

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in
RISCHIO AMBIENTALE E PROTEZIONE CIVILE**



**LIVELLI DI NUTRIENTI E BIODISPONIBILITÀ IN MARE
ADRIATICO**

**NUTRIENTS LEVELS AND BIOAVAILABILITY IN THE ADRIATIC
SEA**

Tesi di Laurea Magistrale

di: Matteo Fanelli

Relatore:

Dott.ssa Anna Annibaldi

Primo Correlatore:

Dott. Stefano Accoroni

SESSIONE STRAORDINARIA (FEBBRAIO 2020)

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. L'eutrofizzazione	4
1.2. Nutrienti.....	7
1.2.1. Fonti naturali ed antropogeniche	7
1.2.2. Normativa vigente	9
1.2.3. Silicati	10
1.2.4. Composti azotati	10
1.2.4.1. Azoto nitrico e nitroso	11
1.2.4.2. Azoto ammoniacale	12
1.2.5. Fosforo.....	13
1.2.5.1. Fosforo organico.....	15
1.3. Rapporto di Redfield	16
1.4. Attività fosfatasica	18
1.5. Indice trofico TRIX.....	19
1.6. Mar Mediterraneo	22
1.6.1. Mare Adriatico – caratteristiche principali	23
1.6.2. Alto Adriatico.....	24
1.6.3. Centro Adriatico	24
1.6.4. Concentrazioni di nutrienti in Adriatico.....	24
2. SCOPO DELLA TESI.....	29
3. MATERIALI E METODI	30
3.1.0. Siti di campionamento	30
3.1.1. Il nord Adriatico	31
3.1.2. L'Adriatico centrale.....	33
3.2.0. Campionamenti.....	37
3.2.1. Campionamenti alto Adriatico.....	38
3.2.2. Campionamenti centro Adriatico.....	39
3.2.3. Dati acquisiti durante il campionamento	40
3.2.4. Campionamento manuale	42
3.3.0. Laboratorio	44
3.3.1. Clean Room	44
3.3.2. Sistema Milli-Q	45
3.3.3. Filtrazione.....	46
3.3.4. Spettroscopia uv-visibile	47
3.3.4.1. Cenni teorici	47
3.4.0. Metodologia analitica	50
3.4.1. Determinazione nutrienti	50

3.4.1.1. Colorimetro EasyChemPlus	50
3.4.1.2. Metodi di determinazione nutrienti	52
3.5.0. Digestione campioni	58
3.6.0. Attività fosfatase - PMEase	60
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	63
4.1.0. Validazione della metodologia analitica: effetto della filtrazione del campione.....	63
4.1.1. Validazione della metodologia analitica: effetto della conservazione del campione	64
4.2.0. Livelli di nutrienti in alto Adriatico.....	65
4.2.1. Nitrati	65
4.2.2. Nitriti	67
4.2.3. Azoto Ammoniacale	70
4.2.4. Silicati	72
4.2.5. DIP	74
4.2.6. DOP	76
4.2.7. Fosforo totale.....	78
4.3.0. Livelli di nutrienti nella costa di Ancona	80
4.3.1. Nitrati	80
4.3.2. Nitriti	82
4.3.3. Azoto Ammoniacale	84
4.3.4. Silicati	86
4.3.5. DIP	88
4.3.6. DOP	90
4.3.7. Fosforo totale.....	92
4.4.0. Rapporto di Redfield	94
4.5.0. Attività fosfatase – PMEase.....	97
4.4.1. Correlazione tra attività fosfatase e salinità.....	98
4.4.2. Correlazione tra attività fosfatase e DOP	102
4.4.3. Correlazione tra attività fosfatase e DIP	105
4.6.0. Monitoraggio eventi di pioggia	109
4.5.1. Evento 1 – Maggio 2019	109
4.5.2. Evento 2 – Novembre 2019	111
5. CONCLUSIONI.....	115
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	117

1. INTRODUZIONE:

L'eutrofizzazione è uno dei descrittori fondamentali (n° 5) per la definizione del buono stato ambientale (GES) secondo la Marine Strategy (Direttiva 2008/56/CE), recepita in Italia con il D. Lgs. n. 190 del 13 ottobre 2010.

L'eutrofizzazione rappresenta uno status ambientale distrofico generato da un eccesso nei livelli di concentrazione di nutrienti nell'ambiente marino o in acque superficiali, tale da generare una serie di problematiche quali bloom algali, fenomeni di anossia legati all'eccessivo consumo di ossigeno ed all'incremento dei processi di degradazione biologica, con conseguenti morie di pesci ed organismi bentonici.

Quando le alghe muoiono, infatti, i microrganismi aerobi iniziano la decomposizione della materia organica utilizzando buona parte dell'ossigeno disciolto nell'acqua. Questo provoca una forte diminuzione della quantità di ossigeno presente nello specchio d'acqua. In queste condizioni i microrganismi anaerobi subentrano nella decomposizione della sostanza organica a quelli aerobi, sviluppando grandi quantità di sostanze tossiche e maleodoranti, come ammoniaca, metano, e acido solfidrico, che rendono l'ambiente inospitale per altre forme di vita, minando pericolosamente gli equilibri ecosistemici.

Tra le principali cause di apporto straordinario di nutrienti in ambiente marino costiero troviamo l'apporto fluviale, conseguente ad eventi di piena o ordinario dilavamento di sostanza organica ad opera dei corsi d'acqua superficiale, significativamente incrementato dalla piovosità, dalle diffuse attività agricole (che prevedono spesso l'utilizzo di fertilizzanti e di pesticidi) ed industriali e dallo sversamento di nutrienti dovuto all'attività degli

scolmatori, che se autorizzati a norma di legge (art. 124 , comma1, D.Lgs 152/2006 e s.m.i.) , in caso di eventi meteorici di portata straordinaria, scaricano le acque grigie e reflue, normalmente destinate alla ricezione in impianti di depurazione, direttamente in mare (a tali scarichi non si applicano i valori limite di emissione previsti dall'Allegato 5 del d.lgs. 152/2006.).

La disciplina degli scarichi (Domestico - Industriale - Urbano - Acque di prima pioggia) rappresenta il fulcro della normativa relativa alla tutela delle risorse idriche. è inserita nel Codice dell'ambiente (Dlgs 152/2006; aggiornato con il D. Lgs 16 gennaio 2008, n. 4; Modificato con il D. Lgs 28 giugno 2010, n. 128;) nella sua Parte III: "la difesa del suolo e la lotta alla desertificazione, la tutela delle acque dall'inquinamento e la gestione delle risorse idriche". La disciplina determina le modalità di trattamento ed i valori limiti associati alle acque per specifica destinazione d'uso, identificando appunto come prioritario il trattamento delle acque reflue urbane ed industriali al fine di preservare la naturale capacità di ripristino ambientale e preservare l'integrità degli ecosistemi e la fruizione degli stessi, minimizzando l'impatto antropico dovuto ad una cattiva gestione delle acque.

I nutrienti sono gli elementi essenziali per l'accrescimento in biomassa di tutti gli organismi viventi, nonché protagonisti di fondamentali reazioni metaboliche e delle principali molecole biologiche, come proteine, acidi nucleici, fosfolipidi, e quant'altro. Sono prevalentemente composti carboniosi, azotati e fosfati e possiamo trovarli nelle varie matrici ambientali in diverse forme chimiche, prevalentemente organiche ed inorganiche. Normalmente le concentrazioni degli stessi vengono mantenute in equilibrio nei sistemi naturali grazie ai loro cicli naturali, ad opera delle comunità biologiche e di normali trasformazioni abiotiche. (M. Loreau, 1995.)

Il Mare Adriatico è un bacino semichiuso, dall'alta pressione antropica dovuta all'elevata densità di popolazione risiedente lungo le coste. Ciò combinato all'alta densità di attività agricole ed industriali ed alla sua poco profonda batimetria, lo rendono altamente suscettibile a fenomeni di eutrofizzazione dovuti ad un apporto straordinario di carichi organici.

Queste caratteristiche rendono l'Adriatico un sito interessante ai fini della determinazione degli indici trofici e dei parametri determinanti l'eutrofizzazione.

1.1.0. L'EUTROFIZZAZIONE

L'eutrofizzazione consiste in un arricchimento delle acque in nutrienti, in particolare composti dell'azoto e/o del fosforo, che determina un aumento della produzione primaria e della biomassa algale, con conseguente accumulo di sostanza organica, ipossia/anossia delle acque di fondo, possibili stati di sofferenza delle comunità bentoniche e morie di pesci.

Inoltre, l'eutrofizzazione può favorire la fioritura di alcune alghe in grado di produrre tossine che possono intossicare direttamente e/o indirettamente l'uomo.

È uno degli 11 Descrittori della Marine Strategy dell'UE (Direttiva 2008/56/CE), per il quale l'Italia ha condotto una valutazione iniziale nel 2012 ai sensi dell'art. 8 della Direttiva stessa. Le cause dell'eutrofizzazione sono soprattutto da riferirsi agli apporti di nutrienti veicolati a mare dai fiumi o dagli insediamenti costieri che provocano seri impatti negativi sulla salute degli ecosistemi marini e sull'uso sostenibile di beni e servizi; le principali fonti di nutrienti sono riconducibili al settore agro-zootecnico e a quello civile (insediamenti urbani).

L'indicatore è annoverato come descrittore all'interno della direttiva 2008/56/CE e fa parte degli undici descrittori per i quali deve essere raggiunto il Buono Stato Ambientale (Good Environmental Status o GES). La direttiva richiede, per il descrittore 5, che sia ridotta al minimo l'eutrofizzazione di origine umana, in particolare i suoi effetti negativi, come perdita di biodiversità, degrado dell'ecosistema, fioriture algali nocive e carenza di ossigeno nelle acque di fondo. La normativa indica come la valutazione dell'eutrofizzazione nelle acque marine debba tenere conto della valutazione delle acque costiere e di transizione ai sensi della Direttiva 2000/60/CE e relativi orientamenti in modo da garantire la comparabilità. La valutazione deve combinare le informazioni relative ai livelli di nutrienti e quelle relative a

una serie di effetti primari e secondari pertinenti dal punto di vista ecologico (criteri). I criteri che consentono di valutare il GES per il Descrittore 5 sono tre: 1) concentrazione di nutrienti nella colonna d'acqua; 2) concentrazione di clorofilla nella colonna d'acqua come effetto diretto dell'arricchimento in nutrienti; 3) ossigeno disciolto con valore soglia corrispondente a concentrazioni pari o inferiori a 3 mg L^{-1} nelle acque di fondo, ossia cambiamenti dovuti a un aumento della decomposizione di sostanza organica e dell'estensione dell'area interessata come effetto indiretto dell'arricchimento in nutrienti. (ISPRA, annuario 2018)

Quando le alghe muoiono, infatti, i microrganismi aerobi iniziano la decomposizione della materia organica utilizzando buona parte dell'ossigeno disciolto nell'acqua. Questo provoca una forte diminuzione della quantità di ossigeno presente nello specchio d'acqua. In queste condizioni i microrganismi anaerobi subentrano nella decomposizione della sostanza organica a quelli aerobi, sviluppando grandi quantità di sostanze tossiche e maleodoranti (ammoniaca, metano, e acido solfidrico) che rendono l'ambiente inospitale per altre forme di vita.

Se prendiamo in considerazione aree di mare come il Mediterraneo, osserviamo che le condizioni trofiche variano in modo considerevole da zona a zona, e all'interno della stessa zona. (UNESCO, 1988. Vollenweider et al., 1996). La concentrazione di soglia di nutrienti al di sopra della quale l'eutrofizzazione diventa un problema ambientale dipende dalla topografia e dalle caratteristiche chimico-fisiche del mare. In generale, le concentrazioni variano da livelli elevati in inverno a livelli vicini allo zero dopo la primavera. [European Environmental Agency]

Le manifestazioni dell'eutrofizzazione seguono modalità estremamente varie, con una notevole differenziazione spaziale da sottocosta al largo, ma anche temporale, sia per

l'intensità che per estensione delle fioriture, da un anno all'altro. L'elevata variabilità dei fenomeni è spesso da correlare alla presenza di grandi fiumi che influenzano in modo pesante i livelli trofici: è il caso dell'Adriatico Settentrionale e della fascia costiera emiliano-romagnola sotto la diretta influenza del fiume Po (Rinaldi e Montanari, 1988. Vollenweider et al. 1992).

Specie non tossiche possono fiorire con densità così elevate da determinare, soprattutto in condizioni di stratificazione, morie di pesci ed invertebrati per carenza di ossigeno, che viene utilizzato per la decomposizione della biomassa algale sedimentata sul fondo. Altre specie presentano caratteristiche morfologiche che possono danneggiare o intasare le branchie di pesci ed invertebrati, quando raggiungono elevate abbondanze (Anderson, 2009; D'Silva et al., 2012), o produrre tossine in grado di danneggiare direttamente l'ecosistema o di venir biomagnificate lungo la rete trofica (Davidson et al., 2011; Bean et al., 2011).

1.2.0. NUTRIENTI

I nutrienti sono elementi essenziali per la sintesi di biomassa animale, vegetale e microbica. Sono elementi che si ritrovano solitamente in ambiente marino in ordini di grandezza di ppb ($\mu\text{g/l}$), costituiti prevalentemente da composti Azotati, Fosfati e Silicati. Questi elementi li ritroviamo direttamente nelle principali molecole biologiche, negli Acidi Nucleici (DNA ed RNA), nelle proteine, negli ormoni, nelle clorofille e nelle pareti e membrane cellulare sia di organismi monocellulari (fitoplancton, batteri ecc...) che pluricellulari.

In ambiente marino li ritroviamo in concentrazioni variabili, il loro apporto è dato sia da causa antropiche che naturali.

1.2.1. *Fonti naturali ed antropogeniche*

- Fonti Naturali: normale decomposizione di organismi viventi, deiezioni animali e scarti vegetali, lisciviazione.
- Fonti Antropiche: utilizzo di fertilizzanti in agricoltura, di pesticidi o altri composti utilizzati direttamente o generati indirettamente in processi industriali di vario tipo, che a seguito di eventi di pioggia possono venir veicolati per dilavamento e trasporto tramite i corsi idrici superficiali e sotterranei fino a giungere in mare; reflui zootecnici ed acque reflue urbane normalmente contenute nelle fognature e destinate agli impianti di depurazione, che in caso di eventi di pioggia straordinari, per l'eccessiva onerosità dello smaltimento e per non sovraccaricare l'impianto di depurazione, possono, a norma di legge, venir scaricate direttamente in mare.

Numerosi fattori determinano i fattori di diluizione ed abbattimento delle concentrazioni dei nutrienti in ambiente marino, quali la batimetria del fondale, il moto ondoso, la risospensione e l'idrodinamicità dell'area in generale, il tipo di substrato e la granulometria del fondale marino, i processi di adsorbimento, la biodiversità e la quantità di organismi che utilizzeranno tali sostanze.

I nutrienti li ritroviamo in equilibrio solitamente negli ecosistemi naturali, purchè non ci siano contaminazioni antropiche rilevanti. L'equilibrio naturale ecosistemico è garantito dai vari cicli naturali e biogeochimici dei composti considerati, in particolare riguardo P ed N.

Come detto in precedenza, sono elementi essenziali per la vita di ogni organismo vivente, ma se presenti in concentrazioni troppo elevate possono determinare una serie di criticità e nel peggiore dei casi generare fenomeni di eutrofizzazione, per cui, il loro monitoraggio è estremamente importante ai fini di una buona caratterizzazione delle acque ed alla tutela della salute ecosistemica ed umana, volta a determinare lo status qualitativo ambientale e degli indici di eutrofizzazione (es. indice di stato trofico TRIX).

Gli impianti di depurazione delle acque operano processi di rimozione di C, N e P tramite dei processi biologici, volti all'abbattimento delle concentrazioni degli stessi al di sotto dei valori limite di legge.

1.2.2. Normativa vigente

Secondo le normative europee e nazionali, vengono riconosciuti diversi valori limite relativi alle concentrazioni nei vari corpi idrici, sia marini che superficiali, in funzione della destinazione d'uso ed alla matrice specifica. Quindi, avranno valori limiti differenti se si tratta di acque destinate alla potabilizzazione, alla balneazione, alla vita dei pesci, in ingresso al depuratore (Scarico in rete fognaria) o di ingresso in corpi idrici superficiali.

Tab. 1: Valori limite dei nutrienti nelle acque superficiali e per gli scarichi in fognatura, D. Lgs 152/2006.

Parametri	Unità di misura	Scarico in acque superficiali	Scarico in rete fognaria
Fosforo totale	mg L ⁻¹	≤ 10	≤ 10
Azoto Ammoniacale -NH ₄	mg L ⁻¹	≤ 15	≤ 30
Azoto nitroso – NO ₂	mg L ⁻¹	≤ 0.6	≤ 0.6
Azoto nitrico – NO ₃	mg L ⁻¹	≤ 20	≤ 30

1.2.3. Silicati

I silicati (SiO_2) sono il costituente fondamentale delle sabbie. La loro origine deriva da formazioni geologiche vulcaniche e sono naturalmente ampiamente diffusi nei fondali oceanici. I silicati sono costituenti strutturali fondamentali per molte comunità biologiche, sia per organismi monocellulari, vegetali (es. Diatomee) e batterici, che per piante e scheletri sponginei e conchiglie. Hanno bassa solubilità in acqua (0.5 g/L a 298K).

1.2.4. Composti Azotati:

I nutrienti azotati, provenienti dalle sorgenti puntiformi (città, aree urbane) e dal dilavamento dei terreni determinato dalle precipitazioni atmosferiche, arrivano a mare dai fiumi e porto canali. L'azoto è un microelemento nutritivo disciolto nell'acqua, le cui componenti azotate sono rappresentate da composti minerali solubili, quali azoto nitrico (N- NO_3), azoto nitroso (N- NO_2) e azoto ammoniacale (N- NH_3), e dall'azoto totale (TKN, Total Kjeldahl Nitrogen).

Le componenti solubili possono essere rappresentate anche come DIN (Dissolved Inorganic Nitrogen), che corrisponde alla somma delle concentrazioni delle singole componenti (N- NO_3 + N- NO_2 + N- NH_3).

Le componenti azotate presentano una elevata variabilità stagionale, con le concentrazioni minori registrate nel periodo estivo in coincidenza con i minimi di portata dei fiumi afferenti la costa (ARPAE); di conseguenza l'andamento di questi parametri è, in genere, ben correlato con la salinità.

Le concentrazioni di azoto totale sono, invece, strettamente collegate alla presenza di particolato organico in sospensione nella colonna d'acqua, di origine sia fitoplanctonica sia detritica e quindi direttamente correlato agli apporti fluviali. (ARPAE)

L'N rappresenta uno dei quattro elementi indispensabili per la vita di tutti gli esseri viventi (gli altri sono il carbonio, l'ossigeno e l'idrogeno) ed entra nella composizione chimica di innumerevoli molecole biologiche quali amminoacidi e proteine, nucleotidi e acidi nucleici, clorofilla, vitamine, ormoni (auxine e citochinine) e metaboliti secondari come gli alcaloidi.

La presenza di N nelle acque è riconducibile sia a fonti naturali che antropiche. Le fonti naturali sono costituite prevalentemente dalle rocce e dai minerali con cui l'acqua viene a contatto durante il suo percorso, che per lisciviazione possono venir solubilizzati nella colonna d'acqua; mentre la presenza di nitrati riconducibile alle attività umane è dovuta prevalentemente a due fonti: immissione nei corsi d'acqua di liquami sia domestici che zootecnici e derivante dal dilavamento di terreni trattati con fertilizzanti azotati, estremamente impiegati in agricoltura.

1.2.4.1. Azoto nitrico e nitroso

Nitriti e nitrati si originano da processi di nitrificazione, ossia dall'ossidazione di azoto ammoniacale ad opera principalmente di batteri autotrofi aerobi, quali *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*.

I batteri *Nitrosomonas* sono responsabili della trasformazione dell'Azoto Ammoniacale in Nitrito ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$. O meglio, $\text{NH}_4^+ + 3/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$).

I batteri *Nitrobacter* invece sono responsabili della trasformazione dei Nitriti in Nitrati ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$, o meglio $\text{NO}_2^- + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$). Questi batteri sono suscettibili all'azione di

diversi meccanismi inibitori, quali la presenza di diversi agenti sia organici che inorganici e ad alte concentrazioni di ammoniaca ed acido nitroso. Il loro metabolismo è massimo a pH compreso tra 7.5 e 8.6 e necessitano di ossigeno in concentrazioni maggiori di 2 mg L^{-1} .

I nitrati (NO_3) rappresentano lo stato ossidativo più avanzato per quanto riguarda i composti azotati. Essi sono generalmente gli elementi presenti in concentrazione maggiore nelle acque marine.

I nitriti (NO_2) rappresentano il secondo stadio ossidativo dell'azoto. La loro concentrazione nelle acque marine è generalmente inferiore di oltre un ordine di grandezza rispetto al loro stadio ossidativo superiore, i nitrati.

1.2.4.2. Azoto Ammoniacale

Azoto Ammoniacale ($\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$): l'azoto ammoniacale è presente nelle acque sotto forma di Ammoniaca (NH_3) o ione Ammonio (NH_4^+). La produzione dell'azoto ammoniacale avviene tramite processi di Ammonificazione, che è un processo di decomposizione batterica generato dall'idrolisi dell'azoto proteico ed organico (TKN, Total Kjeldhal Nitrogen) ad opera di batteri eterotrofi. ($\text{TKN} \rightarrow \text{NH}_3$).

Le concentrazioni di azoto ammoniacale risentono, in alcuni casi in maniera evidente, anche di apporti provenienti dagli insediamenti costieri caratterizzati da elevata densità di popolazione. Un ulteriore incremento dell'azoto ammoniacale si registra negli strati profondi in prossimità dei fondali nei periodi estivo-autunnali, in concomitanza di fenomeni

ipossici/anossici dovuti ai processi di degradazione della sostanza organica (in questo caso le concentrazioni maggiori sono ben correlate a bassi valori di ossigeno disciolto). (ARPAE)

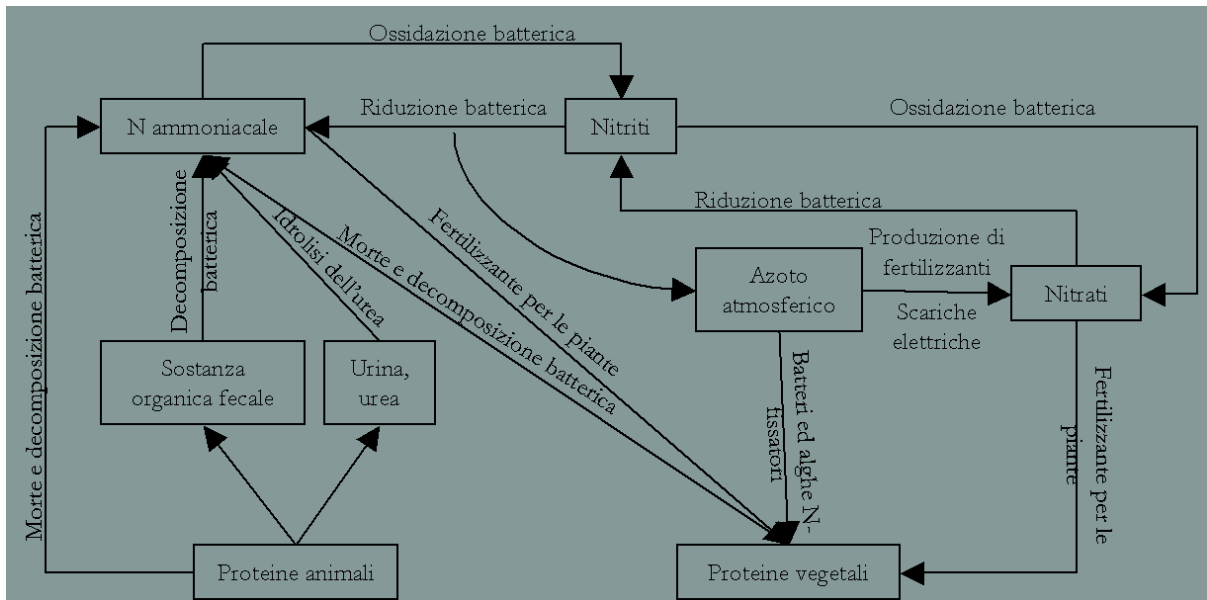


Fig. 1 – Trasformazioni dei composti azotati.

1.2.5. Fosforo

Il fosforo è veicolato alle acque di transizione principalmente dai fiumi. Le sorgenti principali sono individuate nei comparti civile e industriale. Inoltre, per quanto riguarda il settore agricolo, il fosforo in eccesso rispetto alle quote di fertilizzante assimilate dalle piante, in determinate condizioni ambientali, può essere dilavato dai terreni agricoli e raggiungere i corsi d'acqua. Il fosforo è un microelemento nutritivo disciolto nell'acqua, le cui principali componenti sono rappresentate dal fosforo-ortofosfato (P-PO₄) e dal fosforo totale (P-tot). Il fosforo-ortofosfato è la forma fosfatica più facilmente assimilabile da parte della componente floristica, in particolare dal fitoplancton. In presenza di intense fioriture algali, quando l'ortofosfato disponibile nella colonna d'acqua viene rapidamente consumato,

è sicuramente ipotizzabile l'innescare di meccanismi di riciclo di questo nutriente (rapida mineralizzazione e successivo riutilizzo da parte della biomassa algale). Le concentrazioni di fosforo totale sono, invece, strettamente collegate alla presenza di particolato organico in sospensione nella colonna d'acqua, di origine sia detritica, e quindi direttamente correlato agli apporti fluviali, sia fitoplanctonica. Alla fine del suo ciclo, tale elemento può essere immobilizzato nei sedimenti attraverso la formazione di complessi insolubili (in particolare con il calcio e con il ferro ossidato). In caso di situazioni di anossia a livello dell'interfaccia acqua-sedimento, il fosforo può essere rilasciato e tornare in soluzione come ortofosfato biodisponibile. Il DM 260/10 include il fosforo reattivo (P-PO₄) tra gli elementi di qualità fisico-chimica rilevati nella colonna d'acqua e stabilisce un limite di 15 µg/l per i corpi idrici con salinità >30 psu. (ARPAE)

La presenza di fosforo nelle acque è legata all'immissione nei corpi idrici ed il conseguente scarico a mare di:

- Polifosfati derivanti da reflui di origine domestica contenenti detersivi,
 - Ortofosfati provenienti dalle acque di dilavamento dei terreni trattati con fertilizzanti.
- Ortofosfati e polifosfati compongono il fosforo inorganico disciolto (DIP).
- Fosfati organici provenienti soprattutto dai pesticidi.

Generalmente, in soluzione in una matrice acquosa, tutte queste forme vengono ricondotte alla forma di Ortofosfato (PO₄³⁻) in quanto sia i polifosfati che i fosfati organici si idrolizzano più o meno velocemente dando origine ad ortofosfati.

Il fosforo nella maggior parte delle acque è il fattore limitante per la crescita di organismi vegetali, in quanto, solitamente è presente in concentrazioni molto basse.

Gli organismi vegetali, fitoplancton compreso, necessitano di piccole quantità di fosforo per vivere, per tale motivo il fosforo è probabilmente l'elemento più rilevante per la determinazione delle cosiddette "fioriture algali".

1.2.5.1. Fosforo organico

Nelle acque marine ci sono prevalentemente 5 classi di P organico: (D.S.Baldwin, 2013)

- Acidi Nucleici (DNA, RNA). I nucleotidi sono il monomero costituente gli acidi nucleici. Sono caratterizzati da uno zucchero (generalmente mono o disaccaride), una base azotata ed un gruppo fosfato (PO_4^{2-}): per questo motivo ritroviamo gruppi fosfato in Adenina, Guanina, Citosina, Uracile e Timina.
- Altri Nucleotidi (ATP, GTP, AMP). Questi nucleotidi generano dei picchi in concentrazione in corrispondenza di bloom algali. Sono composti la cui degradazione libera molta energia, direttamente utilizzabile dagli organismi (es. ATP).
- Inositolo fosfato (mioinositolo fosfato): il mioinositolo esafosfato è l'elemento predominante (myo-IHP), e rappresenta il principale composto di accumulo di fosforo nelle piante, specialmente nei semi.
- Fosfolipidi: componenti essenziali delle membrane cellulari, contengono gruppi fosfato mono o di-esteri nelle teste polari della molecola.
- Fosfonati (Phosphonates): i fosfonati sono composti organici di P che hanno legami diretti C-P. questa classe è in aumento grazie alla produzione artificiale di fosfonati sintetici, come il Glifosato, N-(fosfometil) glicina, noto erbicida.

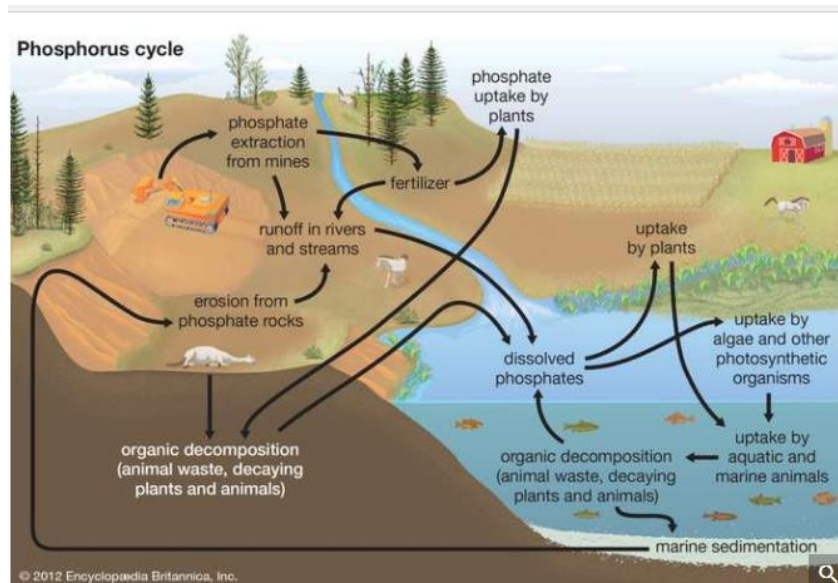


Fig. 2: Il ciclo del fosforo

1.3. Rapporto di Redfield

Il fitoplancton preferenzialmente necessita di dei rapporti atomici tra carbonio, azoto e fosforo dati dal rapporto di Redfield (Redfield ratio) pari a: $C:N:P=106:16:1$, espresso in moli. (A.C. Redfield, 1934; A. C. Redfield, 1958; A. C. Redfield, B. H. Ketchum, F. A. Richards Wiley, 1963.)

Il fitoplancton dunque attinge a questi elementi (C:N:P) dall'ambiente circostante in rapporto 100:16:1 e la sua crescita si fermerà o rallenterà (legge di Liebig) quando uno di questi elementi non sarà più biodisponibile alle concentrazioni necessarie per rispettare tale rapporto.

Il carbonio (C) non costituisce un fattore limitante, in quanto le fonti di generazione (apporto di CO_2 atmosferica, processi di respirazione biologica, presenza di carbonati,

decomposizione di sostanza organica) sono sempre sufficienti a sostenere crescite fitoplanctoniche elevate. Perciò per l'individuazione del fattore nutritivo limitante va esaminato il rapporto N:P.

Se il rapporto N:P in un ambiente acquatico è superiore a 16 si può affermare che il fosforo è il fattore limitante per la crescita algale e l'azoto in eccesso presente nelle acque non può essere utilizzato dalle alghe. Viceversa, un rapporto N:P minore di 16 indica che il fattore limitante è l'azoto.

Essendo importanti per il fitoplancton principalmente i nutrienti inorganici, il rapporto di Redfield viene generalmente calcolato considerando solamente l'azoto e il fosforo inorganico, dunque trattato come rapporto tra Azoto inorganico disciolto (DIN) e Fosforo inorganico disciolto (DIP), DIN:DIP.

Tuttavia, alcuni studi (Accoroni et al., 2017, Baldwin, Nicholson) dimostrano come molte specie fitoplanctoniche siano in grado di utilizzare il fosforo organico (DOP) in alternativa al fosforo inorganico (DIP) per il loro accrescimento, (Accoroni et al., 2017), il quale è solitamente presente nelle acque marine in concentrazioni minori rispetto al DOP.

In condizioni di P-limitazione avvengono modificazioni nelle strutture delle comunità planctoniche che si ripercuotono nella catena trofica microbica, favorendo la proliferazione di singoli comparti della comunità planctonica (fitoplancton, batteri e virus), modificandone l'equilibrio delle loro interazioni.

Il mare Adriatico è caratterizzato da concentrazioni molto basse di fosforo inorganico (DIP: Dissolved Inorganic Phosphorus) con il rapporto N:P di molto maggiore al valore di Redfield

16. (D. Degobbis, 1990.). Di fatti, molti studi considerano sia il mare Adriatico sia altre aree del mare Mediterraneo (I. Pojed, S. Kveder, 1977) fortemente fosforo limitate.

Questa condizione di P-limitazione è dimostrata da alcuni studi condotti in vitro su comunità fitoplanctoniche naturali del golfo di Trieste, aumentando la biodisponibilità di P. In queste condizioni, la produzione primaria incrementa di circa 30 volte i valori naturali a distanza di 9 giorni. Sembra inoltre che l'eccesso di P incrementi i tassi di utilizzo dei nitrati, generando a distanza di giorni condizioni per cui l'azoto potrebbe diventare un fattore co-limitante. (C. Larato et. al, 2010).

1.4. Attività fosfatasica:

Originariamente si pensava che l'accrescimento di fitoplancton fosse legato soprattutto alle concentrazioni di fosforo inorganico disciolto (DIP) nelle acque in quanto considerato l'unica fonte di biodisponibile del P. Molti studi mostrano come alcuni organismi marini fotoautotrofi, sia cianobatteri che microalghe eucariote, siano in grado di utilizzare il DOP (fosforo organico disciolto) come fonte primaria di P. (e.g. Cembella et al., 1984; Orchard et al., 2010; Whitton et al., 2005) qualora il fosforo sia l'elemento limitante alla loro crescita.

Dato che in ambiente marino, specialmente in zone costiere, le concentrazioni di DOP sono tendenzialmente maggiori delle concentrazioni di DIP (Dyhrman and Ruttenberg, 2006; Suzumura et al.1998), diventa fondamentale lo studio di tali parametri per l'ecologia costale.

L'attività fosfatasica avviene grazie a due enzimi, generalmente associati alle membrane cellulari, in grado di idrolizzare diverse forme di P organico, nello specifico la

fosfomonoesterasi (PMEase, la quale verrà investigata durante lo studio) e la fosfomonodiesterasi (PDEase, la cui attività è stata esclusa dallo studio). Questi enzimi sono specifici per legami esterici (monoestere e diestere) e non per singolo composto organico. (Accoroni et al., 2017).

L'attività di questi enzimi genera dunque l'idrolisi dei composti organici contenenti fosforo, rilasciando ortofosfato (PO_4^-) (Cembella et al.1984), che rappresentano la forma principale di P inorganico direttamente assimilabile come nutriente, nonché la forma alla quale vengono ricondotte la quasi totalità di P inorganico presente nelle acque.

L'attività fosfatasica si distingue inoltre in fosfatasi alcalina e fosfatasi acida, strettamente pH dipendenti.

1.5. Indice trofico TRIX

L'indice TRIX è un indice dello stato di trofia, sviluppato originariamente per il Mare Adriatico ed esteso successivamente con successo in tutti i mari italiani. L'indice è stato incluso nel D.Lgs 152/99 ed è un valore obbligatorio per la classificazione delle acque in termini di qualità ambientale. È attualmente in uso in tutte le regioni italiane e nel corso degli anni sta venendo valutato anche dagli altri Stati Membri dell'UE.

L'indice permette una valutazione quantitativa dello stato trofico dell'area in esame, escludendo criteri di valutazione soggettiva e rendendo possibili confronti quantitativi anche su siti geograficamente e temporalmente differenti.

Il TRIX per rappresentare le condizioni trofiche di una data area di mare, si avvale di una serie di parametri fondamentali, quali:

- Fattori che esprimono direttamente la produttività:
 1. Ossigeno disciolto: |D%O| come deviazione in valore assoluto della saturazione di ossigeno dal 100%. È un ottimo indicatore dell'intensità della produzione del sistema in quanto dipende sia dall'attività fotosintetica degli organismi sia dai processi di respirazione.
 2. Clorofilla "a": Cha, espressa in µg/l. La clorofilla "a" è il principale pigmento fotosintetico presente negli organismi fitoplanctonici, di conseguenza è un ottimo indicatore, semplicemente misurabile, sostitutivo della biomassa ed indice di produttività.
- Fattori nutrizionali, quali Ptot, Ntot, DIN e DIP, espressi in µg/l, già discussi nei capitoli precedenti.

$$\text{Indice Trofico TRIX} = (\text{Log}(\text{Cha} \cdot |\text{OD}\%| \cdot \text{N} \cdot \text{P}) - (-1.5)) / 1.2$$

Il risultato viene espresso attraverso una scala da 2 a 8, il grado di trofia ed il livello di produttività delle acque costiere in base a quattro classi di qualità.

Tab. 2: Indice trofico TRIX

Scala Trofica	Stato	Condizioni
2 – 4	elevato	Acque scarsamente produttive. Livello di trofia basso. Buona trasparenza delle acque. Assenza di anomale colorazioni. Assenza di sottosaturazione sul fondo.
4 – 5	basso	Acque moderatamente produttive. Livello di trofia medio. Buona trasparenza delle acque. Occasionali intorbidimenti. Occasionali anomale colorazioni. Occasionali ipossie sul fondo.
5 - 6	mediocre	Acque molto produttive. Livello di trofia elevato. Scarsa trasparenza delle acque. Anomale colorazioni. Ipossie e occasionali anossie sul fondo. Stati di sofferenza sul fondo.
6 - 8	scadente	Acque fortemente produttive. Livello di trofia molto elevato. Elevata torbidità delle acque. Diffuse e persistenti colorazioni. Diffuse e persistenti ipossie/anossie sul fondo. Morie di organismi bentonici. Alterazioni delle comunità bentoniche. Danni economici turismo, pesca e acquacoltura.

1.6. Mar Mediterraneo

La Marine Strategy (Direttiva 2008/56/CE) divide le acque marine europee in 4 macroregioni: Mar Baltico, Mar Mediterraneo, Mar Nero ed Oceano Atlantico Nordorientale.

Il Mar Mediterraneo, a sua volta, viene ulteriormente suddiviso in 4 aree per criteri di similarità, quali:

- Mar Mediterraneo occidentale (Liguria, Toscana, Lazio, Campania, Sardegna)
- Mar Adriatico (Friuli Venezia Giulia, Veneto, Emilia Romagna, Marche, Abruzzo, Molise, Puglia)
- Mar Ionio e Mar Mediterraneo centrale (Calabria, Basilicata, Sicilia).

1.6.1. Mare Adriatico – caratteristiche principali

Il Mare Adriatico è un bacino altamente vulnerabile a fenomeni di inquinamento in quanto si presenta come un bacino semichiuso, caratterizzato da elevata densità di popolazione lungo le coste, con conseguente elevato apporto di sostanze inquinanti e nutrienti in ambiente costiero e la sua circolazione è limitata.

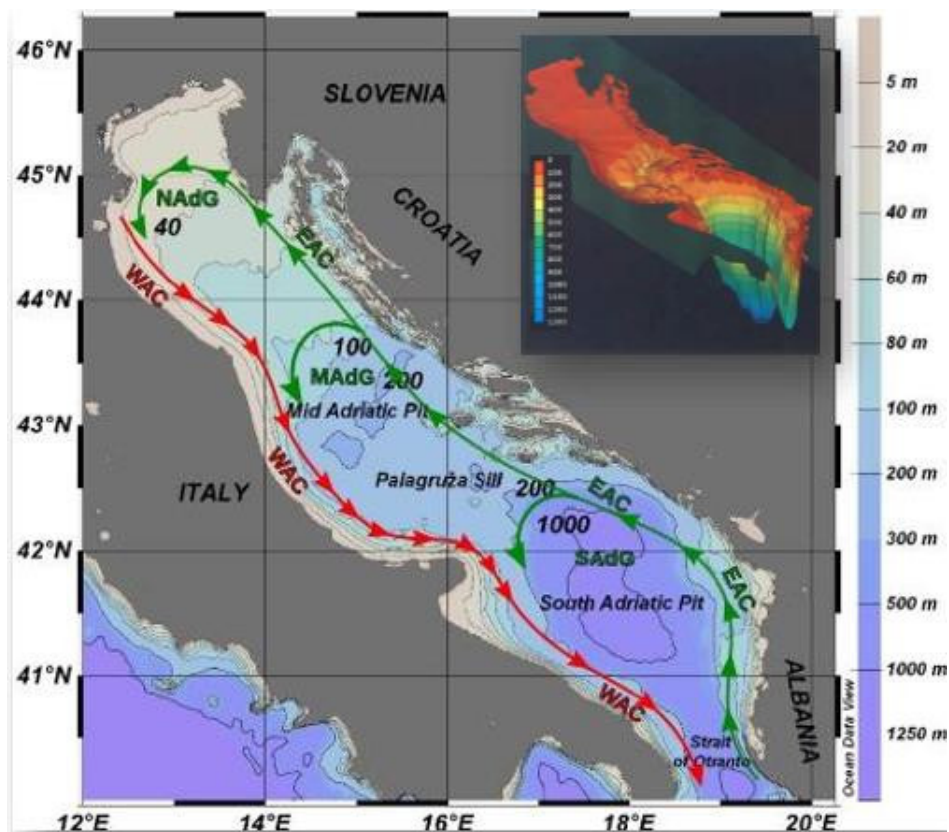


Fig. 3: circolazione adriatica e batimetria

La circolazione marina, risalendo dal Mediterraneo Orientale lungo le coste della grecia, seguendo le coste albanesi e croate, slovene ed italiane, determina un diverso regime deposizionale di sedimenti lungo le coste, diminuendo la granulometria dei sedimenti di deposizione man mano che vengono trasportati dalle correnti.

Infatti, le coste dell'Adriatico orientale sono per lo più rocciose, mentre quelle occidentali sono caratterizzate per lo più da fondali sabbiosi.

L'Adriatico è un mare le cui caratteristiche sono altamente sito-specifiche, caratterizzate in primis dalla differenza di batimetria. Un'altra caratteristica di questo bacino è la diversità di impatto costiero nelle varie regioni, generato sia dall'apporto fluviale del Po, che dall'impatto di attività zootecniche, agricole ed industriali.

L'apporto fluviale del Po, può generare una redistribuzione dei carichi di sostanze inquinanti, specialmente di nutrienti, anche nelle regioni sottostanti, quali Emilia Romagna e Marche.

Nel mare Adriatico, il rapporto di Redfield (N:P) supera nella quasi totalità dei casi il valore di 16:1, per cui risulta fosforo limitato. (Degobbis, 1990; I. Pojed, S. Kveder, 1977).

1.6.2. Alto Adriatico:

L'alto Adriatico rappresenta una regione estremamente particolare di questo vulnerabile bacino, che lo rende quasi un ecosistema a sé stante.

La batimetria è poco profonda, varia tra i 20 m ed i 50 m di profondità; è caratterizzato da un elevato apporto di acque dolci ricche di nutrienti provenienti dal Po ed il suo regime idrodinamico varia notevolmente dal periodo invernale ad periodo estivo.

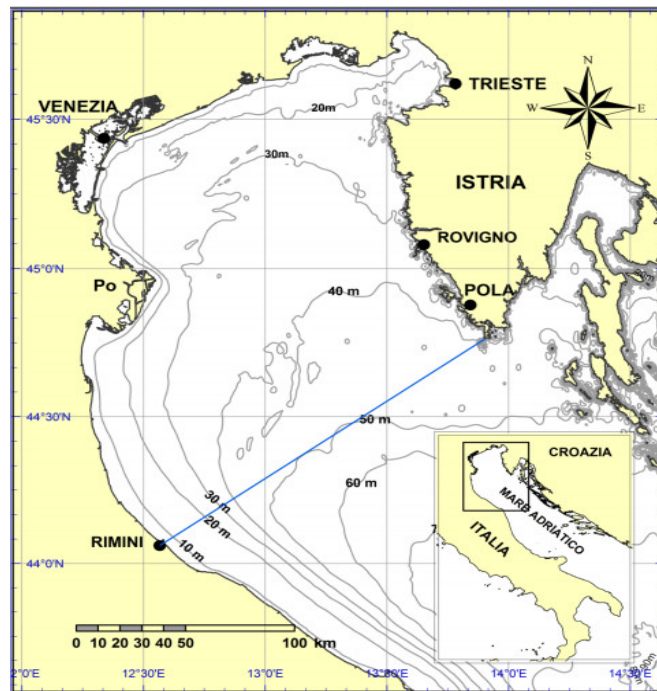


Fig. 4: l'alto Adriatico

Nelle stagioni invernali, a causa del rapido raffreddamento delle acque, conseguenza della scarsa profondità, si crea un corpo d'acqua più denso, mentre nella stagione calda l'Alto Adriatico è caratterizzato da una circolazione chiusa.

Nel caso dell'Adriatico nord-occidentale, la variazione della salinità e di tutta una serie di fattori ad essa correlati, è controllata dalle portate del fiume Po. La salinità risulta inoltre fortemente controllata dal quadro correntometrico locale che determina le specifiche caratteristiche di questo sistema costiero. Localmente, lungo la riviera romagnola, si possono però registrare elevati valori di nutrienti senza variazioni di salinità apprezzabili.

1.6.3. Centro Adriatico

A differenza della regione settentrionale dell'Adriatico, ritroviamo una profondità media più elevata. Le coste sono per lo più sabbiose o ghiaiose, caratterizzate solitamente da basse profondità nei pressi della linea di costa, che aumenta allontanandosi dalla stessa.

1.6.4. Concentrazioni di nutrienti in Adriatico

Nelle seguenti tabelle sono riportati i valori di concentrazione relativi ai nutrienti in mare Adriatico, ricavati dalla bibliografia.

Tab. 3: Concentrazioni nutrienti (μM) nord Adriatico.

Sito ed anno	Ptot	P-PO ₄	N-NO ₂	N-NO ₃	N-NH ₃	DIN	SiO ₂	Riferimento
Nord Adriatico (1991)		0.1 ± 0.19	0.19 ± 0.21	1.56 ± 1.91	2.07 ± 1.35	3.87 ± 2.83		Kaltenböck et al, 1992
Nord Adriatico (1993 - 1994)		0.12 - 0.21		1.03 - 3.33	0.46 - 1.02		0.72 - 4.23	Granèli et al, 1999
Nord Adriatico superficiale		0.05 - 0.12		0.58 - 3.18			0.51 - 5.63	Zavatarelli et al, 1998
Nord Adriatico profondo		0.02 - 0.07		0.40 - 1.25			1.34 - 2.52	Zavatarelli et al, 1998
Golfo di Trieste (1992 - 1993)		<0.1 - ~1		<5 - ~25	~1 - ~5		<5 ~25	Reisenhofer et al, 1996
Golfo di Trieste (2006 - 2007)	0.01 - 0.12		0 - 0.93	0 - 8.75	<0.53 - 3.41		0 - 6.80	Cibic et al, 2018

Tab. 4: Concentrazioni nutrienti (μM) centro Adriatico:

Sito ed anno	Ptot	PO ₄	NO ₂	NO ₃	NH ₃	DIN	DON	Ntot	SiO ₂	Rif. Bibliografico
Adriatico centrale (199. - 1992)		0.02 - 0.10		0.3 - 12.3		0.7 - 9.6			0.9 - 5.5	Zoppini et al, 1995
Adriatico centrale		0.06 - 0.07		0.63 - 0.84					4.03 - 4.76	Zavatarelli et al, 1998
Pesaro - costiero (2000)	0-0.32			0 - 9.68	0 - 2.77					Penna et al, 2004
Mljet Island, Croatia (1997)		0.01 - 0.15	0.01 - 0.33	0.1 - 3.42	0.07 - 0.33			2.19 - 7.82	0.61 - 37.99	Benovic et al, 2000
Mljet Island, Croatia (1997)		0 - 0.26	0.01 - 0.62	0.01 - 4.54	0.21 - 1.2			0.68 - 32.13	0.68 - 32.13	Benovic et al, 2000
Ancona - costiero (2015)	~0.2 - 1.4	<0.2				1.9 - 19.5	3.7 - 49.2	48.6 ± 8.9		Accoroni et al, 2017

Tab. 5: Concentrazione nutrienti (μM) in Adriatico meridionale

Sito ed anno	Ptot	P-PO4	N-NO3	DIN	DON	SiO2	Rif. Bibliografico
Adriatico meridionale		0.04 - 0.06	0.77 - 1.22			2.06 - 3.52	Zavatarelli et al, 1998
Adriatico meridionale, superficiale (2007)	0.08 \pm 0.02	0.03 \pm 0.02		0.17 \pm 0.3	4.6 \pm 0.9		Santinelli et. al, 2012
Adriatico meridionale, superficiale (2008)	0.12 \pm 0.04	0.08 \pm 0.04		2.0 \pm 1.2	4.1 \pm 1.0		Santinelli et. al, 2012

Legenda valida per le tab. 3, 4 e 5:

$a - b \rightarrow$ oscillazione tra valore minimo e valore massimo.

$a \pm b \rightarrow$ valore con deviazione standard.

$\sim a \rightarrow$ valore prossimo ad "a"

2. SCOPO DELLA TESI

La tesi si inserisce in un progetto europeo denominato “AdSWiM”: Managed use of treated urban wastewater for the quality of the Adriatic Sea. Il progetto coinvolge istituti, comuni e gestori degli impianti di depurazione ed è volto al mantenimento e miglioramento della qualità delle acque marine. Il progetto AdSWiM si struttura intorno alle acque reflue urbane (WW) ed agli impianti di depurazione (DP) e mira a valutare se l'immissione in mare delle acque depurate possa influenzare l'apporto di nutrienti per l'ecosistema, in particolare della biodisponibilità del fosforo, alla luce della problematica dell'eutrofizzazione, che interessa fortemente il nord Adriatico . A tal scopo sono stati determinati i livelli di nutrienti sia nelle acque reflue depurate (di due depuratori del Friuli Venezia Giulia) che in ambiente marino, in prossimità dell'immissione di tali acque depurate nella laguna di Marano, durante la stagione balneare 2019.

Inoltre per valutare la biodisponibilità dei nutrienti sono stati determinati i livelli di questi e l'attività fosfatasica lungo la costa anconetana in quattro stazioni a diverso impatto antropico e influenzate in modo differente da apporti di acqua dolce e/o meteorica.

Lo scopo della tesi è sia di determinare il livello di nutrienti del mare Adriatico, in relazione all'efficienza di diversi impianti di depurazione, ma anche di valutare la loro biodisponibilità considerando la ben nota fosforo-limitazione di tali acque, al fine di preservare e migliorare qualitativamente lo stato ecologico e la qualità delle acque di balneazione marino-costiere.

3. MATERIALI E METODI

In questo studio di tesi sono stati investigate le concentrazioni di nitrati (NO_3), nitriti (NO_2), ammoniaca (NH_3), fosfati (PO_4) e silicati (SiO_2) mediante tecniche di rilevazione colorimetriche sia nei siti del nord Adriatico che lungo la costa anconetana e l'attività fosfatasica mediante spettrofotometria UV visibile, nei campioni prelevati lungo la costa marchigiana.

3.1.0. Siti di campionamento

Nell'Adriatico settentrionale sono stati individuati quattro siti di campionamento appartenenti al progetto AdSWiM, due di acqua reflue depurata negli impianti di Lignano Sabbiadoro e S.Giorgio e due di acqua marina nei rispettivi punti di sfocio a mare delle acque depurate. Lungo le coste orientali dell'Adriatico centrale, nei pressi della costa di Ancona sono stati individuati 4 punti di campionamento: tre a Falconara M.ma (dei quali 2 in ambiente costiero ed 1 nei pressi della raffineria API) ed uno a Senigallia, a largo della foce del fiume Cesano.

3.1.1. Il Nord Adriatico

Nord Adriatico: i siti di campionamento localizzati nel Nord Adriatico rientrano nel progetto AdSWiM. Vengono individuati 2 siti, per i quali i campioni vengono raccolti 2 campioni ognuno: uno in prossimità dello scarico delle acque trattate dall'impianto di depurazione (in profondità) ed uno all'interno del depuratore, post trattamento di depurazione.



Fig. 5: Visuale complessiva dei siti di campionamento dell'area Nord-Adriatica: Lignano Sabbiadoro (DP e Sea) e San Giorgio (DP e Sea).

In entrambi i siti il fondale è sabbioso e caratterizzato da bassa profondità. Queste zone sono densamente abitate, soprattutto durante i periodi estivi in quanto località turistiche.

Nei periodi estivi infatti, le criticità legate all'impatto antropico nell'area sono più incalzanti. A differenza dei siti del centro-Adriatico, i campioni relativamente a questi siti vengono campionati da persone terze, aderenti al progetto AdSWiM.

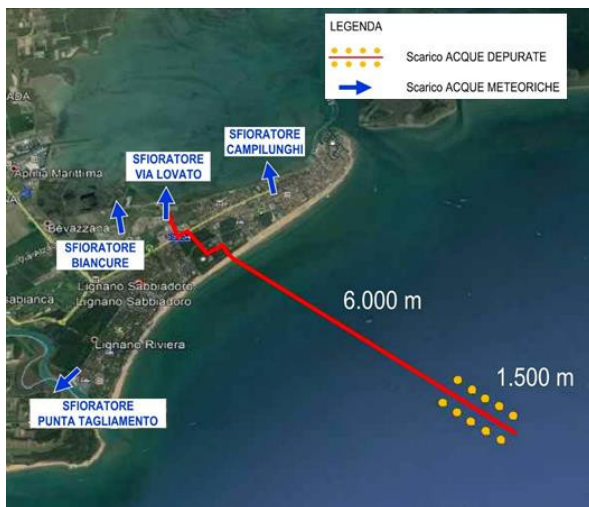


Fig. 6: Lignano Sabbiadoro



Fig. 7: San Giorgio di Nogaro

I due depuratori utilizzano la stessa tipologia di trattamento, costituita da un trattamento biologico a fanghi attivi e chimico di disinfezione.

- Il depuratore di Lignano Sabbiadoro è progettato per la gestione dei reflui di 86400 abitanti equivalenti e raccoglie i reflui solamente per la municipalità di Lignano. La tubazione di scarico si estende per 9.9 km di lunghezza, dei quali 2.5 km sono In-shore ed i restanti 7.5 km sono Off-Shore. Al termine della tubazione, per 1.5 km, si articola il diffusore, al fine di distribuire con maggior diluzione i reflui trattati, in mare.
- Il depuratore di San Giorgio di Nogaro è progettato per la gestione dei reflui di 700000 abitanti equivalenti, il trattamento effettivo invece viene effettuato per 120000 abitanti equivalenti. L'impianto raccoglie i reflui per le municipalità di S.Giorgio di Nogaro, Cervignano, Torviscosa, Carlino, Muzzana e Marano. La tubazione di scarico è lunga 11.8 km, dei quali 5 km In-shore ed i restanti 6.8 km Off-Shore. Al termine, la tubazione si divide in due sezioni, incorporando il diffusore per la redistribuzione dei reflui trattati.

3.1.2. L'Adriatico Centrale

- Falconara M.ma: i siti sono influenzati dall'apporto fluviale dei fiumi Esino (Falconara M.ma), Cesano (Senigallia) e Misa (Senigallia). I siti di campionamento sono stati nominati P1, P2, P3.

I siti P1 e P2 si trovano a 25m circa dalla linea di costa, a distanza di 1,09 km l'uno dall'altro; P1 si localizza a Nord rispetto a P2 (fig. 7). Sono stati scelti in relazione alla vicinanza di scolmatori, che in caso di forti eventi meteorici scaricano direttamente acque reflue non trattate in mare, all'interno delle scogliere artificiali. Entrambi i siti sono caratterizzati da fondale sabbioso basso, con profondità variabile a seconda della marea tra i 20 ed i 40 cm.

La presenza di scogliere artificiali determina un regime idrodinamico relativamente stazionario.

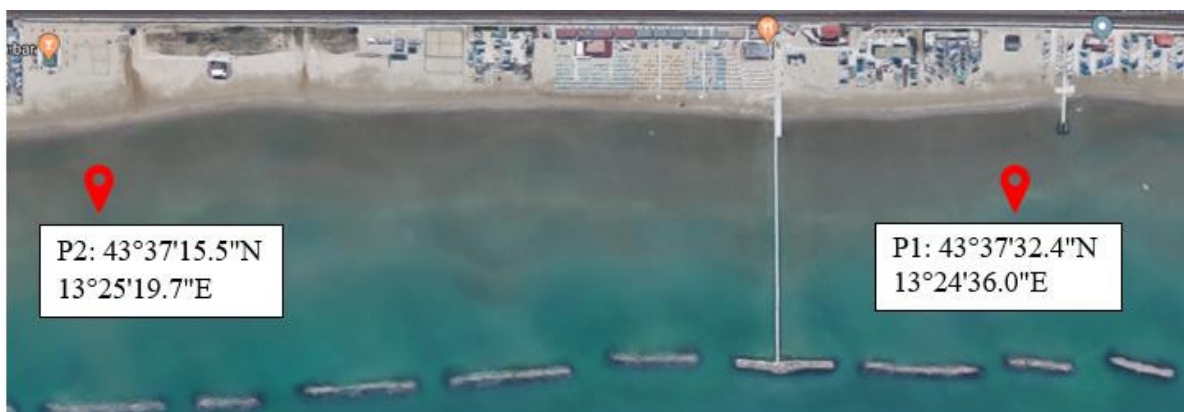


Fig. 8: i siti P1 e P2, Falconara M.ma

Il sito P3 si trova nei pressi dell'estuario del fiume Esino, nei pressi della raffineria API, situato a 4,3 km circa a Nord del P1 ed a 500 m dalla linea di costa, la profondità del fondale è di 4 m. La sua posizione, come si evince dalla figura, non è influenzata direttamente dalla corrente di trasporto del fiume Esino, seppur risente dei fattori di diluizione dovuti alla vicinanza del pennacchio di distribuzione. 43°39'00.0"N 13°22'00.0"E.



Fig. 9: siti P3, P1 e P2 e l'apporto del fiume Esino.

Le frecce in nero indicano il verso della corrente adriatica, in merito all'apporto fluviale del fiume Esino, in questo caso.

- P4 - Senigallia (43°45'18.0"N 13°12'37.8"E): nei pressi di Senigallia è stato individuato un unico sito, a distanza di 2.4km dalla linea di costa. Il sito risente del fattore di diluizione dell'apporto fluviale del fiume Cesano (3.12 km dalla foce dello stesso), localizzato a N-W rispetto all'ubicazione del sito, ed in maniera minore dell'apporto derivante dal fiume Metauro, in quanto si trova a 15 km di distanza da

esso. La profondità del fondale è di circa 11 m ed è prevalentemente costituito da ciottoli e sabbia.

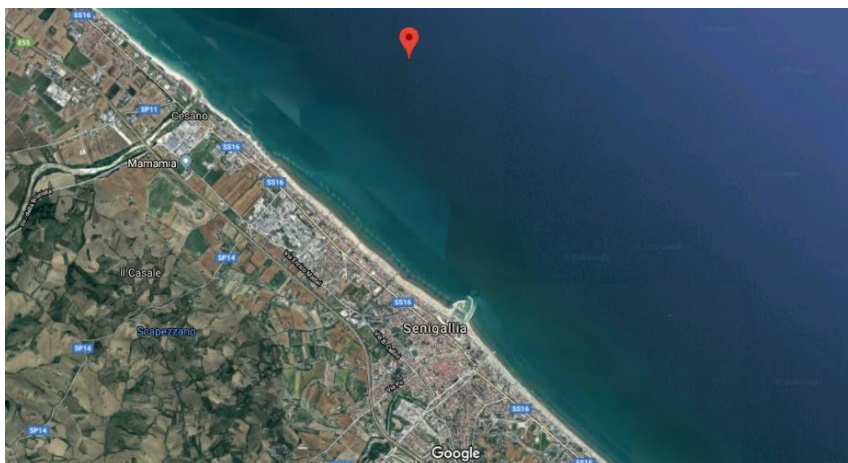


Fig. 10: sito P4



Fig. 11: visuale integrale dei punti di campionamento della costa anconetana e dei principali fiumi della zona.

Nella figura 10 vengono evidenziati tutti i 4 punti di campionamento dell'area centro-adriatica, localizzati nelle Marche, in provincia di Ancona. La linea bianca graduata mostra la distanza tra i vari punti di campionamento, i principali fiumi caratterizzanti l'area sono contrassegnati con una targhetta blu.

I siti P3 e P4 si trovano al di fuori delle scogliere artificiali, sono per cui caratterizzati da un regime idrodinamico più elevato, risentendo maggiormente del moto ondoso.

3.2.0. CAMPIONAMENTI

I campionamenti sono stati effettuati con cadenza mensile durante la stagione balneare in Friuli Venezia Giulia e da maggio 2019 a gennaio 2020 nelle Marche. I siti interni al depuratore (Lignano DP e S.Giorgio DP) dell'alto-Adriatico e i siti in prossimità della costa (P1 e P2) del centro-Adriatico sono stati campionati manualmente; tutti gli altri campionamenti sono stati effettuati da imbarcazioni in condizioni di mare sereno, onde evitare fenomeni di rimescolamento ed eccessiva torbidità.

Tab. 6: Numero di campionamenti effettuati per sito e mese.

	apr -19	mag -19	giu -19	lug -19	ago- 19	set- 19	ott- 19	nov- 19	dic- 19	gen- 2020
Lignano sea	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-
Lignano DP	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-
San Giorgio sea	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-
San Giorgio DP	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-
P1	-	2	1	1	-	1	1	2	-	1
P2	-	-	1	1	-	1	1	2	-	1
P3	-	1	1	1	1	1	1	-	-	1
P4	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1

Nei siti P1 e P2 sono stati analizzati due eventi di pioggia, uno a Maggio ed uno a Novembre.

3.2.1. Campionamento alto Adriatico

Il campionamento dei siti Lignano (sea e DP) e S.Giorgio (sea e DP) segue due modalità differenti: i siti “sea” vengono campionati in profondità, i siti “DP” prevedono la raccolta di campioni direttamente nell’impianto di depurazione, a trattamento avvenuto.

Campionamento depuratore

Le acque, dopo il trattamento del refluo con gli opportuni metodi fisici, meccanici e biologici avvenuto all’interno del depuratore, viene raccolto manualmente tramite delle provette Falcon da 50 ml e filtrato con un filtro da 0.2 μm direttamente sul posto.

Campionamenti in profondità

Per i siti Lignano sea e S.Giorgio sea, i campionamenti dello strato inferiore della colonna d’acqua sono stati effettuati tramite bottiglia di Ruttner.



Fig. 12: Campionatore bottiglia di Ruttner

Questo campionatore permette il raccoglimento di campioni rappresentativi ad alte profondità nella colonna d'acqua. È costituita da un corpo cilindrico trasparente sorretto da un'intelaiatura in acciaio inox. L'interno della bottiglia è privo di parti metalliche per preservare le condizioni del campione e minimizzare i fenomeni di inquinamento durante la raccolta. Dal momento dell'immersione fino al raggiungimento della profondità desiderata il campionatore rimane aperto, la chiusura avviene tramite il rilascio di un messaggero dalla parte apicale del campionatore. Nella bottiglia è incluso un termometro funzionale alla raccolta dei valori di temperatura al momento del prelievo del campione.

3.2.2. Campionamenti centro Adriatico:

I siti P1 e P2 sono stati campionati manualmente da riva utilizzando bottiglie in plastica (PET) di capienza 1.5 L, precedentemente sciacquata con acqua Milli Q ed equilibrata con acqua di mare, riempiendola e vuotandola più volte prima dell'effettivo prelievo. Per ogni sito di campionamento sono state raccolte 2 bottiglie, una congelata subito dopo il prelievo a -18 °C in camera fredda per evitare fenomeni di alterazione del campione in attesa di effettuare analisi sui nutrienti ed una trasportata immediatamente in laboratorio per determinare l'attività fosfatase.

Tutte le operazioni in campo sono state effettuate indossando guanti di plastica. Le bottiglie utilizzate per il prelievo dei campioni e il campionatore sono stati lavati con la procedura descritta sotto nel paragrafo relativo alla conservazione dei campioni.

I siti P3 e P4 sono caratterizzati da una profondità della colonna d'acqua rispettivamente di 4 m e 11 m. il campionamento è stato effettuato per lo strato superficiale della colonna d'acqua, a profondità di 0.5 m, tramite bottiglia in PET, manualmente.

3.2.3. Dati acquisiti durante il campionamento

Durante le operazioni di prelievo dei campioni sono state acquisite alcune variabili complementari utili per l'interpretazione dei risultati, in modo semiquantitativo e quantitativo.

Temperatura e salinità sono stati acquisiti utilizzando un conduttimetro-salinometro YSI Mod. 30M (Fig. 13). I dati di torbidità sono stati acquisiti in modo quantitativo nel campione stesso, utilizzando un torbidimetro da campo modello Orbeco-Hellige Model 966 Portable Turbidimeter (Fig. 14).



Fig. 13: sonda multiparametrica YSI Mod. 30M



Fig. 14: Torbidimetro portatile Orbeco-Hellige Model 966.

3.2.4. *Campionamento manuale*

La tecnica di campionamento manuale segue particolari accorgimenti per evitare la risospensione dei sedimenti, la contaminazione esterna e trasformazioni delle specie chimiche presenti nelle acque dovute alla presenza di ossigeno atmosferico all'interno della bottiglia-campione.

1. **Movimenti in acqua:** per raggiungere i siti di campionamento è risultato necessario l'ingresso in acqua. In prossimità dei punti di campionamento, ogni movimento in acqua è stato effettuato lentamente al fine di evitare risospensione dei sedimenti e possibili alterazioni del campione reale;
2. **Avvinamento:** prima della raccolta del campione le bottiglie vengono avvinate 3 volte, al fine di minimizzare la contaminazione del campione ad opera del recipiente.
3. **Campionamento:** effettuato manualmente tramite immersione della bottiglia campione rivolta verso l'alto. Lo spazio di testa (strato d'aria tra il pelo dell'acqua ed il tappo della bottiglia) è stato minimizzato il più possibile, al fine di ridurre la quantità di ossigeno presente all'interno della bottiglia-campione, per minimizzare eventuali reazioni di ossidazione capaci di alterare la composizione chimica ed il pH del campione raccolto.

4. Stoccaggio sul campo: le bottiglie raccolte vengono inserite in una borsa frigo portatile, con sistema di refrigerazione al fine di mantenere la temperatura dell'acqua il più bassa possibile fino trasporto in laboratorio, al fine di preservare le caratteristiche chimico-biologiche del campione.



Fig. 15: campionamento sito P2

Durante le operazioni di prelievo dei campioni sono state acquisite alcune variabili complementari utili per l'interpretazione dei risultati. Tali variabili sono state acquisite direttamente in situ tramite l'ausilio di sonde multiparametriche e/o conduttimetri salinometri a seconda della disponibilità della strumentazione. I parametri acquisiti sono stati:

- Per i siti del centro Adriatico: salinità, conducibilità, torbidità .
- Per i siti dell'alto Adriatico: salinità, conducibilità, torbidità, temperatura, ossigeno disciolto, pH, clorofilla-a.

3.3.0. Laboratorio

La decontaminazione dei vari materiali e la successiva preparazione dei campioni da analizzare sono state effettuate in un laboratorio denominato *clean room*, ISO 14644-1 Classe 6, con aree ISO Classe 5 sotto flusso laminare (Tab. 3.1). La temperatura del laboratorio è impostata a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante l'inverno e a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ durante l'estate.

Camici, calzari e guanti da *clean room* sono stati indossati seguendo scrupolosamente tutte le procedure previste per questo tipo di laboratorio durante tutte le fasi più critiche del trattamento e della preparazione dei campioni.

Tab. 7 – Classi ISO relative alla clean room

Classe	0.1 μm	0.2 μm	0.3 μm	0.5 μm	1 μm	5 μm
Area						
5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29
6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	292

Il funzionamento della *clean room* si basa sul principio di ricircolo forzato di aria super-filtrata in una stanza sigillata.

Il sistema che provvede a questo è costituito da grandi ventilatori operanti a bassa velocità, che immettono nella stanza, attraverso il soffitto, un flusso laminare di aria precedentemente filtrata attraverso filtri ad alta efficienza (HEPA), posizionati all'esterno della stessa, ed aspirata attraverso griglie poste sul pavimento.

L'analisi dei campioni è stata effettuata in *clean room*, dove si trova lo strumento utilizzato: colorimetro EasyChemPlus.

3.3.1. Sistema Milli-Q:

L'acqua che viene utilizzata per la preparazione di soluzioni standard, per il lavaggio dei materiali e per gli usi generali del laboratorio, viene prodotta attraverso un sistema Millipore Midi con trattamento a due stadi, che produce rispettivamente acqua deionizzata nel primo stadio (sistema Elix) e acqua elettrodeionizzata Milli-Q nel secondo stadio (sistema Milli-Q).



Fig. 16 – Sistema Milli-Q (a sinistra) e sistema Elix (a destra)

3.3.2. Filtrazione a vuoto con pietra porosa

Per la determinazione dei nutrienti e dell'attività fosfatasica i campioni sono stati filtrati con un sistema rampa filtrante collegata ad una pompa a vuoto, tramite l'utilizzo di filtri in nitrocellulosa a porosità $0.45\mu\text{m}$.



Fig. 17: vista completa, strumentazione per filtraggio.

La rampa ha a disposizione sei postazioni di filtrazione, ciascuna delle quali ha un rubinetto che regola l'apertura o la chiusura delle postazioni di filtrazione.

Nelle postazioni utilizzate si dispone una pietra porosa, il filtro ed un recipiente in vetro volto al contenimento dell'acqua marina da filtrare. La chiusura stagna viene garantita da una pinza; prima di avviare la filtrazione è necessario assicurarsi che non ci siano perdite nel sistema filtrante.

L'acqua filtrata verrà convogliata in un'apposita beuta.

3.3.3. Spettroscopia UV-Visibile

La spettroscopia UV-Visibile è stata utilizzata sia per la determinazione dei nutrienti, direttamente incorporata nella cella fotometrica del colorimetro EasyChemPlus, sia per la determinazione dell'attività fosfatasica per l'enzima PMEase, utilizzando lo spettrofotometro presente nella figura sottostante (6705 UV/Vis. Spectrophotometer JENWAY), esclusivamente tramite lettura a 405nm.



Fig. 18: Spettrofotometro JENWAY 6705 UV/vis, utilizzato per la valutazione dell'attività fosfatasica.

3.3.3.1. Cenni teorici

La spettrofotometria è una tecnica analitica basata sui fenomeni di assorbimento di radiazioni nello spettro del visibile (350-700nm) e del vicino ultravioletto (200-350nm).

Lo spettrofotometro è uno strumento costituito da una sorgente di luce policromatica (tungsteno per il visibile, deuterio per l'UV), un monocromatore funzionale al selezionamento della lunghezza d'onda d'interesse, una postazione adibita all'inserimento delle cuvette contenenti il campione da analizzare ed un detector responsabile della trasformazione del segnale luminoso risultante in impulso elettrico.

Le analisi quantitative si basano sulla legge di Lambert-Beer, secondo la quale l'assorbanza è proporzionale sia alla concentrazione della specie assorbente sia alla lunghezza del cammino ottico del materiale.

Legge di Lambert-Beer: Quando un fascio di luce (monocromatica) di intensità I_0 attraversa uno strato di spessore l di un mezzo, una parte di esso viene assorbita dal mezzo stesso e una parte ne viene trasmessa con intensità residua I_1 .

Il rapporto tra le intensità della luce trasmessa e incidente sul mezzo attraversato è espresso dalla seguente relazione:

$$\frac{I_1}{I_0} = e^{-k_\lambda l} = T = e^{-A}$$

dove k_λ è il coefficiente di attenuazione (è una costante tipica del mezzo attraversato e dipende dalla lunghezza d'onda λ) e l è lo spessore di soluzione attraversata.

Definita quindi:

la Trasmittanza (T) come il rapporto I_1/I_0 ,

come assorbanza (A) l'opposto del logaritmo naturale della trasmittanza, la legge assume una forma ancora più semplificata:

$$A = k_\lambda l$$

per una soluzione viene ulteriormente modificata in:

$$A = \varepsilon_{\lambda} l M$$

dove ε_{λ} è il coefficiente di assorbimento molare, M è la molarità della soluzione e l è il cammino geometrico. Il valore di ε_{λ} è considerato costante per una data sostanza a una data lunghezza d'onda, pur se può subire lievi variazioni con variare della temperatura. Inoltre, la sua costanza è garantita solamente all'interno di un dato intervallo di concentrazioni, al di sopra delle quali la linearità tra assorbanza e concentrazione può essere inficiata da fenomeni chimico-fisici (ad esempio la precipitazione della specie chimica colorata).

3.4.0. Metodologia analitica

3.4.1. Determinazione nutrienti

Le determinazioni delle concentrazioni dei nutrienti nelle acque marine sono state effettuate tramite il colorimetro SYSTEA: EasyChemPlus.

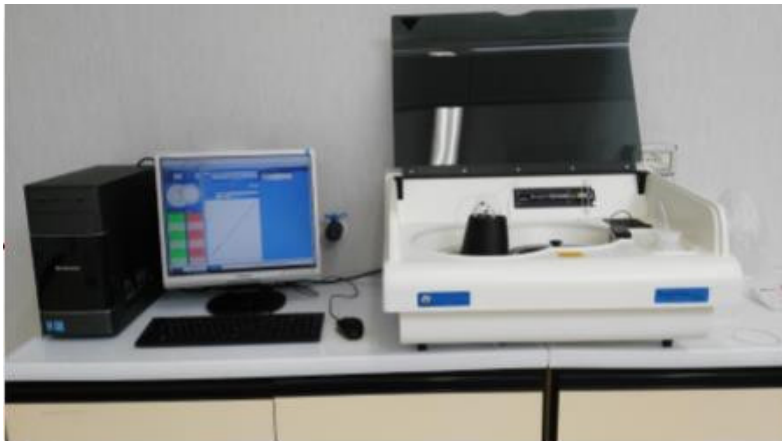


Fig. 19: colorimetro SYSTEA EasyChemPlus, vista frontale

3.4.1.1. Colorimetro EasyChemPlus

- Piatto porta campione: il piatto campioni si trova al centro dello strumento ed ha una capienza massima di 60 provette-campione. Ogni posizione assume l'identità del tipo di analita indicato nella lista di lavoro inserita nel software, quali: campione, calibrante, controllo, bianco.
- Vano reagenti: nel lato sinistro dello strumento troviamo un vano adibito all'inserimento dei reagenti, con 18 posizioni disponibili. Il vano reagenti è refrigerato tramite effetto Peltier, garantendo una temperatura di circa 10°C inferiore rispetto a quella ambientale. Una siringa ad alta precisione alloggiata su un braccio meccanico consente il campionamento dei reagenti e dei campioni.

- Cuvette di reazione: all'esterno del piatto porta campioni si trovano le cuvette di reazione. All'interno delle cuvette di reazione verranno dispensati i reagenti ed il campione prelevati dalla siringa sopra citata; qui permarranno per il tempo indicato nel metodo di lavoro fino alla lettura nella cella di flusso. La temperatura viene regolata intorno ai 50°C dal software, per ottimizzare le reazioni impostate nel metodo di lavoro.
- Colorimetro: un secondo ago collegato ad una pompa peristaltica permette il campionamento della soluzione interna alla cuvetta di reazione nella cella di flusso. Nella cella di flusso, mantenuta a temperatura controllata grazie ad un sistema di riscaldamento controllato, avviene la misurazione dell'assorbanza (O.D.), dopo aver selezionato la lunghezza d'onda a cui vogliamo effettuare la lettura, in funzione del tipo di analisi impostata.
- Lo strumento è quindi dotato di 2 campionatori automatici con sistemi a siringa, la cui capacità di prelievo è garantita grazie ad una pompa peristaltica, alloggiata sul lato destro dello strumento.
- Il braccio sinistro è funzionale al prelievo delle aliquote di campione e di reagente; il braccio destro è funzionale al prelievo delle soluzioni Campione-Reagente, e del deposito dell'aliquota nella cella di lettura.

Tutte le misure analitiche vengono intervallate da cicli di lavaggio al fine di evitare fenomeni di contaminazione

Per la quantificazione è stato utilizzato il metodo della retta di taratura, che consiste nell'effettuare misure di soluzioni standard (5) a concentrazione nota crescente.

La quantificazione si basa sull'incremento di assorbanza rilevato a fronte dell'incremento di concentrazione. Solitamente si effettuano tre repliche per ogni standard.

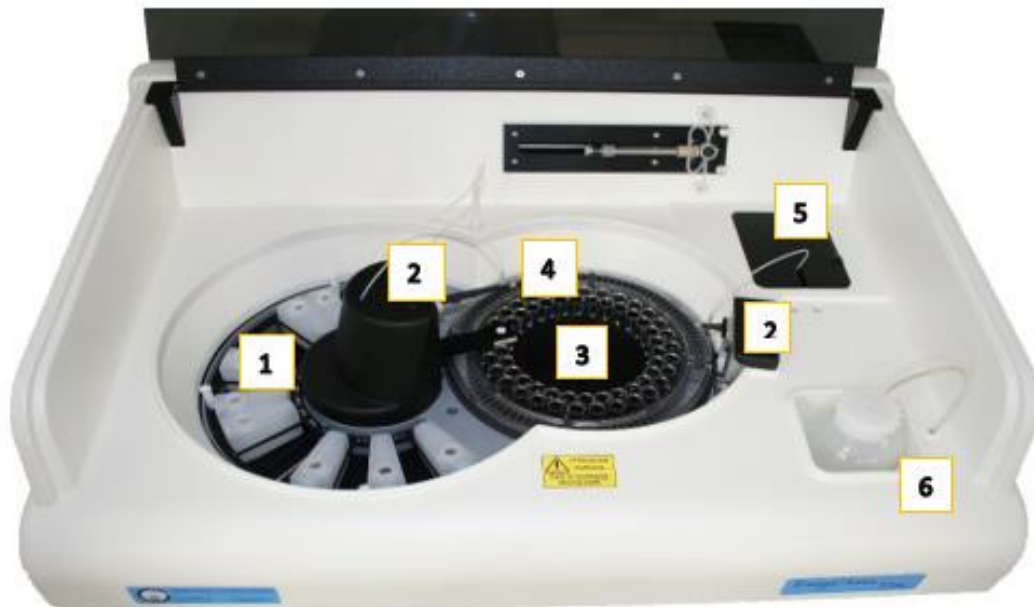


Fig. 20: EasyChemPlus; vista dall'alto. 1) Vano porta reagenti; 2) Braccia meccaniche con siringhe di prelievo; 3) Vano porta campioni; 4) Cuvette di reazione; 5) cella di lettura; 6) Acqua di lavaggio.

3.4.1.2. Metodi di determinazione nutrienti

Per ogni nutriente è stato utilizzato il metodo della retta di taratura. Sono inoltre stati calcolati i limiti di rilevabilità (LOD) ed i limiti di quantificabilità (LOQ) dello strumento, per ogni analita.

- *Nitriti – NO₂*: Ref. United States Environmental Protection Agency (EPA) Method # 354.1. Range: 0-50µg/L Il metodo consiste nel far reagire i Nitriti presenti nei campioni con la Sulfanilamide (C₆H₈N₂O₂S) in ambiente acido, generando un

composto diazoico. Con la N-(1-Naftil)Etilenediamina. Così facendo, si forma un composto color rosa. Le misurazioni colorimetriche vengono effettuate a 546nm.

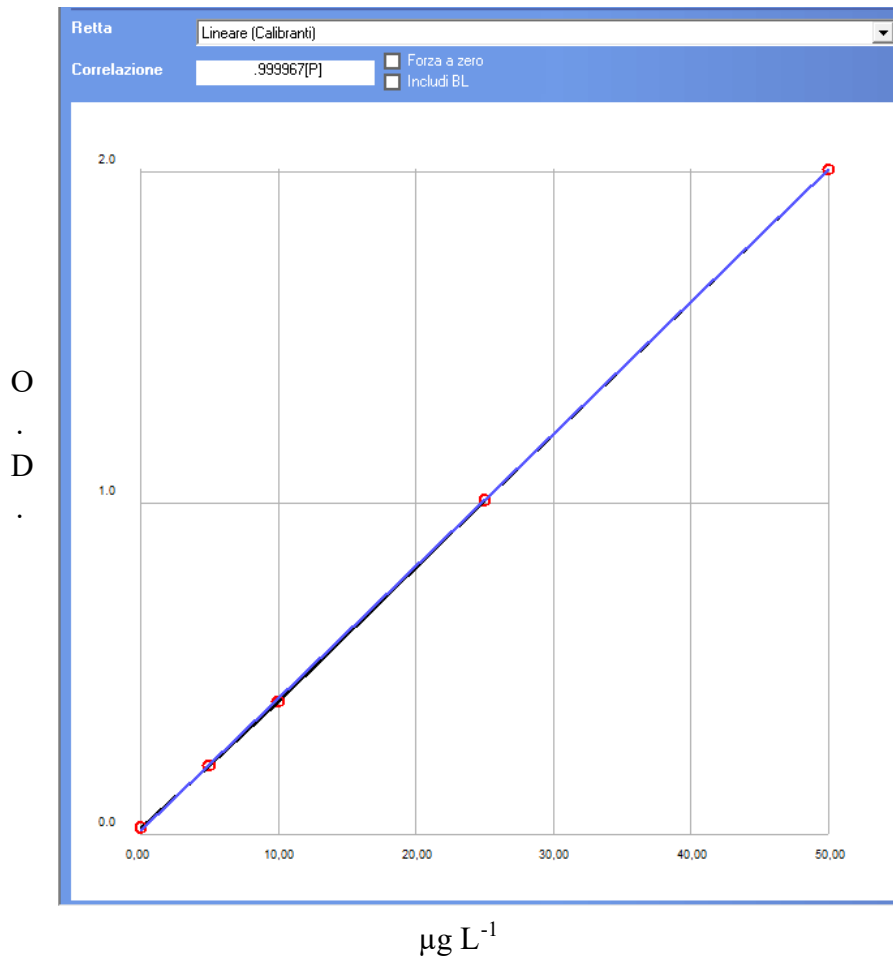


Fig. 21: retta nitriti-NO₂.. Coefficiente correlazione: 0.999967

LOD = 0.00087 µM; 0.40 µg L⁻¹

LOQ = 0.0263 µM; 1.21 µg L⁻¹

- *Nitrati* – NO₃: Ref. United States Environmental Protection Agency (EPA) Method # 354.1. Range: 0-0.1 mg L⁻¹.

Il metodo consiste nella riduzione a Nitriti tramite una soluzione acida di Cloruro di Vanadio (VCl₃). I Nitriti (NO₂) vengono fatti reagire con la Sulfanilamide

($C_6H_8N_2O_2S$) in ambiente acido, generando un composto diazoico. Con la N-(1-Naftil) Etilenediamina, reagisce formando un composto color rosa.

Questo metodo misura direttamente la concentrazione di NO_3 , in quanto la i Nitriti vengono sottratti automaticamente come parte del bianco. Le misure colorimetriche vengono effettuate a 546 nm. La totale corrispondenza con la metodica ufficiale basata sulla riduzione dei Nitrati ad opera di un catalizzatore a base di Cd o Cua viene dimostrato nella seguente pubblicazione: (Automated Nitrate (TON) Assay Method Using Vanadium as Reductant – Correlation to Cadmium and Hydrazine Reductant Methods in Sea, Natural and Waste Waters, January, 2013, [http://www.envirotech-online.com/search/articles/.](http://www.envirotech-online.com/search/articles/))

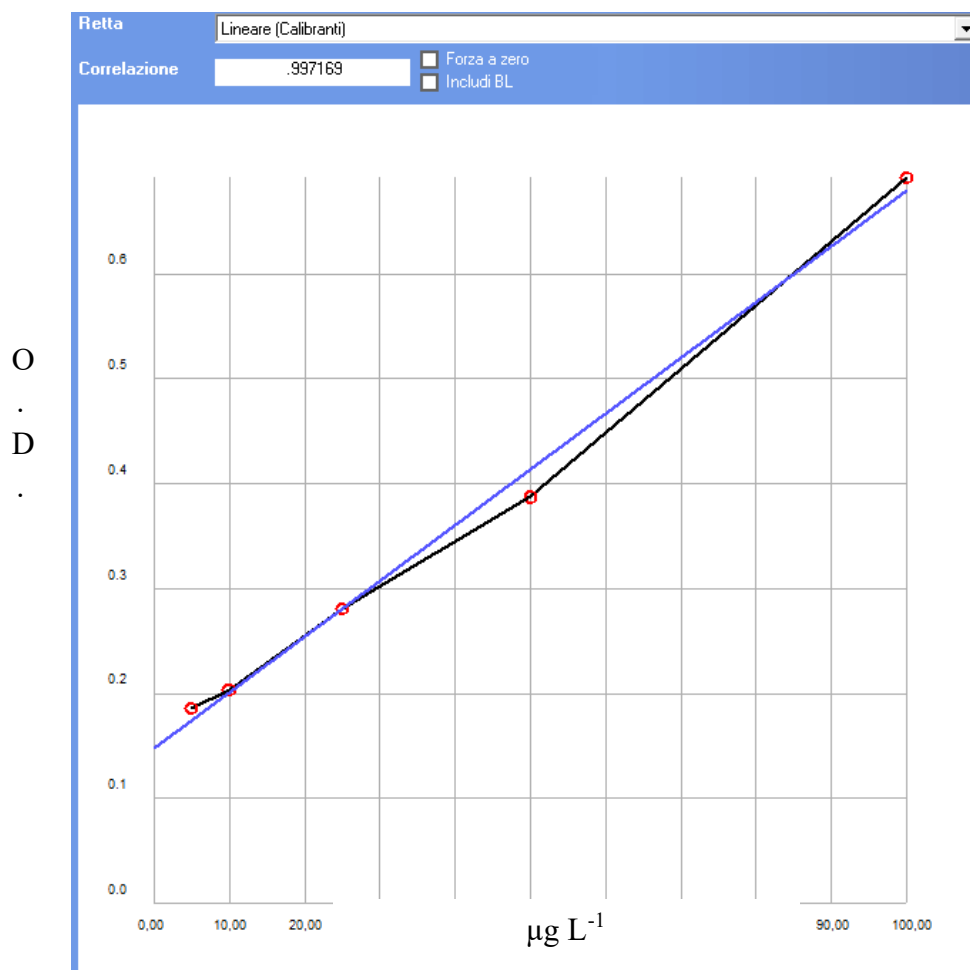


Fig. 22: retta calibrazione nitrati- NO_3 . Coefficiente correlazione: 0.991769.

LOD = 0.0838 μM ; 5.2 $\mu\text{g L}^{-1}$

LOQ = 0.2548 μM ; 15.8 $\mu\text{g L}^{-1}$

- *Azoto Ammoniacale*: metodo: Ref. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 4500 NH_3 G Automated Phenate Method.

L'ammoniaca (NH_3) reagisce in condizioni alcaline, a pH di circa 12.6, col Fenolo ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) ed Ipoclorito (ClO^-), in presenza di Nitroprussiato di Sodio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) per formare Blu Indofenolo ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_2$). L'assorbanza viene misurata a 660nm.

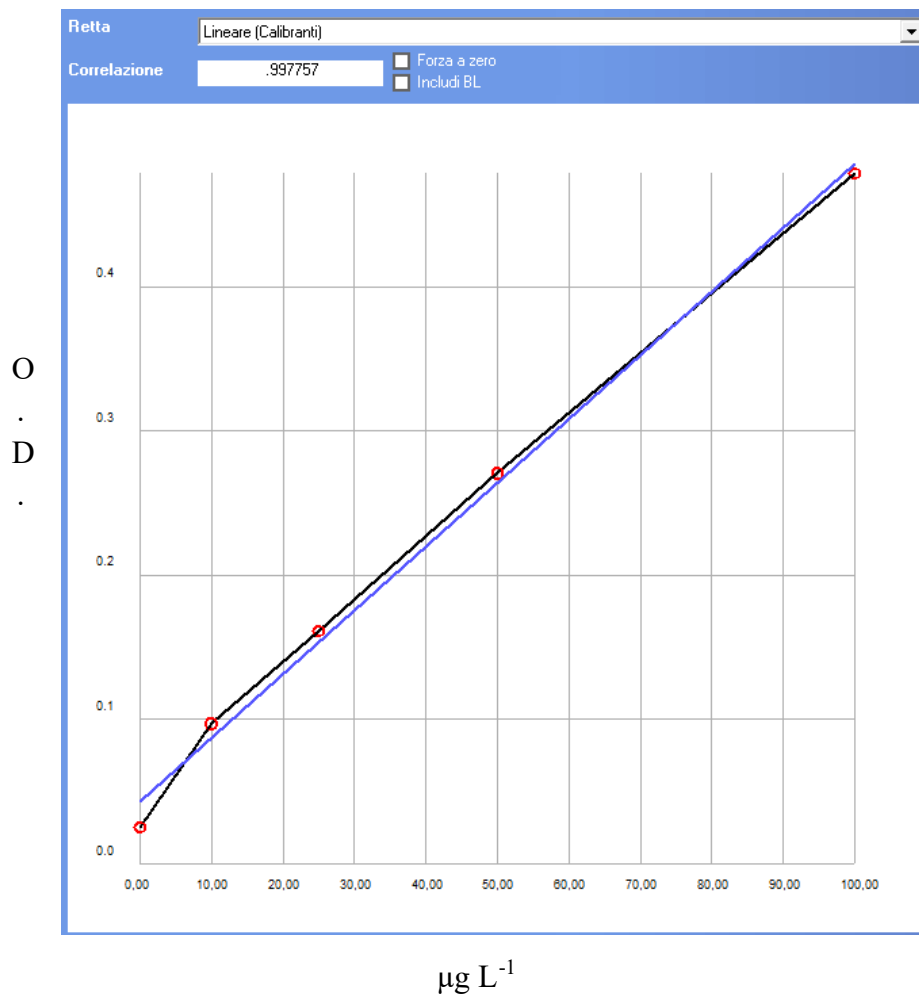


Fig. 23: retta calibrazione NH_3 . Coefficiente correlazione: 0.997757

LOD = 0.08 μM ; 1.45 $\mu\text{g L}^{-1}$

LOQ = 0.244 μM ; 4.41 $\mu\text{g L}^{-1}$.

- *Fosfati*: la misurazione prevede la determinazione degli Ortofosfati (PO_4^{3-}), in quanto unica specie chimica significativamente rilevante.

Metodo: Ref. International Standard Organization 15923.

Gli ortofosfati vengono miscelati in soluzione acida di Molibdato di Sodio (Na_2MoO_4), per produrre un poliossometallato, $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ (α -Keggin-type heteropolyoxometalates). In presenza di Antimonio per catalizzare la reazione, questo anione viene ridotto dall'Acido Ascorbico per formare lo ione β -Kegging, di colorazione blu.

La lettura spettrofotometrica avviene a 880 nm.

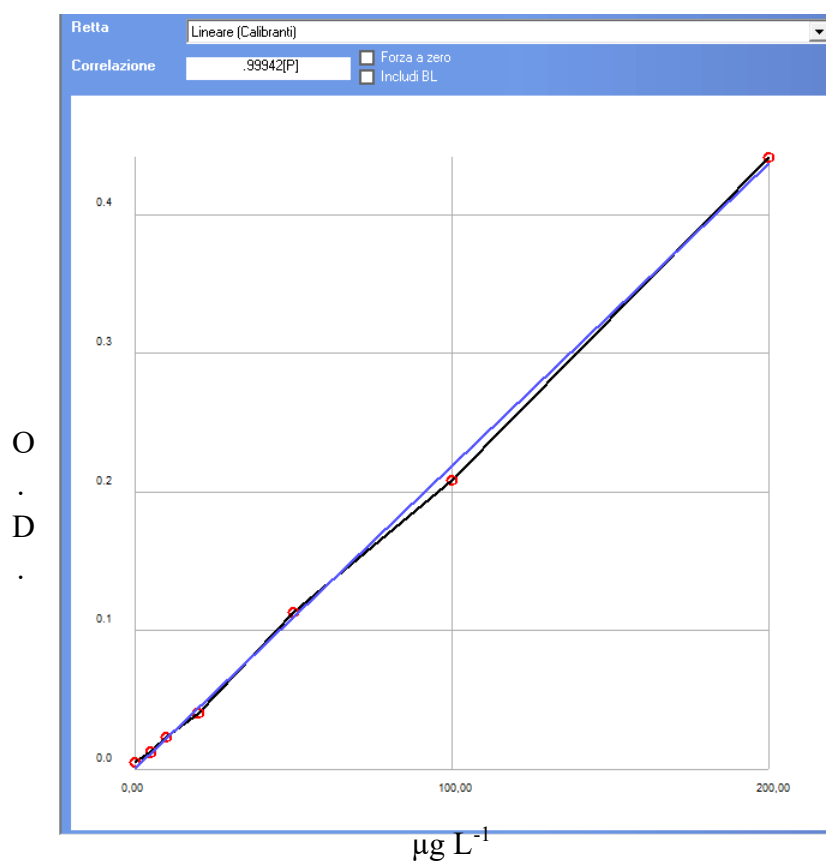


Fig. 24: retta calibrazione PO_4^{3-} . coefficiente correlazione: 0.99942

LOD = 0.035 μm ; 3.35 $\mu\text{g L}^{-1}$

LOQ = 0.107 μm ; 10.16 $\mu\text{g L}^{-1}$

- *Silicati*: Ref. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 4500 SiO₂. I silicati vengono miscelati con una soluzione acida di Molibdato di Ammonio (NH₄)₆Mo₇O₂₄ per produrre α -Keggin-type hetero-polyoxometalates SiMo₁₂O₄₀⁴⁻. Si utilizza Acido Ossalico (C₂H₂O₄) per mascherare l'interferenza dei fosfati. Questo anione viene poi ridotto dall'acido ascorbico per formare lo ione β -Keggin, di colorazione blu. La lettura spettrofotometrica viene effettuata a 880nm.

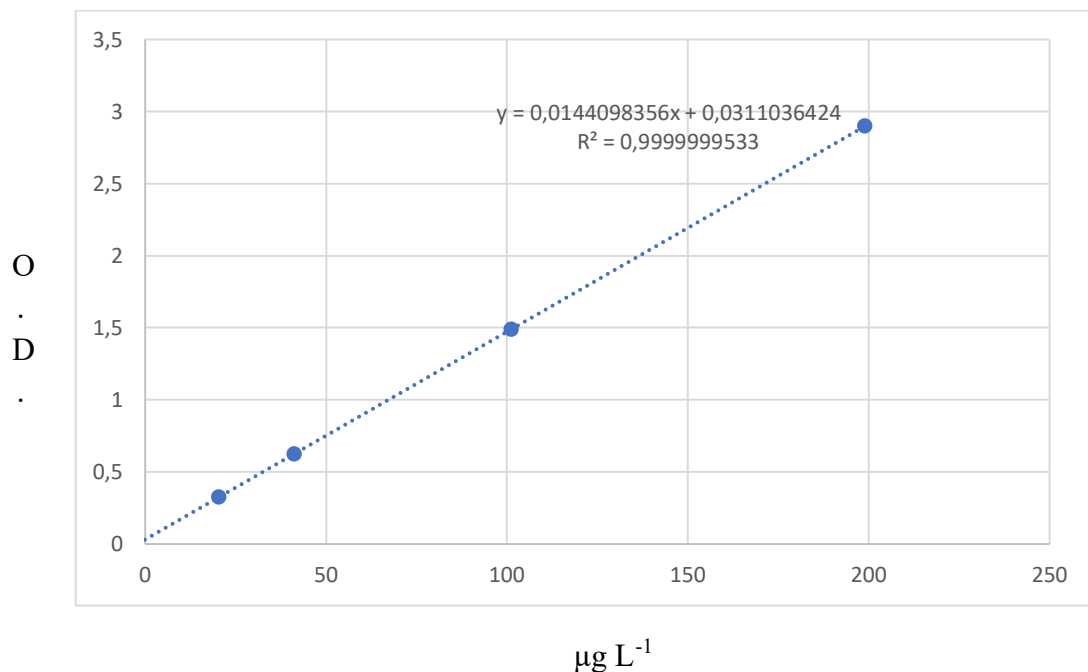


Fig. 25: retta calibrazione SiO₂. Coefficiente correlazione: 0.99999.

LOD = 0.0366 μm ; 2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$

LOQ = 0.1117 μm ; 6.71 $\mu\text{g L}^{-1}$

3.5.0. Digestione campioni

Per la determinazione dei nutrienti totali è stato utilizzato il metodo della digestione con persolfato (Langner and Hendrix, 1982), in autoclave a 120°C.

La procedura di digestione prevede le seguenti fasi:

- Filtrazione del campione tramite setto poroso 0.45 µm;
- Prelievo di 5 ml di acqua-campione ed inserimento in una provetta Pyrex di capienza 7 ml. Per ciascun campione, per ridurre la contaminazione, provetta e puntale utilizzato vengono avvinati con un'aliquota del campione
- Aggiunta di 0.7 ml di reagente di digestione;
- Copertura delle provette-campione con un tappo in foglio d'alluminio;
- Inserimento delle provette campione in un beker in vetro Pyrex e copertura del becker contenente le provette con un ulteriore foglio d'alluminio, per prevenire la possibilità di infiltrazione dell'acqua contenuta nell'autoclave nel campione.
- Inserimento in autoclave per 45 minuti a 120°C;
- Una volta digeriti i campioni, vengono lasciati raffreddare e successivamente conservati in frigorifero a 4°C.
- Le analisi sui campioni digeriti devono essere effettuate entro 28 giorni dalla digestione.

La determinazione quantitativa viene effettuata tramite il colorimetro SYSTEA - EasyChemPlus, con il metodo dei Fosfati (Ref. International Standard Organization 15923).

Nei risultati è stato considerato il fattore di diluzione 14% dovuto al reattivo di digestione (persolfato).

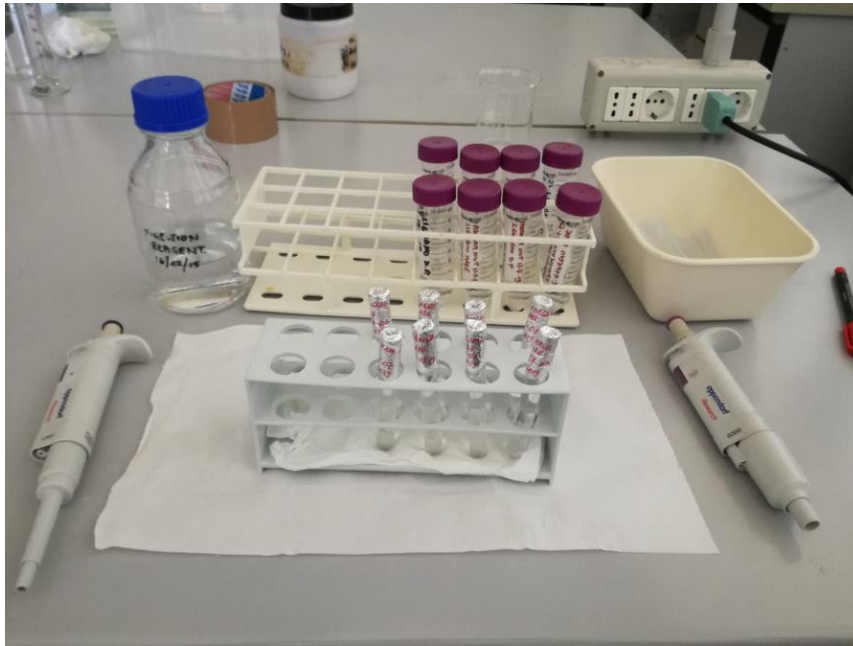


Fig. 26: Campioni pronti per la digestione in autoclave.

Per la digestione dei nutrienti, funzionale all'analisi delle frazioni totali di N e P (DIN e DIP) e di conseguenza delle frazioni organiche, è stata utilizzata l'autoclave da banco 760 – ASAM s.r.l.



Fig. 27: Autoclave 760

3.6.0. Attività Fosfatasica – PMEase

La determinazione dell'attività fosfatasica viene effettuata per l'enzima fosfomonoesterasi (PMEase), tramite una modificazione funzionale allo scopo della tesi del metodo di Turner et. al (2001).

Il saggio viene effettuato sul campione fresco, nel minor tempo possibile dal momento del prelievo del campione, per minimizzare i possibili fenomeni di alterazione dello stesso.

Il saggio si effettua sul particolato ritenuto dalla filtrazione di 1L di acqua di mare tramite un filtro a porosità $0.45\mu\text{m}$ in nitro-cellulosa.

Dopo la filtrazione, in una provetta in vetro da 15ml vengono aggiunti 4.32ml di acqua marina filtrata ed il filtro, il quale deve essere completamente immerso nell'acqua marina.

Successivamente, per la misura della PMEase sono stati aggiunti 0.18 ml di para-nitrophenyl-phosphate (pNPP) $1000\ \mu\text{M}$, il quale in presenza della fosfatasi porta alla formazione di p-nitrofenolo (NP) e fosfato inorganico (Pi).

Aggiunto il substrato pNPP si dispongono poi le provette-campione in un agitatore a bagnetto, a temperatura controllata di 25°C , per un'ora.

Allo scadere dell'ora, più velocemente possibile, si leggono i valori di assorbanza allo spettrofotometro uv-visibile, a lunghezza d'onda di 405nm, al fine di determinare la concentrazione di p-nitrofenolo (NP) nel surnatante.

Le cuvette utilizzate per la lettura spettrofotometrica dell'attività dell'enzima PMEase sono in materiale plastico, con un cammino ottico di 10 mm ed una capienza volumetrica massima di 1.5 ml.

La concentrazione di p-nitrofenolo (espressione dell'attività fosfatasica) per unità di tempo (1 ora) è stata espressa in rapporto al volume di campione filtrato come $\mu\text{mol NP L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ tramite il metodo della retta di taratura, rapportando la retta ai valori determinati dalle analisi quantitative.

Retta di taratura – PMEase:

Per determinare i valori dell'attività enzimatica dell'enzima PMEase sulla base delle misure di assorbanza rilevate, è stata realizzata la seguente retta di taratura (fig. 28).

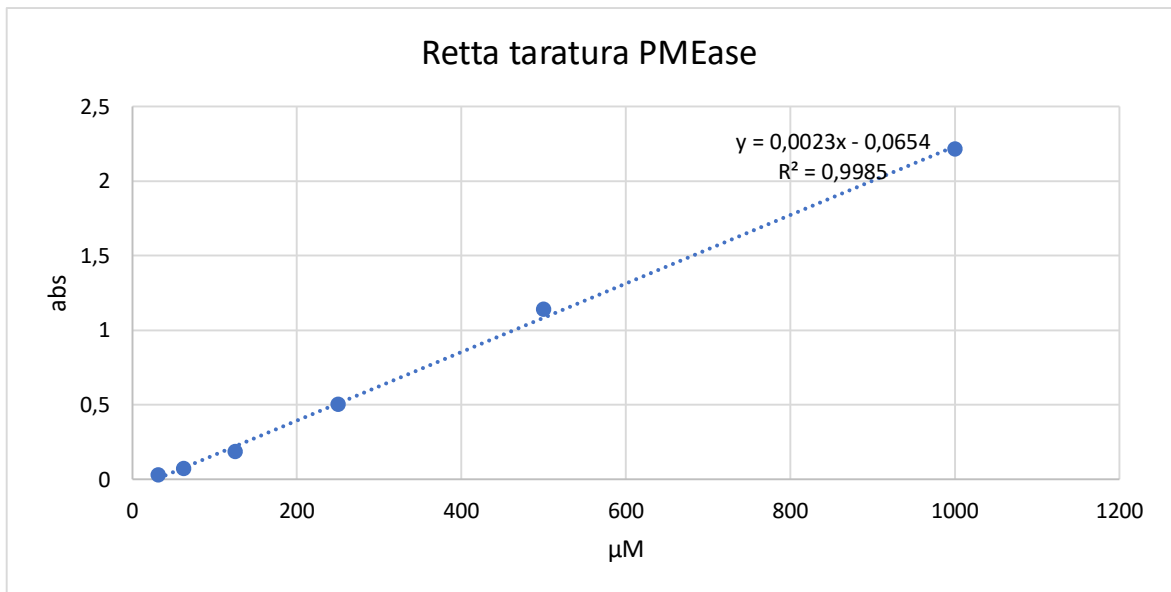


Fig. 28: retta calibrazione PMEase.

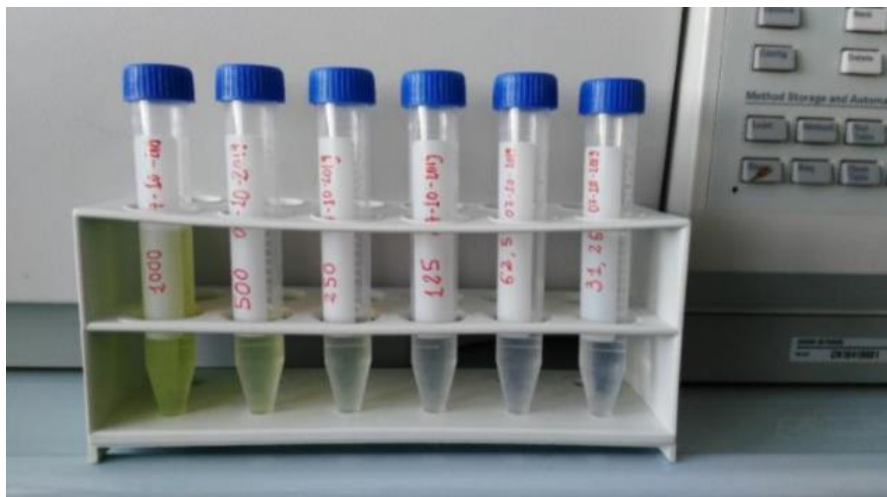


Fig. 29: Soluzioni standard di PMEase. Le 5 diluizioni seriali, partendo dal 1000 µM: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1.0. Validazione metodologia analitica: effetto della filtrazione del campione

Al fine di investigare le migliori metodologie di analisi dei nutrienti è stata valutata la differenza in concentrazione misurata dallo strumento (SYSTEAs-EasyChemPlus) dei vari parametri (NO_3 , NO_2 , NH_4 , PO_4 , SiO_2) tra campioni sottoposti a filtrazione ($0.45 \mu\text{m}$) e campioni non filtrati, per valori di torbidità basse (4 NTU e 4.8 NTU).

I valori riportati nella seguente tabella indicano la media della concentrazione molare ottenuta su tre repliche. L'ammoniaca (NH_4) mostra valori sempre al di sotto del LOD ($< 0.08 \mu\text{M}$).

Tab. 8: confronto campioni filtrati e non filtrati, NTU < 5 .

Data	NTU	NO_3	NO_2	PO_4	Ptot	SiO_2
E1 Filtrato	4	42.2 ± 1.2	10.45 ± 1.3	0.6 ± 0.2	18.3 ± 2.3	11.4 ± 0.4
E1 Non filtrato		44.6 ± 4.3	11.25 ± 0.4	0.9 ± 0.3	20.8 ± 2.6	12.9 ± 0.0
E2 Filtrato	4.83	44.4 ± 7.1	10.6 ± 0.7	0.1 ± 0.2	26.7 ± 0.4	10.6 ± 0.9
E2 non filtrato		46.1 ± 4.4	10.2 ± 0.0	0.2 ± 0.3	25.7 ± 1.9	9.6 ± 2.2

Dai risultati emersi, per valori di torbidità basse, la filtrazione, pur se consigliata, non risulta portare significativi vantaggi ai fini analitici. Tuttavia, i campioni analizzati sono stati comunque filtrati preventivamente a $0.45 \mu\text{m}$.

4.1.1. Validazione metodologia analitica: effetto della conservazione del campione

Per alcuni campioni della costa anconetana sono state analizzate le concentrazioni di DIN subito dopo lo scongelamento ed a 22 e 25 giorni di distanza dallo stesso.

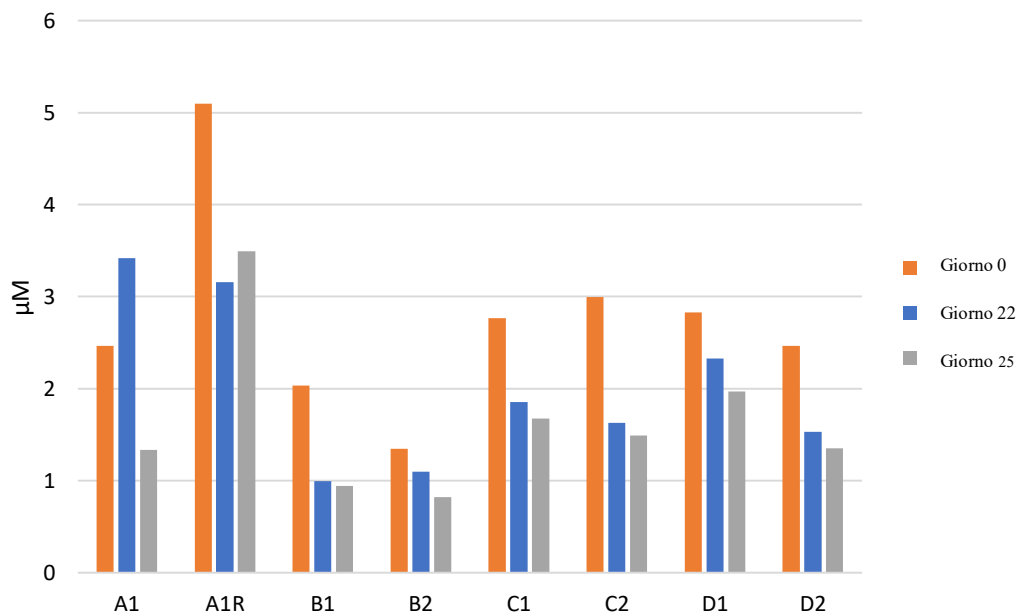


Fig. 30: variazione DIN nel tempo.

Le concentrazioni di DIN mostrano, ad eccezione di A1 ed A1R, un calo in concentrazione col passare del tempo rispetto al giorno di campionamento, dovuta con ogni probabilità alla trasformazione delle specie chimiche presenti, tramite reazioni ossidative ed attività microbica.

Dai risultati si evince come le analisi dei nutrienti debbano essere effettuate nel minor tempo possibile (48 h), onde evitare alterazioni delle specie chimiche presenti.

4.2.0. Livelli di nutrienti in alto Adriatico

I risultati sono espressi in concentrazione μM ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Le caratteristiche e l'ubicazione dei siti sono descritte nel capitolo 3.1.1. e tramite le figure 5, 6 e 7.

4.2.1. Nitrati

Nei siti dell'alto Adriatico, le concentrazioni di nitrati – NO_3 risultano maggiori di circa un ordine di grandezza nei depuratori (fig. 31) rispetto a quelle riscontrate in ambiente marino (fig. 32), dovuto al fattore di diluizione del corpo idrico. Le concentrazioni determinate non eccedono in nessun caso il valore limite di legge di 20 mg L^{-1} (D. Lgs 152/2006).

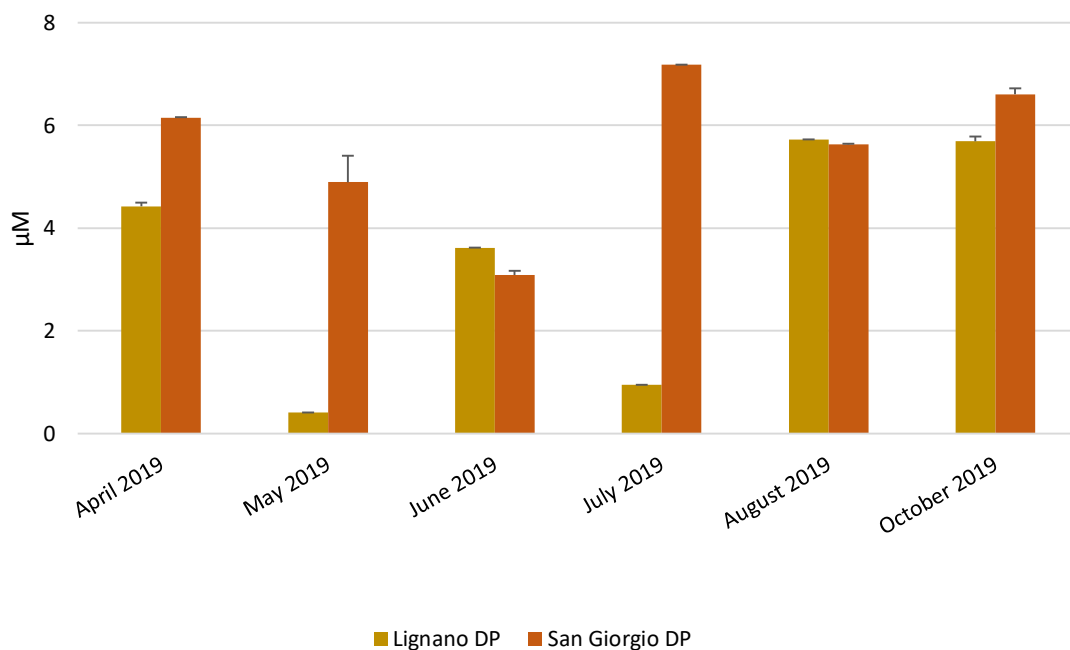


Fig. 31: concentrazioni NO_3 nei depuratori di Lignano e San Giorgio.

Nei siti DP (depuratore) le concentrazioni variano da un minimo di 0.41 μM (Lignano DP, maggio 2019) ad un massimo di 7.18 μM (San Giorgio DP, luglio 2019). Si nota un calo nella prima parte della stagione balneare (aprile – maggio – giugno) ed un incremento nella seconda parte (luglio – agosto – ottobre), con valori generalmente più alti nei depuratori di San Giorgio rispetto a quelli di Lignano.

Nei mesi maggio e giugno i valori riscontrati nel sito Lignano DP sono notevolmente inferiori rispetto a quanto riscontrato nel sito San Giorgio DP, diversamente dagli altri mesi nei quali la differenza di concentrazione è lieve.

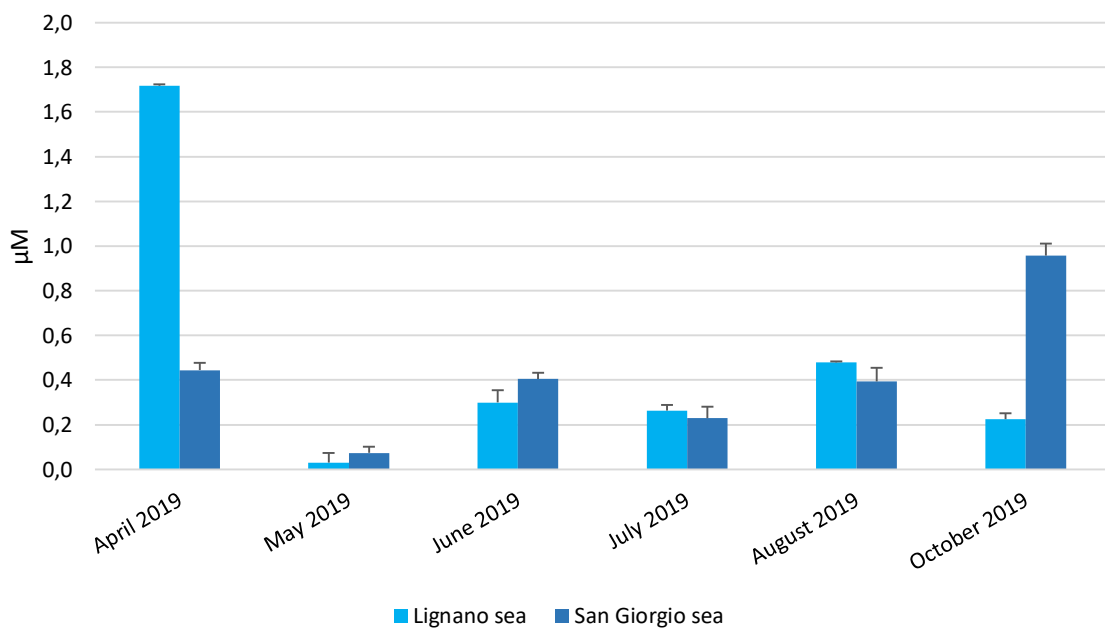


Fig. 32: concentrazione NO₃ in ambiente marino nei siti Lignano sea e San Giorgio sea.

In mare (fig. 32) I valori determinati mostrano un'ampia variabilità, oscillando da un minimo di 0.074 μM (Lignano sea, maggio 2019) ad un massimo di 1.72 μM (Lignano sea, aprile 2019). Nel sito S.Giorgio sea le concentrazioni aumentano nella seconda parte della stagione

(agosto – ottobre). I dati sono in accordo con i valori riscontrati nella letteratura riguardante l'alto Adriatico (tab. 3).

4.2.2. Nitriti

I nitriti – NO₂ mostrano valori più alti, di circa un ordine di grandezza, nei siti depuratore (fig. 33) rispetto quelli in ambiente marino (fig. 44), dovuto al fattore di diluizione del corpo idrico. Sia nei siti sea che nei siti DP, le concentrazioni determinate non eccedono il valore limite di legge per le acque reflue depurate di 0.6 mg L⁻¹ (D. Lgs 152/2006).

Nei siti DP (fig. 33), le concentrazioni di NO₂ determinate nel depuratore di Lignano sono superiori in ogni mese a quelle riscontrate nel sito San Giorgio.

Si nota un incremento in concentrazione nella prima parte della stagione balneare (maggio, giugno e luglio), dovuto ad un aumento nel quantitativo di refluo trattato, in particolar modo per Lignano in quanto località turistica, le quali concentrazioni rimangono comprese tra 2 µM e 3.15 µM. Nella seconda parte della stagione (agosto ed ottobre) si registra un calo nei livelli di NO₂ nel sito di Lignano, dove le concentrazioni passano da 1.19 µM (agosto 2019) a 0.63 µM (ottobre 2019).

Il sito San Giorgio mostra un andamento simile a quello di Lignano, con un incremento nella prima parte della stagione (aprile – maggio), un calo nella parte centrale (giugno – luglio) ed un ulteriore incremento e diminuzione nei mesi di agosto ed ottobre, pur se i livelli di concentrazione sono inferiori.

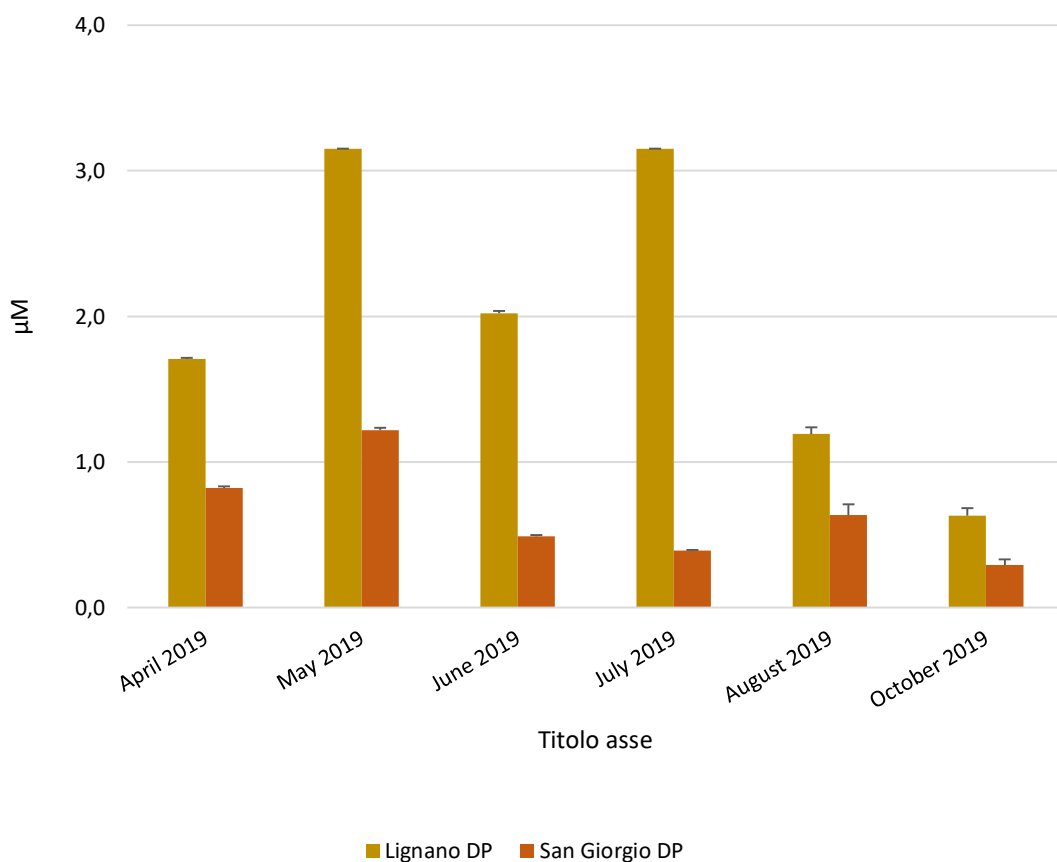


Fig. 33: concentrazione NO₂ nei siti Lignano DP e San Giorgio DP

Nei siti sea (fig. 34) le concentrazioni di NO₂ oscillano da un minimo di 0.12 µM (San Giorgio sea, Luglio 2019) ad un massimo di 0.22 µM (San Giorgio sea, Agosto 2019). Le concentrazioni di NO₂ nell'arco della stagione balneare non mostrano particolare variabilità. I dati sono in accordo con i valori riscontrati in letteratura riguardante l'alto Adriatico (tab. 3).

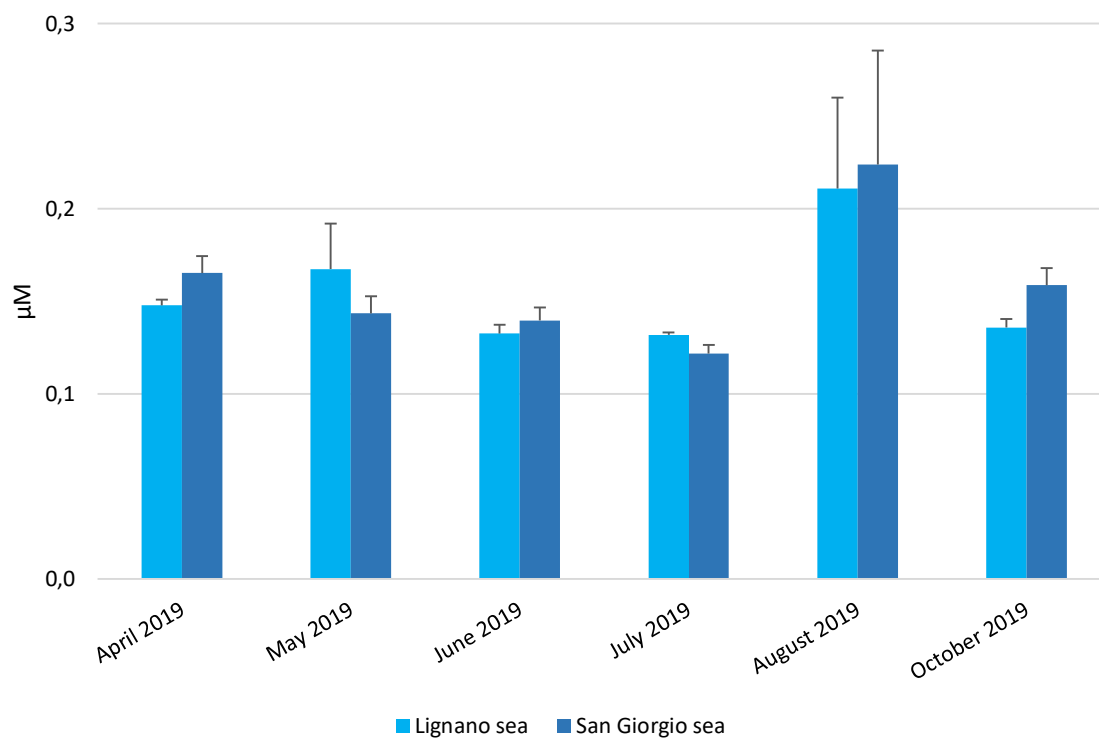


Fig. 34: concentrazioni NO₂ nei siti Lignano sea e San Giorgio sea.

4.2.3. Azoto ammoniacale

I valori di NH_4^+ determinati mostrano concentrazioni maggiori nei siti DP (fig. 35) rispetto a quelli rinvenuti in ambiente marino (fig. 36), di circa un ordine di grandezza. Sia nei siti sea che DP i valori rimangono ben al di sotto del valore limite di legge per le acque reflue depurate di 15 mg L^{-1} (D. Lgs 152/2006).

Nei siti DP (fig. 35), le concentrazioni di NH_4^+ oscillano da valori prossimi allo $0 \text{ } \mu\text{M}$ (Lignano DP, agosto 2019; Lignano DP, aprile 2019) ad un massimo di $53 \text{ } \mu\text{M}$ (San Giorgio DP, giugno 2019). Nei due depuratori emergono differenze significative nelle concentrazioni riscontrate per singolo campionamento, le quali risultano nettamente maggiori presso il depuratore di San Giorgio, probabilmente dovuto alla differenza di tipologia del refluo in ingresso, descritte nel capitolo 3.1.1.

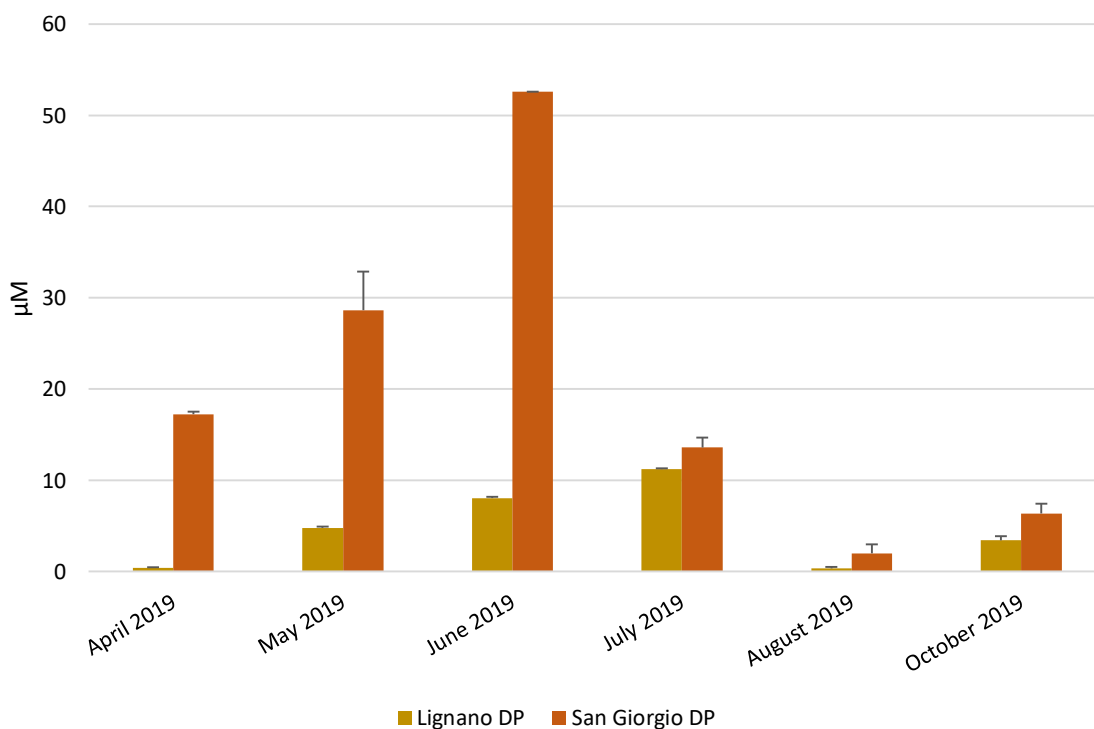


Fig. 35: concentrazioni NH_4^+ nei siti DP di Lignano e San Giorgio.

Le concentrazioni di NH_4^+ in ambiente marino (fig. 36) oscillano da valori al di sotto del LOD, $< 0.08 \mu\text{M}$ (Lignano sea, maggio 2019) ad un massimo di $0.68 \mu\text{M}$ (San Giorgio sea, giugno 2019) mostrando un incremento in concentrazione nella seconda parte della stagione estiva. I dati sono in accordo con i valori riscontrati in letteratura riguardante l'alto Adriatico (tab. 3).

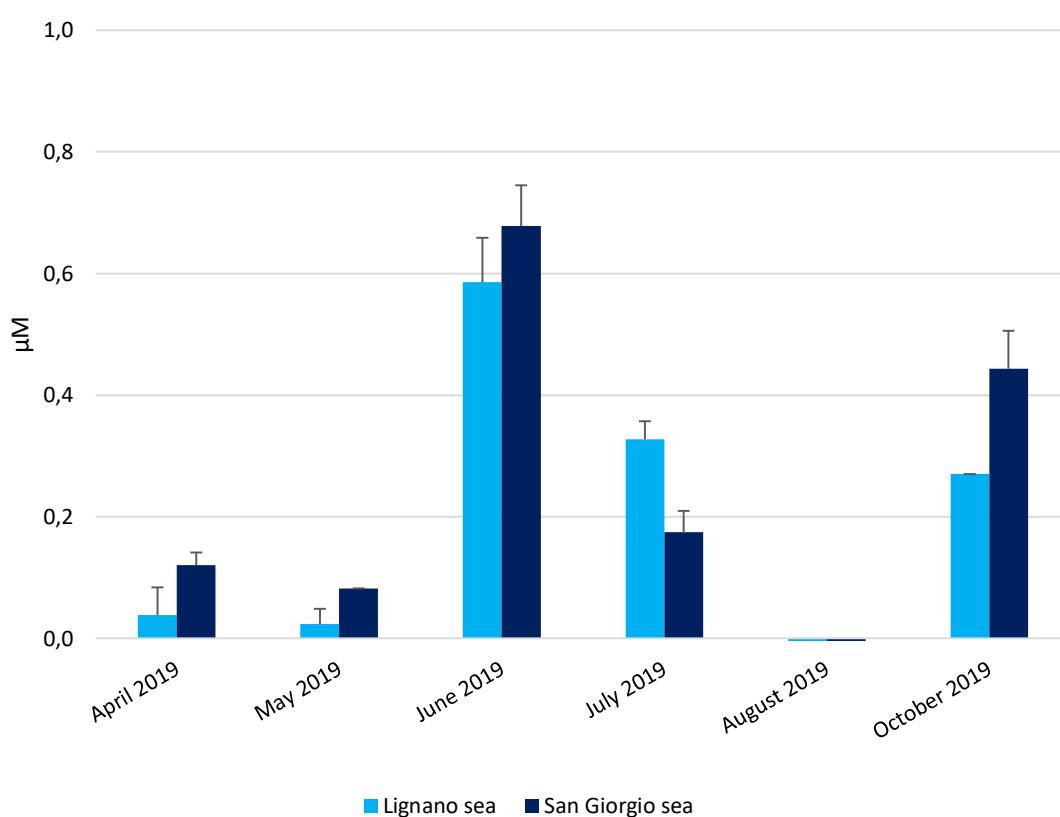


Fig. 36: concentrazioni NH_4^+ in ambiente marino nelle stazioni Lignano e San Giorgio.

4.2.4. Silicati

Le concentrazioni di silicati nei depuratori mostrano valori maggiori di circa un ordine di grandezza rispetto a quanto riscontrato in ambiente marino, come evidente dalla fig. 37.

Nei siti DP le concentrazioni di SiO_2 riscontrate rimangono costanti a $3.85 \mu\text{M}$ per tutti i siti (fig. 37).

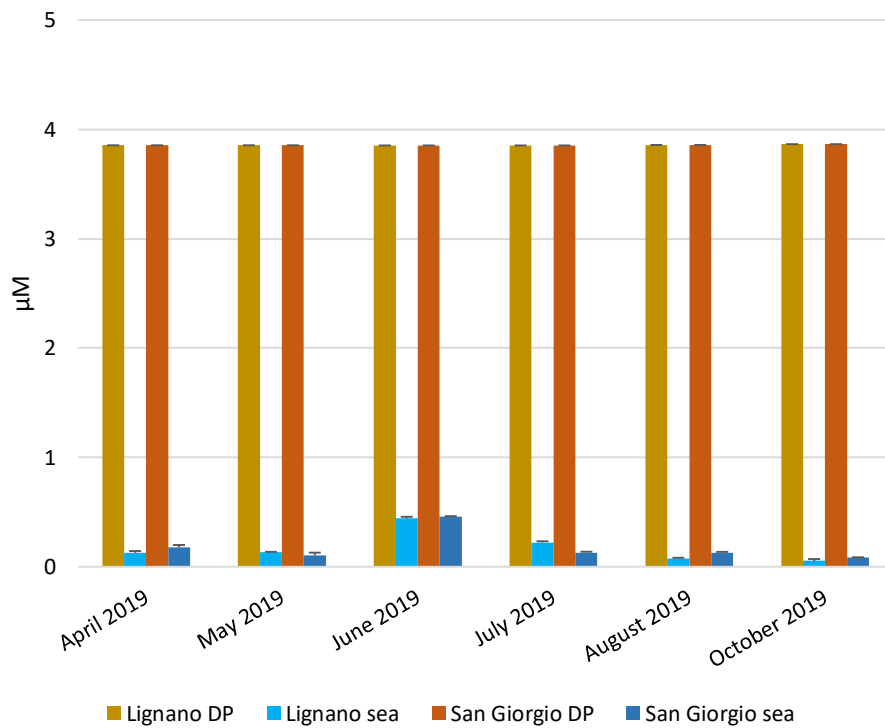


Figura 37: concentrazione di SiO_2 in tutti i siti del nord Adriatico nell'arco della stagione balneare.

In ambiente marino (fig. 38) le concentrazioni di SiO_2 evidenziano una maggior variabilità rispetto ai valori riscontrati nei siti DP. I valori oscillano da un minimo di $0.08 \mu\text{M}$ (Lignano sea, ottobre 2019) ad un massimo di $0.46 \mu\text{M}$ (San Giorgio sea, giugno 2019), mostrando un decremento nelle concentrazioni nella seconda parte della stagione. Non risultano tuttavia differenze rilevanti tra i due siti.

I dati sono in accordo con la letteratura riguardante l'alto Adriatico (tab. 3).

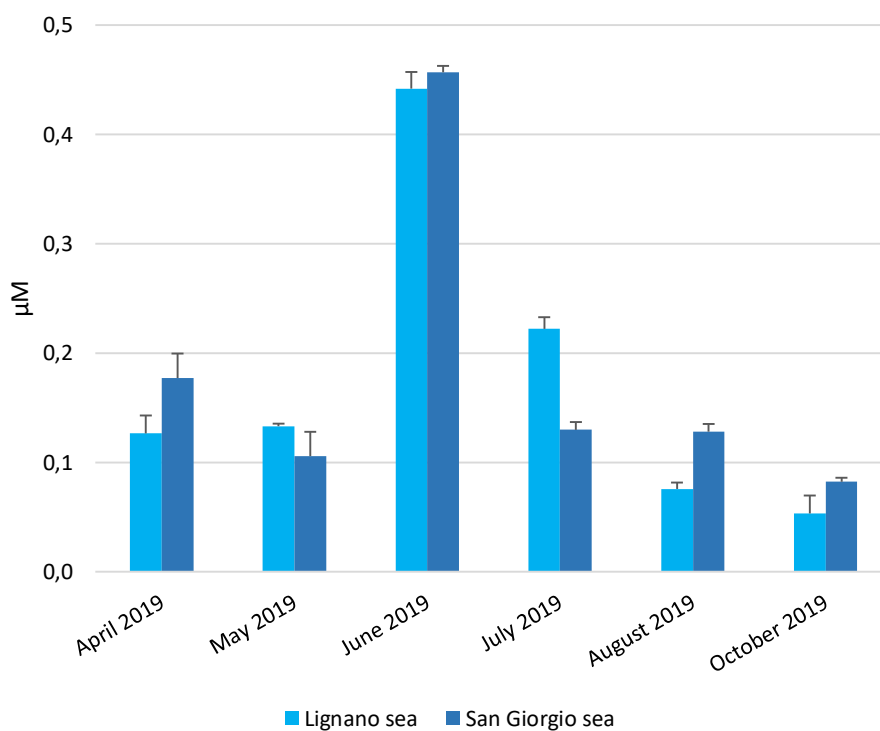


Fig. 38: concentrazione SiO_2 in ambiente marino.

4.2.5. DIP

Le concentrazioni di P inorganico subiscono una drastica riduzione in ambiente marino, di circa 2 ordini di grandezza (fig. 39).

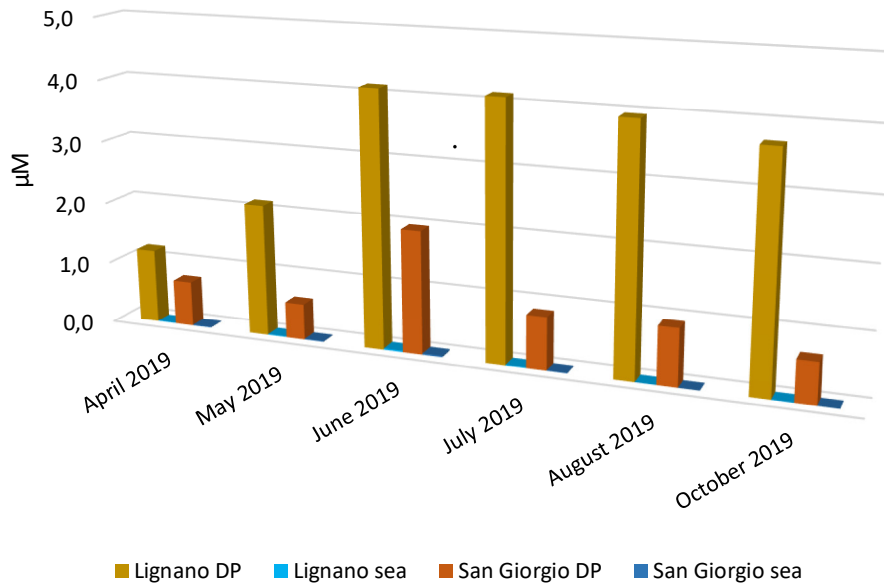


Fig. 39: concentrazioni di P inorganico nei siti DP e sea

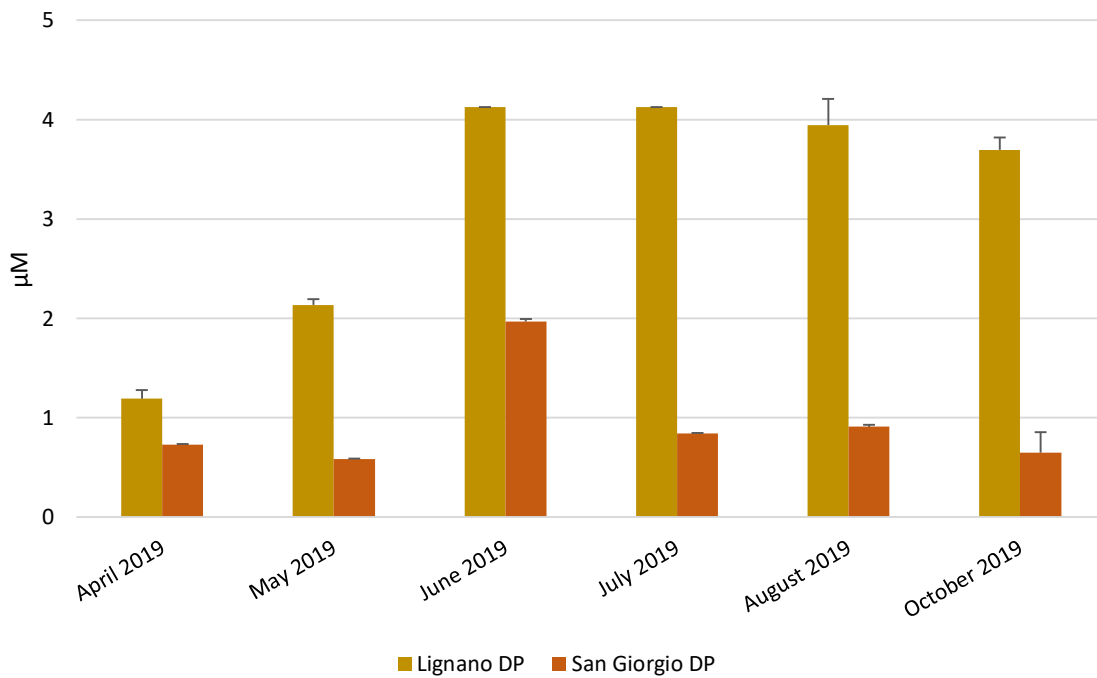


Fig. 40: concentrazioni di P inorganico nei depuratori

Nei depuratori (Fig. 40) le concentrazioni variano da un minimo di 0.58 μM (San Giorgio DP, maggio 2019) ad un massimo di 4.13 μM (Lignano DP, giugno 2019). I due siti presentano andamenti differenti, il sito Lignano DP mostra un incremento delle concentrazioni di DIP lungo la stagione, mentre San Giorgio DP mostra un andamento pressoché stabile (concentrazioni comprese tra 0.6 μM e 0.9 μM) ad eccezione del mese di giugno 2019, dove le concentrazioni raddoppiano raggiungendo il valore di 1.9 μM .

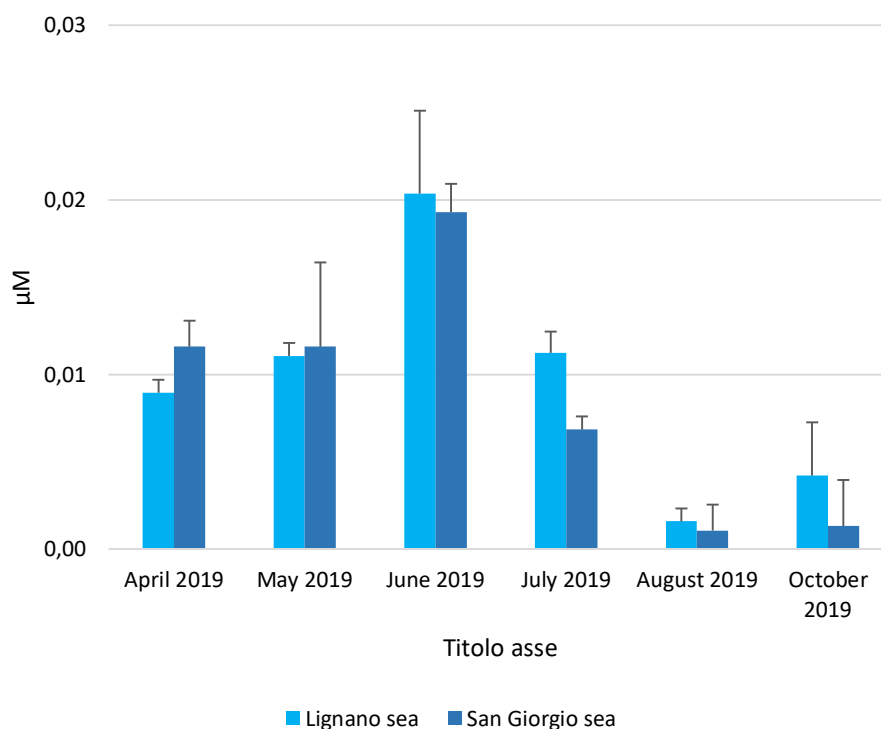


Fig. 41: concentrazioni DIP in ambiente marino.

In ambiente marino (Fig. 41) le concentrazioni di DIP restano sempre inferiori a 0.2 μM . I due siti mostrano lo stesso andamento a campana, con un incremento durante la prima parte della stagione (aprile – giugno) che raggiunge il massimo a giugno ed un decremento nella seconda parte (luglio – ottobre). I dati sono in accordo con la bibliografia riguardante l'alto Adriatico (tab. 3).

4.2.6. DOP

Le concentrazioni di DOP calano di circa un ordine di grandezza passando dal depuratore (fig. 42) all'ambiente marino (fig. 43), dovuto al fattore di diluizione del corpo idrico.

Nei due depuratori le concentrazioni di DOP mostrano andamenti differenti (fig. 42).

I valori oscillano da un minimo di 0.66 μM (San Giorgio DP, Maggio 2019) ad un massimo di 4.72 μM (Lignano DP, Ottobre 2019). I siti Lignano mostrano valori maggiori rispetto ai siti San Giorgio in ogni campione, probabilmente dovuto alla differenza nella tipologia di refluo trattato. Nei siti Lignano si nota un incremento nelle concentrazioni lungo la prima parte della stagione, per poi stabilizzarsi a 4.71 μM nei mesi di giugno, luglio, agosto ed ottobre. Nei siti San Giorgio i valori sono più variabili, mostrando un picco in concentrazione per il mese di luglio ed un trend discendente nella seconda parte della stagione.

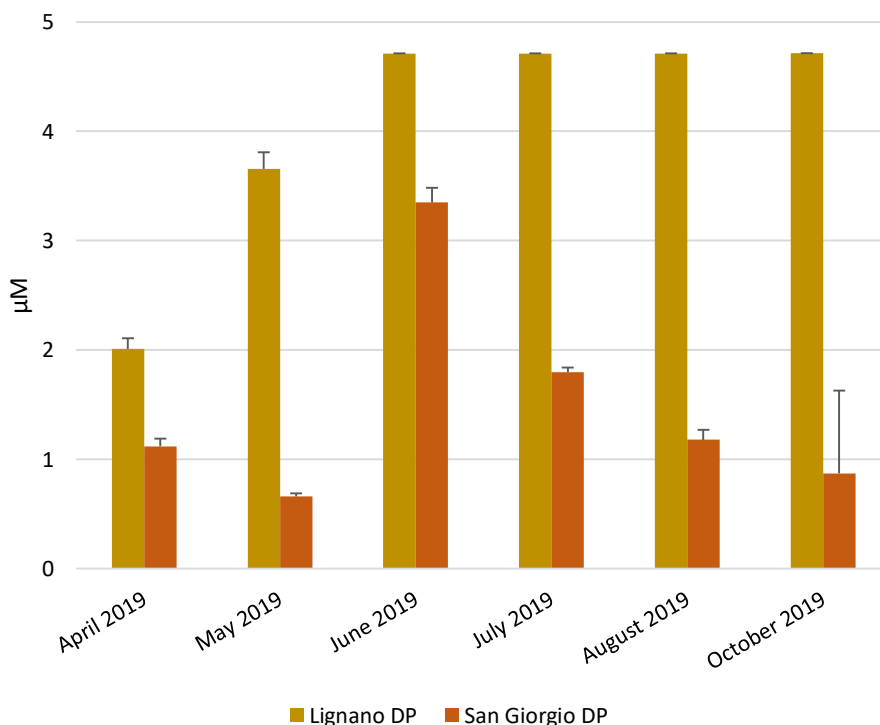


Fig. 42: concentrazioni DOP nei siti DP.

In ambiente marino (fig. 43) i valori riscontrati sono inferiori di circa un ordine di grandezza rispetto ai siti DP. I valori oscillano da un minimo di 0.13 μM (San Giorgio sea, ottobre 2019) ad un massimo di 0.50 μM (San Giorgio sea, luglio 2019). Le concentrazioni di DOP subiscono un incremento nella prima metà della stagione, raggiungendo un picco nei mesi di giugno e luglio e calano nella seconda parte della stagione (agosto – ottobre). Non si notano differenze significative nei due siti. I valori determinati sono in accordo con la letteratura riguardante l'alto Adriatico (tab. 3).

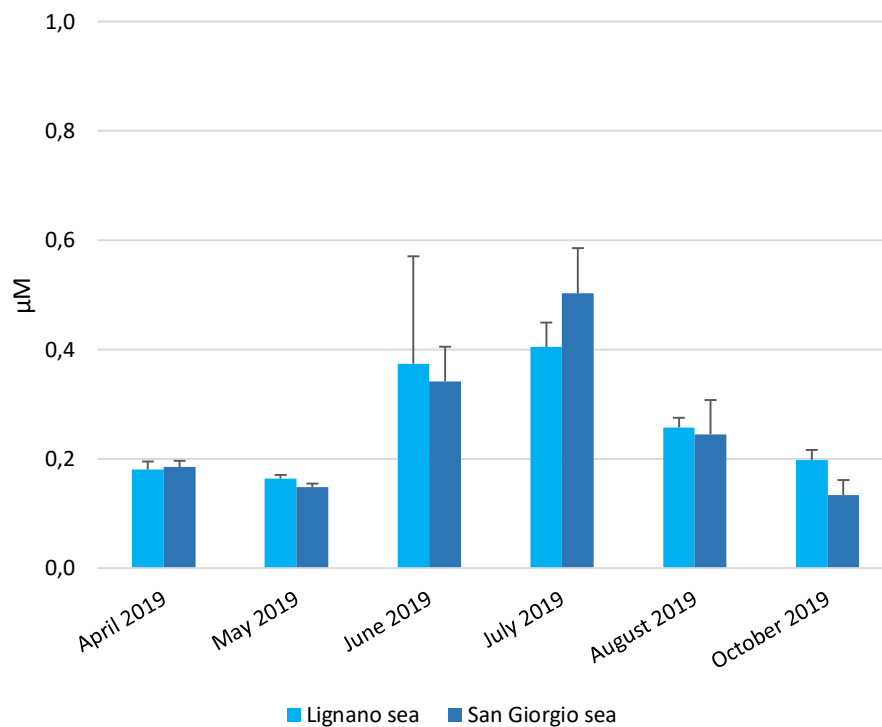


Fig. 43: concentrazioni DOP in ambiente marino.

4.2.7. Distribuzione DIP/DOP

Nei depuratori (fig. 44 e 45) le concentrazioni di DOP rappresentano la minor frazione percentuale del P totale, oscillando da un minimo del 12% (San Giorgio DP, maggio 2019; Lignano DP, giugno - luglio 2019) ad un massimo di 53% (San Giorgio DP, luglio 2019). Il depuratore di San Giorgio presenta concentrazioni di DOP maggiori rispetto a Lignano, probabilmente dovute alla differente composizione del refluo in ingresso. L'elevata percentuale di DIP rispetto al DOP nei depuratori è dovuta al fatto che la frazione organica rimane maggiormente adesa ai flocculi e grani presenti, ed essendo le analisi effettuate solamente sulla frazione disciolta, non viene quantificato il reale contributo del DOP presente.

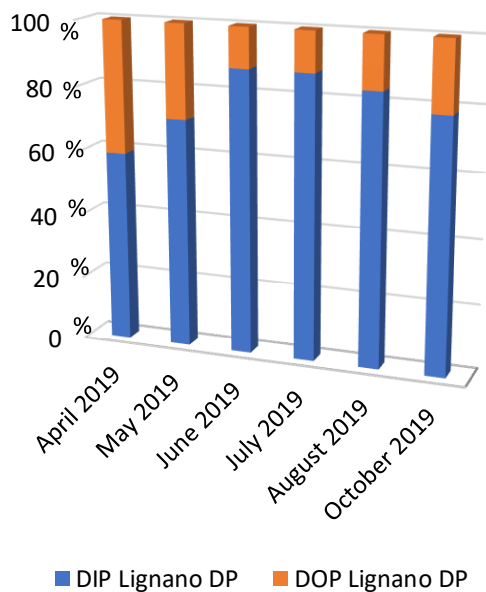


Fig.44: DIP/DOP in Lignano DP.

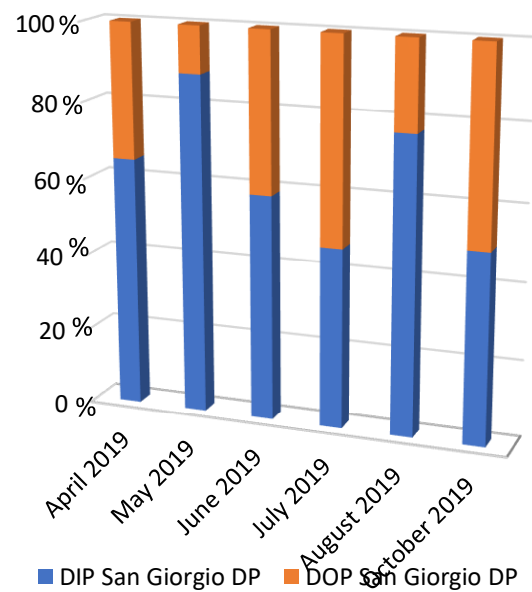


Fig. 45: DIP/DOP in San Giorgio DP.

In ambiente marino (fig. 46 e 47) il quantitativo di DOP rispetto al Ptot è nettamente maggiore rispetto a quanto riscontrato nei depuratori, oscillando da un minimo del 92% a massimi di oltre il 99%.; ciò è dovuto prevalentemente al contributo di sostanza organica derivante dagli apporti fluviali. I due siti mostrano gli stessi andamenti, raggiungendo il picco minimo a maggio per poi aumentare progressivamente verso la fine della stagione estiva.

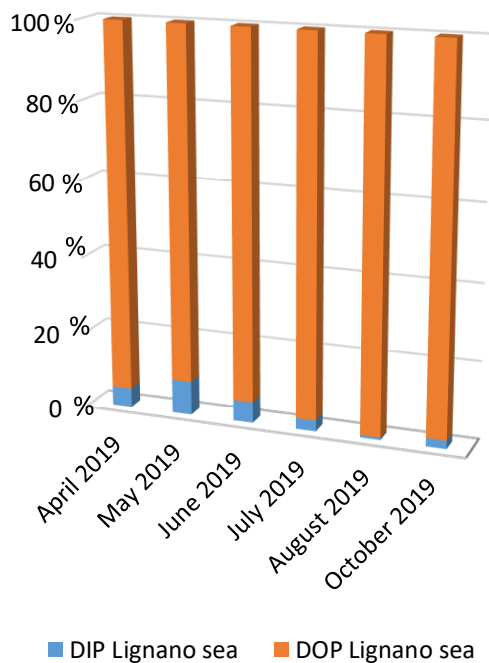


Fig. 46: DIP/DOP in Lignano sea

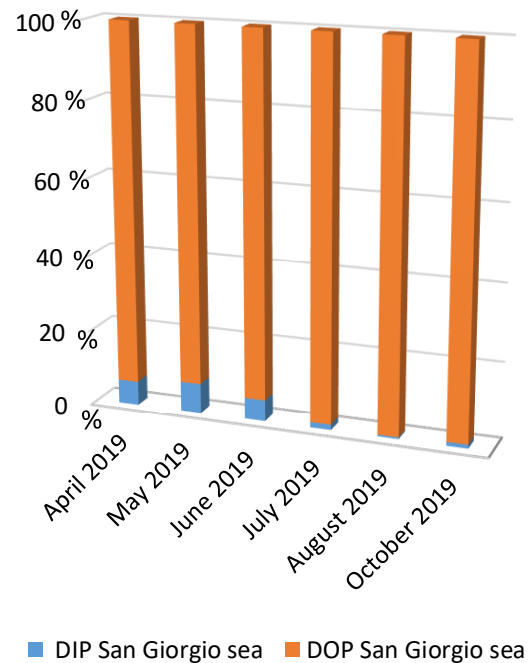


Fig. 47: DIP/DOP in San Giorgio sea

4.3.0. Livelli di nutrienti nella costa di Ancona

I risultati sono espressi in concentrazione μM . La descrizione e l'ubicazione dei siti è descritta al capitolo 3.1.2., fig. 8, 9, 10, 11.

4.3.1. Nitrati

Nei siti P1 e P2 (fig. 48) le concentrazioni di NO_3 variano da un minimo di $0.10 \mu\text{M}$ (P2, giugno 2019) ad un massimo di $5.6 \mu\text{M}$ (P1 e P2, gennaio 2020). Le concentrazioni subiscono un incremento dall'inizio della stagione estiva, fino a raggiungere il picco massimo a gennaio, probabilmente dovuto ad una intensificazione delle attività agricole e zootecniche e ad un intensificato utilizzo di fertilizzanti. Non si evidenziano particolari differenze tra i due siti. L'incremento nelle concentrazioni di nitrati concernente la stagione estiva è stato riscontrato anche nei campioni dell'alto Adriatico.

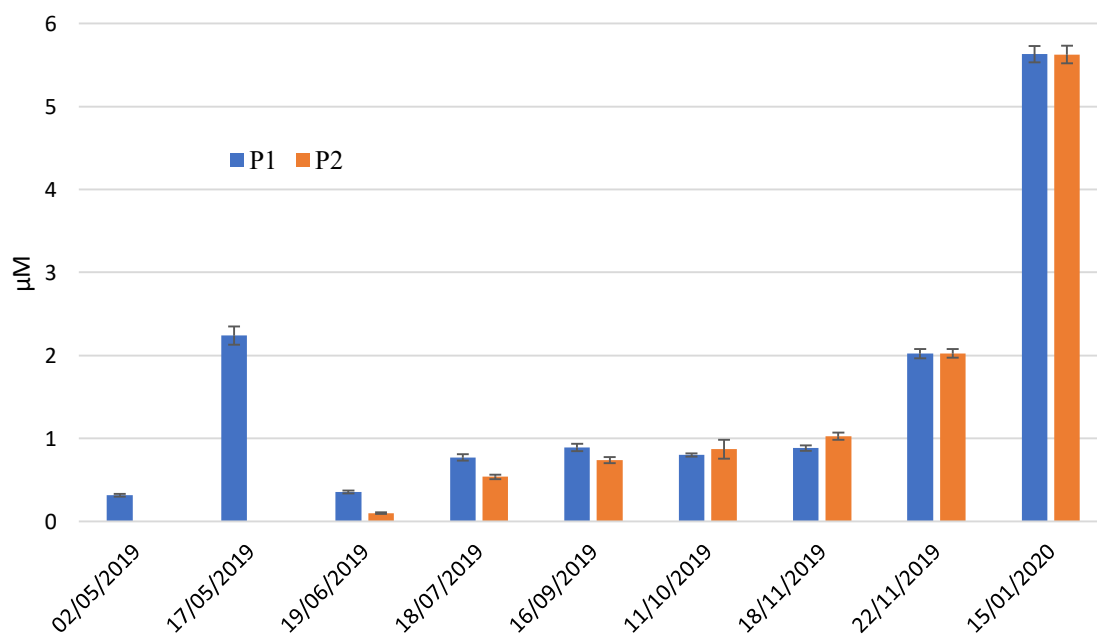


Fig. 48: concentrazioni di NO_3 nei siti P1 e P2.

Nei siti P3 e P4 (fig. 49) le concentrazioni variano da valori prossimi allo 0 (P4: luglio 2019, settembre 2019 e ottobre 2019) a valori massimi di 4.8 μM (P4, gennaio 2020). Tra i due siti emergono differenze significative in concentrazione nei mesi di luglio, settembre ed ottobre. Le concentrazioni di NO_3 subiscono, come per i siti P1 e P2 (fig. 48), un incremento dal termine del periodo estivo alla stagione invernale in entrambi i siti, probabilmente dovuto all'intensificazione delle attività agricole e zootecniche e ad un incremento nell'utilizzo di fertilizzanti. Nei mesi di luglio e settembre, per il sito P4, i valori di NO_3 riscontrati si sono rivelati inferiori del limite di rilevabilità dello strumento ($< 0.0.8 \mu\text{M}$).

I dati sono in accordo con la letteratura riguardante il centro Adriatico (tab. 4).

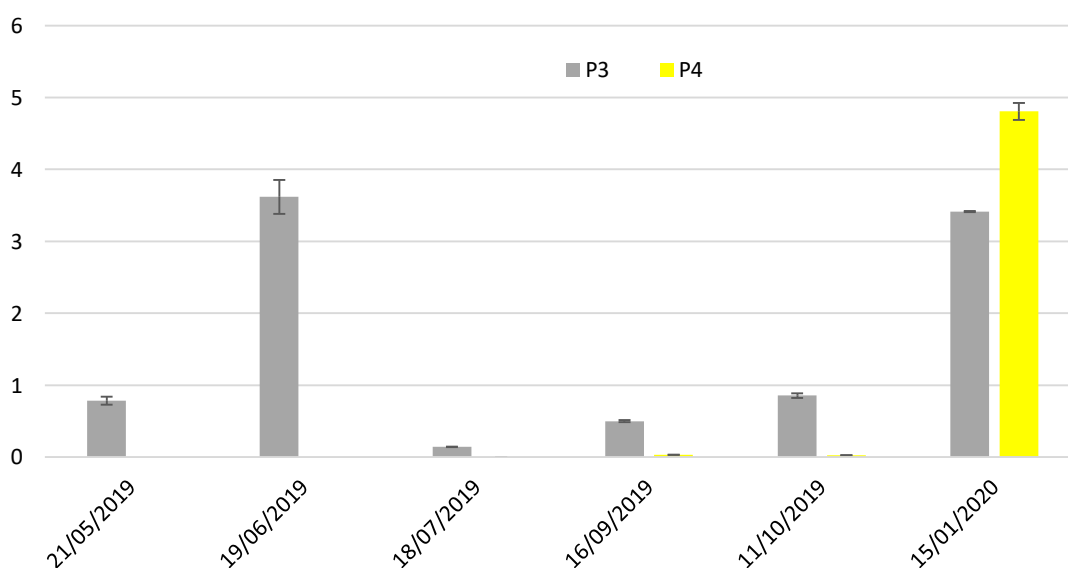


Fig. 49: Concentrazione NO_3 nei siti P3 e P4.

Le concentrazioni di NO_3 non eccedono in nessun sito il valore limite di legge di 20 mg L^{-1} (D. Lgs 152/2006).

4.3.2. Nitriti

Nei siti P1 e P2, le concentrazioni di NO₂ (fig. 50) variano da un minimo di 0.07 µM (P2, novembre 2019) ad un massimo di 0.27 µM (P2, ottobre 2019). Si registra un lieve incremento (di circa 0.02 µM) dall'inizio della stagione estiva, fino a raggiungere un picco nel mese di ottobre (0.26 µM), per poi calare bruscamente ed incrementare nuovamente tra novembre e gennaio, linearmente (da 0.07 – 0.08 µM a 0.17 -0.18 µM). I valori di concentrazione riscontrati coincidono con quelli determinati per i campioni del nord Adriatico.

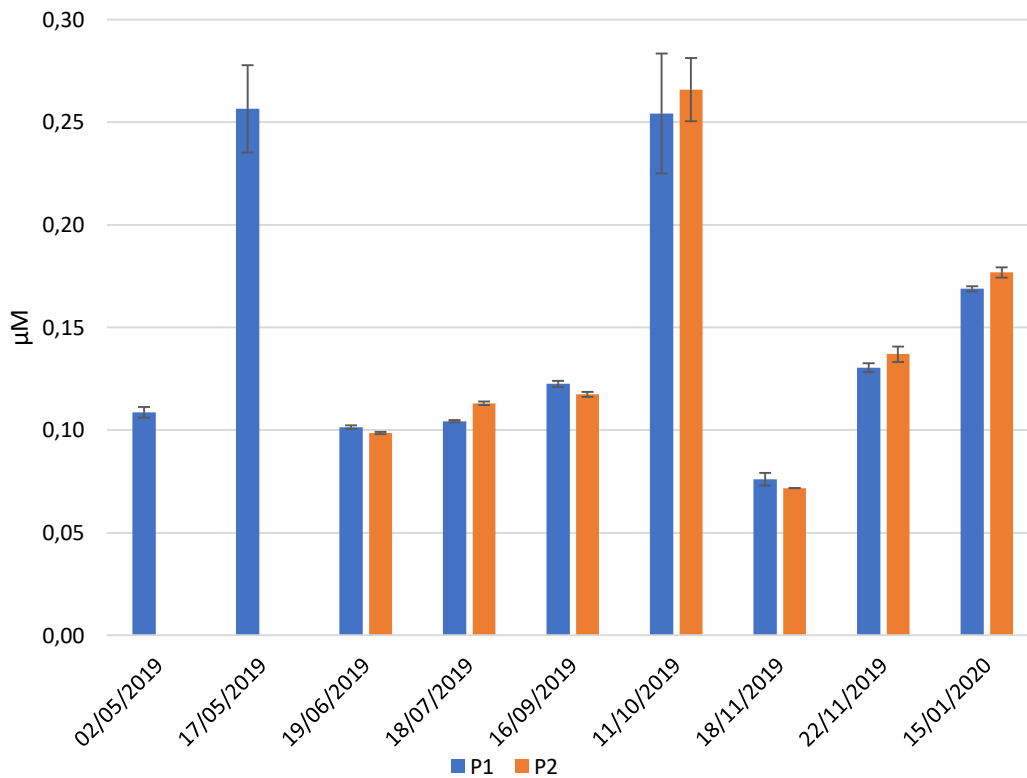


Fig. 50: concentrazioni NO₂ nei siti P1 e P2.

Nei siti P3 e P4 (fig. 51) notiamo un incremento in concentrazione di nitriti dal termine della stagione estiva verso la stagione invernale, dovuto probabilmente all'intensificazione delle attività agricole e zootecniche ed all'utilizzo di fertilizzanti. I valori variano da un minimo di 0.01 μM (P4, Luglio 2019) ad un massimo di 0.16 μM (P4, Gennaio 2019).

I valori sono in accordo con la letteratura riguardante il centro Adriatico (tab. 4)

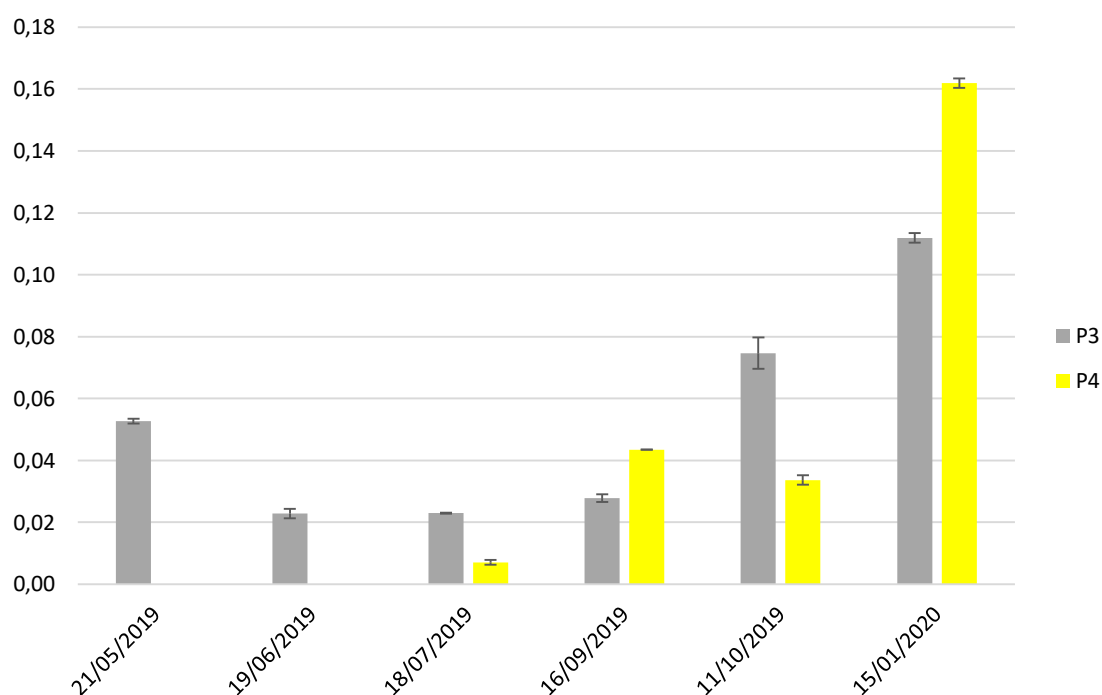


Fig. 51: concentrazione NO_2 nei siti P3 e P4.

Le concentrazioni di NO_2 determinate non eccedono in nessun caso il valore limite di legge di 0.6 mg L^{-1} (D. Lgs 152/2006).

4.3.3. Azoto ammoniacale:

Nei siti P1 e P2, le concentrazioni di NH_4^+ mostrano andamenti variabili, oscillando da un minimo di $0.57 \mu\text{M}$ (P2, gennaio 2020) ad un massimo di $2.44 \mu\text{M}$ (P2, luglio 2019), con un incremento nella stagione estiva ed una diminuzione al termine della stessa. Notiamo un ulteriore decremento al termine della campagna di campionamento. Nel mese di ottobre le concentrazioni rilevate sono al di sotto del limite di rilevabilità dello strumento per entrambi i siti ($< 0.08 \mu\text{M}$).

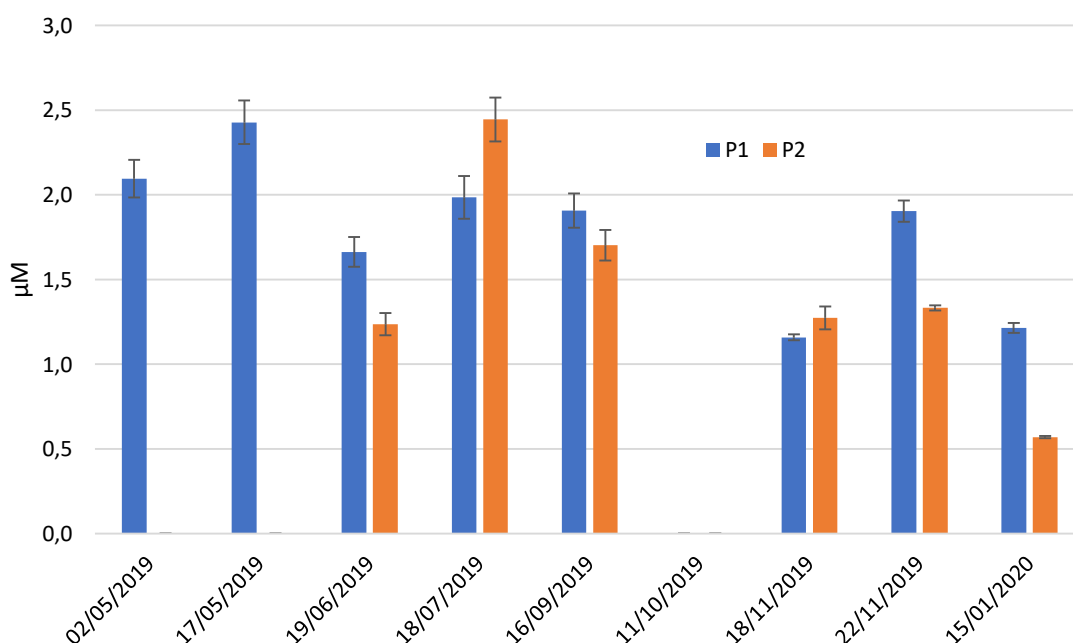


Fig. 52: concentrazioni NH_4^+ nei siti P1 e P2.

I valori riscontrati nei siti P1 e P2 (fig. 52) mostrano concentrazioni circa il doppio più elevate rispetto ai siti P3 e P4 (fig. 53), in particolare nei mesi estivi. Ciò potrebbe essere causato da un maggiore impatto antropico dovuto alla diversa fruizione dei siti, in quanto P1 e P2 rappresentano delle località altamente frequentate nei periodi estivi.

Nei siti P3 e P4 (fig. 53) notiamo un incremento dall'inizio della stagione estiva ad ottobre. I valori riscontrati evidenziano concentrazioni maggiori nei siti P3 rispetto ai P4. Le concentrazioni di NH_4^+ oscillano da valori prossimi allo 0 (P3, gennaio 2020) ad un massimo di 2.98 μM (P3, ottobre 2019). Nel sito P3 si registra un incremento in concentrazione notevole da giugno ad ottobre. Tale tendenza è evidente anche nel sito P4, pur se nel mese di ottobre l'incremento si arresta. I dati sono in accordo con la letteratura riguardante il centro Adriatico (tab. 4).

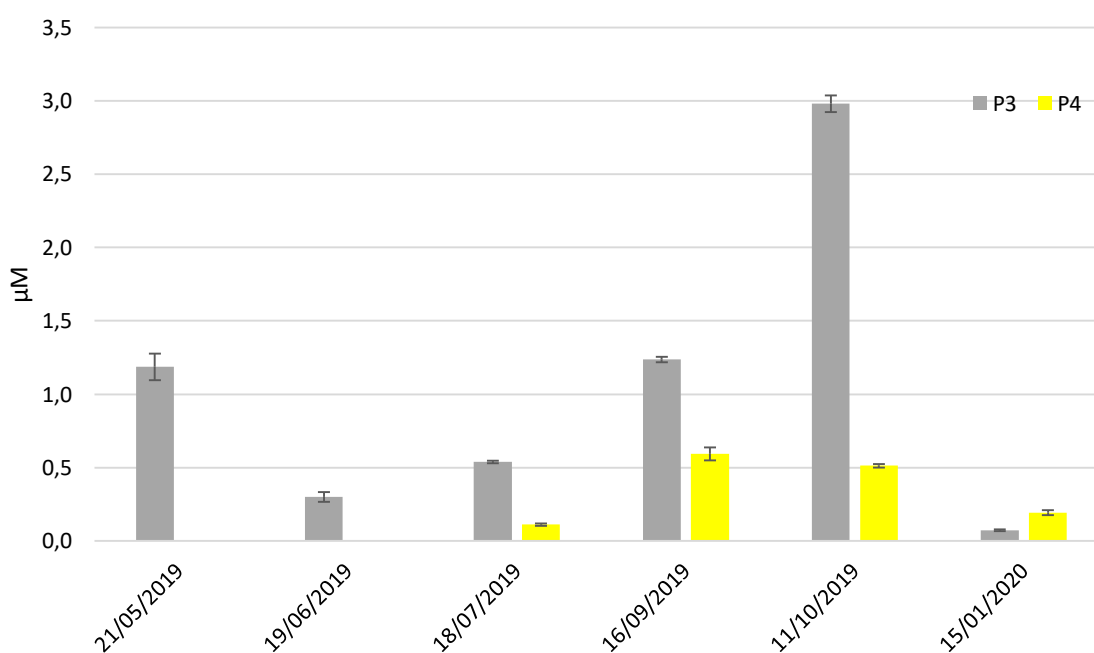


Fig. 53: concentrazione NH_4^+ nei siti P3 e P4.

Le concentrazioni di NH_4^+ non eccedono in nessun sito il valore limite di legge di 15 mg L^{-1} (D. Lgs 152/2006).

4.3.4. Silicati

Nei siti P1 e P2, le concentrazioni di SiO_2 (fig. 54) oscillano da un minimo di $0.14 \mu\text{M}$ (P2, giugno 2019) ad un massimo di $0.95 \mu\text{M}$ (17 maggio 2019). Si nota un incremento durante la stagione estiva (giugno – settembre) ed un decremento nel mese di ottobre, per poi incrementare nuovamente all'inizio della stagione invernale.

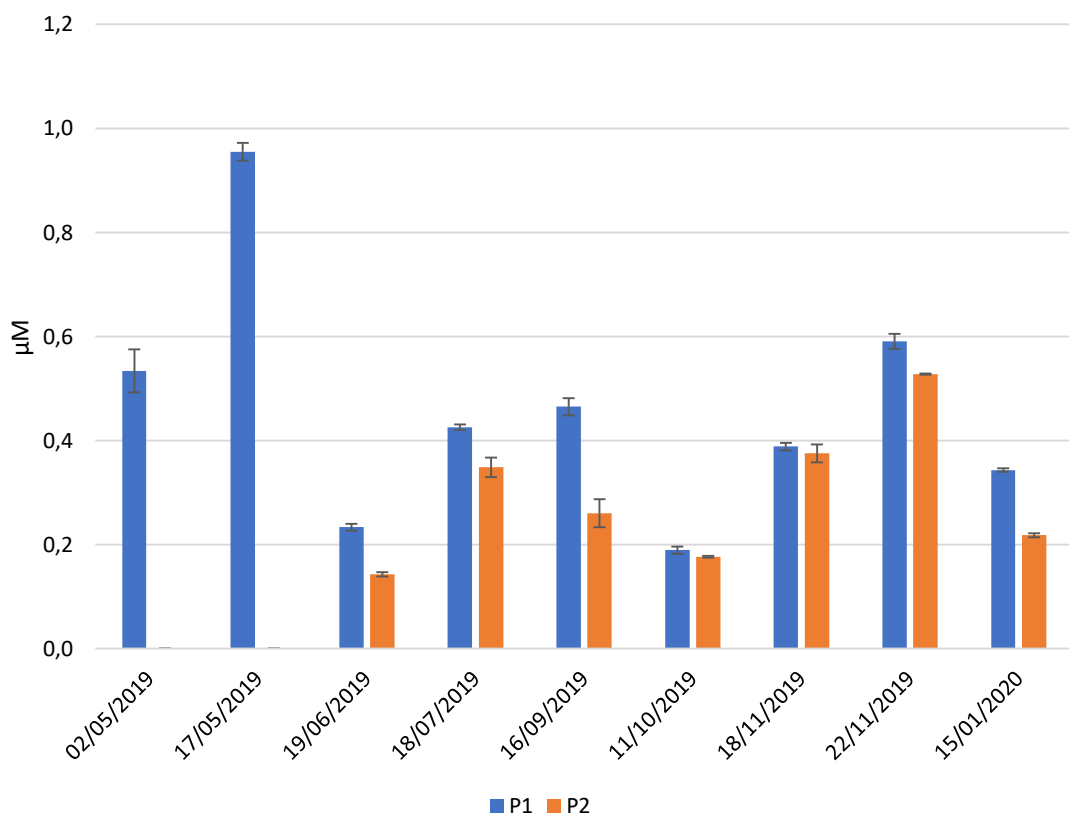


Fig. 54: concentrazione SiO_2 nei siti P1 e P2.

Nei siti P3 e P4, le concentrazioni di SiO_2 (fig. 55) oscillano da valori prossimi allo 0 (P4, settembre 2019) ad un massimo di $1.01 \mu\text{M}$ (P3, giugno 2019). Non si notano significative differenze tra i due siti, i valori sono in accordo con la letteratura concernente il centro Adriatico (tab. 4).

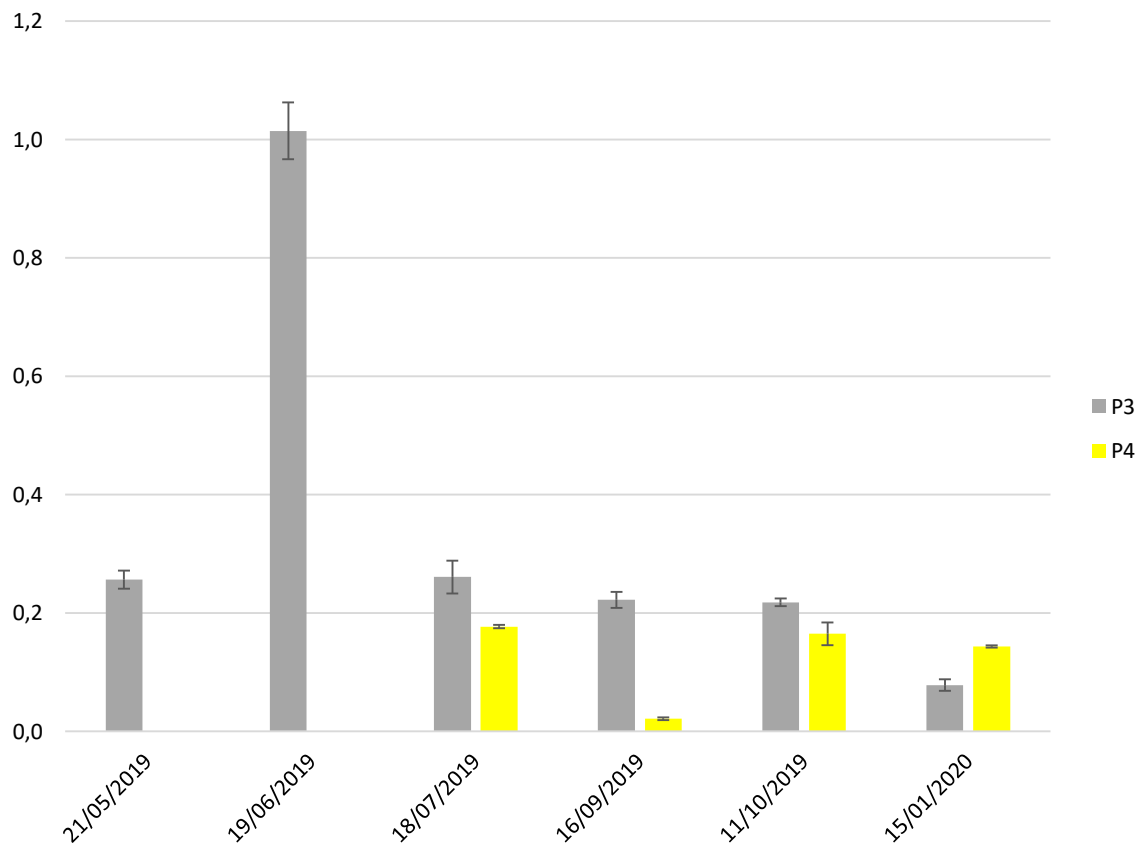


Fig. 55: concentrazione SiO_2 nei siti P3 e P4

Le concentrazioni di silicati riscontrate in tutti i campioni del centro Adriatico (fig. 54 e 55) sono comparabili con quelle riscontrate in ambiente marino per i siti dell'alto Adriatico.

4.3.5. DIP

Nei siti P1 e P2 (fig. 56) le concentrazioni di DIP oscillano da valori prossimi allo 0 (P2, Ottobre 2019) ad un massimo di 0.191 μM (P1, 22 Novembre 2019). Si nota un decremento lungo la stagione estiva per raggiungere il minimo in corrispondenza di Ottobre. Le concentrazioni di DIP sono generalmente maggiori nei siti P1 rispetto ai P2, pur se non si osservano differenze significative.

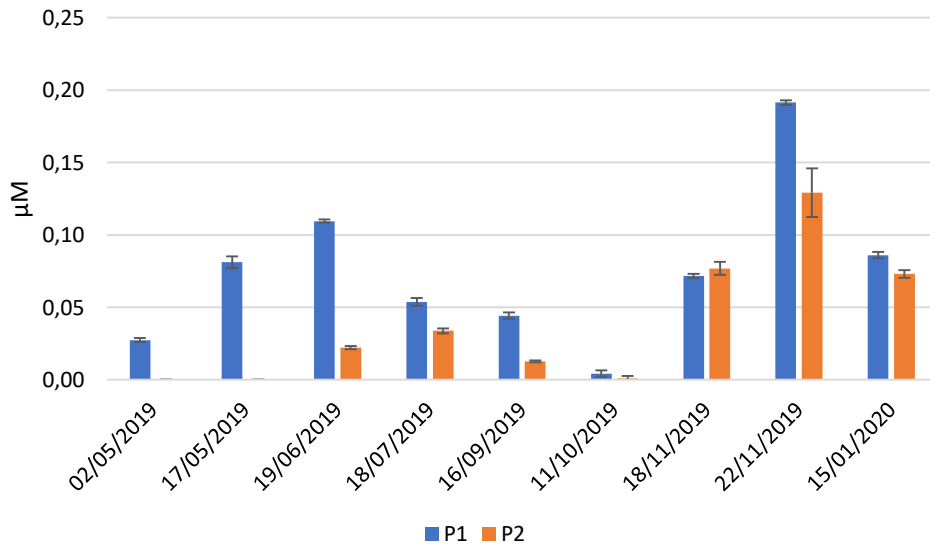


Fig. 56: concentrazioni DIP nei siti P1 e P2.

Nei siti P3 e P4, le concentrazioni di DIP (fig. 57) oscillano da un minimo di 0.06 μM (P3, maggio 2019) ad un massimo di 0.15 μM (P3, giugno 2019). Non si evidenziano particolari differenze tra i due siti.

I dati sono in accordo con la letteratura concernente il centro Adriatico (tab. 4).

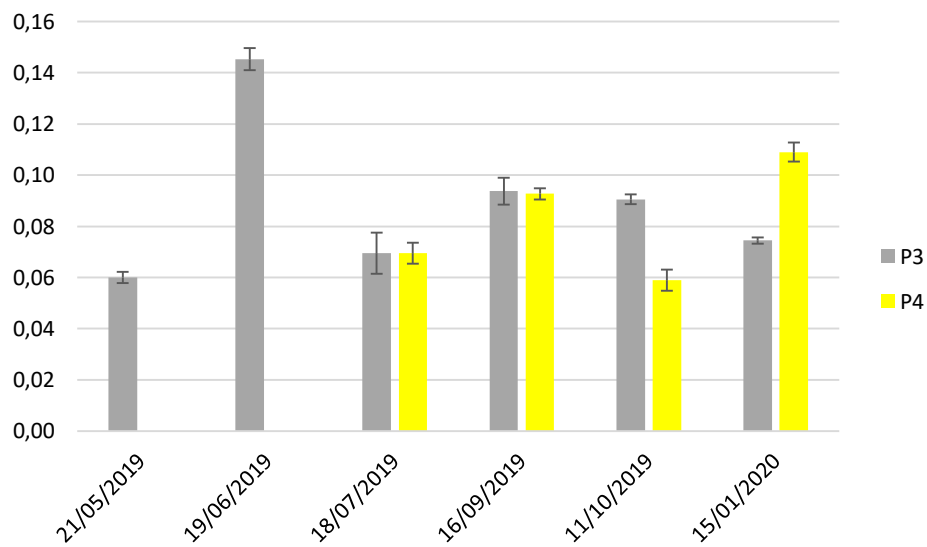


Fig. 57: concentrazioni DIP nei siti P3 e P4.

Le concentrazioni di DIP riscontrate nei campioni del centro Adriatico (fig. 56 e 57) sono comparabili con quelle riscontrate nei siti dell'alto Adriatico (fig. 39)

4.3.6. DOP

Nei siti P1 e P2, le concentrazioni di DOP (fig. 58), oscillano da un minimo di 0.19 μM (P1, luglio 2019) ad un massimo di 0.63 μM (P2, 18 novembre 2019). I valori riscontrati sono lievemente maggiori nei siti P2, pur se non significativamente, in particolare durante la stagione invernale.

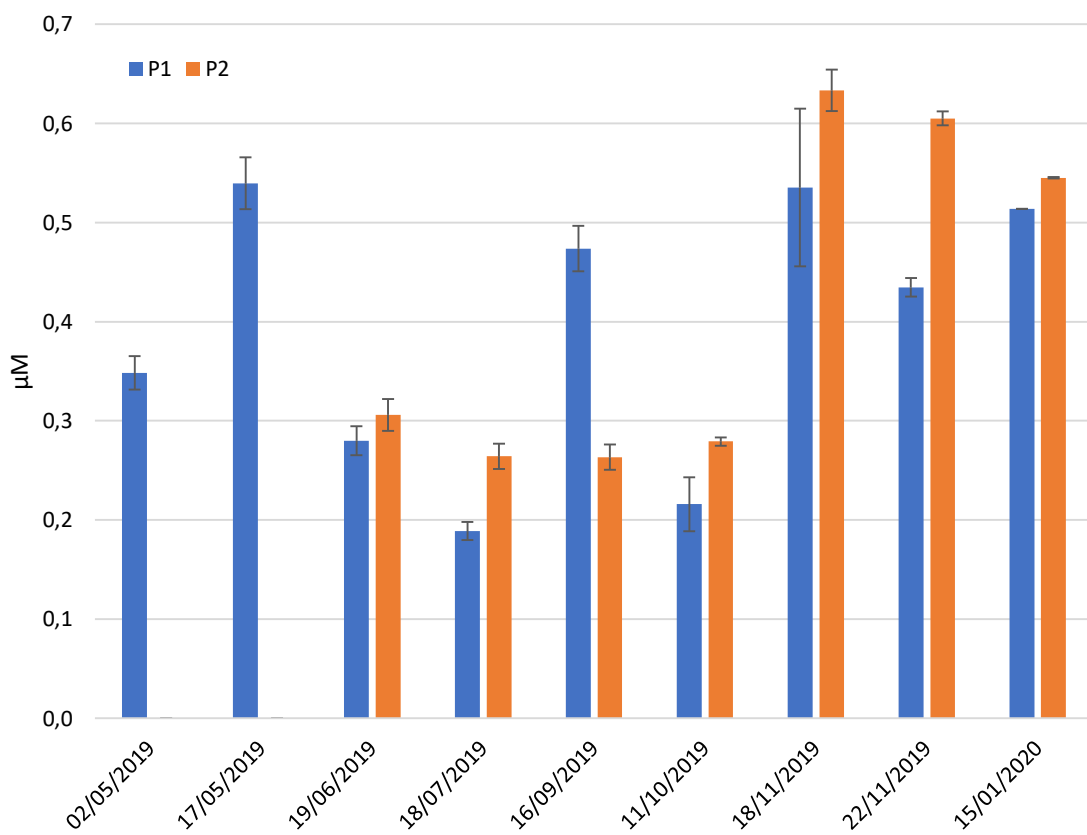


Fig. 58: concentrazioni DOP nei siti P1 e P2.

Nei siti P3 e P4, le concentrazioni di DOP (fig. 59) rimangono per lo più stabili, oscillando tra 0.4 μM (P4, ottobre 2019) e 0.56 μM (P3, ottobre), con un unico picco di 0.86 μM (P4, gennaio 2020). Non si notano significative differenze tra i due siti.

I valori riscontrati sono in accordo con la letteratura concernente il centro Adriatico (tab. 4).

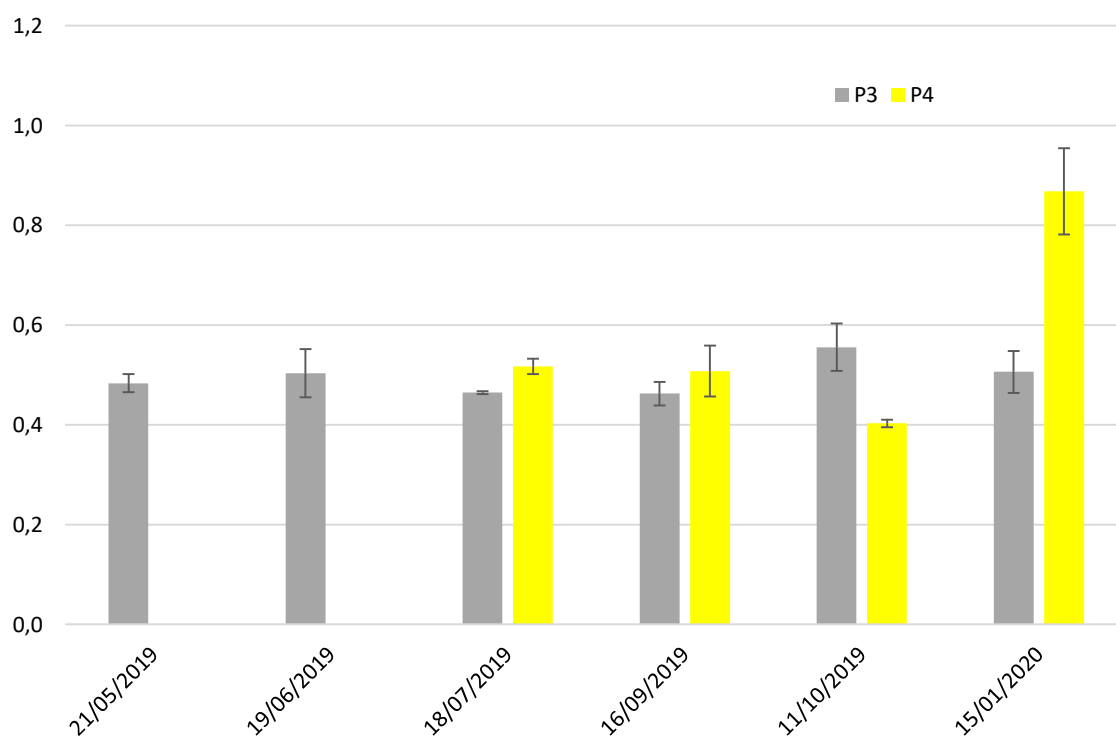


Fig. 59: concentrazione DOP nei siti P3 e P4.

4.3.7. Fosforo totale

Nel sito P1 (fig. 60) la frazione maggiore è rappresentata dal DOP, rimanendo compresa tra il 99% (Ottobre 2019) ed il 70% (22 Novembre 2019). La frazione inorganica diminuisce durante la stagione estiva fino a toccare il minimo in corrispondenza di ottobre.

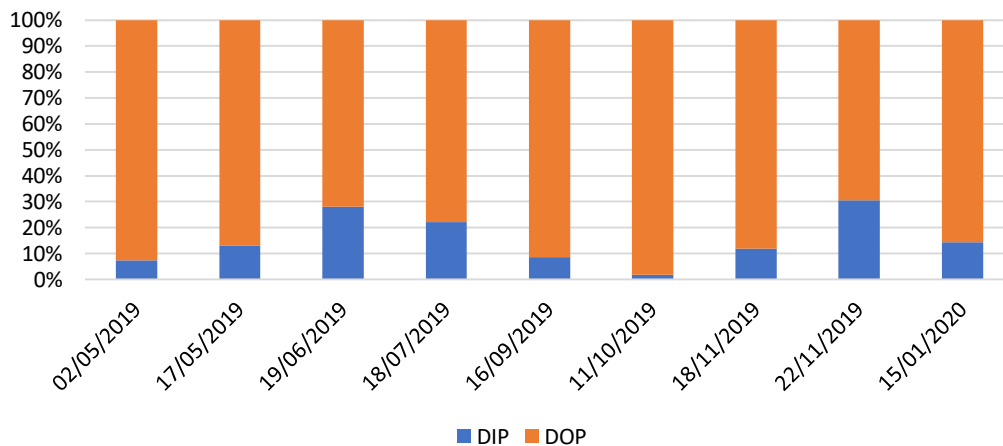


Fig. 60: distribuzione DIP-DOP nel sito P1.

Nel sito P2 (fig. 61) la frazione maggiore è rappresentata dal DOP, la quale varia da un massimo dell'81% (22 novembre 2019) ad un massimo di oltre il 99% (ottobre 2019). La frazione inorganica cala durante il periodo estivo.

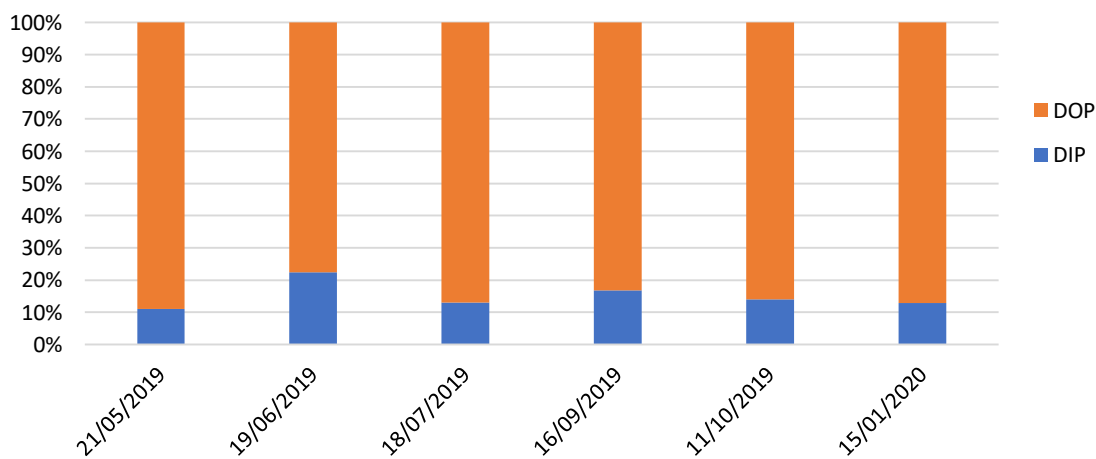


Fig. 61: distribuzione DIP-DOP nel sito P2.

Nel sito P3 (fig. 62) la frazione maggiore è rappresentata dal DOP, la quale oscilla da un massimo del 90% (21 maggio 2019) ad un minimo del 78% (giugno 2019). La frazione DIP mostra un andamento discendente da settembre in poi.

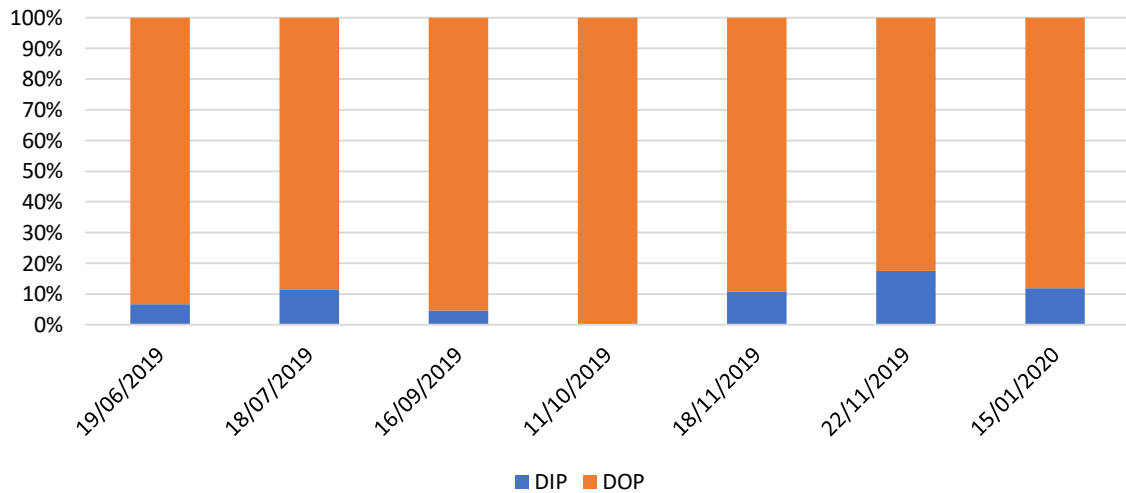


Fig. 62: distribuzione DIP-DOP nel sito P3.

Nel sito P4 (fig. 63), la frazione maggioritaria è rappresentata dal DOP, la quale rimane compresa tra l'89% (gennaio 2020) e l'85% (ottobre 2019). Non si evidenziano particolari andamenti.

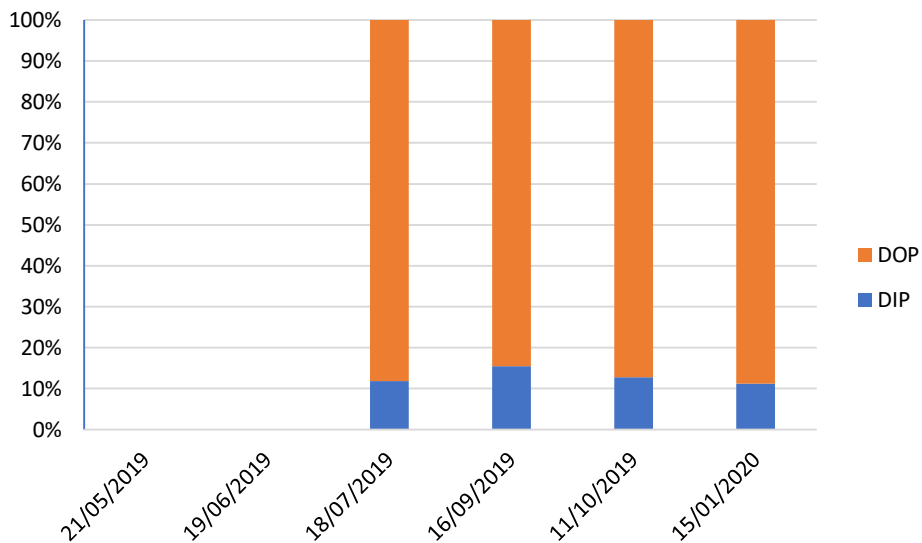


Fig. 63: distribuzione DIP – DOP nel sito P4.

4.4.0. Rapporto di Redfield:

Nord Adriatico:

Il rapporto di Redfield (fig. 64) varia da un minimo di 20 (Lignano Sea, maggio 2019) ad un massimo di 1184 (San Giorgio sea, ottobre 2019). Tutti i valori riscontrati, in quanto maggiori di 16 (DIN:DIP), confermano la fosforo-limitazione dell'area. Tuttavia, va sottolineato come la maggior parte del fosforo presente in acqua sia costituito dalla frazione organica DOP (fig. 46 e 47).

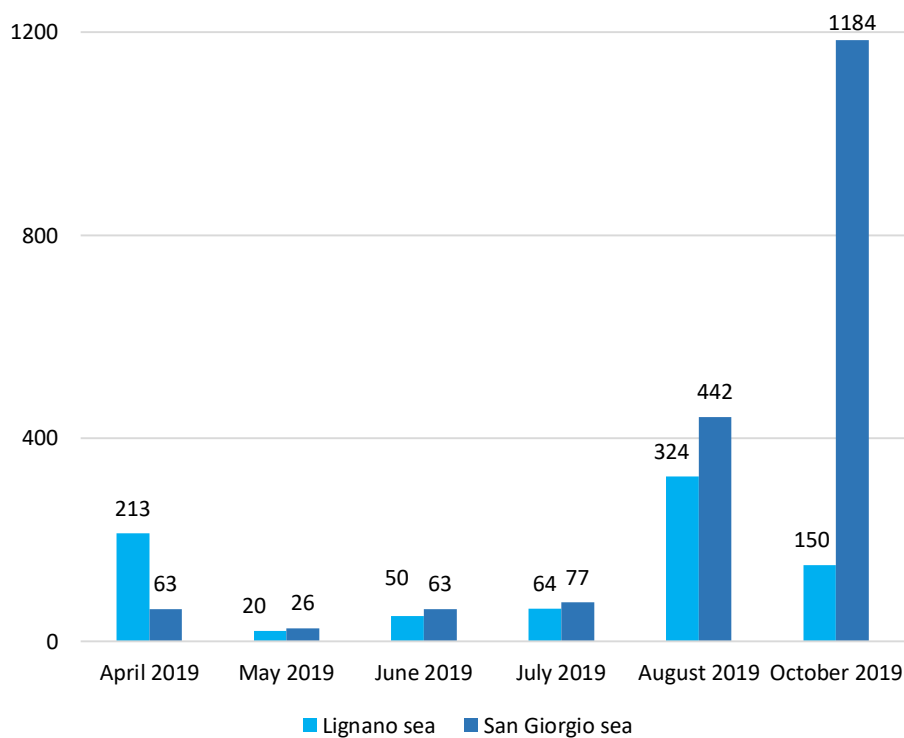


Fig. 64: Rapporto di Redfield in nord Adriatico

Centro Adriatico:

Il rapporto di Redfield per i siti della costa anconetana mostra valori al di sopra di 16 in quasi tutte le stazioni (tab. 9), ad eccezione del mese di luglio per P3 (10.1) e P4 (1.7) e nel sito P4 nei mesi di settembre (7.2) ed ottobre (9.4), nel quale è determinata N-limitazione.

La localizzazione del sito P4 (fig. 11) rispetto alla linea di costa ed all'apporto fluviale potrebbe essere causa della sua N-limitazione.

Il rapporto DIN:DIP maggiore di 16 determina fosforo limitazione nella quasi totalità dei siti della costa anconetana, in accordo con letteratura.

Tab. 9: Rapporto di Redfield nelle 4 stazioni della costa anconetana

Day	Redfield ratio			
	P1	P2	P3	P4
02/05/2019	92.1	-	-	-
17/05/2019	60.7	-	-	-
21/05/2019	-	-	33.7	-
19/06/2019	19.4	64.9	27.1	-
18/07/2019	53.3	91.8	10.1	1.7
16/09/2019	66.0	202.5	18.8	7.2
11/10/2019	250.7	1079.6	43.2	9.7
18/11/2019	29.6	30.9	-	-
22/11/2019	21.2	27.1	-	-
15/01/2020	81.6	87.3	48.4	47.4

Nei siti della costa anconetana, il rapporto di Redfield (fig. 65) subisce un incremento durante la stagione estiva, per raggiungere un picco nel mese di ottobre (P2: 1080), come determinato anche nel caso dell'Adriatico settentrionale, (Fig. 64) per poi ridiminuire nei mesi seguenti.

Nei mesi estivi, il rapporto di Redfield mostra valori maggiori nei siti P2, con significative differenze anche rispetto a P1, nonostante la similarità dei siti.

La differenza nelle concentrazioni di DIN e DIP nei siti P1 e P2 potrebbe essere dovuta alla presenza ed attività degli scolmatori.

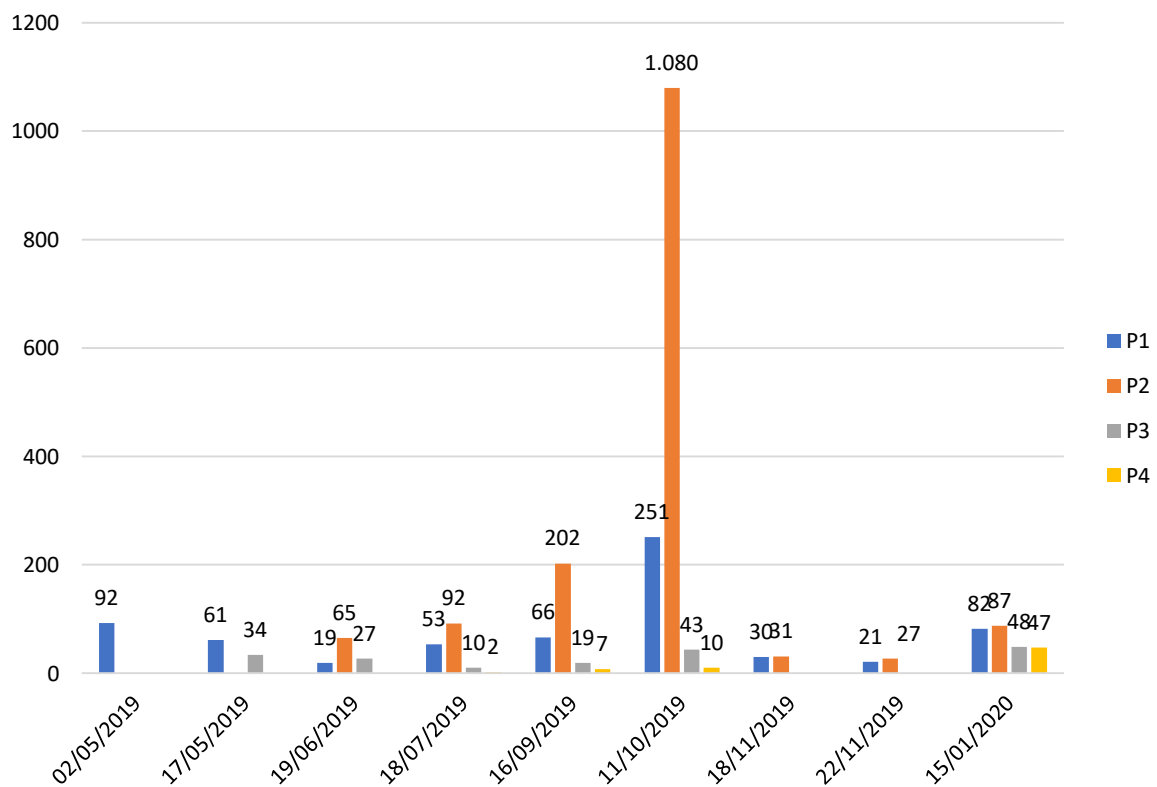


Fig. 65: rapporto di Redfield nei siti della costa anconetana, andamento temporale

4.5.0. *Attività fosfatasica - PMEase*

L'attività dell'enzima PMEase nei siti della costa anconetana (fig. 66) mostra valori sempre compresi da un minimo di 30 $\mu\text{mol pNP L}^{-1}\text{h}^{-1}$ (P3, Maggio 2019; P1, Luglio 2019) ad un massimo di 82 $\mu\text{mol pNP L}^{-1}\text{h}^{-1}$ (P3, Gennaio 2020). I valori mostrano andamenti variabili e non si evincono particolari differenze tra i siti.

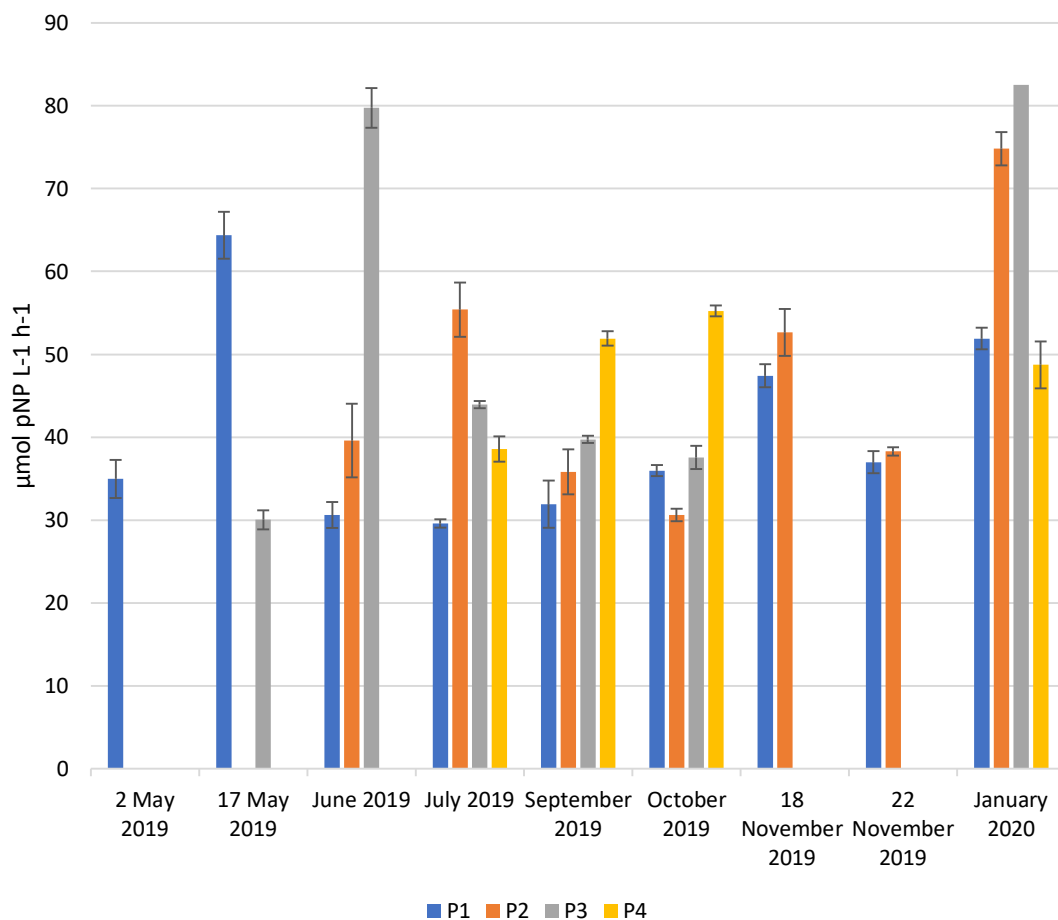


Fig. 66: PMEase in tutti i siti della costa anconetana.

4.5.1. *Correlazione tra attività fosfatasica e salinità*

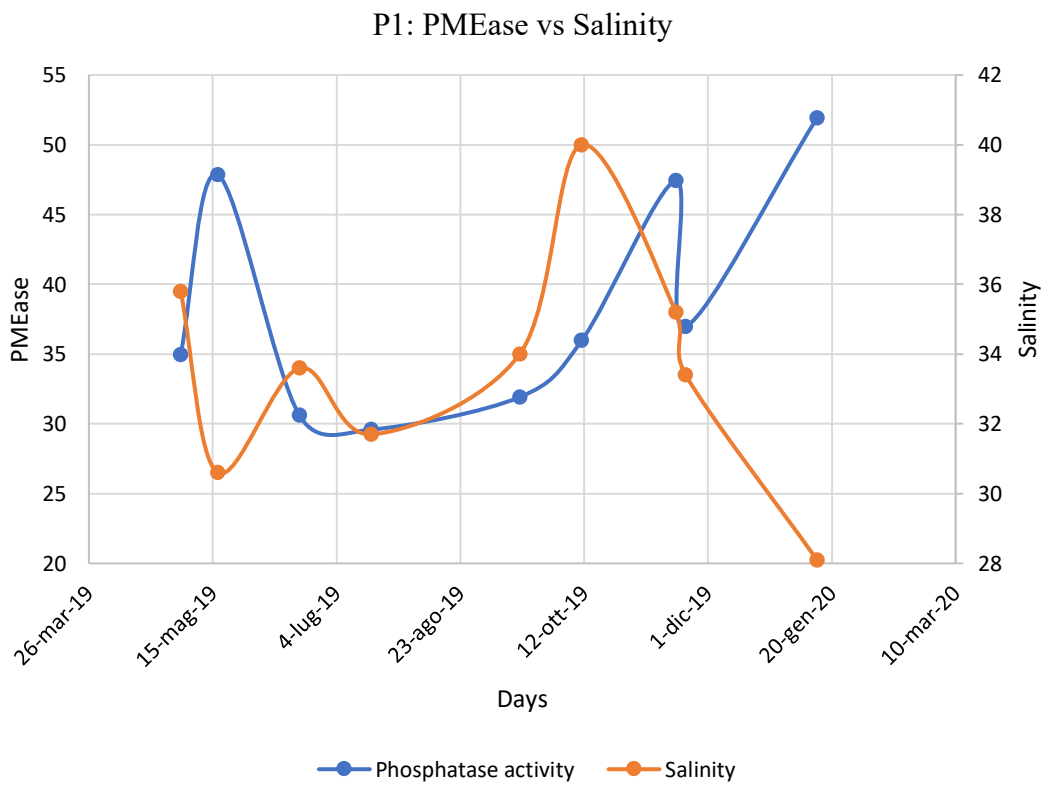


Fig. 67: P1, andamento attività fosfatasica in relazione alla variazione di salinità

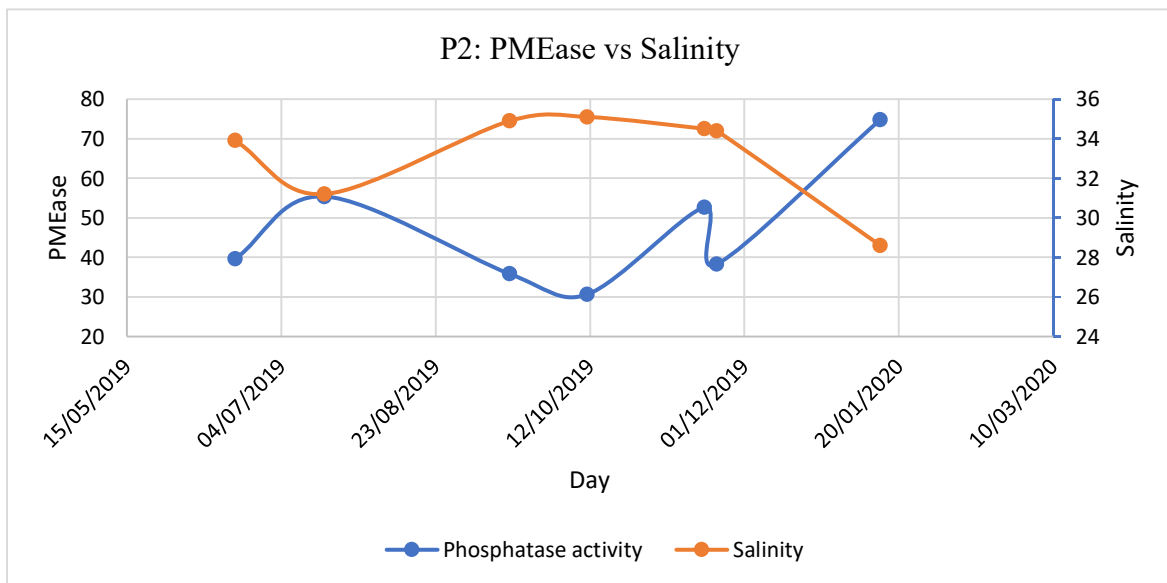


Fig. 68: P2, andamento attività fosfatasica in relazione alla variazione di salinità

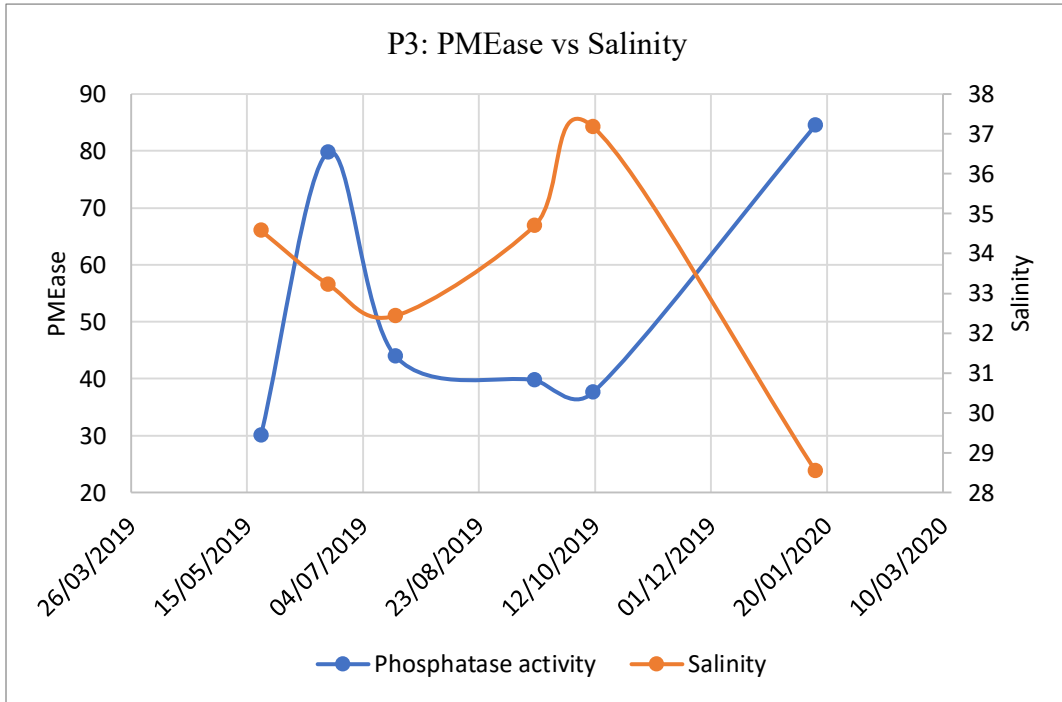


Fig. 69: P3, andamento PMEase in relazione alla variazione di salinità

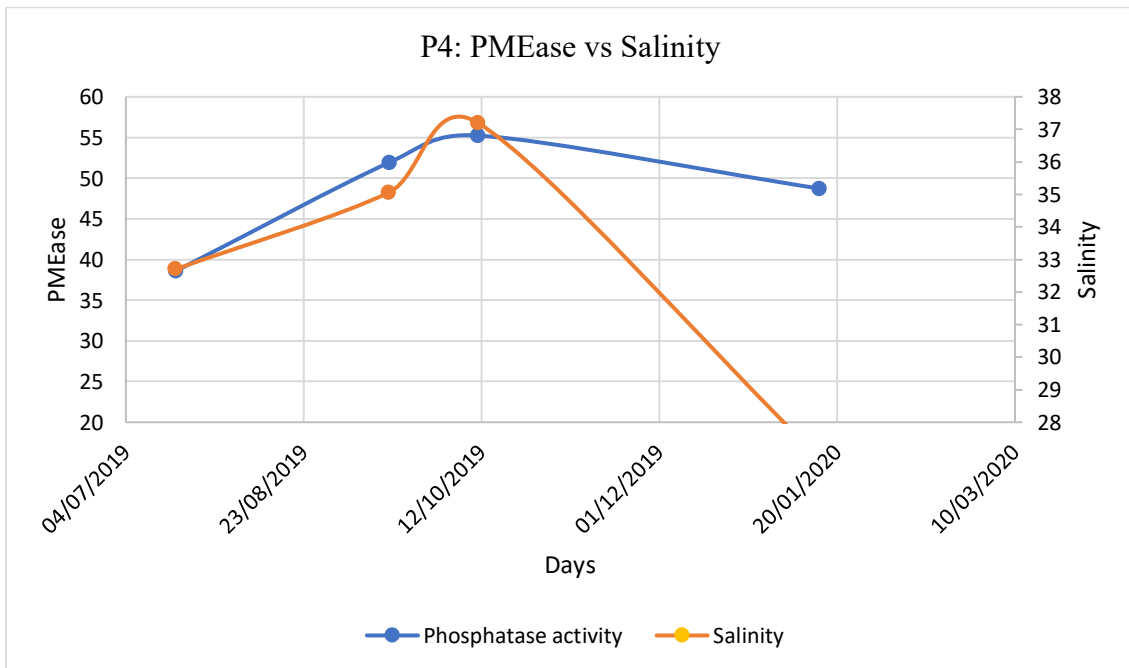


Fig. 70: andamento PMEase in relazione alla variazione di salinità

L'attività fosfatasica per l'enzima PMEase sembra fortemente correlata con la variazione di salinità nei siti P1, P2 e P3 ($R = 0.468$). Come evidente dalle figure 67, 68, 69, al diminuire della salinità e di conseguenza al fronte di apporto fluviale, l'attività dell'enzima PMEase aumenta.

Questa correlazione non è evidente nel P4, seppure sono presenti pochi dati al fine di una corretta interpretazione dei risultati.

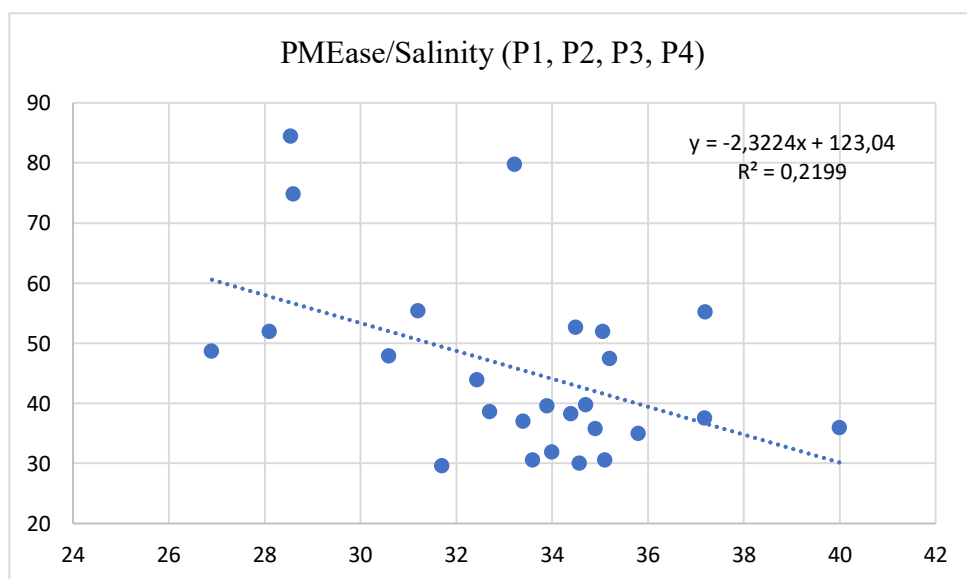


Fig. 71: correlazione lineare PMEase / salinità per tutti i siti della costa anconetana (P1, P2, P3 e P4).

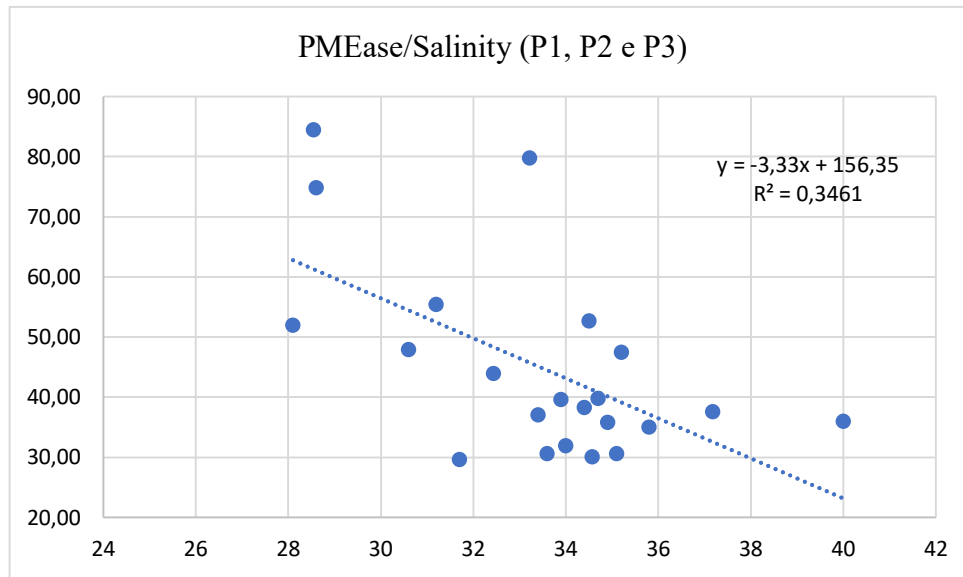


Fig. 72: correlazione PMEase e salinità per i siti P1, P2 e P3.

Dalle fig. 72 si evince come il coefficiente di determinazione R^2 in P1, P2 e P3 mostra una buona proporzionalità. Il coefficiente di correlazione $R = 0,588$ nei siti P1, P2 e P3, evidenzia una proporzionalità diretta tra attività fosfatasica e salinità.

Situazione diversa per il sito P4, il quale inserimento nel grafico (Fig. 71) determina un abbassamento del coefficiente di correlazione, pur se per lo stesso sono stati raccolti pochi dati per una corretta valutazione statistica.

4.5.2. Correlazione tra attività fosfatasica e DOP

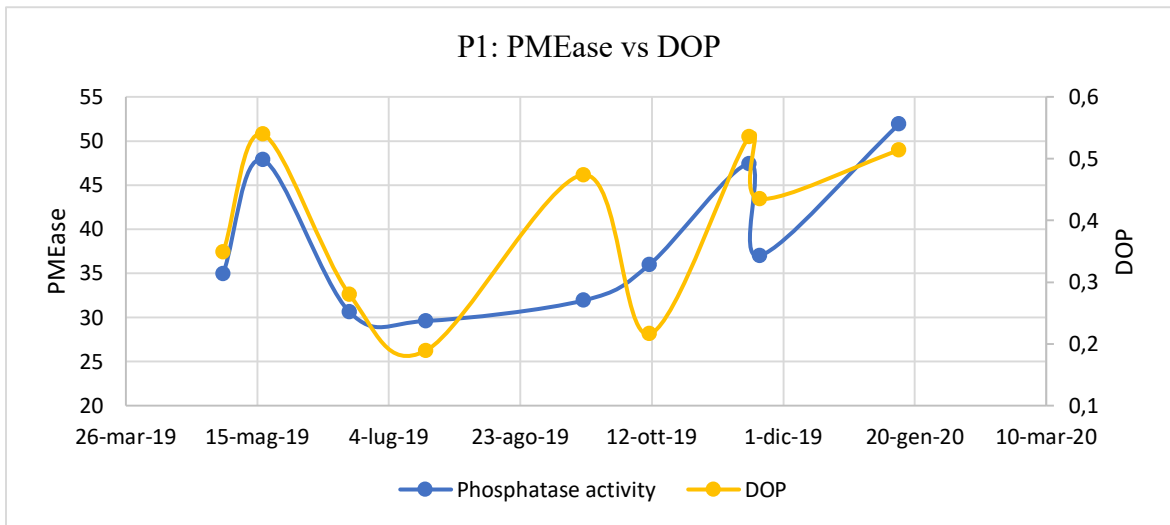


Fig. 73: P1, andamento PMEase in relazione alle concentrazioni di DOP.

Al variare delle concentrazioni di DOP, per il sito P1 notiamo una variazione dello stesso tipo nell'attività dell'enzima PMEase. All'incremento delle concentrazioni di DOP corrisponde spesso un incremento dell'attività fosfatasica ed a una diminuzione delle concentrazioni di DOP corrisponde una diminuzione dell'attività fosfatasica.

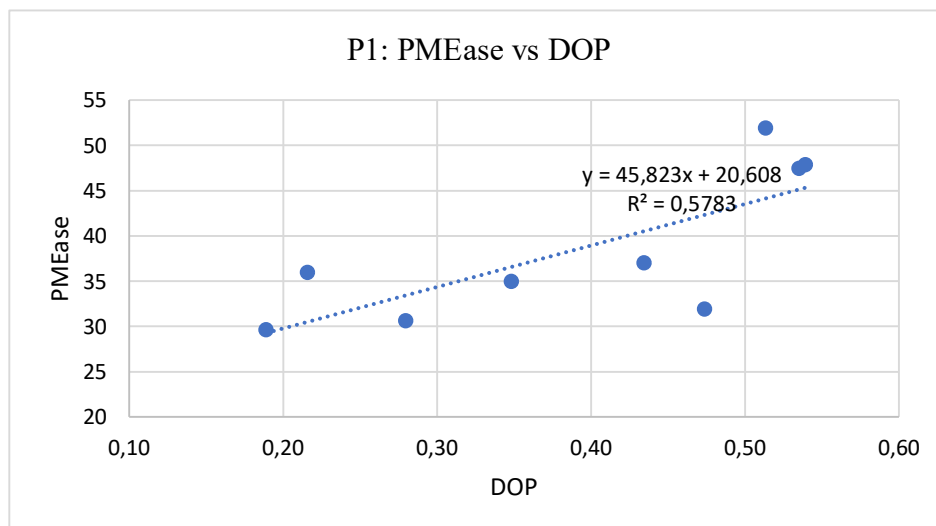


Fig. 74: correlazione tra PMEase e DOP per il sito P1.

Nel sito P1 la correlazione tra PMEase e DOP è positiva, con un coefficiente di correlazione $R = 0.76$.

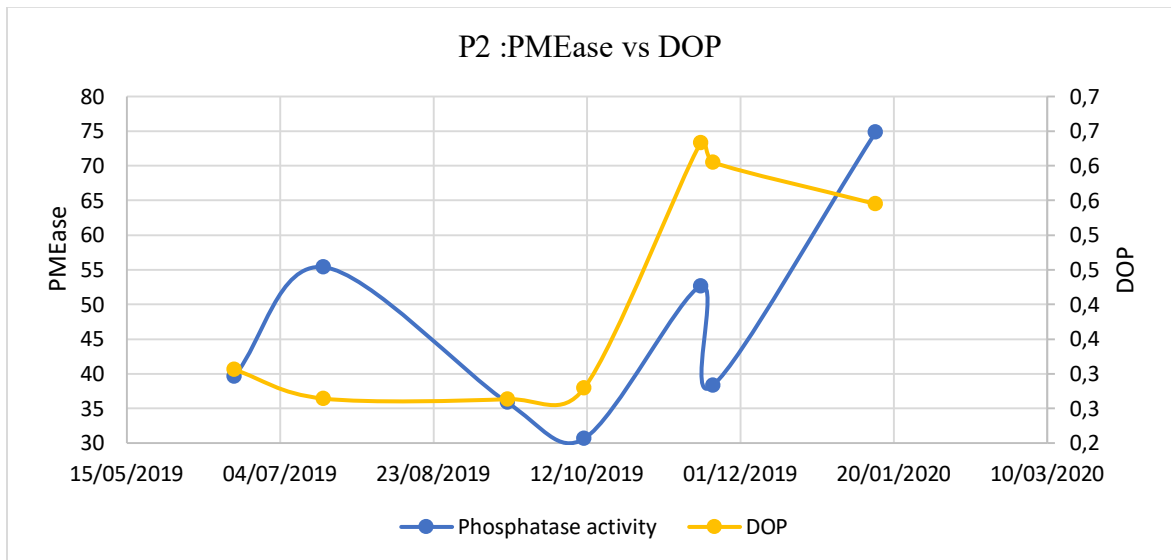


Fig. 75: P2, andamento PMEase in relazione alle concentrazioni di DOP

A differenza del sito P1, l'incremento o diminuzione dell'attività fosfataseica, nel sito P2 (fig. 75), non corrisponde all'incremento od alla diminuzione del DOP, se non limitatamente ad alcuni punti.

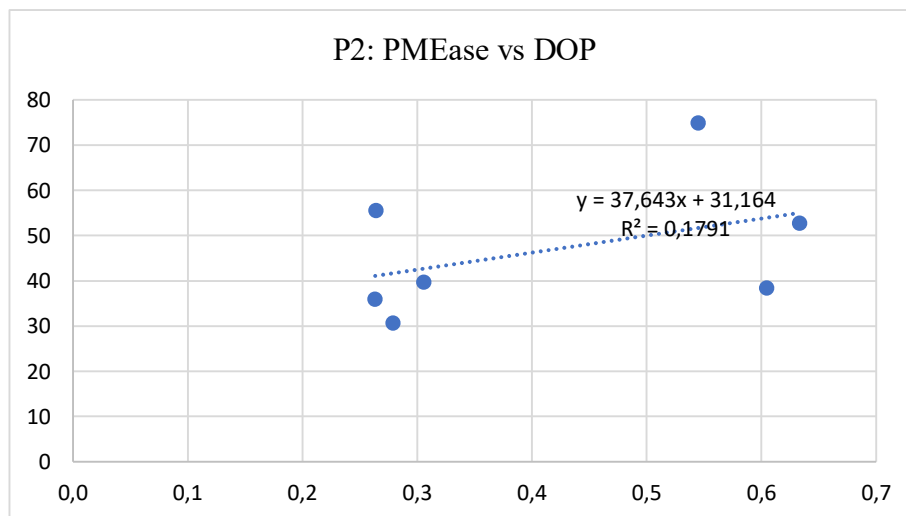


Fig. 76: P2, correlazione PMEase vs DOP

Nel sito P2 la correlazione è meno evidente rispetto a P1, con un coefficiente di correlazione $R = 0.4232$.

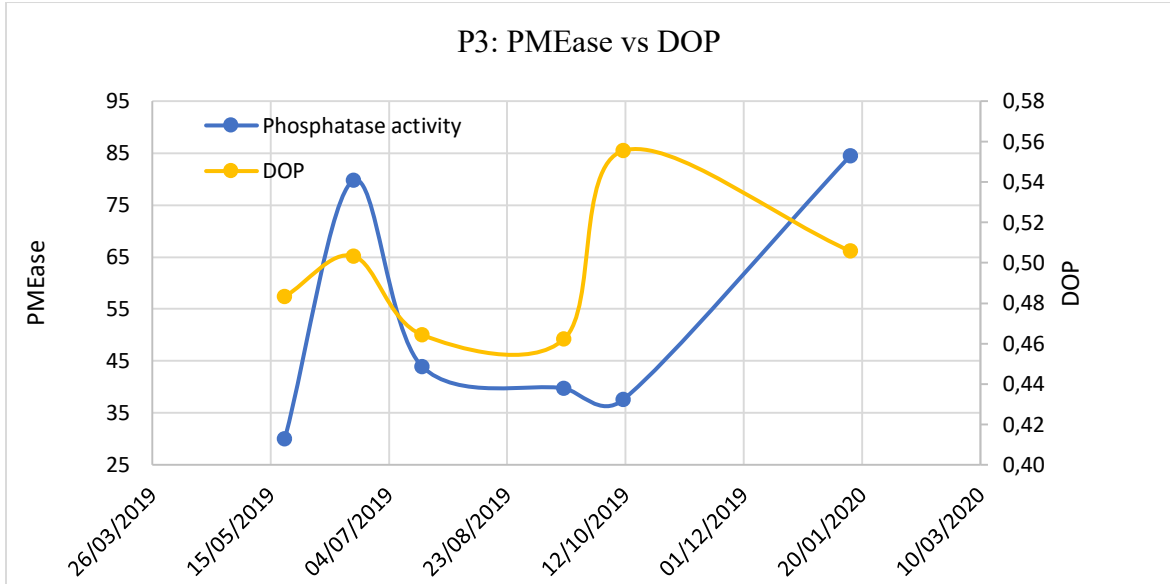


Fig. 77: andamento PMEase in relazione alle concentrazioni di DOP

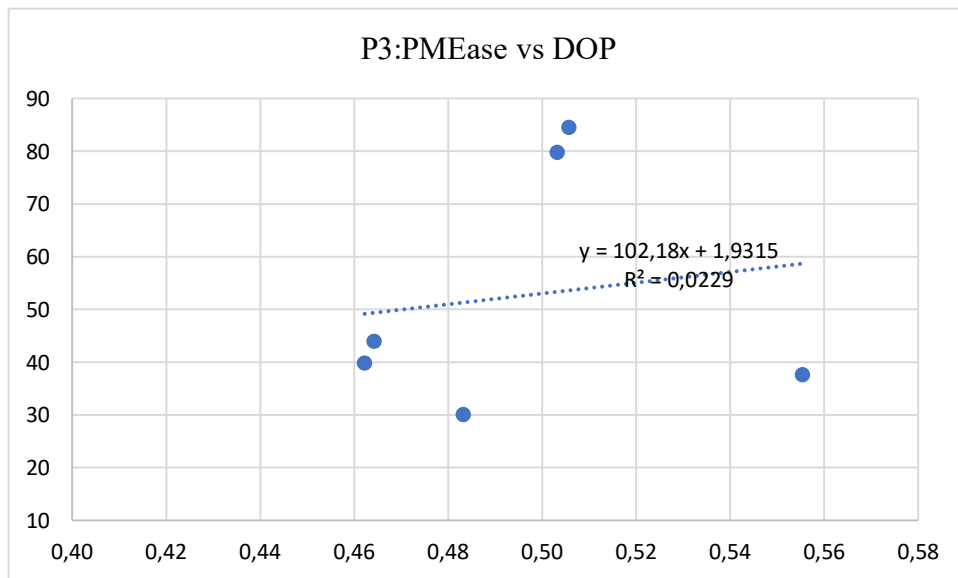


Fig. 78: P3, correlazione PMEase vs DOP

Per il sito P3 non si evince una correlazione statisticamente significativa ($R = 0.1414$) tra le concentrazioni di DOP e l'attività dell'enzima PMEase.

Per il sito P4 non ci sono dati sufficienti per determinare correlazioni statistiche rilevanti.

4.5.3. Correlazione tra attività fosfatasica e DIP

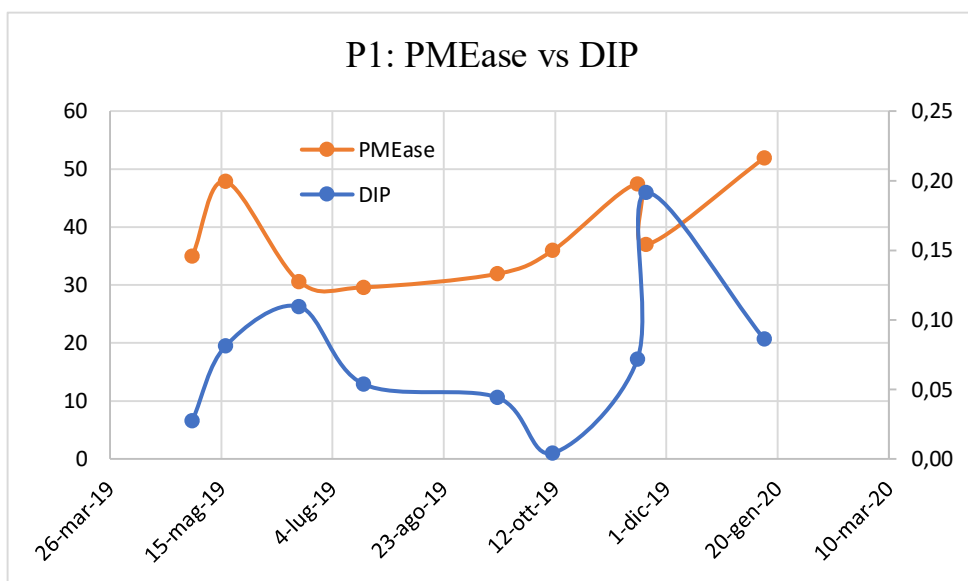


Fig. 79: P1, andamento PMEase in relazione al DIP

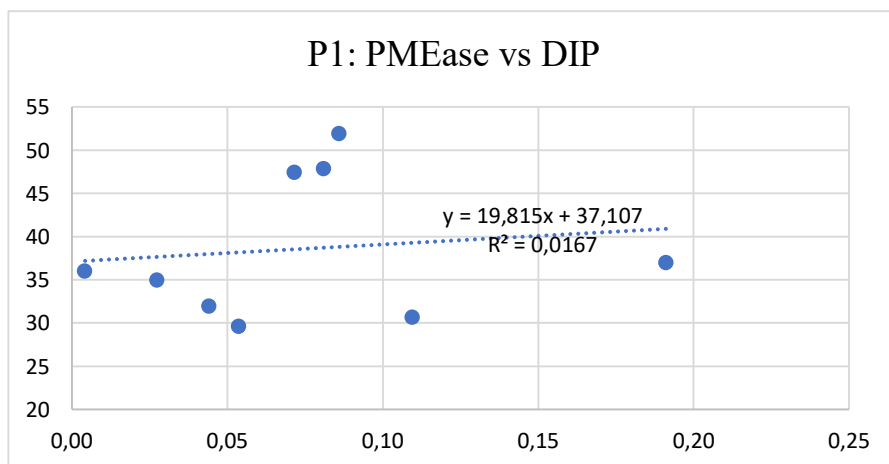


Fig. 80: P1, correlazione PMEase e DIP

Per il sito P1 (fig. 79 e 81) non si evidenziano correlazioni tra attività fosfatasica e DIP ($R = 0.12$).

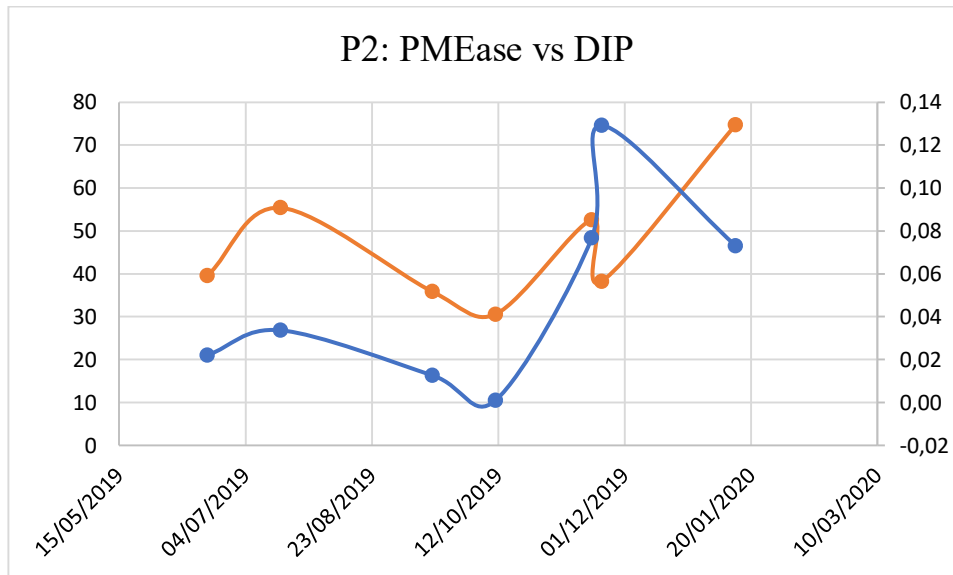


Fig. 81: P2, andamento PMEase in relazione al DIP

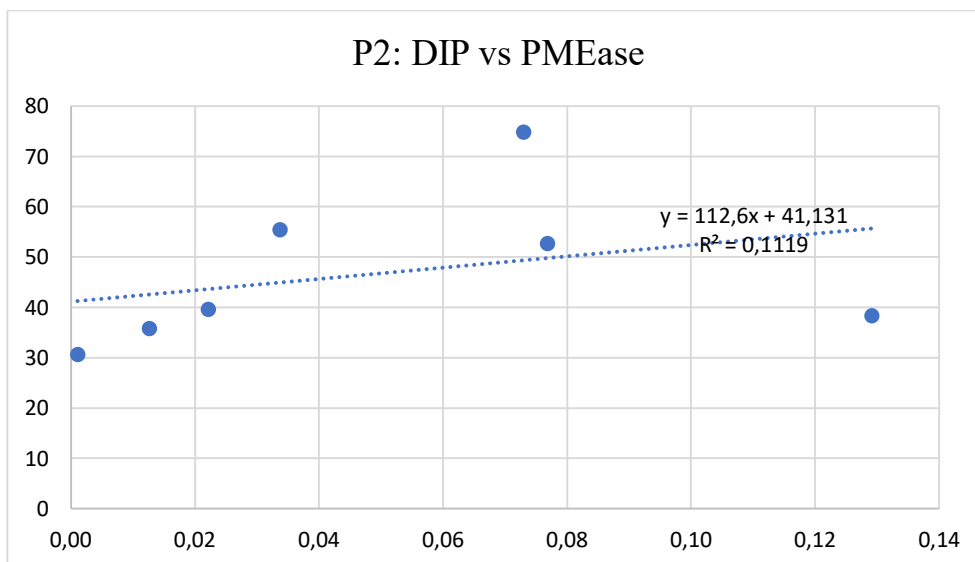


Fig. 82: P2, correlazione PMEase e DIP

Nel sito P2 (fig. 81 e 82) non risulta esserci una correlazione rilevante tra l'attività fosfataseica e le concentrazioni di DIP, coefficiente di correlazione $R = 0.333$.

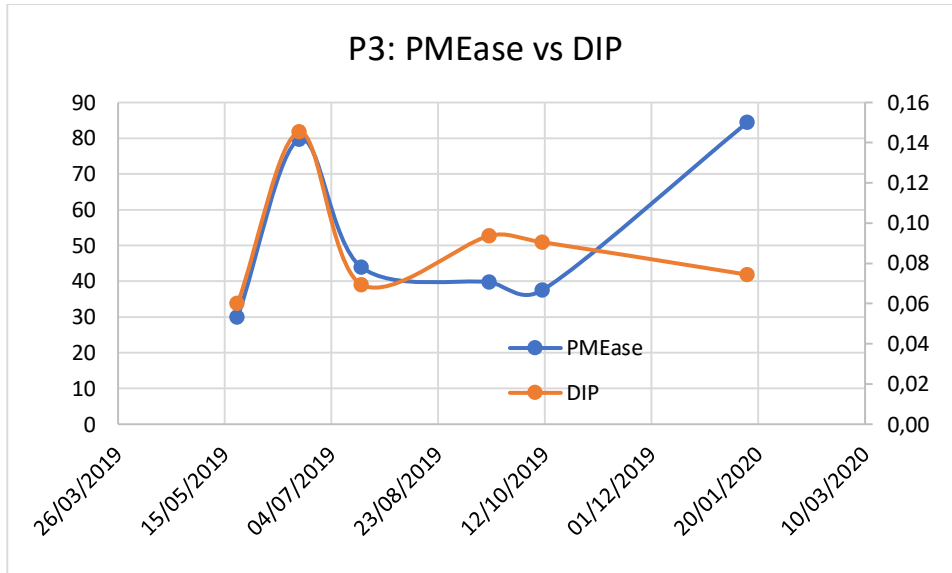


Fig. 83: P3, andamento PMEase in relazione al DIP

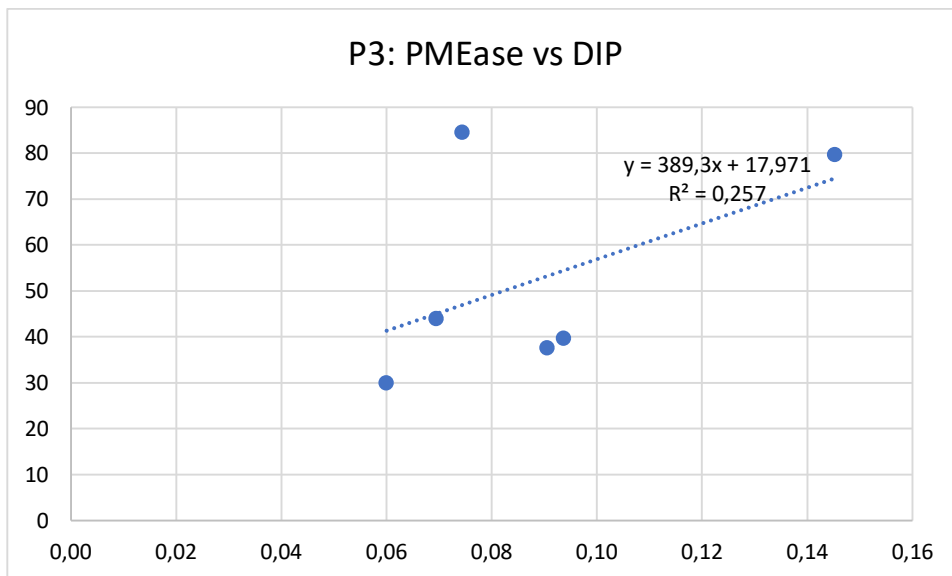


Fig. 84: P3, correlazione PMEase e DIP

Nel sito P3, diversamente da P1 e P2, sembra esserci una correlazione ($R = 0.506$), seppur debole, tra l'attività fosfataseica e le concentrazioni di DIP.

Per il sito P4 non ci sono dati sufficienti per una elaborazione statistica dei dati.

L'attività fosfatasica dovrebbe diminuire all'incremento delle concentrazioni di DIP (Rose et al., 1998). In questo caso non ci aspettiamo alcuna evidente relazione con il fosforo inorganico, dato che il suo contributo al fosforo totale è molto esiguo rispetto quello inorganico, influenzando così molto poco l'attività fosfatasica.

Confrontando i coefficienti di correlazione tra PMEase e DIP (Fig. 74, 76 e 78) e PMEase e DOP (Fig. 80, 82 e 84), notiamo come le correlazioni più evidenti le ritroviamo col DOP, ad eccezione di P3, le quali correlazioni nel sito mostrano una maggior affinità con le concentrazioni di DIP.

4.6.0. Eventi di Pioggia

Per i campioni della costa anconetana P1 e P2, sono stati analizzati 2 eventi di pioggia, al fine di verificare le variazioni nelle concentrazioni di nutrienti e di attività fosfatica conseguentemente all'apporto di materia organica derivante dall'apporto fluviale o dall'apertura degli scolmatori sottocosta (monitorato nell'evento 1), ed alle capacità di recupero naturale a cinque giorni di distanza dal termine di una mareggiata di ampia rilevanza (monitorato nell'evento 2).

4.6.1. Evento 1: 02 Maggio 2019 – 17 Maggio 2019

Maggio 2019. L'evento di pioggia di Maggio 2019 è stato analizzato solamente per il sito P1. Dal 7 Maggio 2019 al 17 Maggio 2019 sono stati registrati 80mm di piovosità, dati stazione Fiumesino (Falconara M.ma, AN), codice sensore 3032.

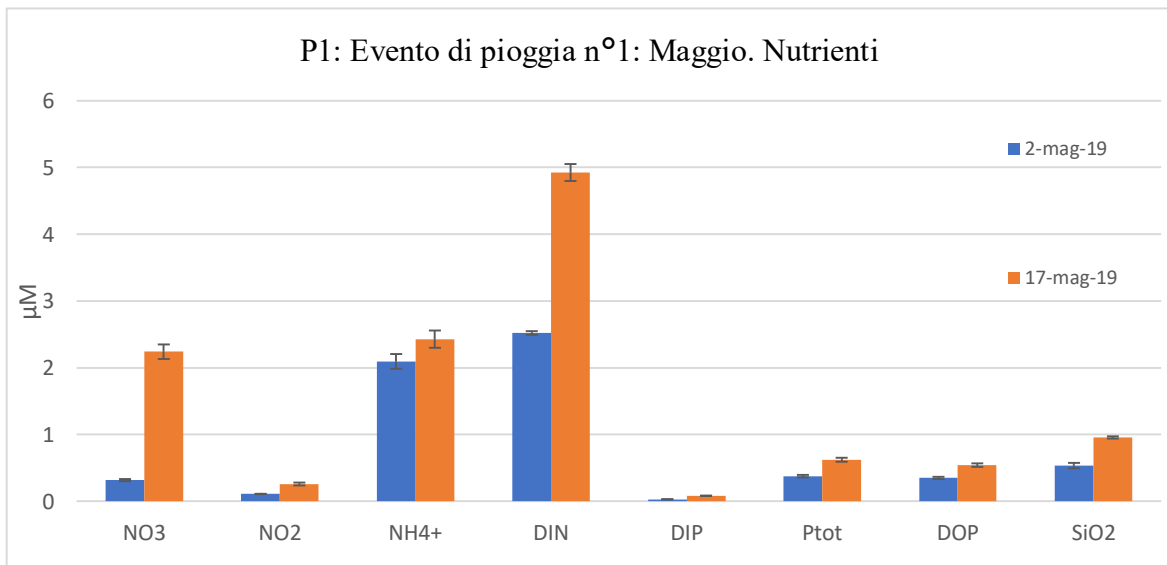


Fig. 84: P1, concentrazione nutrienti conseguente ad evento piovoso

Tutti i parametri analizzati subiscono un incremento in concentrazione, evidente nella figura 84 e nelle tabelle 10 e 11. Tutti i nutrienti incrementano le loro concentrazioni di circa il doppio del valore iniziale al termine dell'evento piovoso, ad eccezione dei nitrati - NO₃, i quali passano da 0.32 μM a 2.24 μM, incrementando la loro concentrazione di 7 volte il valore iniziale.

Tab. 10: Nutrienti P1, evento di pioggia Maggio 2019

	Data	NO ₃ μM	NO ₂ μM	NH ₄ ⁺ μM	DIN μM	DIP μM	Ptot μM	DOP μM	SiO ₂ μM
Evento 1, P1		0.32							
	02- mag	±	0.11 ±	2.095 ±	2.52±	0.027±	0.376 ±	0.35±	0.534 ±
		0.02	0.003	0.11	0.03	0.001	0.02	0.02	0.04
		2.24							
	17- mag	±	0.27 ±	2.43 ±	4.925 ±	0.081 ±	0.621 ±	0.54 ±	0.96 ±
		0.11	0.02	0.13	0.13	0.004	0.03	0.03	0.02

Tab. 11: PMEase e parametri aggiuntivi evento 1.

	Data	Phosphatase activity μmol pNP L ⁻¹ h ⁻¹	Turbidity NTU	Salinity ppt	Conductivity mS
Evento 1, P1	02-mag	35.0 ± 2.3	8.1	35.8	54.3
	17-mag	47.9 ± 2.83	10.1	30.6	47.2

Al fronte degli 80mm di pioggia ricaduti nell'arco di 10 giorni dal secondo campionamento effettuato (17 maggio), l'attività fosfatase aumenta da un valore di 35 μmol pNP L⁻¹ h⁻¹ (02 maggio) a 47.9 μmol pNP L⁻¹ h⁻¹ (17 maggio), conseguentemente all'apporto di materia organica ed all'incremento delle concentrazioni di DOP (da 0.35 μM a 0.54 μM). La diminuzione della salinità, da 35.8 ppt a 30.6 ppt e della conducibilità elettrica, la quale subisce una diminuzione da 54.3 mS a 47.2 mS sono direttamente collegate all'apporto di

acqua dolce di origine meteorica e fluviale giunte nel sito costiero P1. La torbidità subisce un incremento da 8.1 NTU a 10.1 NTU, dovuto all'incremento dell'idrodinamismo generatosi al fronte dell'evento meteorico.

4.6.2. Evento 2: 18 Novembre 2019 – 22 Novembre 2019.

L'evento 2 è stato monitorato per i siti P1 e P2. Dall'8 al 18 Novembre vengono registrati 45.4 mm di pioggia dalla stazione Fiumesino (Falconara M.ma, AN), codice sensore 3032. In concomitanza dell'evento meteorico si verifica inoltre una mareggiata consistente, durante la quale l'acqua marina è rientrata all'interno della linea di costa fino ad oltre 15m.

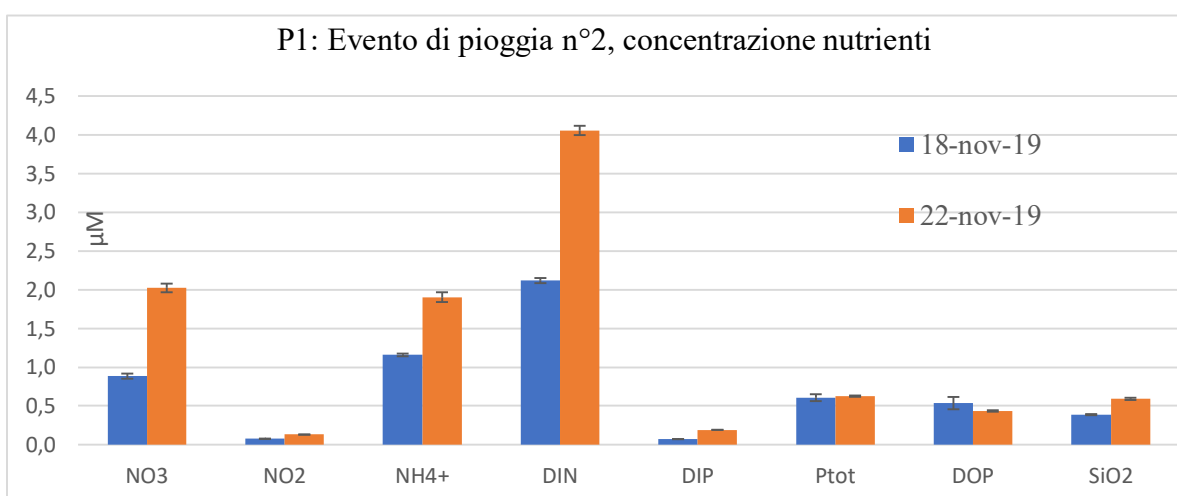


Fig. 85: P1, concentrazioni di nutrienti conseguente ad evento piovoso e mareggiata.

Diversamente da ciò che ci attendevamo di riscontrare, ed analogamente all'evento 1 (02 maggio – 17 maggio), tutti i nutrienti incrementano le loro concentrazioni di circa due volte il loro valore iniziale (fig. 85 e tab. 12). L'unico parametro che subisce una diminuzione è il DOP, il quale cala in concentrazione da 0.54 µM a 0.43 µM.

Tab. 12: P1, concentrazione nutrienti

		NO3	NO2	NH4+	DIN	DIP	Ptot	DOP	SiO2
		μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
	18-	$0.88 \pm$	$0.076 \pm$	1.159	2.118	$0.072 \pm$	0.607	0.535	0.388
Evento	nov	0.03	0.003	± 0.02	± 0.03	0.001	± 0.04	± 0.08	± 0.01
	2 - P1	$2.02 \pm$	$0.130 \pm$	1.903	4.056	$0.191 \pm$	0.626	0.435	0.590
	nov	0.06	0.002	± 0.06	± 0.06	0.002	± 0.01	± 0.01	± 0.01

Tab. 13: P1, PMEase e parametri addizionali

		Phosphatase activity $\mu\text{mol pNP L}^{-2}$ h^{-1}	Turbidity NTU	Salinity ppt	Conductivity mS
Evento 2 -	18-nov	47.4 ± 1.4	20.4	35.2	53.3
P1	22-nov	37.0 ± 1.3	4.3	33.4	51.1

L'elevata torbidità riscontrata il 18 Novembre (20.4 NTU) è dovuta alla risospensione del substrato sabbioso dovuto all'eccessivo idrodinamismo generato dalla mareggiata; a distanza di quattro giorni la torbidità diminuisce notevolmente fino ad un valore di 4.3 NTU. L'attività fosfatasica diminuisce da $47.4 \mu\text{mol pNP L}^{-1} \text{h}^{-1}$ a $37.0 \mu\text{mol pNP L}^{-1} \text{h}^{-1}$, al fronte di una lieve diminuzione delle concentrazioni di DOP (da $0.53 \mu\text{M}$ a $0.43 \mu\text{M}$) e dell'aumento delle concentrazioni di DIP (da $0.07 \mu\text{M}$ a $0.19 \mu\text{M}$).

La salinità subisce una lieve diminuzione, da 35.2 ppt a 33.4 ppt, in linea alla diminuzione di conducibilità elettrica, la quale passa da 53.3 mS a 51.1 mS.

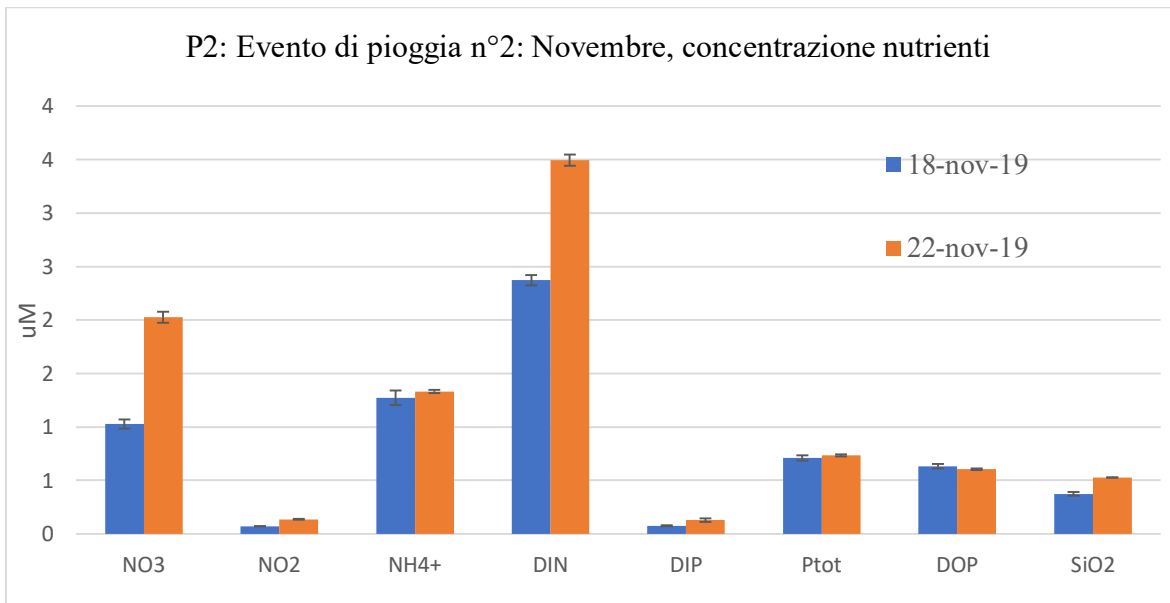


Fig. 86: P2, concentrazione nutrienti conseguentemente ad evento piovoso e mareggiata.

Nel sito P2 (fig. 86, tab. 14 e 15), analogamente a quanto riscontrato in P1, i nitriti, nitrati e silicati subiscono un incremento in concentrazione di circa due volte il loro valore iniziale. Il DOP subisce una lieve diminuzione, passando da 0.63 µM a 0.61 µM. La concentrazione dell'ammoniaca rimane pressochè stazionaria.

Tab. 14: P2, concentrazione nutrienti

		NO3	NO2	NH4+	DIN	DIP	Ptot	DOP	SiO2
		µM	µM	µM	µM	µM	µM	µM	µM
	18-	1.03 ±	0.072 ±	1.27 ±	2.37 ±	0.077 ±	0.71 ±	0.63 ±	0.38 ±
Evento	nov	0.04	0.001	0.07	0.05	0.004	0.03	0.02	0.02
	22-	2.03 ±	0.137 ±	1.33 ±	3.49 ±	0.13 ±	0.73 ±	0.61 ±	0.528 ±
2 - P2	nov	0.05	0.004	0.01	0.05	0.02	0.01	0.01	0.001

Tab. 15: PMEase e parametri addizionali

		Phosphatase activity	Turbidity	Salinity	Conductivity
		$\mu\text{mol pNP L}^{-1} \text{h}^{-1}$	NTU	ppt	mS
Evento 2 -	18-nov	52.6 ± 2.8	19.1	34.5	52.3
P2	22-nov	38.3 ± 0.5	4.9	34.4	52.2

Nel sito P2, analogamente a quanto riscontrato nel sito P1, notiamo una diminuzione dell'attività fosfatase considerevole, la quale passa da $52.6 \mu\text{mol pNP L}^{-1} \text{h}^{-1}$ a $38.3 \mu\text{mol pNP L}^{-1} \text{h}^{-1}$ al fronte di un incremento nelle concentrazioni di DIP, il quale passa da $0.077 \mu\text{M}$ a $0.12 \mu\text{M}$.

La salinità e la conducibilità elettrica, diversamente dal sito P1, rimangono per lo più costanti.

La torbidità riscontrata il 18 Novembre di 19.1 NTU è dovuta all'eccessivo idrodinamismo e risospensione del substrato sabbioso, presente sia sulla costa che sul fondale. A distanza di quattro giorni, la torbidità diminuisce fino ad un valore di 4.9 NTU.

5. CONCLUSIONI

Nell'alto Adriatico gli impianti di depurazione di Lignano e San Giorgio sembrano determinare un impatto antropico relativamente ai nutrienti trascurabile, in quanto tutte le concentrazioni determinate restano ben al di sotto dei valori limite di legge. Il depuratore di Lignano mostra valori di fosforo inorganico (DIP) e nitriti (NO_2) più alti rispetto quanto riscontrato in San Giorgio. Viceversa, il depuratore di San Giorgio mostra valori di azoto ammoniacale (NH_4^+) più alti rispetto quanto riscontrato nel depuratore di Lignano. I livelli di silicati (SiO_2) e di nitrati (NO_3) determinati nei due depuratori non mostrano differenze.

Nella costa anconetana, i siti P1, P2 e P3 mostrano similarità considerevoli e sono fosforo-limitati, mentre il sito P4 risulta l'unico sito tendenzialmente azoto-limitato.

Le concentrazioni di nutrienti in mare aumentano in concomitanza di eventi meteorici, con conseguente apporto fluviale.

Le analisi effettuate hanno dimostrato che l'Adriatico si conferma fosforo limitato nella quasi totalità dei casi, sia nel golfo di Trieste che nella costa anconetana.

La deficienza di fosforo inorganico in ambiente marino può venir sopperita dall'attività dell'enzima fosfomonoesterasi (PMEase), in grado di rendere biodisponibile il fosforo organico disciolto (DOP) all'assimilazione da parte degli organismi. Lo studio dell'attività fosfataseica è quindi di fondamentale importanza negli ambienti marini, in quanto molte specie algali che posseggono tali enzimi possono produrre intense fioriture nonostante l'apparente P-limitazione presente in queste aree. Questo aspetto diventa ancora più importante se si considera che molte di queste alghe sono in grado di produrre e rilasciare sostanze tossiche nelle acque, con la possibilità di essere biomagnificate lungo la rete trofica

minando gli equilibri ecosistemici e la salute umana, specialmente in caso di fioriture straordinarie (Davidson et al., 2011; Bean et al., 2011, Accoroni et al., 2017). A questo proposito, molti studi evidenziano come le fioriture di alghe tossiche siano in aumento a livello globale (Anderson, 1998; Van Dolah, 2000).

L'attività fosfatasica sembra aumentare con l'incremento delle concentrazioni di DOP e con l'avvento di precipitazioni atmosferiche, indice di trasporto fluviale.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- A. C. Redfield, 1934, Redfield, A. C. (1934). On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. James Johnstone memorial volume, 176-192.
- A. C. Redfield, 1958. The biological control of chemical factors in the environment, pp. 230A, 205-221, pp. 207.
- A. C. Redfield, BH Ketchum, FA Richards; 1963. The influence of organisms on the composition of seawater. MN Hill (Ed.), The Sea, Vol. 2, Wiley-Interscience, New York (1963).
- Accoroni, S., Totti, C., Razza, E., Congestri, R., Campanelli, A., Marini, M., & Ellwood, N. T. W. (2017). Phosphatase activities of a microepiphytic community during a bloom of *Ostreopsis cf. ovata* in the northern Adriatic Sea. *Water research*, 120, 272-279.
- Anderson, D. M. (2009). Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean & coastal management*, 52(7), 342-347.
- Benovic, A., Lucic, D., Onofri, V., Pehardia, M., Caric, M., Jasprica, N., & Bobanovic-Colic, S. (2000). Ecological characteristics of the Mljet Islands seawater lakes (South Adriatic Sea) with special reference to their resident populations of medusae. *Scientia Marina*, 64(S1), 197-206.
- Cembella, A. D., Antia, N. J., Harrison, P. J., & Rhee, G. Y. (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 2. *CRC Critical reviews in microbiology*, 11(1), 13-81.

- Cembella, A. D., Antia, N. J., Harrison, P. J., & Rhee, G. Y. (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *CRC Critical reviews in microbiology*, 10, pp. 317-391.
- Cibic, T., Cerino, F., Karuza, A., Fornasaro, D., Comici, C., & Cabrini, M. (2018). Structural and functional response of phytoplankton to reduced river inputs and anomalous physical-chemical conditions in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *Science of the Total Environment*, 636, 838-853.
- D. Degobbis, "Stoichiometric Model of Nutrient Cycling in the Northern Adriatic Sea and its Relations to Regeneration Processes", *Mar. Chem.*, vol. 29
- D. S. Baldwin, (2013). Organic phosphorus in the aquatic environment. *Environmental Chemistry*, 10(6), 439-454.
- D.m. anderson, a.d. cembella, g. Hallegraeff (eds.), the physiological ecology of harmful algal blooms, springer-verlag, heidelberg (1998), pp. 29-48
- D'Silva, Maria Shamina, et al. "Algal blooms: a perspective from the coasts of India." *Natural hazards* 63.2 (2012): 1225-1253.
- Dissolved inorganic and organic phosphorus uptake in *Trichodesmium* and the microbial community: The importance of phosphorus ester in the Sargasso Sea. *Limnology and oceanography*, 55(3), Pp. 1390-1399.
- Dyrhman, S.T., Ruttenberg, K.C., 2006. Presence and regulation of alkaline phosphatase activity in eukaryotic phytoplankton from the coastal ocean: implications for dissolved organic phosphorus remineralization. *Limnol. Oceanogr.* 51, pp. 1381-1390.
- F. Van dolah; marine algal toxins. *Env. Health persp.*, 108 (2000), pp. 133-141

- Granéli, E., Carlsson, P., Turner, J. T., Tester, P. A., Béchemin, C., Dawson, R., & Funari, E. (1999). Effects of N: P: Si ratios and zooplankton grazing on phytoplankton communities in the northern Adriatic Sea. I. Nutrients, phytoplankton biomass, and polysaccharide production. *Aquatic Microbial Ecology*, 18(1), 37-54.
- I. Pojed, S. Kveder, "Investigation of nutrient limitation of phytoplankton production in northern Adriatic", *Rapp. P.-V. Reun. Comm. Int. Mer Mediterr.*, vol. 24, pp. 47-48, 1977.
- J.A. Bean, I.e. Fleming, B. Kirkpatrick, L.C. Backer, K. Nierenberg, A. Reich, Y.S. cheng, a. Wanner, j. Benson, j. Naar, r. Pierce, w.m. abraham, g. Kirkpatrick, j. Hollenbeck, j. Zaias, e. Mendes, d.g. baden, 2011. Florida red tide toxins (brevetoxins) and longitudinal respiratory effects in asthmatics. *Harmful algae*, 10, pp. 744-748.
- K. Davidson, p. Tett, r. R. Hester, r. Harrison (eds.), *gowen; harmful algal blooms; marine pollution and human health (2011)*, pp. 95-127.
- Kaltenböck, E., & Herndl, G. J. (1992). Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the Northern Adriatic Sea. IV. Dissolved nutrients and the autotrophic community associated with marine snow. *Marine Ecology-Progress Series*, 87, 147-147.
- Langner, C. L., & Hendrix, P. F. (1982). Evaluation of a persulfate digestion method for particulate nitrogen and phosphorus. *Water Research*, 16(10), 1451-1454.
- Larato, Chiara, et al. "Production and utilization of organic matter in different P-availability conditions: A mesocosm experiment in the Northern Adriatic Sea." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 391.1-2, 2010. Pp: 131-142.

- Michel Loreau, 1995. Coexistence of Multiple Food Chains in a Heterogeneous Environment: Interactions Among Community Structure, Ecosystem Functioning, and Nutrient Dynamics. *Mathematical biosciences*, 134(2), 153-188.
- Nicholson, D., Dyhrman, S., Chavez, F., & Paytan, A. (2006). Alkaline phosphatase activity in the phytoplankton communities of Monterey Bay and San Francisco Bay. *Limnology and Oceanography*, 51(2), 874-883.
- Oh, S.J., Yamamoto, T., Kataoka, Y., Matsuda, O., Matsuyama, Y., Kotani, Y., 2002. Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Fish. Sci.* 68, 416-424.
- Orchard, E. D., Ammerman, J. W., Lomas, M. W., & Dyhrman, S. T. (2010).
- Penna, N., Capellacci, S., & Ricci, F. (2004). The influence of the Po River discharge on phytoplankton bloom dynamics along the coastline of Pesaro (Italy) in the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 48(3-4), 321-326.

Physiology and bloom dynamics of toxic alexandrium species, with emphasis on life cycle transitions.
- Reisenhofer, E., Adami, G., & Favretto, A. (1996). Heavy metals and nutrients in coastal, surface seawaters (Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea): an environmental study by factor analysis. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 354(5-6), 729-734.
- Rose, C., Axler, R.P., 1998. Uses of alkaline phosphatase activity in evaluating phytoplankton community phosphorus deficiency. *Hydrobiologia* 361, 145–156.

- Santinelli, C., Ibello, V., Lavezza, R., Civitarese, G., & Seritti, A. (2012). New insights into C, N and P stoichiometry in the Mediterranean Sea: The Adriatic Sea case. *Continental Shelf Research*, 44, 83-93.
- Suzumura, M., Ishikawa, K., Ogawa, H., 1998. Characterization of dissolved organic phosphorus in coastal seawater using ultrafiltration and phosphohydrolytic enzymes. *Limnol. Oceanogr.* 43, pp. 1553-1564.
- Turner, B.L., Baxter, R., Ellwood, N.T.W., Whitton, B.A., 2001. Characterization of the phosphate activities of mosses in relation to their environment. *Plant Cell. Environ.* 24, 1165-1176.
- UNESCO (1988) Eutrophication in the Mediterranean Sea: receiving capacity and monitoring of long-term effects. *UNESCO reports in marine science*, 49, 195 pp.
- Van Dolah, F. M. (2000). Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental health perspectives*, 108 (suppl 1), 133-141.
- Vollenweider, R. A., Rinaldi, A., & Montanari, G. (1992). Eutrophication, structure and dynamics of a marine coastal system: results of ten-year monitoring along the Emilia-Romagna coast (Northwest Adriatic Sea). *Marine Coastal Eutrophication*, 63–106.
- Vollenweider, Richard A., et al. "Assessment of the state of eutrophication in the Mediterranean Sea." *MAP Technical Reports Series (UNEP)* (1996).
- Whitton, B.A., Al-Shehri, A.M., Ellwood, N.T.W., Turner, B.L., 2005. Ecological aspects of phosphate activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes. In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic Phosphorus in the environment*. CAB International, Wallingford, pp. 205-241.

- Zavatarelli, M., Raicich, F., Bregant, D., Russo, A., & Artegiani, A. (1998). Climatological biogeochemical characteristics of the Adriatic Sea. *Journal of Marine Systems*, 18(1-3), 227-263.
- Zoppini, A., Pettine, M., Totti, C., Puddu, A., Artegiani, A., & Pagnotta, R. (1995). Nutrients, standing crop and primary production in western coastal waters of the Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 41(5), 493-513.

Sitografia

- ARPAE 2018:Azoto: <https://webbook.arpae.it/indicatore/Concentrazione-di-azoto-00004/?espandi=Descrizione>
- ARPAE 2018: Fosforo: <https://webbook.arpae.it/indicatore/Concentrazione-di-fosforo-00004/?espandi=Descrizione>
- ISPRA, annuario 2018, eutrofizzazione: <https://annuario.isprambiente.it/ada/basic/6976>

Ringraziamenti

Si ringraziano i prof. Anna Annibaldi e Stefano Accoroni, estremamente presenti e disponibilissimi durante l'arco di sviluppo della tesi; lo staff del laboratorio di chimica analitica: Federico, Flavio e Leonardo; la Protezione Civile Marche per la reperibilità dei dati meteo e chiunque ho incontrato durante il percorso: professori, tesisti e compagni.