/contenitore per determinare la tara e riportare il valore in tabella alla voce "Peso vaschetta [Tara]" (qualora si utilizzi la tabella 3);
5. Azzerare la bilancia mantenendo sul piatto il contenitore vuoto;
6. Prelevare un quantitativo di circa 10 - 15 g di sedimento e posizionarlo nel contenitore;
7. Registrare il peso umido del campione;
8. Per l'essiccamento inserire in stufa a 105 °C per 24 h la vaschetta contenente il campione di sedimento;
9. Far raffreddare il campione, ad esempio in essiccatore con sali di silice per 1 h circa, fino a peso costante (U.S. EPA, 2001a);
10. Pesare la vaschetta contenente il campione secco e riportare il dato in tabella alla voce "*peso secco + vaschetta*" (qualora si utilizzi la tabella 3);
11. Calcolare il peso secco del campione di sedimento sottraendo al valore pesato (Peso secco + vaschetta) il peso della vaschetta;
12. Calcolare la percentuale di Umidità utilizzando la formula:

$$\text{Umidità} = 100 - (\text{Peso secco netto} / \text{peso umido netto}) * 100$$

Tabella 3. Esempio di tabella da utilizzare per il calcolo del rapporto PS/PU e dell'umidità.

Campione	Peso vaschetta (Tara)	Peso umido	Peso secco + vaschetta	Peso secco	PS/PU	Umidità (%)

13. Nel caso di preparazione dell'elutriato con rapporto 1:4, aggiungere al campione "tal quale" pesato, un volume di acqua pari a 4 volte il peso secco del campione sottratto del volume di acqua già contenuto nel campione.

2.1.3 - Procedura di preparazione dell'elutriato

1. Posizionare sulla bilancia il contenitore scelto per la miscelazione del sedimento con l'acqua;
2. Tarare la bilancia azzerando il peso del contenitore;
3. Prelevare con una spatola il quantitativo necessario (in peso) del campione di sedimento preventivamente ben omogenizzato (si raccomanda un quantitativo di almeno 15 g);
4. Aggiungere l'opportuno volume d'acqua mediante un cilindro graduato o un dispensatore di liquidi;
5. Posizionare il contenitore sulla piastra magnetica, piastra oscillante/orbitante, rotativa, nel sistema a ribaltamento o altra apparecchiatura in grado di garantire la perfetta miscelazione delle due fasi solido-liquido² [2], considerando un tempo di agitazione di 1 h a temperatura ambiente (velocità di oscillazione 400 g/min nel caso di agitazione magnetica);
6. Lasciare decantare per almeno 1 h;
7. Prelevare il surnatante e trasferirlo nei contenitori scelti per la successiva centrifugazione;
8. Centrifugare il surnatante a 4 °C per 20 minuti a 1200 g;
9. Al termine della centrifugazione prelevare il surnatante e trasferirlo nei contenitori di conservazione dell'elutriato;
10. La filtrazione degli elutriati è generalmente sconsigliata, ma può essere indicata per alcuni saggi di tossicità in base a quanto riportato nello specifico protocollo. Il Manuale tecnico della *United States Environmental Protection Agency* (U.S.EPA 2001a) relativo ai metodi per il campionamento, lo stoccaggio e la manipolazione dei sedimenti per le analisi chimiche e tossicologiche riporta che la filtrazione può ridurre la tossicità degli elutriati a causa dell'assorbimento di sostanze chimiche disciolte sulla membrana di filtrazione e della ritenzione dei colloidali. Se il materiale

² In alternativa è possibile utilizzare altri sistemi che garantiscano una completa miscelazione delle due fasi liquida-solidi, come ad esempio un flocculatore (agitatore jar test) e procedere come segue, considerando di poter prelevare un quantitativo massimo di 50 g per un rapporto sedimento : acqua di 1:10. Pesare il quantitativo scelto di sedimento all'interno di un becher da 1 L ed aggiungere il volume di acqua di mare calcolato; mettere il sedimento ad agitare con le pale del flocculatore per 1 h a 230 rpm (velocità sufficiente a mescolare completamente le due fasi solido-liquido), facendo attenzione a inserire il contenitore in posizione centrale, evitando che le pale non tocchino le pareti del becher; al termine dell'agitazione lasciare decantare per 1 h a temperatura ambiente.

colloidale deve essere rimosso, la centrifugazione seriale o doppia è generalmente un'alternativa preferita. Qualora sia necessario filtrare un elutriato in considerazione dello specifico protocollo metodologico standardizzato, si raccomanda di utilizzare solo filtri pretrattati e di scartare i primi 10 - 15 mL (Environment Canada, 1994).

2.1.4 - Conservazione dell'elutriato

Le indicazioni dell'Allegato tecnico al D.M. 173/2016 riportano: *“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.”*

In letteratura diversi studi confermano la necessità di eseguire i saggi biologici su elutriato derivante da sedimenti freschi il prima possibile, con una conservazione a 4 °C, preferibilmente entro le 24 h dalla preparazione (U.S.EPA. 2001b); Simpson and Batley, 2016; Geffard et al., 2004), con possibilità alternativa di conservazione a - 20 °C (Liß and Ahlf, 1997).

Gli elutriati possono quindi essere impiegati immediatamente o, se correttamente conservati, entro 24 h dalla loro preparazione, oppure congelati e utilizzati in un secondo momento. Il congelamento, infatti, non altera in modo significativo le caratteristiche dei nutrienti (fosfati, nitrati, silicati e nitriti) della fase liquida (Clementson and Wayte, 1992; Segura-Noguera et al., 2011). Uno studio condotto da Carr e Chapman (1995) ha permesso di verificare l'assenza di differenze significative tra la tossicità di campioni di matrici acquose appena estratte e congelate; risultato confermato successivamente da altri autori (Sartori et al., 2017; Arizzi Novelli et al., 2006, Lera and Pellegrini, 2006). La conservazione a freddo e il congelamento di effluenti industriali hanno dimostrato una capacità di preservazione simile in termini di risposte tossiche con una batteria di saggi ecotossicologici (Naudin et al., 1995; Libralato et al., 2009).

Nel BOX 1 di approfondimento vengono riportate ulteriori informazioni utili alla applicazione della procedura da seguire riguardo le fasi di congelamento e successivo scongelamento della matrice liquida

BOX 1 - Approfondimento sulle condizioni di congelamento e scongelamento della matrice liquida

Quando l'acqua è in forma liquida le sue molecole possono scivolare l'una sull'altra e muoversi liberamente.

L'acqua pura ha una densità di 1.000 g/cm³ a 4 °C. All'aumentare o diminuire della temperatura da 4 °C, la densità dell'acqua diminuisce (Figura 2).

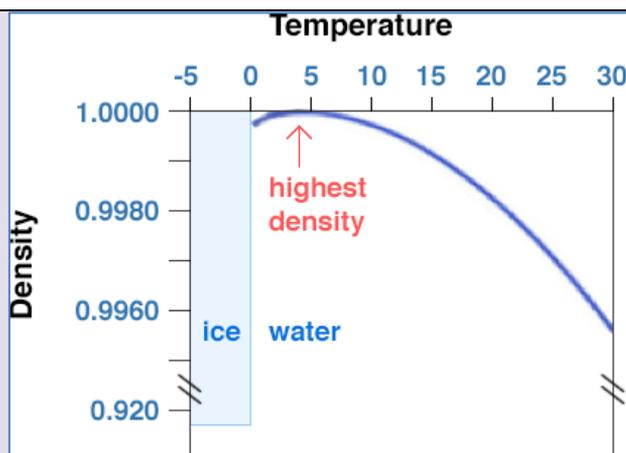


Figura 2 - Grafico di densità vs temperatura

Fonte: Mike Arthur e Demian Saffer (<https://www.e-education.psu.edu/earth111/node/842>)

Quando l'acqua congela si formano legami a idrogeno che bloccano le molecole in posizione secondo uno schema esagonale. Nello stato solido dell'acqua le molecole sono tenute più distanti rispetto a quanto accade nella forma liquida. Al congelamento, quindi, l'acqua si espande con una conseguente riduzione della densità. Il contenuto di sale nell'acqua di mare ne modifica alcune proprietà, determinando un aumento del punto di ebollizione e la diminuzione del punto di congelamento, che si sposta da 0 a circa - 2 °C.

Quando avviene il processo di congelamento delle soluzioni saline gli ioni di sale vengono espulsi dalla fase solida, a causa della formazione preferenziale di cristalli di ghiaccio puro. La formazione di ghiaccio è accompagnata, quindi, da un "salting-out" di ioni nella restante fase liquida, una salamoia sempre più concentrata, man mano che la temperatura diminuisce (Morin et al., 2008). Una conseguenza di questo fenomeno è la generazione di idrati cristallini. Nel corso del processo di concentrazione graduale alcuni sali raggiungono la loro soglia di solubilità e iniziano a precipitare. Il carbonato di calcio ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) precipita a temperature vicine al punto di congelamento dell'acqua di mare (Hu et al., 2014), il solfato di sodio ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) tra - 6 °C (Vancoppenolle et al. 2019) e - 8 °C (Marion et al., 1999).

La precipitazione di carbonati e solfati dalla salamoia non ha praticamente alcun effetto sulla salinità della salamoia del ghiaccio marino (Mel'nichenko and Slobodyuk, 2013). Solo raggiunta la temperatura di circa - 22 °C, il principale costituente dell'acqua di mare, ovvero NaCl, precipita come diidrato $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, modificando la salinità della salamoia.

Alcune goccioline di salamoia rimangono intrappolate nelle tasche tra i cristalli di ghiaccio, rimanendo allo stato liquido. Nel tempo la salamoia può uscire dal ghiaccio marino in modi diversi (per gravità, per migrazione verso il basso attraverso fori e canali nel ghiaccio), lasciando sacche d'aria.

La fase di congelamento, con l'aumento del volume e l'espulsione degli ioni sale dai reticoli di molecole d'acqua, risulta quindi una fase di grandi cambiamenti nello stato dei campioni di acqua o estratti.

A questi cambiamenti di salinità dell'acqua di mare durante il processo di congelamento si accoppia anche una modifica del pH. L'acqua di mare è infatti alcalina (Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001) e il suo pH è generalmente tamponato dal

sistema dei carbonati entro 0,1 - 0,2 unità di pH, intorno al valore medio di 8,2 nelle acque superficiali [Morin et al., 2008].

Sander et al. [2006] hanno proposto che la precipitazione di carbonato di calcio (CaCO_3) nella salamoia a temperature inferiori allo zero potrebbe rimuovere efficacemente la maggior parte dell'alcalinità dell'acqua di mare, annullando così la sua capacità tampone.

Proprio in virtù di questi cambiamenti, nei campioni decongelati è necessario verificare la salinità, secondo quanto indicato al paragrafo successivo.

Fatto salvo quanto sopra riportato e al solo scopo di effettuare ulteriori approfondimenti tecnico-scientifici (da non utilizzare in prove in contraddittorio), sui campioni da caratterizzare tramite esecuzione di saggi biologici con la frazione liquida (saggi di seconda e terza tipologia), qualora esaurita l'aliquota di riserva dell'elutriato congelato, è possibile analizzare un nuovo elutriato preparato a partire dal sedimento originario di riserva decongelato, solo nel caso sia verificata la seguente condizione: il pericolo chimico rispetto al livello chimico di riferimento L2 del campione considerato per tutti i parametri standard sia risultato minore o uguale a "basso" ($\text{HQc} \leq 2,6$) o maggiore o uguale ad "alto" ($\text{HQc} \geq 6,5$).

In questi casi, infatti, la concentrazione dei parametri chimici standard è tale da non determinare sostanziali differenze nella valutazione ecotossicologica dell'elutriato preparato da sedimento fresco o decongelato.

2.2 - Misura dei principali parametri chimico fisici e indicazioni operative

Vengono di seguito riportati i principali parametri chimico fisici di controllo dell'acqua di elutriazione e dell'elutriato, con l'indicazione di alcuni metodi di misura, nonché alcune indicazioni operative riguardo il rispetto dei valori ottimali.

Salinità

Alcune grandezze come la densità, l'indice di rifrazione, la conduttività elettrica e la tensione superficiale aumentano con la salinità e quindi possono essere sfruttate per la sua determinazione. In particolare, la conducibilità dell'acqua aumenta in modo proporzionale alla quantità degli ioni disciolti.

Il salinometro, misurando la conducibilità elettrica di una soluzione attraverso due elettrodi di platino immersi nella soluzione in analisi, determina in maniera accurata la salinità di una soluzione.

Le misure conduttimetriche sono influenzate dalla temperatura all'aumentare della quale aumenta la conduttività. Per ogni grado centigrado i valori della conduttività aumentano tra il 2 e il 4 %; per tale motivo è consigliabile mantenere il campione da analizzare ad una temperatura di circa 20 °C. Altri metodi per la determinazione della salinità consistono nella misurazione della densità o dell'indice di rifrazione con l'impiego di rifrattometri ottici o digitali.

Qualora sia necessario congelare le aliquote da analizzare, anche in relazione a quanto riportato nel BOX 1, è importante mantenere un adeguato spazio di testa nel contenitore, per evitare che durante il congelamento e il conseguente aumento di volume dell'elutriato il processo di *salting-out* possa determinare una fuoriuscita di salamoia dal contenitore, causando una variazione della salinità e del pH del campione. E' inoltre necessario che prima di effettuare un saggio biologico l'elutriato sia completamente decongelato e omogeneizzato.

pH

La determinazione del pH viene effettuata mediante un pHmetro, uno strumento che sfrutta il potenziale creato dalla differenza di concentrazione di ioni idrogeno su due lati di una membrana di vetro.

Il pH di un campione varia in funzione della temperatura. Se la temperatura aumenta, aumenta anche l'attività ionica, in quanto varia la dissociazione degli ioni in soluzione. Per tale motivo è sempre necessario riferire il pH alla temperatura alla quale è stato misurato.

Ammonio totale

Considerato quanto riportato nei paragrafi precedenti circa la possibile influenza dell'ammonio sulla tossicità, è necessario escludere che gli eventuali effetti tossici rilevati nei campioni da testare siano dovuti alla presenza di questa sostanza. A tal fine è necessario determinare la concentrazione di ammonio totale sia nell'acqua utilizzata per la preparazione degli elutriati che in ciascun campione di elutriato, in particolare in quelli che hanno mostrato una qualche evidenza di tossicità.

In letteratura vengono riportati metodi diversi che prevedono una misura quantitativa dell'ammonio [IRSA-CNR, 2003].

In commercio sono disponibili kit di analisi basati su misure spettrofotometriche, conformi ai metodi indicati.

Nitriti

La determinazione dei nitriti nei campioni da analizzare può essere effettuata in spettrofotometria con il metodo della diazotazione. I nitriti reagiscono in soluzione acida con ammine aromatiche primarie formando sali di diazonio. Questi formano complessi aromatici, contenenti un gruppo amminico o idrossilico, composti azoici intensamente colorati la cui assorbanza viene misurata a 543 nm. Riferimenti standardizzati sono i protocolli UNI EN 26777:1994 e DIN 38405 D10-1981.

In commercio sono disponibili kit di analisi basati su misure spettrofotometriche, conformi ai metodi indicati.

Solfuri

In soluzioni acquose esiste un equilibrio pH-dipendente tra solfuro d'idrogeno (H_2S) disciolto, ioni idrogeno solforato (HS^-) e ioni solfuro (S^{2-}). In ambiente acido, dove praticamente è presente solo solfuro d'idrogeno disciolto, questo reagisce con dimetil-p-fenilendiamina e ioni Ferro (III) formando blu di metilene, la cui assorbanza viene determinata fotometricamente a 670 nm. Riferimenti standardizzati sono i protocolli ISO 10530:1992 e DIN 38405-D26-1989.

In commercio sono disponibili kit di analisi basati su misure spettrofotometriche, conformi ai metodi indicati.

Indicazioni operative per il rispetto dei valori ottimali

Nel caso in cui i parametri di controllo indicati siano alterati rispetto alle condizioni ottimali di ciascun saggio, nonché alle condizioni dell'ambiente naturale, è possibile operare secondo quanto riportato nei paragrafi successivi, riportando nei risultati delle prove i valori anomali riscontrati.

Riguardo la **salinità**, nota la condizione ottimale per eseguire la prova, per la preparazione dell'elutriato deve essere utilizzata un'acqua di elutrazione con salinità compatibile. Assicurarsi che anche la salinità finale dell'elutriato sia mantenuta nell'intervallo indicato.

Riguardo il **pH** dell'elutriato, prima dell'esecuzione della prova con il saggio specifico, assicurarsi che si trovi nell'intervallo indicato per la prova. Nel caso non siano rispettate le condizioni di accettabilità previste dai protocolli degli specifici saggi biologici della seconda e della terza tipologia, condizionare l'elutriato, riportando tali parametri negli intervalli di accettabilità della prova.

Riguardo l'**ammonio totale**, prima dell'esecuzione della prova si suggerisce di assicurarsi che il suo livello nell'elutriato sia compatibile con i valori delle concentrazioni di effetto riportati nella tabella 2, i cui valori sono da considerarsi quindi orientativi per la scelta dello specifico saggio, al fine di evitare che esso sia inficiato dalla possibile presenza di ammonio. In particolare, per i saggi della "terza tipologia" devono essere preventivamente considerati i valori soglia riportati al paragrafo 2.3 (Tabella 4). E' comunque possibile, soprattutto nel caso di popolazioni selvatiche, determinare il valore della EC10 nei confronti del medesimo lotto di organismi utilizzati nelle prove quale specifico valore soglia. Per la stima dell'EC10 è opportuno utilizzare una soluzione di NH_4Cl , come indicato nel BOX 2.

La misura dei **nitriti** si rende necessaria solo qualora il campione risulti con una evidente tossicità, in particolare per i saggi della terza tipologia, al fine di escludere una sua possibile interferenza sugli effetti osservati. Per i saggi della "terza tipologia" procedere secondo quanto riportato al paragrafo 2.3.

La misura dei **solfuri** non risulta generalmente necessaria, considerando le normali procedure di preparazione degli elutriati (essendo composti volatili). Tuttavia, potrebbe essere opportuna la loro misura in caso di effetti di tossicità non giustificabili altrimenti. Il protocollo ASTM per l'esecuzione di test statici di tossicità cronica a breve termine a partire da embrioni di quattro specie di molluschi bivalvi d'acqua di mare, recentemente aggiornato (ASTM 2021) riporta alcuni dati sulla sensibilità di *C. gigas* ai solfuri contenuti nei sedimenti (USACE 1994), stimando concentrazioni di effetto nell'elutriato pari a 34 mg L^{-1} (EC50) e $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ (NOEC). La stessa ASTM riporta inoltre un valore limite di $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ fissato dal programma Puget Sound Dredged Disposal Analysis (PSDDA) (U.S. EPA 1993) e relativo ai saggi di sviluppo embrionale con bivalvi ed echinoidi. Come riportato dalla stessa ASTM, tuttavia, tali valori sono da considerarsi comunque indicativi, in quanto dipendono dal numero di campioni analizzati e dalle condizioni sperimentali.

BOX 2 - Determinazione dello specifico valore soglia di accettabilità per l'ammonio nei saggi della terza tipologia

Per l'esecuzione dei saggi appartenenti alla terza tipologia è possibile ricercare uno specifico valore soglia di ammonio totale, al fine di determinarne la concentrazione massima di accettabilità del saggio nelle condizioni di esecuzione della prova. Tale aspetto assume ulteriore importanza nel caso di utilizzo di organismi appartenenti a popolazioni selvatiche per le quali può sussistere una maggiore variabilità nella sensibilità all'ammonio.

La prova per la determinazione del valore soglia prevede l'esposizione degli organismi test a concentrazioni crescenti di cloruro di ammonio, diluendo con la medesima acqua di mare utilizzata nella prova, una soluzione madre concentrata.

Si consiglia quindi di partire da una soluzione madre in acqua distillata di 1 g L⁻¹, utilizzando 1 g di sale di cloruro di ammonio in 1 L di acqua distillata, e procedere con le successive diluizioni misurando la salinità come controllo, al fine di rispettare le condizioni di esecuzione della prova indicate nello specifico protocollo del saggio prescelto.

A titolo esemplificativo si riportano le concentrazioni da utilizzare per l'individuazione di una soglia riguardo i saggi della terza tipologia, indicate come concentrazione di ammonio totale [concentrazione di ammonio totale = concentrazione del cloruro di ammonio/2.965]:

- 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 - 3,5 - 4 - 4,5 - 5 mg L⁻¹ per i saggi di fecondazione e sviluppo larvale con *Paracentrotus lividus*, saggio di sviluppo larvale con *Crassostrea gigas* e *Mytilus galloprovincialis*,
- 1 - 5 - 10 - 15 - 20 mg L⁻¹ per il saggio di mortalità a 7 giorni con *Acartia tonsa*.

Alla prova occorre aggiungere il controllo negativo in acqua di mare filtrata a 0,45 micron (FSW), corrispondente alla concentrazione di 0 mg L⁻¹.

La specifica soglia di concentrazione si identifica con il valore corrispondente alla EC10 stimata sulla curva dose-risposta. Tale stima può essere effettuata tramite il metodo EPA Probit Analysis Program (<https://www.epa.gov/bmds/download-benchmark-dose-software-bmds-model-executables>) che, oltre a fornire il valore di EC10, mostra anche i valori di EC1, EC5, EC15, EC85, EC90, EC95, EC99.

2.3 Valori soglia dell'ammonio totale e dei nitriti - indicazioni operative per i saggi della "terza tipologia" dell'Allegato

2.3.1 - Valori soglia

Gli invertebrati marini utilizzati come specie-test nei saggi di terza tipologia dell'Allegato tecnico al D.M. 173/2016 risultano dunque altamente sensibili alla presenza di ammonio e dei nitriti. Di conseguenza, per discriminare la tossicità dovuta alla reale presenza di inquinanti è fondamentale l'individuazione di "valori soglia", oltre ai quali il saggio è da ritenersi non applicabile alle condizioni date. Per la definizione di tali valori soglia, ISPRA, Università Politecnica delle Marche, IAS-CNR di Genova ed ARPA Marche, partendo dai dati di letteratura, hanno allestito una serie di prove sperimentali (utilizzando cloruro di ammonio e sodio nitrito), su campioni a diversa concentrazione

di ammonio (da qualche decina di microgrammi a diverse decine di milligrammi per litro) e nitriti (nell'intorno di qualche centinaia di microgrammi), riscontrati anche in campioni di elutriato provenienti dai sedimenti dei porti del Medio Adriatico.

I valori soglia sono stati stimati a partire da curve dose-risposta ottenute dalla ripetizione di alcune prove con soluzioni di cloruro di ammonio e con elutriati di campioni reali, nonché dai dati riportati in letteratura, considerando le minime concentrazioni di effetto.

Nella tabella 4 vengono riportate le soglie di accettabilità per ciascun saggio della terza tipologia individuate per l'ammonio totale (esprese come valori medi), fatto salvo quanto riportato al precedente paragrafo 2.2 e al BOX 2 sulle indicazioni operative per l'eventuale individuazione degli valori soglia specifici per le popolazioni di individui utilizzati.

Tabella 4. Soglie di concentrazione di ammonio totale per ciascun saggio della "terza tipologia".

SAGGIO "TERZA TIPOLOGIA"	Valore soglia (NH ₄ ⁺ mg L ⁻¹)
Embriotossicità con <i>Paracentrotus lividus</i>	2
Embriotossicità con <i>Crassostrea gigas</i>	3
Embriotossicità con <i>Mytilus galloprovincialis</i>	3
Inibizione della motilità naupliare (7gg) con <i>Acartia tonsa</i>	8

Riguardo i nitriti, poiché 0,1 mg L⁻¹ rappresenta generalmente una concentrazione critica per la sopravvivenza degli invertebrati acquatici, tale valore, anche sulla base delle informazioni disponibili, viene cautelativamente indicato come "soglia" per l'esecuzione dei saggi della terza tipologia.

2.3.2 - Indicazioni operative per i saggi della "terza tipologia"

Per i campioni di elutriato che presentano una concentrazione di ammonio totale o di nitriti superiore allo specifico valore soglia si può procedere con l'analisi del campione diluito al 50 %. Qualora i valori continuino ad essere superiori ai rispettivi valori soglia è possibile procedere al condizionamento del campione, abbattendo la concentrazione di ammonio o di nitriti dell'elutriato 1:10 (non diluito al 50 %) ad un valore compatibile con il test. I valori di effetto ottenuti nei casi sopracitati dovranno essere utilizzati per la stima dell'*Hazard Quotient* tramite il tool applicativo Sediqualsoft 109.0[®].

La procedura di abbattimento deve essere sempre descritta e accompagnata dalle misure effettuate su controlli (negativo e positivo) indicati nello specifico protocollo metodologico utilizzato e sottoposti allo stesso trattamento, i cui valori devono rientrare nelle soglie di accettabilità di ciascun saggio.

Nel paragrafo 2.3.3, a titolo esemplificativo viene riportata una delle possibili procedure per l'abbattimento della concentrazione di ammonio totale.

Riguardo il saggio di embriotossicità con il riccio di mare *P. lividus* (saggio appartenente alla terza tipologia), il protocollo esecutivo pubblicato come Quaderno ISPRA n.11/2017 prevede la possibilità di utilizzare un elutriato al 50 % per le prove inerenti l'Allegato tecnico al D.M. 173/2016, nelle condizioni di un elutriato 1:4. Occorre evidenziare che nelle condizioni indicate nel presente Quaderno (rapporto di

elutriazione 1:10], tale facoltà è riservata solo “*per i campioni di elutriato che presentano una concentrazione di ammonio totale o di nitriti superiore allo specifico valore soglia*”.

2.3.3 - Esempio di procedura per l'abbattimento dei livelli di ammonio

Nei campioni di elutriato nei quali le concentrazioni di ammonio risultino superiori al valore soglia riportato al paragrafo 2.3.1, tale composto può essere eliminato prima dell'esecuzione del saggio, applicando il metodo seguente.

L'eliminazione dell'ammonio dai campioni acquosi di elutriato può essere effettuata sfruttando la diminuzione della solubilità dell'ammoniaca in acqua al diminuire della pressione e all'aumentare della temperatura. Seguendo tale principio viene misurato il valore di pH della soluzione di prova, quindi aggiunto per titolazione NaOH 10 M fino al raggiungimento di un pH compreso tra 10 e 10,5; a questo punto i campioni vengono posti in centrifuga evaporante sottovuoto, munita di pompa a membrana, per 6 ore alla temperatura di 60 °C. Al termine i campioni vengono recuperati, il pH viene riportato al valore iniziale utilizzando soluzioni concentrate di HCl per titolazione e il volume iniziale ripristinato mediante aggiunta di acqua ultrapura.

L'aggiunta di NaOH prima e di HCl in seguito, contribuiscono ad un lieve incremento dei tenori di Na⁺ e Cl⁻, che non modifica significativamente il valore di salinità del campione di elutriato. La salinità può comunque essere monitorata prima e dopo il trattamento, per verificare che sia ottimale per l'esecuzione del saggio, come previsto dai protocolli. La modifica dei volumi di soluzioni aggiunte è trascurabile.

Gli elutriati così trattati possono essere nuovamente analizzati per la determinazione dello ione ammonio secondo il metodo precedentemente descritto e utilizzati, in funzione del risultato, con i vari saggi di embriotossicità.

BIBLIOGRAFIA

Alonso A. and Camargo J.A., 2003. Short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70, 1006–1012.

ANZECC/ARMCANZ, 2000. Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water quality, vol. 1. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, Canberra, Australia.

APAT CNR IRSA 3030 Man 29 2003 Determinazione di cationi (sodio, ammonio, potassio, magnesio, calcio) mediante cromatografia ionica.

Arizzi Novelli A., Picone M., Losso C., Volpi Ghirardini A., 2003. Ammonia as confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). Toxicol. and Environ. Chem. 85 (4-6), 183-191.

Arizzi Novelli A., Losso C., Libralato G., Tagliapietra D., Pantani C., Volpi Ghirardini A., 2006. Is the 1:4 elutriation ratio reliable? Ecotoxicological comparison of four different sediment: water proportions. Ecotoxicology and Environmental Safety 65, 306-313.

ARPA–Regione Emilia-Romagna, 2002. Eutrofizzazione delle acque costiere dell'Emilia-Romagna, rapporto annuale. Struttura oceanografica Daphne. Assessorato ambiente studi e documentazione.

ASTM, 1990. Standard guide for collection, storage, characterisation and manipulation of sediments for toxicological testing. E1390–E1391.

ASTM, 1991. Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for Selection of Samplers Used to Collect Benthic Invertebrates. E1391-03.

ASTM, 2004. Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. E1706 – 04.

ASTM, 2021. Standard Guide for Conducting Static Short-Term Chronic Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. E724 – 21.

Arthur J.W., West C.W., Allen K.N., Hedtke S.F., 1987. Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrates species. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 38, 324-331.

Azov Y. and Goldman J.C., 1982. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. Appl. and Envir. Microb. 43 (4), 735-739.

Bagarinao T., 1992. Sulfide as an important factor and toxicant: Tolerance and adaptations in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 24, 21–62.

Basuyaux O. and Mathieu M., 1999. Inorganic nitrogen and its effect on growth of the abalone *Haliotis tuberculata* Linnaeus and the sea urchin *Paracentrotus lividus* Lamarck. Aquaculture 174, 95–107.

Batley G.E., Simpson S. L., 2009. Development of guidelines for ammonia in estuarine and marine water systems. *Marine Pollution Bulletin* 58, 1472–1476.

Borgatti A.R., Pagliarani A., Pirini M., Trigari G., Trombetti F., Ventrella V., 1998. Effetto dell'ambiente marino costiero sulle caratteristiche biochimiche della regolazione ionica e della catena respiratoria dei mitili in allevamento. *Biologia Marina Mediterranea* 5 (3), 1070-1079.

Bouwman A. F., Pawlowski M., Liu C., Beusen A. H. W., Shumway S. E., Gilbert P. M., Overbeek C. C., 2011. Global hindcasts and future projections of coastal nitrogen and phosphorous loads due to shellfish and seaweed aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* 19, 331 – 357.

Burton J.A Jr and Mac Person C., 1995. Sediment toxicity testing issues and methods. *Handbook of ecotoxicology in: Hoffman DJ, Rattener BA, Burton J.A Jr, Cairns J Jr, eds. Boca Raton, FL: Lewis, 70-103.*

Buttino, I., 1994. The effect of low concentrations of phenol and ammonia on egg production rates, fecal pellet production and egg viability of the calanoid copepod *Acartia clausi*. *Mar. Biol.* 119 (4), 629– 634.

Camargo J. A., Alonso, A., Salamanca A., 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58 (9), 1255-1267.

Camargo J. and Alonso A., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32, 831–849.

Cardwell R.D., Woelke C.E., Carr M.I., Sanborn E.W., 1976. Sediment and elutriate toxicity to oyster larvae. In: *Proceedings of the Speciality Conference on Dredging and its Environmental Effects*, Mobile, Alabama. American society of Civil Engineers, New York, 684–718.

Carr R.S. and Chapman D.C., 1995. Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 69–77.

Carr R.S., Chapman D.C., Howard C.L., Biedenbach J.M., 1996. Sediment quality triad assessment survey of the Galveston Bay, Texas system. *Ecotoxicology* 5, 341-364.

Chariton A.A., Roach A.C, Simpson S.L., Batley G.E., 2010. Influence of the choice of physical and chemistry variables on interpreting patterns of sediment contaminants and their relationships with estuarine macrobenthic communities. *Mar. Freshwater Res.* 61, 1109-1122.

Cheng S.Y. and Chen J.C., 2002. Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid–base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic. Toxicol.* 61,181 –193.

Clementson L.A. and Wayte S.E., 1992. The effect of frozen storage of open-ocean seawater samples on the concentration of dissolved phosphate and nitrate. *Water Research* 26 (9), 1171- 1176.

Colt J. and Tchobanoglous G., 1976. Evaluation of short term toxicity of nitrogenous compounds in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 8, 209–224.

Constable M., Charlton M., Jensen F., McDonald K., Craig G., Taylor K. W., 2003. An ecological risk assessment of ammonia in the aquatic environment. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 9, 527–548.

Cutrofello M. and Durant J.L., 2007. Fate of high loads of ammonia in a pond and wetland downstream from a hazardous waste disposal site. *Chemosphere* 68, 1365–1376.

Daniels, S.A., Munawar M., Mayfield C.I., 1989. An improved elutriation technique for the bioassessment of sediment contaminants. *Hydrobiologia* 188/189, 619–631.

Da Ros L., Marin M.G., Fossato V.U., Campesan G., 1997. Sedimenti lagunari: prove di tossicità su embrioni di riccio di mare, *Paracentrotus lividus*. *Biol. Marina Mediterranea* 4 (1), 632–636.

Di Giano F.A., Miller C.T., Yoon J., 1995. Dredging elutriate test (DRET) development. Contract Report D-95-1, U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS.

DIN 38405-10. German Standard Methods for the Analysis of Water, Waste Water and Sludge; Anions (Group D); Determination of Nitrite Ion (D 10). 38405-10:1981-02.

DIN 38405-26. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; anions (group D); determination of dissolved sulfide by spectrometry (D 26). April, 1989.

D.M. 173 del 15 luglio 2016. Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini. GU Serie Generale n.208 del 06/09/2016 - Suppl. Ordinario n. 40.

Emerson K.R., Russo R.C., Lund R.E., Thurston R.V., 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *J. Fish Res. Board Can.* 32, 2379-2383.

Environmental Canada, 1994. Biological test method: fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars), chapter 10. Section 8: Specific Procedures for Testing Samples of Liquid Extracted from Sediment or Similar Material. Method Development and Applications Unit Science and Technology Branch Environment Canada Ottawa, Ontario Report EPS 1/RM/27.

Geffard O., His E., Budzinski H., Chiffoleau J.F., Coynel A., Etcheber H., 2004. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. *Environmental Pollution* 129, 457–465.

Gissi F., Binet M.T., Adams M.S., 2013. Acute toxicity testing with the tropical marine copepod *Acartia sinjiensis*: optimization and application. *Ecotoxicology Environmental Safety* 97, 86-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.008>.

Greenstein D.J., Alzadjali S., Bay S.M., 1996. In: M.J. Allen, C. Francisco and D. Hallock (Eds.), Southern California Coastal Water Research Project Annual Report 1995–95, p. 72. Westminster, CA.

Hargreaves, J.A., 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166, 181–212.

Hickey C.W. and Martin M.L., 1999. Chronic toxicity of ammonia to the freshwater bivalve *Sphaerium novaezelandiae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 38-46.

Hu Y.B., Wolf-Gladrow D.A., Dieckmann G.S., Volker C., Nehrke G., 2014. A laboratory study of ikaite [CaCO₃·6H₂O] precipitation as a function of pH, salinity, temperature and phosphate concentration. *Mar. Chem.* 162, 10–18.

Huey D.W., Beitinger T.L., Wooten M.C., 1984. Nitrite induced methaemoglobin formation and recovery in channel catfish [*Ictalurus punctatus*] at three acclimation temperatures. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 32, 674–681.

IMO, 1996. Protocol to the convention on the prevention of marine pollution by dumping of wastes and other matter, 1972.
<https://wwwcdn.imo.org/localresources/en/OurWork/Environment/Documents/PROTOCOLAmended2006.pdf>

Ip Y.K., Loong A.M., Hiong K.C., Wong P.W., Chew S.F., Reddy K., 2006. Light induces an increase in the pH of and a decrease in the ammonia concentration in the extrapallial fluid of the giant clam *Tridacna squamosa*. *Physiological and Biochemical Zoology* 79 (3), 656-664.

ISO 10530:1992. Water quality – Determination of dissolved sulfide – Photometric method using methylene blue.

ISO 17244:2015. Water quality – Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of japanese oyster [*Crassostrea gigas*] and mussel [*Mytilus edulis* or *Mytilus galloprovincialis*]

ISO 21268-2: 2019 Soil quality – Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil-like materials – Part 2: Batch test using a liquid to solid ratio of 10 l/kg dry matter.

ISPRA Manuali e Linee Guida 67/2011, 2011. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre.

Jensen F.B., 1996. Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish [*Astacus astacus*]. *Aquat. Toxicol.* 34, 95–104.

Jensen F. B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals – A review. *Comp. Biochem. Physiol.* 135A, 9–24.

Jepsen P.M., Andersen C.V.B., Schjelde J., Hansen B.W., 2015. Tolerance of un-ionized ammonia in live feed cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Aquaculture Research* 46, 420-431.

Jiang X., Cheng Z., Ma W., Gao Z., Ma X., Wang R., 2015. Removal of Ammonia from Wastewater by Natural Freezing Method. *Proceedings of the International Conference on Chemical, Material and Food Engineering*. <https://doi.org/10.2991/cmfe-15.2015.41>

Kater B.J., Dubbeldam M., Postma J.F., 2006. Ammonium toxicity at high pH in a marine bioassay using *Corophium volutator*. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 51, 347-351.

Kelso B.H.L., Smith R.V., Laughlin R.J., Lennox S.D., 1997. Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63,4679-4685.

Lee W.Y. and Nicol J.A.C., 1978. Individual and combined toxicity of some petroleum aromatics to the marine amphipod, *Elasmopus pectinicus*. *Marine Biology* 48, 215-222.

Lera S. and Pellegrini D., 2006. Evaluation of the fertilization capability of *Paracentrotus lividus* sea urchin stored gametes by the exposure to different aqueous matrices, *Environ Monit Assess* 119(1-3):1-13.

Libralato G., Avezzi F., Losso C., Volpi Ghirardini A., 2009. Influence of storage methods, refrigeration or freezing, on the toxicity of wastewater samples to oyster embryos, *Environmental Technology* 30 (6), 535-541.

Liß W. and Ahlf W., 1997. Evidence from whole-sediment, porewater, and elutriate testing in toxicity assessment of contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36, 140-147.

Lohse L., Malschaert J.F.P., Slomp C.P., Helder W., Van Raaphorst W., 1993. Nitrogen cycling in North Sea sediments: interaction of denitrification and nitrification in offshore and coastal areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 01, 283-296.

Long E.R., Buchman M.F., Bay S.M., Breteler R.J., Carr R.S., Chapman P.M., Hose J.E., Lissner A.L., Scott J., Wolfe D.A., 1990. Comparative evaluation of five toxicity tests with the sediments from San Francisco Bay and Tomales Bay, California. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1193-1214.

Losso C., Arizzi Novelli A., Picone M., Ghirardini A. V., Ghetti P. F., Rudello D., Ugo P., 2004. Sulfide as a confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Comparisons with chemical analysis data. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 23(2), 396-401.

Losso C., Arizzi Novelli A., Picone M., Marchetto D., Pantani C., Ghetti P.F., Ghirardini A.V., 2007. Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 252-257.

Ludwing D.D. and Sherrard J.H. 1988. An evaluation of the standard elutriate test as an estimator of contaminant release at the point of dredging, contract report HL-88-1, prepared for U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station, Improvement of Operations and Maintenance Techniques Research Program, Washington, DC: U.S. Army Corps of Engineers, Department of the Army.

Marion G.M., Farren R.E., Komrowski A.J., 1999. Alternative pathways for seawater freezing, *Cold Reg. Sci. Technol.* 29 (3), 259–266.

Matthiessen P., Bifield S., Jarret F., Kirby M.F., Law R.J., McMinn W.R., Sheahan D.A., Thain J.E., Whale G.F., 1998. An assessment of sediment toxicity in the river Tyne estuary, UK by means of bioassays. *Mar. Environ. Res.* 45, 1–15.

Meador J.P., Ross B.D., Dinnel P.A., Picquelle S.J., 1990. An analysis of the relationship between a sand-dollar embryo elutriate assay and sediment contaminants from stations in an urban embayment of puget sound, Washington. *Marine Environmental Research* 30 (4), 251-272.

Mel'nichenko N.A. and Slobodyuk A.B., 2013. Nuclear magnetic resonance study of sea-water freezing mechanisms: Temperature dependence of relative brine content in sea ice. *Journal of Glaciology* 59 (216), 711-713.

Moore D.W., Bridges T.S., Gray B.R., Duke B.M., 1997. Risk of ammonia toxicity during sediment bioassays with the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1020–1027.

Morin S., Marion G. M., Von Glasow R., Voisin D., Bouchez J., Savarino J., 2008. Precipitation of salts in freezing seawater and ozone depletion events: a status report. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*: 9035–9060.

Morris J.G., 1987. *Chimica fisica applicata alle scienze biomediche*. Guerrieri F., Lorusso M., Papa S. Editoriale Grasso Bologna 210-213.

Naudin S., Garric J., Vindimian E., Bray M., Migeon B., Vollat B., Lenon G., 1995. Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30, 54-62.

Neal C. and Davies H., 2003. Water quality fluxes for eastern UK rivers entering the North Sea: a summary of information from the Land Ocean Interaction Study (LOIS). *Sci. Total. Environ.* 314/316, 821–882.

Nixon S.W., Betty A.B., Granger S.L., Entsua-Mensah M., Ansa-Asare O., White M.J., Mc Kinney R.A., Mensah E., 2007. Anthropogenic enrichment and nutrients in some tropical lagoons of Ghana, West Africa. *Ecolog. Applicat.* 17, S144–S164.

Onorati F., Sarni A., Faraponova O., Ruggiero G., Mecozzi M., 2007. Ruolo dei nutrienti e della salinità come possibili fonti di interferenza sull'esito di alcuni saggi biologici. *Biol. Mar. Medit.*, 14 (1), 181-185.

Phillips, B.M., Nicely, P.A., Hunt, J.W., Anderson, B.S., Tjeerdema, R.S., Palmer, F.H., 2005. Tolerance of five west coast marine toxicity test organisms to ammonia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75, 23–27.

Picone M., Bergamin M., Arizzi Novelli A., Noventa S., Delaney E., Barbanti A., et al., 2008. Evaluation of *Corophium orientale* as bioindicator for Venice Lagoon: Sensitivity assessment and toxicity-score proposal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 174–184. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.06.005.

Postma J.F., de Valk S., Dubbeldam M., Maas J.L., Tonkes M., Schipper C.A., Kater B.J., 2002. Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 226–237.

Rose A., 2004. The utility of a native copepod species for determining the toxicity of chemicals and complex effluents. *Environmental Biology Bachelor of Science (Honours) Environmental Biology*. University of Technology, Sydney.

Rose A., Carruthers A.M., Stauber J., Lim R., Blockwell S., 2006. Development of an acute toxicity test with the marine copepod *Acartia sinjiensis*. *Aust. J. Ecotoxicol.* 12, 73–81.

Russo R.C., 1985. Ammonia, nitrite and nitrate. In Rand G.M., Petrocelli S.R. *Fundamental of aquatic toxicology*. Washinton: H.P.C. Mc Graw-Hill 455-471.

Russo R.C., Thurston R.V., Emerson K., 1981. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effects of pH, nitrite species, and anion species. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 38, 387–93.

Russo R.C. and Thurston R.V., 1991. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. In: Brune D.E., Tomasso J.R. (eds.): *Aquaculture and Water Quality*. World Aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, 58–89.

Saco-Álvarez L., Durán I., Lorenzo J.I., Beiras R., 2010. Methodological basis for the optimization of marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicol Environ Safety* 73, 491 – 499.

Sander R., Burrows, J.P., Kaleschke L., 2006. Carbonate precipitation in brine – a potential trigger for tropospheric ozone depletion events. *Atmos. Chem. Phys.* 6, 4653–4658.

Sartori D., Macchia S., Vitiello V., Morroni L., Onorati F., Pellegrini D., 2017. ISPRA, Quaderni – Ricerca Marina n. 11/2017. A cura di Macchia S., Sartori D., Roma, pp 60.

Scott G. and Crunkilton R.L., 2000. Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2918–2922.

Segura-Noguera M., Cruzado A., Blasco D., 2011. Nutrient preservation, analysis precision and quality control of an oceanographic database of inorganic nutrients, dissolved oxygen and chlorophyll a from the NW Mediterranean Sea. *Scientia Marina* 75 (2), 321-339.

Seitzinger, S.P. and Kroeze C., 1998. Global distribution of nitrous oxide production and N inputs in freshwater and coastal marine ecosystems. *Glob. Biogeochem. Cycles* 12, 93–113.

Sharma B. and Ahlert R.C., 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Water Res* 11, 897–925.

Shuba, P. J., Tatem H. E., Carroll J. H., 1978. Biological assessment methods to predict the impact of open-water disposal of dredged material. Technical Report D-78-50, U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS.

Sigleo A.C. and Frick W.E., 2007. Seasonal variations in river discharge and nutrient export to a Northeastern Pacific estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73, 368–378.

Sims W.G. and Moore D.W., 1995. Risk of Pore Water ammonia toxicity in dredged material bioassays. US Army Corps of Engineers Waterways Experiment Station Miscellaneous Paper D-95-3, Vicksburg, MS, USA.

Simpson S.L., Batley G.B., Chariton A.A., 2013. Revision of the ANZECC/ARMCANZ Sediment Quality Guidelines. CSIRO Land and Water Science Report 08/07. CSIRO Land and Water.

Simpson S. and Batley G., 2016. Sediment quality assessment: A practical guide. CSIRO, 2016. <http://hdl.handle.net/102.100.100/90767?index=1>.

Stronkhorst J., Schot M.E., Dubbeldam M.C., Ho K.T., 2003. A toxicity identification evaluation of silty marine harbour sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Marine Pollution Bulletin* 46 (1), 56–64.

Sullivan B.K. and Ritacco P.J., 1985. Ammonia toxicity to larval copepods in eutrophic marine ecosystems: a comparison of results from bioassays and enclosed experimental ecosystems. *Aquatic Toxicol* 7, 2005–2217.

Suksomjit M., Nagao S., Ichimi K., Yamada T., Tada K., 2009. Variation of dissolved organic matter and fluorescence characteristics before, during and after phytoplankton bloom. *Journal of Oceanography*, 65 (6), 835–846. doi:10.1007/s10872-009-0069-x

Svobodova Z., Machova J., Poleszczuk G., Huda J., Hamackova J., Kroupova, H., 2005. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: three case studies. *Acta Vet. Brno.* 74, 129–137.

Thurston R.V., Phillips G.R., Russo R.C., Hinkins S.M., 1981. Increased toxicity of ammonia to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) resulting from reduced concentrations of dissolved oxygen. *Can. J. Fisher Aquatic. Sci.* 39, 983-988.

UNI EN 26777:1993 Water quality - Determination of nitrite - Molecular absorption spectrometric method

UNI EN ISO 10253:2017 Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*

USACE (US Army Corps of Engineers). 1991. Draft feasibility report, American River watershed investigation, California, documentation report. unpublished report. USACE Sacramento District, South Pacific Division. April 1991.

USACE (US Army Corps of Engineers), 1994. Dredged Analysis Information System (DAIS), Version 4.4, Electronic Database, Seattle District, U.S. Army Corps of Engineers, Seattle, WA.

USACE US Army Corps of Engineers, 1995. Lower truckee river recon-naissance report. Sacramento (CA): USACE Sacramento District.

USACE United States Army Corps of Engineers, 2008. New York District (NYD). Far Field Surveys of Suspended Sediment Plumes Associated With Harbor Deepening Dredging In Newark Bay. September 2008.

U.S. EPA., 1989. Ambient water quality criteria for ammonia (saltwater) - 1989. EPA 440/5-88-004. National Technical Information Service, Springfield, VA.

U.S. EPA, 1993. Refinements of Current PSDDA Bioassays, Final Report Summary EPA 910/R-9-93-014a, 1993, U.S. EPA, Region 10, Seattle, WA.

U.S. EPA., 2001 (a). Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses: Technical Manual. EPA 823-B-01-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.

U.S. EPA., 2001 (b). Evaluation of Material Proposed for Discharge to Waters of the US - Testing Manual (Inland Testing Manual). EPA/823/B-98/004. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Vancoppenolle M., Madec G., Thomas M., McDougall T.J., 2019. Thermodynamics of sea ice phase composition revisited. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 124, 615–634.

Van den Hurk P., Eertman R.H.M., Stronkhorst J., 1997. Toxicity of harbour canal sediments before dredging and after off-shore disposal. *Mar. Pollut. Bull.* 34 (4), 244–249.

Vashchenko M.A. and Zhada P.M., 1993. Bioassay of bottom sediments of Petr Velikiy Gulf (Sea of Japan) with sexual cells, embryos and larvae of sea urchins. *Oceanology*. 33, 102-106.

Vicinie A., Palermo M., Matko L., 2011. A review of the various elutriate tests and refinements of these methodologies. Proceedings of the Western Dredging Association (WEDA XXXI) Technical Conference and Texas A&M University (TAMU 41) Dredging Seminar, Nashville, Tennessee, June 5–8, 2011.

Wang X., 1989. Tolerance of the blood Cockle (*Anadara granosa*) and Philippine clam (*Ruditapes philippinarum*) to ammonia in sediments. *Mar. Sci.* 6, 51-54.

Wear R. J. and Tanner J. E., 2007. Spatio-temporal variability in faunal assemblages surround the discharge of secondary treated sewage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73, 630–638.

Wetzel R.G., 2001. *Limnology*. 3rd edition. New York: Academic Press.

Wiesche M.V.D. and Wetzel A., 1998. Temporal and spatial dynamics of nitrite accumulation in the river Lahn. *Water Res.* 32, 1653–1661.

Williams L.G., Chapman P.M., Ginn T.C., 1986. A comparative evaluation of marine sediment toxicity using bacterial luminescence, oyster embryo and amphipod sediment bio-assays. *Mar. Environ. Res.* 19, 225–249.

Zeebe R. E. and Wolf-Gladrow D. A., 2001. *Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes*, Elsevier Oceanogr. Ser., vol. 65, Elsevier, New York.

