

# Procedura di deperimetrazione dei SIN, implementazione della procedura per la stima del Livello di Effetto Grave (LEG)

Massimiliano Lippi, **Paolo Fastelli** e Roberto Riccio

**BIO**CHEMIE *lab*  
competenza italiana nel settore analisi

Livorno, 22/11/2023



# LE: Livello di Effetto

concentrazione di un determinato inquinante oltre la quale sono attesi effetti tossici con una certa probabilità (p)

- **LEC – Livello di Effetto Certo (p=0.95)**
- **LEMP – Livello di Effetto Molto Probabile (p=0.75)**
- **LSE – Livello soglia di Effetto (p=0,5)**

## ➤ **Decreto MATTM 173 del 15/06/2016**

ALLEGATO TECNICO - APPENDICE 2F:  
CRITERIO PER LA STIMA DEL LIVELLO DI  
EFFETTO GRAVE (LEG)

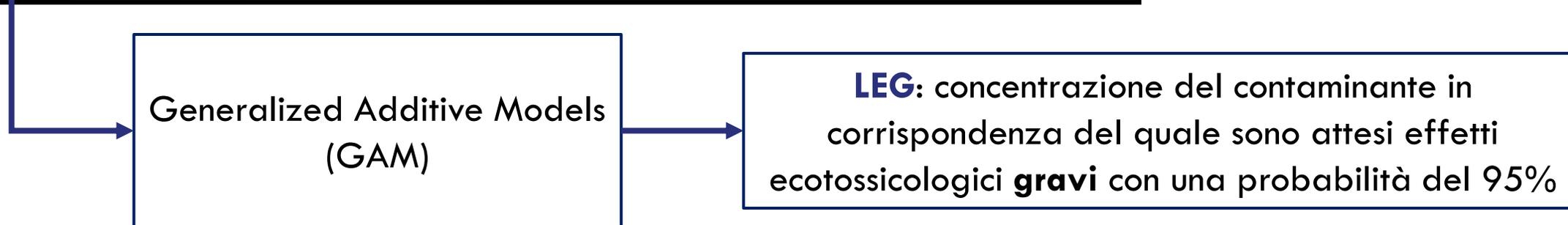
## ➤ **Decreto MATTM 351 del 08/06/2016**

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

# Decreto MATTM 173 del 15/07/2016

<b>Classe A</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>› RIPASCIMENTO della spiaggia emersa con pelite <math>\leq 10\%</math> o altro valore stabilito su base regionale;</li><li>› RIPASCIMENTO della spiaggia sommersa con frazione sabbiosa prevalente;</li><li>› IMMERSIONE DELIBERATA IN AREE MARINE NON COSTIERE (oltre le 3mn);</li><li>› IMMERSIONE IN AMBIENTE CONTERMINATO MARINO-COSTIERO Per ogni opzione deve essere prevista una graduale attività di monitoraggio ambientale</li></ul>
<b>Classe B</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>› IMMERSIONE DELIBERATA IN AREE MARINE NON COSTIERE (oltre le 3mn) con monitoraggio ambientale;</li><li>› IMMERSIONE IN AMBIENTE CONTERMINATO in ambito portuale, incluso capping, con monitoraggio ambientale</li></ul>
<b>Classe C</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>› IMMERSIONE IN AMBIENTE CONTERMINATO in ambito portuale in grado di trattenerne tutte le frazioni granulometriche del sedimento, incluso capping all'interno di aree portuali, con idonee misure di monitoraggio ambientale</li></ul>
<b>Classe D</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>› IMMERSIONE IN AMBIENTE CONTERMINATO IMPERMEABILIZZATO, con idonee misure di monitoraggio ambientale</li></ul>
<b>Classe E</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>› EVENTUALE RIMOZIONE IN SICUREZZA DALL'AMBIENTE MARINO DOPO VALUTAZIONE DI RISCHIO, secondo quanto previsto dalla normativa vigente</li></ul>

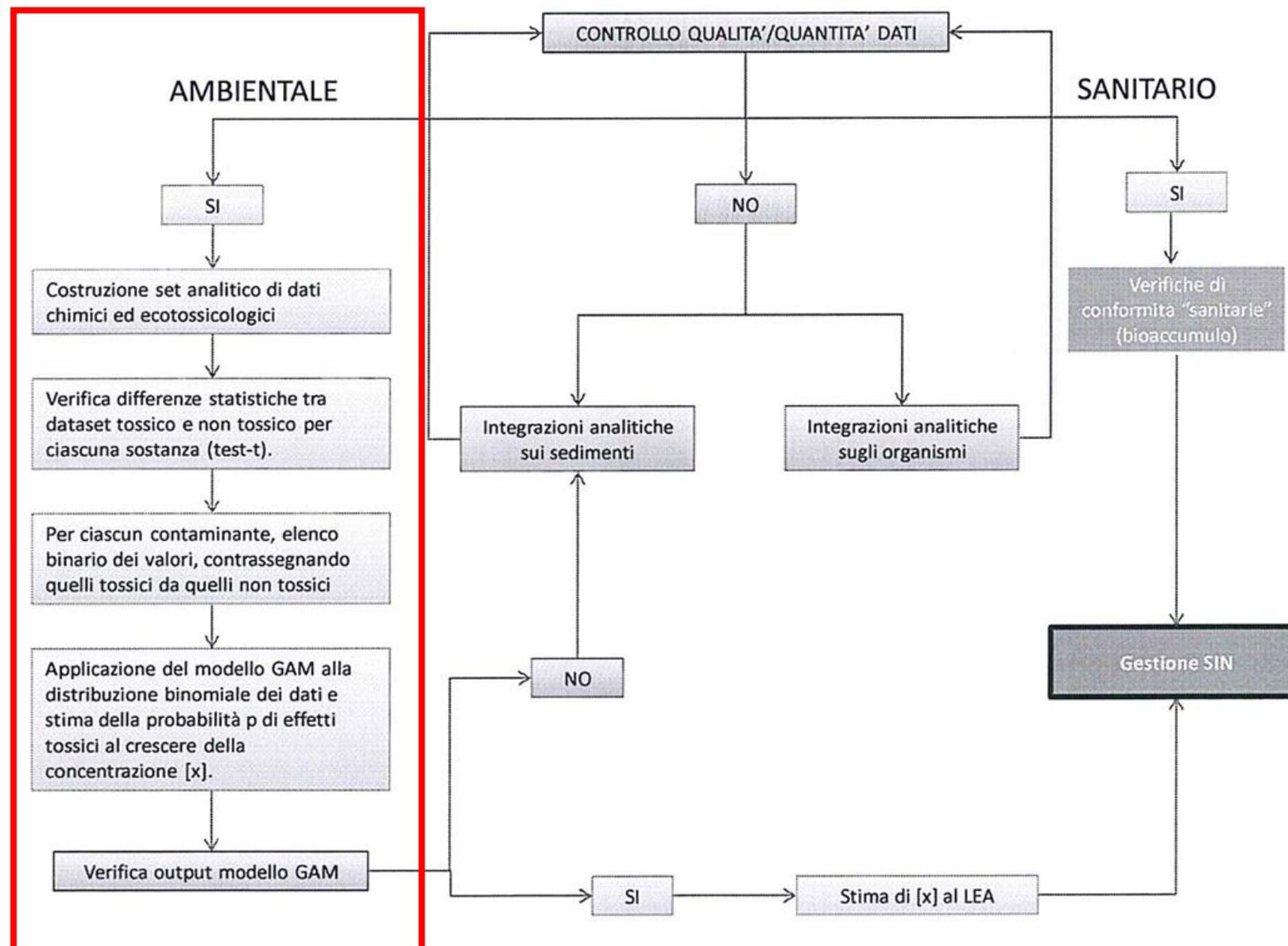
<i>HQ<sub>BATTERIA</sub></i>	Livello di pericolo
< 1.0	→ Assente
$\geq 1.0$ - < 1.5	→ Basso
$\geq 1.5$ - < 3.0	→ Medio
$\geq 3.0$ - < 6.0	→ Alto
$\geq 6.0$ - $\leq 10.0$	→ Molto Alto



# Decreto MATTM 351 del 08/06/2016

$HQ_{BATTERIA}$	Livello di pericolo
< 1.0	→ Assente
≥ 1.0 - < 1.5	→ Basso
≥ 1.5 - < 3.0	→ Medio
≥ 3.0 - < 6.0	→ Alto
≥ 6.0 - ≤ 10.0	→ Molto Alto

**LEC:** in corrispondenza del 95% di probabilità di riscontrare generici effetti tossici



# Script R per il calcolo del LEG

```
1 # Cambia la cartella di lavoro
2 setwd("C://Users//Utente//Desktop")
3
4 # Carica i dati dal csv
5 data<-read.csv("Sostanza.csv",header=T,sep=";")
6
7
8
9 # Esegue il t test
10 x<-data[,1]
11 Y<-data[,2]
12
13 data0<-subset(data,Y=="0")
14 data1<-subset(data,Y=="1")
15
16 data0_sup<-subset(data0,data0[,1]>=median(data0[,1]))
17 data1_sup<-subset(data1,data1[,1]>=median(data1[,1]))
18
19 data_sup<-rbind(data0_sup,data1_sup)
20
21 t.test(data_sup[,1]~data_sup[,2],var.equal=F)
22
23
24 # Carica il package mgcv
25 library(mgcv)
26
27 # Chiama l'help per il package
28 ? mgcv
29
30 # Scelgo un livello di effetto e creo una variabile numerica p che lo contiene
31 p <- 0.95
32
33 # Formulazione del modello GAM
34 mod<-gam(Y~s(X,k=5),family=binomial(link = "logit"),data=data)
35 # Stimare i valori di p in corrispondenza dei valori osservati del contaminante
36 pred<-predict(mod,type="response",se=T)
37
38 # Generare una variabile aleatoria uniforme nell'intervallo [0,max(x)]
39 seq<-runif(10000,0,max(x))
40 newd<-data.frame(X=seq)
41
42 # Stimare i valori di p per ogni valore della variabile uniforme
43 pred2<-predict(mod,newd,type="response")
44
45 plot(seq,pred2,xlab="X (contaminante)",ylab="p (probabilit? di tossicit?)",cex=0.2)
46 abline(p,0,col="red")
47
48 # Tutti i valori di X con probabilit?? di tossicit?? >p
49 X_tossici<-seq[pred2>p]
50 # Stima del Livello di Effetto
51 LE<-min(X_tossici)
52 # Valore del Livello di Effetto
53 LE
```



➤Necessita della disponibilità sia delle analisi chimiche che ecotossicologiche

➤Concentrazioni distribuite in un ampio range

## GAM

➤Esegue lo script per ogni composto

➤Un dataset per ogni composto attribuendo a ciascun campione il valore di 0/1 in base alla tossicità

➤distribuzione binomiale con funzione con una pendenza positiva al crescere della concentrazione

# Scopo

🎯 Attraverso l'implementazione di un nuovo strumento bioinformatico che parte dal LIMS e utilizzando set di dati reali, l'obiettivo è dimostrare **l'efficacia, l'applicabilità pratica, il risparmio di tempo e la standardizzazione** degli output del processo di caratterizzazione per la gestione dei sedimenti marini

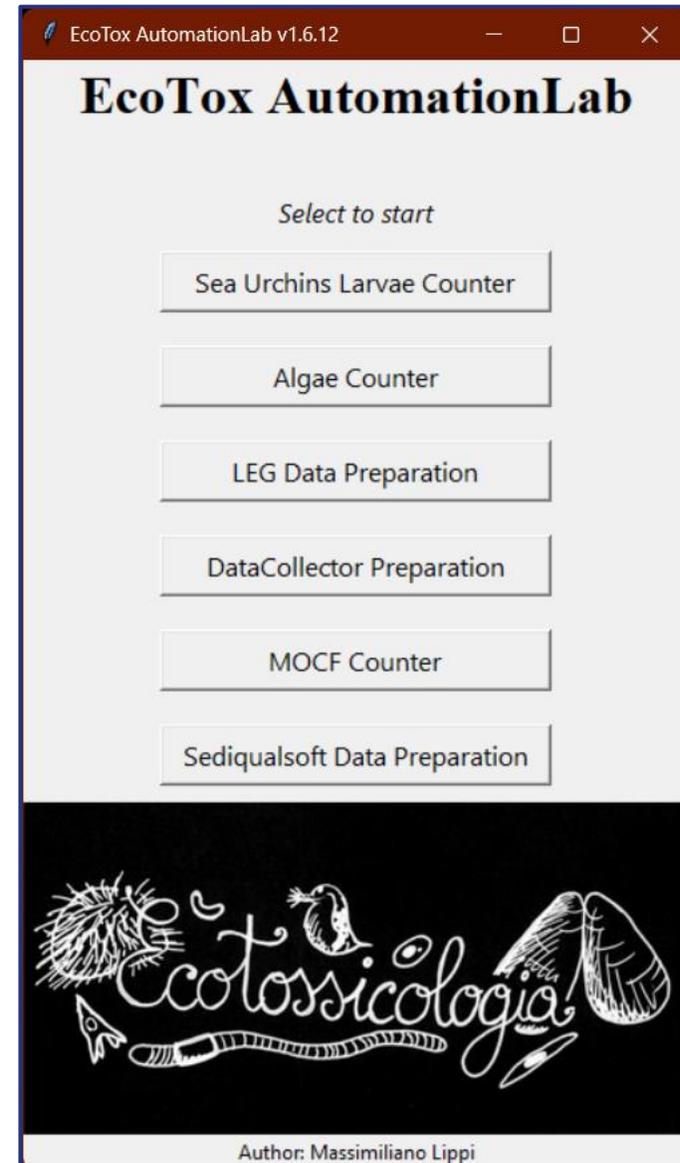
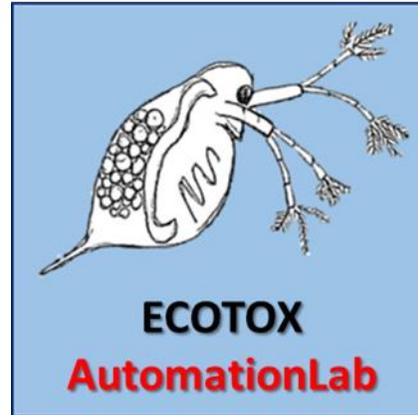
🤖 Automazione del processo di **acquisizione** dati

🤖 Automazione del processo di **trasferimento e trasformazione** dati

🤖 Automazione del **calcolo** del LEG e produzione report

# EcoTox Automation Lab

-  Tkinter
-  Winsound
-  Datetime
-  Pandas
-  Numpy
-  Os
-  PIL
-  Logging
-  Pyinstaller



# Larvae Counter

Sea Urchins Larvae Counter v1.3.8

Sample:  Confirm

Dilution:  Confirm

Max Count:  Start

**Normal Larvae:** 0

**Malformed Larvae:** 0

Reset Save

Campione: codice\_campione Concentrazione: 50 Saved! Normali: 72 Anormali: 28

End

1- In Sample inserire il codice del campione e cliccare su "Confirm"  
2- In Dilution inserire la concentrazione del campione e cliccare il tasto "Confirm"  
3- In Max Count inserire il numero massimo di conteggi che si vuole raggiungere e premere il tasto "Start"  
4- Usare il tasto "a" sulla tastiera per contare le larve di riccio Normali e "s" per le larve di riccio Malformate  
5- Quando la somma dei contatori raggiunge il valore inserito in MaxCount, il contatore si ferma ed emette un suono  
6- Controllare che i dati presenti nelle stringhe Campione, Concentrazione, Normali e Anormali siano corretti e salvarli cliccando su "Save"  
7- Apparirà la scritta Saved a confermare il salvataggio  
8- Il tasto reset permette di azzerare i contatori e iniziare un nuovo conteggio, ricordarsi di aggiornare campione e diluizione se sono differenti  
9- Effettuare tutti i conteggi necessari cliccando "Save" al termine e reset per riniziare un nuovo conteggio  
10- Una volta terminati i conteggi cliccare il pulsante "End"

NB: Si creerà un file .csv chiamato Conta\_Ricci\_YYYY\_MM\_DD\_temp che contiene i singoli conteggi di ogni campione in cui vengono appesi i risultati di ogni conteggio, al termine, dopo aver premuto il tasto "End" si creerà il file finale Conta\_Ricci\_YYYY\_MM\_DD che conterrà una singola riga per ogni campione-concentrazione e i rispettivi conteggi di ogni replica, il file temporaneo viene cancellato

FINITO UN ORDINE CLICCARE END, CHIUDERE IL PROGRAMMA E RINOMINARE IL FILE GENERATO  
RIAPRIRE IL PROGRAMMA AD OGNI NUOVO ORDINE PER GENERARE UN NUOVO FILE  
in caso di mancato salvataggio, rinominare il file temp contenente i conteggi con altro nome, generare un nuovo file con una riga a caso, aprire il csv\_temp, ricopiare la riga con intestazione colonne nel file rinominato dei conteggi e rinominare tale file come temp eliminando il file generato per prendere le colonne, chiudere il file temp così da continuare il conteggio

Author: Massimiliano Lippi Versione 1.3.8

# Algae Counter

Algae Counter v1.2.4

Sample:  Confirm

Dilution:  Confirm

Replica:  Confirm

Start Restart

**Algae Counter:** 0

Campione: codice\_campione Concentrazione: 50 Replica: 1

1-Cell Count: 24 Save

2-Cell Count: 59 Save

3-Cell Count: 62 Save

Reset Save Total

End

1- In Sample inserire il codice del campione o il controllo e cliccare "Confirm"  
2- In Dilution inserire la concentrazione del campione e cliccare "Confirm"  
3- In Replica inserire il numero di replica ch si sta contando di quel campione e cliccare "Confirm"

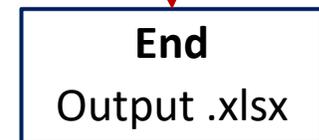
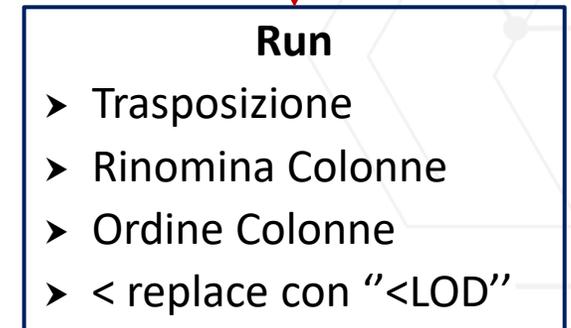
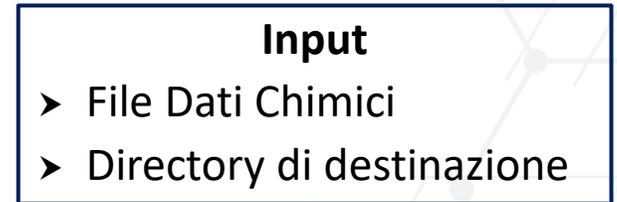
IN GRASSETTO SI TROVANO I CODICI CHE SARANNO SALVATI AL TERMINE DEL CONTEGGIO

4- Cliccare su "Start" per iniziare a il conteggio, in caso di necessità si può azzerare con "Restart"  
5- Contare le cellule algali con il tasto "a" della tastiera  
6- Una volta terminato il conteggio di un quadrato della Camera di Burkler cliccare "Save"  
7- Cliccare "Save" per salvare anche il secondo e terzo conteggio della camera di Burkler. SE IL CONTEGGIO 0 CLICCA SAVE CON 0.  
8- Terminato il conteggio delle 3 Celle, cliccare "Save Total" per scrivere nel file .csv Conta\_alghe\_YYYY\_MM\_DD\_temp i valori contati  
9- Cliccare reset per azzerare il contatore generale e i conteggi delle 3 Celle  
10- Modificare i codici di Sample, Dilution e Replica e iniziare un nuovo conteggio  
11- Terminate tutte le repliche del campione, cliccare su "End" per salvare il file .csv definitivo chiamato Conta\_alghe\_YYYY\_MM\_DD

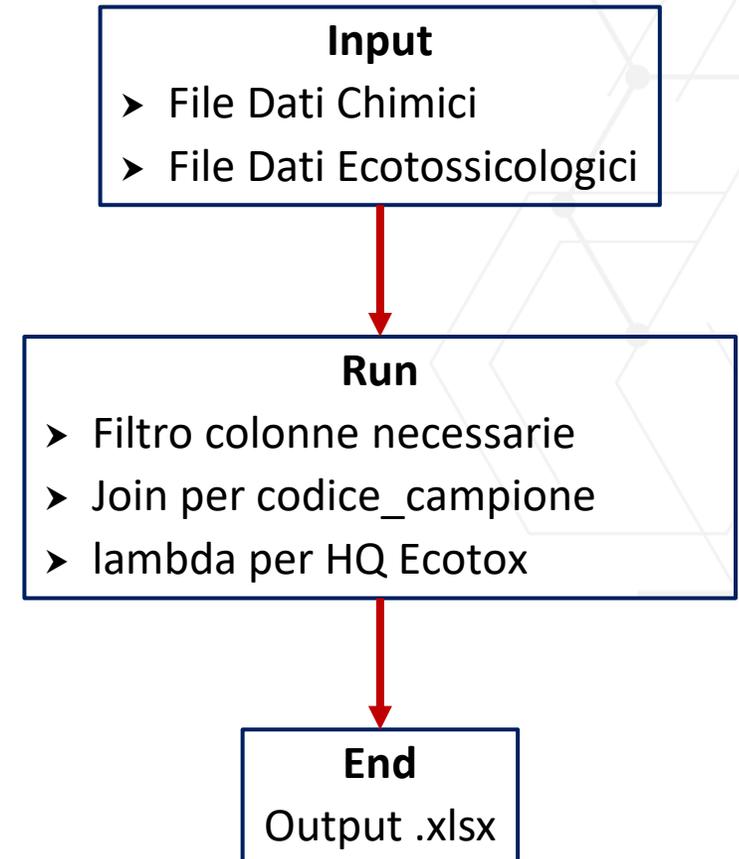
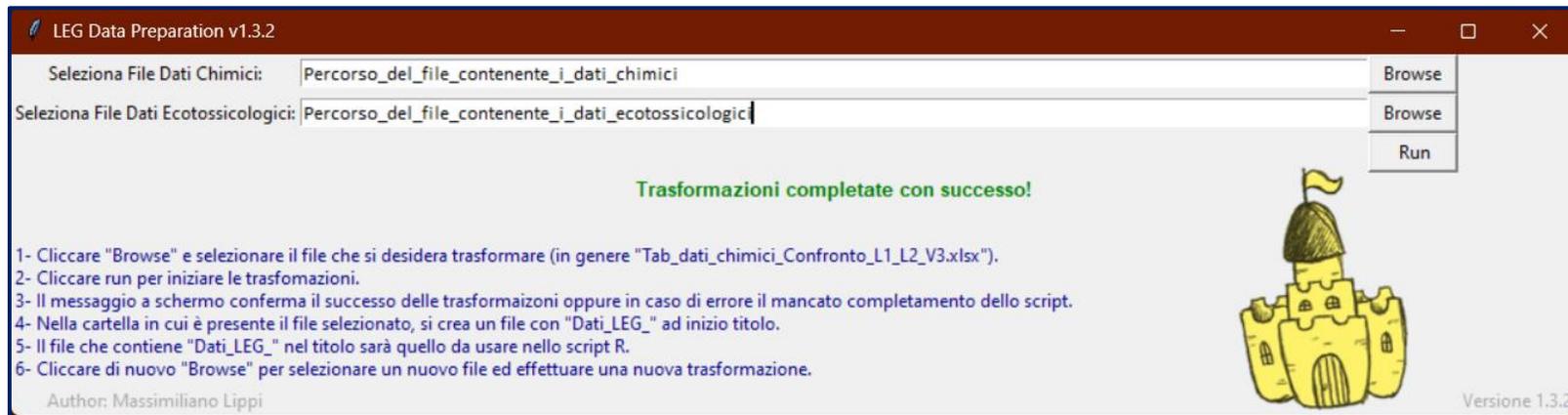
NEL FILE CSV DEFINITIVO LE 3 CELLE CONTATE DI OGNI REPLICHA VENGONO MEDIATE TRA LORO E MOLTIPLICATE PER 10000.  
IL FILE CONTIENE IL PUNTO (.) COME SEPARATORE DECIMALE, CAMBIARE CON LA VIRGOLA (,) IN BASE ALLE IMPOSTAZIONI DEL PC.

Author: Massimiliano Lippi Versione 1.2.4

# Sediqualsoft Data Preparation

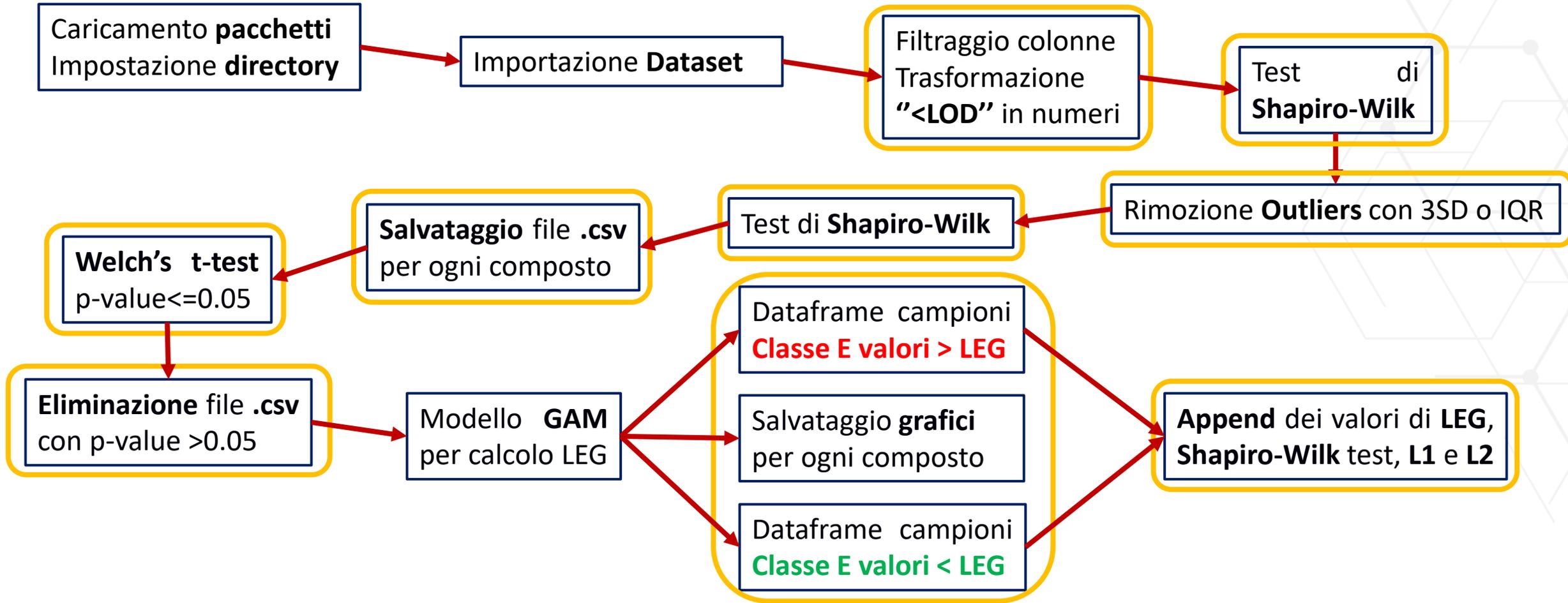


# LEG Data Preparation





# Script R per il calcolo automatizzato del LEG



# Script R per il calcolo automatizzato del LEG

## Rimozione **Outlier**

### Triplo Deviazione Standard (**3SD**)

- ▶ Distribuzione Normale

$$T_{min} = media - a \times DS$$

$$T_{max} = media + a \times DS$$

### Intervallo Interquartile (**IQR**)

- ▶ Influenzato dai valori anomali quando Q1 o Q3 si trovano all'interno dei valori anomali

$$T_{min} = Q1 - c \times IQR$$

$$T_{max} = Q3 + c \times IQR$$

$$IQR = Q3 - Q1$$

# Caso studio

39 campioni su cui è stato effettuato un set completo di analisi chimico-fisiche ed ecotossicologiche

Sample Coding	Core Thickness (m)	Depth (m)	Sample Coding	Core Thickness (m)	Depth (m)	Sample Coding	Core Thickness (m)	Depth (m)	Sample Coding	Core Thickness (m)	Depth (m)
A	0.0 - 0.5	10	K	0.5 - 1.0	9.7	U	0.5 - 1.0	7	AE	0.0 - 0.5	8.5
B	0.0 - 0.5	10	L	0.0 - 0.5	6	V	1.0 - 2.0	7	AF	0.0 - 0.5	8.5
C	0.0 - 0.5	9.5	M	0.5 - 1.0	6	W	0.0 - 0.5	6.1	AG	0.0 - 0.5	7.5
D	0.5 - 1.0	9.5	N	1.0 - 2.0	6	X	0.5 - 1.0	6.1	AH	0.5 - 1.0	7.5
E	0.0 - 0.5	9.8	O	2.0 - 3.0	6	Y	1.0 - 2.0	6.1	AI	1.0 - 2.0	7.5
F	0.5 - 1.0	9.8	P	0.0 - 0.5	6.5	Z	2.0 - 3.0	6.1	AJ	0.0 - 0.5	8
G	0.0 - 0.5	9.3	Q	0.5 - 1.0	6.5	AA	0.0 - 0.5	8	AK	0.5 - 1.0	8
H	0.5 - 1.0	9.3	R	1.0 - 2.0	6.5	AB	0.5 - 1.0	8	AL	0.0 - 0.5	8
I	1.0 - 1.5	9.3	S	2.0 - 2.5	6.5	AC	0.0 - 0.5	8.5	AM	0.5 - 1.0	8
J	0.0 - 0.5	9.7	T	0.0 - 0.5	7	AD	0.0 - 0.5	8.5			

*Riepilogo dei campioni con spessore e profondità*

# Risultati: Integrazione ponderata

CARATTERIZZAZIONE ECOTOSSICOLOGICA	
<b>MOLTO ALTO</b>	0 Campioni
<b>ALTO</b>	11 Campioni
<b>MEDIO</b>	10 Campioni
<b>BASSO</b>	2 Campioni
<b>ASSENTE</b>	16 Campioni

*Livello di pericolo Ecotossicologico*

CARATTERIZZAZIONE CHIMICA	
<b>MOLTO ALTO</b>	39 Campioni
<b>ALTO</b>	0 Campioni
<b>MEDIO</b>	0 Campioni
<b>BASSO</b>	0 Campioni
<b>ASSENTE</b>	0 Campioni

*Livello di pericolo chimico*

CLASSIFICAZIONE SEDIMENTI	
<b>A</b>	0 Campioni
<b>B</b>	0 Campioni
<b>C</b>	0 Campioni
<b>D</b>	28 Campioni
<b>E</b>	11 Campioni

*Classe di qualità dei sedimenti*

# Risultati: Stima del LEG

Codice_campione	Acenaffilene	Benzo_b_fluorantene	Benzo_k_fluorantene	Cd	Idrocarburi_C12	Naftalene	Pirene
A	8.07	88	40	0.249	140000	4.13	175
C	6.99	66.1	25.6	0.245	180000	3.98	65.2
D	5.25	41.9	18	0.151	110000	1.18	47.7
E	8.06	87.1	33.3	0.232	170000	4.35	162
F	7.99	68.3	24.3	0.351	220000	3.57	98.3
G	6.21	50.3	20.3	0.239	140000	2.58	52.8
H	7.08	58.9	22.7	0.262	170000	3.93	60.5
I	7.66	60.8	23.4	0.222	170000	2.66	82.5
J	7.55	63.9	24.4	0.122	130000	3.12	82.6
K	19.2	164	67.5	0.243	220000	8.19	262
O	5.41	101	41.6	0.135	230000	2.88	119
LEG	9.37	119.04	50.2	0.246	168568	3.48	134.87
L1		40	20	0.3		35	153
L2		500	500	0.8	50000	391	1398

Original script – 7 composti

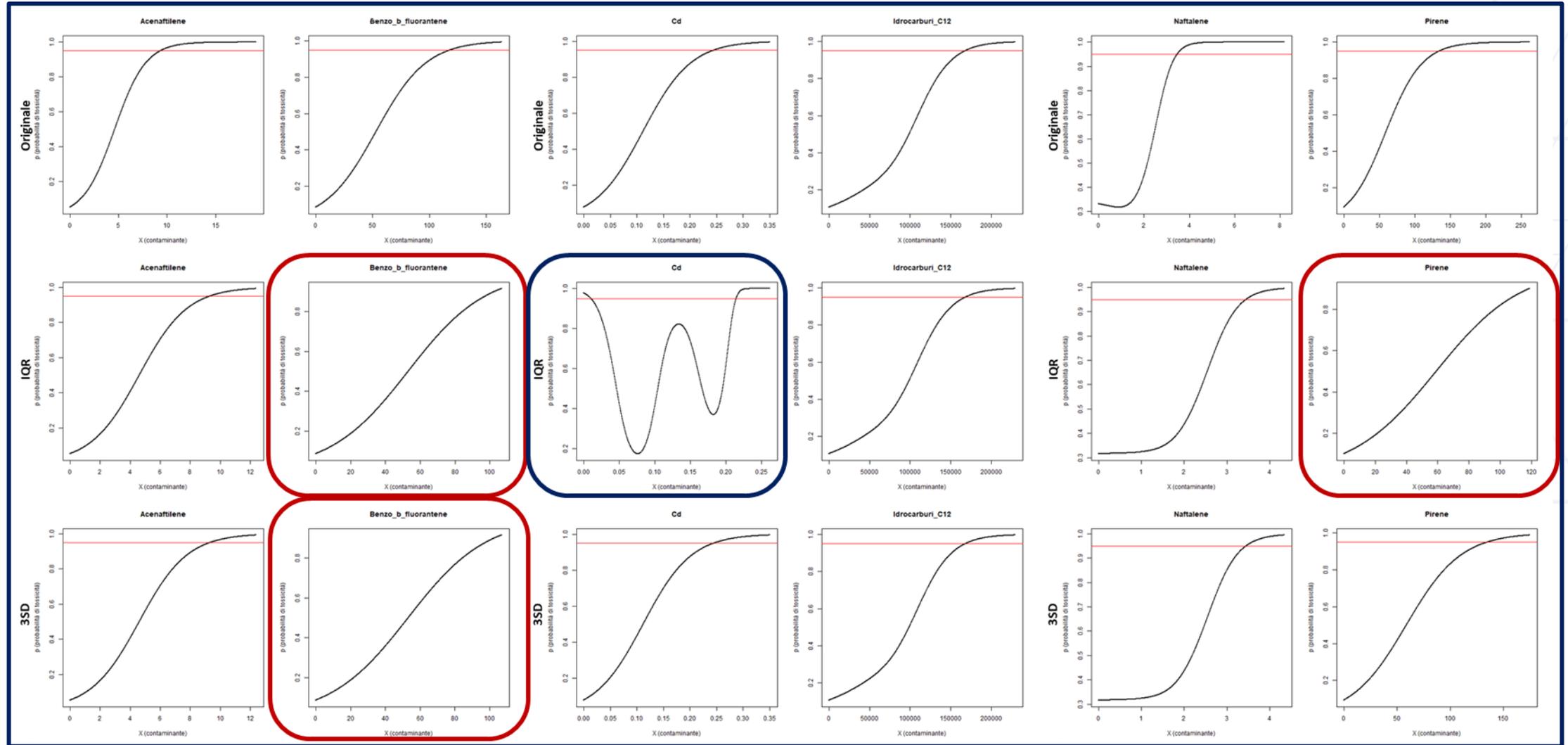
IQR – 14 composti

Codice_campione	2_4_DDE	4_4_DDE	Acenaffilene	Antracene	Benzo_b_fluorantene	Cd	Cr	Fluorene	Idrocarburi_C12	Naftalene	Ni	PCB_52	Pirene	Somma_DDE
A	1.67	1.76	8.07	15.5	88	0.249	60	4.31	140000	4.13	53.6	0.05	175	3.43
C	1.88	1.34	6.99	12.5	66.1	0.245	66.2	3.52	180000	3.98	58.1	0.525	65.2	3.22
D	1.57	1.52	5.25	6.84	41.9	0.151	51.5	1.94	110000	1.18	46.3	0.524	47.7	3.09
E	2.52	1.94	8.06	16.8	87.1	0.232	71.5	6.6	170000	4.35	63.6	0.747	162	4.46
F	2.8	2.27	7.99	12.7	68.3	0.351	86.7	3.65	220000	3.57	77.7	1.39	98.3	5.07
G	1.89	1.6	6.21	8.99	50.3	0.239	79	2.83	140000	2.58	71.2	0.234	52.8	3.49
H	1.24	1.25	7.08	11.4	58.9	0.262	75.2	3.39	170000	3.93	71	0.638	60.5	2.49
I	1.86	1.8	7.66	10.8	60.8	0.222	67.6	3.22	170000	2.66	64.3	0.05	82.5	3.66
J	1.41	1.28	7.55	12.3	63.9	0.122	40.9	3.6	130000	3.12	38.4	0.404	82.6	2.69
K	1.29	1.23	19.2	32	164	0.243	80.8	9.88	220000	8.19	74.3	0.363	262	2.52
O	1.93	1.79	5.41	19.6	101	0.135	74.3	23.7	230000	2.88	55	2.37	119	3.72
LEG	Inf	Inf	9.36	Inf	Inf	0.00000158	Inf	Inf	168553	3.45	Inf	Inf	Inf	Inf
L1				24	40	0.3	50	21		35	30		153	1.8
L2				245	500	0.8	150	144	50000	391	75		1398	3.7
Shapiro_pre	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal
Shapiro_post	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Not Normal	Normal	Normal	Not Normal	Normal	Normal	Not Normal	Normal	Not Normal

3SD – 13 composti

Codice_campione	2_4_DDE	4_4_DDE	Acenaffilene	Benzo_b_fluorantene	Benzo_k_fluorantene	Cd	Cr	Idrocarburi_C12	Naftalene	Ni	PCB_52	Pirene	Somma_DDE
A	1.67	1.76	8.07	88	40	0.249	60	140000	4.13	53.6	0.05	175	3.43
C	1.88	1.34	6.99	66.1	25.6	0.245	66.2	180000	3.98	58.1	0.525	65.2	3.22
D	1.57	1.52	5.25	41.9	18	0.151	51.5	110000	1.18	46.3	0.524	47.7	3.09
E	2.52	1.94	8.06	87.1	33.3	0.232	71.5	170000	4.35	63.6	0.747	162	4.46
F	2.8	2.27	7.99	68.3	24.3	0.351	86.7	220000	3.57	77.7	1.39	98.3	5.07
G	1.89	1.6	6.21	50.3	20.3	0.239	79	140000	2.58	71.2	0.234	52.8	3.49
H	1.24	1.25	7.08	58.9	22.7	0.262	75.2	170000	3.93	71	0.638	60.5	2.49
I	1.86	1.8	7.66	60.8	23.4	0.222	67.6	170000	2.66	64.3	0.05	82.5	3.66
J	1.41	1.28	7.55	63.9	24.4	0.122	40.9	130000	3.12	38.4	0.404	82.6	2.69
K	1.29	1.23	19.2	164	67.5	0.243	80.8	220000	8.19	74.3	0.363	262	2.52
O	1.93	1.79	5.41	101	41.6	0.135	74.3	230000	2.88	55	2.37	119	3.72
LEG	Inf	2.4	9.36	Inf	Inf	0.246	Inf	168538	3.45	Inf	Inf	134.9	5.48
L1				40	20	0.3	50		35	30		153	1.8
L2				500	500	0.8	150	50000	391	75		1398	3.7
Shapiro_pre	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal	Not Normal
Shapiro_post	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Not Normal	Normal	Not Normal	Normal	Normal	Not Normal	Normal	Normal

# Risultati: Stima del LEG





# Sviluppi futuri



**Dataset più numerosi**



**Dataset provenienti da altre regioni geografiche**



**Applicazione di modelli diversi dal GAM**



**Adattamento agli sviluppi normativi**

# GRAZIE PER L'ATTENZIONE

**BIOCHEMIE** *lab*

competenza italiana nel settore analisi

Via di Limite 27/G,  
50013 Campi Bisenzio (FI)

☎ 055 88 75 41

📠 055 88 62 700

📧 info@biochemielab.it

[www.biochemielab.it](http://www.biochemielab.it)



LAB N° 0195



Laboratorio riconosciuto dal Consiglio Direttivo  
Internazionale ICOP per l'analisi fisico-chimica  
di oli di oliva e oli di semola di grano duro  
(Tipo A/NC) (SUL/2018 - 30/1/2020)