

**ENI S.p.A. - DIVISIONE E&P**

**PROGRAMMA DI MONITORAGGIO  
TRANSFRONTALIERO AI SENSI DEL DECRETO DEL  
MATTM 2008-000271 DEL 12-12-2008 RELATIVO  
ALL'INSTALLAZIONE DELLA PIATTAFORMA DI  
ESTRAZIONE DI IDROCARBURI GASSOSI  
“ANNAMARIA B”**

**4° SURVEY SUCCESSIVO ALLE OPERAZIONI DI INSTALLAZIONE  
(I SEMESTRE 2012)**

**INDAGINI FISICHE, CHIMICHE ED ECOTOSSICOLOGICHE DELLA  
COLONNA D'ACQUA, ANALISI DI INQUINANTI IN ORGANISMI MARINI**

**OPERATORE SCIENTIFICO:  
CNR – ISMAR SEDE DI ANCONA**

**RESPONSABILE SCIENTIFICO:  
GIANNA FABI**

**RAPPORTO A CURA DI:  
GIANNA FABI  
STEFANO DE RANIERI  
ALESSIO GOMIERO  
CRISTINA NASCI  
ALESSANDRA SPAGNOLO**

**ANCONA, Dicembre 2014**



# INDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>MATERIALI E METODI</b> .....	4
2.1.	CAMPIONAMENTO IN MARE .....	5
2.1.1.	MISURE CORRENTOMETRICHE .....	5
2.1.2.	INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA .....	5
2.1.2.1	Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina.....	7
2.1.3.	ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA .....	7
2.1.4.	ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> .....	8
2.2.	ANALISI DI LABORATORIO E ANALISI DEI DATI .....	8
2.2.1.	MISURE CORRENTOMETRICHE.....	8
2.2.2.	INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA .....	9
2.2.2.1	Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina.....	9
2.2.3.	ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA .....	11
2.2.3.1	<i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	11
2.2.3.2	<i>Vibrio fischeri</i> .....	12
2.2.3.3	<i>Tigriopus fulvus</i> .....	13
2.2.4.	ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> .....	14
2.2.4.1	Biomarkers .....	14
2.2.4.2	Metalli pesanti .....	20
2.2.4.3	Idrocarburi totali .....	21
<b>3.</b>	<b>RISULTATI</b> .....	23
3.1.	MISURE CORRENTOMETRICHE .....	23
3.2.	INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA ....	27
3.2.1.	TEMPERATURA, SALINITÀ, TORBIDITÀ, OSSIGENO DISCIOLTO E TRASPARENZA .....	27
3.2.2.	FLUORESCENZA INDOTTA E CLOROFILLA A .....	31
3.2.3.	RICERCA DI IDROCARBURI TOTALI SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA.....	33
3.3.	ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI D'ACQUA MARINA .....	34
3.3.1.	<i>DUNALIELLA TERTIOLECTA</i> .....	34
3.3.2.	<i>VIBRIO FISCHERI</i> .....	36
3.3.3.	<i>TIGRIOPUS FULVUS</i> .....	38
3.4.	ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> .....	40
3.4.1.	BIOMARKERS .....	40
3.4.2.	METALLI PESANTI .....	46
3.4.3.	IDROCARBURI TOTALI .....	48
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONI</b> .....	49
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	53
<b>ALLEGATO A</b>	Schede tecniche della strumentazione utilizzata nelle indagini .....	I
- ALL. A1	Colonna d'acqua: Indagini fisiche e chimiche e Idrocarburi totali .....	II
- ALL. A2	Analisi di inquinanti in <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	VII

## PARTECIPANTI AL PROGRAMMA

Il presente programma è stato svolto in collaborazione con il Consorzio Interuniversitario di Biologia Marina ed Ecologia Applicata (CIBM) di Livorno, la Società Thetis S.p.A. di Venezia e con il Lab Control s.r.l. di Rovigo.

Responsabile Scientifico                      G. Fabi                      CNR - ISMAR Ancona

Misure correntometriche e analisi fisiche e chimiche della colonna d'acqua

S. Bruno                      Thetis S.p.A Venezia

M. Conchetto                      Thetis S.p.A Venezia

Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina

A. Gomiero                      Thetis S.p.A.Venezia

S. Ruzza                      Lab Control s.r.l. Rovigo

Ecotossicologia su campioni di acqua marina

S. De Ranieri                      CIBM Livorno

N. Bigongiari                      CIBM Livorno

L. Kozinkova                      CIBM Livorno

C. Pretti                      Università degli Studi di Pisa

C. Nasci                      Thetis S.p.A Venezia

M. Bergamin                      Thetis S.p.A Venezia

A. Gomiero                      CNR - ISMAR Ancona

R. Lo Re                      Thetis S.p.A Venezia

F. Perin                      Thetis S.p.A Venezia

M. Picone                      Thetis S.p.A Venezia

Analisi di inquinanti in organismi marini

A. Gomiero                      CNR - ISMAR Ancona

Hanno inoltre collaborato allo svolgimento dei campionamenti in mare i Sigg.ri G. Gaetani e A. Marziali imbarcati sulla M/R Tecnopeca II del CNR-ISMAR UOS Ancona utilizzata per le indagini.

## 1. INTRODUZIONE

In riferimento al Programma di Monitoraggio Transfrontaliero ai sensi del Decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B" e redatto da ISPRA in collaborazione con il Centro di Ricerche Marine dell'Istituto Ruder Bošković (Croazia), il CNR-ISMAR Sede di Ancona è stato incaricato da ENI S.p.A. – Divisione E&P di effettuare un monitoraggio volto a valutare il potenziale impatto ambientale conseguente l'installazione della suddetta piattaforma.

La piattaforma Annamaria B è stata installata a circa 60 km al largo di Pesaro alla profondità di circa 60 m, nella zona delle sabbie relitte del largo. L'area in cui è posizionata Annamaria B è particolarmente interessante dal punto di vista idrodinamico in quanto, trovandosi sulla mid-line, ovvero la linea mediana che divide in due longitudinalmente l'Adriatico, non è influenzata in maniera consistente dalla circolazione generale del bacino (diretta verso Nord lungo il versante croato e verso Sud lungo quello italiano). Tuttavia, in alcuni periodi dell'anno, può essere soggetta a un maggiore idrodinamismo dovuto al passaggio sul fondo di acque dense formatesi nel Nord Adriatico durante la stagione invernale che, avendo caratteristiche chimiche e fisiche differenti da quelle presenti in zona, possono modificare le caratteristiche biogeochimiche e la distribuzione spaziale dei sedimenti. Inoltre, gli strati più superficiali della colonna d'acqua (10-20 m) possono essere interessati da eventi di Bora anche abbastanza consistenti, che possono determinare variazioni brusche di correnti.

In base a quanto prescritto nel Piano Transfrontaliero le indagini da svolgere durante la fase di installazione della struttura e perforazione dei pozzi riguardavano i seguenti aspetti:

1. caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d'acqua (1 survey);
2. caratteristiche fisiche e chimiche dei sedimenti (2 survey);
3. ecotossicologia su campioni di sedimento (2 survey);
4. studio del macrozoobenthos (2 survey).

Per quanto concerne le caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d'acqua (punto 1), il monitoraggio è stato condotto nell'inverno 2010 (Fabi *et al.*, 2010a). Per le caratteristiche fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti e il macrozoobenthos (punti 2-4) i due survey sono stati condotti nell'estate 2009 e

nell'inverno 2010 (Fabi *et al.*, 2010a; 2010b; Tab. 1-I).

Nella fase successiva all'installazione della piattaforma, della durata complessiva di 5 anni, gli aspetti da indagare sono i seguenti:

1. misure correntometriche (2 volte/anno per almeno 1 mese ogni volta);
2. caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d'acqua (2 volte/anno);
3. ricerca di idrocarburi totali su campioni di acqua marina (2 volte/anno);
4. ecotossicologia su campioni di acqua marina (2 volte/anno);
5. indagini fisiche e chimiche dei sedimenti (1 volta/anno; estate);
6. ecotossicologia su campioni di sedimento (1 volta/anno; estate);
7. analisi di biomarkers, metalli pesanti e idrocarburi totali in organismi marini (2 volte/anno).

Nel presente rapporto sono descritti i risultati relativi ai punti 1-4 e 7 del precedente elenco ottenuti nel corso del I semestre 2012 (IV survey post lavori; inverno 2012; Tab. 1-I) confrontati, ove possibile, con i dati pregressi. Nell'estate 2010 non è stato possibile condurre le analisi di inquinanti e biomarkers in organismi marini in quanto, al momento del campionamento (settembre), sulle parti sommerse della piattaforma era presente solo una scarsa quantità di esemplari di *Mytilus galloprovincialis* le cui dimensioni erano troppo ridotte per permettere l'esecuzione delle suddette analisi (Fabi *et al.*, 2011a).

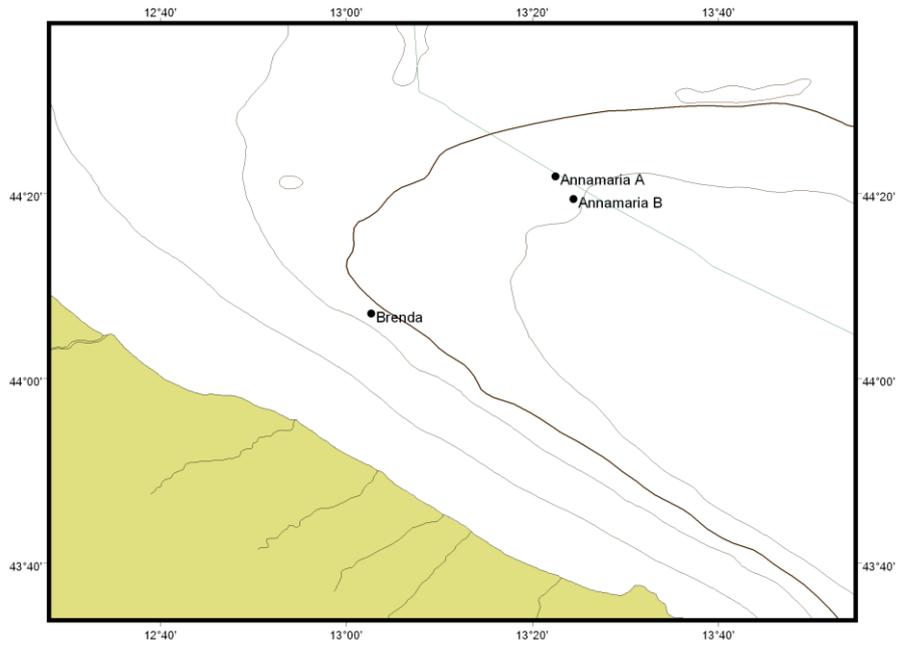
**Tab. 1-I** – Cronoprogramma dei survey previsti durante il programma di monitoraggio ambientale transfrontaliero. In grigio le indagini richieste dal Piano di monitoraggio transfrontaliero; **x** = survey già effettuati. **nc** = non campionati per scarsa presenza di esemplari insediati sulle parti sommerse della piattaforma.

Aspetti indagati	Survey durante i lavori di installazione		Survey dopo i lavori di installazione										
	Est '09	Inv '10	Est '10	Inv '11	Est '11	Inv '12	Est '12	Inv '13	Est '13	Inv '14	Est '14	Inv '15	
Correntometria			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Caratteristiche fisiche e chimiche colonna d'acqua		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Ricerca di idrocarburi totali su campioni di acqua marina			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Ecotossicologia su campioni di acqua marina			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Caratteristiche fisiche e chimiche sedimenti	x	x	x		x		x		x		x		
Ecotossicologia su campioni di sedimento	x	x	x		x		x		x		x		
Analisi su <i>M. galloprovincialis</i>			nc	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Macrozoobenthos	x	x											

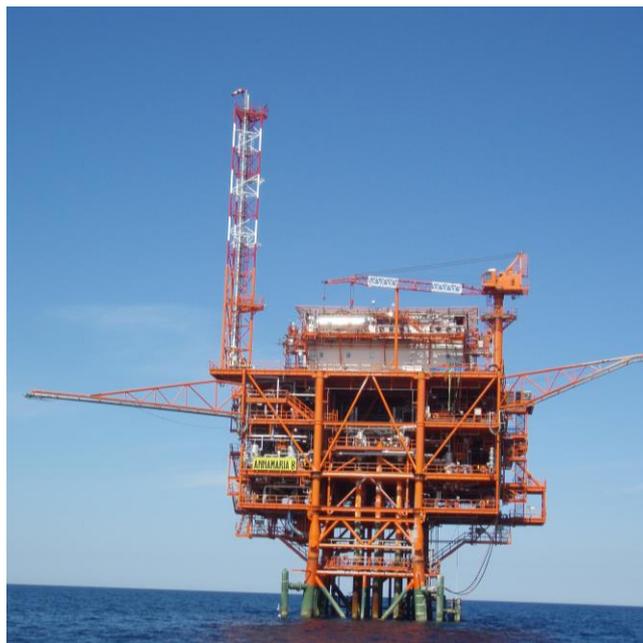
Per quanto concerne le concentrazioni di idrocarburi totali e l'ecotossicologia lungo la colonna d'acqua, non si è potuto effettuare un confronto con i dati pregressi relativi alla fase di costruzione della struttura (Fabi *et al.*, 2010a; 2010b) poiché il Piano di monitoraggio transfrontaliero ha previsto schemi di campionamento e/o tipologie di indagini differenti tra il durante e il post-lavori. Per altri aspetti (parametri fisici e chimici della colonna d'acqua) è stato possibile solo un confronto parziale per i medesimi motivi di cui sopra.

## 2. MATERIALI E METODI

Come già accennato nel Cap. 1, la piattaforma Annamaria B è ubicata a circa 60 km al largo di Pesaro a una profondità di circa 60 m (figg. 2.1 e 2.2). Le coordinate del punto in cui è installata la struttura sono riportate in Tab. 2-I.



**Fig. 2.1** – Ubicazione della piattaforma Annamaria B.



**Fig. 2.2** - Piattaforma Annamaria B.

**Tab. 2-I** – Coordinate geografiche della piattaforma Annamaria B.

Sito	Coordinate Geografiche
Piattaforma Annamaria B	44°19'21'',78N 13°24'24'',90E

## **2.1. CAMPIONAMENTO IN MARE**

### **2.1.1. MISURE CORRENTOMETRICHE**

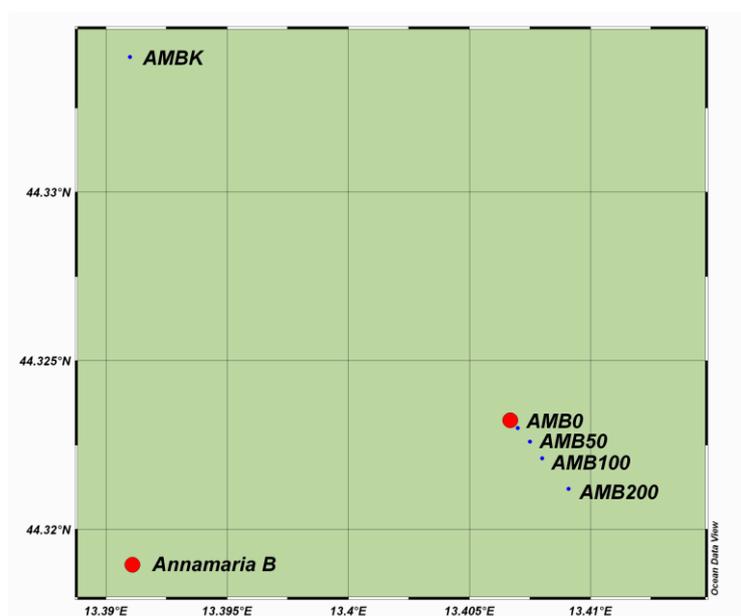
Nel 2011 è stata utilizzata una catena correntometrica composta da una zavorra di circa 120 kg di catena di ferro e da due correntometri acustici (modello Aquadopp della ditta Nortek AS; All. A1-I), uno posto a circa 3 m dal fondo (alla profondità di circa 57 m dalla superficie) e un altro posto a circa 46 m dal fondo (alla profondità di circa 14 m dalla superficie). Mediante tali strumenti sono stati registrati, ad intervalli di 10', i valori di direzione e intensità delle correnti, oltre a quelli di temperatura, in corrispondenza delle due quote. La catena correntometrica è stata posizionata dal 09/03/2011 al 12/04/2011. Si è quindi proceduto al recupero per effettuare lo scarico dei dati, la manutenzione degli strumenti e la sostituzione delle batterie. Il riposizionamento della catena correntometrica è avvenuto il 23/05/2011, rimanendo in seguito operativa fino al 15/09/2011, data in cui la catena correntometrica è stata recuperata per effettuare lo scarico dei dati. Nello stesso giorno, è stato posizionato un sistema di misura costituito da un correntometro acustico profilante ad effetto Doppler ADCP (Acoustic Doppler Current Profiler) della ditta Teledyne RD Instruments, mod. Workhorse Sentinel 300 kHz, integrato con sensore interno per la misura della temperatura (All. A1-II). L'ADCP è stato posizionato sul fondale utilizzando un apposito supporto in acciaio inox AISI 316L, al quale è stato accoppiato uno sganciatore acustico della ditta Sonardyne mod. LRT Light Release Transponder munito di apposito pallone di spinta, necessario per il successivo recupero della strumentazione. Tale sistema di misura è rimasto operativo fino al 24/02/2012. Infine, è stato effettuato un nuovo posizionamento dell'ADCP il 18/05/2012 il cui recupero è avvenuto 27/03/2013. Nel presente rapporto sono riportati i dati sino al 30 giugno 2012.

### **2.1.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA**

Come richiesto dal Piano di monitoraggio transfrontaliero per la fase successiva

all'installazione della piattaforma Annamaria B (2 campagne/anno), al fine di monitorare le condizioni ambientali nella zona d'installazione della piattaforma Annamaria B una prima campagna di misure è stata condotta nel settembre 2010. I survey successivi sono stati invece effettuati a marzo e agosto 2011 e nel febbraio 2012.

E' stato tracciato un transetto intersecante la piattaforma orientato in direzione NW-SE (fig. 2.3; Tab. 2-II). Lungo tale transetto sono state posizionate 4 stazioni di prelievo: una in corrispondenza della piattaforma (AMB0) e 4 in direzione SE a distanze crescenti dalla struttura (50 m: AMB50; 100 m: AMB100; 200 m: AMB200). E' stata inoltre campionata una stazione di controllo (AMBK) posta a 2000 m di distanza dalla piattaforma in direzione NW.



**Fig. 2.3** - Schema delle stazioni di campionamento utilizzate dopo i lavori di installazione della piattaforma Annamaria B per le indagini idrologiche.

**Tab. 2-II** – Profondità e coordinate geografiche delle stazioni di campionamento utilizzate nel febbraio 2012 per le indagini idrologiche.

Sito	Profondità (m)	Coordinate
AMB0	59,0	44°19'22'',80N 13°24'25'',20E
AMB50	59,0	44°19'21'',36N 13°24'27'',00E
AMB100	59,5	44°19'19'',56N 13°24'28'',80E
AMB200	60,0	44°19'16'',32N 13°24'32'',76E
AMBK	58,5	44°20'02'',40N 13°23'27'',60E

Presso tutti i siti sono stati registrati i valori di temperatura, salinità, fluorescenza, torbidità (misura del materiale sospeso) e ossigeno disciolto lungo tutta la colonna d'acqua utilizzando una sonda multiparametrica CTD (Conductivity-Temperature-Depth) della Idronaut modello OceanSeven 316 *plus* (All. A1-III) equipaggiata, oltre che con i sensori standard di conducibilità, temperatura e pressione, con un sensore di ossigeno per la misurazione della concentrazione di ossigeno disciolto, con un fluorimetro SeaPoint per la misura della fluorescenza indotta (da cui viene derivata la misura indiretta della concentrazione di clorofilla *a*) e con un torbidimetro SeaPoint per la misura della torbidità.

Per il prelievo dei campioni d'acqua sono state utilizzate 4 bottiglie Niskin della General Oceanics della capacità di 5 l, montate sul cavo del verricello di equipaggiamento della N/R. La chiusura delle bottiglie alle profondità previste è stata ottenuta utilizzando idonei messengeri assicurati al cavo stesso.

In ogni stazione è stata misurata la trasparenza della colonna d'acqua mediante disco di Secchi.

Il confronto tra i risultati conseguiti durante i lavori di installazione della piattaforma e i survey condotti nella fase di produzione è stato possibile esclusivamente per il sito posto a 2000 m a NW dalla struttura e per quello posizionato a 100 m a SE, gli unici due campionati in entrambe le fasi di indagine.

#### **2.1.2.1 Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina**

In corrispondenza di tutte le 5 stazioni campionate per le indagini fisiche e chimiche della colonna d'acqua sono stati effettuati anche prelievi a quattro quote (superficie, 20 m, 40 m e fondo) per la misura delle concentrazioni degli Idrocarburi totali utilizzando bottiglie ambrate della capacità di 2,5 l ciascuna (1 bottiglia per ogni quota), prelavate con metanolo e risciacquate prima con acqua demineralizzata e dopo con acqua bidistillata.

#### **2.1.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA**

Presso le medesime stazioni di cui ai Capp. 2.1.2. e 2.1.2.1 sono stati effettuati anche prelievi a quattro quote (superficie, 20 m, 40 m e fondo) per l'esecuzione dei seguenti saggi biologici:

- alghe: *Dunaliella tertiolecta*;

- batteri: *Vibrio fischeri*;
- crostacei: *Tigriopus fulvus*.

In questo caso, sono state utilizzate bottiglie da 250 ml tipo Nalgene prelevate in acido e sciacquate con acqua di rubinetto, acqua demineralizzata e acqua bidistillata (1 bottiglia per ogni saggio e per ogni quota).

#### 2.1.4. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Come già spiegato nel Cap. 1, questo tipo di indagine è stato effettuato per la prima volta nell'inverno 2011; infatti, nel I survey post lavori (estate 2010) non era stato possibile prelevare esemplari di *M. galloprovincialis* poiché, al momento del campionamento, sulle parti sommerse della piattaforma era presente solo una scarsa quantità di mitili di dimensioni troppo ridotte (Fabi *et al.*, 2011a). Nell'inverno ed estate 2011 e nell'inverno 2012 sono stati raccolti n. 2 campioni presso Annamaria B, di cui uno in prossimità e uno lontano dagli anodi sacrificali della piattaforma (VA e LA rispettivamente). Come controllo è stato prelevato un ulteriore campione da un impianto di mitilicoltura al largo di Senigallia (AN).

In Tab. 2-III sono riportate le taglie medie (LC mm  $\pm$  dev.st) degli esemplari campionati nei tre survey.

**Tab. 2-III** - Misure biometriche degli esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati dai tre siti di campionamento durante i tre survey.

Sito	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012
Controllo	4,11 $\pm$ 0,76	4,72 $\pm$ 0,34	4,25 $\pm$ 0,56
Vicino Anodo	5,55 $\pm$ 0,69	5,98 $\pm$ 0,80	5,31 $\pm$ 0,47
Lontano anodo	5,48 $\pm$ 0,66	5,70 $\pm$ 0,63	5,38 $\pm$ 0,47

## 2.2. ANALISI DI LABORATORIO E ANALISI DEI DATI

### 2.2.1. MISURE CORRENTOMETRICHE

Dopo il recupero dello strumento, i dati sono stati validati, processati e sono state calcolate le medie orarie e giornaliere della componente della velocità di corrente orientata verso Nord e della componente orientata verso Est. Inoltre, ai fini della rappresentazione grafica, alle serie temporali della velocità di corrente e della

temperatura sono stati applicati degli algoritmi di smoothing, ai fini di ridurre la variabilità di alta frequenza dei dati.

### 2.2.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA

I campioni d'acqua raccolti sono stati analizzati in laboratorio per valutare il contenuto dell'ossigeno disciolto e della concentrazione di pigmenti clorofilliani.

L'**ossigeno disciolto** è stato quantificato con metodo Winkler (1888): immediatamente dopo il prelievo i campioni d'acqua sono stati fissati con idrossidi misti di manganese e conservati al buio fino alla determinazione effettuata con metodo potenziometrico ed elettrodo di platino (All. A1-IV). Le analisi dell'ossigeno disciolto sono state utilizzate per calibrare la sonda CTD Idronaut OS316*plus*.

Le analisi della **clorofilla a** sono state effettuate secondo il metodo Wright *et al.* (1991) mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography; All. A1-V) *Dionex Ultimate 3000 RSLC*, utilizzando una colonna *C18 Reversed-phase*, una pompa *HPC-3x00 RS* ed un detector a fluorescenza, fluorimetro *Dionex RF-2000*. I dati sono stati acquisiti con il software Chromeleon.

Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati registrati e raccolti tramite la sonda CTD è stato utilizzato il software fornito dalla casa produttrice; le grandezze derivate, come la salinità, sono state calcolate secondo gli algoritmi UNESCO (UNESCO, 1983) seguendo le norme suggerite dall'UNESCO (UNESCO, 1988).

#### 2.2.2.1 Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina

Per la ricerca degli idrocarburi totali lungo la colonna d'acqua è stato seguito il metodo UNI EN ISO 9377-2 (2002). Il campione d'acqua è stato estratto con un agente di estrazione (diclorometano). Le sostanze polari sono state rimosse mediante purificazione su Florisil. L'aliquota purificata è stata successivamente analizzata mediante cromatografia capillare utilizzando una colonna non polare e un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID; All. A1-VI). Per la quantificazione degli analiti esaminati è stata misurata l'area totale di picchi tra *n*-decano e *n*-tetracontano. La concentrazione di Idrocarburi totali è stata quantificata a fronte di un campione di riferimento esterno. Il procedimento di estrazione è consistito, nella sua fase preliminare, nel raffreddamento del campione a circa 10°C al fine di impedire perdite del solvente di estrazione mediante volatilizzazione. Successivamente si è

provveduto all'acidificazione del campione acquoso a pH 2 aggiungendo HCl (37%). La formazione di emulsioni è stata prevenuta aggiungendo circa 200 g di solfato di magnesio per 2,5 l di campione. Sono stati quindi aggiunti 125 ml di soluzione di riferimento di solvente di estrazione e il campione così preparato è stato posto in agitazione tramite agitatore magnetico dotato di ancoretta per 30'. Successivamente il tappo del contenitore è stato sostituito da un microseparatore. E' stato quindi aggiunto un volume di acqua ultrapura tale da consentire il prelievo dello strato del solvente di estrazione dal microseparatore. Successivamente la frazione organica è stata trasferita nella colonna di purificazione, avendo cura di evitare il trasferimento d'acqua per non incorrere nel rischio di incrostazioni della superficie del solfato di sodio.

La fase di purificazione è stata realizzata trasferendo la fase del solvente di estrazione in una piccola colonna riempita con 2 g di Florisil e coperta con uno strato di 2 g di solfato di sodio. Il campione è stato caricato in testa alla colonna e, dopo averlo fatto fluire, è stato ulteriormente caricato un volume di 10 ml di solvente di estrazione. La fase organica purificata è stata opportunamente raccolta in coda alla colonna in un recipiente atto alla concentrazione. Attraverso un evaporatore l'estratto è stato concentrato dapprima a un volume di circa 6 ml e infine a poco meno di 1 ml utilizzando un flusso misurato di azoto. Il volume finale è stato stimato con precisione attraverso una siringa da iniezione. L'estratto ottenuto è stato trasferito in una fiala a setto per analisi gas-cromatografica.

La determinazione dei composti organici presenti nel campione è stata eseguita attraverso una colonna capillare (Technocrom TRD-5; All. A1-VII). Il gascromatografo è stato opportunamente settato fino a ottenere una separazione ottimale ottenendo picchi nel gas-cromatogramma della miscela di riferimento di *n*-alcani separati dalla linea base. Sono stati quindi misurati il campione, le soluzioni di taratura e la soluzione del bianco nel gascromatografo. Il cromatogramma rilevato analizzando il solvente di estrazione è stato utilizzato per correggere le aree dei cromatogrammi dei campioni. Il gascromatogramma acquisito tra *n*-decano (C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>) e *n*-tetracontano (C<sub>40</sub>H<sub>82</sub>) è stato quindi integrato acquisendo ogni picco a livello di segnale a fronte del picco di solvente. Il livello di ogni singolo idrocarburo è stato ottenuto utilizzando la seguente equazione:

$$\rho = \frac{(A_m - b) \cdot f \cdot V \cdot w}{a \cdot (m_1 - m_2)}$$

dove:  $\rho$  è l'indice di idrocarburi, in milligrammi al litro;  
 $a$  è la pendenza della funzione di taratura, in litri al milligrammo;  
 $A_m$  è l'area di picco integrata dell'estratto del campione, in unità dipendenti dalla strumentazione;  
 $f$  è qualsiasi fattore di diluizione dell'estratto del campione;  
 $m_1$  è la massa del flacone di campionamento riempito, in grammi;  
 $m_2$  è la massa del flacone del campione vuoto, in grammi;  
 $w$  è la densità del campione d'acqua, in grammi al millilitro (per l'acqua fresca, può essere utilizzato 1,00 g/ml);  
 $V$  è il volume dell'estratto finale, in millilitri;  
 $b$  è l'intersezione dell'asse y in unità dipendenti dalla strumentazione.

### **2.2.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA**

#### **2.2.3.1 *Dunaliella tertiolecta***

Il saggio di crescita algale con la cloroficea *Dunaliella tertiolecta* è stato eseguito secondo le indicazioni riportate nella linea guida ASTM E1218-04-E1 (2004). Il saggio consiste nell'esposizione di una quantità definita di clone algale in condizioni di crescita esponenziale al campione e al controllo negativo costituito da sola acqua marina artificiale. Prima dell'inoculo del clone algale, tutti i trattamenti, compreso il controllo, sono stati arricchiti con macro- e micronutrienti secondo le specifiche riportate in USEPA (1995).

Esecuzione del saggio – Il saggio è stato condotto in triplicato, effettuando 5 diluizioni a partire dal campione tal quale; come supporto sono state utilizzate piastre sterili di polistirene da 24 pozzetti della capacità di 3 ml ciascuno. Parallelamente, per ogni piastra è stato eseguito anche un test con un controllo negativo costituito da acqua di diluizione (acqua di mare ISO a cui sono state aggiunte concentrazioni note di nutrienti). A ciascuna diluizione e al controllo è stata aggiunta una concentrazione nota di clone algale in rapporto di 1:1000. Una volta inoculato il clone algale (concentrazione iniziale  $2 \times 10^3$  cellule  $\text{ml}^{-1}$ ), le piastre sono state trasferite per 72 h in camera fitologica a condizioni di temperatura e luminosità controllate ( $T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$ , luminosità  $< 10000$  lux). Al termine dell'esposizione è stata verificata la crescita algale nel campione, espressa come densità algale, mediante lettura al Coulter Counter; si è proceduto quindi al conteggio delle tre repliche del campione tal quale e del controllo e al loro confronto statistico, per verificare eventuali aumenti o diminuzioni significative della crescita algale nel campione rispetto al controllo e procedere eventualmente alla lettura delle altre diluizioni.

Espressione e analisi dei dati – I risultati del saggio possono essere riportati come percentuale di inibizione della crescita algale e, qualora la tossicità del campione lo consenta, in termini di EC<sub>50</sub> o EC<sub>20</sub>. L'EC<sub>50</sub> e l'EC<sub>20</sub> si calcolano utilizzando il foglio Excel sviluppato dalla DTU (Danmarks Tekniske Universitet) denominato "KOK457T3" che utilizza i programmi statistici LOG457.EXE e LOG457W.EXE elaborati per la determinazione della relazione concentrazione-effetto in endpoint continui (Christensen *et al.*, 2009).

Sulla base dei risultati espressi in termini di inibizione/stimolazione della crescita e dell'analisi statistica del dato eco-tossicologico (eseguita secondo lo schema USEPA, 1991), i risultati del saggio possono essere suddivisi nelle seguenti categorie:

- *assenza di effetto*: percentuale di inibizione/stimolazione inferiore al 20% ed assenza di differenze significative;
- *presenza di significativo effetto eutrofizzante*: percentuale di biostimolazione > 20% e differenza significativa rispetto alla crescita nel controllo;
- *presenza di significativo effetto tossico*: inibizione della crescita > 20% e differenza significativa con il controllo.

Nel caso in cui la distribuzione dei dati nelle varie diluizioni lo consenta, è possibile calcolare altri parametri tra cui la NOEC (secondo la procedura di Dunnett) e l'EC<sub>20</sub> (Christensen *et al.*, 2009).

QA/QC - La sensibilità di ogni clone algale impiegato per i test con i campioni di elutriato è stata verificata mediante il test di controllo positivo eseguito con bicromato di potassio il cui risultato, espresso come EC<sub>50</sub>, è stato confrontato con i dati della carta di controllo del laboratorio il cui intervallo è compreso tra 6,2 e 8,9 mg l<sup>-1</sup> come cromo; altri parametri che devono essere rispettati affinché il test sia considerato valido sono:

- la densità cellulare dopo 72 h deve aumentare di un fattore non inferiore a 16 rispetto al valore di partenza ( $2 \times 10^3$  cellule ml<sup>-1</sup>);
- il coefficiente di variazione nei controlli e nel campione tal quale (CV%): ≤ 15%.

### **2.2.3.2 *Vibrio fischeri***

Il saggio è stato eseguito utilizzando acqua di mare naturale come controllo secondo il protocollo Comparison Test (Azur Environmental, 1994) e utilizzando 5 repliche

del campione e 5 repliche del controllo, con letture in 2 tempi (5' e 15'). I campioni sono stati preventivamente filtrati attraverso membrana di 0,45  $\mu$ . Il risultato del test è stato espresso come differenza percentuale della bioluminescenza ( $\Delta$  % biol.) del campione a una concentrazione del 90% rispetto al controllo (acqua di mare naturale). La significatività della differenza è stata valutata mediante il test t di Student. Il giudizio qualitativo è stato formulato in base alla scala di tossicità riportata in Tab. 2-IV.

**Tab. 2-IV** - Scala di tossicità adottata per il saggio con *V. fischeri* condotto per la colonna d'acqua.

H <sub>2</sub> O mare	Test t	Tossicità
Variazione biolumin. %		
$\Delta b < -10$	$p < 0,05$	Ormesi
$-10 \leq \Delta \leq 10$	p qualunque	Assente
$-10 \leq \Delta \leq 20$	$p < 0,05$	Bassa
$20 \leq \Delta \leq 40$	$p < 0,05$	Media
$\Delta b > 40$	$p < 0,05$	Elevata

### 2.2.3.3 *Tigriopus fulvus*

*Tigriopus fulvus* Fischer (fig. 2.4) è un copepode arpacticoida meiobentonico, ampiamente diffuso nell'area mediterranea e facilmente identificabile (Carli e Fiori 1979; Carli *et al.*, 1988; Pane *et al.*, 1996).

La specie è autoctona, eurialina ed euriterma e per le sue caratteristiche biologiche (durata del ciclo vitale, rapporto maschi/femmine, fecondità, produzione di uova), oltre alla facilità di manipolazione degli individui e al mantenimento in laboratorio, viene ritenuta idonea all'impiego come specie target nei test e nei saggi ecotossicologici (ISO/FDIS, 1999; Faraponova *et al.*, 2005).

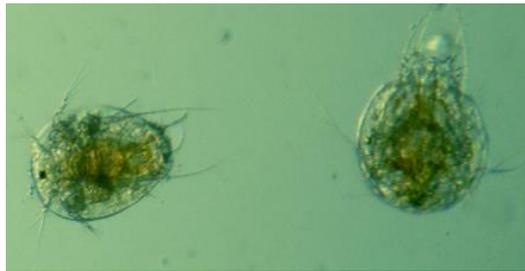
La coltura utilizzata, che origina dal Mar Tirreno (località Calafuria, Livorno), è stata mantenuta in acqua di mare sintetica Instant Ocean<sup>®</sup> (I.O.<sup>®</sup>), all'interno di fiasche per coltura in polistirene da 150cm<sup>2</sup> (0,5 l) con tappo ventilato, munito di membrana da 0,22  $\mu$ m alle seguenti condizioni (Faraponova *et al.*, 2005):

- salinità al  $38 \pm 1$  PSU;
- temperatura di  $18 \pm 1$ °C;

- fotoperiodo 16L/8B ad una luminosità di 500–1200 lux;
- alimentazione *ad libitum* con Tetramarin<sup>®</sup>.

Il saggio biologico è stato applicato al campione tal quale (100%).

E' stata utilizzata una coltura sincronizzata di nauplii con età di 24 – 36 h provenienti da una coltura isolata di femmine ovigere (fig. 2.4), alimentate con colture algali di *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* in rapporto 2:1.



**Fig. 2.4** - Nauplii di *Tigriopus fulvus*.

Le prove sono state condotte in piastre per colture cellulari da 12 pozzetti, organizzando ogni campione in 4 repliche, contenenti ciascuna 10 individui in 3 ml di soluzione.

Il periodo di esposizione è stato di 96 h, al termine del quale sono stati osservati gli organismi immobilizzati/morti (previa stimolazione meccanica).

La significatività dei dati ottenuti sui naupli di *T. fulvus* è stata valutata sulla base della differenza tra campione e controllo, tramite test-t di Student per varianza disomogenea utilizzando il software Primer 5.0.

La matrice testata è stata giudicata tossica quando la differenza tra campione e controllo è risultata statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) e maggiore del 20% (ISO/FDIS, 1999).

#### **2.2.4. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS***

##### **2.2.4.1 Biomarkers**

In accordo con il Programma di Monitoraggio Transfrontaliero, è stata eseguita la seguente batteria di biomarkers:

- |                            |  |
|----------------------------|--|
| Indici di stress generale: | sopravvivenza in aria (stress on stress) |
|                            | stabilità delle membrane lisosomiali     |
| Indici di esposizione:     | metallotioneine                          |

livelli di lipofuscine

livelli di lipidi neutri

Danno genotossico: test della cometa

**Sopravvivenza in aria** - Il tempo di sopravvivenza in aria, o “Stress On Stress”, è un indice generale particolarmente sensibile nell’individuare le condizioni di stress ambientale a cui sono sottoposti i bivalvi. La definizione di tale parametro si basa sulla naturale capacità di questi organismi intertidali di resistere a brevi periodi di esposizione all’aria (Eertman e de Zwann, 1994). Durante i periodi di emersione i molluschi chiudono le loro valve lasciando una piccola apertura attraverso la quale l’ossigeno atmosferico può diffondere nella cavità palleale. La velocità con cui l’ossigeno viene consumato dipende da numerosi fattori, quali ad esempio temperatura, stagione, acclimatazione e periodo riproduttivo. In condizioni di prolungata esposizione i molluschi riescono a sopravvivere per molti giorni grazie all’evoluzione di una particolare strategia biochimica: il loro metabolismo, infatti, passa da aerobico ad anaerobico e in questo caso i carboidrati, e soprattutto il glicogeno, diventano la principale fonte d’energia attraverso processi di fermentazione che consentono di aumentare la normale produzione di ATP in condizioni anaerobiche (de Zwaan e Wijsman, 1976).

I molluschi esposti a sostanze tossiche o a stress naturali in genere hanno un metabolismo accelerato (de Zwaan e de Kock, 1988) e, pertanto, ci si aspetta che una volta esposti all’aria il loro tempo di sopravvivenza sia minore.

Tra i vari stressori naturali che possono influenzare il tempo di sopravvivenza in aria vi sono la temperatura, la salinità e altre variabili stagionali.

Vari esperimenti realizzati *in vivo* esponendo gli organismi a concentrazioni subletali di contaminanti (sia metalli pesanti che inquinanti organici) hanno evidenziato una diminuzione del tempo di sopravvivenza in aria suggerendo l’utilizzo di tale parametro quale indice di stress generale applicabile nei programmi di monitoraggio (Viarengo *et al.*, 1995).

L’analisi è stata effettuata su un campione di 30 organismi per ciascun sito (VA, LA e controllo) i quali, subito dopo l’arrivo in laboratorio, sono stati lavati, asciugati e mantenuti a temperatura costante ( $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) in un contenitore a tenuta stagna con tasso di umidità a saturazione. Quotidianamente sono stati registrati e asportati gli individui morti fino ad esaurimento degli organismi, registrando  $LT_{50}$  e  $LT_{90}$ . Sono

stati considerati morti gli individui con le valve aperte che non rispondevano a nessuna sollecitazione.

**Valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali** - La valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali delle cellule della ghiandola digestiva del mitilo permette di ottenere un indice integrato della presenza di inquinanti nell'ambiente marino e degli effetti tossici di tali sostanze. E' noto, infatti, che inquinanti quali metalli pesanti, Idrocarburi Aromatici e PCB, anche se presenti in mare in concentrazioni minime, inducono una destabilizzazione delle membrane dei lisosomi, la cui aumentata permeabilità porta a un aumento del catabolismo delle macromolecole (proteine, RNA, DNA, ecc.), autofagia e, quindi, danno cellulare. E' importante ricordare che i diversi inquinanti presenti nell'ambiente marino presentano effetti sinergici sulla destabilizzazione delle membrane lisosomiali; questo indice di stress rappresenta, quindi, la risposta dell'organismo all'azione combinata di più tossici co-presenti nell'ambiente marino (Lowe *et al.*, 1995).

In laboratorio le ghiandole digestive di 5 mitili provenienti da ciascun sito sono state tagliate in modo tale da ottenere delle sezioni trasversali dei tubuli disposti parallelamente all'asse longitudinale della ghiandola stessa e poste in fila su apposito supporto in alluminio (chuck) per criostato (All. A2-I) precedentemente raffreddato in ghiaccio. Successivamente, il supporto con i frammenti è stato posto per 15" in un piccolo recipiente contenente N-esano, precedentemente raffreddato con azoto liquido. Il chuck è stato poi avvolto in 4-5 strati di Parafilm e posto immediatamente a -80°C. Al momento dell'analisi, per mezzo di un criostato, sono state ottenute sezioni di 10-20 µm di spessore con un'angolatura di taglio di 15°. Le sezioni sono state quindi trasferite su vetrini tenuti a temperatura ambiente. La stabilità della membrana lisosmiale è stata testata attraverso l'enzima N-acetyl-hexosaminidase che ha come substrato il naphthol As-BI N-acetyl-β-D-glucosaminide.

Le sezioni, preparate come descritto in precedenza, sono state trattate in una vaschetta di Hellendal con un tampone destabilizzante le membrane lisosomiali a 37°C per tempi diversi (0, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40') in modo da determinare il tempo di trattamento richiesto per labilizzare interamente le membrane lisosomiali (periodo di labilizzazione). Il set di vetrini è stato trasferito nel mezzo di incubazione del substrato contenente naphthol As-BI N-acetyl-β-D-glucosaminide precedentemente disciolto in 2,5 ml di 2-metossietanolo e portato a volume con il tampone citrato

contenente Polipep, un polipeptide a bassa viscosità che agisce come stabilizzante per le sezioni. L'incubazione con il substrato è stata di 20' a 37°C nella vaschetta di Hellendal in un bagno agitante. I vetrini sono stati successivamente risciacquati in acqua di mare filtrata a temperatura ambiente o in una soluzione di NaCl al 3% a 37°C per 2' prima del loro trasferimento per 10' a temperatura ambiente in un tampone fosfato pH 7,4 contenente il colorante diazoinico fast violet B blue. I vetrini, risciacquati in acqua corrente per 5', sono stati successivamente fissati con gelatina glicerinata. Le sezioni così ottenute sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine al microscopio ottico (All. A2-II) per la determinazione del periodo di labilizzazione lisosomiale. Le analisi sono state eseguite almeno in quintuplicato.

**Valutazione del Contenuto in Metallotioneine** - La valutazione del contenuto in metallotioneine rappresenta un importante indice di stress specifico. Le metallotioneine sono proteine cellulari inducibili dall'accumulo nella cellula di cationi di metalli pesanti; pertanto, la valutazione della loro concentrazione tissutale nelle cellule della ghiandola digestiva del mitilo risulta un parametro specifico per quantificare la risposta biologica degli animali all'inquinamento da metalli pesanti quali Cu, Cd, Hg, Zn, Pb, ecc.

Al momento dell'analisi i tessuti (3 pool di 5-7 individui per ogni stazione) sono stati omogeneizzati in 3 volumi di Saccoroso/Tris-HCl addizionati di Leupeptina e  $\beta$ -mercaptoetanololo. L'omogenato è stato quindi centrifugato (All. A2-III) per ottenere una frazione solubile contenente le metallotioneine. Il soprannatante è stato successivamente precipitato con etanolo-cloroformio con il duplice scopo di rimuovere i tioli a basso peso molecolare e concentrare le metallotioneine; 1 ml di citosol è stato quindi addizionato con 1,05 ml di etanolo freddo e cloroformio e centrifugato a 6.000 x g per 10'. Il soprannatante così ottenuto è stato addizionato di 3 volumi di etanolo freddo e mantenuto a -20°C per 1 h e quindi centrifugato a 6.000 x g per 10' in rotore oscillante. Il pellet è stato lavato una volta con etanolo e cloroformio nel buffer di omogeneizzazione, ri-centrifugato, insufflato con azoto e risospeso in NaCl 0,25 M addizionato di 150  $\mu$ l di HCl e EDTA. Ai campioni così risospesi è stato aggiunto DTNB (acido ditiobisnitrobenzoico) preparato al momento dell'uso e quindi sono stati centrifugati a 3.000 x g. L'assorbanza è stata valutata per via spettrofotometrica (All. A2-IV) misurandola a 412 nm.

**Accumulo di Lipofuscine nei lisosomi** – Questo metodo permette di determinare l'accumulo nei lisosomi dei prodotti finali della perossidazione lipidica delle membrane cellulari: le lipofuscine. Con il termine di ossidazione lipidica si intende una serie di reazioni chimiche favorite da specie reattive dell'ossigeno (ROS) che causano danni alle molecole lipidiche delle membrane cellulari. Gli eventi perossidativi si verificano comunemente nelle cellule viventi, anche in condizioni fisiologiche, in quanto rappresentano una via catabolica per gli acidi grassi insaturi di membrana. L'esposizione a sostanze xenobiotiche, tra cui i contaminati organici, può favorire fenomeni perossidativi provocando danni cellulari. Il processo di perossidazione porta alla formazione di miscele complesse di prodotti di degradazione lipidica altamente tossici in grado di interagire sia con le proteine di membrana che con altri componenti cellulari alterandone le funzioni. Al termine del processo, i prodotti vanno ad accumularsi nel sistema vacuolare lisosomiale sotto forma di lipofuscine. Studi recenti (Terman e Brunk, 2004; Viarengo *et al.*, 2007) sembrano evidenziare un contributo da parte delle lipofuscine all'accumulo dei metalli pesanti nella ghiandola digestiva. Infatti, il metallo può rimanere intrappolato nel granulo di lipofuscina legandosi stabilmente ad esso, oppure può legarsi ai gruppi acidi dei lipidi ossidati, restando così vincolato in maniera non stabile al granulo. Come per i lipidi neutri insaturi, questo tipo di analisi utilizza una metodologia quantitativa. Il contenuto in lipofuscine viene valutato utilizzando il metodo Schmorl (Moore, 1990).

In laboratorio le sezioni di 5 individui provenienti da ciascun sito preparate al criostato (All. A2-I) sono state fissate in calcio-formolo a 4°C, risciacquate in acqua distillata e poste nel mezzo di reazione contenente cloruro di ferro e potassio ferrocianuro per 5'. Successivamente, sono state lavate in acido acetico, risciacquate in acqua, montate su vetrino ed analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine al microscopio ottico (All. A2-II) per la determinazione della colorazione dei lisosomi dovuta all'accumulo di lipofuscine.

**Accumulo di Lipidi neutri nei lisosomi** - Questo indice valuta l'alterazione delle membrane lisosomiali derivata dall'esposizione a idrocarburi aromatici che determinano un accumulo di lipidi neutri insaturi all'interno dei lisosomi.

Le sezioni, derivanti da 5 individui per ciascun sito preparate al criostato (All. A2-I) con la stessa modalità seguita per la valutazione della stabilità delle membrane

lisosomiali, sono state fissate in calcio-formolo per 15' a 4°C, risciacquate in acqua distillata e poste in una soluzione di trietilfosfato. Successivamente sono state colorate con una soluzione di oil red in trietilfosfato a 20°C per 15', lavate in trietilfosfato per 30", risciacquate in acqua distillata e montate con gelatina.

Le sezioni così ottenute sono state analizzate al microscopio ottico (All. A2-II) mediante un sistema di analisi d'immagine che determina la percentuale di colorazione dei lisosomi dovuta all'accumulo dei lipidi neutri insaturi.

**Test della Cometa** - L'esecuzione del Test della Cometa (Comet Assay; ITRC, 2006; Visvardis *et al.*, 1997; Lee e Steinert, 2003) ha previsto inizialmente il prelievo di emolinfa da 5 individui per ogni sito (VA, LA e controllo). L'emolinfa è stata raccolta dal muscolo adduttore posteriore di ogni organismo (0,5 ml/ind.) tramite una siringa sterile da 2,5 ml precaricata con 0,5 ml di soluzione salina di Hank's. Il prelevato è stato quindi posto in eppendorf da 2,0 ml e mantenuto in ghiaccio. La sospensione cellulare è stata concentrata e purificata mediante: a) centrifugazione a 500g x 5' (+4°C); b) eliminazione del surnatante ottenuto; c) risospensione del pellet risospeso e centrifugazione per due volte in tampone fosfato (1 x PBS). Il pellet così ottenuto è stato nuovamente risospeso in PBS 0,5 ml e addizionato con 0,5 ml agarosio LMPA (Low Melting Point Agarose) sciolto in bagno termostatico a 42°C. 100 µl di quanto ottenuto sono stati caricati rapidamente su vetrini precedentemente agarizzati, mantenuti a 42°C e coperti con coprioggetti e il preparato così realizzato è stato posto in frigo a 4°C per 5-10'. Successivamente, è stato rimosso il coprioggetto e sono stati aggiunti altri 100-200 µl di LMPA (senza cellule) al centro del vetrino. Dopo aver collocato i vetrini con il preparato in frigorifero a 4°C per ulteriori 5-10', essi sono stati posti nella soluzione di lisi a 4°C per 60'.

A questo punto, è stata distinta la preparativa per la corsa elettroforetica in modalità Alcalina e/o Neutra.

**Versione Alcalina:** ogni vetrino è stato asciugato dal buffer di lisi e trasferito nella soluzione alcalina (pH>13) per 15' al buio e a temperatura ambiente. Esso è poi stato posizionato sul bagno di corsa elettroforetica precaricato con la medesima soluzione, settando il voltaggio a 0,7 V/cm e realizzando l'elettroforesi per 45'. Terminata la corsa il vetrino è stato prelevato e lasciato scolare. Con una pipetta sono stati prelevati 500 µl di soluzione neutra e posti sopra il preparato, incubando per 5'. Tale step, pur essendo opzionale, aiuta a ridurre l'effetto background. Il vetrino è stato

quindi posizionato in etanolo 70% per 5' e successivamente asciugato all'aria e a temperatura ambiente. E' stata quindi preparata la fase di colorazione e lettura.

**Versione Neutra:** anche in questo caso, ogni vetrino è stato asciugato dal buffer di lisi e trasferito nella soluzione alcalina (pH>13) per 15' al buio e a temperatura ambiente. La soluzione alcalina è stata quindi sciacquata con la soluzione tampone 1 x TBE. Successivamente, i vetrini sono stati posizionati nel bagnetto elettroforetico precaricato con la medesima soluzione (TBE) utilizzando gli stessi settaggi della versione alcalina ed è stata eseguita l'elettroforesi per 45'. Dopo la corsa, i vetrini sono stati scolati e incubati in una soluzione di etanolo 70% per 5'. Successivamente, essi sono stati asciugati a temperatura ambiente e all'aria ed è stata preparata la fase di colorazione e lettura.

**Lettura:** per la fase di lettura è stato seguito il metodo suggerito da Asby *et al.*(1995). La colorazione dei preparati è comune per entrambe le procedure. Il vetrino reidratato è stato incubato per 3-5' con 500 µl di sonda fluorescente FLUOplus alla concentrazione di lavoro. Il colorante in eccesso è stato sciacquato dal vetrino con acqua milliQ ed è stato posto un coprivetrino protettivo sul preparato. I vetrini sono stati quindi osservati in fluorescenza (490nm<sub>Ex</sub>/535nm<sub>Em</sub>) scattando un numero appropriato (15-20) di immagini a un ingrandimento X 400-630. La sonda Fluoplus produce una colorazione verde-gialla del materiale genetico. L'analisi quantitativa/qualitativa è stata effettuata attraverso l'analisi d'immagine valutando le dimensioni della "coda della cometa".

#### **2.2.4.2 Metalli pesanti**

E' stata effettuata la valutazione dei livelli di bioaccumulo di bario, cadmio e zinco, seguendo quanto previsto dal Programma di Monitoraggio Transfrontaliero.

I campioni di tessuto congelato sono stati opportunamente trattati secondo il metodo USEPA 3050B (1996; leggermente modificato).

Circa 10 g di campione umido proveniente da ciascun sito (VA, LA e controllo) è stato opportunamente pesato e posto in provette di digestione in polipropilene da 65 ml non riutilizzabili con un indicatore di volume da 50 ml perfettamente calibrato di Classe "A". In contemporanea, è stato previsto un bianco di mineralizzazione costituito dai soli reagenti utilizzati per la fase di mineralizzazione e da una prova di recupero su materiale di riferimento certificato tipo IRMM ERM-CE278 o similare.

Un vetrino nervato in polipropilene è stato applicato in ogni provetta di digestione per prevenire una cross-contaminazione dei campioni e per aiutare il reflusso durante la digestione. Su ogni campione sono stati aggiunti 18 ml di una miscela 1:2 di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HNO<sub>3</sub>. Il campione è stato mescolato e lasciato digerire per 12 h. Successivamente, è stato applicato un gradiente termico attraverso una piastra riscaldante che ha previsto l'aumento della temperatura fino a 65°C in 30'. Si è quindi portato il campione a 115°C per 150' e si è proceduto al raffreddamento parziale e all'aggiunta di ulteriori 1,5 ml di HNO<sub>3</sub>, 3,5 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 1 ml di HCl. Il campione è stato poi lasciato rifluire per ulteriori 150' a 110°C.

Alla fine del trattamento termico si è proceduto al raffreddamento del campione che è stato così trasferito in matraccio tarato di classe A, portato al volume finale di 100 ml e filtrato su filtro monouso a trottola in Telon. I campioni liquidi così ottenuti sono stati analizzati tramite un sistema ICP-OES (Optima 7300, Perkin Elmer; All. A2-V) dotato di sistema di nebulizzazione/iniezione tipo MiraMist<sup>®</sup>. Le condizioni operative applicate per le analisi sono riportate in Tab. 2-V.

**Tab. 2-V** – Condizioni operative per i metalli oggetto di indagine.

<b>Analita</b>	<b>Lunghezza d'onda principale monitorata (nm)</b>	<b>detector principale</b>
Zn	206.200	Assiale
Ba	233.527	Assiale
Cd	226.502	Assiale

Gas carrier/flusso: Argon/ 15 l m<sup>-1</sup>  
 Flusso supplementare: 0,2 ml/min  
 Flusso entrata campione: 1,5 ml/min

Un'analoga quantità iniziale di campione congelato è stata posta in stufa a 105°C per 48 h per la determinazione del rapporto peso umido/peso secco. I dati sono stati espressi in mg/kg peso secco.

### **2.2.4.3 Idrocarburi totali**

La tecnica d'indagine si basa sull'applicazione integrale dei metodi USEPA 3550c rev. 3 – 2007 e 8015c rev. 3 – 2000.

Una quantità nota di campione (5-10 g) è stata dapprima liofilizzata e successivamente estratta mediante sonicazione a freddo per 60' con 50 ml di

acetone/n-eptano (1:1 v/v). Nella soluzione estraente è stata aggiunta la soluzione di riferimento per la finestra dei tempi di ritenzione contenente n-pentano ( $C_5$ ), n-dodecano ( $C_{12}$ ) e n-tetracontano ( $C_{40}$ ). L'estratto è stato purificato su colonna di Florisil. Un'aliquota dell'estratto purificato è stato analizzato in GG-FID. In particolare, è stata misurata l'area totale dei picchi presenti nell'intervallo delimitato dalle tre soluzioni di riferimento  $C_5, C_{12}$  e  $C_{40}$ . LA quantità di idrocarburi è stata quindi determinata mediante confronto con la soluzione di riferimento esterno costituito da quantità uguali di tre standard. Ulteriormente, sono state disposte prove in bianco per ogni serie di analisi al fine di identificare la baseline.

### **3. RISULTATI**

#### **3.1. MISURE CORRENTOMETRICHE**

Per brevità, nella presente sezione sono riportati i risultati relativi agli ultimi 12 mesi (luglio 2011 - giugno 2012). Per i dati precedenti consultare Fabi *et al.*, 2011b.

Nel secondo semestre 2011 erano state registrate intensità di corrente superficiale mediamente inferiori a 10 cm/s; tuttavia, soprattutto fino alla fine di ottobre, si rilevavano diversi eventi con intensità più elevate e orientamento prevalentemente verso il quarto quadrante (NW) o il terzo quadrante (SW; fig. 3.1). In tali casi le intensità di corrente erano risultate spesso superiori a 30 cm/s, soprattutto in direzione SW, raggiungendo valori anche superiori a 60 cm/s (valore massimo: 65 cm/s registrato il giorno 14/10/2011 alle ore 9.30, direzione 241 °N).

In corrispondenza della quota di fondo le intensità di corrente risultavano costantemente minori rispetto alla superficie, essendo mediamente di intensità inferiore a 7 cm/s e di direzione variabile (fig. 3.1); tuttavia, spesso erano presenti correnti di intensità compresa tra 10 cm/s e 20 cm/s orientate secondo il quarto quadrante (NW) e il secondo quadrante (SE); il massimo (32 cm/s), si registrava in direzione SSW il 14/10/2011 alle ore 12.20 (direzione 180 °N), in corrispondenza di elevate intensità di corrente anche nello strato superficiale.

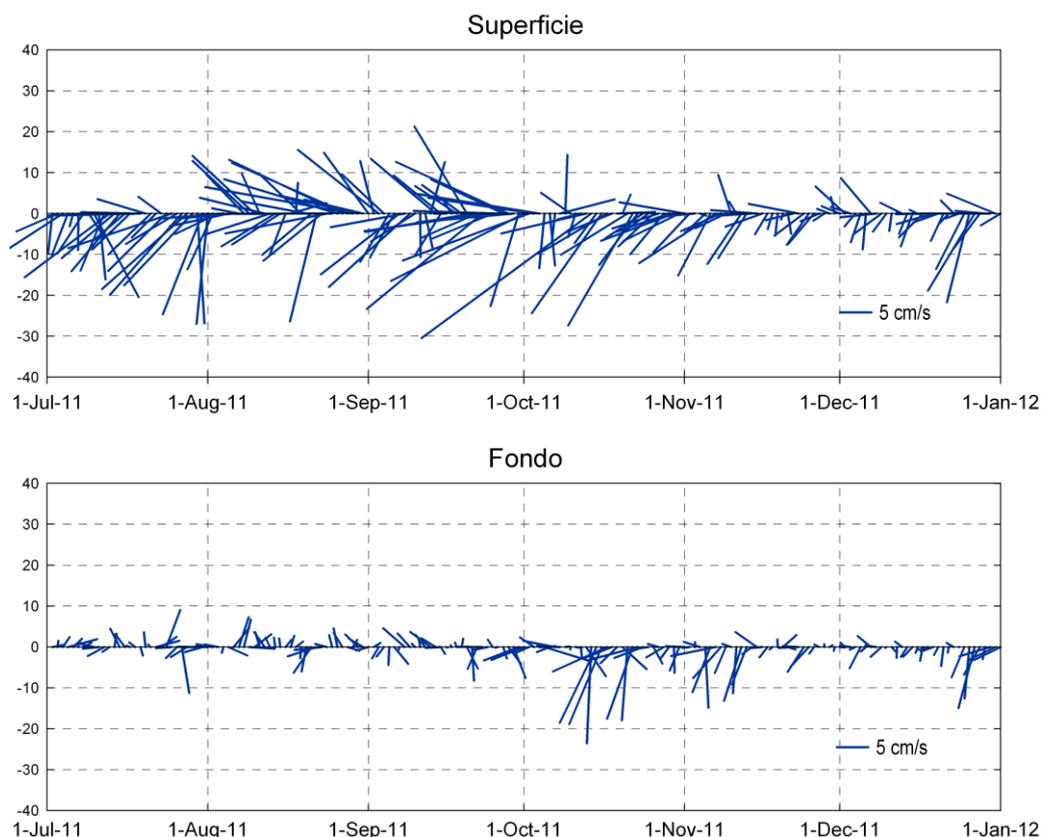
Dal 01 gennaio al 24 febbraio e dal 18 maggio al 30 giugno 2012 le correnti sono risultate sostanzialmente di direzione costante e provenienti dal terzo quadrante (SW; fig. 3.2), anche se nel secondo periodo sul fondo è stata notata una rotazione e una direzione prevalente da NW.

Anche l'intensità della corrente è apparsa abbastanza costante, con un aumento all'inizio di febbraio, e di modesta intensità: il valore medio è risultato pari a circa 13 cm/s. In febbraio si è verificato un breve periodo in cui si è registrato un leggero aumento della velocità lungo tutta la colonna d'acqua, con punte fino a 25-30 cm/s.

Durante l'intero periodo di osservazione, la velocità della corrente è risultata mediamente superiore in superficie.

In corrispondenza della quota di fondo, nel II semestre 2011 la temperatura ha mostrato valori inizialmente piuttosto costanti attorno a 13,2°C fino a circa la metà del mese di agosto, cui è seguito un andamento moderatamente crescente fino alla metà di ottobre, quando sono stati raggiunti i 14,9°C (fig. 3.3). Successivamente sono state registrate diverse fluttuazioni, con un minimo relativo a inizio novembre

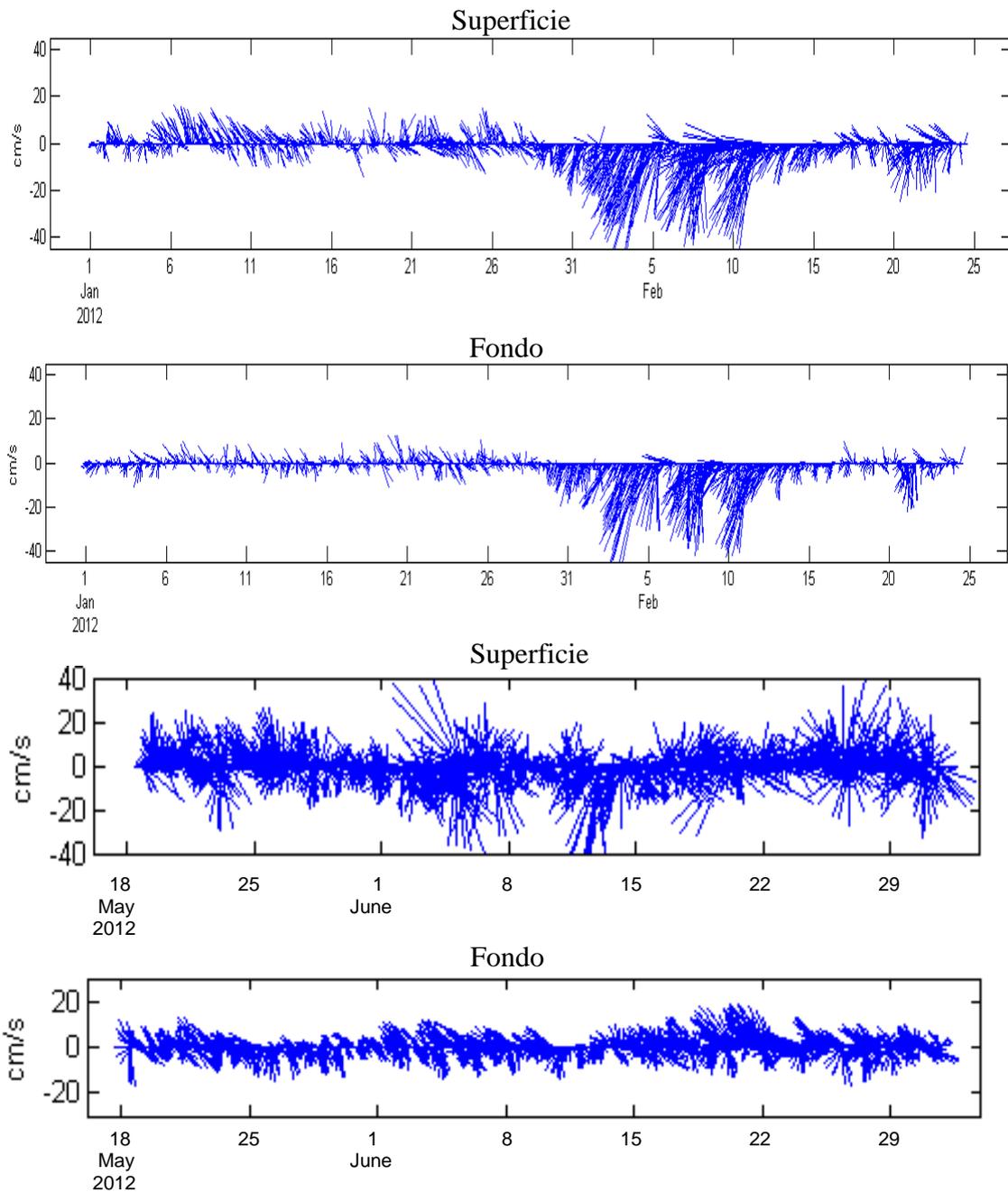
(13,6°C), seguito da un incremento piuttosto cospicuo dei valori fino a 17,8°C a metà novembre e poi da un progressivo decremento che ha riportato la temperatura intorno a 14,0-14,2°C alla fine di dicembre.



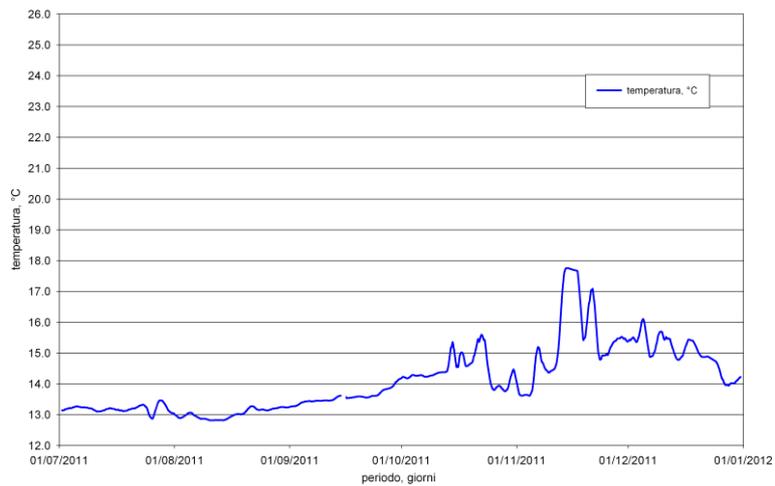
**Fig. 3.1** - Componenti Nord ed Est dell'intensità delle correnti registrate dal correntometro Nortek Aquadopp nel periodo dal 01/07/11 al 15/09/11 e dall'ADCP TRDI Workhorse Sentinel 300 kHz nel periodo dal 15/09/11 al 31/12/11 (media mobile 36 ore).

Nei primi due mesi del 2012 (fig. 3.4) la temperatura ha presentato un andamento decrescente da circa 14°C a 10,5°C, tipico del periodo.

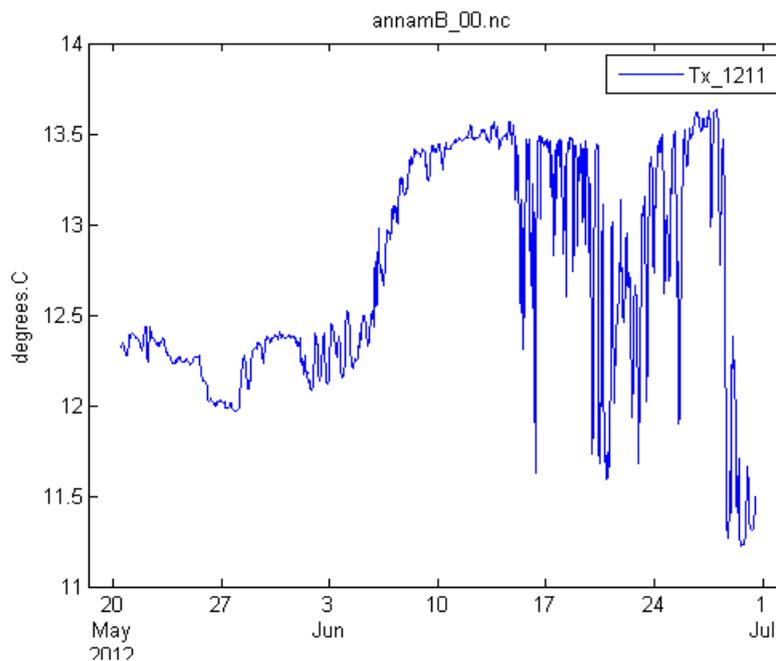
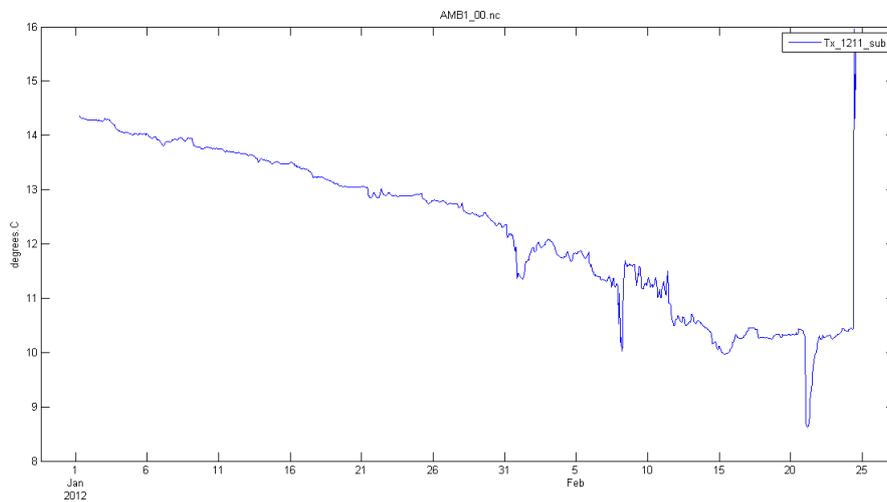
Da maggio a metà giugno 2012 si è registrato un andamento crescente, da circa 12,3°C a 13,5°C, seguito poi da una graduale decrescita nella seconda parte del mese. Le oscillazioni massime non hanno superato in ogni caso i 2°C.



**Fig. 3.2** - Componenti Nord ed Est dell'intensità delle correnti registrate dall'ADCP nel periodo dal 01/01 al 24/02/12 e dal 18/05 al 30/06/2012 (media mobile 36 ore).



**Fig. 3.3** - Andamento della temperatura registrata dal sensore del correntometro Aquadopp posizionato al fondo dal 01/07/11 al 15/09/11, e dal sensore installato sull'ADCP dal 15/09/2012 al 31/12/2011 (media mobile 36 ore).



**Fig. 3.4** - Andamento della temperatura registrata dal sensore installato sull'ADCP dal 01/01 al 24/02/12e dal 18/05 al 30/06/2012 (media mobile 36 ore).

### **3.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA**

Nella presente relazione vengono riportati i dati relativi al 2° anno post lavori di installazione di Annamaria B (2° semestre 2011 e 1° semestre 2012). Per i risultati precedenti consultare Fabi *et al.*, 2011b.

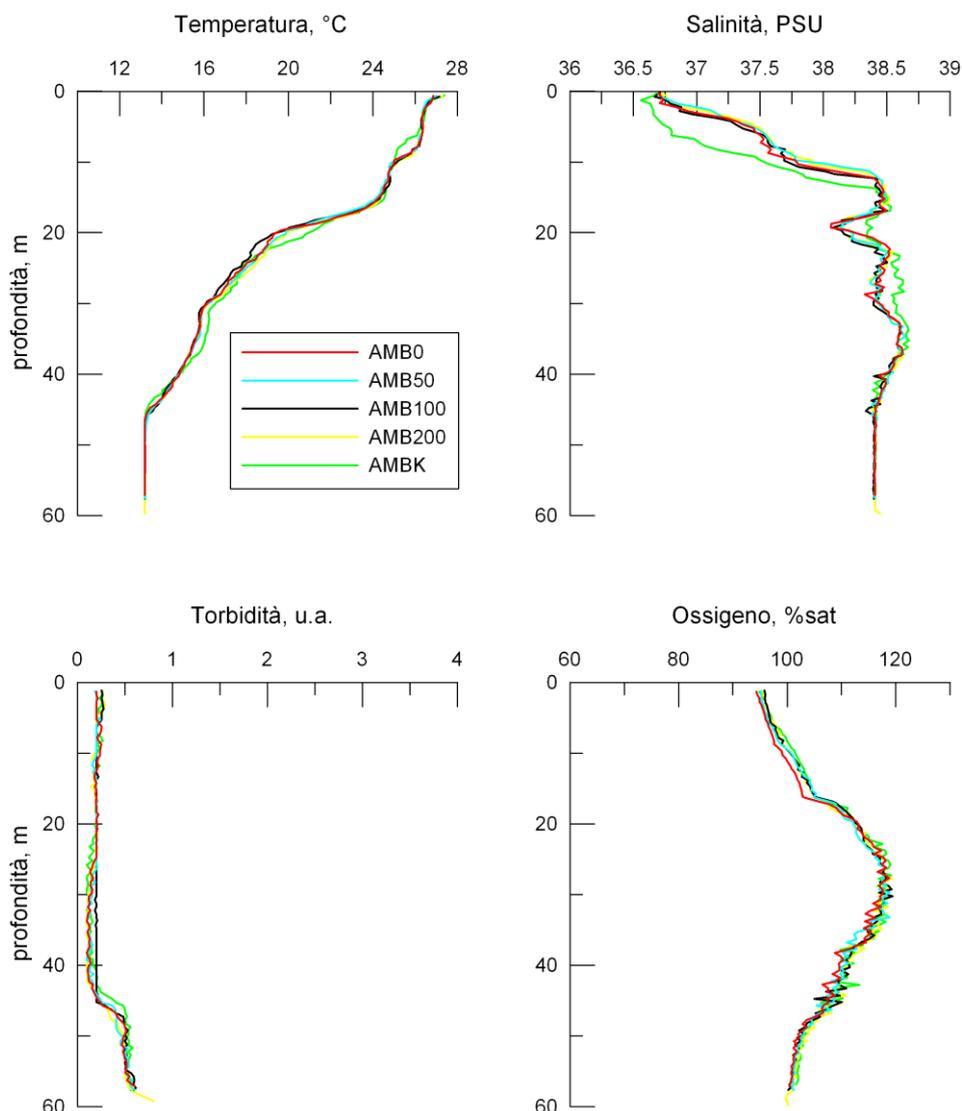
#### **3.2.1. TEMPERATURA, SALINITÀ, TORBIDITÀ, OSSIGENO DISCIOLTO E TRASPARENZA**

Durante il monitoraggio condotto nell'**agosto 2011** (fig. 3.5) la colonna d'acqua ha mostrato caratteristiche tipiche del periodo tardo-estivo. La temperatura è diminuita gradualmente da 27,2°C alla quota sub-superficiale fino a 24,0°C a circa 16 m di profondità. Al di sotto di tale quota è stato riscontrato un termoclino in corrispondenza del quale la temperatura si è ridotta rapidamente fino alla profondità di 20 m, dove sono stati registrati 19,2°C; un'ulteriore, progressiva riduzione è avvenuta fino alla quota di circa 46 m dove sono stati raggiunti 13,2°C, rimasti costanti sino al fondo. Non si sono evidenziate differenze importanti tra le diverse stazioni, con variazioni di temperatura tra di esse estremamente contenute.

La salinità ha mostrato un andamento crescente dalla superficie (36,7 PSU) fino alla profondità di circa 13 m, dove è stato raggiunto il valore di 38,4 PSU. Limitatamente a questo strato superficiale, in corrispondenza della stazione di controllo AMBK è stata riscontrata una salinità lievemente inferiore rispetto alle altre stazioni. A partire da questa quota e fino a 46 m di profondità i valori sono risultati variabili in un range molto ristretto in tutti i siti, compreso tra 38,3 PSU e 38,6 PSU, con un'unica discontinuità apprezzabile costituita dalla diminuzione riscontrata alla quota di 19 m, dove è stato registrato un valore pari a 38,0 PSU. Tale discontinuità è stata osservata in tutte le stazioni, anche se in corrispondenza del controllo AMBK è apparsa meno pronunciata (minimo relativo: 38,3 PSU). A partire da 46 m fino al fondo la salinità è risultata costante e pari a 38,4 PSU in tutte le stazioni.

La torbidità è apparsa molto bassa in tutte le stazioni e lievemente decrescente dalla superficie (0,2-0,3 NTU) fino alla profondità di 42 m (0,1-0,2 NTU). In seguito è stato riscontrato un incremento che ha portato a valori di 0,4-0,6 NTU a 45 m, che poi si sono mantenuti praticamente costanti fino al fondo. Non sono state riscontrate differenze apprezzabili tra le stazioni.

L'ossigeno disciolto ha mostrato un andamento moderatamente crescente dalla superficie, dove sono stati registrati valori di leggera sottosaturazione (94-96%), fino alla profondità di 16 m, dove ha raggiunto il 103-105%. A partire da questa quota è stato rilevato un aumento dei valori verso la sovrasaturazione, esteso fino alla profondità di 48 m, con massimi compresi nel range 116-117% nell'intervallo di profondità 24-34 m. A profondità maggiori di 48 m l'ossigeno disciolto ha mostrato un andamento decrescente fino al fondo dove sono stati registrati valori di 100-101%. Anche in questo caso, l'omogeneità orizzontale è risultata molto elevata, non essendosi evidenziate differenze rilevanti tra le stazioni.



**Fig. 3.5** - Profili di temperatura (°C), salinità (PSU), torbidità (Unità Arbitraria) e saturazione di ossigeno (%) relativi al III campionamento svolto nella fase di produzione di Annamaria B (agosto 2011).

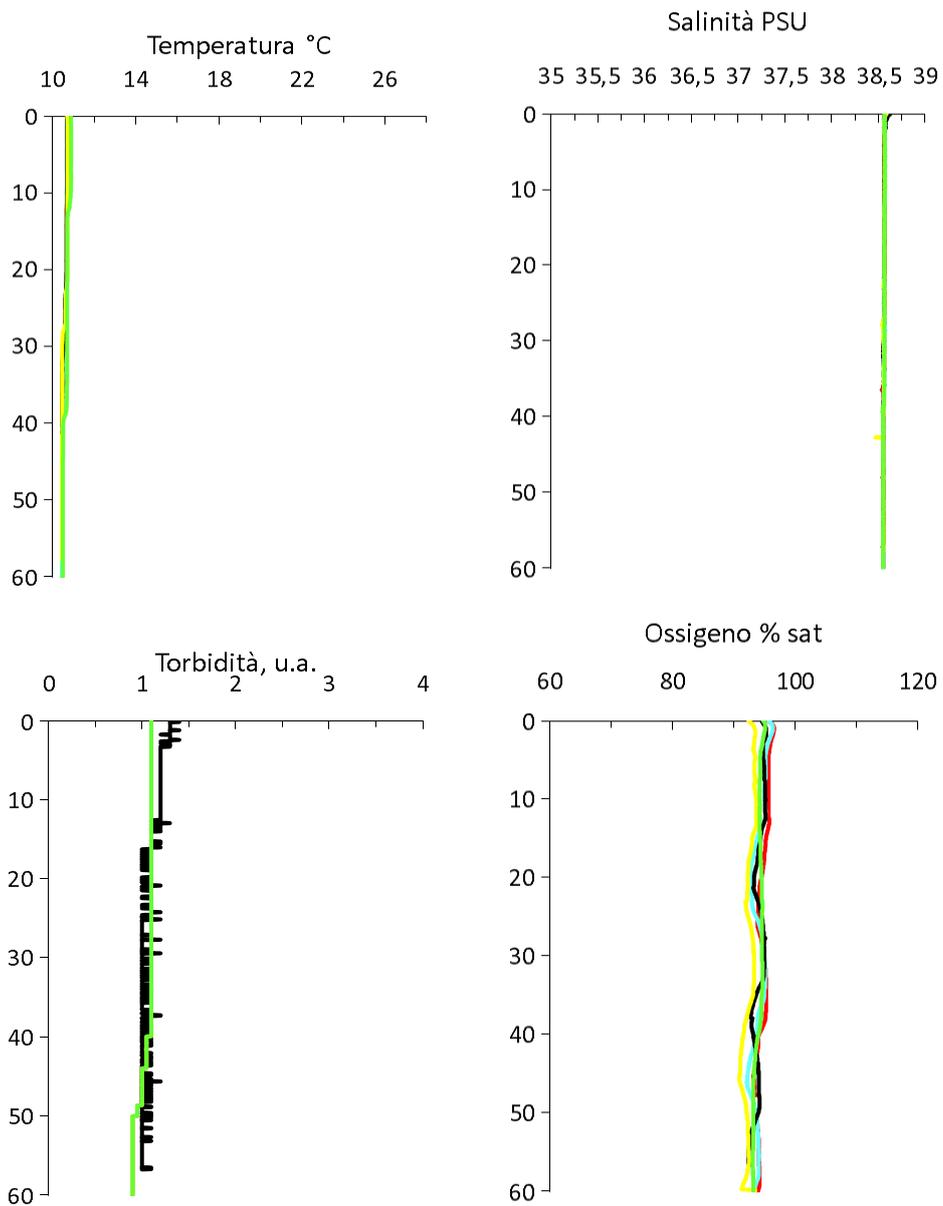
Il monitoraggio condotto nel **febbraio 2012** (fig. 3.6) ha mostrato una colonna d'acqua avente le caratteristiche fisiche tipiche del periodo invernale, con valori di temperatura pressoché stabili lungo la colonna d'acqua e in tutte le stazioni, passando da 10,7°C in superficie a 10,4°C in prossimità del fondo.

Anche la salinità si è mantenuta pressoché costante in tutta la colonna d'acqua con valori attorno a 38,5 PSU in tutte le stazioni.

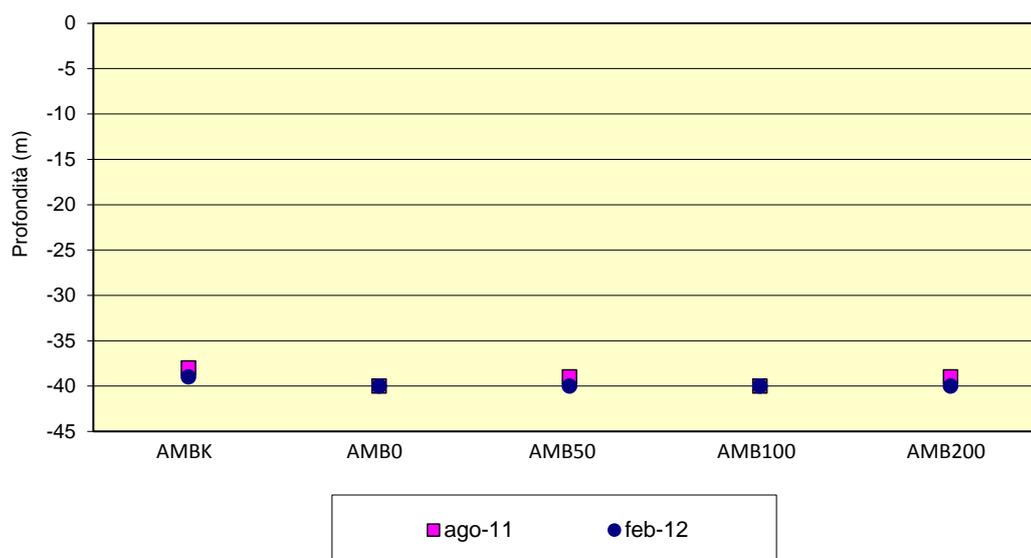
Le quantità di particolato sono risultate relativamente basse (intorno a 1 u.a.) e omogenee in tutta la colonna d'acqua e ovunque.

L'ossigeno disciolto ha presentato valori sostanzialmente stabili a tutte le profondità e in tutte le stazioni, con percentuali di saturazione tra il 92% e il 95%.

Per quanto concerne la trasparenza, nell'agosto 2011 la colonna d'acqua ha presentato una trasparenza compresa tra 38 m (AMBK) e 40 m (AMB0 e AMB100), che è stata confermata nell'ultimo survey.



**Fig. 3.6** - Profili di temperatura (°C), salinità (PSU), torbidità (Unità Arbitraria) e saturazione di ossigeno (%) relativi al III campionamento svolto nella fase di produzione di Annamaria B (febbraio 2012).

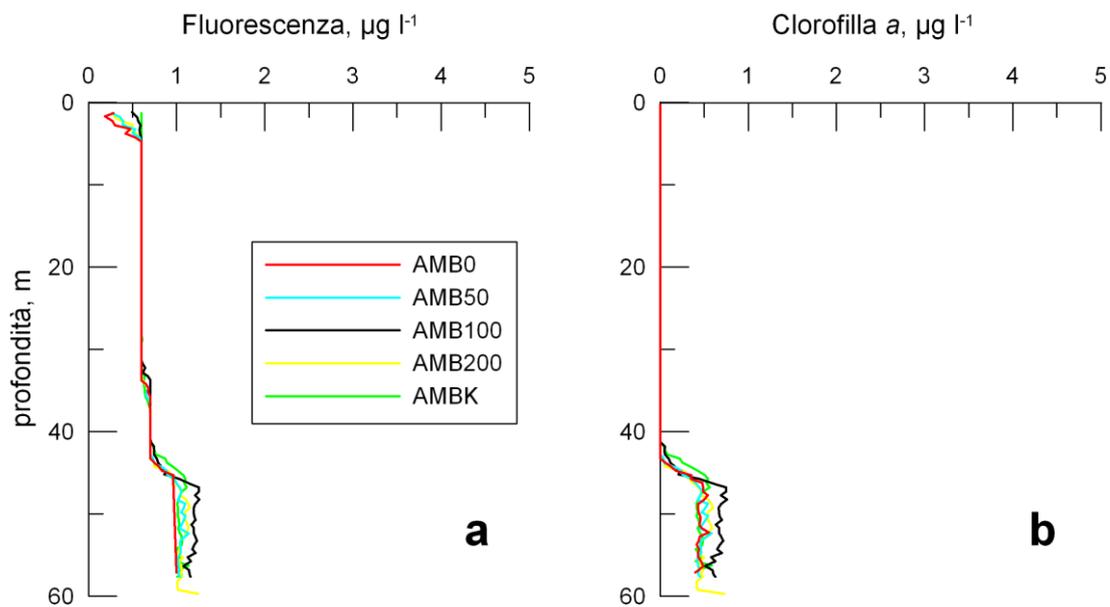


**Fig. 3.7** - Trasparenza della colonna d'acqua mediante disco Secchi registrata nei due survey condotti ad agosto 2011 e febbraio 2012.

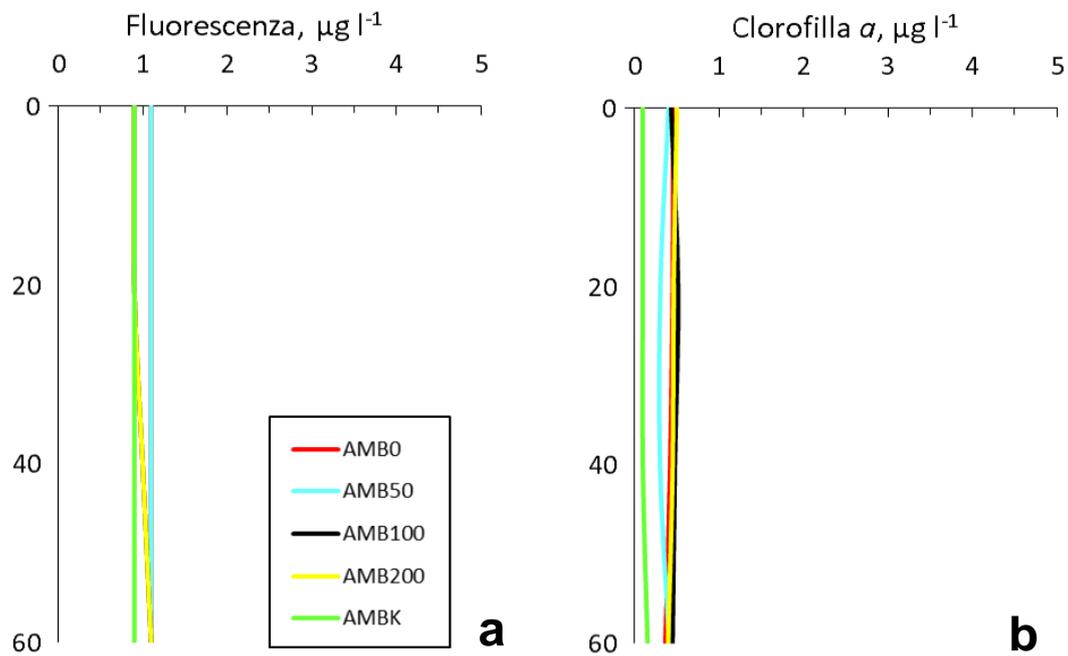
### 3.2.2. FLUORESCENZA INDOTTA E CLOROFILLA A

Nel monitoraggio effettuato ad **agosto 2011** (fig. 3.8) i profili verticali della fluorescenza indotta sono stati caratterizzati da valori particolarmente bassi, con i minimi in prossimità della superficie fino a 5 m di profondità ( $0,2-0,6 \mu\text{g l}^{-1}$ ) e poi un valore costante pari a  $0,6 \mu\text{g l}^{-1}$  in tutte le stazioni fino a 32-34 m. A partire da questa quota si è evidenziato un andamento moderatamente crescente in tutte le stazioni fino a 46-47 m di profondità, dove sono stati raggiunti valori compresi tra  $1,0 \mu\text{g l}^{-1}$  e  $1,2 \mu\text{g l}^{-1}$ , rimasti costanti fino al fondo. Solo nello strato superficiale entro i 5 m di profondità si è evidenziata qualche differenza tra le stazioni, comunque entro range molto ristretti. La clorofilla *a* è risultata assente in tutte le stazioni fino a 43 m di profondità; a partire da tale quota ha mostrato un andamento crescente fino a 46-47 m, dove sono stati raggiunti valori compresi tra  $0,4 \mu\text{g l}^{-1}$  e  $0,7 \mu\text{g l}^{-1}$  che successivamente si sono mantenuti costanti fino al fondo.

Nel **febbraio 2012** la fluorescenza indotta ha presentato un andamento costante dalla superficie al fondo e abbastanza simile in tutte le stazioni, con valori tra  $0,9 \mu\text{g l}^{-1}$  e  $1,1 \mu\text{g l}^{-1}$  (fig. 3.9). Analogamente, anche la clorofilla *a* è risultata costante lungo tutta la colonna d'acqua, essendo compresa tra  $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ , minimo raggiunto nella stazione AMBK sino a 40 m di profondità, e un massimo di  $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ , osservato attorno a 20 m di profondità presso AMB100.



**Fig. 3.8** - Profili di fluorescenza indotta (a) e di concentrazione della clorofilla *a* (b) registrati durante il terzo survey effettuato **dopo l'installazione** (agosto 2011).



**Fig. 3.9** - Profili di fluorescenza indotta (a) e di concentrazione della clorofilla *a* (b) registrati durante il quarto survey effettuato **dopo l'installazione** (febbraio 2012).

### 3.2.3. RICERCA DI IDROCARBURI TOTALI SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA

I risultati relativi alla ricerca di Idrocarburi totali determinati nei campioni d'acqua raccolti nell'inverno 2012 hanno confermato quanto osservato nel survey precedente (estate 2011), ovvero la completa assenza di questi composti organici in tutti i siti esaminati e lungo l'intera colonna d'acqua (Tab. 3-I). Tale situazione era stata riscontrata già dal survey condotto durante i lavori di installazione di Annamaria B (Fabi *et al.*, 2010b).

**Tab. 3-I** - Idrocarburi totali ricercati nel II anno post lavori di installazione di Annamaria B in corrispondenza delle quattro quote di ciascuna stazione utilizzata per le indagini fisiche e chimiche della colonna d'acqua.  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  = limite di quantificazione. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  = limite di quantificazione.

Stazione	Quota	Idrocarburi Totali ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	
		Estate 2011	Inverno 2012
AMBK	Superficie	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10
AMB0	Superficie	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10
AMB50	Superficie	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10
AMB100	Superficie	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10
AMB200	Superficie	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10

### **3.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA**

#### **3.3.1. *DUNALIELLA TERTIOLECTA***

QA-QC - I risultati dei test eseguiti come controllo positivo con  $K_2Cr_2O_7$  sono rientrati nei limiti della carta di controllo intralaboratorio (6,1 – 8,8 mg/l); i coefficienti di variazione tra le repliche nei campioni non diluiti, alla massima concentrazione, sono risultati conformi perché in tutti i casi inferiori al 15%. La crescita algale nei controlli è sempre risultata superiore rispetto al limite minimo consentito (fattore  $\geq 16$ ).

Risultati del saggio - I risultati del saggio applicato ai campioni d'acqua raccolti nell'inverno 2012 sono riportati in Tab. 3-II, contestualmente ai principali parametri di contorno misurati.

Nel complesso è stata rilevata l'assenza di effetto, con valori compresi tra -18% e 15%. Hanno costituito delle eccezioni i campioni prelevati in superficie e a 20 m di profondità presso AMB0 e quello superficiale della stazione AMB200 in cui è stata la presenza di effetto eutrofizzante (crescita algale leggermente superiore rispetto al controllo), con valori compresi tra -35% e -27%.

Confronto con i survey precedenti – Nell'inverno 2011 era stato notato un leggero peggioramento in AMBK (superficie e fondo) e in AMB200 (superficie) dove si era evidenziato un lieve effetto. In corrispondenza della struttura (AMB0) le condizioni erano invece migliorate, essendo scomparso l'effetto riscontrato a -20 m nell'estate 2010. Anche in AMB100 alle quote di 20 e 40 m la situazione era apparsa migliorata nell'inverno 2011. Nelle altre due stazioni le condizioni continuavano a non destare preoccupazioni, essendo ovunque assente l'effetto o essendo presente un effetto eutrofizzante. Nell'estate 2011 è stata confermata l'assenza di effetto già evidenziata nella maggior parte delle stazioni e un miglioramento nei siti in cui nel monitoraggio precedente si era rilevata una leggera presenza di effetto. Nulla da segnalare per quanto riguarda l'inverno 2012.

**Tab 3-II** - Parametri di contorno e risultati relativi al saggio di tossicità con *D. tertiolecta* nei campioni di acqua raccolti nell'inverno 2012. I valori negativi della percentuale di effetto indicano effetto stimolante. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

Stazione	Quota	pH	% Effetto 100% campione	EC50 %	Intervallo fiduciale 95%	EC20 %	Intervallo fiduciale 95%	Giudizio
AMBK	superficie	8,22	-18%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-20	8,11	-4%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,21	-14%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,19	9%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMBO	superficie	8,12	-29%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,19	- 27%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-40	8,23	-5%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,31	-12%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB50	superficie	8,29	-24%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,27	-3%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,21	-1%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,23	-7%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB100	superficie	8,24	5%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-20	8,26	9%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,28	6%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,22	-3%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB200	superficie	8,14	-35%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,29	-2%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,13	11%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,29	15%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto

**Tab 3-III** – Andamento dei risultati ottenuti con il saggio con *D. tertiolecta* relativi ai quattro monitoraggi condotti nella fase di produzione di Annamaria B.

	Sito	Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012
AMBK	superficie	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-20	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-40	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Presenza di effetto	Presenza effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB0	superficie	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	Presenza di effetto	Presenza di effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante
	-40	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB50	superficie	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-40	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Presenza di effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB100	superficie	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-20	Presenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-40	Presenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB200	superficie	Assenza di effetto	Presenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-40	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto

### 3.3.2. *VIBRIO FISCHERI*

QA-QC – I valori EC<sub>50</sub> di 0,96 mg l<sup>-1</sup> e di 0,38 mg l<sup>-1</sup> rispettivamente a 5' e a 15' con sostanza di riferimento (Cu<sup>++</sup>) sono rientrati all'interno del range di riferimento relativo al test Microtox® (0,42 – 1,16 mg l<sup>-1</sup> e 0,03 – 0,75 mg l<sup>-1</sup> rispettivamente per il test a 5' e 15') UNICHIM (Onorati *et al.*, 2007).

Risultati del saggio - In Tab. 3-IV sono riportati i risultati del test, mentre in Tab. 3-V è indicata la relativa stima di tossicità. In tutti i campioni analizzati non è stata rilevata alcuna tossicità.

Confronto con i survey precedenti - Nell'inverno 2012 sono stati completamente confermati i risultati ottenuti a partire dall'estate 2010 (Tab. 3-VI).

**Tab. 3-IV** - Risultati del saggio biologico con il *Vibrio fischeri* applicato ai campioni di acqua marina prelevati nell'inverno 2012. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

Stazione	Quota	Incubazione 5'			Incubazione 15'				
		$\Delta$ biol %	Limiti di confidenza al 95% (inf. e sup.)		Test t (p)	$\Delta$ biol %	Limiti di confidenza al 95% (inf. e sup.)		Test t (p)
AMBK	superficie	0,60	-4,12	8,32	<0,05	0,86	-4,26	6,81	<0,05
	-20 m	1,56	-5,86	7,34	<0,05	1,88	-11,66	11,02	<0,05
	-40 m	2,76	-4,56	9,33	<0,05	3,32	-6,25	7,61	<0,05
	fondo	1,12	-5,46	11,43	<0,05	1,89	-4,06	5,14	<0,05
AMB0	superficie	0,07	-10,40	9,13	<0,05	-0,56	-3,92	4,18	<0,05
	-20 m	-2,12	-11,10	12,79	<0,05	1,08	-4,44	7,81	<0,05
	-40 m	3,45	-4,19	9,18	<0,05	4,12	-2,25	6,38	<0,05
	fondo	1,45	-3,78	4,33	<0,05	2,15	-3,22	4,52	<0,05
AMB50	superficie	-1,86	-9,71	12,41	<0,05	0,76	-3,24	8,64	<0,05
	-20 m	-1,38	-6,25	7,38	<0,05	0,58	-4,97	7,81	<0,05
	-40 m	2,34	-2,65	5,92	<0,05	3,22	-5,62	10,29	<0,05
	fondo	1,65	-3,76	6,58	<0,05	1,86	-4,20	8,62	<0,05
AMB100	superficie	3,12	-3,76	5,49	<0,05	2,78	-5,97	11,05	<0,05
	-20 m	2,52	-7,87	12,51	<0,05	3,42	-3,86	9,78	<0,05
	-40 m	1,26	-2,62	5,68	<0,05	2,48	-8,30	11,53	<0,05
	fondo	0,75	-9,27	10,46	<0,05	0,61	-9,56	12,61	<0,05
AMB200	superficie	1,63	-9,58	4,69	<0,05	2,35	-8,71	3,06	<0,05
	-20 m	-2,57	-13,78	11,74	<0,05	-1,68	-13,42	11,26	<0,05
	-40 m	1,73	-12,36	11,13	<0,05	1,85	-12,59	110,08	<0,05
	fondo	2,41	-7,09	8,82	<0,05	1,46	-6,82	7,59	<0,05

**Tab. 3-V** - Stima di tossicità relativa al saggio biologico con *Vibrio fischeri* effettuato nell'inverno 2012. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

Stazione	Quota	Giudizio di tossicità
AMBK	Superficie	Assente
	-20 m	Assente
	-40 m	Assente
	Fondo	Assente
AMB0	Superficie	Assente
	-20 m	Assente
	-40 m	Assente
	Fondo	Assente
AMB50	Superficie	Assente
	-20 m	Assente
	-40 m	Assente
	Fondo	Assente
AMB100	Superficie	Assente
	-20 m	Assente
	-40 m	Assente
	Fondo	Assente
AMB200	Superficie	Assente
	-20 m	Assente
	-40 m	Assente
	Fondo	Assente

**Tab 3-VI** – Andamento dei risultati ottenuti con il saggio con *V. fischeri* relativi ai quattro monitoraggi condotti nella fase di produzione di Annamaria B.

Stazione	Quota	Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012
AMBK	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB0	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB50	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB100	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB200	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente

### 3.3.3. *TIGRIOPUS FULVUS*

QA-QC – La percentuale di crescita nei controlli è risultata conforme (< 10%) al controllo.

Risultati del saggio - I risultati del saggio applicato ai campioni relativi all'inverno 2012 rispetto all'end point di sopravvivenza sono riportati in Tab. 3-VII. I campioni d'acqua analizzati non hanno evidenziato alcun effetto tossico nei confronti della sopravvivenza del crostaceo *T. fulvus*, in quanto la percentuale di sopravvivenza degli organismi è risultata pari a quella del controllo (100%) o comunque non significativamente differente da essa, come nei campioni AMBK (superficie), AMB0 (-20 m), AMB100 (-40).

Confronto con i survey precedenti - I risultati ottenuti nell'inverno 2012 confermano pienamente quanto già evidenziato nel corso delle campagne condotte dall'estate 2010 a quella del 2011 (Tab. 3-VIII).

**Tab. 3-VII** - Risultati del saggio biologico condotto con *Tigriopus fulvus* sui campioni di acqua marina prelevati nell'inverno 2012. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

Stazione	Quota	$\Delta$ % sopravvissuti vs controllo $\pm$ d.s.	T test	Giudizio
<b>Controllo</b>	---	100,0 $\pm$ 0,0	---	----
AMBK	superficie	96,7 $\pm$ 1,99	n.d.	Tossicità assente
	-20 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-40 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
AMB0	superficie	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-20 m	96,7 $\pm$ 1,99	n.d.	Tossicità assente
	-40 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
AMB50	superficie	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-20 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-40 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
AMB100	superficie	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-20 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-40 m	96,7 $\pm$ 1,99	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
AMB200	superficie	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-20 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-40 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Tossicità assente

**Tab 3-VIII** – Andamento dei risultati ottenuti con il saggio con *T. fulvus* relativi ai quattro monitoraggi condotti nella fase di produzione di Annamaria B.

Stazione	Quota	Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012
AMBK	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB0	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB50	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB100	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB200	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente

### 3.4. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

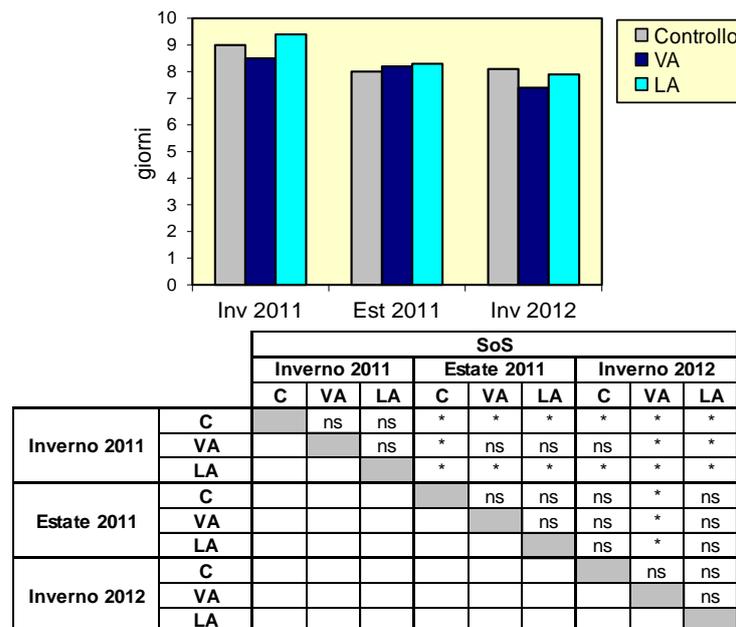
#### 3.4.1. BIOMARKERS

In Tab. 3-IX sono riportati i valori dei biomarkers analizzati nei mitili prelevati vicino (VA) e lontano (LA) dall'anodo di sacrificio della piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nel corso dei tre monitoraggi effettuati nell'inverno ed estate 2011 e nell'inverno 2012.

**Sopravvivenza in aria (Stress on Stress)** - I mitili prelevati nell'inverno 2012 presso la piattaforma Annamaria B hanno presentato una sopravvivenza all'aria compresa tra 7,4 (VA) e 7,9 (LA), senza differenze significative con il controllo (8,1; fig. 3.10).

Rispetto all'estate 2011 è da segnalare solo la riduzione in VA. In quel campionamento, invece, era stato registrato un decremento significativo rispetto all'inverno precedente negli altri due siti (LA e controllo).

Le risposte osservate evidenziano una scarsa alterazione a livello fisiologico nei bivalvi esaminati. Infatti, i tempi di sopravvivenza osservati sono simili, e in alcuni casi superiori, a quelli che emergono dai risultati di studi analoghi condotti in precedenza su piattaforme come PCMS-1 (Fabi *et al.*, 2005a), "Calipso" (4-7 gg, Fabi *et al.*, 2006; Gomiero *et al.*, 2011), Naide (6,3-7,1 Fabi *et al.*, 2014), Clara Nord (4,8-8 gg, Fabi *et al.*, 2010c) e Clara Est (5,3 -8,4 gg, Fabi *et al.*, 2010d).



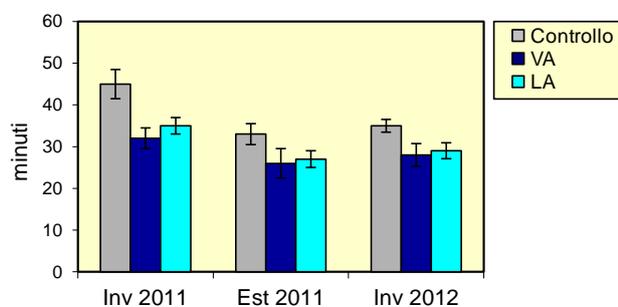
**Fig. 3.10** - Tempi di sopravvivenza all'aria riscontrati negli esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nei tre campionamenti vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test di Kaplan-Meier; ns = non significativo; \* = significativo.

**Tab. 3-IX** - Valori medi dei biomarker ( $\pm$  dev.std.) determinati nei mitili campionati dall'inverno 2011 a quello del 2012 nei siti di controllo, vicino (VA) e lontano (LA) dall'anodo di sacrificio di Annamaria B.

Biomarker	Unità di misura	Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
		Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA
Stress on Stress	LT50 (gg)	9,0	8,5	9,4	8,0	8,2	8,3	8,1	7,4	7,9
Stabilità lisosmiale	min	45,0 $\pm$ 3,5	32,0 $\pm$ 2,5	35,0 $\pm$ 2,0	33,0 $\pm$ 2,5	26,0 $\pm$ 3,5	27,0 $\pm$ 2,0	35,0 $\pm$ 1,5	28,0 $\pm$ 2,8	29,0 $\pm$ 1,9
Lipidi neutri	densità ottica / pixels <sup>2</sup>	31291 $\pm$ 3541	32540 $\pm$ 2401	30280 $\pm$ 3201	28001 $\pm$ 2541	30218 $\pm$ 2401	32051 $\pm$ 3591	28300 $\pm$ 1951	30331 $\pm$ 2500	32400 $\pm$ 3002
Lipofuscine	densità ottica / pixels <sup>2</sup>	5028 $\pm$ 285	6146 $\pm$ 540	6050 $\pm$ 520	7308 $\pm$ 361	8000 $\pm$ 321	8099 $\pm$ 269	7106 $\pm$ 423	7930 $\pm$ 720	7880 $\pm$ 361
Metallotioneine	$\mu$ g MT/g	90,1 $\pm$ 7,0	115,9 $\pm$ 5,7	103,8 $\pm$ □,4	96,1 $\pm$ 5,4	129,9 $\pm$ 4,7	133,9 $\pm$ 6,4	123,78 $\pm$ 1,57	129,14 $\pm$ 0,59	126,77 $\pm$ 0,99
Test della Cometa	% di coda DNA	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1

**Stabilità delle membrane lisosomiali** – I tempi medi di destabilizzazione osservati nell’inverno 2012 nei mitili prelevati presso la piattaforma hanno mostrato valori significativamente più bassi rispetto al controllo, analogamente alle campagne precedenti (fig. 3.11), suggerendo un leggero stato di stress nei bivalvi insediati presso la struttura.

Dal confronto interstagionale è emersa una diminuzione dei tempi al controllo e in LA nell’estate 2011 rispetto all’inverno precedente, senza ulteriori variazioni nell’ultimo campionamento. Nessuna variazione significativa nel tempo è stata invece rilevata in VA. Nel complesso, comunque, i tempi di destabilizzazione sinora registrati sono confrontabili a quelli osservabili su organismi in buono stato di salute (Donnini *et al.*, 2007). Confrontando i risultati con quelli di analoghe attività di biomonitoraggio si osserva come i valori medi determinati finora presso Annamaria B risultino simili, e in alcuni casi superiori, agli analoghi registrati precedentemente su analoghe strutture estrattive (Fabi *et al.*, 2006; 2010c; 2010d; Gomiero *et al.*, 2011) e presso altre aree dell’alto Adriatico (Petrovic *et al.*, 2004). Essi risultano invece inferiori a quelli riportati da Gorbi *et al.* (2008), ottenuti però con una differente metodologia d’analisi.



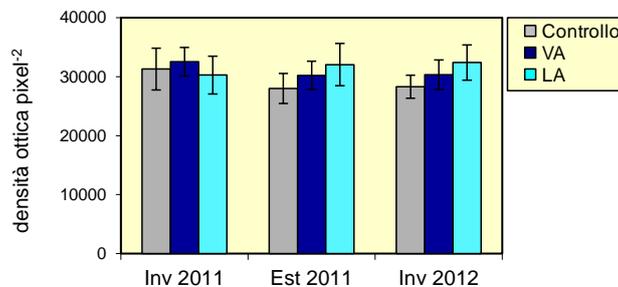
		Stabilità membrane lisosomiali								
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	*	*	*	*	*	*
	VA			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA				ns	*	*	ns	*	*
Estate 2011	C					*	*	ns	ns	ns
	VA						ns	*	ns	ns
	LA							*	ns	ns
Inverno 2012	C								*	*
	VA									ns
	LA									

**Fig. 3.11** – Valori medi ( $\pm$  d.s.) dei tempi di destabilizzazione espressi in min ed associati alla fragilità dei lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nei tre survey vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test Mann-Whitney; ns = non significativo; \* = significativo.

**Valutazione del contenuto di lipidi neutri** - I livelli di lipidi neutri osservati nei siti VA e LA nell'inverno 2012 sono risultati comparabili a quello relativo ai mitili prelevati dal sito di controllo, analogamente ai survey precedenti (fig. 3.12).

Nel tempo è stata registrata una generale omogeneità, non evidenziando alcuna fluttuazione stagionale.

Nel complesso i valori fin ora osservati permettono di escludere un'alterazione biologica indotta dalla presenza di contaminanti ambientali. Confrontando i risultati ottenuti nel corso dei tre survey con la più recente letteratura si evidenziano risposte nella norma e assimilabili ad organismi soggetti a una bassa pressione antropica (Fabi *et al.*, 2006; 2010c; 2010d; 2014; Gorbi *et al.*, 2008).



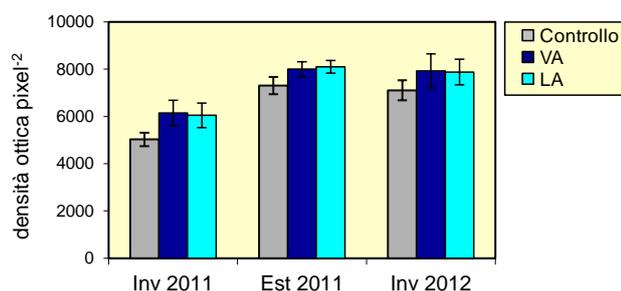
		Lipidi neutri								
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA				ns	ns	ns	ns	ns	ns
Estate 2011	C					ns	ns	ns	ns	ns
	VA						ns	ns	ns	ns
	LA							ns	ns	ns
Inverno 2012	C								ns	ns
	VA									ns
	LA									

**Fig. 3.12** - Valori medi ( $\pm$  d.s.) di accumulo di lipidi neutri espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nei tre survey vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test ANOVA; ns = non significativo.

**Valutazione del contenuto di lipofuscine** - I livelli di lipofuscine osservati nei tre siti di indagine nell'inverno 2012 sono risultati omogenei (fig. 3.13). Nelle due stagioni precedenti, invece, il livello registrato al controllo era risultato statisticamente inferiore a quelli di uno o entrambi i siti della piattaforma.

Non sono state evidenziate variazioni dall'estate 2011, stagione in cui era avvenuto ovunque un innalzamento di questi sottoprodotti della perossidazione delle

membrane cellulari rispetto all'inverno precedente. Nel complesso i livelli medi assunti da questo parametro non portano ad ipotizzare alcuna criticità correlabile alla presenza di stress perossidativo a carico degli organismi analizzati. Infatti quanto ottenuto, confrontato con quanto riportato in letteratura, è inferiore ai livelli evidenziati nel corso di precedenti esperienze di monitoraggio in aree costiere dell'Adriatico settentrionale (Petrovic *et al.*, 2004) o su analoghe piattaforme (Fabi *et al.*, 2006; 2014; Gorbi *et al.*, 2008).



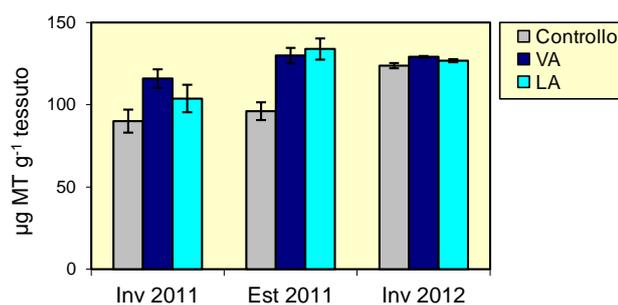
	Lipofuscine								
	Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
C		*	*	*	*	*	*	*	*
VA			ns	*	*	*	ns	*	*
LA				*	*	*	ns	*	*
C					ns	*	ns	ns	ns
VA						ns	ns	ns	ns
LA							ns	ns	ns
C								ns	ns
VA									ns
LA									

**Fig. 3.13** - Valori medi ( $\pm$  d.s.) di accumulo di lipofuscine espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nei tre survey vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test ANOVA; ns = non significativo; \* = significativo.

**Metallotioneine** - I livelli di metallotioneine determinati nei mitili prelevati dai due siti della piattaforma nell'inverno 2012 sono risultati significativamente superiori rispetto al controllo, analogamente a quanto registrato in uno o entrambi i punti di prelievo di Annamaria B nei monitoraggi precedenti (fig. 3.14).

Nel tempo sono avvenuti due incrementi significativi; il primo ha riguardato i due siti della piattaforma nell'estate 2011, il secondo il sito di controllo nell'inverno 2012.

Le risposte biologiche finora rilevate rimangono più contenute rispetto a quanto evidenziato per altre piattaforme metanifere collocate nella medesima zona di studio (Fabi *et al.*, 2005a; 2005b; 2006; 2014; Gomiero *et al.*, 2011).



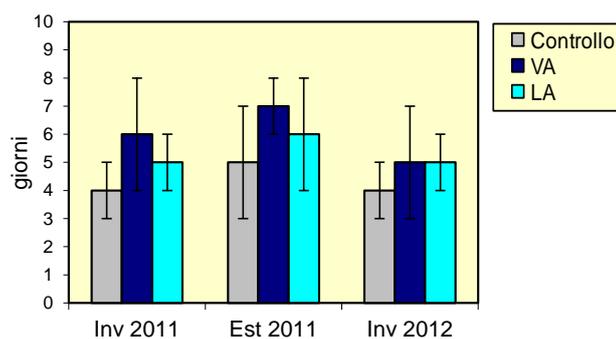
		Metallothioneine								
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	ns	ns	*	*	*	*	*
	VA			ns	*	*	*	ns	*	*
	LA				ns	*	*	*	*	*
Estate 2011	C					*	*	*	*	*
	VA						ns	ns	ns	ns
	LA							*	ns	ns
Inverno 2012	C								*	*
	VA									ns
	LA									

**Fig. 3.14** – Concentrazioni medie ( $\pm$  d.s.) di metallothioneine rilevate nella ghiandola digestiva di mitili (*M. galloprovincialis*) prelevati nei tre survey vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test di Mann – Whitney; ns = non significativo; \* = significativo.

**Comet assay** - Nell'inverno 2012 il test della cometa (Comet assay) non ha evidenziato, come già in precedenza, differenze significative tra i siti (fig. 3.15). I mitili provenienti dal sito di controllo hanno mostrato una dimensione media della “coda”, indice diretto di danno genetico, pari al  $4\pm 1\%$  dell'intera superficie del nucleo. Valori nel complesso simili sono stati ottenuti nei mitili prelevati presso il VA ( $5\pm 2\%$ ) e il LA ( $5\pm 1\%$ ) della piattaforma.

Non sono state riscontrate differenze significative neanche nei confronti interstagionali.

I valori inoltre sono confrontabili con quanto riportato in letteratura per organismi nativi prelevati presso aree marine non soggette a pressione antropica e non evidenziano quindi criticità ambientali (Klobučar *et al.*, 2008).



		Test della Cometa								
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA				ns	ns	ns	ns	ns	ns
Estate 2011	C					ns	ns	ns	ns	ns
	VA						ns	ns	ns	ns
	LA							ns	ns	ns
Inverno 2012	C								ns	ns
	VA									ns
	LA									

**Fig. 3.15** - Livello di danno al DNA rilevato dal Test della Cometa negli emociti di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nei tre survey vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test di Mann – Whitney; ns = non significativo; \* = significativo.

### 3.4.2. METALLI PESANTI

L'analisi della distribuzione dei metalli pesanti negli organismi prelevati nell'inverno 2012 ha evidenziato un accumulo significativo di tutti i tre metalli analizzati nei mitili prelevati in entrambi i siti della piattaforma rispetto a quelli di controllo, analogamente a quanto rilevato nelle due stagioni del 2011 (Tabb. 3-X e 3-XI; fig. 3.16).

Rispetto ai monitoraggi precedenti è stata osservata un'uniformità di comportamento nel tempo per quanto riguarda bario e cadmio non essendo state evidenziate differenze interstagionali significative in nessuno dei tre siti. Lo zinco, invece, dopo un decremento significativo ovunque nell'estate 2011 ha evidenziato un aumento in tutti i tre siti nell'ultimo survey, senza tuttavia raggiungere i tenori registrati nell'inverno 2011. Nel complesso, i livelli medi riscontrati sono in linea con quelli osservati in un precedente studio pluriennale condotto da Fattorini et al. (2008), mirato a valutare la biodisponibilità di metalli pesanti evidenziata in mitili prelevati presso diverse piattaforme ubicate nel mare Adriatico settentrionale e centrale, da Gorbi et al. (2008) presso la piattaforma "Giovanna" e da Fabi et al. 2004; 2005a;

2005b; 2006; 2010c; 2010d; 2014) presso varie piattaforme estrattive off-shore dell'Adriatico centro-settentrionale.

**Tab. 3-X** - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nel corso dei tre survey. Valori espressi in mg/kg p.s. ( $\pm$  d.s.). LA = lontano anodo di sacrificio; VA = vicino anodo di sacrificio.

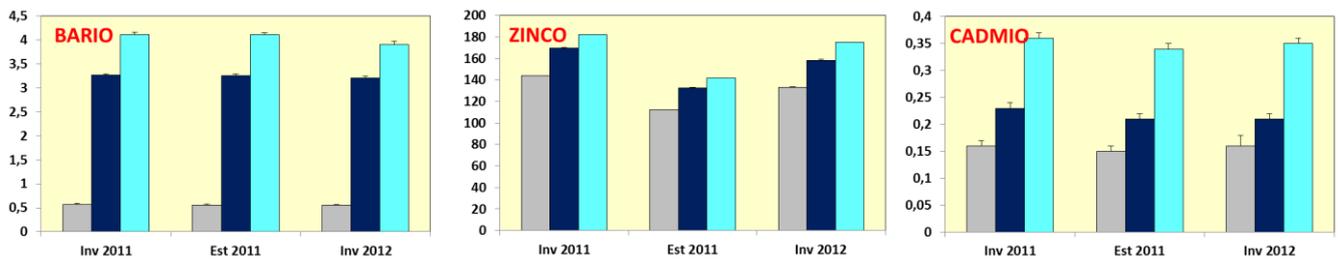
	Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
	Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA
Ba	0,57 $\pm$ 0,02	3,27 $\pm$ 0,03	4,12 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,02	3,26 $\pm$ 0,03	4,11 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,02	3,21 $\pm$ 0,05	3,91 $\pm$ 0,07
Zn	143,81 $\pm$ 0,08	169,82 $\pm$ 0,08	182,06 $\pm$ 0,07	112,1 $\pm$ 0,19	132,4 $\pm$ 0,91	141,9 $\pm$ 0,11	133,27 $\pm$ 0,09	158,23 $\pm$ 0,11	174,98 $\pm$ 0,17
Cd	0,16 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01

**Tab. 3-XI** - Risultati dei confronti statistici relativi alla distribuzione dei metalli pesanti nei siti della piattaforma Annamaria B (vicino anodo, VA; lontano anodo, LA) rispetto al controllo (test U - Mann-Whitney). \* =  $p < 0,05$ ; ns = non significativo.

		Ba								
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA			*	*	ns	*	*	ns	*
	LA				*	*	ns	*	*	ns
Estate 2011	C					*	*	ns	*	*
	VA						*	*	ns	*
	LA							*	*	ns
Inverno 2012	C							*	*	*
	VA								*	*
	LA									*

		Zn								
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	*	*	*	*	*	*
	VA			*	*	*	*	*	*	*
	LA				*	*	*	*	*	*
Estate 2011	C					*	*	*	*	*
	VA					*	*	ns	*	*
	LA						*	*	*	*
Inverno 2012	C							*	*	*
	VA								*	*
	LA									*

		Cd								
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA			*	*	ns	*	*	ns	*
	LA				*	*	ns	*	*	ns
Estate 2011	C					*	*	ns	*	*
	VA					*	*	ns	*	*
	LA						*	*	ns	*
Inverno 2012	C							*	*	*
	VA								*	*
	LA									*



**Fig. 3.16** - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nel corso dei tre survey. Valori espressi in mg/kg p.s. ( $\pm$  d.s.).

### 3.4.3. IDROCARBURI TOTALI

Analogamente ai survey precedenti, anche nell'inverno 2012 la somma degli idrocarburi totali (C5-C40) è risultata inferiore a 0,1 mg/kg p.s. in tutti siti, indicando quindi uno scarso accumulo di tale classe di composti organici.

**Tab. 3-XII** - Distribuzione degli idrocarburi totali rilevati nei tessuti di mitili prelevati presso la piattaforma Annamaria B nel corso dei tre survey. Valori espressi in mg/kg p.s. n.c. = non calcolabile. 0,1 mg/kg = limite di rilevabilità strumentale.

	Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
	Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA
$\Sigma_{IA} C5-C40$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Test U		n.c.	n.c.		n.c.	n.c.		n.c.	n.c.

## 4. CONCLUSIONI

In riferimento al Decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 la piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi “Annamaria B” è sottoposta a un Programma di Monitoraggio Transfrontaliero redatto da ISPRA in collaborazione con il Centro di Ricerche Marine dell’Istituto Ruder Bošković (Croazia).

Nel presente rapporto sono descritte le caratteristiche fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d’acqua e le analisi di inquinanti in *Mytilus galloprovincialis* relative al quarto survey condotto dopo la fine dei lavori di perforazione e installazione di Annamaria B (inverno 2012) confrontati, ove possibile, con quelli precedenti e relativi sia alla fase di installazione della piattaforma che ai monitoraggi post lavori sinora condotti (estate 2010; Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012). Per la maggior parte degli aspetti indagati non è stato possibile effettuare un confronto con i dati pregressi relativi alla fase di costruzione della struttura, poiché nel Piano di monitoraggio transfrontaliero sono stati richiesti schemi di campionamento e/o tipologie di indagini differenti tra il durante e il post-lavori.

Nell’estate 2010 non è stato possibile condurre le analisi di inquinanti e di biomarkers nei mitili insediati sulle parti immerse della piattaforma in quanto, al momento del campionamento (settembre), sul jacket di Annamaria B era presente solo una scarsa quantità di esemplari di *Mytilus galloprovincialis* le cui dimensioni erano troppo ridotte per permettere l’esecuzione delle suddette analisi. Pertanto, queste indagini sono iniziate nell’inverno 2011.

**Misure correntometriche** – Analogamente a quanto riscontrato nel I semestre 2011 (Fabi *et al.*, 2011b), anche nel I semestre 2012 le correnti sia di fondo che di superficie hanno avuto prevalentemente direzione del terzo quadrante (SW). L’intensità è apparsa piuttosto costante, intorno a 13 cm/s, anche se a inizio febbraio si sono registrate intensità superiori, sino a 25-30 cm/s lungo tutta la colonna d’acqua, e mediamente superiore in superficie.

**Caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d’acqua** – Rispetto al survey condotto nell’agosto 2011, nel febbraio 2012 sono state riscontrate differenze nelle diverse stazioni che appaiono interamente legate alla stagionalità tipica del mare Adriatico, analogamente a quanto evidenziato nell’anno di indagine precedente (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b). Infatti, nell’agosto 2011 la colonna d’acqua era apparsa

stratificata da un punto di vista termalino, mentre nel febbraio 2012 le condizioni sono risultate tipicamente invernali, con il completo rimescolamento verticale delle masse d'acqua.

Pertanto, considerando l'intero periodo di monitoraggio, non sono state evidenziate peculiarità da un punto di vista fisico e chimico rispetto a quanto riportato in bibliografia per l'alto e medio Adriatico (Artegiani *et al.*, 1997a; 1997b; Marini *et al.*, 2008).

L'ossigeno aveva mostrato nell'agosto 2011 una situazione di leggera sotto saturazione sino a circa 16 m di profondità, di sovrasaturazione sino a circa 48 m e di saturazione alle quote più profonde, senza differenze tra controllo e siti di campionamento posti lungo il transetto intersecante la piattaforma sino a 200 m di distanza. A febbraio 2012, invece, anche per l'ossigeno sono stati ottenuti profili omogenei lungo la colonna d'acqua con valori di saturazione attorno al 92-95%, ed è stata confermata l'omogeneità tra i siti.

I valori di torbidità sono risultati ridotti sia nell'estate 2011 che nell'inverno 2012 come già nell'anno precedente, quando a partire dall'inverno 2011 era stato osservato un decremento rispetto sia alla fase di posa in opera della piattaforma, sia al survey condotto nel settembre 2010 all'inizio della fase di produzione di Annamaria B (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b).

La fluorescenza indotta e la concentrazione di clorofilla *a* si sono mantenute su valori molto ridotti in tutte le stazioni sia nell'agosto 2011 che nel febbraio 2012, mostrando pertanto, anche in questo caso, analogie con l'estate 2010 e inverno 2011. La trasparenza misurata mediante il disco di Secchi è notevolmente aumentata in questo secondo anno di produzione di Annamaria B, raggiungendo i 40 m circa ovunque, mentre precedentemente i valori si attestavano attorno ai 15-20 m (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b). Pertanto non vi sono evidenze di aumenti del particolato sospeso indotti dalla presenza della struttura o dall'esercizio di attività ad essa connesse.

**Idrocarburi totali lungo la colonna d'acqua** - La ricerca di idrocarburi totali nel corso dei quattro survey sinora condotti nella fase di produzione di Annamaria B (estate 2010 - inverno 2012) effettuata presso le medesime stazioni utilizzate per le indagini chimiche e fisiche della colonna d'acqua in corrispondenza di 4 quote (superficie, -20 m, -40 m e fondo) non ha evidenziato la presenza rilevabile di questa classe di contaminanti organici.

Al contrario, idrocarburi totali sono stati rinvenuti sia nel mare del Nord (0,04- 3,0 mg/l; Strømngren *et al.*,1995) che nelle acque di strato di diverse piattaforme petrolifere (130 e 575 µg/l; Ekins *et al.*, 2005). Livelli simili a questi ultimi vengono indicati anche dall'OGP (International Association of Oil & Gas Producers) per analisi condotte nelle acque di piattaforme installate nella costa orientale della Scozia (OGP, 2002).

I risultati sin qui ottenuti presso Annamaria B tendono quindi ad escludere criticità ambientali associate alla presenza di questa classe di inquinati organici.

**Ecotossicologia su campioni di acqua marina** - I saggi di tossicità impiegati nella fase di post installazione della piattaforma Annamaria B (estate 2010 - inverno 2012) hanno confermato, nel complesso, l'assenza di effetti tossici in tutti gli indicatori ambientali che costituiscono la batteria. Ciò vale per i test condotti sia con *Vibrio fischeri* che con *Tigropus fulvus*. Il test effettuato con *Dunaliella tertiolecta* aveva evidenziato un lieve peggioramento nell'inverno 2011 nella stazione di controllo AMBK posta a 2000 m a NW da Annamaria B, mantenendo invece inalterate le condizioni nelle stazioni da 50 e 200 m a SE dalla piattaforma (ad eccezione della quota superficiale di quella posizionata a 200 m) ed evidenziando un miglioramento nelle immediate vicinanze della struttura e a 100 m a SE di distanza da essa. A partire dall'estate 2011 anche per questo organismo non è stato più rilevato alcun segnale di criticità in tutti i siti monitorati.

**Analisi di inquinanti in *Mytilus galloprovincialis*** - L'applicazione della batteria di biomarkers nel campionamento effettuato nell'inverno 2012 ha evidenziato, nel complesso, un buono stato degli organismi prelevati presso la piattaforma. I parametri più generali (stress on stress) hanno evidenziato valori leggermente inferiori rispetto al controllo, ma in linea con casi analoghi.

I test più sensibili, condotti per cercare eventuali cambiamenti a livello cellulare e subcellulare, hanno riportato solo una lieve diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali (indice aspecifico di stress) nei mitili prelevati sia vicino che lontano dagli anodi sacrificali. Il rischio genotossico (livelli intracellulari di lipidi neutri) è apparso scarso e il test della cometa non ha evidenziato alcun segnale significativamente differente tra il controllo e i campioni prelevati presso la piattaforma.

Se nell'inverno 2012 la sintesi di proteine metallo-chelanti (metallotioneine) non ha

indicato differenze tra controllo e piattaforma, contrariamente ai survey precedenti in cui nei mitili di Annamaria B era stato evidenziato un modesto effetto biologico correlabile alla presenza di elementi metallici, l'accumulo dei tre metalli pesanti ricercati (bario, zinco e cadmio) negli organismi prelevati sia vicino che lontano dagli anodi di sacrificio è invece risultato significativamente superiore rispetto al controllo, analogamente a quanto osservato precedentemente.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Artegiani, A., Bregant D., Paschini E., Pinardi N., Raicich F., A. Russo 1997a. The Adriatic Sea general circulation. Part I. Air-sea interactions and water mass structure, *J. Phys. Oceanogr.*, 27, 1492–1514.
- Artegiani, A., . Bregant D, Paschini E., Pinardi N., Raicich F., Russo A. 1997b. The Adriatic Sea general circulation. Part II: Baroclinic Circulation Structure, *J. Phys. Oceanogr.*, 27, 1515–1532.
- Asby J., Tinwell H., Lefevre P.A., Browne M.A. 1995. The single gel electrophoresis assay for induced DNA damage assay: measurement of tail length and moment. *Mutagenesis*, 10: 85-90.
- ASTM E1218-04-E1. 2004. *Standard guide for conducting static toxicity tests with microalghe*. ASTM E1218-04-E1. 14 pp.
- Azur Environmental. 1994. *Microtox® M500 manual* (A toxicity testing handbook). Carlsbad, CA, USA
- Carli A., Fiori M.A. 1979. Sviluppo larvale del *Tigriopus fulvus* Fischer. *Atti IX Congr, Soc, Ital, Biol, Mar.*; 181-190.
- Carli A., Mariottini G.L., Pane L. 1988. Reproduction of the rockpools Harpacticoid copepod *Tigriopus fulvus* (Fischer 1860), suitable for aquaculture. *XII Congrès international d'Aquariologie*: 295-300.
- Christensen E.R., Kusk K.O., Nyholm N. 2009. Dose-response regressions for algal growth and similar continuous endpoint: calculation of effective concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28: 826-835.
- de Zwaan A., de Kock W.C. 1988. The development of a general biochemical stress index. *Mar. Environ. Res.*, 24: 254-255.
- de Zwaan A., Wijsman T.M.C. 1976. Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 54B: 313-323.
- Donnini F., Dinelli E., Sangiorgi F., Fabbri E. 2007. A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). *Env. Int.*, 33 (7): 919-928.
- Eertman R.H.M., de Zwann A. 1994. Survival of the fittest: resistance of mussels to aerial exposure. Pagg. 269-284, in: Kramer (Ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton.
- Ekins P., Vanner R., Firebrace J. 2005. *Management of produced water on offshore oil installations: A comparative Assessment using Flow analysis*. Final Report for UK Offshore Operators Association and its member companies. 89 pp.
- Fabi G., De Ranieri S, Manoukian S., Marini M., Scarcella G., Spagnolo A. 2004. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Barbara NW. Rapporto conclusivo di tre anni di indagine (2000–2002)*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 228+XLIX pp.
- Fabi G., Ausili S., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2005a. *Servizi di monitoraggio ambientale piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi “Porto Corsini Mare Sud 1 (PCMS-1)”*. Rapporto conclusivo di due anni di indagine. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 95 + XI pp.
- Fabi G., Boldrin A., De Ranieri S., Manoukian S., Nasci C., Scarcella G., Spagnolo A. 2005b. *Servizi di monitoraggio ambientale Piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi “Naomi-Pandora”*. Rapporto conclusivo di due anni di indagine (2002-2003).

- Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 201 + XXVIII pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Manoukian S., Marini M., Meneghetti F., Paschini E., Scarcella G., Spagnolo A. 2006. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Calipso. Rapporto finale di 4 anni di studio (2002-2005)*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 224 + XLII pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2010a. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 2° Survey durante le operazioni di installazione (inverno 2010). Indagini fisiche e chimiche della colonna d'acqua, indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti e indagini sulla comunità bentonica*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 47 + XIX pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2010b. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". I Survey durante le operazioni di installazione (settembre 2009). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti e indagini sulla comunità bentonica*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 29 + XIII pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Grilli F., Nasci C., Spagnolo A. 2010c. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Clara Nord. Rapporto conclusivo di tre anni di indagine (estate 2005 - inverno 2008)*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 240 + XLIII pp.
- Fabi G., Campanelli A., De Ranieri S., Nasci C., Polidori P., Punzo E. 2010d. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Clara Est. Rapporto conclusivo di tre anni di indagine (estate 2005 - inverno 2008)*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 353 + XLI pp.
- Fabi G., Campanelli A., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2011a. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 1° Survey successivo alle operazioni di installazione (estate 2010). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua, indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 53 + XVI pp.
- Fabi G., Campanelli A., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2011b. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 2° Survey successivo alle operazioni di installazione (I semestre 2011). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua, analisi di inquinanti in organismi marini*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 61 + IX pp.
- Fabi G., Bruno S., De Ranieri S., Gomiero A., Nasci C., Spagnolo A. 2012. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 3° Survey successivo alle operazioni di installazione (estate 2011). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua, Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti, Ricerca di inquinanti in organismi marini*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 83 + XXI pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Girasole M., Gomiero G., Penna P., Spagnolo A. 2014. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Naide. Rapporto finale dal pre-survey al IV anno dopo la posa in opera (2004-2009). Misure correntometriche, Indagini*

- sedimentologiche, ecotossicologiche e Analisi di inquinanti in organismi marini*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 213 + xlviii pp.
- Faraponova O., De Pascale D., Onorati F., Finoia M.G. 2005. *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida) as a target species in biological assays. *Meiofauna Marina*, 14: 91-95.
- Fattorini D., Notti A., Di Mento R., Cicero A.M., Gabellini M., Russo A. Regoli F. 2008. Seasonal, spatial and inter-annual variations of trace metals in mussels from the Adriatic sea: a regional gradient for arsenic and implications for monitoring the impact of off-shore activities, *Chemosphere* 72: 1524–1533.
- Gomiero A., Da Ros L., Nasci C., Meneghetti F., Spagnolo A., Fabi G. 2011. Integrated use of biomarkers in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing off-shore gas platforms in the Adriatic Sea: results of a two year biomonitoring program. *Mar. Poll. Bull.*, 62 (11): 2483-2495.
- Gorbi S., Lamberti C.V., Notti A., Benedetti M., Fattorini D., Moltedo G., Regoli F. 2008. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Mar. Environ. Res.*, 65 (1): 34-49.
- ISO/FDIS 14669. 1999. *Water quality- Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea., ISO/TC147/SC5N, Draft version*. 16 pp.
- ITRC - Interstate Technology & Regulatory Council. 2006. *Protocol for the single cell gel electrophoresis/comet assay for rapid genotoxicity assessment*. 10 pp.
- Klobučar G.I.V., Štambuka A., Hylland K., Pavlica M. 2008. Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir bays, Croatia. *Science of the total Environment* 405: 330-337.
- Lee R.F., Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544,(1): 43-64.
- Lowe D.M., Fossato V.U., Depledge M.H. 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 129: 189-196.
- Marini M., Jones B.H., Campanelli A., Grilli F., Lee C.M. 2008. Seasonal variability and Po River plume influence on biochemical properties along western Adriatic coast. *J. Geophys. Res.*, 113, C05S90, doi:10.1029/2007JC004370.
- Moore M.N. 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochemistry*, 22: 187-191.
- OGP. 2002. *Aromatics in produced water: occurrence, fate and effects and treatment*. OGP January 2002, Report No. 1.20/324. 6 pp.
- Onorati F, Bandini F., Brillì L., Bellaria V., Castiglioni S., Celetti A.M., Comin S., Di Gioia E., Fabbri S., Facchini L., Ferrara M., Guerra R., Leoni T., Lo Re R., Manzo S., Martini P., Mascilongo G., Meloni P., Meineri V., Milani S., Molina M., Rossi E., Ruggiero G., Sanguinetti M.S., Tamberlich F., Traldi D., Trichilo S. 2007. Interconfronto nazionale sul test di inibizione della bioluminescenza mediante *Vibrio fischeri*. *Biol. Mar. Medit.*, 14(1): 87-91.
- Pane L., Feletti M., Carli A.M. 1996. Fattori ambientali e fluttuazioni della popolazione del copepode *Tigriopus fulvus* delle pozze di scogliera di Genova - Nervi (Mar Ligure). *Atti Soc. Ital. Ecol.*, 17: 317-320.
- Petrovic S., Semencic L., Ozetic B., Orzetic M. 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Mar. Poll. Bull.*, 49 (9-10): 713-720.

- Strømgren T., Sørstrøm S.E., Schou L., Kaarstad I., Aunaas T., Brakstad O.G. 1995. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. *Mar. Environ. Res.*, 40 (2): 147-169.
- Terman A., Brunk U.T. 2004. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36: 1400–1404.
- UNESCO. 1983. Algorithms for computation of fundamental properties of seawater, by N.P. Fofonoff and R.C. Millard Jr., *Tech. Pap. Mar. Sci.*, 44. 53 pp.
- UNESCO. 1988. The acquisition, calibration, and analysis of CTD data. *Tech. Pap. Mar. Sci.*, 54. 59 pp.
- UNI EN ISO 9377-2. 2002. *Determinazione dell'indice di idrocarburi. Metodo mediante estrazione con solvente e gascromatografia*. 17 pp.
- USEPA. 1991. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms -Section 14- Green alga *Selenastrum capricornutum* growth test - Method 1003.0*. EPA/600/4-91/002. 334 pp.
- USEPA. 1995. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluent and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms*. EPA/600/R-95/136. 15 pp.
- USEPA. 1996. *Acid digestion of sediments, sludges, and soils*. US-EPA 3050B. 12 pp.
- USEPA. 2000. *Nonhalogenated organics by gas chromatography*. 8015c rev. 3. 36 pp.
- USEPA. 2007. *Ultrasonic Extraction of Solid Samples*. US-EPA 3550C rev. 3. 17 pp.
- Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Marcinelli G., Accomando R., Smaal A.C., Orunesu M. 1995. Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar. Environ. Res.*, 39: 245-248.
- Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 281–300.
- Visvardis E.E., Tassiou A.M., Piperakis S.M. 1997. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  $\gamma$ -irradiation with alkaline comet assay. *Mutation Res.*, 383: 71-80.
- Winkler L.W. 1888. Die Bestimmung des im Wasser gelosten Sauerstoffes. *Chem. Ber.*, 21: 2843-2855.
- Wright S.W., Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., Bjornland T., Repeta D., Welschmeyer N. 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 77: 183-196.

***ALLEGATO A***

**SCHEDE TECNICHE DELLA STRUMENTAZIONE**

**UTILIZZATA NELLE INDAGINI**

**A1**  
**COLONNA D'ACQUA**  
**INDAGINI FISICHE E CHIMICHE**  
**e**  
**IDROCARBURI TOTALI**

**A1-I CORRENTOMETRO Aquadopp**



**Correntometro** Aquadopp (nell'immagine a destra montato su apposito supporto utilizzato per l'installazione sulla catena correntometrica).

Strumento	Costruttore	Modello	Sensore	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione
Correntometro acustico	Nortek	Aquadopp	Velocità	1% del valore misurato $\pm 0,5 \text{ cm s}^{-1}$	$0-500 \text{ cm s}^{-1}$	della casa
			Bussola	$\pm 2^\circ$	$0-360^\circ$	in campo
			Pressione	$\pm 0,25\%$	0-200 m	in campo
			Temperatura	$\pm 0,1^\circ\text{C}$	$-4 - 40^\circ\text{C}$	della casa

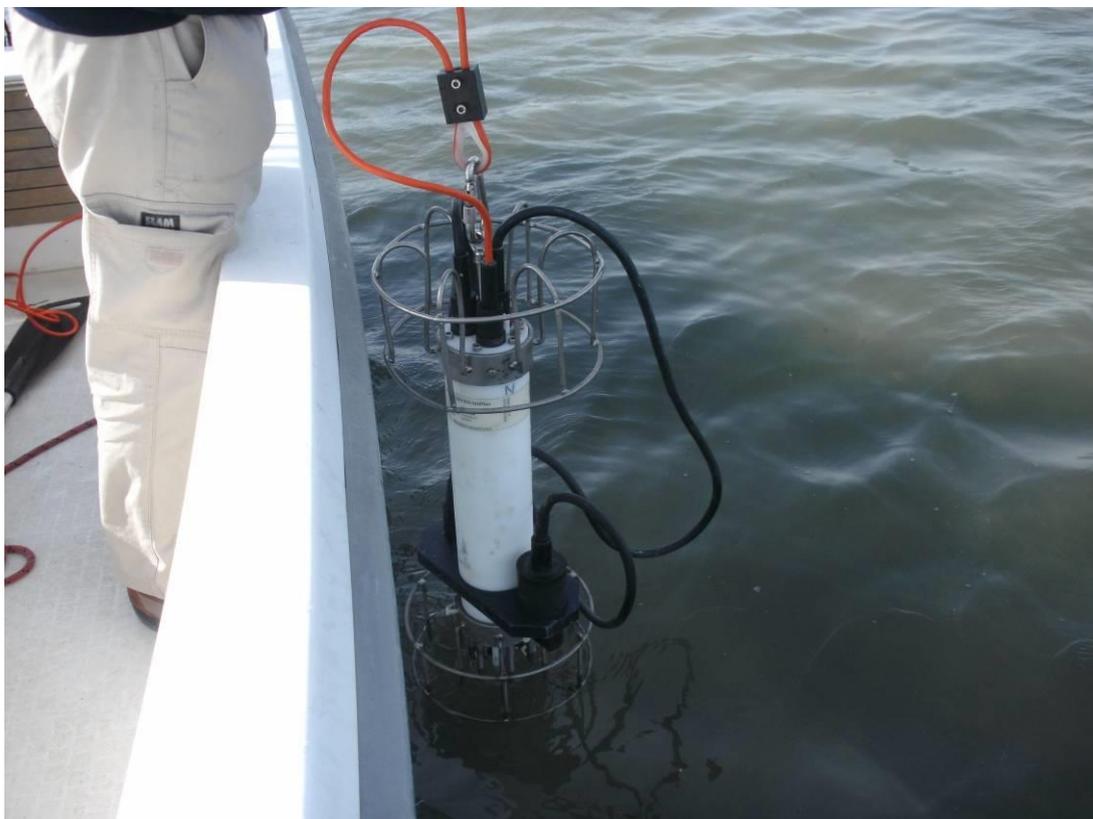
## A1-II ADCP (ACOUSTIC DOPPLER CURRENT PROFILER)



Strumento	Costruttore	Modello	Risoluzione	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione
ADCP	Teledyne RD Instruments	Workhorse Sentinel 300 kHz	0,1 cm/s	$\pm 0,5$ cm/s	$\pm 5$ m/s (default) $\pm 20$ m/s (maximum)	Ad ogni deployment

Sensore	Costruttore	Modello	Risoluzione	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione
Temperatura	Teledyne RD Instruments	Workhorse Sentinel 300 kHz	0,01°C	$\pm 0,4$ cm/s	da -5°C a + 45°C	ad ogni deployment

**A1-III      SONDA MULTIPARAMETRICA CTD OS316plus**



**CTD:** Idronaut *Ocean Seven 316plus* equipaggiata con i seguenti sensori:

Sensore	Costruttore	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione*
Temperatura	Idronaut	$\pm 0,003$ °C	-3 – +50°C	della casa
Conducibilità	Idronaut	$\pm 0,003$ mS cm <sup>-1</sup>	0 – 64 mS cm <sup>-1</sup>	della casa
Pressione	Idronaut	$\pm 0,1\%$ f.s.	0 – 200 dbar	in campo
Ossigeno	Idronaut	$\pm 0,1$ ppm $\pm 1\%$ sat	0 – 50 ppm 0 – 500 %sat	in campo
Fluorimetro	Seapoint	$\pm 0,01$ µg l <sup>-1</sup>	0,02 : 100 µg l <sup>-1</sup>	della casa
Torbidimetro	Seapoint	$\pm 0,01$ NTU	0,05 : 100 NTU	della casa

## A1-IV TRITINO



Strumento	Costruttore	Modello	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione
Tritino	METROHM	Titrimo 702 SET/MET	0,03 ml l <sup>-1</sup>	2 : 6 ml l <sup>-1</sup>	giornaliera

## A1-V HPLC



Strumento	Costruttore	Modello	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione
HPLC	DIONEX	Pompa GP50 Detector PDA100 Colonna C <sub>18</sub> (RF)	0,03 ml l <sup>-1</sup>	2 : 6 ml l <sup>-1</sup>	giornaliera

## A1-VI GAS CROMATOGRAFO VARIAN CP-3800 FID



Tipo Strumento	Costruttore	Serie	Detector	Iniezione	V <sub>Iniezione</sub>	Carrier
Gas Cromatografo	Varian	CP-3800	FID	Spliless	2-100 $\mu$ l	He

## A1-VII COLONNA CAPILLARE TECHNOCROM TRD-5



Tipo Strumento	Costruttore	Serie	Lunghezza	Diametro	Fase
Colonna capillare	Technochom	TRD-5	25 m	0.25 mm	5% MetilSilicone

## A2

### ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

#### A2-I CRIOSTATO Leica CM1900



Strumento	Costruttore	Serie	Cabina	Refrigerante
Criostato	Leica	1900	Refrigerata fino a -50C°	Freon

## A2-II    **MICROSCOPIO invertito Carl Zeiss Axiocam 135 motorizzato con telecamera Carl Zeiss Axiovert HS**



Main features	Highly stable pyramid shape and low center of gravity for vibration-free work, min. 6 adaptation options (12 drilled holes) e.g. for micromanipulators Optovar revolver 3x motorized 6x objective nosepiece for HD DIC, motorized
Optics	ICS optics for finest image quality: special application objectives with long working distance
Objectives	Reflected light: Epiplan, Epiplan-Neofluar, EC Epiplan-Neofluar Transmitted light: Achroplan, Plan-Neofluar Special: LD-Epiplan, LD-EC Epiplan-Neofluar (reflected light objective with long working distance)
Modules	Polarization optical shearing interferometer (TIC) to measure reflected light-phase objects(levels, differences in height), MHT 10, DeepView
Illumination Reflected light	12V, 100W halogen HBO 50W mercury vapor short arc lamp HBO 100W mercury vapor short arc lamp XBO 75W xenon lamp
Reflected light/filter slider	3 positions for filters with 25 mm diameter
Reflector turret	5 positions, manual or motorized, exchangeable
Light Trap	High contrast, minimized stray light
Transmitted light	6V, 30W 12V, 100W LCD-display, light manager

### **TelecameraAxiovert HS**

Sensore	Sony ICX 414, progressives readout
Risoluzione	660(H) x 494 (V) = 330 K Pixels
Pixel Size	9.9 µm (H) x 9.9 µm (V)
Dimensione sensore	6,5 mm x 4,9 mm, equivalent to ½
Sensibilità spettrale	HSc appr. 400 bis 720 nm con BG 40 IR-blocking filter HSm appr. 350 bis 1000 nm con BK7 protective cover glass
Dynamic Range	Typical SNR 65 dB = 1 : 1800
Noise	1 17 e
Dark Current	0,7 LSB/s, equivalenti a to 5,4 e / Pixel/s
Fotogrammi / sec	Appr. 54 fotogrammi/s in risoluzione normale fino a . 140 fotogrammi/s a
Tempo di esposizione	da 0,25 ms fino a 60 s
Color optimisation	Available for color model, default white point 3200 k

### A2-III CENTRIFUGA Beckman Allegra 25R



Strumento	Costruttore	Modello	Range velocità	Range temperatura (°C)	Precisione	Diametro rotore
Centrifuga	Beckman	Allegra 25R	100-25000 rpm	0 – 50 piena velocità -30-40 a veloc. ridotta	±1	215 mm

### A2-IV SPETTROFOTOMETRIA Shimadzu UV-1700 Pharma



Strumento	Costruttore	Serie	Lampada	Range lunghezza d'onda	Accuratezza lung. d'onda	Range fotometrico	Accuratezza fotometrica
Spettrofotometro	Shimadzu	UV 1700 Pharma	UV-VIS	195-1100 nm)	±0,5 nm	Trasmittanza 0-100% T Assorbanza 0-4 A	±0,005 A

Taratura giornaliera ed esecuzione di curva standard di riferimento.

## A2-V OPTIMA 7300 V ICP-OES



Spettrofotometro ad emissione atomica al plasma ad accoppiamento induttivo (ICP) e lettura sequenziale. Generatore multifrequenze nel range 750-1500 W Il sistema di raccolta della radiazione emessa dal plasma è di tipo assiale e radiale. Banda di analisi: 163-782 nm. Gas flusso principale e secondario: Argon gas ultrapuro (flusso 0-20 l/min). Gas stabilizzazione spettrofotometro: Azoto ultrapuro (flusso: 5 l/min).