

- rifiuti costituiti da pietrisco di vagliatura del calcare, previa eventuale disidratazione; scarti da vagliatura latte di calce;
- terre da coltivo, derivanti dalla pulizia di materiali vegetali eduli e dalla battitura della lana sudicia;
- terre e rocce da scavo.

Per tutte le citate tipologie il recupero è subordinato all'esecuzione del test di cessione sul rifiuto tal quale (secondo il metodo in allegato 3 del D.M. 05.02.1998).

Emerge, quindi, che i fanghi da segagione provenienti dalle segherie non possono essere ricompresi tra i rifiuti conferibili in attività di recupero ambientale, proprio perché il particolare ciclo produttivo prevede l'utilizzo di sostanze chimiche quali resine e stucchi contenenti *stirene*. Tale sostanza, se presente nei fanghi, in concentrazione inferiore a 50 ppm, non modifica la classificazione del rifiuto (quale speciale pericoloso) ma ne restringe comunque il campo di riutilizzazione in attività di recupero in procedura semplificata<sup>53</sup>.

Per quanto sopra descritto dall'attività ispettiva posta in essere è emerso che nell'area di cava gestita dalla società oggetto di controllo sono stati conferiti rifiuti non riferibili alla Tipologia 7.2 (rifiuti provenienti da attività di estrazione) ed è stata rilevata, nella grande maggioranza, la presenza di rifiuti costituiti da fanghi di segagione non destinabili ad attività di recupero.

Pertanto, ravvisata nei confronti del rappresentante legale della società l'ipotesi di reato di cui all'articolo 256 commi 1, 2 e 3 del decreto legislativo 152/2006 («attività di gestione rifiuti non autorizzata»), si è proceduto, ad opera della polizia giudiziaria territorialmente competente, al sequestro d'iniziativa dell'intera area (2000 mq circa) ove la società svolge l'attività di recupero, comprendente la superficie di cava ove si conferiscono i rifiuti, l'area della loro messa in riserva, nonché il bilico di pesa ed il gabbiotto in metallo ubicato all'ingresso del sito, ed al deferimento del responsabile alla Procura della Repubblica presso il Tribunale di Marsala.

### *c. Porto di Trapani e «cassa di colmata» di Marsala.*

In riferimento all'annosa vicenda che da anni interessa le aree del porto di Trapani e della cosiddetta «cassa di colmata» di Marsala, nel corso della missione in parola, con il supporto dei Carabinieri della Com-

---

<sup>53</sup> In base a stime condotte dall'Associazioni Industriali di Trapani la produzione di fango da segagione nell'area di Custonaci sarebbe oggi di circa 600 mc. giornalieri, pari a circa 120.000 mc. annui (circa 200.000 tonnellate/annue). Sono inoltre presenti rilevanti quantitativi (almeno 300.000-400.000 tonnellate) di fanghi residui, temporaneamente stoccati presso le aziende di lavorazione a causa della carenza di impianti di smaltimento e/o recupero. Da tale situazione fattuale emerge una diffusa violazione della normativa ambientale sia da parte di chi gestisce gli impianti di recupero, sia di chi è delegato al rilascio delle autorizzazioni all'attività di recupero ed al controllo nonché di chi procede alla caratterizzazione dei rifiuti.

pagnia di Marsala e del Nucleo CC Subacquei di Messina, è stata condotta da tecnici dell'ICRAM (Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare), un'attività di prelevamento di campioni composti da materiale solido presente sulla superficie dell'area e costituiti dalla miscelazione di distinte aliquote di materiale prelevati manualmente al di sotto dei primi 10 cm del terreno; sono stati inoltre acquisiti dei campioni di materiale provenienti dall'area marittima esterna alla «colmata».

Successivamente è stata eseguita, sempre a cura del personale dell'ICRAM supportato dai Carabinieri della Compagnia di Trapani, analoga attività di campionamento presso l'area portuale di Trapani.

Nella preliminare relazione tecnica inoltrata dall'Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare<sup>54</sup> sono compendiate le risultanze emerse dall'attività di analisi condotta.

### 3.3. INDAGINE PRELIMINARE AMBIENTALE DELL'AREA PORTUALE DI TRAPANI E DELLA VASCA DI COLMATA DI MARSALA

**Relazione tecnica relativa all'incarico conferito all'Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica applicata al mare dalla Commissione parlamentare di inchiesta sul ciclo dei rifiuti e sulle attività illecite ad esso connesse (prot. N. 1108/Comm. Rif. del 29 novembre 2007)**

#### *Relatori*

Dr. Fulvio Onorati e Dr.ssa Angela Sarni  
Roma, febbraio 2008

#### *Responsabile scientifico*

Dott. Fulvio Onorati  
Dr.ssa Antonella Ausili

#### *Collaboratori tecnici*

Dr.ssa Angela Sarni  
Dr.ssa Olga Faraponova  
Sig. Giordano Ruggiero  
Dr.ssa Chiara Maggi  
Dr.ssa Jessica Bianchi  
Dr. Giulio Sesta

<sup>54</sup> Riportata al paragrafo 3.3 della presente Appendice.

### 3.3.1. *Premessa.*

Con nota n. 1108/Comm. Rif. del 29.11.2007 la Commissione Parlamentare di inchiesta sul ciclo dei rifiuti e sulle attività illecite ad esso connesse ha richiesto la disponibilità dell'ICRAM di poter fornire un supporto tecnico per il prelievo e l'analisi di campioni di sedimento nell'area portuale di Trapani e presso la cosiddetta «vasca di colmata» di Marsala, denominata anche «Colmata di Casabianca». Tale richiesta, ribadita con nota n. 1125/Comm.Rif. del 03.12.2008, ha specificato che le modalità di prelievo ed analisi sarebbero state a totale carico e discrezionalità dell'ICRAM.

Stante l'urgenza e il carattere istituzionale dell'incarico, l'ICRAM ha immediatamente confermato la propria disponibilità con nota del 03.12.2008, prot. N. 11671/07, provvedendo a predisporre i laboratori e ad inviare proprio personale specializzato sul posto, nelle persone del Dr. Fulvio Onorati e Dr.ssa Angela Sarni, i quali, con l'ausilio dell'Arma dei Carabinieri del Nucleo Subacquei di Messina, del Comando Provinciale di Trapani e della Compagnia di Marsala, hanno effettuato un prelievo di campioni nei giorni 5 e 6 dicembre 2007.

Considerata la tempistica con la quale la Commissione parlamentare ha richiesto la trasmissione delle risultanze analitiche dell'indagine effettuata (prot. N. 1367/Comm.Rif. del 21.02.2008), il presente documento contiene tutti i risultati analitici ottenuti alla data odierna ed alcune considerazioni preliminari relativi alla «qualità» del materiale inorganico e biologico esaminato.

L'ICRAM, pertanto, si riserva la facoltà di trasmettere successivamente ulteriori considerazioni, alla luce di una più attenta ed approfondita analisi dei dati disponibili.

Si ritiene di fondamentale importanza, infatti, evidenziare il fatto che, considerati i tempi di preavviso, le modalità logistiche con le quali è stato organizzato ed attuato il campionamento, nonché i tempi tecnici analitici necessari alle esecuzioni delle attività di laboratorio, il piano di caratterizzazione attuato non può che essere inteso come un survey preliminare, finalizzato alla individuazione di eventuali segnali negativi per l'ambiente indagato, da approfondire successivamente con modalità e tempi adeguati. Ciò al fine di porre la Commissione parlamentare nelle condizioni di poter trarre conclusioni oggettive e verosimili rispetto alla reale situazione ambientale dei luoghi indagati.

Infine, si specifica che, data l'incertezza normativa di settore, le valutazioni che seguono sono di natura prettamente scientifica, lasciando a chi di competenza la classificazione dei materiali dal punto di vista giuridico.

### 3.3.2. Attività di prelievo e pretrattamento dei campioni.

#### 3.3.2.1. Attività di prelievo.

Le operazioni di prelievo hanno interessato i giorni 5 e 6 dicembre 2007 e sono state suddivise in due fasi, di cui la prima presso l'area denominata «vasca di colmata di Marsala», la seconda presso l'area portuale di Trapani e lo specchio acqueo antistante la citata vasca di colmata.

In data 05.12.2007 è stato eseguito il prelievo manuale di nr. 5 campioni composti di materiale solido presente alla superficie della vasca di colmata di Trapani. 3 dei 4 campioni (VMT-1, VMT-2 e VMT-2) sono stati ottenuti miscelando 3 distinte aliquote (di pari volume), provenienti da altrettanti fori praticati a una distanza di circa 30 m l'uno dall'altro, prelevando il materiale al di sotto dei primi 10 cm e fino a circa 30 cm di profondità. Il quarto campione (VMT-3), costituito con le stesse modalità ma miscelando 5 distinte aliquote, è stato prelevato da una serie di cumuli che, sulla base di affermazioni di funzionari della Provincia di Trapani presenti sul posto, corrispondevano a materiale proveniente dal dragaggio del Molo Isolella del porto di Trapani. Infine, il quinto campione (VMM-6), data la difficoltà di accesso, è stato prelevato dal personale del Nucleo Sommozzatori di Messina dell'arma dei Carabinieri, nella zona più a sud, oltre la recinzione esterna, in un'area acquitrinosa con abbondanti residui di vegetazione (fanerogame marine) in avanzato stato di decomposizione (verbale del Nucleo Sommozzatori di Messina prot. Nr. 13/29-6 del 11.12.2007).

Non è stato possibile prelevare campioni nell'area a nord del stazione VMT-1 per le difficoltà di accesso da terra, in considerazione dell'incoerenza del substrato e della presenza di spesse coltri di fango e di resti di fibre di fanerogame marine a diverso stato di decomposizione. Le coordinate geografiche delle aree campionate sono riportate in tabella 1 e visualizzate in figura 1.

TAB. 1 - *Coordinate dei punti di campionamento ubicati presso la superficie emersa dell'area denominata «vasca di colmata di Marsala».*

CAMPIONE	Latitudine	Longitudine
VMT-1	37°46'36.45" N	12°27' 8.54" E
VMT-2	37°46'30.49" N	12°27'12.46" E
VMT-2bis	37°46'29.67" N	12°27'12.42" E
VMT-3	37°46'19.20" N	12°27'20.13" E
VMM-6	37°46'05.22" N	12°27'24.14" E



Fig. 1 – Ubicazione delle stazioni di campionamento presso l'area di colmata di Marsala.

In data 06.12.2007 sono state eseguite le operazioni di prelievo di sedimenti marini superficiali con l'ausilio degli operatori specializzati del Nucleo Subacquei di Messina. Sono stati collezionati complessivamente nr. 10 campioni, le cui coordinate geografiche e localizzazione sono riportate in tabella 2 e figura 2, rispettivamente, come da verbale dello stesso Nucleo Subacquei dell'Arma dei Carabinieri (prot. Nr. 13/29-6 del 11.12.2007).

TAB. 2 - Coordinate dei punti di campionamento dei sedimenti presso l'area portuale di Trapani.

CAMPIONE	Latitudine	Longitudine
PTRON-1	38° 00'680"	N 12°30'367" E
PTRON-2	38° 00'683"	N 12°30'435" E
PTRON-3	38° 00'683"	N 12°30'453" E
PTRON-4	38° 00'663"	N 12°30'533" E
PTRON-5	38° 00'652"	N 12°30'550" E
PTRON-6	38° 00'613"	N 12°30'588" E
PTRON-7	38° 00'574"	N 12°30'572" E
PTRON-8	38° 00'783"	N 12°30'417" E
PTRON-9	38° 00'747"	N 12°30'820" E
PTRON-10	38° 00'677"	N 12°30'073" E

Le prime otto stazioni (TPRON-1 – TPRON-8) sono state posizionate nell'intorno del costruendo Molo Ronciglio, le ultime due in una zona nettamente più interna (TPRON-9) e nell'avamposto (TPRON-10), rispettivamente.

Lo stesso giorno, su indicazione del personale tecnico ICRAM, gli operatori del Nucleo Subacquei di Messina hanno provveduto a prelevare nr. 4 campioni «biologici», consistenti in alcuni ciuffi di *Posidonia oceanica* nello specchio acqueo antistante l'area della colmata. In tabella 3 e in figura 3 sono riportate le coordinate geografiche e l'ubicazione delle stazioni di campionamento prescelte.



Fig. 2 – Ubicazione delle stazioni di campionamento presso l'area portuale di Trapani.

Tab. 3 - *Coordinate dei punti di campionamento di Posidonia oceanica nello specchio acqueo antistante l'area denominata «vasca di colmata di Marsala».*

CAMPIONE	Latitudine	Longitudine
PO-1	37° 46'701" N	12° 26'913" E
PO-2	37° 46'619" N	12° 26'532" E
PO-3	37° 46'137" N	12° 26'265" E
PO-4	37° 46'089" N	12° 26'867" E



Fig. 3 - *Ubicazione delle stazioni presso le quali sono stati prelevati campioni di Posidonia oceanica.*

Le stazioni 1 e 3 (PO-1 e PO-3) sono state posizionate a circa 150 m dalla riva, mentre la 2 e la 4 (PO-2 e PO-4) a circa 750 m.

La scelta di prelevare campioni della fanerogama marina è stata dettata dalla impossibilità di trovare spazi liberi di fondale dalla prateria in

cui fossero affioranti sul fondo dei sedimenti da poter campionare. Come da verbale dello stesso Nucleo Subacquei dell'Arma dei Carabinieri (prot. Nr. 13/29-6 del 11.12.2007), infatti, il giorno 05.12.2007 sono stati ispezionati diversi potenziali siti di prelievo, precedentemente stabiliti in via teorica, risultati però o inaccessibili per le avverse condizioni meteomarine o coperti da una fitta e rigogliosa prateria di *P. oceanica*.

### 3.3.2.2. *Trasporto e pretrattamento dei campioni.*

I campioni di materiale solido provenienti dall'area portuale e dalla vasca di colmata sono stati omogeneizzati sul posto, ripartiti in 3 diversi contenitori in polietilene che a loro volta sono stati posti all'interno di buste di plastica chiuse, etichettate e sigillate. I campioni di *Posidonia oceanica* sono stati posti immediatamente in buste chiuse di polietilene per alimenti, etichettate e sigillate.

Il trasporto fino ai laboratori ICRAM si è svolto sempre in condizioni refrigerate (4-6 °C).

In laboratorio, una volta tolti i sigilli i campioni sono stati nuovamente omogeneizzati e ripartiti in più aliquote per le diverse tipologie di analisi.

### 3.3.3. *Metodologie analitiche.*

I campioni, suddivisi nelle diverse aliquote, sono stati sottoposti alle seguenti analisi di laboratorio:

- granulometria;
- analisi di metalli ed elementi in tracce;
- analisi di composti organoclorurati (pesticidi e policlorobifenili);
- analisi degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA);
- analisi ecotossicologiche (saggi biologici).

#### 3.3.3.1. *Analisi granulometriche.*

Data la relativa esiguità dei campioni si è proceduto alla sola determinazione delle principali frazioni granulometriche (ghiaia > 2 mm; sabbia compresa tra 2 mm e 63 mm; pelite < 63 mm).

Le modalità utilizzate per l'individuazione di tali frazioni granulometriche sono state suddivise in 4 fasi:

1. trattamento del campione per 48 ore con una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (al 30%) diluita 1:7, al fine di facilitare la separazione e la disgregazione del sedimento mediante allontanamento (ossidazione) della sostanza organica;
2. setacciatura su getto di acqua distillata mediante setacci standardizzati ASTM da 2 mm, 1 mm e 63 mm;
3. recupero delle frazioni ottenute ed essiccamento in stufa;
4. pesatura delle frazioni e calcolo delle relative proporzioni.



### 3.3.3.2. *Analisi dei metalli e degli elementi in tracce.*

Il metodo prevede la digestione totale del sedimento mediante mineralizzazione con miscela di acido nitrico e acido cloridrico (1:3) a caldo (ISO, 11466). Per la determinazione della concentrazione totale di metalli presenti nei campioni di *Poseidonia oceanica*, la digestione del campione viene effettuata con una miscela di acido nitrico e acqua ossigenata (7:1) (ISTISAN 04-4).

In particolare per ciò che concerne i campioni di *P. oceanica*, in considerazione dei tempi di restituzione dei risultati richiesti, si è proceduto ad una digestione totale dell'intero campione, includendo quindi gli organismi animali e vegetali epibioti, tra i quali la comunità a Briozoi costituisce generalmente una delle principali componenti. Ciò potrebbe condurre a lievi sottostime o sovrastime delle reali concentrazioni riferite alla fanerogama. Inoltre, non è stato possibile, al momento, approfondire l'indagine distinguendo le fronde dai rizomi che potrebbero essere caratterizzati da un bioaccumulo differenziato.

#### 3.3.3.2.1. *Procedimento.*

Una volta essiccato (35 °C per 48 ore) e omogeneizzato, il campione è sottoposto a digestione acida per la dissoluzione totale della matrice. Le migliori tecniche di dissoluzione oggi disponibili sono quelle che si basano sull'utilizzo di forni a microonde ad alta e/o a bassa pressione. Per la dissoluzione della matrice sedimento l'uso del forno a microonde ad alta pressione è quello consigliato, poiché permette di diminuire i tempi di trattamento mantenendo una resa di mineralizzazione molto buona anche senza l'uso di acido fluoridrico, unico acido che permette la completa mineralizzazione del sedimento nel caso di non utilizzo di un forno a microonde ad alta pressione.

Il contenuto totale dei metalli è determinato mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico con atomizzazione a fornello di grafite e spettrometria di emissione mediante plasma induttivamente accoppiato (EPA 6010, EPA 7060, EPA 7131A).

Per il Mercurio si utilizza la tecnica della concentrazione su amalgama d'oro, desorbimento e rivelazione con spettrofotometro UV mediante uno strumento dedicato (spettrofotometro con sistema di concentrazione ad amalgama - DMA-80), che consente di lavorare direttamente sulla matrice tal quale senza nessun pretrattamento (EPA 7473).

L'accuratezza del metodo è valutata mediante l'analisi di materiali di riferimento certificati, aventi composizione il più possibile simile ai campioni reali esaminati.

Il limite di quantificazione per ciascun metallo, relativo alla metodica impiegata, è riportato nella tabella 4.

Tab. 4 - *Il limite di quantificazione per ciascun metallo, relativo alla metodica impiegata.*

<i>Parametro</i>	<i>Limite di quantificazione (mg/Kg)</i>
Mn	1,5
Fe	10
Ba	1,5
Cu	1,5
Ni	1,5
Pb	1,5
Zn	1,5
Cr totale	1,5
As	0,05
Cd	0,01
Hg	0,0005

### 3.3.3.3. *Analisi dei composti organoclorurati.*

#### 3.3.3.3.1. *Sedimento.*

I campioni di sedimento sono stati sottoposti a liofilizzazione prima dell'analisi vera e propria.

I campioni sono stati quindi setacciati su maglie da 2 mm ed omogeneizzati tramite macinazione.

L'estrazione dei policlorobifenili e dei pesticidi organoclorurati è stata effettuata mediante l'impiego di un estrattore a fluido pressurizzato (Dionex ASE 200). L'estrazione è avvenuta con una miscela etere di petrolio/diclorometano in celle da 22 ml in cui, oltre al campione di sedimento, viene posto uno strato di florisil per realizzare una prima parziale purificazione da composti polari ed uno strato di rame attivato ed asciugato per realizzare la purificazione dallo zolfo.

L'estratto è stato evaporato con evaporatore multiplo automatico e ricostituito in isoottano, dibattuto con acido solforico concentrato per la rimozione di eventuali composti organici interferenti e quindi trasferito in vial per autocampionatore GC.

La determinazione quali-quantitativa è stata effettuata per gascromatografia con rivelazione a cattura di elettroni nelle microcelle (GC- $\mu$ ECD). L'analisi è stata effettuata in modalità dual column impiegando una colonna RTX-PCB ed una colonna RTX-CLP, utilizzando elio come gas di trasporto e azoto come gas di Make-up per il rivelatore.

L'identificazione degli analiti avviene tramite l'individuazione del picco all'interno della finestra dei tempi di ritenzione in entrambe le colonne.

La quantificazione avviene mediante standard esterno con retta di taratura a 6 punti. Il risultato espresso è il più basso fra i due risultati derivanti dalle due colonne.

I risultati vengono espressi in ng/g sul sedimento secco o in unità di misura equivalenti ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , ppb, etc). Il limite di quantificazione è di 0,1 ng/g.

Il controllo di qualità sui risultati viene effettuato mediante l'impiego di standard surrogati per ogni campione e mediante l'esecuzione, ad ogni batch analitico, di repliche, fortificazioni e bianchi di procedimento. Periodicamente vengono inoltre analizzati materiali certificati e, con cadenza semestrale, campioni incogniti nell'ambito di un circuito interlaboratorio internazionale.

#### 3.3.3.3.2. *Biota*.

Per i campioni di *P. oceanica*, in considerazione dei tempi di restituzione dei risultati richiesti, si è proceduto ad una estrazione dell'intero campione, includendo quindi gli organismi animali e vegetali epifiti, tra i quali la comunità a Briozoi costituisce generalmente una delle principali componenti.

In particolare la metodica seguita è stata la seguente.

Vengono liofilizzati alcuni grammi di materiale al quale si aggiunge un volume di circa 3 ml di hydromatrix. Si agita manualmente in modo da omogeneizzare la miscela solida e si trasferisce in una cella da 11 ml aiutandosi con l'apposito imbuto di alluminio. Si completa il trasferimento con piccole quantità di hydromatrix. Si pressa il contenuto della cella con l'apposito pestello e si colma la cella con hydromatrix. Quindi si chiude la cella avvitandovi il coperchio superiore e si serrano le chiusure. Si trasferisce la cella così preparata nell'autocampionatore dell'estrattore ASE 200, si inserisce il vial di raccolta dell'estratto in vetro da 60 ml avendo cura di serrare bene il tappo e di controllare la integrità del setto. Si sottopone la cella al procedimento di estrazione automatizzata impostando una temperatura di 135°C, una pressione operativa di 1500 psi, un tempo di statica pari a 4 minuti ed un numero di tre statiche, n-esano o etere di petrolio come solvente di estrazione.

Al termine dell'estrazione si preleva il vial di vetro contenente l'estratto in esano o in etere di petrolio e se ne versa il contenuto in una beuta dotata di collo a smeriglio. Si recupera quantitativamente l'estratto impiegando piccole aliquote del solvente di estrazione per lavare il vial e si trasferisce nella beuta con una pipetta pasteur.

Si collega la beuta contenente l'estratto all'evaporatore rotante, ci si assicura che il bagno riscaldante ad acqua abbia raggiunto la temperatura di 45°C, che il rubinetto dell'acqua di refrigerazione sia aperto e si comincia la concentrazione dell'estratto impostando la pompa da vuoto al valore di pressione idoneo per il solvente di estrazione impiegato.

Una volta che l'estratto sia in procinto di andare completamente a secco si spegne la pompa da vuoto e si rimuove la beuta. Si pone la beuta

sotto cappa affinché si completi la evaporazione a pressione atmosferica. Il campione è ora pronto per la fase di purificazione.

Nella colonna di vetro, opportunamente decontaminata tramite lavaggio con detergente specifico per vetreria ed opportunamente asciugata, viene inserito un filtro (un filtro di cellulosa per celle ASE o un batuffolo di cotone estratto con diclorometano), viene aggiunto del florisil (1 g), viene versato dell'esano o dell'etere di petrolio fino a ricoprire interamente il florisil, viene aggiunto (tramite pipetta di vetro e propipetta) del rame attivato in sospensione di esano fino a raggiungere uno spessore di 0.5-1 cm, viene aggiunto del solfato di sodio anidro e viene ricoperto tutto con esano o etere di petrolio. Nella cartuccia preimpaccata viene versato dell'esano o dell'etere di petrolio fino a ricoprire interamente il Florisil, viene aggiunto (tramite pipetta di vetro e propipetta) del rame attivato in sospensione di esano fino a raggiungere uno spessore di 0.5-1 cm, viene aggiunto del solfato di sodio anidro e viene ricoperto tutto con esano o etere di petrolio.

Si condiziona la colonna o la cartuccia così preparata facendo passare un volume di almeno 6 ml di solvente (esano o etere di petrolio). Una volta che il livello del solvente sia arrivato a pelo dello strato superiore di sodio solfato si chiude il flusso della colonna.

Una volta evaporato l'estratto lo si riprende con 1 ml di solvente (esano o etere di petrolio) e lo si trasferisce, mediante pipetta pasteur, nella colonna o nella cartuccia impaccate con florisil. Si completa il trasferimento impiegando altre due aliquote da 0.5 ml. Si avvia l'eluizione ad un flusso di 2 ml/min impiegando 12 ml di esano o di etere di petrolio. Si raccoglie l'eluato in una beuta con collo a smeriglio e lo si concentra all'evaporatore rotante come sopra.

Una volta andato a secco l'estratto a pressione atmosferica lo si riprende con 1 ml di isoottano e lo si trasferisce in vial da autocampionatore.

Il campione è così pronto per l'iniezione al gascromatografo.

#### 3.3.3.4. *Analisi degli IPA.*

##### 3.3.3.4.1. *Sedimenti.*

Allo scopo di ottenere una efficiente estrazione degli idrocarburi policiclici aromatici tramite solvente organico è necessario rimuovere l'acqua dai campioni di sedimento. Al fine di preservare gli analiti più termolabili e volatili la rimozione dell'acqua è stata effettuata per liofilizzazione congelando i campioni e realizzando la sublimazione dell'acqua. Fino al momento della liofilizzazione i campioni sono stati conservati in congelatore a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

I campioni sono stati quindi setacciati su maglie da 2 mm ed omogeneizzati tramite macinazione.

L'estrazione degli idrocarburi policiclici aromatici è stata effettuata mediante l'impiego di una miscela di solventi organici (metanolo-acetone)

sotto ponendo un'aliquota di campione a dibattimento meccanico ed immersione in bagno ad ultrasuoni termostato.

Dopo centrifugazione l'estratto del campione è stato sottoposto a filtrazione su filtri inorganici ed è stato trasferito in vial per autocampionatore HPLC.

La determinazione quali-quantitativa è stata effettuata per cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelazione fluorimetrica programmata multisegnale (HPLC-FLD). L'analisi strumentale è stata eseguita in condizioni di automazione e di termostatazione del comparto colonne. L'eluizione è stata effettuata mediante un gradiente di fase mobile acetone/acqua e la rivelazione dei 15 analiti è avvenuta mediante l'acquisizione programmata dei segnali di lunghezze d'onda di emissione multiple specificamente selezionate per ogni analita.

L'identificazione degli analiti avviene tramite l'individuazione, sul segnale specifico dell'analita, del picco all'interno della finestra dei tempi di ritenzione.

La quantificazione è stata eseguita mediante standard esterno con retta di taratura a 6 punti.

I risultati sono stati espressi in ng/g sul sedimento secco o in unità di misura equivalenti ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , ppb, eccetera). Il limite di quantificazione è di 1 ng/g.

Il controllo di qualità sui risultati viene effettuato, per ogni batch analitico, mediante l'esecuzione di repliche, bianchi di procedimento, campioni di controllo del laboratorio, bianchi strumentali, verifica continua della taratura e, periodicamente, tramite l'analisi di materiali di riferimento certificati, di campioni fortificati e tramite la partecipazione di più laboratori.

#### 3.3.3.4.2. *Biota*.

Per ciò che concerne i campioni di *P. oceanica* in considerazione dei tempi di restituzione dei risultati richiesti, si è proceduti ad un trattamento dell'intero campione, compreso quindi gli organismi animali e vegetali epifiti, tra i quali la comunità a Briozoi costituisce generalmente una delle principali componenti.

Il metodo nel dettaglio prevede la seguente procedura.

Si pesano alcuni grammi di organismo liofilizzato in un contenitore di polipropilene da centrifuga «Falcon» da 50 ml e si aggiunge un volume di circa 3 ml di hydromatrix. Si agita manualmente in modo da omogeneizzare la miscela solida e si trasferisce nella cella da 11 ml aiutandosi con l'apposito imbuto di alluminio. Si completa il trasferimento con piccole quantità di hydromatrix.

Si pressa il contenuto della cella con l'apposito pestello e si colma la cella con hydromatrix.

Quindi si chiude la cella avvitandovi il coperchio superiore e si serrano le chiusure.

Si trasferisce la cella così preparata nell'autocampionatore dell'estrattore ASE 200, si inserisce il vial di raccolta dell'estratto in vetro da 60 ml avendo cura di serrare bene il tappo e di controllare la integrità del setto. Si sottopone la cella al procedimento di estrazione automatizzata impostando una temperatura di 135 °C, una pressione operativa di 1500 psi, un tempo di statica pari a 4 minuti ed un numero di tre statiche, n-esano o etere di petrolio come solvente di estrazione.

Al termine dell'estrazione si preleva il vial di vetro contenente l'estratto in esano o in etere di petrolio e se ne versa il contenuto in una beuta dotata di collo a smeriglio. Si recupera quantitativamente l'estratto impiegando piccole aliquote del solvente di estrazione per lavare il vial e si trasferisce nella beuta con una pipetta pasteur. Si collega la beuta contenente l'estratto all'evaporatore rotante, ci si assicura che il bagno riscaldante ad acqua abbia raggiunto la temperatura di 45 °C, che il rubinetto dell'acqua di refrigerazione sia aperto e si comincia la concentrazione dell'estratto impostando la pompa da vuoto al valore di pressione idoneo per il solvente di estrazione impiegato. Una volta che l'estratto sia in procinto di andare completamente a secco (un paio di ml residui) si spegne la pompa da vuoto e si rimuove la beuta. Si pone la beuta sotto cappa affinché si completi la evaporazione a pressione atmosferica. Una volta andato a secco l'estratto lo si riprende con 1 ml di acetonitrile e lo si trasferisce in una siringa sulla quale è stato applicato un filtro da 0.2 mm. Si filtra l'estratto in un vial da autocampionatore, si tappa il vial ed il campione è pronto per l'iniezione all'HPLC.

### 3.3.3.5. *Analisi ecotossicologiche.*

#### 3.3.3.5.1. *Introduzione.*

La batteria di saggi ecotossicologici utilizzata è costituita da 3 specie: il batterio marino *Vibrio fischeri* (Microtox<sup>®</sup>), l'alga unicellulare *Phaeodactylum tricornutum* ed il crostaceo copepode *Tigriopus fulvus*, rappresentanti rispettivamente i decompositori, i produttori primari ed i consumatori.

Gli organismi indicati rispondono ai principali requisiti che ne stabiliscono l'idoneità come specie-test da impiegare in ecotossicologia: ampia diffusione in natura, rilevanza ecologica, adattabilità alle condizioni di laboratorio, breve ciclo vitale, maneggevolezza e sensibilità ai contaminanti (Walsh *et al.*, 1988; Lambertson, 1992; USACE, 1994).

Dalle aree indagate sono pervenuti nei nostri laboratori 15 campioni di materiale solido da sottoporre ad analisi ecotossicologiche così organizzate:

- test di inibizione della bioluminescenza su fase solida mediante il batterio *Vibrio fischeri* applicato direttamente al sedimento tal quale;
- saggio d'inibizione della crescita algale con la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* sull'elutriato ottenuto dal sedimento;
- test di sopravvivenza e di accrescimento naupliare con il crostaceo *Tigriopus fulvus* applicato all'elutriato.

In totale sono state effettuate 60 prove.

#### 3.3.3.5.2. Preparazione dell'elutriato.

L'elutriato è una matrice ambientale che fornisce indicazioni sulla frazione idrosolubile dei contaminanti che per agitazione meccanica viene estratta in acqua e rappresenta la matrice più indicativa in caso di movimentazione dei fondali marini (USACE, 1991).

La fase solida fornisce informazioni circa quella frazione di contaminanti che per natura chimica, apolarità, solubilità, adsorbimento e grado di complessazione con la sostanza organica, rimane legata alle particelle di sedimento.

Per la preparazione di tutte le matrici è stata utilizzata acqua di mare sintetica:

- ISO (2006) per l'alga verde *P. tricornutum* e per il batterio *V. fischeri*;
- Instant Ocean<sup>®</sup> per *T. fulvus*.

Gli elutriati sono stati ottenuti miscelando aliquote di sedimento e acqua sintetica in rapporto 4:1 (volume/peso secco), con successiva agitazione per un'ora a temperatura ambiente e centrifugazione per 20 minuti a 3.500 rpm e a 4°C. Il sovrantante, dopo filtrazione a 0,45 µm, è stato utilizzato per l'esecuzione dei saggi biologici entro 24 h dalla loro preparazione.

#### 3.3.3.5.3. *Vibrio fischeri*.

*Vibrio fischeri* è un batterio marino Gram-negativo, eterotrofo, appartenente alla famiglia delle *Vibrionaceae*. E' cosmopolita, ma con maggior diffusione nelle fasce temperate e subtropicali.

Il sistema Microtox<sup>®</sup> è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di questa specie (figura 4).

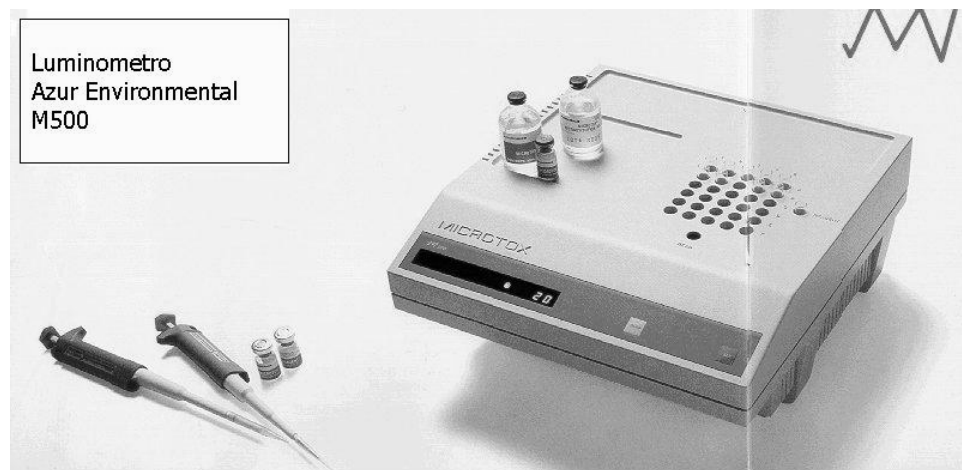


Fig. 4 - Luminometro M500 (sistema Microtox<sup>®</sup>)

Poiché in presenza di contaminanti l'emissione di luce da parte di *V. fischeri* diminuisce, la misura dell'eventuale inibizione della bioluminescenza a seguito dell'esposizione del batterio ad una sostanza nota o ad un campione naturale di acqua o sedimento, consente di valutare il grado di tossicità della sostanza o della matrice testata.

Il sistema di misura risulta piuttosto versatile in quanto è applicabile a matrici naturali, sia continentali che marine, acquose (acqua potabile, acqua interstiziale, elutriato, ecc.) e solide (fanghi, suoli, sedimenti), nonché a soluzioni acquose di sostanze tossiche pure sia organiche che inorganiche.

L'emissione della bioluminescenza è stata misurata all'interno del luminometro termostato M500 (SDI), dotato di pozzetti termostatati a 15°C per i controlli e i campioni e a 4°C per il reagente.

Per i campioni di sedimento è stato applicato il protocollo Solid Phase Test (SPT) con la procedura Large Sample Method (Azur Environmental, 1995) organizzato con 9-12 diluizioni e 3 controlli, a seconda della granulometria del campione. Il test prevede una prima esposizione di 20 minuti durante i quali i batteri si trovano a diretto contatto con il sedimento ed una seconda fase di ulteriori 10 minuti in cui la risospensione batterica viene incubata nel luminometro a 15°C.

La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, è stata elaborata mediante un software dedicato (Microtox Omni™ v. 1.16), che consente di individuare l'EC50 (o qualunque altra EC), ossia la concentrazione del campione cui corrisponde una riduzione della bioluminescenza pari al 50% o, in alternativa, la semplice variazione percentuale di emissione di luce rispetto al controllo.

Il risultato dei saggi sulla fase solida esso è stato espresso sia in TU (Unità Tossiche = 100/EC50), che consente di ottenere una relazione diretta fra tossicità e riduzione della bioluminescenza, sia come Sediment Toxicity Index (S.T.I.), che permette di esprimere la reale tossicità acuta del campione rispetto alla tossicità "naturale" di un campione di riferimento avente le medesime caratteristiche granulometriche (Onorati *et al.*, 1998).

Al fine di esprimere il risultato del saggio nella scala S.T.I., poiché il test in fase solida viene effettivamente applicato sulla frazione granulometrica < 1 mm e poiché la componente naturale della tossicità è funzione della frazione pelitica, è stata eseguita anche un'analisi granulometrica mirata ad individuare la proporzione tra le due frazioni citate, indispensabile per la valutazione del reale livello di tossicità acuta.

Le modalità utilizzate per l'individuazione di tali frazioni granulometriche si dividono in 3 fasi:

1. trattamento del campione con una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per facilitare la separazione e la disgregazione del sedimento;
2. setacciatura su getto di acqua distillata mediante setacci ASTM da 63 µm e da 1 mm;