

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”**

**3° ANNO SUCCESSIVO ALLE OPERAZIONI DI INSTALLAZIONE
(2012-2013)**

(Rapporto Finale)

**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
ANNA MARIA DE BIASI
ALESSIO GOMIERO
ALESSANDRA SPAGNOLO**

ANCONA, Febbraio 2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
2. MATERIALI E METODI	3
2.1. CAMPIONAMENTO IN MARE	4
2.1.1. MISURE CORRENTOMETRICHE	4
2.1.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA	4
2.1.2.1 Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina.....	6
2.1.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA	6
2.1.4. ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i>	6
2.2. ANALISI DI LABORATORIO E ANALISI DEI DATI	7
2.2.1. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA	7
2.2.1.1 Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina.....	8
2.2.2. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA	9
2.2.2.1 <i>Dunaliella tertiolecta</i>	9
2.2.2.2 <i>Vibrio fischeri</i>	11
2.2.2.3 <i>Tigriopus fulvus</i>	11
2.2.3. ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i>	13
2.2.3.1 Biomarkers	13
2.2.3.2 Metalli pesanti	19
2.2.3.3 Idrocarburi totali	20
3. RISULTATI	21
3.1. MISURE CORRENTOMETRICHE	21
3.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA	23
3.2.1. TEMPERATURA, SALINITÀ, TORBIDITÀ, OSSIGENO DISCIOLTO E TRASPARENZA	23
3.2.2. FLUORESCENZA INDOTTA E CLOROFILLA A E TSM	26
3.2.3. RICERCA DI IDROCARBURI TOTALI SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA.....	29
3.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI D'ACQUA MARINA	31
3.3.1. <i>DUNALIELLA TERTIOLECTA</i>	31
3.3.2. <i>VIBRIO FISCHERI</i>	34
3.3.3. <i>TIGRIOPUS FULVUS</i>	36
3.4. ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i>	38
3.4.1. BIOMARKERS	38
3.4.2. METALLI PESANTI	45
3.4.3. IDROCARBURI TOTALI	49
4. CONCLUSIONI	50
5. BIBLIOGRAFIA	53
 ALLEGATO A 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>	VI

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

M. Borghini CNR - ISMAR Venezia

S. Durante CNR - ISMAR 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

A. Gomiero CNR - ISMAR Ancona

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 Tecno pesca 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 2013 (VI survey post lavori; inverno 2013; Tab. 1-I) confrontati, ove possibile, con i dati pregressi.

Tab. 1-I –Cronoprogramma dei survey effettuati sino all'inverno 2013 per 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				
Caratteristiche fisiche e chimiche colonna d'acqua		x	x	x	x	x	x	x				
Ricerca di idrocarburi totali su campioni di acqua marina			x	x	x	x	x	x				
Ecotossicologia su campioni di acqua marina			x	x	x	x	x	x				
Caratteristiche fisiche e chimiche sedimenti	x	x	x		x		x					
Ecotossicologia su campioni di sedimento	x	x	x		x		x					
Analisi su <i>M. galloprovincialis</i>			nc	x	x	x	x	x				
Macrozoobenthos	x	x										

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.

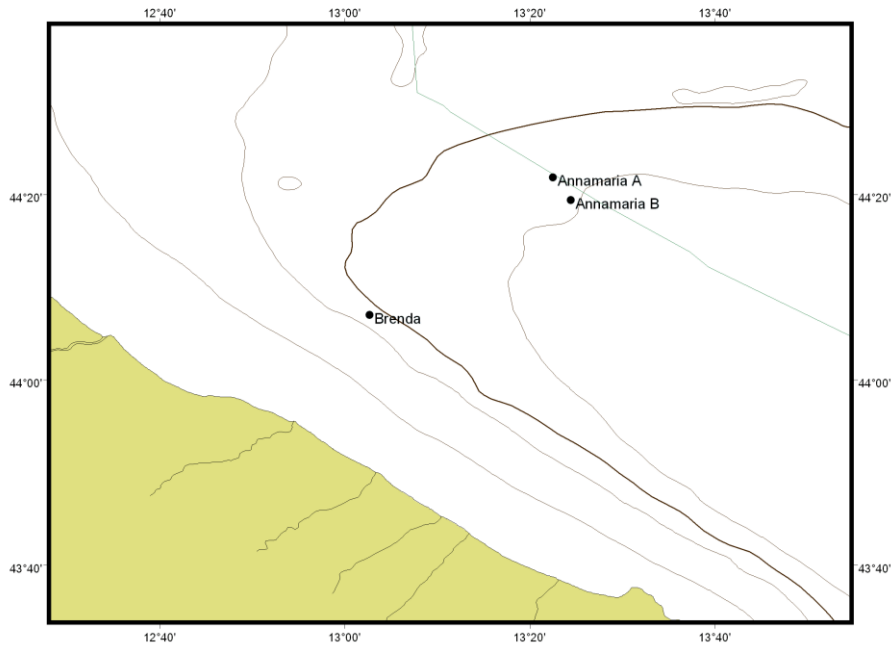


Fig. 2.1 – Ubicazione della piattaforma Annamaria B.

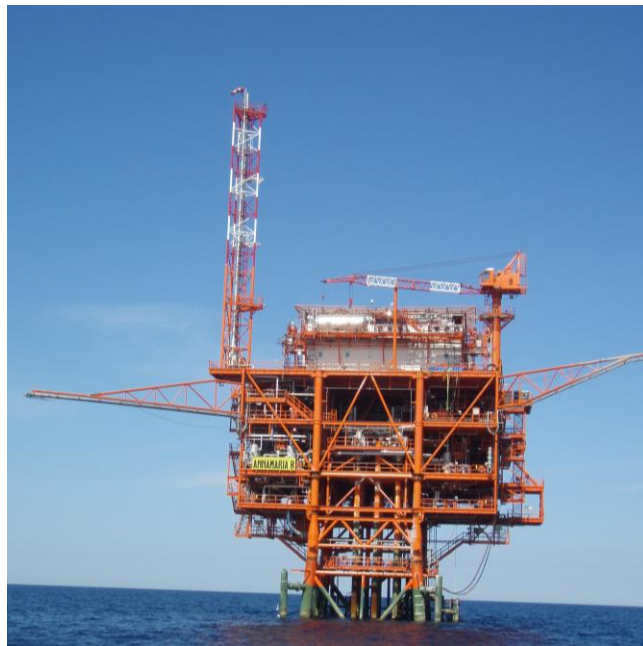


Fig. 2.2 - Piattaforma Annamaria B.

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

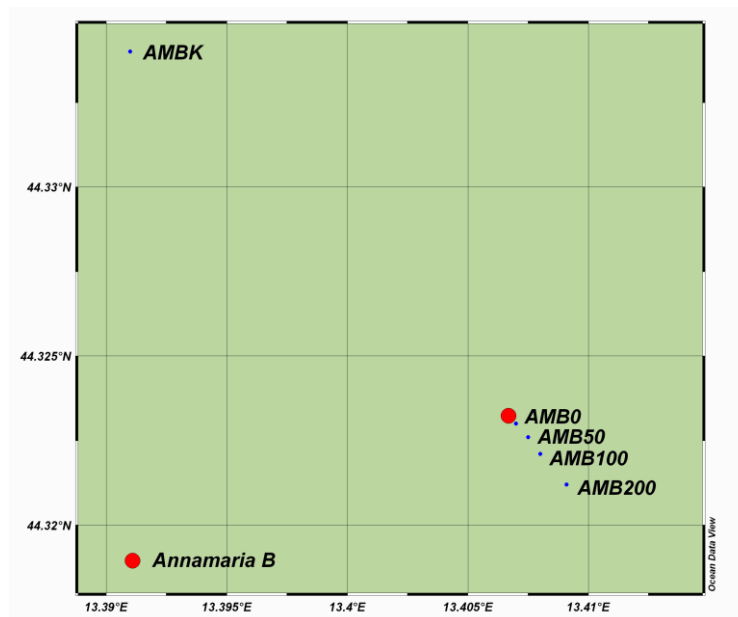
2.1.1. MISURE CORRENTOMETRICHE

Dal 01/01/2013 al 30/06/2013 è stato posizionato un ormeggio sommerso finalizzato alla raccolta di dati correntometrici in corrispondenza della piattaforma Annamaria B (coordinate punto di ormeggio: Latitudine 44°19.320' N, Longitudine 13°24.261' E. L'ormeggio correntometrico era costituito da un correntometro acustico del peso in acqua di circa 5 kg, una boa con spinta positiva di 55 kg, uno sganciatore acustico Edge Tech e una zavorra in ferro a perdere di circa 110 kg. Il correntometro utilizzato per le misure è un profilatore acustico (ADCP) costruito dalla ditta americana Teledyne RDI. Si tratta del modello WH Sentinel a 600 kHz, con un range di circa 50 m che, oltre a misurare la direzione e la velocità della corrente nei vari strati, misura la temperatura e la pressione nel luogo in cui è posizionato (All. A1-I). L'accuratezza del correntometro è di 0,3 cm/s e la risoluzione di 0,1 cm/s. Lo strumento è stato settato per misurare con 23 celle da 2 m, coprendo in questo modo 46 m di profilo. Il tempo di campionamento è stato impostato a 30' e 50 ping: ciò significa avere un valore medio di corrente ogni mezz'ora derivato da 50 misure.

2.1.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA

Come richiesto dal Piano di monitoraggio transfrontaliero nell'aprile 2013 è stato effettuato un survey al fine di monitorare le condizioni ambientali della zona in cui è posizionata la piattaforma Annamaria B. Il survey è stato condotto utilizzando la N/R Tecnopeca II. Analogamente a quanto già effettuato precedentemente (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014b; 2014b), per il campionamento è stato tracciato un transetto intersecante la piattaforma orientato in direzione NW-SE (fig. 2.3; Tab. 2-II). Lungo tale transetto sono stati posizionati 5 siti di prelievo. Di queste stazioni, una è stata posta in corrispondenza della piattaforma (AMB0), una a 50 m (AMB50), una a 100 m (AMB100) e una a 200 m (AMB200) da essa in direzione SE; la quinta

stazione (controllo) è stata posizionata a 2000 m dalla piattaforma in direzione NW



(AMBK).

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 nell'aprile 2013 per le indagini idrologiche.

Sito	Profondità (m)	Coordinate geografiche
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 lt, 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.

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 lt ciascuna prelevate con metanolo e risciacquate prima con acqua demineralizzata e dopo con acqua bidistillata (1 bottiglia per ogni quota).

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*

Questo tipo di indagine è stato effettuato per la prima volta nell'inverno 2011; infatti, nel 1° 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 2013 è pertanto avvenuto il quinto campionamento che ha previsto la raccolta di 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). Gli esemplari raccolti dai tre siti nell'inverno 2013 avevano le seguenti misure medie (lunghezza conchiglia \pm dev.st.):

Controllo: $3,90 \pm 0,70$ cm;

VA: $5,10 \pm 0,65$ cm;

LA: $5,29 \pm 0,55$ cm.

2.2. ANALISI DI LABORATORIO E ANALISI DEI DATI

2.2.1. 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 direttamente a bordo con metodo Winkler (1888): i campioni d'acqua appena raccolti sono stati fissati con idrossidi misti di manganese e conservati al buio fino alla determinazione effettuata con metodo potenziometrico ed elettrodo di platino entro le 24 h successive (All. A1-III). Le analisi dell'ossigeno disciolto sono state utilizzate per calibrare la sonda SBE 43 del CTD.

Le analisi della **clorofilla a** sono state effettuate secondo il metodo Wright *et al.* (1991) mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography; All. A1-IV) *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 un software fornito dalla casa produttrice seguendo le norme suggerite dall'UNESCO (UNESCO, 1988) e riportate sul manuale "Handbook of method protocols" (Artegiani, 1996); le grandezze derivate, come salinità e anomalie della densità, sono state calcolate secondo gli algoritmi dell'UNESCO (UNESCO, 1983). Infine, per l'analisi dei dati è stato utilizzato un apposito software sviluppato dal CNR-ISMAR di Ancona e la mappatura dei dati ricavati è stata effettuata con il software Ocean Data View.

2.2.1.1 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 lt 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 (C₁₀H₂₂) e *n*-tetracontano (C₄₀H₈₂) 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: ρ 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.

2.2.2. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA

2.2.2.1 *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 2×10^3 cellule 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_{50} o EC_{20} . L' EC_{50} e l' EC_{20} 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.

Non è stato possibile calcolare altri parametri come la NOEC (secondo la procedura di Dunnett) e l' EC_{20} (Christensen *et al.*, 2009) a causa dei dati ottenuti alle varie diluizioni.

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_{50} , è stato confrontato con i

dati della carta di controllo del laboratorio il cui intervallo è compreso tra 6,2 e 8,9 mg lt⁻¹ 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 (2×10^3 cellule ml⁻¹);
- il coefficiente di variazione nei controlli e nel campione tal quale (CV%): $\leq 15\%$.

2.2.2.2 *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 μ . Il risultato del test è stato espresso come differenza percentuale della bioluminescenza (Δ % 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-III.

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

H ₂ 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

2.2.2.3 *Tigriopus fulvus*

Tigriopus fulvus Fischer (fig. 2.4) è un copepode arpacticoide 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[®] (I.O.[®]), all'interno di fiasche per coltura in polistirene da 150cm² (0,5 lt) con tappo ventilato, munito di membrana da 0,22 µm alle seguenti condizioni (Faraponova *et al.*, 2005):

- salinità al 38 ± 1 PSU;
- temperatura di 18 ± 1 °C;
- fotoperiodo 16L/8B ad una luminosità di 500–1200 lux;
- alimentazione *ad libitum* con Tetramarin[®].

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.

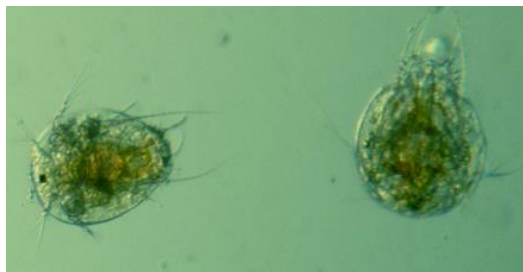


Fig. 2.4 - Nauplii di *Tigriopus fulvus*.

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).

2.2.3. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

2.2.3.1 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 lisosomiale 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 β -mercaptoetanolo. L'omogenato è stato quindi centrifugato (All. A2-III) per ottenere una frazione solubile contenente le metallotioneine. Il sopranatante 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 sopranatante 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 µl 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_{Ex}/535nm_{Em}) 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".

2.2.3.2 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 riflusso durante la digestione. Su ogni campione sono stati aggiunti 18 ml di una miscela 1:2 di H_2O_2/HNO_3 . 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_3 , 3,5 ml di H_2SO_4 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[®]. Le condizioni operative applicate per le analisi sono riportate in Tab. 2-IV.

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

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

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

Un'analogia 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.

2.2.3.3 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 (C₅), n-dodecano (C₁₂) e n-tetracontano (C₄₀). 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 C₅, C₁₂ e C₄₀. LA quantità di idrocarburi è stata quindi determinata mediante confronto con la soluzione di riferimento esterno costituito da quantità uguali di tre standard. Inoltre, sono state disposte prove in bianco per ogni serie di analisi al fine di identificare la baseline.

3. RISULTATI

3.1. MISURE CORRENTOMETRICHE

Durante il periodo preso in considerazione (gennaio - giugno 2013) le correnti sia superficiali che di fondo sono risultate sostanzialmente di direzione prevalente verso SW.

L'intensità è apparsa abbastanza costante e modesta, essendo il valore medio sul fondo pari a circa 13 cm/s. In superficie, invece, la velocità della corrente è risultata mediamente superiore essendosi stabilizzata intorno ai 18-20 cm/s. A inizio giugno è avvenuto per un breve periodo un leggero aumento della velocità su tutta la colonna d'acqua, con punte fino a 25 cm/s.

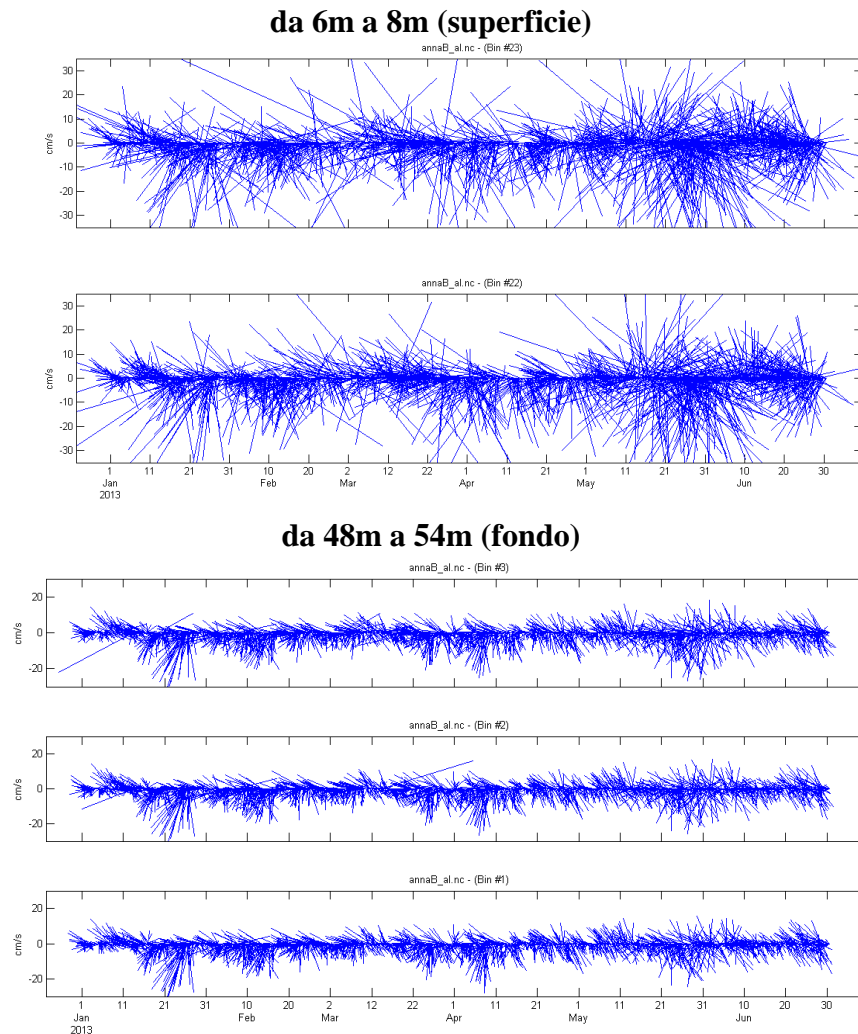


Fig. 3.1 - Componenti Nord ed Est dell'intensità delle correnti registrate dall'ADCP nel periodo dal 01/01 al 30/06/13.

La temperatura misurata in prossimità del fondo dal correntometro nel 1° semestre 2013 ha mostrato un andamento inizialmente decrescente sino ai primi giorni di marzo, passando da circa 14,8°C a 12,3°C, con poche oscillazioni nei mesi successivi. Il picco negativo registrato il 27 marzo non è da tenere in considerazione essendo dovuto al recupero dello strumento per motivi di manutenzione, riposizionato subito dopo.

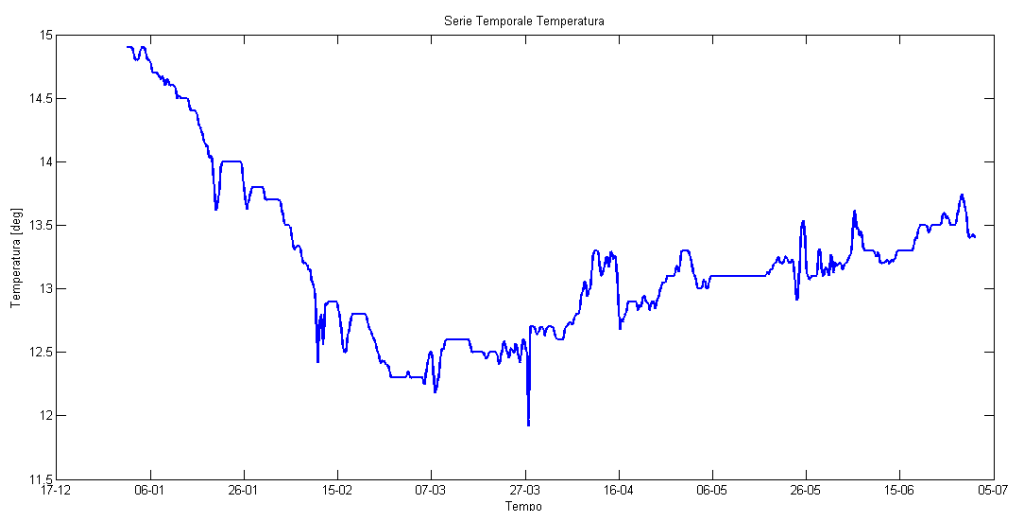


Fig. 3.2 - Andamento della temperatura registrata in prossimità del fondo dal sensore installato sull'ADCP dal 01/01 al 30/06/2013.

3.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA

Nella presente relazione vengono riportati i dati relativi al 1° semestre 2013 confrontati con quelli del semestre precedente. Per i risultati conseguiti anteriormente all'estate 2012 consultare Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a.

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

Nel monitoraggio condotto nel settembre 2012 (fig. 3.3) si era notata la presenza di un netto termocline con valori di **temperatura** intorno a 21,5°C dalla superficie fino a 18 m. Dopo una riduzione graduale che aveva portato intorno a 15°C a 45 m di profondità, la temperatura si manteneva costante fino al fondo. Il profilo di **salinità** presentava valori intorno a 38,3-38,7 su tutta la colonna d'acqua. L'andamento della **torbidità** era costante dalla superficie fino al fondo (0,1 NTU) mentre il profilo di **ossigeno disciolto** aveva presentato valori intorno al 93% di saturazione dalla superficie a circa 20 m e da 30 m sino al fondo, con un leggero aumento sino al 107% di saturazione nello strato fra 25-30 m.

Nel monitoraggio condotto ad aprile 2013 (fig. 3.4) i profili di **temperatura** hanno mostrato un andamento decrescente con valori compresi fra 16 e 18 °C in superficie che diminuivano gradualmente sino a circa 10 m di profondità per mantenersi poi costanti fino al fondo su valori intorno a 13 °C. La **salinità** è risultata compresa fra 36 e 38,5 nei primi 3 m di profondità per poi mantenersi costante con valori di 38,5 fino al fondo. I profili di **torbidità** sono risultati costanti su tutta la colonna d'acqua (~ 0,1 NTU). L'**ossigeno disciolto** ha presentato valori intorno al 100% di saturazione lungo tutta la colonna d'acqua, con una leggera diminuzione (94% di saturazione) negli ultimi 10 m dal fondo.

La **trasparenza** misurata mediante disco Secchi (fig. 3.5) nel settembre 2012 aveva evidenziato valori compresi tra 21 m e 24 m. Il valore di maggiore trasparenza (24 m) si osservava nella stazione di controllo AMBK, mentre le tre stazioni poste a Sud della piattaforma mostravano valori compresi tra 21 e 22 m.

Ad aprile 2013 la colonna d'acqua ha presentato una trasparenza inferiore (17 m) e costante in tutti i siti.

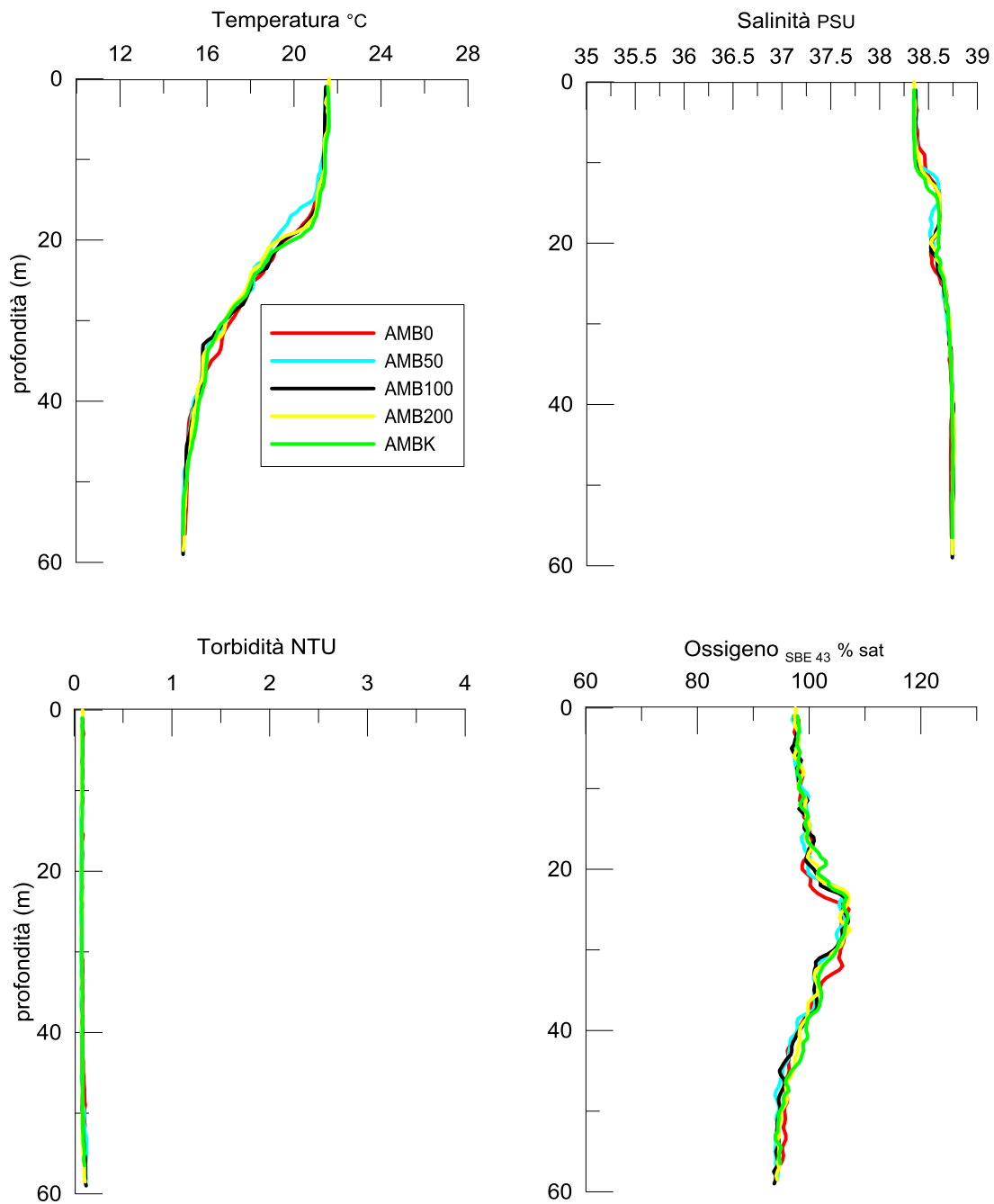


Fig. 3.3 - Profili di temperatura (°C), salinità (PSU), torbidità (NTU) e saturazione di ossigeno (%). Settembre 2012.

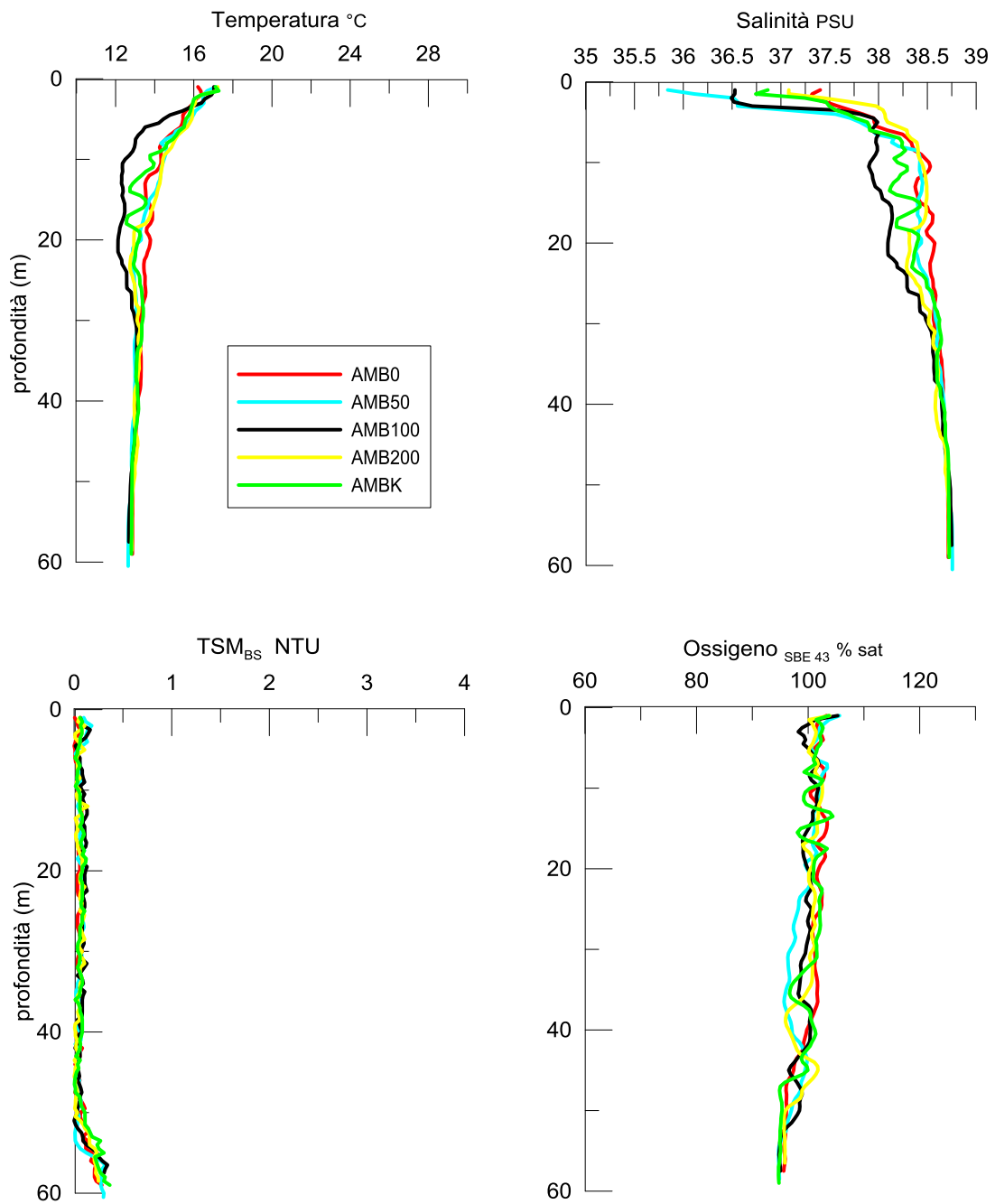


Fig. 3.4 - Profili di temperatura (°C), salinità (PSU), torbidità (NTU) e saturazione di ossigeno (%). Aprile 2013.

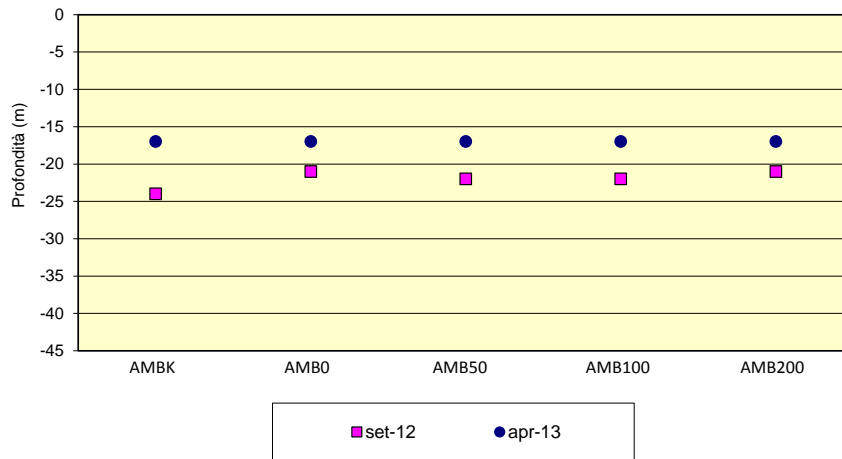


Fig. 3.5 - Trasparenza della colonna d'acqua misurata mediante disco di Secchi lungo il transetto NW–SE nei survey effettuati nel settembre 2012 e nell'aprile 2013.

3.2.2. FLUORESCENZA INDOTTA, CLOROFILLA A E TSM

Le concentrazioni di clorofilla *a*, misurate nel settembre 2012 come **fluorescenza indotta** (fig. 3.6a) avevano presentato un andamento pressoché costante dalla superficie al fondo e simile in tutte le stazioni, con valori compresi tra circa 0,5 µg/l in superficie e 0,6 µg/l sul fondo.

La **clorofilla a**, misurata mediante HPLC (fig. 3.6b), risultava minima nella stazione di controllo AMBK e in AMB200 lungo tutta la colonna con valori di 5-10 ng/l. Il massimo era stato raggiunto nella stazione AMB0 alla quota di superficie (118,46 ng/l).

Il **TSM**, misurato con metodo gravimetrico, (fig. 3.6c) aveva mostrato valori intorno a 2 mg/l alla quota superficiale di tutte le stazioni. I siti AMB50 e AMB200 non evidenziavano differenze marcate nella quantità di particolato misurato dalla superficie al fondo. Nelle altre stazioni era stato invece osservato un incremento dei valori nelle quote dei 40 m e di fondo rispetto alla superficie. Il valore massimo di 3,67 mg/l si registrava nella stazione AMB0 alla quota dei 40 m.

Nell'aprile 2013 le concentrazioni di clorofilla *a*, misurate come **fluorescenza indotta**, (fig. 3.7a) hanno presentato nell'aprile 2013 valori costanti (0,1-0,3 µg/l) dalla superficie a 25 m di profondità e simile in tutte le stazioni. Da questa quota si è osservato un incremento che ha portato a concentrazioni di 1,5-2 µg/l alla profondità di 40 m senza ulteriori particolari variazioni fino al fondo.

La **clorofilla a**, misurata mediante HPLC (fig. 3.7b), ha mostrato valori generalmente crescenti dalla superficie al fondo. La stazione AMB100 ha evidenziato valori

minimi su tutta la colonna d'acqua. I valori massimi (320-380 ng l^{-1}) sono stati osservati alla quota di fondo delle stazioni AMB0, AMB50 e AMBK ed alla quota dei 40 m della stazione AMB200.

Il TSM, misurato con metodo gravimetrico (fig. 3.7c), ha infine mostrato valori compresi tra 1,5 mg/l e 3,8 mg/l . Lungo la colonna d'acqua non sono state osservate differenze significative nella quantità di TSM misurato.

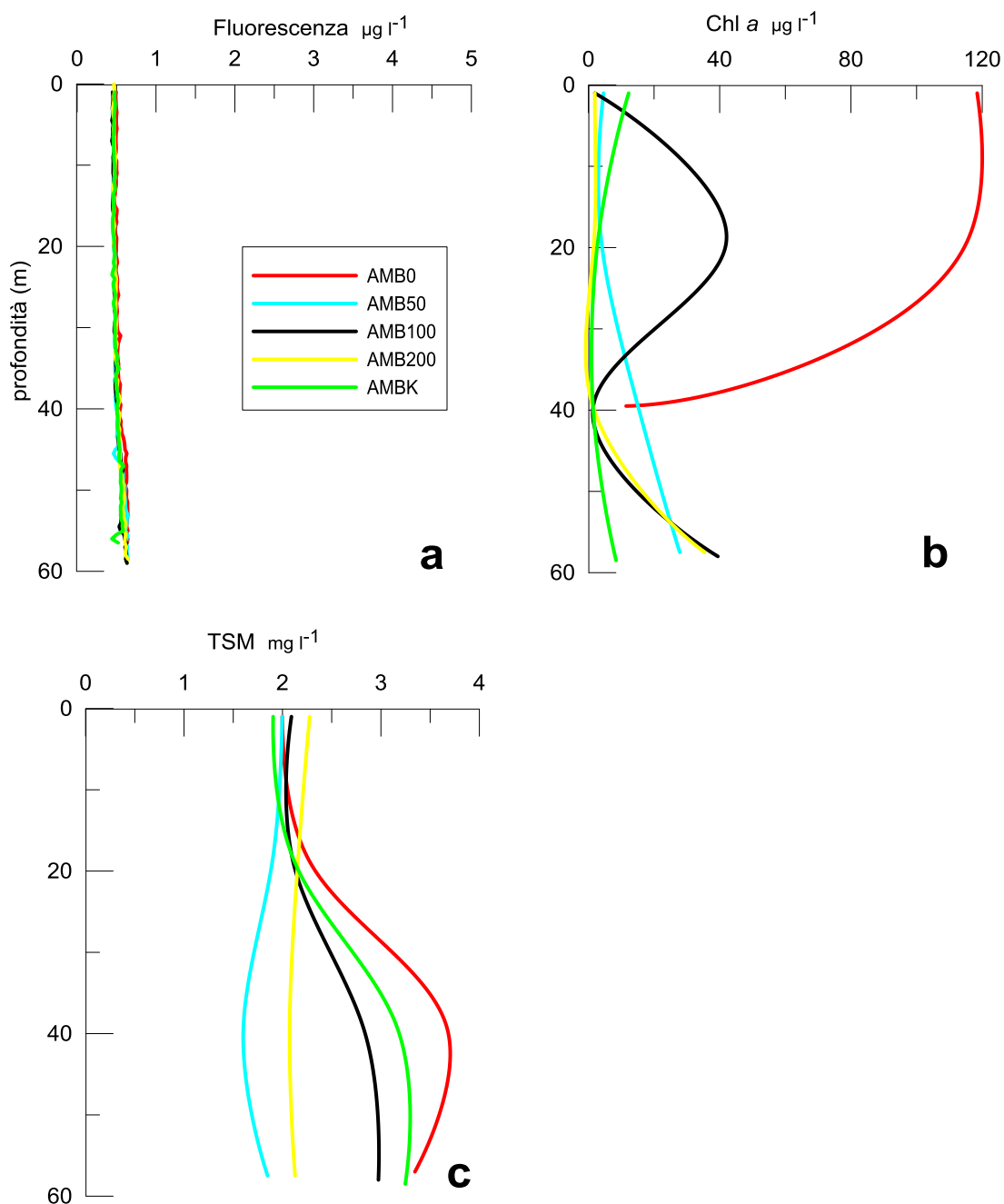


Fig. 3.6 - Profili di fluorescenza indotta (a), di concentrazione della clorofilla *a* (b) e TSM (c) registrati nel settembre 2012.

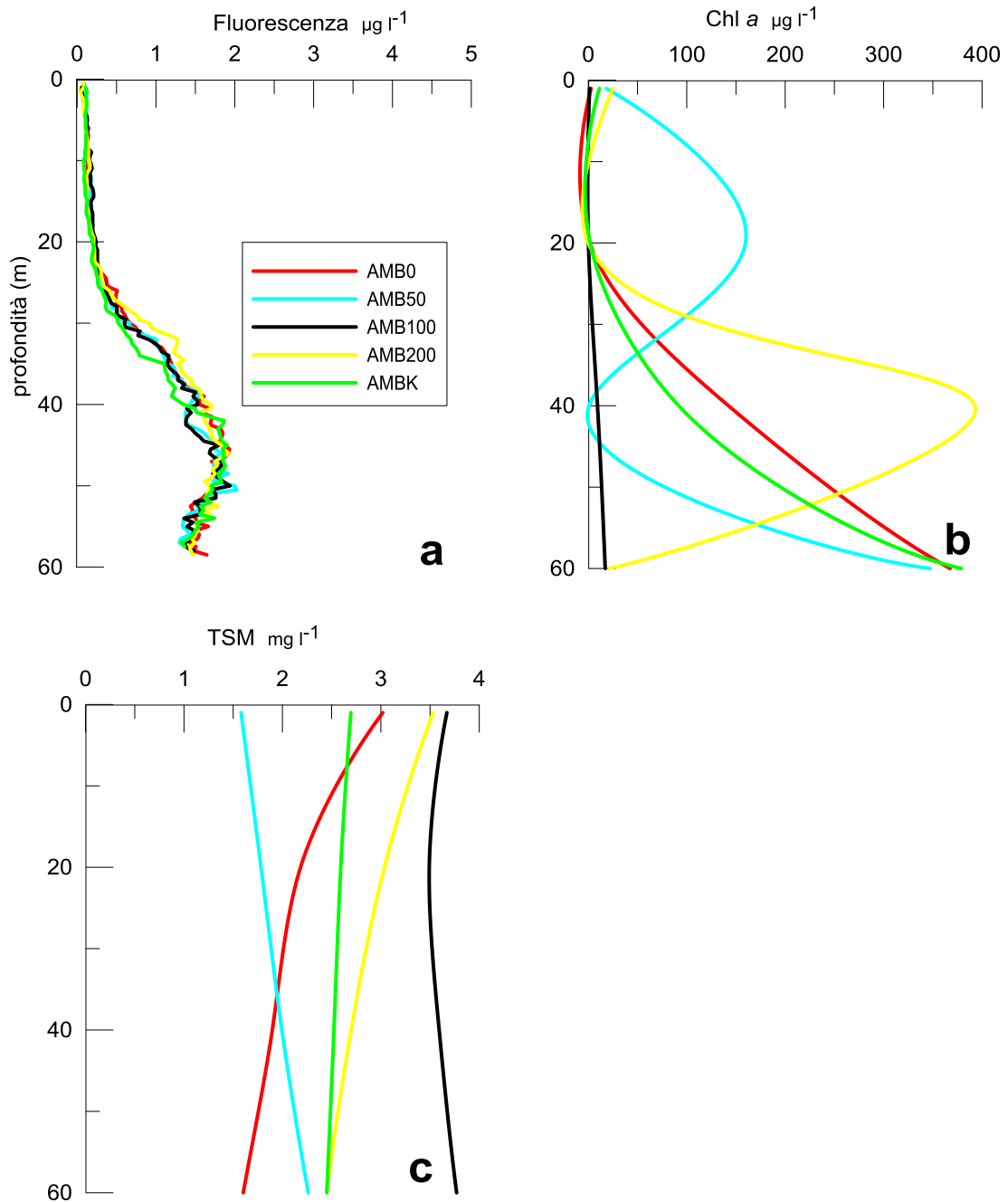


Fig. 3.7 - Profili di fluorescenza indotta (a), di concentrazione della clorofilla *a* (b) e TSM (c) registrati nell'aprile 2013.

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 2013 (Tab. 3-I) hanno confermato quanto osservato in tutti i survey precedenti (Tab. 3-II), ovvero la completa assenza di questi composti organici in tutti i siti esaminati e lungo l'intera colonna d'acqua (Tab. 3-I).

Tab. 3-I - Idrocarburi totali ricercati nell'inverno 2013 in corrispondenza delle quattro quote di ciascuna stazione utilizzata per le indagini fisiche e chimiche della colonna d'acqua. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B. 10 µg/lit = limite di quantificazione.

Stazione	Quota	Idrocarburi Totali (µg/lit)
AMB K	Superficie	< 10
	-20	< 10
	-40	< 10
	Fondo	< 10
AMB 0	Superficie	< 10
	-20	< 10
	-40	< 10
	Fondo	< 10
AMB 50	Superficie	< 10
	-20	< 10
	-20	< 10
	Fondo	< 10
AMB 100	Superficie	< 10
	-20	< 10
	-40	< 10
	Fondo	< 10
AMB 200	Superficie	< 10
	-20	< 10
	-40	< 10
	Fondo	< 10

Tab. 3-II - Idrocarburi totali ricercati nell'intero periodo di indagine in corrispondenza delle quattro quote di ciascuna stazione utilizzata per le indagini fisiche e chimiche della colonna d'acqua. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B. 10 µg/l = limite di quantificazione.

Stazione	Quota	Idrocarburi Totali (µg/l)					
		Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012	Estate 2012	Inverno 2013
AMBK	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
AMB0	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
AMB50	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
AMB100	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
AMB200	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 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 (5,0 – 16,0 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 ≥ 16).

Risultati del saggio - I risultati del saggio applicato ai campioni d'acqua raccolti nell'inverno 2013 sono riportati in Tab. 3-III, contestualmente ai principali parametri di contorno misurati.

Nel complesso viene osservata l'assenza di effetto in 15 campioni con valori d'inibizione della crescita algale compresi tra -19% e 1%. I rimanenti 5 campioni, prelevati a tutte le quote nelle strette vicinanze di Annamaria B (AMB0) e a 50 m da essa in superficie (AMB50), hanno evidenziato la presenza di effetto eutrofizzante (crescita algale leggermente superiore rispetto al controllo) compreso tra -20% e -31% rispetto al controllo.

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 (Tab. 3-IV). 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 si confermava 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 i tre monitoraggi successivi (inverno ed estate 2012, inverno 2013).

Tab 3-III - Parametri di contorno e risultati relativi al saggio di tossicità con *D. tertiolecta* nei campioni di acqua raccolti nell'inverno 2013. 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	8,19	-7%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-20	8,23	-18%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,21	-11%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,15	-15%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMBO	superficie	8,25	-31%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,23	-29%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-40	8,25	-25%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	fondo	8,24	-20%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
AMB50	superficie	8,25	-25%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,24	-19%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,26	-11%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,31	-6%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB100	superficie	8,19	-1%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-20	8,23	-6%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,14	-5%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,33	-11%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB200	superficie	8,24	-19%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-20	8,21	-5%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,19	-8%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,22	-2%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto

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

Sito		Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012	Estate 2012	Inverno 2013
AMBK	superficie	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-20	Assenza di effetto	Assenza di effetto	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	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Presenza di effetto	Presenza effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB0	superficie	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	Presenza di effetto	Presenza di effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante
	-40	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante
	fondo	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante
AMB50	superficie	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	Assenza di effetto	Assenza di effetto	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	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Presenza di effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB100	superficie	Assenza di effetto	Assenza di effetto	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	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-40	Presenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Assenza di effetto	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	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-20	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-40	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto

3.3.2. *VIBRIO FISCHERI*

QA-QC – I valori EC₅₀ di 0,76 mg/lit e di 0,51 mg/lit rispettivamente a 5' e a 15' con sostanza di riferimento (Cu⁺⁺) sono rientrati all'interno del range di riferimento relativo al test Microtox® (0,42 – 1,16 mg/lit e 0,03 – 0,75 mg/lit rispettivamente per il test a 5' e 15') UNICHIM (Onorati *et al.*, 2007).

Risultati del saggio - In Tab. 3-V sono riportati i risultati del test, mentre in Tab. 3-VI 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 2013 sono stati completamente confermati i risultati ottenuti a partire dall'estate 2010 (Tab. 3-VII).

Tab. 3-V - Risultati del saggio biologico con il *Vibrio fischeri* applicato ai campioni di acqua marina prelevati nell'inverno 2013. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

Stazione	Quota	Incubazione 5'				Incubazione 15'			
		Δ biol %	Limiti di confidenza al 95% (inf. e sup.)		Test t (p)	Δ biol %	Limiti di confidenza al 95% (inf. e sup.)		Test t (p)
AMBK	superficie	-0,78	-4,78	6,13	>0,05	1,14	-3,69	7,14	>0,05
	-20 m	-1,25	-6,54	8,37	>0,05	0,37	-3,81	6,53	>0,05
	-40 m	-0,56	-3,69	7,19	>0,05	0,64	-2,97	7,25	>0,05
	fondo	-0,86	-4,17	9,39	>0,05	1,29	-3,44	10,06	>0,05
AMBO	superficie	-0,71	-4,09	8,99	>0,05	1,56	-5,12	7,86	>0,05
	-20 m	-1,12	-6,32	10,24	>0,05	-0,06	-5,14	9,28	>0,05
	-40 m	-0,91	-5,78	11,57	>0,05	1,72	-4,32	9,12	>0,05
	fondo	0,06	-2,98	6,73	>0,05	1,95	-2,45	5,69	>0,05
AMB50	superficie	0,39	-3,57	5,97	>0,05	0,86	-2,97	6,25	>0,05
	-20 m	-0,88	-6,21	9,36	>0,05	1,18	-3,96	9,85	>0,05
	-40 m	0,91	-2,37	6,18	>0,05	1,09	-2,15	6,23	>0,05
	fondo	-1,11	-7,09	12,57	>0,05	0,52	-5,74	11,94	>0,05
AMB100	superficie	-0,73	-3,98	8,86	>0,05	0,68	-3,47	9,05	>0,05
	-20 m	1,65	-7,11	10,67	>0,05	2,08	-6,39	9,86	>0,05
	-40 m	0,99	-3,17	5,93	>0,05	1,76	-3,05	6,33	>0,05
	fondo	0,18	-3,91	8,34	>0,05	0,44	-3,11	8,87	>0,05
AMB200	superficie	-0,61	-4,13	7,91	>0,05	0,61	-2,79	9,04	>0,05
	-20 m	-1,44	-6,80	9,17	>0,05	-0,21	-4,76	8,76	>0,05
	-40 m	-1,17	-5,19	8,70	>0,05	-0,17	-4,43	9,11	>0,05
	fondo	0,55	-2,75	4,69	>0,05	1,48	-2,66	5,17	>0,05

Tab. 3-VI - Stima di tossicità relativa al saggio biologico con *Vibrio fischeri* effettuato nell'inverno 2013. 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-VII – Andamento dei risultati ottenuti con il saggio con *V. fischeri* relativi ai sei monitoraggi condotti nella fase di produzione di Annamaria B.

Stazione	Quota	Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012	Estate 2012	Inverno 2013
AMBK	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB0	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB50	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB100	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB200	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	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 2013 rispetto all'end point di sopravvivenza sono riportati in Tab. 3-VIII. 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 (-20 m), AMB50 superficie) e AMB200 (-20 m).

Confronto con i survey precedenti - I risultati ottenuti nell'inverno 2013 confermano pienamente quanto già evidenziato nel corso dei monitoraggi precedenti (Tab. 3-IX).

Tab. 3-VIII - Risultati del saggio biologico condotto con *Tigriopus fulvus* sui campioni di acqua marina prelevati nell'inverno 2013. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

Stazione	Quota	Δ % sopravvissuti vs controllo \pm d.s.	T test	Giudizio
Controllo	---	100,0 \pm 0,0	---	----
AMBK	superficie	100,0 \pm 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-20 m	96,7 \pm 1,99	p>0,05	Tossicità assente
	-40 m	100,0 \pm 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 \pm 0,0	n.d.	Tossicità assente
AMBO	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
AMB50	superficie	96,7 \pm 1,99	p>0,05	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	100,0 \pm 0,0	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	96,7 \pm 1,99	p>0,05	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-IX – Andamento dei risultati ottenuti con il saggio con *T. fulvus* relativi ai sei monitoraggi condotti nella fase di produzione di Annamaria B.

Stazione	Quota	Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012	Estate 2012	Inverno 2013
AMBK	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB0	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB50	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB100	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB200	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente

3.4. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

3.4.1. BIOMARKERS

In Tab. 3-X 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 cinque monitoraggi effettuati dall'inverno 2011 a quello del 2013 (cinque stagioni).

Tab. 3-X - Valori medi dei biomarker (\pm dev.std.) determinati nei mitili campionati dall'inverno 2011 a quello del 2013 nei siti di controllo, vicino (VA) e lontano (LA) dall'anodo di sacrificio di Annamaria B.

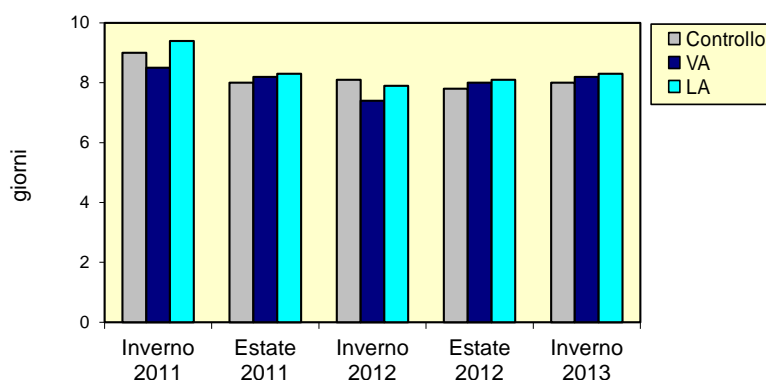
Biomarker	Unità di misura	Inverno 2011			Estate 2011		
		Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA
Stress on Stress	LT50 (gg)	9,0	8,5	9,4	8,0	8,2	8,3
Stabilità lisosmiale	min	45,0 \pm 3,5	32,0 \pm 2,5	35,0 \pm 2,0	33,0 \pm 2,5	26,0 \pm 3,5	27,0 \pm 2,0
Lipidi neutri	densità ottica / pixels ²	31291 \pm 3541	32540 \pm 2401	30280 \pm 3201	28001 \pm 2541	30218 \pm 2401	32051 \pm 3591
Lipofuscine	densità ottica / pixels ²	5028 \pm 285	6146 \pm 540	6050 \pm 520	7308 \pm 361	8000 \pm 321	8099 \pm 269
Metallotioneine	μ g MT/g	90,1 \pm 7,0	115,9 \pm 5,7	103,8 \pm 8,4	96,1 \pm 5,4	129,9 \pm 4,7	133,9 \pm 6,4
Test della Cometa	% di coda DNA	4 \pm 1	6 \pm 2	5 \pm 1	5 \pm 2	7 \pm 1	6 \pm 2

Biomarker	Unità di misura	Inverno 2012			Estate 2012		
		Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA
Stress on Stress	LT50 (gg)	8,1	7,4	7,9	7,8	8,2	8,3
Stabilità lisosmiale	min	35,0 \pm 1,5	28,0 \pm 2,8	29,0 \pm 1,9	36,0 \pm 2,5	26,0 \pm 3,5	27,0 \pm 2,0
Lipidi neutri	densità ottica / pixels ²	28300 \pm 1951	30331 \pm 2500	32400 \pm 3002	24567 \pm 2541	30218 \pm 2401	32051 \pm 3591
Lipofuscine	densità ottica / pixels ²	7106 \pm 423	7930 \pm 720	7880 \pm 361	8114 \pm 501	8000 \pm 321	8099 \pm 269
Metallotioneine	μ g MT/g	123,78 \pm 1,57	129,14 \pm 0,59	126,77 \pm 0,99	87,9 \pm 7,2	129,9 \pm 4,7	133,9 \pm 6,4
Test della Cometa	% di coda DNA	4 \pm 1	5 \pm 2	5 \pm 1	3,6 \pm 1,0	5,5 \pm 0,1	5,1 \pm 0,5

Biomarker	Unità di misura	Inverno 2013		
		Controllo	VA	LA
Stress on Stress	LT50 (gg)	8,0	8,2	8,3
Stabilità lisosmiale	min	33,0 \pm 2,5	26,0 \pm 3,5	27,0 \pm 2,0
Lipidi neutri	densità ottica / pixels ²	28001 \pm 2541	30218 \pm 2401	32051 \pm 3591
Lipofuscine	densità ottica / pixels ²	7308 \pm 361	8000 \pm 321	8099 \pm 269
Metallotioneine	μ g MT/g	96,1 \pm 5,4	129,9 \pm 4,7	133,9 \pm 6,4
Test della Cometa	% di coda DNA	2,8 \pm 1,0	4,9 \pm 2,0	5,8 \pm 1,0

Sopravvivenza in aria (Stress on Stress) - I mitili prelevati nell'inverno 2013 hanno presentato una sopravvivenza all'aria, misura dello stress on stress, compresa tra 8,0 (controllo) e 8,3 gg (LA). I valori nel complesso sono risultati omogeneamente distribuiti come già osservato precedentemente (fig. 3.8). Ciò porta a confermare una scarsa alterazione a livello fisiologico nei bivalvi esaminati.

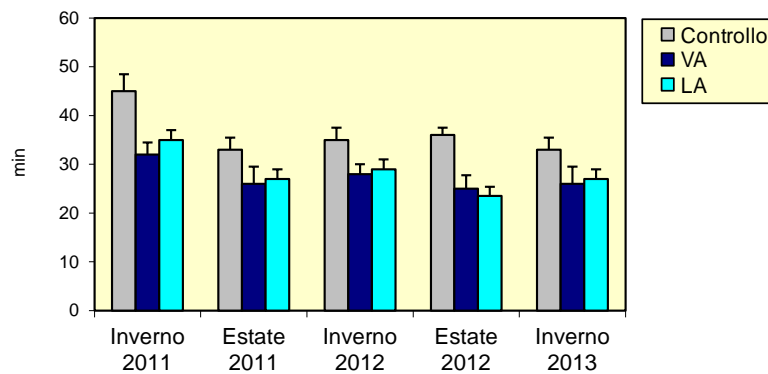
Solo in rari casi, inoltre, sono state osservate variazioni significative interstagionali. I tempi di sopravvivenza osservati sono simili, e in alcuni casi superiori, a quelli ottenuti in studi analoghi condotti in precedenza su altre piattaforme estrattive installate in alto e medio Adriatico come PCMS-1 (Fabi *et al.*, 2005a), Calipso (Fabi *et al.*, 2006; Gomiero *et al.*, 2011), Naide (Fabi *et al.*, 2014c), Clara Nord (Fabi *et al.*, 2010c) e Clara Est (Fabi *et al.*, 2010d).



		SoS														
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013		
		C	VA	LA	C	VA	LA	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	ns	ns	ns	ns	ns
	LA				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Estate 2011	C					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Inverno 2012	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 2012	C											ns	ns	ns	ns	ns
	VA												ns	ns	ns	ns
	LA													ns	ns	ns
Inverno 2013	C														ns	ns
	VA															ns
	LA															

Stabilità delle membrane lisosomiali – Nell'inverno 2013 sono stati evidenziati tempi medi di destabilizzazione compresi tra 26,0±3,5 min (VA) e 33,0±2,5 min (controllo). Rispetto agli organismi di riferimento, entrambi i siti della piattaforma hanno presentato un leggero ma significativo incremento della fragilità lisosomiale (fig. 3.9). Tale tendenza tende a confermare quanto osservato sin dal primo

campionamento. Un ulteriore confronto effettuato sulle risposte osservate nel corso dell'intero periodo di studio ha evidenziato una certa fluttuazione stagionale con livelli di stabilità più elevati nei periodi invernali, anche se spesso le differenze non sono risultate statisticamente significative.



		Stabilità membrane lisosomiali														
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns
	LA				ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
Estate 2011	C					*	*	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	*
	VA						ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	LA							*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
Inverno 2012	C								*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA									ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	LA										*	ns	*	ns	ns	ns
Estate 2012	C											*	*	ns	*	*
	VA												ns	*	ns	ns
	LA													*	ns	ns
Inverno 2013	C														*	*
	VA															ns
	LA															

Fig. 3.9 – 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 cinque 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.

L'andamento dei valori rilevati tende tuttavia ad evidenziare un leggero stato di stress nei bivalvi prelevati presso la piattaforma. Nel complesso, comunque, i tempi di destabilizzazione rilevati sono confrontabili con quelli osservabili su organismi in buono stato di salute (Donini *et al.*, 2007). Confrontando ulteriormente i risultati di analoghe attività di biomonitoraggio si osserva come i valori medi determinati finora presso Annamaria B risultano simili e in alcuni casi superiori agli analoghi registrati in precedenti indagini ambientali su analoghe strutture estrattive (Calipso, Clara Nord, Clara Est, Naide, Fabi *et al.*, 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gomiero *et al.*, 2011) e ad altre aree dell'alto Adriatico (Petrovic *et al.*, 2004), ma inferiori a quelli

riportati da Gorbi *et al.*, (2008), ottenuti tuttavia con una differente metodologia d'analisi.

Valutazione del contenuto di lipidi neutri - La distribuzione dei livelli di lipidi neutri relativa all'inverno 2013 ha evidenziato valori compresi tra 28001 ± 2541 unità di densità ottica/pixel (controllo) e 32051 ± 3591 unità di densità ottica/pixel (VA), senza differenze statistiche tra i campioni analizzati (fig. 3.10). La distribuzione appare simile a quelle osservata nei monitoraggi precedenti, dimostrando quindi lo scarso accumulo di queste sostanze nella ghiandola digestiva degli organismi analizzati. Non sono state inoltre evidenziate fluttuazioni stagionali.

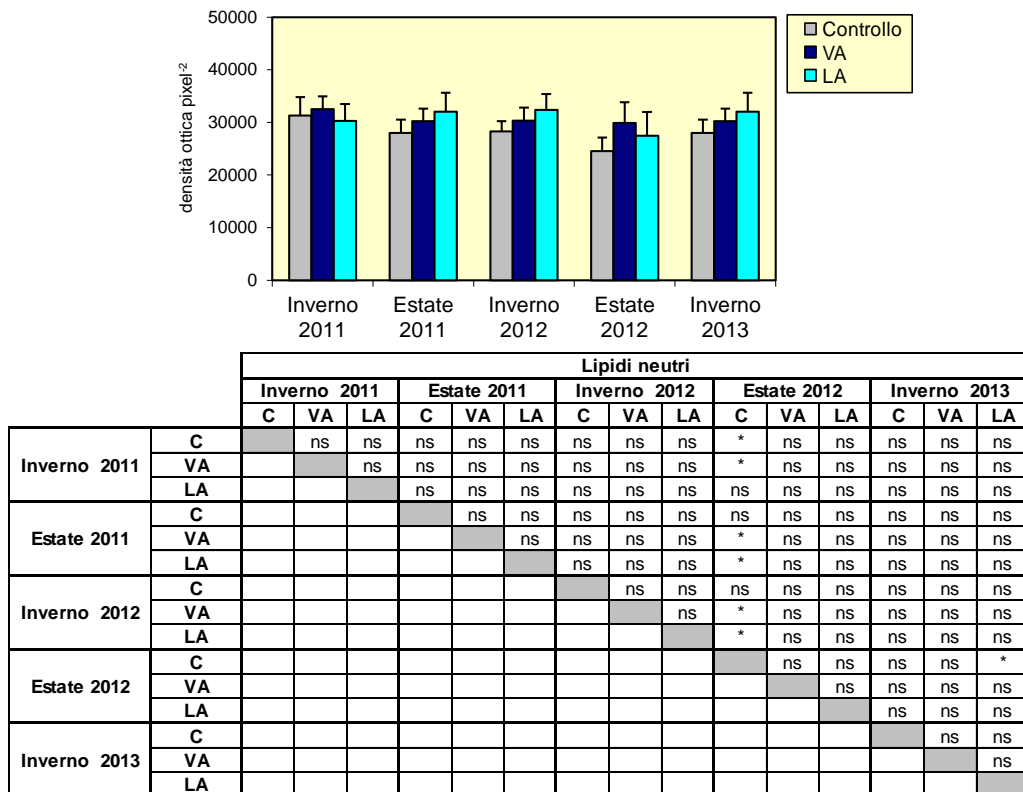


Fig. 3.10 - Valori medi (\pm d.s.) di accumulo di lipidi neutri espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nei cinque survey vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test ANOVA; ns = non significativo.

Nel complesso la distribuzione di valori finora osservati tende ad escludere l'aumento delle alterazioni biologiche associate alla sintesi dei lipidi nei mitili prelevati dai siti della piattaforma indotta dalla presenza di sostanze xeno-biotiche biodisponibili quali i composti organici, che sono sostanze capaci di alterare il

normale metabolismo lipidico di un organismo marino. Confrontando i risultati ottenuti con la più recente letteratura si evidenziano risposte nella norma e assimilabili ad organismi soggetti a una bassa pressione antropica (Gorbi *et al.*, 2008).

Valutazione del contenuto di lipofuscine - I livelli di lipofuscine evidenziati nei mitili prelevati nell'inverno 2013 non hanno evidenziato valori significativamente diversi tra i campioni analizzati, essendo risultati compresi tra i 7308 ± 361 (controllo) e 8099 ± 269 unità di densità ottica/pixel (VA) della piattaforma (fig. 3.11).

Solo nelle due stagioni del 2011 in uno o entrambi i siti di prelievo di Annamaria B erano stati registrati valori significativamente superiori rispetto al controllo.

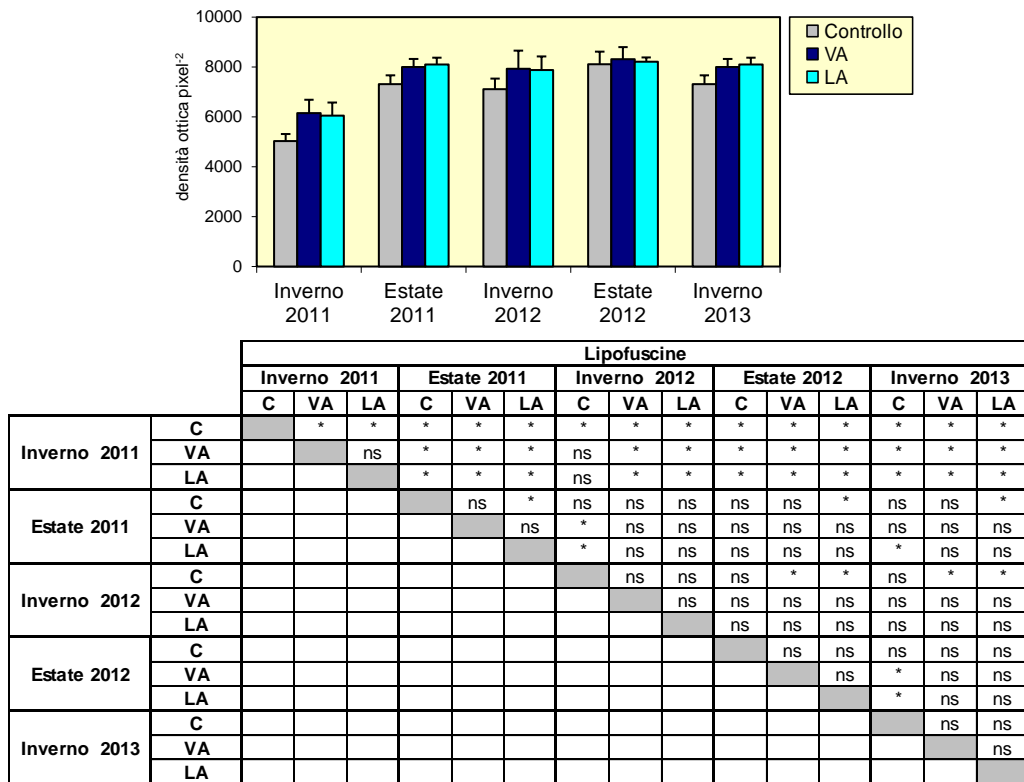


Fig. 3.11 - Valori medi (\pm d.s.) di accumulo di lipofuscine espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nei cinque survey vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test ANOVA; ns = non significativo; * = significativo.

Scarse sono inoltre apparse le fluttuazioni stagionali.

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. Essi appaiono inoltre inferiori a quelli evidenziati nel corso di

precedenti esperienze di monitoraggio in aree costiere in Adriatico settentrionale (Petrovic *et al.*, 2004) o su analoghe piattaforme (Fabi *et al.*, 2004; 2005b; 2006; 2010c; 2010d; Gorbi *et al.*, 2008; Gomiero *et al.*, 2011).

Metallotioneine - I livelli medi rilevati nell'ultimo survey confermano incrementi significativi di proteine metallo-chelanti nei mitili prelevati da entrambi i siti della piattaforma rispetto al controllo (fig. 3.12). Una risposta biologica simile, con livelli superiori presso entrambi i siti di Annamaria B, era stata riscontrata nelle due stagioni estive del 2011 e 2012, mentre, per quanto riguarda le stagioni invernali, solo nell'inverno 2011 i mitili prelevati nel sito VA avevano presentato livelli più alti del controllo.

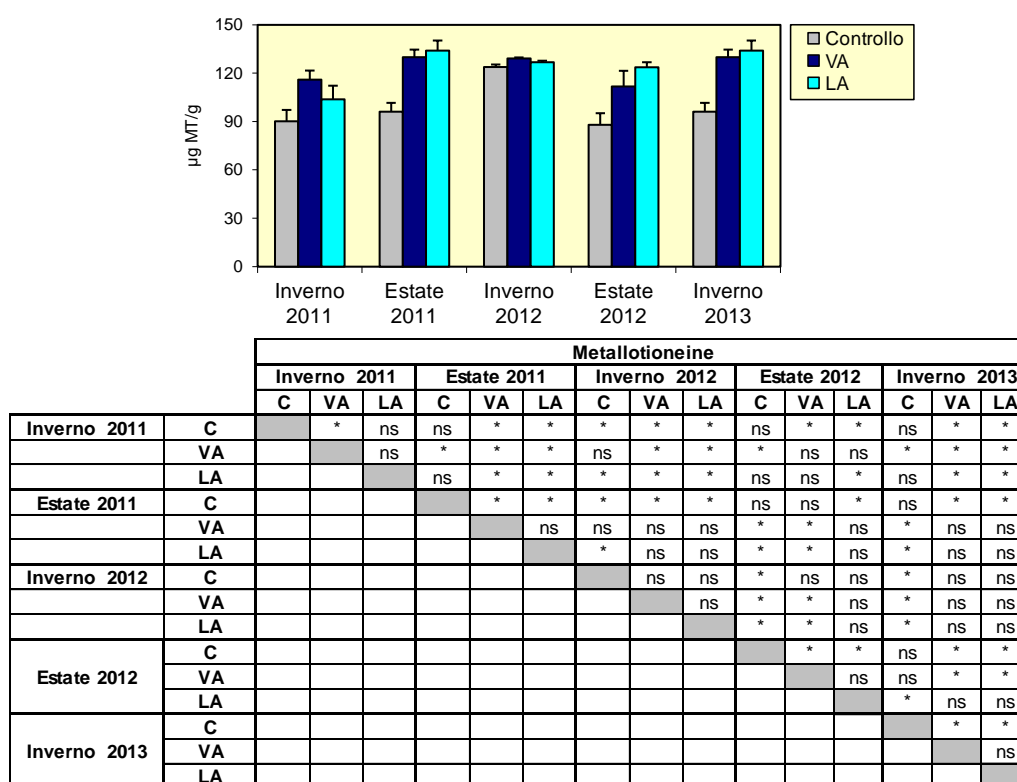


Fig. 3.12 – Concentrazioni medie (\pm d.s.) di metallotioneine rilevate nella ghiandola digestiva di mitili (*M. galloprovincialis*) prelevati nei cinque survey vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test di Mann – Whitney; ns = non significativo; * = significativo.

Quanto evidenziato tende a riportare una significativa, seppur moderata, risposta biologica alla presenza di metalli pesanti nei mitili della piattaforma. A livello stagionale le variazioni riscontrate in ciascun sito non sono apparse frequenti.

Comunque, le risposte biologiche finora rilevate rimangono più contenute rispetto a quanto evidenziato per altre piattaforme metanifere oggetto di monitoraggio Fabi *et al.*, 2005b; 2006; 2014c; Gomiero *et al.*, 2011; 2013).

Comet assay - Il test della cometa (Comet assay), condotto per valutare l'integrità del DNA, nell'inverno 2013 ha evidenziato nei mitili prelevati dal controllo una dimensione media della "coda" ($2,8 \pm 1,0\%$), indice diretto di danno genetico, statisticamente inferiore a quella degli esemplari prelevati da LA ($5,8 \pm 1,0\%$) e confrontabile con VA ($4,9 \pm 2,0\%$; fig. 3.13).

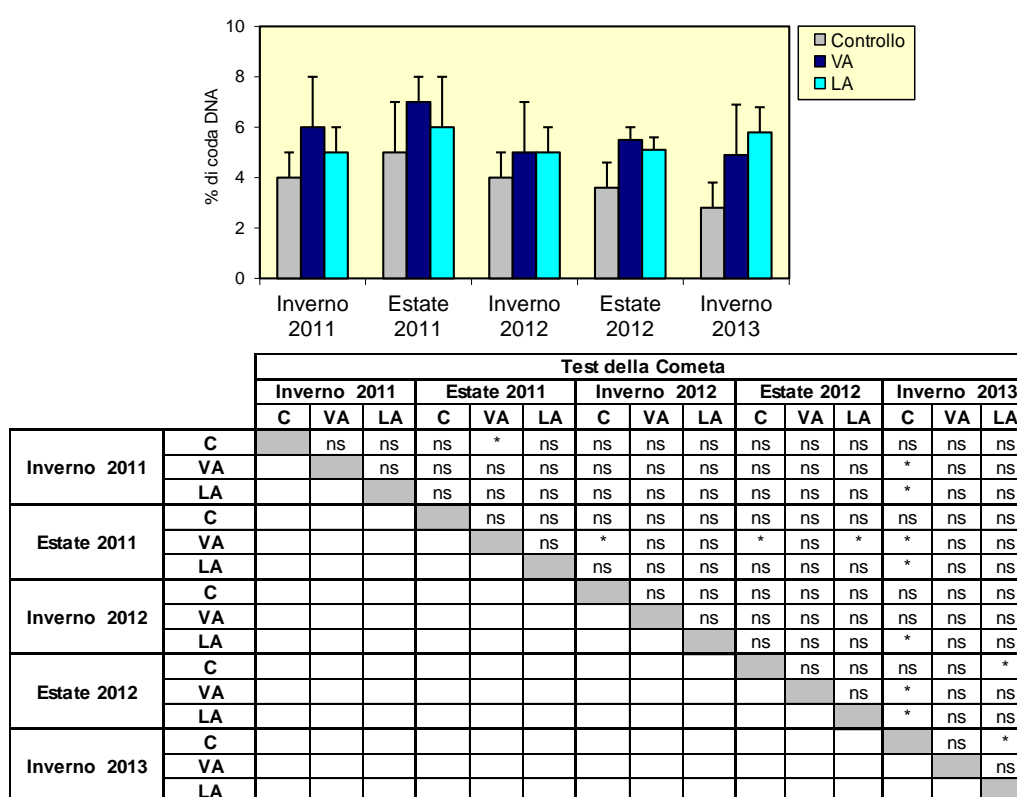


Fig. 3.13 - Livello di danno al DNA rilevato dal Test della Cometa negli emociti di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nei cinque survey vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B (VA e LA) e nel sito di controllo. Test di Mann – Whitney; ns = non significativo; * = significativo.

Nelle precedenti stagioni i tre siti avevano sempre evidenziato valori confrontabili. Stagionalmente non sono state riscontrate variazioni in ciascuno dei tre punti di prelievo. Tale risposta biologica rientra all'interno di quanto è spesso osservabile naturalmente in organismi nativi prelevati presso aree marine e marino-costiere non soggette a significativa pressione antropica e non rappresenta, quindi, alcuna criticità ambientale (Klobučar *et al.*, 2008).

3.4.2. METALLI PESANTI

L'analisi della distribuzione dei metalli pesanti negli organismi prelevati nell'inverno 2013 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 in tutti i precedenti monitoraggi (fig. 3.14; Tabb. 3-XI e 3-XII). Inoltre, per tutti i tre metalli sono state riscontrate differenze significative anche tra VA ed LA, con concentrazioni maggiori sempre in quest'ultimo sito.

Lo zinco ha mostrato un andamento stagionale, con valori maggiori in inverno e inferiori in estate. Le concentrazioni dell'ultimo campionamento non hanno comunque raggiunto i massimi registrati nei due inverni precedenti.

Il cadmio, invece, non ha mostrato variazioni da un survey all'altro, salvo qualche caso riguardante esclusivamente LA (estate 2012 con le tre stagioni precedenti, inverno 2013 con estate 2012). Pertanto, le concentrazioni raggiunte in ciascun sito nell'ultimo campionamento sono apparse del tutto confrontabili con quelle dell'inverno 2011.

Rispetto al monitoraggio precedente (estate 2012), caratterizzato da un decremento ovunque, il bario è significativamente aumentato in tutti i tre siti. In LA ha raggiunto una concentrazione del tutto simile a quelle registrate nei primi tre survey, al controllo ha raggiunto il massimo dell'intero periodo, mentre in VA è stato registrato un contenuto del metallo intermedio tra i primi tre, risultati i più alti per questo sito, e quello dell'estate 2012 corrispondente al minimo. Non è stato riscontrato un chiaro andamento stagionale.

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; 2014c) presso varie piattaforme estrattive off-shore dell'Adriatico centro-settentrionale.

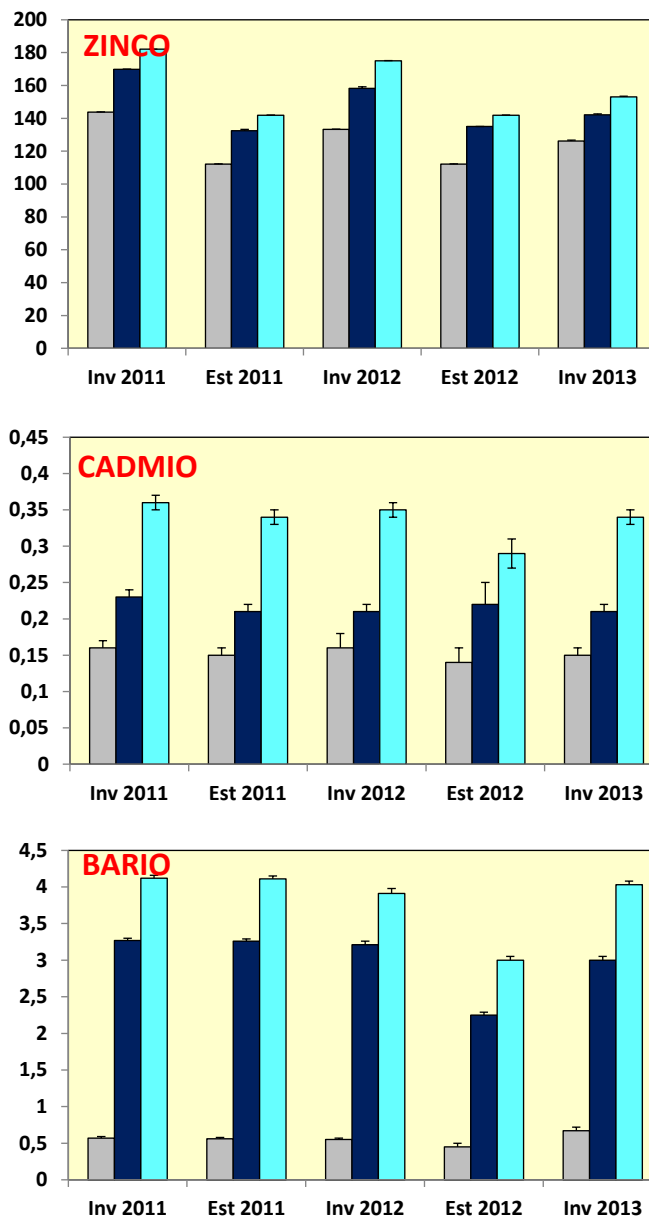


Fig. 3.14 - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nel corso dei cinque survey. Valori espressi in mg/kg p.s. (\pm d.s.).

Tab. 3-XI - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nel corso dei cinque 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	112,10 \pm 0,19	132,40 \pm 0,91	141,90 \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

	Estate 2012			Inverno 2013		
	Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA
Ba	0,45 \pm 0,05	2,25 \pm 0,04	3,00 \pm 0,05	0,67 \pm 0,05	3,00 \pm 0,05	4,03 \pm 0,05
Zn	109,10 \pm 1,10	135,00 \pm 1,00	141,90 \pm 0,10	126,20 \pm 0,50	142,2 \pm 0,50	153,00 \pm 0,50
Cd	0,14 \pm 0,05	0,22 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,34 \pm 0,01

Tab. 3-XII - 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.

		Zn														
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*
	VA			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Estate 2011	C					*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*
	VA						*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA							*	*	*	*	*	ns	*	ns	*
Inverno 2012	C								*	*	*	*	*	*	*	*
	VA									*	*	*	*	*	*	*
	LA										*	*	*	*	*	*
Estate 2012	C											*	*	*	*	*
	VA													*	*	*
	LA													*	ns	*
Inverno 2013	C														*	*
	VA															*
	LA															

		Cd														
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA			*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*
	LA				*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns
Estate 2011	C					*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA						*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*
	LA							*	*	ns	*	*	*	*	*	ns
Inverno 2012	C								*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA									*	*	ns	*	*	ns	*
	LA										*	*	*	*	*	ns
Estate 2012	C											*	*	ns	*	*
	VA												*	*	ns	*
	LA													*	*	*
Inverno 2013	C														*	*
	VA															*
	LA															

		Ba														
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*
	VA			*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*
	LA				*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	ns
Estate 2011	C					*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA						*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*
	LA							*	*	*	*	*	*	*	*	ns
Inverno 2012	C								*	*	ns	*	*	*	*	*
	VA									*	*	*	*	*	*	*
	LA										*	*	*	*	*	ns
Estate 2012	C											*	*	*	*	*
	VA												*	*	*	*
	LA													*	ns	*
Inverno 2013	C														*	*
	VA															*
	LA															

3.4.3. IDROCARBURI TOTALI

Analogamente ai survey precedenti, anche nell'inverno 2013 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-XIII).

Tab. 3-XIII - Distribuzione degli idrocarburi totali rilevati nei tessuti di mitili prelevati presso la piattaforma Annamaria B nel corso dei cinque 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.

	Estate 2012			Inverno 2013		
	Controllo	VA	LA	Controllo	VA	LA
$\Sigma_{IA\ C5-C40}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Test U		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 sesto survey condotto dopo la fine dei lavori di perforazione e installazione di Annamaria B (inverno 2013) confrontati, ove possibile, con quelli precedenti e relativi sia alla fase di installazione della piattaforma che ai monitoraggi post lavori sinora condotti (Fabi *et al.*, 2010a; 2010b; 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b). 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 nei primi sei mesi del 2011 e del 2012 (Fabi *et al.*, 2011b; 2014a), anche nel I semestre 2013 le correnti sia di fondo che di superficie hanno avuto prevalentemente direzione verso SW. L’intensità è apparsa piuttosto costante, intorno a 13 cm/s, lungo tutta la colonna d’acqua, e mediamente superiore in superficie.

Caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d’acqua – Nel monitoraggio condotto nell’aprile 2013 è apparsa evidente l’incipiente stratificazione termica dovuta al riscaldamento della colonna d’acqua durante i mesi primaverili con l’inizio della formazione del caratteristico termocline stagionale. La salinità ha presentato un gradiente marcato nei primi metri, indicando come l’area fosse interessata, al

momento del monitoraggio, dalla presenza di abbondanti acque dolci di origine fluviale. La saturazione d'ossigeno è risultata ovunque superiore al 90%, escludendo la presenza di episodi ipossici nella zona indagata. I valori di torbidità sono risultati ridotti mentre la fluorescenza ha mostrato incrementi sul fondo. La trasparenza superficiale della colonna d'acqua non ha mostrato differenze tra le stazioni poste vicino alla piattaforma e il controllo, il che esclude un condizionamento della trasparenza superficiale nell'area intorno alla struttura, analogamente a quanto osservato anche nei survey precedenti (Fabi *et al.*, 2010a; 2010b; 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b).

La distribuzione della clorofilla *a* ha generalmente mostrato un incremento in prossimità del fondo, in accordo con il profilo di fluorescenza, indice di una maggior crescita fitoplanctonica a quelle quote.

In generale l'area indagata non presenta peculiarità da un punto di vista fisico e chimico rispetto a quanto riportato in bibliografia (Artegiani *et al.*, 1997a e 1997b; Marini *et al.*, 2008), pertanto con i dati disponibili sembra che la presenza della piattaforma non abbia alterato le caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d'acqua.

Idrocarburi totali lungo la colonna d'acqua - La ricerca di idrocarburi totali nel corso dei sei survey sinora condotti nella fase di produzione di Annamaria B (estate 2010 - inverno 2013) 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 2013)

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 presso la 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 ai campioni di mitili prelevati dalle parti sommerse della piattaforma Annamaria B nell'inverno 2013 tende ad evidenziare una modesta sindrome di stress in questi organismi rispetto a quelli prelevati nel sito di controllo. Al momento non vengono osservate alterazioni a livello metabolico, come evidenziato dai risultati della sopravvivenza all'aria. Diversamente, la stabilità delle membrane lisosomiali (indice aspecifico di stress), che rappresenta un test più sensibile del precedente e che viene condotto per evidenziare cambiamenti a livello cellulare e subcellulare negli organismi sentinella, riporta una diminuzione di valori nei mitili della piattaforma. Non è stato riscontrato un danno al DNA nelle cellule degli organismi analizzati, essendo le percentuali di frammentazione simili a quelle riscontrabili naturalmente su popolazioni di bivalvi prelevati in ambienti marino-costieri poco impattati. I livelli intracellulari di lipidi neutri appaiono omogeneamente distribuiti e tendono quindi ad escludere la presenza di effetto legato a molecole organiche come IPA e PCB. Non è stato neanche rilevato alcun accumulo di inquinanti organici. Al contrario, sia la sintesi di proteine metallo-chelanti (metallotioneine) sia l'accumulo di Zn, Ba e Cd nei tessuti dei bivalvi esaminati evidenzia un significativo effetto biologico correlabile alla presenza di elementi metallici in prossimità della piattaforma.

5. BIBLIOGRAFIA

- Artegiani A. 1996. *Temperature and salinity measurements of seawaters, Handbook of method protocols*. MAST II Mediterranean Targeted Project. 34 pp.
- 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 microalgae*. 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., Gomiero A., Nasci C., Spagnolo A. 2014a. *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". 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.* Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 56 + X pp.
- Fabi G., Campanelli A., De Ranieri S., Gomiero A., Spagnolo A. 2014b. *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". 5° Survey successivo alle operazioni di installazione (estate 2012). 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. 70 + XX pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Girasole M., Gomiero G., Penna P., Spagnolo A. 2014c. *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.
- Gomiero A., Spagnolo A., De Biasi A., Kozinkova L., Polidori P., Punzo E., Santelli A., Strafella P., Girasole M., Dinarelli S., Viarengo A., Negri A., Nasci C., Fabi G. 2013. Development of an integrated chemical, biological and ecological approach for impact assessment of Mediterranean off shore gas platforms. *Chemistry and Ecology*, 29(7): 620-634.
- 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., Brilli 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.
- Strømngren 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 H₂O₂ and γ -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.

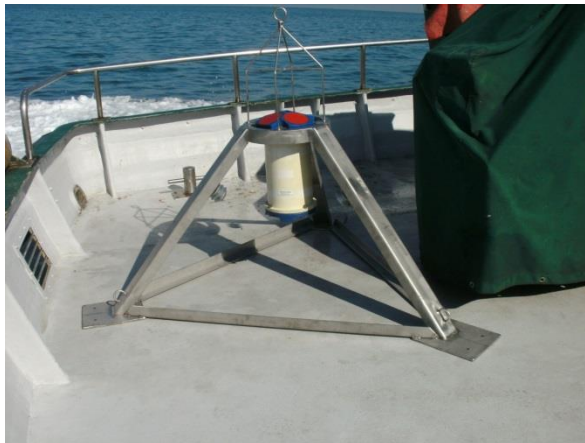
ALLEGATO A

SCHEDE TECNICHE DELLA STRUMENTAZIONE

UTILIZZATA NELLE INDAGINI

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

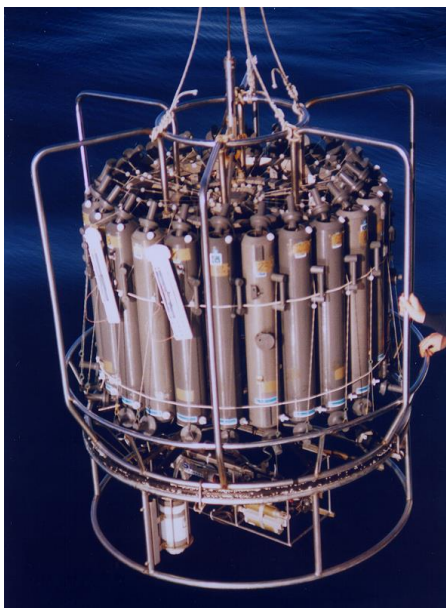
A1-IADCP (ACOUSTIC DOPPLER CURRENT PROFILER)



Strumento	Costruttore	Modello	Risoluzione	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione
ADCP	Teledyne RD Instruments	Workhorse Sentinel 300 kHz	0,1 cm/s	± 0,5 cm/s	± 5 m/s (default) ±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	± 0,4 cm/s	da -5°C a + 45°C	ad ogni deployment

A1-II SONDA MULTIPARAMETRICA CTD e “ROSETTE”



CTD: Sea Bird Electronics SBE911plus (frequenza di campionamento 24 Hz) dotato dei seguenti sensori:

Sensore	Costruttore	Modello	Accuratezza	Intervallo di misura
Temperatura	Sea Bird Electronics	SBE 3	$\pm 0,002$ °C	-5 : +35°C
Conducibilità	Sea Bird Electronics	SBE 4	$\pm 0,0003$ S m ⁻¹	0 : 7 S m ⁻¹
Pompa	Sea Bird Electronics	SBE 5	---	9 : 18 VDC
Ossigeno	Sea Bird Electronics	SBE 43	$\pm 0,1$ ml L ⁻¹	0 : 15 ml L ⁻¹
Fluorimetro	Turner Designs	SCUFA	$\pm 0,01$ µg L ⁻¹	0,02 : 100 µg L ⁻¹
Torbidimetro	Turner Designs	SCUFA	$\pm 0,01$ NTU	0,05 : 100 NTU
Back-scattering	Seapoint Turbidity Meter	Seapoint Turbidity Meter	< 5cm (approx.)	2 : 750 FTU
Altimetro	Datasonics	PSA-900	$\pm 0,75$ cm	0 : 300 m

Campionatore: Rosette General Oceanics equipaggiato con 12 bottiglie idrologiche Niskin da 10 lt.

A1-III TRITINO



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

A1-IV HPLC



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

A1-V GAS CROMATOGRAFO VARIAN CP-3800 FID



Tipo Strumento	Costruttore	Serie	Detector	Iniezione	V _{Iniezione}	Carrier
Gas Cromatografo	Varian	CP-3800	FID	Spliless	2-100 μ l	He

A1-VI 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

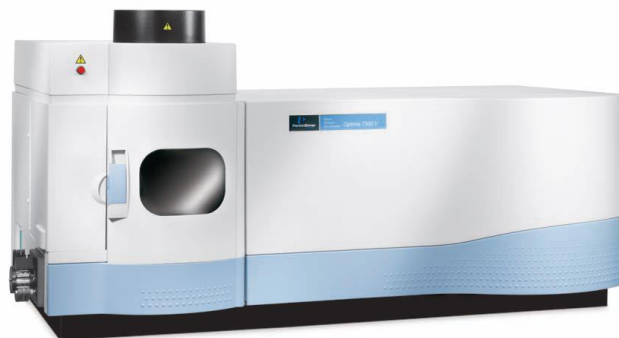
A2-IV SPETTROFOTOMETRIA Shimadzu UV-1700 Pharma



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).