



*Ministero dell'Ambiente
e della Tutela del Territorio e del Mare*

DIREZIONE GENERALE PER LA SALVAGUARDIA DEL TERRITORIO E DELLE ACQUE

- Vista la Legge 8 luglio 1986, n. 349, recante "Istituzione del Ministero dell'Ambiente e norme in materia di danno ambientale";
- Visto il Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante "Norme in materia ambientale";
- Vista la Legge 28 gennaio 1994, n. 84 recante "Riordino della legislazione in materia portuale" e, nello specifico, l'art. 5bis recante "Disposizioni in materia di dragaggio"
- Vista la Legge 28 dicembre 2015, n. 221, recante "Disposizioni in materia ambientale per promuovere misure di green economy e per il contenimento dell'uso eccessivo di risorse naturali" ed in particolare l'art. 78, recante "Modifica all'articolo 5-bis della Legge 28 gennaio 1994, n. 84, in materia di dragaggio"
- Visto l'art. 5-bis, co. 2, lett. d) della Legge 28 gennaio 1994, n. 84, in conformità del quale qualora i sedimenti "risultino caratterizzati da concentrazioni degli inquinanti al di sotto dei valori di riferimento specifici definiti in conformità ai criteri approvati dal Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, l'area o le aree interessate vengono escluse dal perimetro del sito di interesse nazionale previo parere favorevole della conferenza di servizi di cui all'articolo 242, comma 13, del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152"
- Visti gli esiti dei lavori svolti dal tavolo tecnico sulle attività di dragaggio all'interno dei Siti di Interesse Nazionale, istituito dalla Direzione Salvaguardia del Territorio e delle Acque e pubblicati sul sito istituzionale del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare al link <http://www.bonifiche.minambiente.it/dragaggi.html>

DECRETA

ART. 1

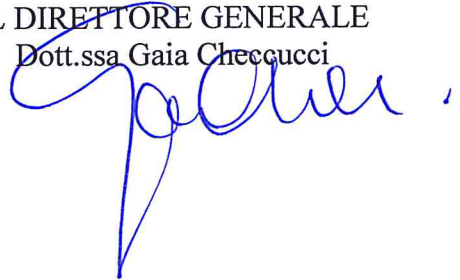
E' approvata la "Procedura per la derivazione dei valori di riferimento in aree marine e salmastre interne alla perimetrazione dei Siti di Interesse Nazionale", allegata al presente decreto, onde costituirne parte integrante e sostanziale, recante i criteri per la definizione dei valori di riferimento specifici di concentrazione degli inquinanti per i materiali risultanti dalle attività di dragaggio di cui all'art. 5-bis, co. 2, lett. d) della legge 28 gennaio 1994, n. 84 all'interno dei Siti di Interesse Nazionale.

ART. 2

Le disposizioni di cui al presente decreto si applicano ai procedimenti non conclusi, nelle forme previste dalla legge, alla data dell'entrata in vigore della presente disposizione.

Roma,

IL DIRETTORE GENERALE
Dott.ssa Gaia Checucci





ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



**Consiglio
Nazionale delle
Ricerche**

PROCEDURA PER LA DERIVAZIONE DI VALORI DI RIFERIMENTO IN AREE MARINE E SALMASTRE INTERNE ALLA PERIMETRAZIONE DEI S.I.N.

PROPOSTA ISPRA – CNR – ISS



A cura di

Mario Carere	ISS
Francesca Giaime	ISPRA
Fulvio Onorati	ISPRA
Enza Maria Quinci	CNR
Mario Sprovieri	CNR

Ottobre 2015

Sommario

PREMESSA	3
1. INTRODUZIONE	4
2. STATO ATTUALE DELLA CARATTERIZZAZIONE DEI SIN.....	5
3. BREVE RICOGNIZIONE GENERALE SUI CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DI SEDIMENTI CONTAMINATI.....	5
4. APPROCCIO PROPOSTO – Generalità.....	8
4.1 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI: IL MODELLO GAM (MODELLO ADDITIVO GENERALIZZATO)	11
4.1.1 Requisiti del set analitico	12
4.1.2 Attribuzione del giudizio di tossicità	15
4.1.3 Procedura di dettaglio.....	19
4.1.4 Strategie per la definizione del livello di riferimento rispetto al contesto ambientale.....	19
4.2 VALUTAZIONE DEL BIOACCUMULO	19
4.2.1 Procedura per la valutazione del bioaccumulo.....	19
4.2.2 Metodologia “Mussel Watch”- Trasferimento Attivo di Mitili.....	22
5. STIMA COSTI ANALISI	22
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	23

PREMESSA

La valutazione della qualità dei sedimenti di aree marine e salmastre in aree ricomprese nel perimetro dei Siti di Interesse Nazionale (SIN) implica aspetti finalizzati a garantire la tutela sanitaria e ambientale nel pieno rispetto della normativa comunitaria e nazionale. Le procedure tecnico-scientifiche per la determinazione di valori di riferimento per i sedimenti si sono rapidamente evolute, tanto da richiedere un aggiornamento di quelle attualmente in uso. E' stato pertanto istituito presso il MATTM, su indicazione del Sottosegretario di Stato, On. Silvia Velo, un tavolo tecnico, coordinato dalla direzione generale competente in materia di bonifiche e costituito da rappresentanti dei Ministeri della Salute, delle Infrastrutture e dello Sviluppo Economico, da esperti delle Regioni, delle Agenzie Regionali per l'Ambiente, dell'ISPRA, dell'ISS e del CNR. Nell'ambito di tale tavolo proprio ISPRA, ISS e CNR hanno formulato una proposta di procedura per l'individuazione dei criteri scientifici finalizzati alla determinazione di valori chimici di riferimento per la matrice sedimento di aree marine e salmastre, utili alla gestione dei sedimenti in aree SIN e a una eventuale rivalutazione del perimetro dei SIN medesimi.

Tale procedura è da considerarsi valida esclusivamente nell'ambito dei SIN, cioè in siti in cui si presuppone sia presente un certo grado di compromissione delle matrici ambientali. Il superamento dei valori chimici di riferimento derivabili dall'applicazione della procedura in un determinato SIN potrebbe comportare un'elevata probabilità di effetti tossici per le comunità bentoniche e rischi per la salute umana in caso di consumo di prodotti ittici provenienti da tale area (bioaccumulo). La conformità ai valori di riferimento potrebbe comportare una rivalutazione delle condizioni che hanno portato all'inclusione dell'area all'interno del SIN.

Si deve evidenziare che la conformità ai valori di riferimento stabiliti dalla procedura tecnico-scientifica proposta non coincide con il raggiungimento del buono stato chimico ed ecologico dei corpi idrici superficiali previsto dalla Direttiva Quadro Acque e dai decreti nazionali di recepimento (D.M. 260/2010, D.lgs. 219/2010 e successivi aggiornamenti). Tale normativa si basa infatti sul concetto di standard di qualità ambientale (stabilito per la colonna d'acqua, sedimenti e/o biota), che rappresenta la concentrazione di un inquinante al di sotto della quale non sono attesi effetti tossici per l'ambiente e la salute umana. I valori di riferimento che saranno elaborati nell'ambito della procedura proposta non costituiscono quindi standard di qualità ambientale.

Tale precisazione risulta importante in particolare per le aree di "pregio" presenti nei SIN (ad esempio aree di molluschicoltura/acquacoltura, aree a vario titolo protette, aree di nursery, aree di balneazione, aree di pesca, ecc.), in quanto queste aree, qualora conformi ai valori di riferimento derivati dalla procedura proposta, dovrebbero essere restituite ad una gestione "ordinaria" e quindi tendere al raggiungimento del buono stato previsto dalla citata Direttiva Quadro Acque.

Per quanto riguarda gli aspetti sanitari inoltre, si fa presente che la procedura proposta non modifica gli obblighi derivanti da altre normative. Pertanto, nelle aree adibite a balneazione, ancorché incluse in un SIN, la normativa vigente è costituita dalla Direttiva 2006/7/CE e relativi decreti di recepimento; per quanto riguarda le aree in cui si praticano attività connesse con il consumo di prodotti della pesca (molluschicoltura, acquacoltura, pesca consentita) la normativa di riferimento è costituita dalle direttive europee di settore (e relativi decreti di recepimento) e dal regolamento europeo 1881/2006/CE e successivi aggiornamenti.

1. INTRODUZIONE

Il presente documento illustra la procedura elaborata di concerto da ISPRA, CNR e ISS, su mandato del MATTM, per l'identificazione di valori di riferimento di contaminanti chimici in relazione alla matrice sedimento di aree marine e salmastre situate all'interno del perimetro dei Siti di Bonifica di Interesse Nazionale (SIN).

Essa è specificamente riferita ai sedimenti marini e salmastri ricadenti nelle perimetrazioni SIN, come da mandato del MATTM, e non è estensibile alla parte a terra.

La procedura proposta è frutto di un'analisi degli approcci metodologici adottati a livello internazionale (soprattutto Stati Uniti e Canada) e riportati nella letteratura scientifica di settore più aggiornata, con adattamenti concettuali e normativi rispetto al contesto italiano e dell'esperienza diretta maturata nelle attività di ricerca applicata condotta dagli istituti.

L'approccio che viene presentato, da adottare in maniera univoca in tutti gli ambienti e situazioni geografiche, risulta sito specifico, e permette di identificare i valori di riferimento per i contaminanti mediante un'integrazione accurata di informazioni che emergono dalla valutazione, tramite test ecotossicologici, degli effetti sull'ambiente e, tramite test biologici, degli effetti potenziali e indiretti sulla salute umana in relazione al bioaccumulo.

La procedura di seguito descritta, basata, per la parte ambientale, su modelli probabilistici, ingloba la logica e le elaborazioni che hanno condotto in precedenza alla formulazione dei cosiddetti "Valori di Intervento" e ne costituisce una evoluzione.

Con l'eccezione di casi particolari, in un'ambiente contaminato l'effetto biologico nei confronti degli organismi acquatici è dato dalla "risultante" dell'azione simultanea di miscele complesse di inquinanti e dalla loro interazione con le condizioni fisico chimiche (es. temperatura, pH, Eh, ossigeno disciolto, attività microbica, ecc...). Per tale ragione non risulta possibile ricavare correlazioni dirette di causa-effetto tra la concentrazione nell'ambiente di una specifica e singola sostanza e gli effetti biologici prodotti negli organismi. Ciò costituisce un importante limite intrinseco comune alle Sediment Quality Guidelines (SQGs), indipendentemente dal criterio utilizzato per la loro derivazione. Per tale motivo, un modo realistico di affrontare la tematica e corrispondere alla esigenza di disporre di valori chimici di riferimento sito specifici, è quella di avvalersi di approcci statistici da applicare su ampi dataset, come attuato anche a livello internazionale.

Il fulcro dell'elaborazione numerica è un'analisi probabilistica, che rappresenta uno strumento di valutazione della stima degli effetti di tossicità da parte delle miscele di contaminanti presenti nel sedimento sulla popolazione di un numero discreto di specie target rappresentative delle comunità acquatiche (saggi biologici). La valutazione dei valori di riferimento è, pertanto, stabilita su soglie di probabilità di effetto; mentre la valutazione del trasferimento delle sostanze bioaccumulabili nella catena alimentare è effettuata attraverso analisi dirette su organismi acquatici per quei contaminanti caratterizzati da una elevata tendenza al bioaccumulo.

Si tratta quindi di un approccio integrato chimico-ecotossicologico-biologico, che riflette le esigenze di valutare lo stato di pericolosità di un sistema complesso come il comparto dei sedimenti, dove fenomeni di mobilità inter- ed intra-matrice dei contaminanti in relazione al cambiamento dei parametri chimico-fisici dell'ambiente, fenomeni di speciazione chimica degli stessi analiti, così come effetti di contributo sinergico e/o di "antagonismo" emergente dalle miscele di inquinanti, possono produrre non linearità complesse in termini di interazioni ed effetti sull'ambiente.

I valori di riferimento così calcolati "integreranno" in maniera scientificamente robusta e tecnicamente semplice le specifiche caratteristiche chimico-fisico-biologiche dei diversi SIN indagati, permettendo scelte gestionali differenti, in termini di identificazione di valori soglia, in relazione anche ad altri fattori relativi al contesto ambientale, quale la presenza di impianti di acquacoltura, biocenosi sensibili, aree protette a diverso titolo, e all'eventuale esigenza di individuare "fasce tampone", cioè margini di sicurezza tra area SIN e l'esterno.

2. STATO ATTUALE DELLA CARATTERIZZAZIONE DEI SIN

I SIN comprendenti aree marino-costiere e di transizione erano 26 fino al 2013. La caratterizzazione è stata completata in 18 di essi.

Successivamente, l'area marina di 9 SIN è stata restituita alle competenze regionali.

Dei rimanenti SIN, sono in corso di completamento le attività di caratterizzazione di Sulcis Iglesiente, Falconara, Trieste e Milazzo; risulta quindi non ancora caratterizzato solo Porto Torres.

Per 17 S.I.N. sono stati definiti, sulla base dei dati disponibili, i cosiddetti "Valori di Intervento", in funzione dei quali è stato delineato il quadro qualitativo delle aree indagate.

La raccolta informazioni in merito allo stato di attuazione delle caratterizzazioni delle aree marino costiere nei SIN ed alla definizione dei Valori di Intervento sito specifici è contenuta nel documento elaborato da ISPRA e trasmesso al MATTM con nota del 10.06.2015 (prot. Nr. 25326).

3. BREVE RICOGNIZIONE GENERALE SUI CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DI SEDIMENTI CONTAMINATI

Negli ultimi decenni soprattutto nel Nord America sono stati sviluppati numerosi standard numerici per la definizione della qualità dei sedimenti, riguardanti sia gli ecosistemi marini che le acque interne.

Tali standard di qualità, definiti genericamente Sediment Quality Guidelines (SQGs), sebbene presentino denominazioni diverse in relazione all'applicazione per la quale sono stati sviluppati (Sediment Quality Criteria, Objectives, Targets, Standards, Benchmarks, Action Levels) si basano sull'integrazione di dati chimici e biologici.

Alcuni autori come Chapman (Chapman et al., 1999) ritengono che i valori numerici degli standard di qualità, non dovrebbero essere gli unici parametri da impiegare per individuare le strategie gestionali più idonee e gli obiettivi da conseguire, ma solamente uno degli strumenti di cui avvalersi congiuntamente ad altre indagini specifiche, come ad esempio i saggi di tossicità e le analisi sulla comunità bentonica (approccio triade).

Gli approcci che vengono selezionati dalle singole giurisdizioni si differenziano in relazione ai recettori finali considerati nel modello concettuale elaborato (ad es.: organismi bentonici, fauna ittica), al grado di rischio che si decide di assumere, all'area geografica nella quale si vogliono applicare, e al loro impiego specifico (MacDonald, 2000).

La metodologia basata sull'equilibrio di ripartizione (EqP) acqua-sedimento è uno dei primi approcci studiati ed approfonditi per definire criteri di qualità dei sedimenti per sostanze organiche non polari e per miscele di metalli (Di Toro et al., 1991; Hansen et al., 1996). Questo approccio si basa sull'assunzione che la concentrazione di una sostanza in un determinato comparto (sedimento o acqua interstiziale) possa essere derivata in base alle proprietà chimico-fisiche della sostanza stessa, nell'ipotesi che lo scambio tra i due comparti avvenga in condizioni di equilibrio. Utilizzando l'approccio dell'EqP, quindi, i valori di SQG per ciascuna sostanza sono ricavati moltiplicando i corrispondenti standard di qualità delle acque (SQA) per il coefficiente di ripartizione acqua/sedimento K_p (l/kg) caratteristico della sostanza:

$$SQG = K_p \cdot SQA$$

In questo modo i valori degli SQG ricavati risultano spesso inferiori ai limiti di quantificazione strumentale, e quindi molto cautelativi per le specie acquatiche, in quanto ricavati dai corrispondenti standard di qualità per le acque, per i quali è molto importante il valore del contenuto di carbonio organico del sedimento che viene utilizzato per calcolare gli SQG.

Tale metodo viene anche suggerito dall'Unione Europea nell'ambito del REACH.

Più recentemente, per la definizione degli standard di qualità sono stati sviluppati metodi combinati, basati su database sia chimici che ecotossicologici, ricavati da diversi approcci sia empirici che teorici.

Tali database si basano prevalentemente sulla selezione di dati di concentrazione chimica dei contaminanti nei sedimenti con i relativi test di tossicità, e del grado di corrispondenza tra i dati chimici e le risposte biologiche misurate (Long e Morgan, 1990).

Da queste distribuzioni di dati vengono selezionati poi diversi valori di SQG, in funzione dello specifico approccio scelto, ed in particolare:

- ERL e ERM (approccio sviluppato dal National Oceanic and Atmospheric Administration degli USA);
- TEL e PEL (approccio sviluppato dallo stato della Florida);
- TEC e PEC (determinati dall'approccio detto Consensus Based).

I due valori soglia ERL (*Effect Range Low*) e ERM (*Effect Range Median*) (Long et al., 1995) sono da intendersi come valori di concentrazione di una determinata sostanza nei sedimenti a cui è associata una bassa o media probabilità di determinare effetti biologici avversi negli organismi bentonici (NOAA, 1999). Questi due valori di concentrazione (ERL ed ERM) corrispondono rispettivamente al 10° e al 50° percentile della distribuzione dei dati di concentrazione di una specifica sostanza per la quale sono stati registrati effetti tossici.

L'approccio denominato degli *Effects Level* (EL), sviluppato dal Florida Department of Environmental Protection (MacDonald, 1994), si basa sull'estensione del database originariamente definito da Long e Morgan (1990), in quanto utilizza anche dati di sedimenti che non hanno fatto registrare effetti biologici avversi per gli organismi bentonici. Il database sviluppato da MacDonald (1994) è stato quindi utilizzato per derivare due classi di SQG: il livello soglia di effetto (TEL), calcolato come media geometrica tra il 15° percentile dei dati di concentrazione di una determinata sostanza che hanno fatto registrare un effetto tossico e il 50° percentile dei dati che non hanno mostrato effetti tossici; il livello probabile di effetto (PEL), calcolato come media geometrica tra il 50° percentile dei dati di concentrazione di una determinata sostanza corrispondenti ad effetti tossici e l'85° percentile dei dati che non hanno fatto registrare effetti tossici. Considerando l'incertezza legata alla distribuzione dei dati e alla presenza di dati anomali, l'utilizzo di medie geometriche permette di scegliere un valore che rispecchia maggiormente la distribuzione media dei dati.

Nell'approccio Consensus Based la derivazione dei valori di SQG avviene attraverso una procedura critica di raccolta e analisi dei dati disponibili per ciascun approccio, in funzione delle procedure di derivazione dei valori, del grado di correlazione dei dati di concentrazione con gli effetti biologici misurati, ecc. I valori di SQG che soddisfano tali criteri di selezione sono raggruppati in due classi di valori (Swartz, 1999) per derivare due livelli di riferimento basati sul consenso: le *Threshold Effect Concentrations* (TEC) e le *Probable Effect Concentrations* (PEC). I valori di TEC rappresentano le concentrazioni di uno specifico contaminante al di sotto delle quali sono raramente attesi effetti negativi sugli organismi bentonici, mentre i PEC indicano le concentrazioni di ogni sostanza al di sopra delle quali effetti biologici nocivi sono frequentemente attesi (MacDonald et al., 1996; Swartz, 1999).

Dopo la suddivisione in classi, i valori numerici dei TEC e PEC sono ricavati dalla media geometrica di tutti i valori classificati rispettivamente nella prima e seconda categoria (MacDonald et al., 2000).

I valori di SQG basati sul consenso, in virtù del metodo con cui vengono derivati, sono considerati valori affidabili poiché costituiscono una sintesi di valori già esistenti riportati da studi scientifici e tengono conto degli effetti della compresenza di miscele di contaminanti nei sedimenti (Swartz 1999; MacDonald et al., 2000).

Nella elaborazione dei cosiddetti "Valori di Intervento" definiti da ISPRA (già ICRAM) per i sedimenti delle aree marine-salmastre interne ai SIN è stato adottato il PEL (Probable Effect Level) calcolato con

dati sito specifici per ciò che riguarda metalli ed elementi in tracce, che presuppone “l'accettazione” di un certo livello di contaminazione per ambienti inevitabilmente compromessi. Tale approccio è stato adottato più in generale in materia di movimentazione dei fondali marini, come riportato nel manuale tecnico APAT-ICRAM (2007) e presentato a livello internazionale in ambito IMO (International Maritime Organization) nella sua versione aggiornata nel 2013 (Onorati *et al.*, 2013).

I riferimenti di letteratura delle varie SQG, tuttavia, non possono essere utilizzati *sic et simpliciter* (indipendentemente dal criterio selezionato), in quanto ottenuti a partire da un database di informazioni chimiche che originano per lo più dalle coste del continente americano, notoriamente diverse da un punto di vista geochimico da quelle del Mediterraneo, e da informazioni ecotossicologiche ottenute con organismi non presenti nei nostri mari o comunque non utilizzati comunemente nei test tossicologici. Quindi, per tenere conto di queste differenze e per una maggiore aderenza alla realtà, la procedura da utilizzare dovrebbe avvalersi di dati locali che contemplino la eterogeneità sito specifica, scaturiti dall'applicazione di saggi biologici e/o altri test biologici riferiti a specie-test presenti anche nel Mediterraneo e derivanti da procedure standardizzate da organismi nazionali e/o internazionali quali (ISO, ESEPA, ASTM, UNI, ecc.).

In Europa, nell'ambito della Strategia di implementazione comune della direttiva quadro acque, è stato pubblicato un documento guida per la derivazione di standard di qualità ambientali (Rif: Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards. Guidance Document n.27. 2011-055. European Commission, disponibile nel sitoweb CIRCABC) in acqua, sedimenti e biota sia per le sostanze prioritarie che per quelle rilevanti a livello nazionale. Gli standard di qualità ambientali rappresentano il Buono Stato Chimico (nel caso delle sostanze prioritarie) dei corpi idrici superficiali o costituiscono un supporto per il raggiungimento del buono stato ecologico (inquinanti specifici a livello nazionale). In particolare, per quanto riguarda i sedimenti la procedura prevede principalmente l'applicazione di due possibili criteri in base ai dati disponibili: 1) l'utilizzo di saggi di laboratorio di tipo acuto o cronico e relativi fattori di sicurezza; 2) l'applicazione dell'equilibrio di ripartizione acqua-sedimento, indicato principalmente per contaminanti organici. In entrambi i casi il dato dovrebbe essere confrontato con metodi di campo che integrano aspetti chimici e biologici (es: TEL/PEL, ERL/ERM, logistic regression).

In Italia il DM 260/2010 (integrato nel D.lgs. 152/2006) individua standard di qualità ambientali per una serie di contaminanti, tra cui alcune sostanze prioritarie di cui alla Direttiva 2013/39/UE. Gli standard di qualità ambientali, come accennato in premessa, rappresentano le concentrazioni che definiscono il buono stato chimico per le sostanze prioritarie e, per le sostanze non prioritarie, concorrono al raggiungimento del buono stato ecologico. Tali standard di qualità ambientali rappresentano quindi concentrazioni protettive per la salute umana e per l'ambiente e si basano principalmente sull'applicazione dei TEL (Threshold Effect Level) sviluppati dal NOAA per gli inquinanti organici; per i metalli i valori sono derivati sulla base delle medie riscontrate in aree di “bianco” e sulla base di valutazioni ecotossicologiche analoghe a quelle del TEL. Inoltre per i contaminanti bioaccumulabili sono incluse anche valutazioni di tipo sanitario.

L'approccio dell'equilibrio di ripartizione, di natura deduttiva e prettamente chimica, è fortemente influenzato dal metodo e dai parametri utilizzati per la stima del coefficiente di ripartizione Koc tra acqua e carbonio organico nei sedimenti. La correttezza dei suoi risultati è inoltre influenzata dal fatto che alcune sostanze presenti nei sedimenti potrebbero effettivamente non risultare in equilibrio con l'acqua interstiziale.

Occorre sottolineare che i metodi descritti non considerano i meccanismi di bioaccumulo, che permetterebbero di stimare effetti avversi su organismi acquatici appartenenti a livelli trofici ai vertici della catena alimentare e, indirettamente, sugli esseri umani che consumano prodotti ittici.

Per quanto riguarda il bioaccumulo esiste un approccio applicato a livello internazionale, basato sull'utilizzo di fattori di ripartizione Biota-Sedimento, che viene denominato BSAF (*Biota Sediment Accumulation Factor*) e che permette di derivare criteri di qualità dei sedimenti tali da garantire che i livelli nel biota non superino i limiti normativi derivati a tutela della salute umana o di predatori quali uccelli acquatici. Tale approccio si riferisce solo agli inquinanti organici apolari e non ai metalli (tranne il

metilmercurio) ed ha il limite principale di dover essere applicato in aree di ridotte dimensioni attraverso studi “ad hoc” che prevedano analisi chimiche di sedimenti e organismi nelle stesse stazioni di campionamento.

Inoltre, tali standard di qualità non tengono conto delle caratteristiche geochimiche locali che potrebbero esercitare un’influenza sulla biodisponibilità dei contaminanti. In particolare, l’approccio basato sul consenso, incorporando i criteri numerici derivati da vari metodi, incluso l’EqP, evidenzia i vantaggi e le limitazioni di tutte queste metodiche e i valori risultati sono da considerarsi una sintesi dei valori pubblicati di SQG (MacDonald et al., 2000).

I principali criteri degli SQG utilizzati da cui sono stati derivati i consensus-based TEC e PEC sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Definizione dei principali standard di qualità dei sedimenti sviluppati con diversi approcci utilizzati per determinare valori di TEC e PEC

SQG	Acronimo	Descrizione
Lowest Effect Level	LEL	I sedimenti sono classificati da non contaminati a marginalmente contaminati. Nessun effetto sulla maggioranza degli organismi bentonici è atteso al di sotto di questo valore (Persaud et al., 1993).
Threshold Effect Level	TEL	Rappresenta la concentrazione al di sotto della quale effetti avversi sono attesi solo raramente (MacDonald, 1994).
Effects Range Low	ERL	Rappresenta la concentrazione chimica al di sotto della quale effetti avversi sono raramente osservati (NOAA, 1999).
Threshold Effect Level (tests con Hyalella Azteca)	TEL-HA28	Rappresenta la concentrazione al di sotto della quale effetti avversi per l’amfipode <i>Hyalella azteca</i> sono attesi raramente (mediante saggi a 28 giorni) (US EPA, 1996).
Severe Effect Level	SEL	I sedimenti sono classificati significativamente contaminati. Effetti avversi sono attesi sulla maggioranza degli organismi bentonici al di sopra di questo valore (Persaud et al., 1993).
Probable Effects Level	PEL	Rappresenta la concentrazione al di sopra della quale effetti avversi sono attesi con elevata probabilità (MacDonald et al. 1994).
Effects Range Median	ERM	Rappresenta la concentrazione chimica al di sopra della quale effetti avversi sarebbero frequentemente osservati (NOAA, 1999).
Probable Effects Level (tests con Hyalella Azteca)	PEL-HA28	Rappresenta la concentrazione al di sopra della quale effetti avversi sull’amfipode <i>Hyalella Azteca</i> sono attesi frequentemente (mediante test condotti per 28 giorni) (US EPA, 1996).

4. APPROCCIO PROPOSTO – GENERALITÀ

A seguito di una ricognizione dello stato attuale delle caratterizzazioni effettuate nei SIN, della qualità e quantità dei dati ambientali disponibili ad ISPRA relativamente alle indagini svolte al loro interno, dei valori di riferimento attualmente disponibili per i SIN (i cosiddetti “Valori di Intervento”) e delle SQG (Sediment Quality Guidelines) internazionali, gli istituti scientifici interpellati dal MATTM propongono l’approccio di seguito descritto.

In linea con le SQG internazionali, i criteri previsti a livello Europeo (Direttiva Quadro Acque) e le conoscenze/esperienze maturate da ISPRA, ISS e CNR in campo ambientale e sanitario, poiché non è

nota alcuna teoria di carattere chimico-fisico che consenta di estrapolare valori di riferimento del comparto sedimenti a partire da effetti misurati a qualsiasi livello dell'organizzazione biologica (molecolare, cellulare, tessuto, organismo, popolazione, ecc.), si assume che qualunque approccio orientato alle finalità descritte debba essere basato sull'integrazione di informazioni chimiche e biologiche e sulla loro successiva elaborazione mediante un approccio di tipo statistico.

Nel caso specifico, per ciò che riguarda gli aspetti ambientali, la procedura proposta è di tipo statistico/probabilistico per la valutazione degli effetti ecotossicologici, basata sulla *stima della probabilità (p) attesa di effetti tossici rispetto alla concentrazione [x] di un determinato contaminante*; tale procedura è supportata da una valutazione di tipo sanitario in relazione al bioaccumulo in organismi acquatici target. Per la parte ambientale saranno quindi derivati valori/soglia sito-specifici per i diversi contaminanti chimici che corrispondono a determinati livelli di probabilità di effetti tossici.

E' opportuno evidenziare che, oltre ai limiti già espressi, l'affidabilità del prodotto finale risulta fortemente condizionata anche da intrinseci errori di tipo statistico, dalla qualità/quantità dei dati disponibili, dalla loro distribuzione e dalla ridotta numerosità dei contaminanti comunemente ricercati rispetto a quelli potenzialmente presenti (noti e non noti), di cui per lo più si ignorano cinetica, sinergismi e interazioni, anche sulla base delle condizioni fisico chimiche del comparto abiotico (es. temperatura, pH, redox, ecc.).

Considerato che:

- i perimetri delle aree marine dei SIN sono stati stabiliti sulla base delle pressioni presenti e di ipotesi di impatto, spesso in assenza di dati di caratterizzazioni dei fondali;
- i SIN possono includere al loro interno corpi Idrici Fortemente Modificati, ma in alcuni casi anche aree di pregio, con usi sensibili (es. aree destinate a molluschicoltura),

si propone che la soglia di riferimento per gli aspetti ambientali, che si potrebbe definire "*Livello di Effetto Accettabile*", debba essere scelta in funzione del contesto ambientale (es. presenza limitrofa di impianti di allevamento, di aree marine a vario titolo protette, biocenosi sensibili come le praterie a fanerogame marine, ecc.), delle pressioni che insistono nell'area (aree portuali, impianti industriali attivi o dismessi, effluenti, ecc.) e degli impatti già individuati.

In tale logica e a titolo esemplificativo si potrebbero definire i seguenti riferimenti:

- *Livello di Effetto Certo* (LEC), in corrispondenza del 95% di probabilità di riscontrare generici effetti tossici (senza specificare la tipologia e l'entità degli effetti);
- *Livello di Effetto Molto Probabile* (LEMP), in corrispondenza di una probabilità attesa di effetti tossici generici del 75%;
- *Livello Soglia di Effetto* (LSE), quando la probabilità di misurare effetti tossici e quella di non riscontrare alcun effetto si equivalgono ($p = 0.5$). Superata tale soglia il contributo della sostanza contaminante agli effetti ecotossicologici complessivi inizia ad essere statisticamente visibile ($p > 0.5$).

Considerando il *Livello di Effetto Certo* (LEC) come principale riferimento e punto di partenza per le successive considerazioni/elaborazioni rispetto anche alla gradualità e alle tipologie delle risposte tossicologiche misurate, è possibile valutare dal punto di vista qualitativo quanto il valore di $p = 0.95$ sia appropriato rispetto allo specifico contesto ambientale, analizzando la ripartizione percentuale dei campioni tossici tra le diverse classi di tossicità (Tabella 6) in base alla gravità degli effetti misurati. Qualora, infatti, la maggior parte dei campioni presenti effetti di tossicità lievi o moderati, è ragionevole presumere che il valore di $p = 0.95$ sia sufficientemente cautelativo, anche in caso di presenza di componenti da tutelare quali ad esempio biocenosi sensibili e aree destinate all'acquacoltura. Qualora invece la maggior parte degli effetti sia grave o molto grave, denotando una situazione di particolare pericolo ecotossicologico, è ragionevole presumere che il valore di p debba essere opportunamente ridotto, soprattutto in caso di presenza di componenti da tutelare.

A seguito di tale verifica, qualora si decida di procedere ad una variazione del livello di “p” accettabile rispetto al LEC ($p = 0.95$), in funzione del contesto ambientale e delle esigenze territoriali, le ARPA e/o le Regioni o, più in generale, i soggetti interessati potrebbero definire il LEA attribuendo uno specifico “peso” a ciascuno dei fattori selezionati da considerare ai fini della descrizione del contesto ambientale (es. presenza limitrofa di impianti di allevamento, di aree marine a vario titolo protette, biocenosi sensibili, ecc.). A tal fine il Tavolo Tecnico ha formulato una lista di variabili con i relativi range all’interno dei quali sarà stabilito il peso di ciascun fattore (par. 4.1.4). In tal modo il “peso” cumulativo dei fattori ambientali selezionati, a partire dal LEC ($p = 0.95$), tenderà a ridurre progressivamente il LEA per lo specifico SIN.

Ciascun valore di riferimento così individuato potrà essere applicato solo a sedimenti dell’area con concentrazioni ricadenti nel range individuato dal set di dati utilizzato per le elaborazioni e non potrà essere estrapolato a materiali/sedimenti aventi livelli di contaminanti superiori o inferiori a tale range. Pertanto, l’estensione dell’utilizzo dei valori di riferimento a sedimenti con caratteristiche diverse dovrà contemplare la rielaborazione dei dati, includendo i valori di questi ultimi, eventualmente ottenibili da indagini integrative.

Il modello concettuale della presente proposta è illustrato in Figura 1.

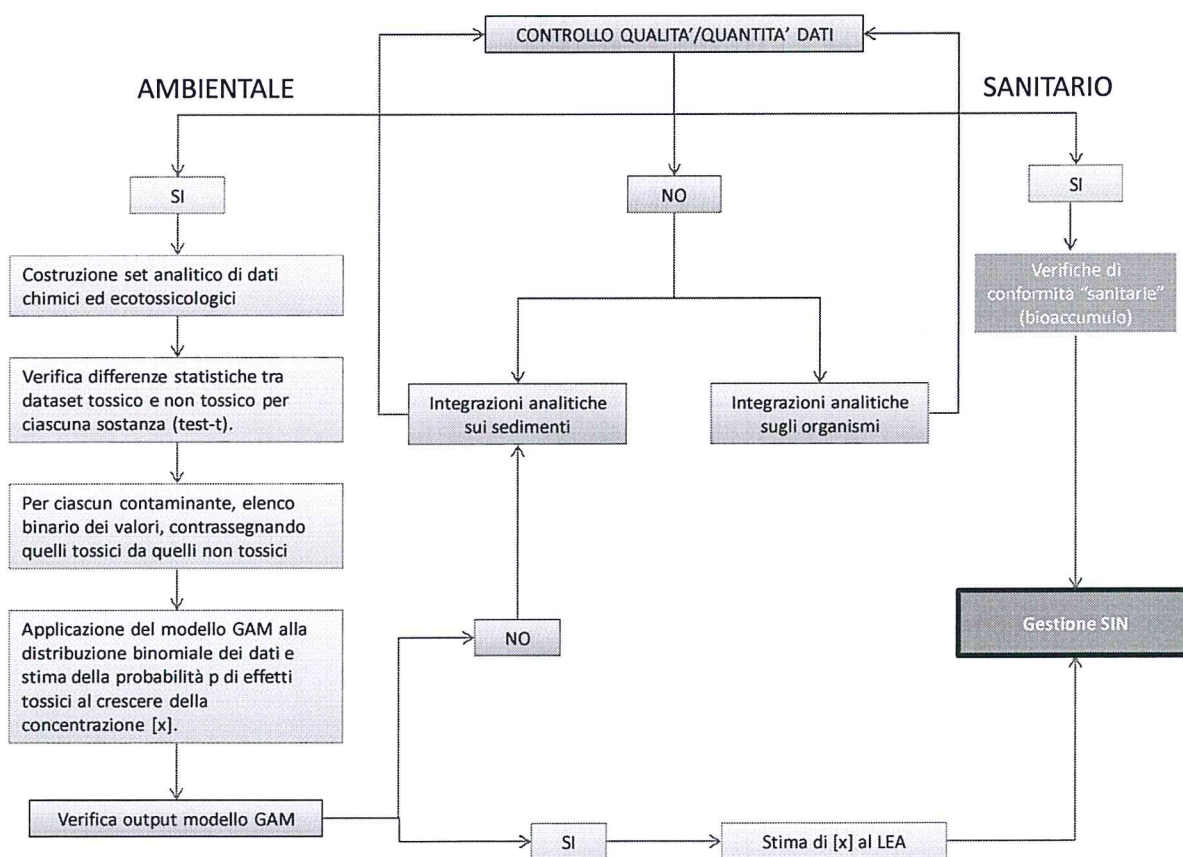


Figura 1. Modello concettuale della procedura proposta

4.1 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI: IL MODELLO GAM (MODELLO ADDITIVO GENERALIZZATO)

Per stimare la probabilità di effetti tossici in relazione alla concentrazione del contaminante possono essere utilizzati i Modelli Additivi Generalizzati (modelli GAMs; Hasti e Tibshirani, 1990).

I modelli additivi generalizzati (GAMs; Hasti e Tibshirani, 1990) sono estensioni semi-parametriche dei più classici modelli lineari. Non conoscendo esattamente la migliore interpolazione tra probabilità di effetti tossici e contaminante, essi costituiscono un approccio flessibile all'identificazione e alla descrizione di relazioni di tipo non lineare, non essendo legati a particolari forme funzionali. Questo può essere realizzato introducendo una funzione di smoothing per ciascun predittore, ottenendo la seguente struttura:

$$g(E(Y)) = \beta_0 + \sum_{i=1}^p s(X_i)$$

dove le funzioni s sono i lisciatori di regressione (smoothers) e g è detta "funzione di link".

Sono, quindi, basati sulla somma di p funzioni non parametriche relative a p variabili, oltre al termine costante e sull'impiego di una funzione legame (g) parametrica nota che collega la parte additiva del modello alla parte dipendente. La sola assunzione è che le variabili risposta (Y) siano indipendenti e che abbiano una distribuzione di probabilità nota.

Rispetto ai modelli lineari, quindi, il vantaggio principale è quello di poter includere nel modello i predittori con una forma interamente determinata dalle informazioni contenute nei dati.

Nel nostro caso, una volta selezionati i dati idonei e costruito il database da utilizzare nella elaborazione, verrà costruita la variabile Y binaria con valori:

$$Y_i = \begin{cases} 1 & \text{se il campione risulta tossico} \\ 0 & \text{se il campione non è tossico} \end{cases}$$

Tale funzione, per come è stata costruita, avrà una distribuzione di probabilità nota: la distribuzione binomiale. Quindi, il modello GAM più adatto alla presente finalità utilizzerà una distribuzione dell'errore binomiale e come funzione di link la funzione "logit" = $\log[(\text{probabilità tossico})/(\text{probabilità non tossico})]$.

Tramite la funzione logit la variabile binaria (tossico/non tossico) viene trasformata in una variabile con range da 0 a 1, che rappresenta la probabilità (p) che ci sia un effetto tossico ad ogni concentrazione [x] del contaminante.

Stimate le probabilità, è possibile derivare la concentrazione del contaminante in corrispondenza di qualunque valore di p compreso tra 0 e 1. Ad esempio, il "Livello di Effetto Certo (LEC)" sarà il più basso valore del contaminante con $p = 0.95$.

La procedura individua livelli chimici di riferimento solo per quei parametri che, nell'ambito del range di concentrazione individuato, contribuiscono in misura statisticamente evidenziabile alla tossicità complessiva rilevata nel campione.

La stima della funzione di smoothing viene determinata mediante la procedura descritta in Wood (2000), utilizzando le "penalized regression splines". L'idea di base della tecnica delle splines è quella di utilizzare più polinomi di grado non superiore a 3 per diversi intervalli della variabile esplicativa. In questo modo viene stimata la forma funzionale che interpola meglio i dati, basata quindi esclusivamente sulle informazioni contenute nei campioni osservati. L'unica scelta è data dal limite massimo dei gradi di libertà per la funzione di smooth. Da questa scelta dipende la flessibilità della funzione stimata. Essa sarà tanto meno variabile, quanto meno sono i gradi di libertà. Per uniformare la stima delle differenti forme funzionali relative ai vari siti, è stato scelto di imporre nella presente proposta un limite massimo pari a 4 gradi di libertà, che è un buon compromesso tra curve con gradi di libertà inferiori, e quindi troppo smussate, e superiori, quindi troppo sinuose.

Il modello valuterà l'effetto del contaminante sulla probabilità di tossicità, analizzando l'esposizione diretta del campione sul sito, che dovrà essere rappresentativo dell'area indagata, al fine di consentire la definizione del limite di concentrazione sito specifico in funzione del livello di effetto ritenuto accettabile.

In Figura 2 viene rappresentato il tipico andamento probabilistico stimato dal modello GAM, con gli esempi di Livelli di Effetto descritti.

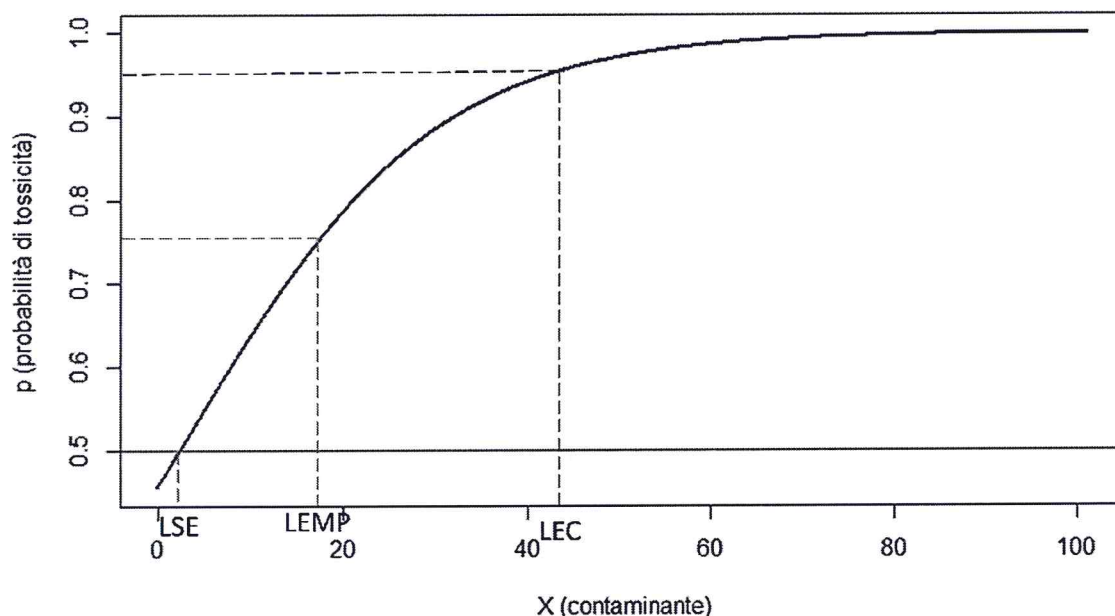


Figura 2. Modello Additivo generalizzato applicato alla distribuzione binomiale degli effetti tossici in funzione della concentrazione del contaminante con esempi di livelli di effetto: LSE (*Livello Soglia di Effetto*, $p = 0.5$), LEMP (*Livello di Effetto Molto Probabile*, $p = 0.75$), LEC (*Livello di Effetto Certo*, $p = 0.95$)

4.1.1 Requisiti del set analitico

Ai fini dell'applicazione della procedura descritta, finalizzata alla stima della migliore funzione della probabilità di effetti attesi tramite applicazione del modello GAM, i requisiti dei dati chimici ed ecotossicologici necessari possono essere suddivisi in requisiti di carattere generale dell'intero database e requisiti specifici del singolo risultato (chimico o ecotossicologico).

Requisiti generali

- Sono ammissibili soltanto i dati di campioni per i quali sono disponibili sia analisi chimiche che ecotossicologiche. In particolare tali analisi possono essere riferite anche a tempi differenti, poiché il modello si basa su "coppie" di dati associati (chimici ed ecotossicologici riferiti al medesimo campione), indipendentemente dal periodo in cui essi sono stati acquisiti. L'utilizzo di dati recenti permetterà di descrivere una situazione più "fedele" allo stato attuale dei luoghi, rispetto a dati pregressi, magari riferiti a sedimenti già dragati e quindi non più presenti.
- Le concentrazioni di ciascun contaminante dovrebbero essere distribuite all'interno di un range il più ampio possibile, in modo tale da risultare rappresentativo delle differenti situazioni ambientali del SIN.

- I risultati ecotossicologici dovrebbero essere il più possibile equamente ripartiti tra campioni tossici e non tossici.
- Poiché non esiste una regola per fissare un numero minimo di osservazioni (campioni) che renda la stima affidabile (ad esempio a seconda della distribuzione di probabilità e della ripartizione proporzionale tra campioni tossici e non tossici), si suggerisce di utilizzare un minimo di 100 campioni. Tuttavia, i modelli GAM possono essere applicati anche a campioni di numerosità più ridotta, in base alla distribuzione dei dati. In particolare, dalle simulazioni effettuate e in base ad alcuni esempi applicativi, le risposte ecotossicologiche (positive o negative) alle maggiori concentrazioni dei contaminanti giocano un ruolo essenziale nella configurazione delle funzioni di probabilità. In ogni caso l'interpolazione è più affidabile all'aumentare della grandezza del campione. Inoltre, la potenza del test t dipende dalla numerosità campionaria e il test t per due campioni necessita che la somma delle due numerosità sia non inferiore a 40. Quindi, considerando che il test t preliminare viene applicato solo sul 50% dei valori osservati, si necessita di una numerosità campionaria di almeno 80 unità. Nel caso di campioni più ridotti, sarà necessario applicare un test di normalità della variabile e se la distribuzione non risultasse normale, si dovrà utilizzare un test non parametrico.
- La ripartizione dei campioni tra tossici e non tossici dovrebbe risultare il più possibile bilanciata. Dal punto di vista statistico, infatti, le maggiori performance (in termini di robustezza numerica dei risultati e di affidabilità) del modello vengono ottenute una volta che la popolazione dei campioni risultati tossici e non tossici siano comparabili. In ogni caso la distribuzione della popolazione campionaria dovrebbe mostrare sempre una tendenza positiva (seppur con pendenza variabile), ovvero una tendenza all'aumento della frequenza di casi tossici al crescere della concentrazione [X] del contaminante (Figura 2). Qualora non risultino soddisfatti questi presupposti e qualora l'output non fosse giudicato adatto a rappresentare la relazione tra tossicità e contaminante, sarà necessario riesaminare la distribuzione del campione osservato, escludendo i valori anomali nella relazione. In ultima analisi, potrà essere escluso dalla lista delle sostanze di riferimento sito-specifiche il parametro a cui tali valori si riferiscono.

Requisiti di dettaglio

Per quanto concerne le analisi ecotossicologiche ogni campione dovrebbe essere analizzato mediante una batteria di saggi biologici costituita da almeno 3 organismi-test appartenenti a gruppi trofici e filogenetici ben distinti da applicare complessivamente su almeno due matrici ambientali (3 saggi per ciascun campione).

Il soggetto deputato all'applicazione della procedura dovrebbe disporre delle seguenti informazioni per ciascun organismo costituente la batteria di saggi biologici impiegata.

Metodologia:

- data di ricevimento del campione, di inizio e fine analisi;
- Organismo test;
- Metodo di prova;
- Origine organismi (commerciale, selvatica, allevamento, ecc.);
- Nr. repliche;
- Range di concentrazione saggiata

Risultati:

- EC50 e limiti di confidenza;
- EC20 e limiti di confidenza;

- Effetto medio \pm dev. Std alla massima concentrazione testata;
- Significatività statistica del risultato rispetto al controllo negativo;

Sensibilità specifica:

- Sostanza tossica di riferimento;
- Range di riferimento e/o carta di controllo;
- EC50 e limiti fiduciali (controllo positivo).

Per quanto riguarda le determinazioni analitiche, anche riferite all'analisi degli organismi, i livelli di prestazione dovranno essere conformi ai requisiti di cui al D.lgs. 219/2010. Nel dettaglio, i limiti di quantificazione richiesti sono riportati in Tabella 2, mentre in Tabella 3 sono schematizzati i requisiti di qualità.

Tabella 2. Limiti di quantificazioni richiesti per le analisi chimiche

Parametri	u.m.	Limite di quantificazione
Argilla (< 0,004 mm)	%	
Silt (0,063 mm > x > 0,004 mm)	%	
Sabbia (2 mm > x > 0,063 mm)	%	
Ghiaia (> 2 mm)	%	
Alluminio	mg/kg s.s.	5,0
Manganese	mg/kg s.s.	5,0
Arsenico	mg/kg s.s.	0,1
Cadmio	mg/kg s.s.	0,05
Cromo	mg/kg s.s.	1,0
Ferro	mg/kg s.s.	5,0
Mercurio	mg/kg s.s.	0,05
Nichel	mg/kg s.s.	1,0
Piombo	mg/kg s.s.	1,0
Rame	mg/kg s.s.	1,0
Stagno	mg/kg s.s.	0,1
Zinco	mg/kg s.s.	1,0
Vanadio	mg/kg s.s.	1,0
Policlorobifenili (PCB) (per singolo composto)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.	0,1
Esaclorobenzene (HCB)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.	0,1
Clorofenoli e Fenoli (per singolo composto)*	$\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.	10
Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) (per singolo idrocarburo)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.	1,0
Idrocarburi pesanti (C>12)	mg/kg s.s.	5
Alifatici clorurati cancerogeni* (per singolo composto)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.	1,0
Pesticidi organoclorurati (per singolo composto)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.	1,0
Composti organostannici (Σ mono-, di-, tri-butilstagno, come Sn)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.	1,0
Diossine e furani*	$\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.	$0,5 \times 10^{-3}$

*opzionali

Tabella 3. Requisiti di qualità per le analisi chimiche

Requisito	Specifiche
Incertezza	L'incertezza estesa è ottenuta secondo quanto riportato nel D.Lgs 219/2010 come recepimento della Direttiva 90/2009/EC. Il suo valore non deve essere superiore al 50% del valore di riferimento scaturito dall'applicazione della presente procedura.
Sommatoria di parametri chimico-fisici o di singole sostanze appartenenti alla medesima classe	a) Nel calcolo di misurandi, rappresentati dalla somma totale di singoli misurandi chimici, il risultato di misura delle singole sostanze < LOQ è considerato = 0. Qualora tutte le singole sostanze risultino < LOQ, alla somma totale è attribuito il valore del LOQ più elevato. b) Nella tabella di restituzione dei dati i risultati di misura inferiori al limite di quantificazione sono posti pari alla metà del LOQ.
Impiego materiali certificati	I risultati di misura devono essere accompagnati da dati relativi alle percentuali di recupero ottenute rispetto a materiali certificati di riferimento, selezionati in funzione degli analiti da ricercare e delle caratteristiche dei sedimenti da indagare. E' opportuno che tale controllo venga effettuato inserendo l'analisi dei materiali certificati almeno ogni 10 campioni.

4.1.2 **Attribuzione del giudizio di tossicità**

La classificazione dei risultati ecotossicologici potrebbe essere effettuata mediante due sistemi alternativi con diverso grado di complessità e quindi di affidabilità e oggettività.

Sistema 1

Il metodo di più semplice applicazione, di scarsa confrontabilità, è basato sull'approccio "*pass to fail*", ovvero calibrato sul risultato peggiore ottenuto dalla batteria di saggi biologici impiegata. Si tratta di un approccio cautelativo, ma spesso poco verosimile.

Il campione viene considerato tossico quando nell'ambito della batteria di saggi biologici utilizzata è calcolabile almeno una EC20 o quando almeno un saggio presenta un effetto biologico netto uguale o superiore al 20%, in presenza di una significatività statistica di tale differenza tramite test-t per varianza disomogenea.

Sistema 2

Un secondo metodo, più complesso ma integrato e più realistico, è basato sull'applicazione di criteri di integrazione ponderata (Piva *et al.*, 2011; Benedetti *et al.*, 2011), che consentono di formulare una valutazione oggettiva della tossicità dell'intera batteria, superando le limitazioni connesse al giudizio basato sul risultato peggiore ottenuto.

I criteri di integrazione ponderata considerano aspetti importanti e caratteristiche specifiche dei saggi biologici inclusi nella batteria utilizzata, tra cui la significatività statistica della differenza di effetto tra campione e controllo (contemplando così anche la variabilità tra le repliche, sia nel controllo, sia nel campione); la severità dell'effetto, inteso come gravità del danno biologico misurato dallo specifico endpoint; la tipologia di esposizione (acuta o a breve termine, cronica o a lungo termine); la rappresentatività ambientale della matrice testata.

Per ciascuno dei saggi previsti nelle diverse tipologie di batterie utilizzabili è indicata una "soglia" di effetto che rappresenta la variazione minima ritenuta biologicamente significativa per ciascuna condizione sperimentale (Tabella 4); vengono anche riportati i "pesi" da attribuire ad alcuni dei saggi più diffusi in funzione della rilevanza biologica dell'endpoint misurato, della durata dell'esposizione, della matrice testata (Tabella 5).

Tabella 4. Valori di soglia attribuiti ai saggi biologici previsti nelle batterie

Specie	Endpoint (E)	Soglia (%)	Esposizione (T)	Matrice (M)
<i>Acartia tonsa</i>	mortalità	15	Acuta/Cronica	b, c, e, f
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	comportamento	15	Acuta/Cronica	b, c, e, f
	mortalità	15	Acuta/Cronica	b, c, e, f
<i>Brachionus plicatilis</i>	mortalità	15	Acuta/Cronica	b, c, e, f
<i>Corophium insidiosum</i>	comportamento	15	Acuta/Cronica	a, d
	mortalità	15	Acuta/Cronica	a, d
<i>Corophium orientale</i>	comportamento	15	Acuta/Cronica	a, d
	mortalità	15	Acuta/Cronica	a, d
<i>Crassostrea gigas</i>	sviluppo	15	Acuta/Cronica	c, e, f
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	crescita	10	Cronica	b, c, e, f
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	sviluppo	15	Acuta/Cronica	b, c, e, f
<i>Paracentrotus lividus</i>	riproduzione	15	Acuta	b, c, e, f
	sviluppo	15	Cronica	b, c, e, f
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	crescita	10	Cronica	b, c, e, f
<i>Skeletonema costatum</i>	crescita	10	Cronica	b, c, e, f
<i>Tigriopus fulvus</i>	crescita	10	Acuta	b, c, e, f
	mortalità	10	Acuta	b, c, e, f
<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	15	Acuta	b, c, e, f
		25		a, d

a = sedimento intero; b = acqua interstiziale; c = elutriato; d = sedimento umido; e = acqua della colonna; f = estratti organici

Tabella 5. Pesi attribuiti in funzione della rilevanza dell'endpoint biologico, la matrice, il tempo di esposizione, ed utilizzati per il calcolo del coefficiente W_2

ENDPOINT	(En)	MATRICE	(M)
Crescita	1.2	Sedimento intero (tal quale)	1
Riproduzione	1.5	Acqua interstiziale	0.8
Sviluppo	1.9	Elutriato	0.7
Bioluminescenza	2.4	Sedimento umido (es. centrifugato)	0.5
Sopravvivenza	3	Acqua della colonna	0.3
ESPOSIZIONE	(T)	ORMESI	Ei
Acuta	1	$E \leq 40\%$	0
		$40 < E \leq 100\%$	1.25
		$E > 100\%$	1.5
Cronica	0,7		

L'intera elaborazione può essere effettuata automaticamente avvalendosi dello specifico Modulo per la "caratterizzazione ecotossicologica dei sedimenti" (LOE-2) contenuto nel software applicativo fornito in allegato.

Vengono di seguito descritti i passaggi e le procedure di calcolo per l'integrazione dei risultati e la formulazione del giudizio di tossicità, di cui è riportato uno schema complessivo nella Figura 3:

- dopo la verifica dei dati, per ciascun saggio biologico viene calcolato l'effetto (E_i), inteso come variazione percentuale dell'endpoint misurato e compensato tramite la correzione di Abbott rispetto alle variazioni osservate nel controllo (equazione 2 del flow-chart di Figura 3);

- l'effetto E_i viene corretto in base alla significatività statistica della variazione rispetto ai controlli, applicando il coefficiente Z , che viene calcolato in funzione del valore ottenuto dal test T per dati con varianza disomogenea (punto 3 del flow-chart di Figura 3). Il coefficiente Z ha un valore pari a 1 (nessuna riduzione dell'effetto) quando il campione risulta significativamente diverso dal controllo ($p < 0.05$); esso decresce con il diminuire della significatività, passando in maniera lineare da 1 a 0.5 quando p cresce da 0.05 a 0.06. Per valori di p superiori a 0.06, il coefficiente Z diminuisce rapidamente in maniera non lineare fino a 0.2 quando p tende a 1. Questa correzione riduce progressivamente il peso complessivo di un saggio non statisticamente significativo, ma non ne elimina completamente il contributo alla batteria;
- ciascun effetto (E_i) moltiplicato per il suo coefficiente Z viene rapportato con la "soglia" specifica per quel saggio (equazione 4 del flow-chart di Figura 3); l'effetto corretto (E_{iw}) così ottenuto indica di quante volte la variazione misurata in un saggio supera quella ritenuta biologicamente rilevante;
- solo per determinati saggi, quando sia possibile ottenere un eventuale effetto ormetico, viene assegnato un valore di E_{iw} pari a 0 se l'effetto ormetico è $< 40\%$, 1.25 se l'effetto ormetico è $> 40\%$ ma $< 100\%$, pari a 1.5 se l'effetto ormetico è $> 100\%$;
- l'indice di pericolo complessivo della batteria di saggi ecotossicologici (Hazard Quotient, $HQ_{Batteria}$) viene calcolato come sommatoria degli effetti pesati (E_{iw}) dei singoli saggi (equazione 5 del flow-chart di Figura 3), ulteriormente corretti secondo il fattore W_2 , che corrisponde al prodotto dei pesi assegnati in funzione della rilevanza biologica dell'endpoint considerato, della rilevanza ecologica della matrice testata, della esposizione acuta o cronica degli organismi (Tabella 5);
- per l'attribuzione del livello di pericolo derivante dalla batteria di saggi ecotossicologici, il valore ottenuto per l'indice $HQ_{Batteria}$ è normalizzato ad una scala compresa tra 0 e 10 (equazione 6 del flow-chart di Figura 3), dove 1 corrisponde al valore di soglia della batteria (cioè il valore di HQ che si otterrebbe se tutti i saggi della batteria mostrassero un effetto pari alla rispettiva soglia) e 10 corrisponde al valore massimo della batteria (quando tutti i saggi mostrano il 100% di effetto). A seconda del valore dell' $HQ_{Batteria}$ normalizzato, il livello di pericolo ecotossicologico viene attribuito ad una classe di gravità (da assente a molto alto), identificata da un diverso colore: Assente/bianco se $HQBatteria < 1$; Basso/azzurro se $HQBatteria \geq 1$ e < 1.5 ; Medio/giallo se $HQBatteria \geq 1.5$ e < 3 ; Alto/rosso se $HQBatteria \geq 3$ e < 6 ; Molto Alto/nero se $HQBatteria \geq 6$ (Tabella 6).

Tabella 6. Classi di pericolo ecotossicologico rispetto ai valori di HQ della batteria di saggi.

HQ BATTERIA DI SAGGI	CLASSE DI PERICOLO
< 1	Assente
$\geq 1 - 1.5$	Basso
$\geq 1.5 - 3.0$	Medio
$\geq 3.0 - 6.0$	Alto
$\geq 6.0 - 10.0$	Molto alto

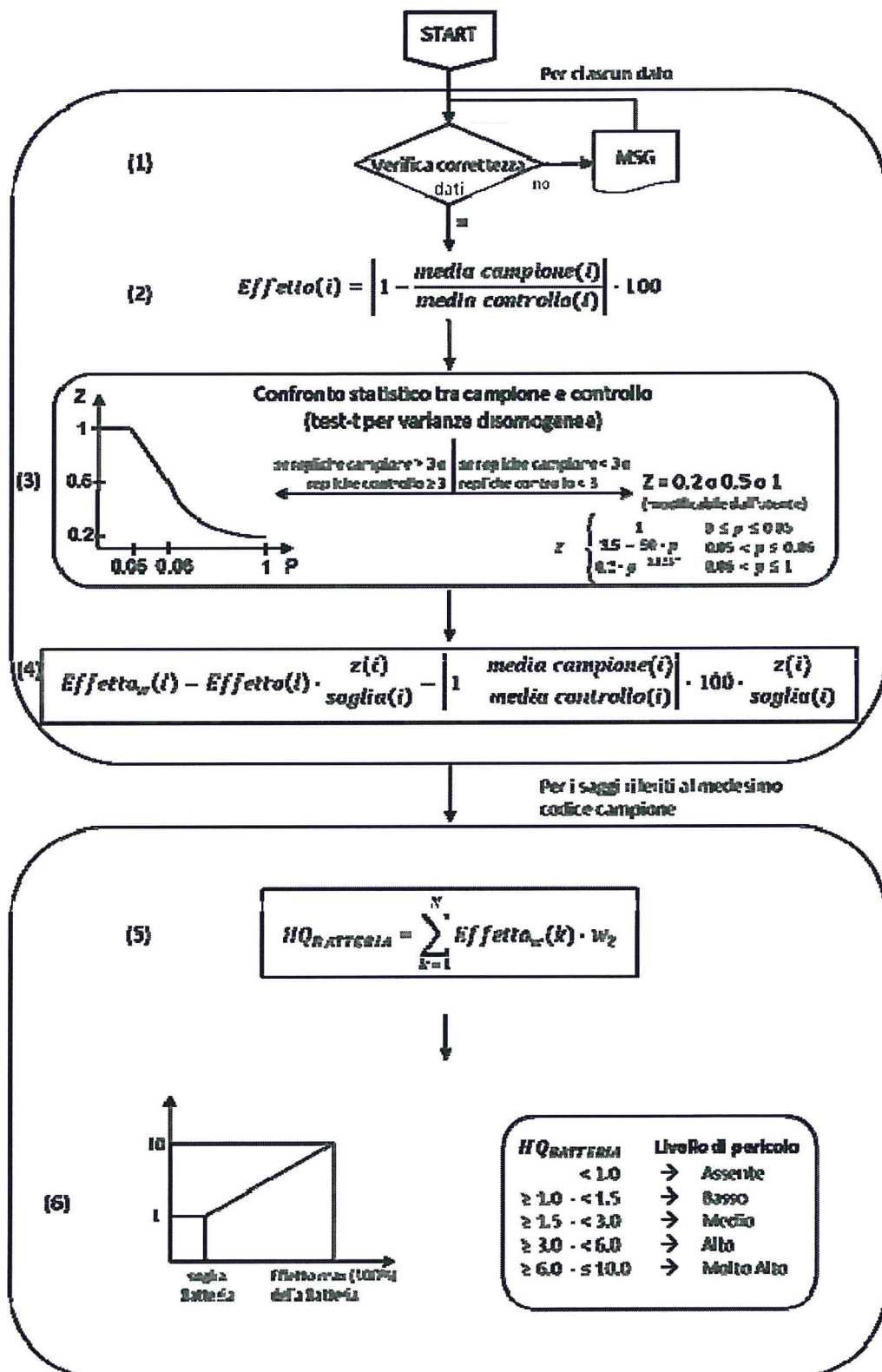


Figura 3. Procedura per l'elaborazione dei dati dei saggi ecotossicologici

Nella presente proposta si propone come soglia discriminante tra campioni tossici e non tossici il valore di HQ pari a 1, che implica una classificazione come "tossico" in senso generico, riferito anche a campioni che hanno provocato lievi effetti biologici.

4.1.3 Procedura di dettaglio

Al fine di agevolare l'applicazione della procedura descritta per ciò che concerne l'eventuale utilizzo dei criteri di integrazione ponderata per il giudizio di tossicità, viene fornito in allegato il software applicativo contenente il Modulo per la "caratterizzazione ecotossicologica dei sedimenti" (LOE-2). Il software è sviluppato su piattaforma Access ed è compatibile con la versione Microsoft® Office Access 2013 oppure tramite Microsoft® Access Runtime, scaricabile gratuitamente.

Mentre per quanto attiene all'elaborazione statistica dei dati, viene fornito un tutorial dettagliato relativo anche a download e installazione del software statistico open source R, con il relativo script da trasferire.

4.1.4 Strategie per la definizione del livello di riferimento rispetto al contesto ambientale

In relazione a quanto riportato al par. 5.1 e ai contributi pervenuti, il Tavolo Tecnico ha individuato un elenco di fattori ambientali da considerare per agevolare la scelta del LEA sito specifico (Tabella 7). Poiché ciascuno di questi fattori può essere modulato all'infinito, una quantificazione esatta risulta piuttosto complessa rispetto alla casistica estremamente diversificata dei siti; pertanto si propone l'individuazione di un range indicativo all'interno del quale il soggetto deputato fisserà il peso specifico di ciascun fattore, in funzione di ulteriori elementi valutativi sito-specifici (estensione, quantità/qualità dell'elemento/fattore, ecc.).

Tabella 7. Variabili e relativo peso da considerare nella scelta del LEA sito specifico.

Variabile	Peso rispetto a p (proposta)
Presenza entro il perimetro di habitat/biocenosi sensibili/specie protette/aree di nursery	0.01 - 0.05
Presenza entro 3 mn dal perimetro esterno di habitat/biocenosi sensibili/specie protette/aree di nursery	0.01 - 0.02
Presenza entro il perimetro di aree marine a vario titolo protette	0.05 - 0.10
Presenza entro 3 mn dal perimetro esterno di aree marine a vario titolo protette	0.01 - 0.02
Presenza di interconnessione tra falda superficiale e falda profonda	0.01 - 0.02
Presenza di impianti o aree adibite a molluschicoltura/acquacoltura/pesca e/o ad attività ricreative (balneazione)	0.01 - 0.1

Il Livello di Effetto Accettabile dovrà comunque essere compreso tra LEMP e LEC, ovvero con un livello di p compreso tra 0.75 e 0.95, indipendentemente dalla risultante del peso cumulativo dei pesi attribuiti.

4.2 VALUTAZIONE DEL BIOACCUMULO

La procedura descritta nei paragrafi precedenti non consente di valutare fenomeni di trasferimento nella catena alimentare che possono essere caratteristici di contaminanti che hanno elevate caratteristiche di bioaccumulabilità: i contaminanti presenti nei sedimenti possono, infatti, trasferirsi nei diversi livelli della catena trofica fino ad accumularsi in concentrazioni elevate in organismi acquatici edibili, con un potenziale rischio per la salute umana. Nelle aree SIN è necessario quindi verificare che non siano presenti fenomeni significativi di bioaccumulo, in modo da limitare i rischi per la salute umana e quella degli organismi appartenenti a livelli trofici più elevati degli ecosistemi acquatici (es. uccelli).

4.2.1 Procedura per la valutazione del bioaccumulo

La procedura si basa sulla valutazione delle concentrazioni di alcune sostanze chimiche bioaccumulabili in organismi acquatici, tenendo conto di:

- livelli di riferimento presenti nel regolamento europeo 1881/2006/EC e successivi aggiornamenti;
- trend delle concentrazioni su un arco temporale di almeno 3 anni (nel caso di dati pregressi);

I contaminanti oggetto di interesse sono: Cadmio, Mercurio, Piombo, Benzo(a)pirene, Diossine (inclusi PCB Diossina simili). Altri contaminanti saranno presi in considerazione e discussi nell'ambito della Conferenza di Servizi qualora, in un determinato SIN, siano noti specifici fenomeni di bioaccumulo.

Per quanto riguarda il Benzo(a)pirene, la valutazione non può essere svolta su pesci, in quanto tali organismi presentano capacità di regolazione che non consentono di valutarne il bioaccumulo.

I valori considerati per il Benzo(a)pirene e per le Diossine (inclusi PCB Diossina simili), poiché inclusi anche nella Direttiva 2013/39/UE, sono protettivi anche per organismi all'apice della catena alimentare, quali gli uccelli.

Per le valutazioni possono essere utilizzati dati pregressi nei SIN che dovranno risalire a non oltre i 6 anni, purché non siano accaduti eventi che abbiano modificato lo stato dei luoghi (ad esempio sversamenti accidentali, incidenti, nuovi insediamenti industriali, ecc.). Tali dati dovranno riguardare organismi stanziali, preferibilmente bentonici (es. *Tapes philippinarum*, *Mullus barbatus*) e dovranno essere conformi ai requisiti analitici di cui al Dgls 219/2010 (calcolo dell'incertezza, limiti di quantificazione, applicazione ISO 17025). L'eventuale utilizzo di dati esterni all'area del SIN al fine di una valutazione comparativa con i dati interni al SIN saranno valutati in sede di Conferenza di Servizi.

Per quanto riguarda il mercurio, poiché tale sostanza biomagnifica (in particolare il metilmercurio) e quindi la sua concentrazione tende ad aumentare nei livelli trofici superiori, nei SIN in cui siano presenti attività di acquacoltura (intensiva o estensiva) e/o sia consentita attività di pesca, o vi siano evidenze di contaminazione di tale sostanza, l'analisi sui dati pregressi dovrà comprendere anche specie ittiche, preferibilmente edibili, almeno di livello trofico 3.

Nel caso in cui i dati pregressi relativi alle sostanze sopraelencate siano conformi ai valori del regolamento europeo 1881/2006/EC (con una tolleranza del 20% rispetto al valore medio annuale rilevato*) e non evidenzino un trend crescente di bioaccumulo almeno negli ultimi tre anni, non sarà necessario procedere ad ulteriori analisi.

Nel caso in cui i dati pregressi relativi alle sostanze sopraelencate non siano conformi (anche per una sostanza) ai valori del regolamento europeo 1881/2006/EC (con una tolleranza del 20% rispetto al valore medio annuale*), o evidenzino un trend crescente di bioaccumulo negli ultimi tre anni, o in assenza di analisi eseguite secondo i requisiti citati, sarà necessario procedere all'analisi dei contaminanti riportati su organismi trapiantati (procedura mussel watch).

In caso di furto delle reste di mitili o di morte degli organismi per cause indipendenti dai fenomeni di contaminazione chimica (es. eutrofizzazione, infezioni microbiologiche), è possibile prevedere l'opzione alternativa di analizzare organismi stanziali dell'area. A tale scopo occorre disporre, per ciascun sito, di un elenco di possibili specie con abitudini prevalentemente bento/nectoniche e stanziali da utilizzare in contemporanea o in alternativa al Mussel Watch. Tali organismi dovrebbero appartenere ad un livello trofico 2 (organismi filtratori) o più elevato.

Nei SIN in cui siano presenti attività di acquacoltura (intensiva o estensiva) e/o sia consentita attività di pesca, o vi siano evidenze di contaminazione da Mercurio, si dovranno affiancare alle eventuali indagini di "Mussel Watch" anche analisi di bioaccumulo di tale elemento su specie ittiche preferibilmente stanziali. Data la spiccata tendenza del mercurio alla biomagnificazione, le specie ittiche dovranno appartenere almeno al livello trofico 3 ed essere preferibilmente edibili. Nel caso in cui vi sia nell'ambito del SIN un'attività di acquacoltura estensiva, le analisi di mercurio dovranno essere riferite proprio alle specie allevate.

*la tolleranza viene intesa solo ai fini della applicazione della presente procedura e non ha valore rispetto alla validità del regolamento europeo 1881/2006 e successivi aggiornamenti.

Le eventuali non conformità riferite al mercurio saranno valutate in sede di Conferenza di Servizi.
 Il percorso di valutazione dei dati di bioaccumulo è illustrato in Figura 4.

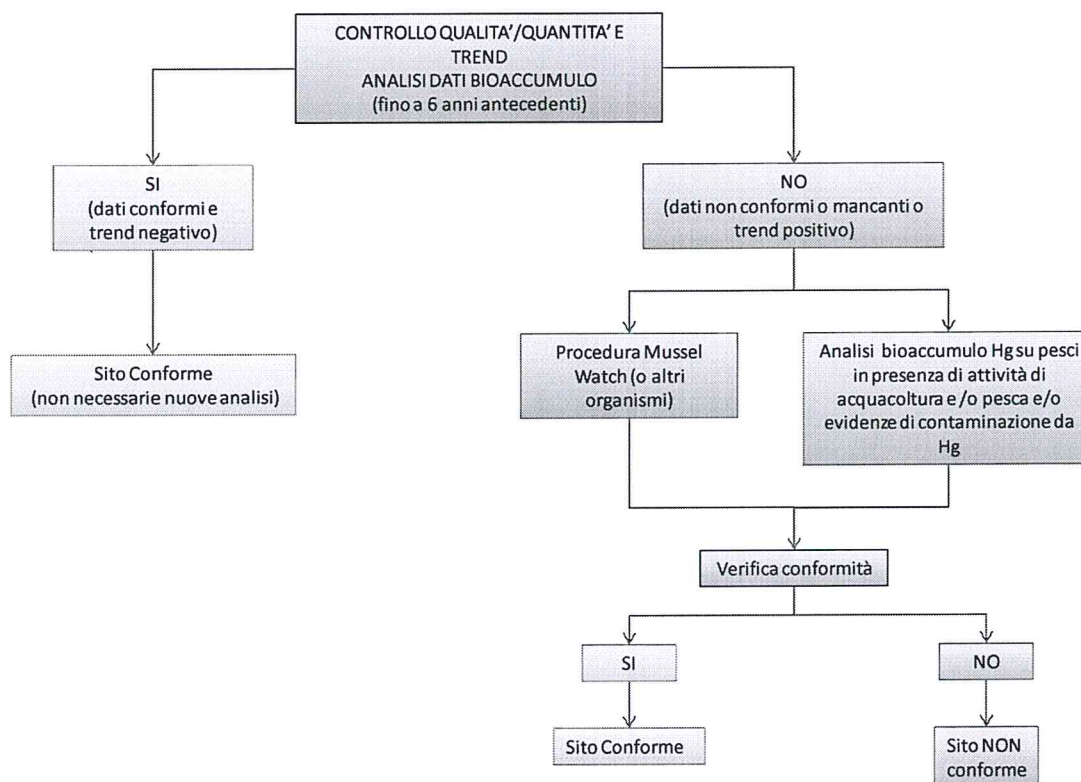


Figura 4. Diagramma di flusso della procedura di valutazione del bioaccumulo

Per quanto concerne la lista delle specie nell’ambito delle quali selezionare gli organismi sui quali eseguire le analisi di bioaccumulo, sulla base dei contributi pervenuti da ARPA e Regioni, viene proposto l’elenco di cui alla Tabella 8.

I livelli trofici dei pesci sono reperibili al seguente sito: <http://www.fishbase.org/search.php>.

Tabella 8. Lista indicativa di organismi di riferimento per le analisi di bioaccumulo. Per le analisi del mercurio i pesci dovranno avere almeno un livello trofico 3.

PESCI		CROSTACEI		MOLLUSCHI	
<i>Gobius</i>	Ghiozzo	<i>Eriphia</i>	Favollo	<i>Mytilus</i>	Mitilo
<i>Diplodus</i>	Sarago	<i>Squilla</i>	Canocchia	<i>Tapes</i>	Vongola
<i>Symphodus</i>	Tordo			<i>Arca</i>	Mussolo
<i>Conger</i>	Gronco			<i>Chamalea</i>	Vongola/Lupino
<i>Scorpaena</i>	Scorfano			<i>Donax</i>	Tellina
<i>Mugil</i>	Cefalo				
<i>Lithognatus</i>	Mormora				
<i>Mullus</i>	Triglia				
<i>Scorpaena</i>	Scorfano				
<i>Anguilla</i>	Anguilla				

Qualora l'analisi delle concentrazioni tissutali di organismi stanziali produca delle non conformità, è facoltà di procedere ad un confronto con un sito di controllo esterno all'attuale perimetrazione del SIN, al fine di valutare il caso in cui le difformità siano diffuse e generalizzate anche al di fuori del sito indagato.

4.2.2 Metodologia “Mussel Watch”- Trasferimento Attivo di Mitili

La procedura prevede il trasferimento di mitili “*Mytilus galloprovincialis*” con concentrazioni tissutali di partenza ampiamente inferiori ai riferimenti del reg. eu. 1881/2006/EC, in almeno 3-5 stazioni (siti di monitoraggio) rappresentative all'interno dell'area di interesse, per un periodo di almeno 4 settimane; il numero delle stazioni definitivo sarà stabilito in funzione della superficie di interesse.

Prima ed al termine del periodo di esposizione dovranno essere svolte analisi in triplicato per ciascun campione (o pool). Nei SIN in cui sono disponibili dati pregressi, si potrà procedere solo con l'analisi dei rimanenti parametri .

Per le specifiche tecniche è possibile fare riferimento al volume Ministero dell'Ambiente-ICRAM: “Metodologie analitiche di riferimento”, 2001, Scheda “Utilizzo dei molluschi bivalvi nel programma di monitoraggio dell'ambiente costiero (protocollo mussel watch)”.

I criteri numerici di valutazione sono quelli presenti nel regolamento europeo 1881/2006/EC (e successivi aggiornamenti), per i quali è ammessa una tolleranza del 20% sul valore medio annuale. Inoltre, i dati dovranno essere statisticamente comparati con il “bianco cronologico” precedente al trapianto. I risultati dovranno essere valutati indipendentemente per ogni sito di monitoraggio.

I campioni derivanti dai siti di monitoraggio sono considerati conformi quando i valori delle concentrazioni tissutali risultano inferiori a quelli presenti nel regolamento europeo 1881/2006/EC con le relative tolleranze sui valori medi.

5. STIMA COSTI ANALISI

Da una stima basata sui tariffari delle ARPA e sulla base dell'esperienza analitica di ISPRA, il costo per le determinazioni chimico fisiche per ciascun campione si aggira intorno ai 1.500 €, a cui va aggiunto un costo variabile tra 400÷700 € per i saggi di tossicità (batteria di 3 specie test su 2 matrici).

Per le analisi di bioaccumulo il costo stimato è di circa 1.000 € per campione.

Tali costi possono subire sensibili variazioni in funzione di numerose variabili, come ad esempio quantità dei campioni, metodiche analitiche prescelte, esito di procedure di gara ad evidenza pubblica, etc.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- APAT-ICRAM, 2007. Manuale per la movimentazione di fondali marini. <http://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/manuali-e-linee-guida/manuale-per-la-movimentazione-di-sedimenti-marini>.
- Benedetti M., Ciaprini F., Piva F., Onorati F., Fattorini D., Notti A., Ausili A., Regoli F., 2011. A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environment International*, 38: 17-28.
- Carere M, Dulio V, Hanke G, Polesello S. "Guidance for sediment and biota monitoring under the common implementation strategy for the water framework directive". TRAC. "Trends in analytical chemistry". Volume 36. pp. 15-24. June 2012.
- Chapman P.M., Wang F., Adams W.J. e Green A., 1999. Appropriate applications of sediment quality values for metals and metalloids. *Environmental Science and Technology*, 33: 3937-3941.
- Di Toro D.M., Zarba C.S., Hansen D.J., Berry W.J., Swartz R.C., Cowan C.E., Pavlou S.P., Allen H.E., Thomas H.E. e Paquin P.R., 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for non-ionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10: 1541-1583.
- Hansen D.J., Berry W.J., Mahoney J.D., Boothman W.S., Di Toro D.M., Robson D.L., Ankley G.T., Ma D., Yan Q., e Pesch C.E., 1996. Predicting the toxicity of metal contaminated field sediments using interstitial concentration of metals and acid-volatile sulfide normalizations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 2080-2094.
- Hastie T.J. e Tibshirani R.J., 1990. (Eds). Generalized Additive Models, Chapman and Hall, New York, 335p.
- Long E.R. e Morgan L.G., 1990. The potential for biological effects of sediment-sorbed contaminants tested in the national status and trends program, NOAA Technical Memorandum NOS OMA 52, National Oceanic and Atmospheric Administration, disponibile al link: <http://www.ccma.nos.noaa.gov/publications/tm52.pdf>.
- Long E.R., MacDonald D.D., Smith S.L., Calder F.D., 1995. Incidence of adverse biological effects with ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management*, 19(1): 81-97.
- MacDonald D.D., Ingersoll C.G. e Berger T.A., 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39: 20-31.
- MacDonald D.D., 1994. Development of an approach to assessing sediment quality in Florida coastal waters, Volume II: Development of the Sediment Quality Assessment Guidelines. Report preparato per il Florida Department of Environmental Regulation.
- MacDonald D.D., Carr R.S., Calder F.D., Long E.R. e Ingersoll C.G., 1996. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology*, 5, 253-278.
- MacDonald D.D., Ingersoll C.G., berger T.A., 2000. Development and evaluation of Consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 20-31.
- NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration), 1999. Sediment quality guidelines developed for the National Status and Trends Program. (<http://ccma.nos.noaa.gov/publications/sqg.pdf>).
- Onorati F., Mugnai C., Pulcini M, Gabellini M., 2013. A framework for the integrated assessment and management of dredged materials in Italy: a case study by applying Local Sediment Quality Guidelines. 36° Meeting dello "Scientific group of the London Convention" e 7° Meeting dello "Scientific group of the London Protocol", 27-31 maggio, Buenos Aires.
- Persaud D., Jaagumagi R. e Hayton A., 1993. Guidelines for the protection and management of aquatic sediment quality in Ontario. Ontario Ministry of the Environment, Toronto, Canada.
- Piva F., Ciaprini F., Onorati F., Benedetti M., Fattorini D., Ausili A., Regoli F., 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere*, 83: 475-485.
- U.S. EPA, 1996. Calculation and evaluation of sediment effect concentrations for the amphipod *Hyaella Azteca* and the midge *Chironomus riparius*. EPA 905-R96-009. Great Lakes National Program Office. Regione 5. Chicago, U.S.A.
- Swartz R.C., 1999. Consensus sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 780-787.