

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

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

**7° SURVEY SUCCESSIVO ALLE OPERAZIONI DI INSTALLAZIONE  
(ESTATE 2013)**

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

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

**RESPONSABILE SCIENTIFICO:  
GIANNA FABI**

**RAPPORTO A CURA DI:  
GIANNA FABI  
ALESSANDRA CAMPANELLI  
ANNA DE BIASI  
ALESSIO GOMIERO  
ALESSANDRA SPAGNOLO**

**ANCONA, Maggio 2015**



# INDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUZIONE</b> .....   | 1  |
| <b>2. MATERIALI E METODI</b> .....   | 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  |
| 2.1.5. INDAGINI FISICHE, CHIMICHE ED ECOTOSSICOLOGICHE DEI<br>SEDIMENTI .....      | 7  |
| 2.1.5.1 Caratteristiche fisiche e chimiche dei sedimenti .....                     | 8  |
| 2.1.5.2 Ecotossicologia dei sedimenti .....  | 8  |
| 2.2. ANALISI DI LABORATORIO E ANALISI DEI DATI .....                               | 9  |
| 2.2.1. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA .....                     | 9  |
| 2.2.1.1 Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina.....             | 10 |
| 2.2.2. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA .....                           | 11 |
| 2.2.2.1 <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....  | 11 |
| 2.2.2.2 <i>Vibrio fischeri</i> .....   | 13 |
| 2.2.2.3 <i>Tigriopus fulvus</i> .....  | 14 |
| 2.2.3. ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> .....             | 15 |
| 2.2.3.1 Biomarkers .....   | 15 |
| 2.2.3.2 Metalli pesanti .....  | 21 |
| 2.2.3.3 Idrocarburi totali .....   | 22 |
| 2.2.4. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DEI SEDIMENTI.....                              | 22 |
| 2.2.4.1 Granulometria .....  | 22 |
| 2.2.4.2 Idrocarburi totali .....   | 23 |
| 2.2.4.3 Metalli pesanti .....  | 24 |
| 2.2.5. ECOTOSSICOLOGIA DEI SEDIMENTI .....   | 25 |
| 2.2.5.1 <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....  | 25 |
| 2.2.5.2 <i>Vibrio fischeri</i> .....   | 26 |
| 2.2.5.3 <i>Corophium orientale</i> .....   | 28 |
| <b>3. RISULTATI</b> .....  | 30 |
| 3.1. MISURE CORRENTOMETRICHE .....   | 30 |
| 3.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA ....                        | 33 |
| 3.2.1. TEMPERATURA, SALINITÀ, TORBIDITÀ, OSSIGENO DISCIOLTO<br>E TRASPARENZA ..... | 33 |
| 3.2.2. FLUORESCENZA INDOTTA, CLOROFILLA A E TSM.....                               | 35 |
| 3.2.3. RICERCA DI IDROCARBURI TOTALI SU CAMPIONI DI ACQUA<br>MARINA.....           | 37 |
| 3.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI D'ACQUA MARINA .....                              | 38 |
| 3.3.1. <i>DUNALIELLA TERTIOLECTA</i> .....   | 38 |
| 3.3.2. <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....  | 39 |
| 3.3.3. <i>TIGRIOPUS FULVUS</i> .....   | 40 |
| 3.4. ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> .....               | 42 |
| 3.4.1. BIOMARKERS .....  | 42 |
| 3.4.2. METALLI PESANTI.....  | 47 |

|                   |   |            |
|-------------------|---|------------|
| 3.4.3.            | IDROCARBURI TOTALI .....  | 48         |
| 3.5.              | INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DEI SEDIMENTI .....                           | 49         |
| 3.5.1.            | GRANULOMETRIA .....   | 49         |
| 3.5.2.            | METALLI PESANTI .....   | 50         |
| 3.5.3.            | IDROCARBURI TOTALI .....  | 53         |
| 3.6.              | ECOTOSSICOLOGIA DEI SEDIMENTI .....                                       | 55         |
| 3.6.1.            | <i>DUNALIELLA TERTIOLECTA</i> .....                                       | 55         |
| 3.6.2.            | <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....  | 56         |
| 3.6.3.            | <i>COROPHIUM ORIENTALE</i> .....  | 57         |
| <b>4.</b>         | <b>CONCLUSIONI</b> .....  | <b>59</b>  |
| <b>5.</b>         | <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....   | <b>64</b>  |
|                   |   |            |
| <b>ALLEGATO A</b> | Schede tecniche della strumentazione utilizzata nelle indagini .....      | <b>I</b>   |
|                   | - ALL. A1 Indagini idrologiche .....                                      | <b>II</b>  |
|                   | - ALL. A2 Sedimenti: Indagini fisiche e chimiche .....                    | <b>VI</b>  |
|                   | - ALL. A3 Analisi di inquinanti in <i>Mytilus galloprovincialis</i> ..... | <b>X</b>   |
| <b>ALLEGATO B</b> | Schede granulometriche Estate 2013.....                                   | <b>XIV</b> |

## PARTECIPANTI AL PROGRAMMA

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

Responsabile Scientifico                      G. Fabi                                      CNR - ISMAR Ancona

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

|               |                     |
|---------------|---------------------|
| M. Borghini   | CNR-ISMAR La Spezia |
| S. Durante    | CNR-ISMAR La Spezia |
| M. Betti      | CNR - ISMAR Ancona  |
| G. Caccamo    | CNR - ISMAR Ancona  |
| A. Campanelli | CNR - ISMAR Ancona  |
| E. Frapiccini | CNR - ISMAR Ancona  |
| F. Grilli     | CNR - ISMAR Ancona  |
| M. Marini     | CNR - ISMAR Ancona  |
| E. Paschini   | CNR - ISMAR Ancona  |
| P. Penna      | CNR - ISMAR Ancona  |

Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina

|            |                           |
|------------|---------------------------|
| A. Gomiero | CNR - ISMAR Ancona        |
| S. Ruzza   | Lab Control s.r.l. Rovigo |

Ecotossicologia su campioni di acqua marina

|               |                                |
|---------------|--------------------------------|
| S. De Ranieri | CIBM Livorno                   |
| N. Bigongiari | CIBM Livorno                   |
| C. Pretti     | Università degli Studi di Pisa |
| A. Gomiero    | CNR - ISMAR Ancona             |

Ricerca di inquinanti e biomarkers in organismi sentinella

|            |                    |
|------------|--------------------|
| A. Gomiero | CNR - ISMAR Ancona |
|------------|--------------------|

Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| S. De Ranieri      | CIBM Livorno |
| A.M. De Biasi      | CIBM Livorno |
| G. Bontà-Pittaluga | CIBM Livorno |
| S. Dell'Ira        | CIBM Livorno |
| L. Kozinkova       | CIBM Livorno |
| L. Pacciardi       | CIBM Livorno |
| M. Pertusati       | CIBM Livorno |
| S. Polese          | CIBM Livorno |
| O. Spinelli        | CIBM Livorno |

Hanno inoltre collaborato allo svolgimento dei campionamenti in mare i Sigg.ri G. Gaetani e A. Marziali imbarcati sulla M/R Tecnopisca II del CNR – ISMAR di 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 Programma 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 effettuati nell'estate 2009 e

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

Nella fase successiva all'installazione della piattaforma erano previste le seguenti indagini:

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

Tale fase è iniziata nell'estate 2010 (Tab. 1-I).

**Tab. 1-I** – Cronoprogramma dei survey previsti durante il Programma di Monitoraggio Transfrontaliero. In grigio le indagini richieste dal Programma di monitoraggio transfrontaliero; x = survey già effettuati sino all'estate 2013. DL = durante lavori; PL = post lavori.

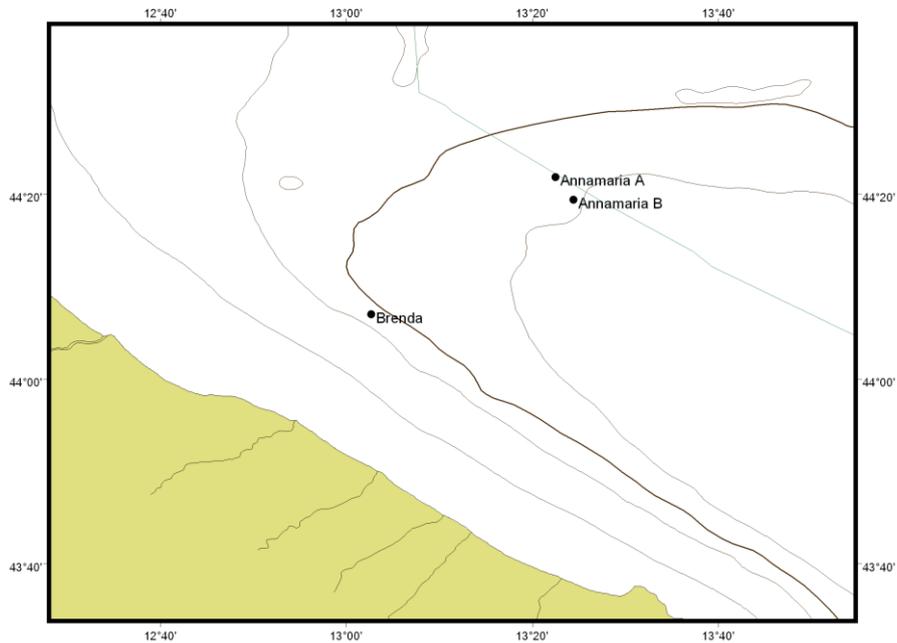
| Aspetti indagati                                   | Survey DL |         | Survey PL |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|--|-----------|---------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|  | Est '09   | Inv '10 | Est '10   | Inv '11 | Est '11 | Inv '12 | Est '12 | Inv '13 | Est '13 | Inv '14 | Est '14 | Inv '15 |
| Correntometria                                     |           |         | x         | x       | x       | x       | x       | x       | x       |         |         |         |
| Caratteristiche fisiche e chimiche colonna d'acqua |           | x       | x         | x       | x       | x       | x       | x       | x       |         |         |         |
| Ricerca di idrocarburi totali colonna d'acqua      |           |         | x         | x       | x       | x       | x       | x       | x       |         |         |         |
| Ecotossicologia colonna d'acqua                    |           |         | x         | x       | x       | x       | x       | x       | x       |         |         |         |
| Caratteristiche fisiche e chimiche sedimenti       | x         | x       | x         |         | x       |         | x       |         | x       |         |         |         |
| Ecotossicologia su campioni di sedimento           | x         | x       | x         |         | x       |         | x       |         | x       |         |         |         |
| Biomarkers su <i>M. galloprovincialis</i>          |           |         |           | x       | x       | x       | x       | x       | x       |         |         |         |
| Macrozoobenthos                                    | x         | x       |           |         |         |         |         |         |         |         |         |         |

Nelle indagini post installazione sono previsti 2 campionamenti/anno per quanto concerne la colonna d'acqua e biomarkers in organismi marini e un campionamento/anno (estate) per le caratteristiche sedimentologiche.

Nel presente rapporto sono descritti i risultati relativi a tutti i punti del precedente elenco ottenuti nel corso del VII survey post lavori (estate 2013).

## 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. I lavori di installazione della piattaforma sono terminati nel giugno 2010 e subito dopo è iniziata la fase di produzione.



**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 01/07/2013 al 31/12/2013 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).

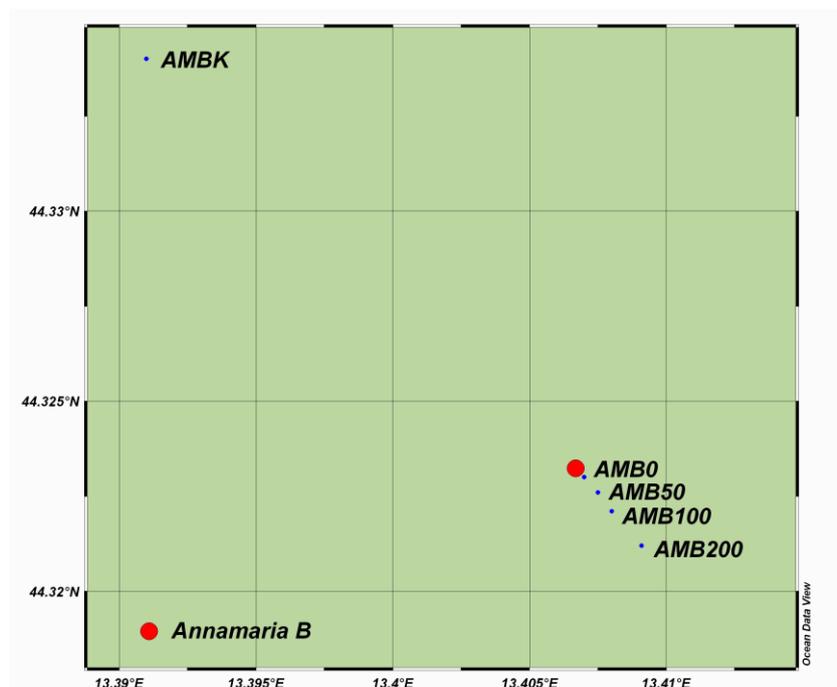
L'ormeggio correntometrico era costituito da un correntometro acustico del peso in acqua di circa 5 kg, una boa con spinta positiva di 55 kg, uno sganciatore acustico Edge Tech e una zavorra in ferro a perdere di circa 110 kg. Il correntometro utilizzato per le misure è un profilatore acustico (ADCP) 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 alla quota 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 Programma di Monitoraggio Transfrontaliero, nell'agosto 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/O G. Dallaporta. Analogamente a quanto già effettuato precedentemente (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015), 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 nelle 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 SeaBird modello SBE911plus (All. A1-II) equipaggiata, oltre che con i sensori standard di temperatura e conducibilità e pompa in duplice coppia, con un fluorimetro e torbidimetro Turner - SCUFA per la misurazione della concentrazione di clorofilla *a* misurata come fluorescenza indotta e della torbidità, un sensore di

ossigeno SBE43 per la misurazione della concentrazione di ossigeno disciolto e un altimetro della Datasonics per la misurazione della profondità. La sonda era accoppiata a una “rosette” della General Oceanics da 4 bottiglie Niskin della capacità di 10 lt. Le sonde sono state periodicamente calibrate presso il centro di calibrazione del SACLANT della NATO di La Spezia.

I campioni d’acqua per le analisi chimiche dell’ossigeno disciolto e dei pigmenti clorofilliani sono stati prelevati tramite le bottiglie Niskin in corrispondenza della quota superficiale, di due quote intermedie e in prossimità del fondo. In ogni stazione è stata misurata la trasparenza della colonna d’acqua mediante disco Secchi.

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

In 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 prelavate 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 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 dal 250 ml tipo Nalgene prelavate 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. Nell'estate 2013 è pertanto avvenuto il sesto 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 avevano le seguenti misure medie (lunghezza conchiglia  $\pm$  dev.st.):

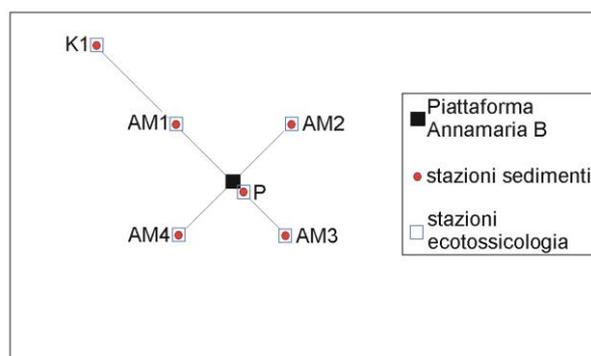
Controllo:  $4,60 \pm 0,72$  cm;

VA:  $5,55 \pm 0,50$  cm;

LA:  $5,60 \pm 0,55$  cm.

#### 2.1.5. INDAGINI FISICHE, CHIMICHE ED ECOTOSSICOLOGICHE DEI SEDIMENTI

Come già indicato nel Cap. 1, il Programma di Monitoraggio Transfrontaliero prevede, nella fase di produzione della piattaforma, un solo survey da condurre nelle stagioni estive. Analogamente alle estati del 2010, 2011 e 2012, anche in quella del 2013 i prelievi dei sedimenti sono stati effettuati seguendo uno schema di campionamento ridotto rispetto a quello relativo alle fasi di installazione della struttura (Fabi *et al.*, 2010a; 2010b). Sono state posizionate 5 stazioni di cui una in corrispondenza del sito della piattaforma (stazione P), 4 a 60 m di distanza da essa (AM1, AM2, AM3, AM4) e 1 a circa 1000 m in direzione NW (controllo; K1; fig. 2.4).



**Fig. 2.4** - Schema di campionamento dei sedimenti (non in scala). P = stazione posta in corrispondenza della struttura; AM1, AM2, AM3, AM4 = stazioni poste a 60 m di distanza dalla struttura; K1 = stazione posta a 1000 m dalla struttura (controllo).

Le coordinate, la posizione rispetto alla piattaforma Annamaria B e le profondità

delle singole stazioni campionate nell'estate 2013 sono riportate in Tab. 2-III.

**Tab. 2-III** - Dati identificativi delle stazioni di campionamento utilizzate nell'estate 2013 per le indagini sedimentologiche. In rosso il punto di campionamento in corrispondenza della piattaforma.

|          | Distanza dal sito Annamaria B (m) | Posizione rispetto alla piattaforma | Coordinate geografiche               | Profondità (m) |
|----------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| AM1      | 60                                | NW                                  | 44°19'23'',10N 13°24'22'',66E        | 59,9           |
| AM2      | 60                                | NE                                  | 44°19'19'',98N 13°24'28'',86E        | 59,2           |
| AM3      | 60                                | SE                                  | 44°19'19'',08N 13°24'28'',92E        | 59,2           |
| AM4      | 60                                | SW                                  | 44°19'19'',14N 13°24'23'',76E        | 59,2           |
| <b>P</b> | <b>0</b>                          | <b>SE</b>                           | <b>44°19'20'',52N 13°24'27'',36E</b> | <b>59,1</b>    |
| K1       | 1000                              | NW                                  | 44°19'41'',58N 13°23'56'',94E        | 58,9           |

### 2.1.5.1 Caratteristiche fisiche e chimiche dei sedimenti

Tutte le stazioni sono state campionate mediante box-corer (fig. 2.5; All. A2-I).

Dal campione, dopo la descrizione degli aspetti macroscopici, è stata prelevata la porzione superficiale (0-2 cm). L'ulteriore campione così ottenuto è stato successivamente omogeneizzato e suddiviso in 2 aliquote per le seguenti analisi:

- analisi granulometriche (già eseguite nella prima fase di studio);
- metalli pesanti (bario, cadmio, zinco);
- idrocarburi totali.

I campioni sono stati congelati e conservati a  $-18^{\circ}\text{C}$  ad eccezione di quelli utilizzati per le analisi granulometriche, conservati a  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1.5.2 Ecotossicologia dei sedimenti

Durante il survey condotto nel settembre 2012 presso tutte le stazioni di campionamento utilizzate per le indagini sedimentologiche (fig. 2.4) sono stati raccolti mediante benna Van-Veen anche campioni di sedimento per lo svolgimento dei seguenti saggi biologici:

- *Dunaliella tertiolecta* (accrescimento);
- *Vibrio fischeri* (variazione della bioluminescenza);
- *Corophium orientale* (mortalità a 10 gg).

Dal campione di sedimento è stata prelevata solo la porzione superficiale (5-10 cm), eliminando lo strato di fango venuto a contatto con le pareti della benna al fine di evitare eventuali contaminazioni. Il materiale così ottenuto è stato posto in recipienti puliti e conservato a circa 5°C.



**Fig. 2.5** – Box-corer utilizzato per le indagini fisiche e chimiche dei sedimenti.

## **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-V). Per la quantificazione degli analiti esaminati è stata misurata l’area totale di picchi tra *n*-decano e *n*-tetracontano. La concentrazione di Idrocarburi totali è stata quantificata a fronte di un campione di riferimento esterno. Il procedimento di estrazione è consistito, nella sua fase preliminare, nel raffreddamento del campione a circa 10°C al fine di impedire perdite del solvente di estrazione mediante volatilizzazione. Successivamente si è provveduto all’acidificazione del campione acquoso a pH 2 aggiungendo HCl (37%). La formazione di emulsioni è stata prevenuta aggiungendo circa 200 g di solfato di magnesio per 2,5 l di campione. Sono stati quindi aggiunti 125 ml di soluzione di riferimento di solvente di estrazione e il campione così preparato è stato posto in agitazione tramite agitatore magnetico dotato di ancoretta per 30', dopodiché 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. La frazione organica è stata quindi 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-VI). Il gascromatografo è stato opportunamente settato fino a ottenere una separazione ottimale ottenendo picchi nel gas-cromatogramma della miscela di riferimento di *n*-alcani separati dalla linea base.

Sono stati quindi misurati il campione, le soluzioni di taratura e la soluzione del bianco nel gascromatografo. Il cromatogramma rilevato analizzando il solvente di estrazione è stato utilizzato per correggere le aree dei cromatogrammi dei campioni. Il gascromatogramma acquisito tra *n*-decano (C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>) e *n*-tetracontano (C<sub>40</sub>H<sub>82</sub>) è stato quindi integrato acquisendo ogni picco a livello di segnale a fronte del picco di solvente. Il livello di ogni singolo idrocarburo è stato ottenuto utilizzando la seguente equazione:

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

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

## 2.2.2. 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  $2 \times 10^3$  cellule  $\text{ml}^{-1}$ ), le piastre sono state trasferite per 72 h in camera fitologica a condizioni di temperatura e luminosità controllate ( $T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$ , luminosità  $< 10000$  lux). Al termine dell'esposizione è stata verificata la crescita algale nel campione, espressa come densità algale, mediante lettura al Coulter Counter; si è proceduto quindi al conteggio delle tre repliche del campione tal quale e del controllo e al loro confronto statistico, per verificare eventuali aumenti o diminuzioni significative della crescita algale nel campione rispetto al controllo e procedere eventualmente alla lettura delle altre diluizioni.

Espressione e analisi dei dati – I risultati del saggio sono riportati come percentuale di inibizione della crescita algale e, qualora la tossicità del campione lo consenta, in termini di  $\text{EC}_{50}$  o  $\text{EC}_{20}$ . L' $\text{EC}_{50}$  e l' $\text{EC}_{20}$  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 sono stati suddivisi nelle seguenti categorie:

- *assenza di effetto*: percentuale di inibizione/stimolazione inferiore al 20% e 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<sub>20</sub> (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<sub>50</sub>, è stato confrontato con i dati della carta di controllo del laboratorio il cui intervallo è compreso tra 6,2 e 8,9 mg l<sup>-1</sup> come cromo; altri parametri che devono essere rispettati affinché il test sia considerato valido sono:

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

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

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

| H <sub>2</sub> O mare         | Test t      | Tossicità |
|-------------------------------|-------------|-----------|
| <b>Variazione biolumin. %</b> |             |           |
| $\Delta b < -10$              | $p < 0,05$  | 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. 2.6) 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 14669, 1999; Faraponova *et al.*, 2005).



**Fig. 2.6** - Nauplii di *Tigriopus fulvus*.

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

- salinità al  $38 \pm 1$  PSU;
- temperatura di  $18 \pm 1$ °C;
- fotoperiodo 16L/8B ad una luminosità di 500–1200 lux;
- alimentazione *ad libitum* con Tetramarin<sup>®</sup>.

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

E' stata utilizzata una coltura sincronizzata di nauplii con età di 24–36 h provenienti da una coltura isolata di femmine ovigere (fig. 2.6) alimentate con colture algali di *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* in rapporto 2:1.

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 14669, 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)<br>stabilità delle membrane lisosomiali. |
| Indici di esposizione:     | metallotioneine;<br>livelli di lipofuscine;<br>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 da ottenere delle sezioni trasversali dei tubuli disposti parallelamente all'asse longitudinale della ghiandola stessa. Tali sezioni sono state

disposte in fila su apposito supporto in alluminio (chuck) per criostato (All. A3-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'angolazione di taglio di 15° che sono state trasferite su vetrini tenuti a temperatura ambiente. La stabilità della membrana lisosmiale è stata testata attraverso l'enzima N-acetyl-hexosaminidase che ha come substrato il naphthol As-BI N-acetyl-β-D-glucosaminide.

Le sezioni, preparate come descritto in precedenza, sono state trattate in una vaschetta di Hellendal con un tampone destabilizzante le membrane lisosomiali a 37°C per tempi diversi (0, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40') in modo da determinare il tempo di trattamento richiesto per labilizzare interamente le membrane lisosomiali (periodo di labilizzazione). Il set di vetrini è stato trasferito nel mezzo di incubazione del substrato contenente naphthol As-BI N-acetyl-β-D-glucosaminide precedentemente disciolto in 2,5 ml di 2-metossietanolo e portato a volume con il tampone citrato contenente Polipep, un polipeptide a bassa viscosità che agisce come stabilizzante per le sezioni. L'incubazione con il substrato è stata di 20' a 37°C nella vaschetta di Hellendal in un bagno agitante. I vetrini sono stati successivamente risciacquati in acqua di mare filtrata a temperatura ambiente o in una soluzione di NaCl al 3% a 37°C per 2' prima del loro trasferimento per 10' a temperatura ambiente in un tampone fosfato pH 7,4 contenente il colorante diazoinico fast violet B blue. I vetrini, risciacquati in acqua corrente per 5', sono stati successivamente fissati con gelatina glicerinata. Le sezioni così ottenute sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine al microscopio ottico (All. A3-II) per la determinazione del periodo di labilizzazione lisosomiale. Le analisi sono state eseguite almeno in quintuplicato.

***Valutazione del Contenuto in Metallothioneine*** - La valutazione del contenuto in metallothioneine rappresenta un importante indice di stress specifico in quanto Le metallothioneine sono proteine cellulari inducibili dall'accumulo nella cellula di cationi di metalli pesanti. Pertanto, la valutazione della loro concentrazione tissutale nelle cellule della ghiandola digestiva del mitilo risulta un parametro specifico per

quantificare la risposta biologica degli animali all'inquinamento da metalli pesanti quali Cu, Cd, Hg, Zn, Pb, ecc.

Al momento dell'analisi i tessuti (3 pool di 5-7 individui per ogni stazione) sono stati omogeneizzati in 3 volumi di Saccoroso/Tris-HCl addizionati di Leupeptina e  $\beta$ -mercaptoetanolo. L'omogenato è stato quindi centrifugato (All. A3-III) per ottenere una frazione solubile contenente le metallotioneine. Il sopratanate 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 sopratanate così ottenuto è stato addizionato di 3 volumi di etanolo freddo e mantenuto a -20°C per 1 h e quindi centrifugato a 6.000 x g per 10' in rotore oscillante. Il pellet è stato lavato una volta con etanolo e cloroformio nel buffer di omogeneizzazione, ri-centrifugato, insufflato con azoto e risospeso in NaCl 0,25 M addizionato di 150  $\mu$ l di HCl e EDTA. Ai campioni così risospesi è stato aggiunto DTNB (acido ditiobisnitrobenzoico) preparato al momento dell'uso e quindi sono stati centrifugati a 3.000 x g. L'assorbanza è stata valutata per via spettrofotometrica (All. A2-IV) misurandola a 412 nm.

***Accumulo di Lipofuscine nei lisosomi*** – Questo metodo permette di determinare l'accumulo nei lisosomi dei prodotti finali della perossidazione lipidica delle membrane cellulari: le lipofuscine. Con il termine di ossidazione lipidica si intende una serie di reazioni chimiche favorite da specie reattive dell'ossigeno (ROS) che causano danni alle molecole lipidiche delle membrane cellulari. Gli eventi perossidativi si verificano comunemente nelle cellule viventi anche in condizioni fisiologiche, in quanto rappresentano una via catabolica per gli acidi grassi insaturi di membrana. L'esposizione a sostanze xenobiotiche, tra cui i contaminanti 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 si accumulano 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. A3-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. A3-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. A3-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. A3-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 preparazione per la corsa elettroforetica in modalità Alcalina e/o Neutra.

Versione Alcalina: ogni vetrino è stato asciugato dal buffer di lisi, trasferito nella soluzione alcalina (pH>13) per 15' al buio e a temperatura ambiente e quindi 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 infine 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 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 ( $490\text{nm}_{\text{Ex}}/535\text{nm}_{\text{Em}}$ ) 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 di mitilo congelato sono stati opportunamente trattati secondo il metodo US-EPA 3050B del 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  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HNO}_3$ . 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  $65^\circ\text{C}$  in 30'. Si è quindi portato il campione a  $115^\circ\text{C}$  per 150' e si è proceduto al raffreddamento parziale e all'aggiunta di ulteriori 1,5 ml di  $\text{HNO}_3$ , 3,5 ml di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 1 ml di  $\text{HCl}$ . Il campione è stato poi lasciato rifluire per ulteriori 150' a  $110^\circ\text{C}$ .

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

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

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

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

Un'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 US-EPA 3550c rev. 3 – 2007 e 8015c rev. 3 – 2000.

Una quantità nota di campione (5-10 g) è stata dapprima liofilizzata e successivamente estratta mediante sonicazione a freddo per 60' con 50 ml di acetone/n-eptano (1:1 v/v). Nella soluzione estraente è stata aggiunta la soluzione di riferimento per la finestra dei tempi di ritenzione contenente n-pentano (C<sub>5</sub>), n-dodecano (C<sub>12</sub>) e n-tetracontano (C<sub>40</sub>). L'estratto è stato purificato su colonna di Florisil e un'aliquota è stata analizzata in GG-FID. In particolare, è stata misurata l'area totale dei picchi presenti nell'intervallo delimitato dalle tre soluzioni di riferimento C<sub>5</sub>, C<sub>12</sub> e C<sub>40</sub>. 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.

## **2.2.4. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DEI SEDIMENTI**

### **2.2.4.1 Granulometria**

In laboratorio i campioni di sedimento sono stati pesati tal quali per la determinazione del peso umido utilizzando una bilancia elettronica tipo "Europe" (All. A2-II). Successivamente sono stati posti in contenitori di alluminio e introdotti

in stufa (All. A2-III) a 110°C per almeno 24 h. Una volta raggiunta la completa essiccazione si è proceduto alla misurazione del peso secco.

Per la separazione in sabbie e peliti ogni campione è stato immerso in acqua tiepida sino alla sua completa disgregazione; si è quindi proceduto alla setacciatura con maglie da 63  $\mu$ . Il materiale trattenuto dal setaccio, definito come sabbie, è stato essiccato in stufa a 130°C per almeno 24 h ed è stato sottoposto a indagine granulometrica, ovvero è stata analizzata la distribuzione percentuale in peso dei grani costituenti il campione secondo le loro dimensioni. Per questa analisi è stato utilizzato un set di setacci (All. A2-IV) aventi dimensioni delle maglie decrescenti (4000  $\mu$ , 2000  $\mu$ , 1000  $\mu$ , 500  $\mu$ , 250  $\mu$ , 125  $\mu$ , 63  $\mu$ ). Una volta terminata la setacciatura sono stati pesati i residui di ogni setaccio ed è stata determinata la percentuale conchigliare presente. I dati così ottenuti sono stati riportati su un diagramma semilogaritmico e uniti mediante la cosiddetta “curva granulometrica”.

Le peliti (materiale inferiore a 63  $\mu$ ) sono state fatte decantare ed essiccare in stufa a 130°C sino a completa evaporazione. E' stata quindi eseguita l'aerometria mediante l'utilizzo di un densimetro (All. A2-V) per terreni secondo il metodo di Casagrande basato su due proprietà: a) velocità con cui si depositano i grani in sospensione in un liquido viscoso in quiete dipende dal volume, dalla forma e dal peso dei granuli stessi (Legge di Stokes); b) la densità della sospensione ad un dato istante è funzione della qualità del prodotto solido non ancora depositato.

#### **2.2.4.2 Idrocarburi totali**

Gli idrocarburi leggeri ( $C < 12$ ) sono stati determinati tramite i metodi EPA 5021A (2003) ed EPA 8015D (2003), che prevedono l'estrazione termica con tecnica in spazio di testa e la determinazione tramite gas-cromatografia con rivelatore FID (All. A2-VI; limite di quantificazione = 1 mg kg<sup>-1</sup>). Per gli idrocarburi pesanti ( $C > 12$ ) sono stati seguiti i metodi EPA 3545A (2007), EPA 3620C (2007) ed EPA 8015D (2003). L'estrazione in questo caso è stata effettuata con solvente (Diclorometano), la successiva purificazione dell'estratto con florisil e la determinazione tramite gascromatografia con rivelatore FID (limite di quantificazione = 1 mg kg<sup>-1</sup>). Gli idrocarburi totali sono stati calcolati come somma delle due frazioni.

### 2.2.4.3 Metalli pesanti

Sono stati analizzati i seguenti elementi, espressi in  $\text{mg kg}^{-1}$  di sostanza secca: bario, cadmio e zinco.

La mineralizzazione dei campioni è stata effettuata su circa 0,45 g di sostanza secca, mediante un sistema di digestione a microonde opportunamente programmato, aggiungendo a 9 ml di  $\text{HNO}_3$ , 3 ml di  $\text{HCl}$ .

Al termine della mineralizzazione i campioni sono stati filtrati e portati a un volume finale di 25 ml utilizzando acqua ultrapura. Gli acidi impiegati sono tutti rigorosamente ultrapuri.

Le concentrazioni del **bario** e dello **zinco** sono state determinate mediante spettrofotometria ad emissione atomica al plasma (Varian ICP-720ES; All.A2-VII) seguendo il metodo EPA 6010C (2007).

La determinazione del **cadmio** è stata effettuata mediante spettroscopia di assorbimento atomico in fornetto di grafite (Varian SpectrAA-240Z. All. A2-VIII), secondo la procedura EPA 7010 (2007).

L'accuratezza delle procedure di digestione e di analisi dei campioni è stata verificata impiegando i materiali standard di riferimento (LGC 6137 o MESS-3).

I recuperi percentuali ottenuti rispetto ai valori certificati dei suddetti materiali sono riportati in Tab. 2-VI.

Tutti i parametri strumentali sono stati inoltre ottimizzati tramite una risposta tipica strumentale conforme a quella fornita dalla casa costruttrice.

I limiti di rilevabilità strumentale e della metodica per i metalli determinati, relativamente alla strumentazione impiegata, sono riportati in Tab 2-VII.

**Tab. 2-VI** - Recuperi percentuali ottenuti sui materiali certificati LGC 6137, tranne il mercurio per il quale è stato usato MESS-3.

| Ba  | Cd | Zn  |
|-----|----|-----|
| 122 | 78 | 108 |

**Tab. 2-VII** - Limiti di quantificazione espressi in  $\text{mg kg}^{-1}$ . La seconda riga si riferisce alle rette dedicate allo studio di basse concentrazioni.

| Bario  | Cadmio | Zinco  |
|--------|--------|--------|
| 1,3888 | 0,0111 | 1,3888 |
| 0,2500 | 0,0111 | 0,2500 |

## 2.2.5. ECOTOSSICOLOGIA DEI SEDIMENTI

### 2.2.5.1 *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 (2004). Il saggio consiste nell'esposizione di una quantità definita di clone algale in condizioni di crescita esponenziale a diverse diluizioni di campione (nella fattispecie elutriato) 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).

Preparazione degli elutriati - L'elutriato è stato preparato secondo il metodo ICRAM (2001), utilizzando come acqua di lavorazione il medium preparato secondo le specifiche riportate nella norma UNI EN ISO 10253:2000 (2000).

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

Espressione e analisi dei dati – I risultati del saggio sono stati riportati come percentuale di inibizione della crescita algale e, qualora la tossicità del campione lo consenta, in termini di  $\text{EC}_{50}$  o  $\text{EC}_{20}$ . L' $\text{EC}_{50}$  e l' $\text{EC}_{20}$  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 sono stati suddivisi nelle seguenti categorie:

- *assenza di effetto*: percentuale di inibizione/stimolazione < 20% e 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<sub>20</sub> (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<sub>50</sub>, è stato confrontato con i dati della carta di controllo del laboratorio, il cui intervallo è compreso tra 6,2 e 8,9 mg l<sup>-1</sup> come cromo; altri parametri che devono essere rispettati affinché il test sia considerato valido sono:

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

### **2.2.5.2 *Vibrio fischeri* (sistema Microtox®)**

Preparazione delle matrici - La fase solida è stata ottenuta per centrifugazione refrigerata (30 min. a 3.500 rpm a 4°C), con successiva ri-omogenizzazione.

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

Il sistema Microtox® è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di questa specie. Poiché in presenza di contaminanti

l'emissione di luce diminuisce, la misura dell'eventuale inibizione della bioluminescenza, a seguito dell'esposizione del batterio a una sostanza nota o a un campione naturale di acqua o sedimento, consente di valutare il grado di tossicità acuta della sostanza o della matrice testata.

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

Procedura adottata e lettura dei dati - I saggi biologici sulla fase solida sono stati completati entro 24 h dalla preparazione della matrice.

L'emissione della bioluminescenza è stata misurata all'interno del luminometro M500, dotato di pozzetti termostatati a 15°C per i controlli e i campioni e a 4°C per il reagente. E' stato applicato il protocollo Solid Phase Test (SPT) con la procedura Large Sample Method (Azur Environmental, 1994), organizzato con 9-12 diluizioni e 3 controlli, a seconda della granulometria del campione. Il test prevede una prima esposizione di 20' durante i quali i batteri si trovano a diretto contatto con il sedimento e una seconda fase di ulteriori 10' in cui la risospensione batterica viene incubata nel luminometro a 15°C.

La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione - inibizione della bioluminescenza, è stata elaborata mediante un software dedicato (Microtox Omni™ v. 1.16), che consente di individuare l'EC<sub>50</sub> (o qualunque altra EC), ossia la concentrazione del campione cui corrisponde una riduzione della bioluminescenza pari al 50% o, in alternativa, la semplice variazione percentuale di emissione di luce rispetto al controllo. Il risultato è stato espresso sia in TU (Unità Tossiche = 100/EC<sub>50</sub>), che consente di ottenere una relazione diretta fra tossicità e riduzione della bioluminescenza, sia come Sediment Toxicity Index (S.T.I.), che permette di esprimere la reale tossicità acuta del campione rispetto alla tossicità "naturale" di un campione di riferimento avente le medesime caratteristiche granulometriche (Onorati *et al.*, 1999; Onorati *et al.*, 2007).

Poiché il test in fase solida viene effettivamente applicato sulla frazione granulometrica <1 mm e poiché la componente naturale della tossicità è funzione della frazione pelitica, al fine di esprimere il risultato del saggio nella scala S.T.I. sono state utilizzate le analisi granulometriche dei campioni di sedimento per

individuare la proporzione tra le due frazioni citate, indispensabile per la valutazione del reale livello di tossicità acuta.

E' stata adottata la scala di tossicità (Tab. 2-VIII) indicata nella Tab. 1 del Manuale ICRAM-APAT (2007). La fase solida è stata giudicata tossica quando il valore di S.T.I è risultato  $> 3$ .

**Tab. 2-VIII** - Scala di tossicità adottata per il saggio Microtox<sup>®</sup>.

| Specie Test                        | Colonna A<br>Tossicità assente<br>/trascurabile | Colonna B<br>Tossicità<br>presente | Colonna C<br>Tossicità<br>elevata | Colonna D<br>Tossicità<br>molto elevata |
|------------------------------------|---|------------------------------------|-----------------------------------|---|
| <i>Vibrio fischeri</i> (sedimento) | S.T.I. $\leq 3$                                 | $3 < \text{S.T.I.} \leq 6$         | $6 < \text{S.T.I.} \leq 12$       | S.T.I. $> 12$                           |

### 2.2.5.3 *Corophium orientale*

Il saggio effettuato con esemplari di *Corophium orientale* (fig. 2.7) è stato allestito secondo il protocollo ISO 16712:2005(E) (2005).

Il principio del saggio biologico “a breve termine” (di tossicità acuta) consiste nell'esposizione di un numero stabilito di organismi per 10 gg al sedimento tal quale, con la finalità di stimare la percentuale di mortalità degli organismi stessi.

Gli anfipodi sono campionati setacciando il loro sedimento nativo con setaccio a maglia di 0,5 mm, che permette di selezionare organismi di ~4 mm idonei per il test, scartando gli individui maturi e le forme giovanili. Gli anfipodi selezionati sono quindi stati portati in laboratorio e acclimatati alle seguenti condizioni del test:

- Temperatura dell'acqua:  $16 \pm 2^\circ\text{C}$
- Salinità:  $36 \pm 2\%$
- Illuminazione: continua
- O<sub>2</sub> disciolto nell'acqua sovrastante il sedimento:  $>60\%$ .



**Fig. 2.7** - Esemplari di *C. orientale*

Procedimento del saggio - Circa 200 cc di sedimento da testare sono stati introdotti all'interno di un barattolo di vetro da 1 lt, ai quali sono stati aggiunti circa 750 cc di acqua di mare naturale filtrata. Per ogni campione sono state allestite 4 repliche. Dopo 24 h sono stati immessi 25 individui in ciascun barattolo. Come sedimento di controllo è stato utilizzato il sedimento nativo proveniente da un sito non contaminato. I barattoli contenenti gli organismi sono stati coperti per ridurre l'evaporazione dell'acqua, posti alla temperatura di  $16\pm 2^{\circ}\text{C}$  e areati in continuo.

Dopo 10 gg è stato vagliato il contenuto di ogni barattolo contando gli organismi ancora vivi. Sono stati considerati morti gli anfipodi che, dopo una delicata stimolazione, non mostravano alcun movimento degli arti. La sensibilità degli organismi (96hLC50) è stata determinata tramite l'esposizione per 96 h alle concentrazioni di 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4  $\text{mg l}^{-1}$   $\text{CdCl}_2$ .

All'inizio e alla fine del saggio biologico sono stati misurati i seguenti parametri dell'acqua sovrastante il sedimento: pH, salinità,  $\text{NH}_4^+$  e ossigeno disciolto.

Elaborazione dei dati - Il saggio biologico è considerato valido quando la mortalità media all'interno del sedimento di controllo è  $\leq 15\%$  e quando la mortalità nella singola replica per l'intero periodo di esposizione è  $\leq 20\%$ . Sia nei campioni da testare che nel sedimento di controllo sono state calcolate le percentuali medie ( $\pm$  dev. st.) degli anfipodi morti. La percentuale di mortalità rilevata in ogni campione è stata confrontata con quella nel sedimento di controllo. Il livello di tossicità è stato valutato prendendo in considerazione la percentuale di mortalità degli organismi osservata nei campioni da saggiare, corretta con la formula di Abbott (M). La scala adottata per la quantificazione della tossicità è riportata in Tab. 2-IX.

**Tab. 2-IX** – Scala di tossicità relativa al test con *C. orientale*.

| Tossicità a lungo termine | Giudizio |
|---------------------------|----------|
| $M < 15\%$                | Assente  |
| $15\% < M \leq 30\%$      | Bassa    |
| $30\% < M \leq 60\%$      | Media    |
| $M > 60\%$                | Alta     |

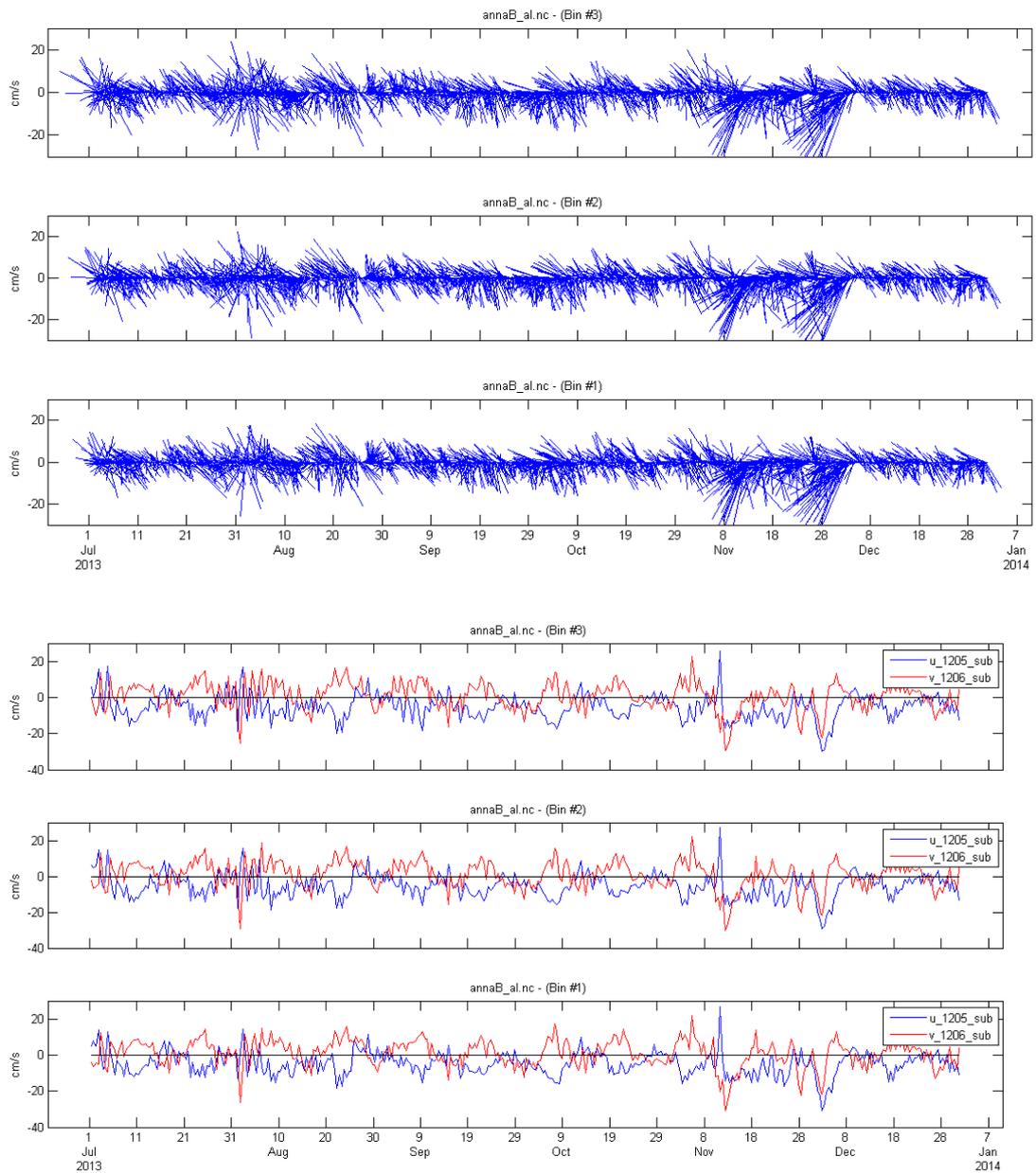
### **3. RISULTATI**

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

Durante il periodo preso in considerazione (01/07 - 31/12/2013) le correnti sono risultate sostanzialmente di direzione costante verso SW e verso NW (figg. 3.1 e 3.2). L'intensità della corrente è apparsa abbastanza costante e di modesta intensità, con un valore medio di circa 13 cm/s. Durante l'intero periodo di osservazione, la velocità della corrente è risultata mediamente superiore (intorno ai 18-20 cm/s) nei cinque bin più vicini alla superficie (da -10 m). In agosto e novembre sono stati osservati brevi periodi caratterizzati da un leggero aumento della velocità su tutta la colonna d'acqua, corrispondente a una lieve rotazione verso NW del flusso della corrente, con punte fino a 25 cm/s.

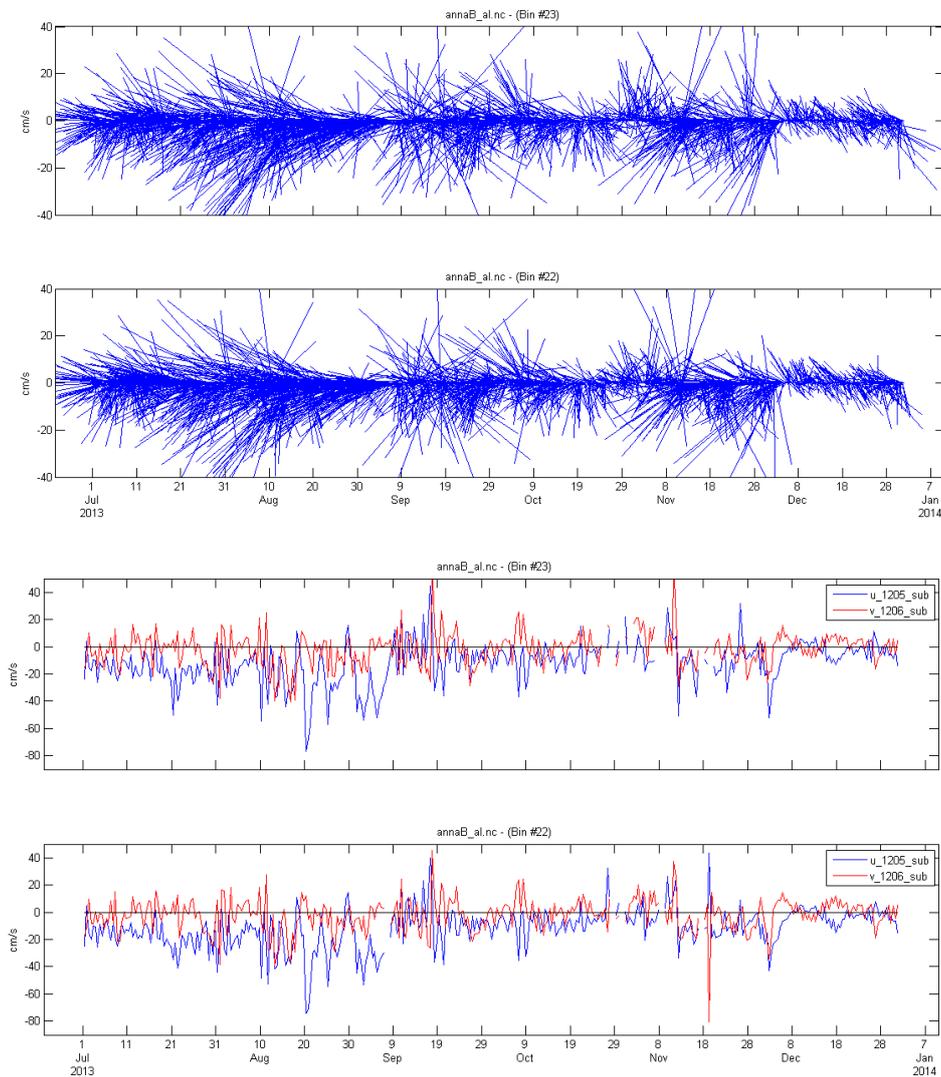
La temperatura misurata dal correntometro durante il periodo ha presentato un andamento crescente e un picco tra novembre e dicembre, coerentemente con le misure dell'anno precedente (Fabi *et al.*, 2014b). In corrispondenza del massimo di temperatura è stato registrato un aumento importante di velocità della corrente sostanzialmente in quasi tutti i bin, in maniera più marcata in quelli profondi.

## Fondo da 48m a 54m (fondo)

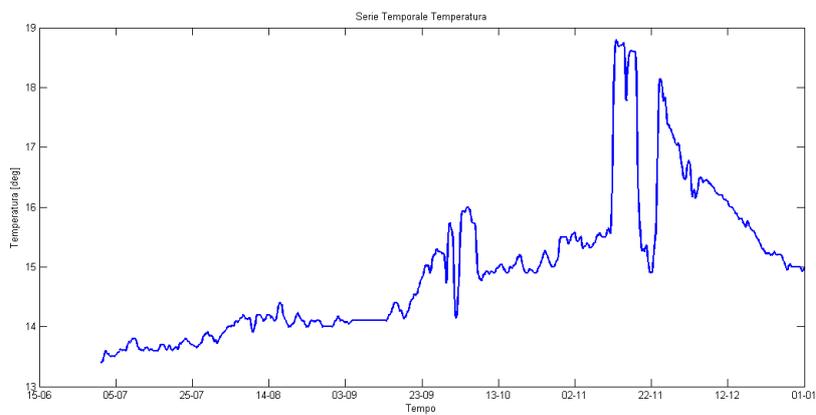


**Fig. 3.1** - Stickplot della corrente (medie giornaliere) sul fondo. Linea rossa: Est positivo e Ovest negativo; linea blu: Nord positivo e Sud negativo.

## Superficie da 6m a 8m (superficie)



**Fig. 3.2** - Stickplot della corrente (medie giornaliere) vicino alla superficie. Linea rossa: Est positivo e Ovest negativo; linea blu: Nord positivo e Sud negativo.



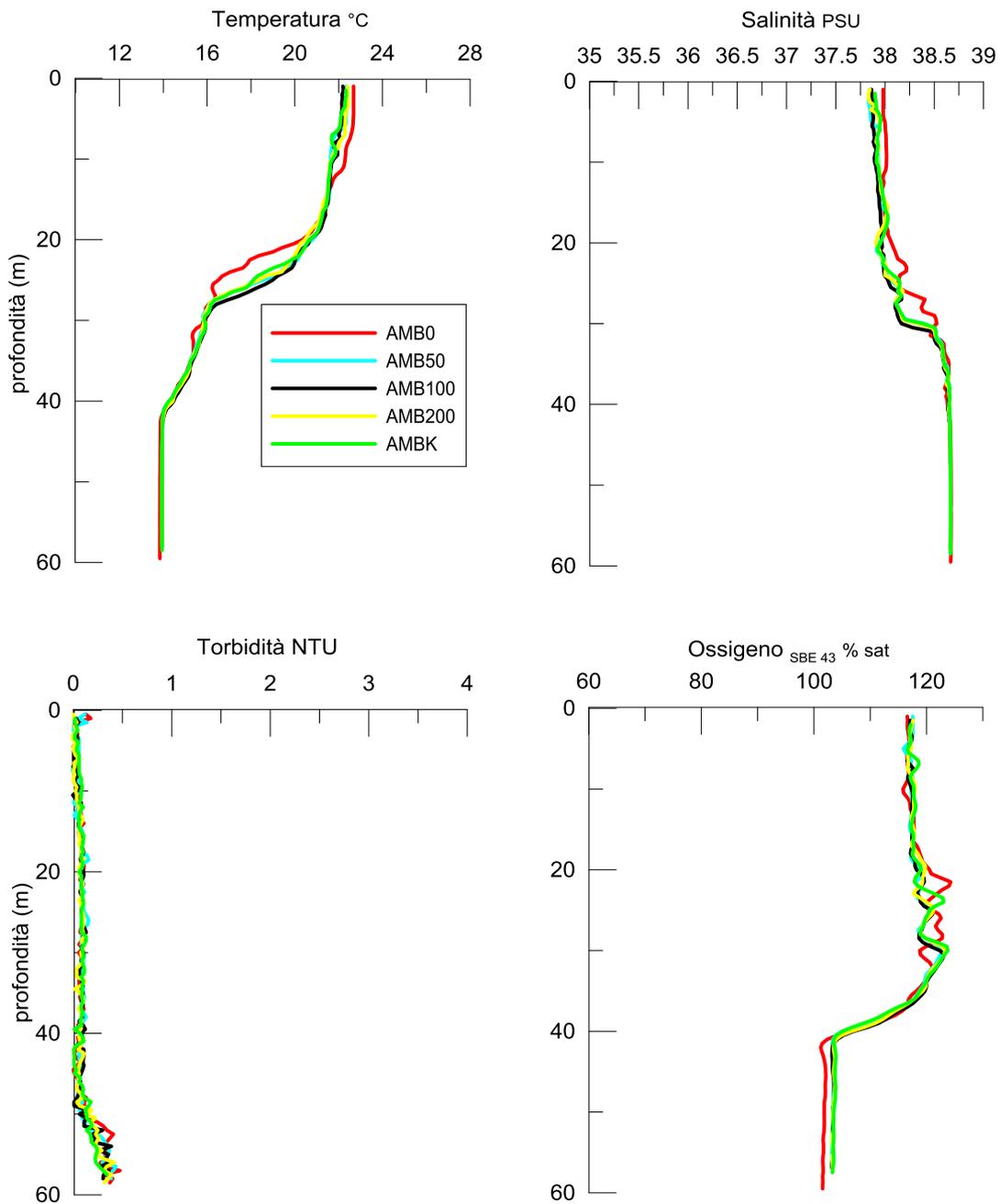
**Fig. 3.3** - Andamento della temperatura registrata a 54 m di profondità (media mobile 36 ore).

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

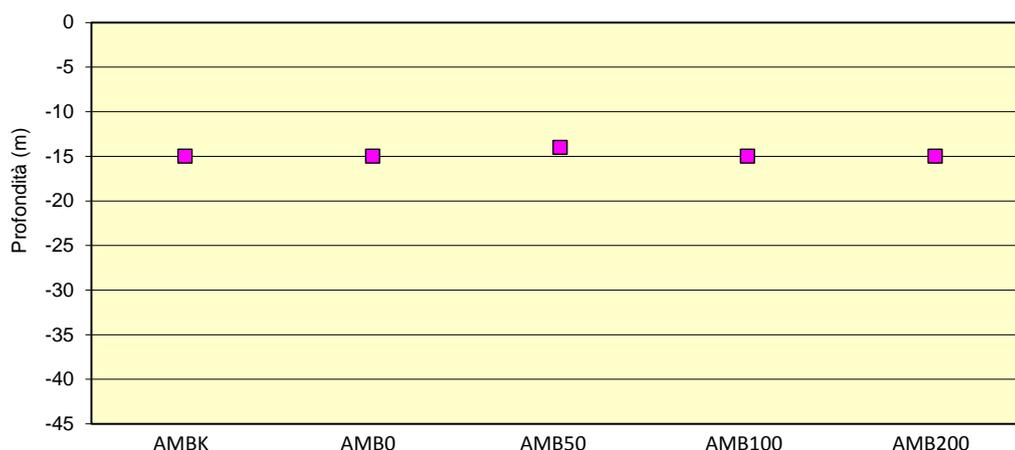
### **3.2.1. TEMPERATURA, SALINITÀ, TORBIDITÀ, OSSIGENO DISCIOLTO E TRASPARENZA**

Nel monitoraggio condotto nell'agosto 2013 (fig. 3.4) si è potuta notare la presenza di un doppio termoclino, il primo posto a circa 30 m e ben marcato, il secondo posto a 40 m di profondità. I valori di temperatura oscillavano da 22°C alla superficie a 16°C a 30 m, per poi diminuire gradualmente fino a 14°C intorno a 40 m senza ulteriori variazioni fino al fondo. Il profilo di salinità ha presentato valori attorno a 37,7-38,0 psu sino a circa 20-25 m di profondità e un aumento a 38,7 psu verso i 25-30 m, dopo il quale non si sono avuti altri cambiamenti. L'andamento della torbidità è risultato costante dalla superficie fino a 50 m (~ 0,1 NTU) per poi aumentare leggermente sul fondo sino a 0,3 NTU. Il profilo di ossigeno disciolto ha presentato valori intorno al 120% di saturazione dalla superficie fino a 30 m. La percentuale di saturazione è quindi scesa gradualmente al 100% fino a 40 m ed è poi rimasta costante.

La trasparenza misurata mediante disco Secchi (fig. 3.5) ha evidenziato valori omogenei in tutti i siti (14-15 m).



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



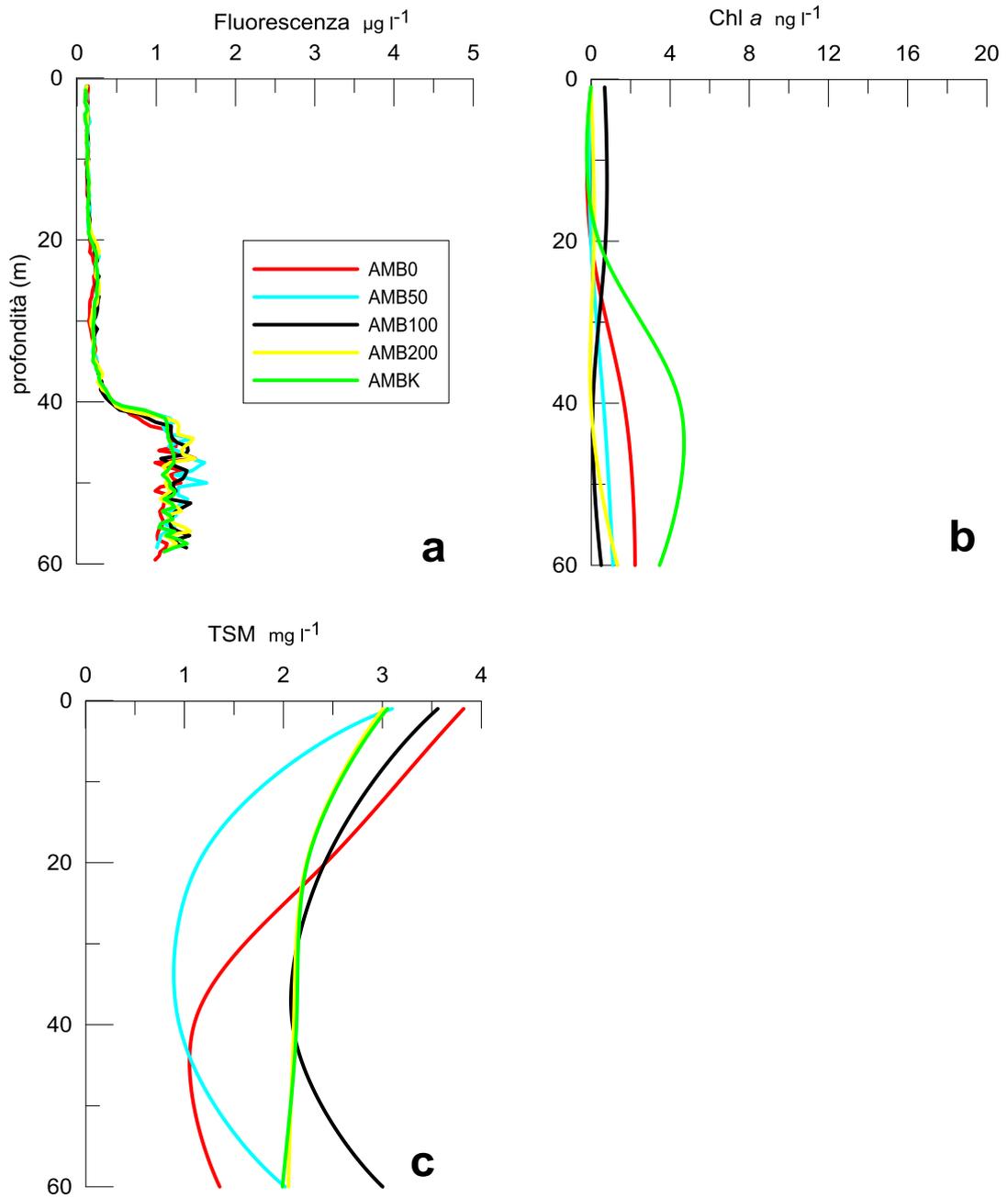
**Fig. 3.5** - Trasparenza della colonna d'acqua misurata mediante disco Secchi lungo il transetto NW-SE nel survey effettuato nell'agosto 2013.

### 3.2.2. FLUORESCENZA INDOTTA, CLOROFILLA A E TSM

Le concentrazioni di clorofilla *a*, misurate come fluorescenza indotta nell'agosto 2013 (fig. 3.6a), hanno presentato valori costanti ( $0,1-0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ ) dalla superficie fino a 40 m e simile in tutte le stazioni. Al di sotto di tale quota, verso i 43 m, è stato registrato un incremento repentino che ha portato a concentrazioni di  $1,5-2 \mu\text{g l}^{-1}$  senza altre variazioni verso il fondo.

La clorofilla *a*, misurata mediante HPLC (fig. 3.6b), è risultata minima su tutte le stazioni fino alla quota dei 20 m, dove si sono osservati valori di  $0,1-1,5 \text{ ng l}^{-1}$ . Al di sotto dei 20 m solo le stazioni AMB0 e, soprattutto, AMBK hanno mostrato un leggero incremento raggiungendo rispettivamente i valori di  $2,2 \text{ ng l}^{-1}$  e  $3,5 \text{ ng l}^{-1}$ .

I valori di TSM, misurato con metodo gravimetrico (fig. 3.6c), sono risultati intorno a  $3-3,8 \text{ mg l}^{-1}$  alla quota superficiale di tutte le stazioni, con un decremento costante fino alla quota di 40 m e un aumento sul fondo dove si sono registrati valori compresi tra  $1,5 \text{ mg l}^{-1}$  (AMB0) e  $3 \text{ mg l}^{-1}$  (AMB100).



**Fig. 3.6** - Profili di a) fluorescenza ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ), b) clorofilla *a* ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) e c) Total Suspended Matter ( $\text{mg l}^{-1}$ ). Agosto 2013.

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

I risultati relativi ai livelli di Idrocarburi totali (C<sub>5</sub>-C<sub>40</sub>) determinati nei campioni prelevati nell'estate 2013 (Tab. 3-I) confermano la totale assenza di questi composti organici come già evidenziato a partire dall'estate 2010 (Fabi *et al.*, 2011b; 2014b).

**Tab. 3-I** - Idrocarburi totali ricercati nell'estate 2013 in corrispondenza delle quattro quote di ciascuna stazione utilizzata per le indagini fisiche e chimiche della colonna d'acqua. 10 µg l<sup>-1</sup> = limite di quantificazione. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

| Stazione | Quota      | Idrocarburi totali |
|----------|------------|--------------------|
| AMBK     | Superficie | < 10               |
|          | -20        | < 10               |
|          | -40        | < 10               |
|          | Fondo      | < 10               |
| AMB0     | Superficie | < 10               |
|          | -20        | < 10               |
|          | -40        | < 10               |
|          | Fondo      | < 10               |
| AMB50    | Superficie | < 10               |
|          | -20        | < 10               |
|          | -20        | < 10               |
|          | Fondo      | < 10               |
| AMB100   | Superficie | < 10               |
|          | -20        | < 10               |
|          | -40        | < 10               |
|          | Fondo      | < 10               |
| AMB200   | Superficie | < 10               |
|          | -20        | < 10               |
|          | -40        | < 10               |
|          | Fondo      | < 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  $K_2Cr_2O_7$  (10,0 mg  $l^{-1}$  come cromo) sono rientrati nei limiti della carta di controllo intra-laboratorio (5 – 16,0 mg  $l^{-1}$ ); 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 stabilito per il metodo di coltura ottimale (fattore  $\geq 16$ ).

Risultati del saggio - I risultati del saggio applicato ai campioni sono riportati in Tab. 3-II, contestualmente ai principali parametri di contorno misurati.

**Tab 3-II** - Parametri di contorno e risultati relativi al saggio di tossicità con *D. tertiolecta* nei campioni di acqua prelevati nell'estate 2013. I valori negativi della % di effetto indicano effetto stimolante. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

| Stazione | Quota      | pH   | % Effetto campione tal quale | EC50 % | Intervallo fiduciale 95% | EC20 % | Intervallo fiduciale 95% | Giudizio                       |
|----------|------------|------|------------------------------|--------|--------------------------|--------|--------------------------|--------------------------------|
| AMBK     | Superficie | 8,23 | -1%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | -20        | 8,31 | -7%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | -40        | 8,20 | -5%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | fondo      | 8,22 | -5%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
| AMBO     | Superficie | 8,27 | -21%                         | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Presenza effetto eutrofizzante |
|          | -20        | 8,29 | -25%                         | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Presenza effetto eutrofizzante |
|          | -40        | 8,31 | -21%                         | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Presenza effetto eutrofizzante |
|          | fondo      | 8,26 | -19%                         | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
| AMB50    | Superficie | 8,22 | -15%                         | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | -20        | 8,26 | -11%                         | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | -40        | 8,24 | 2%                           | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | fondo      | 8,35 | -6%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
| AMB100   | Superficie | 8,22 | 7%                           | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | -20        | 8,26 | -1%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | -40        | 8,27 | 4%                           | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | fondo      | 8,11 | -7%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
| AMB200   | Superficie | 8,19 | -9%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | -20        | 8,33 | 3%                           | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | -40        | 8,23 | -3%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |
|          | fondo      | 8,19 | -1%                          | n.c.   | n.c.                     | n.c.   | n.c.                     | Assenza di effetto             |

Nel complesso, rispetto all'inverno 2013 (Fabi *et al.*, 2015), è stato osservato un aumento del numero di campioni contraddistinti da sostanziale assenza di tossicità

(17 campioni contro i 16 dell'inverno); tali campioni hanno presentato percentuali d'effetto comprese tra -19% (AMB0, fondo) e 7% (AMB100, superficie). I restanti 3 campioni, tutti relativi al sito AMB0, hanno evidenziato risposte comprese tra -21% e -25%, risultando capaci di biostimolare la crescita algale.

### 3.3.2. *VIBRIO FISCHERI*

QA-QC – I valori EC<sub>50</sub> (0,83 mg l<sup>-1</sup> e di 0,47 mg l<sup>-1</sup> rispettivamente a 5' e 15') con la sostanza di riferimento (Cu<sup>++</sup>) sono rientrati nel range di riferimento relativo al test Microtox® (0,42–1,16 mg l<sup>-1</sup> e 0,03–0,75 mg l<sup>-1</sup> rispettivamente) UNICHIM (Onorati et al., 2007).

Risultati del saggio - I risultati del test hanno dimostrato l'assenza di tossicità acuta in tutti i campioni. In Tab. 3-III sono riportati i risultati del test, mentre in Tab. 3-IV è indicata la relativa stima di tossicità.

**Tab. 3-III** - Risultati del saggio biologico con il *V. fischeri* applicato ai campioni di acqua marina prelevati nell'estate 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 | -0,02          | -2,01                                     | 1,97  | <0,05           | -0,02    | -0,98                                     | 0,94  | <0,05      |
|          | -20 m      | -0,04          | -0,61                                     | 0,53  | <0,05           | -0,12    | -0,67                                     | 0,43  | <0,05      |
|          | -40 m      | -0,49          | -1,03                                     | 0,05  | <0,05           | 0,08     | -0,43                                     | 0,59  | <0,05      |
|          | Fondo      | -0,54          | -1,01                                     | -0,07 | <0,05           | 0,09     | -0,40                                     | 0,57  | <0,05      |
| AMB0     | Superficie | 8,41           | 6,64                                      | 10,19 | <0,05           | 11,06    | 8,31                                      | 13,81 | <0,05      |
|          | -20 m      | 8,31           | 6,50                                      | 10,12 | <0,05           | 13,61    | 11,63                                     | 15,60 | <0,05      |
|          | -40 m      | 2,63           | -0,84                                     | 6,09  | <0,05           | 4,62     | -1,50                                     | 10,74 | <0,05      |
|          | Fondo      | 9,40           | 7,92                                      | 10,88 | <0,05           | 10,88    | 6,12                                      | 15,66 | <0,05      |
| AMB50    | Superficie | 5,73           | 1,86                                      | 9,61  | <0,05           | 8,78     | 5,72                                      | 11,83 | <0,05      |
|          | -20 m      | 3,42           | 0,51                                      | 6,32  | <0,05           | 3,23     | 0,33                                      | 6,13  | <0,05      |
|          | -40 m      | -0,49          | -6,31                                     | 5,33  | <0,05           | -1,99    | -4,49                                     | 0,51  | <0,05      |
|          | Fondo      | -0,26          | -1,81                                     | 1,30  | <0,05           | -0,24    | -2,64                                     | 2,15  | <0,05      |
| AMB100   | Superficie | 0,07           | -1,87                                     | 2,01  | <0,05           | 0,34     | -1,12                                     | 1,80  | <0,05      |
|          | -20 m      | 0,01           | -2,57                                     | 2,60  | <0,05           | -0,02    | -2,60                                     | 2,56  | <0,05      |
|          | -40 m      | -0,48          | -2,67                                     | 1,70  | <0,05           | -0,32    | -2,49                                     | 1,86  | <0,05      |
|          | Fondo      | 1,44           | -4,37                                     | 1,50  | <0,05           | -1,87    | -4,75                                     | 1,01  | <0,05      |
| AMB200   | Superficie | 0,21           | -1,93                                     | 2,35  | <0,05           | 0,25     | -1,01                                     | 1,51  | <0,05      |
|          | -20 m      | 0,60           | -1,33                                     | 2,53  | <0,05           | -0,66    | -1,11                                     | -0,21 | <0,05      |
|          | -40 m      | -1,83          | -2,62                                     | -1,03 | <0,05           | -2,54    | -3,57                                     | -1,51 | <0,05      |
|          | Fondo      | 0,26           | -1,01                                     | 1,53  | <0,05           | 0,17     | -1,43                                     | 1,76  | <0,05      |

**Tab. 3-IV** - Stima di tossicità relativa al saggio biologico con *V. fischeri* effettuato nell'estate 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               |

### 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 rispetto all'end point sopravvivenza sono riportati in Tab. 3-V.

Non è stato evidenziato alcun effetto tossico nei confronti della sopravvivenza del crostaceo *T. fulvus*.

**Tab. 3-V** - Risultati del saggio biologico condotto con *Tigriopus fulvus* sui campioni di acqua marina prelevati nel corso dell'estate 2013. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

| Stazione         | Quota      | $\Delta\%$ sopravvissuti vs controllo $\pm$ d.s. | T test | Giudizio          |
|------------------|------------|--|--------|-------------------|
| <b>Controllo</b> | ---        | 100,0 $\pm$ 0,0                                  | ---    | ----              |
| AMBK             | Superficie | 100,0 $\pm$ 0,0                                  | n.d.   | Tossicità assente |
|                  | -20 m      | 100,0 $\pm$ 0,0                                  | n.d.   | Tossicità assente |
|                  | -40 m      | 97,1 $\pm$ 1,99                                  | p>0,05 | Tossicità assente |
|                  | Fondo      | 100,0 $\pm$ 0,0                                  | n.d.   | Tossicità assente |
| AMB0             | Superficie | 100,0 $\pm$ 0,0                                  | n.d.   | Tossicità assente |
|                  | -20 m      | 100,0 $\pm$ 0,0                                  | n.d.   | Tossicità assente |
|                  | -40 m      | 96,0 $\pm$ 1,25                                  | p>0,05 | Tossicità assente |
|                  | Fondo      | 100,0 $\pm$ 0,0                                  | n.d.   | Tossicità assente |
| AMB50            | Superficie | 95,0 $\pm$ 0,0                                   | 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      | 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 |

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

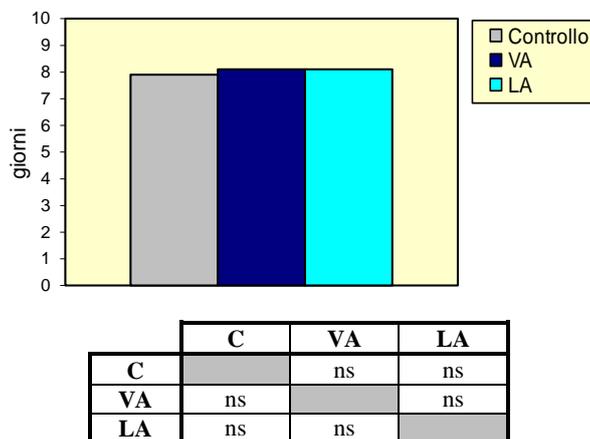
#### 3.4.1. BIOMARKERS

In Tab. 3-VI sono riportati i valori dei biomarkers analizzati nei mitili prelevati vicino (VA) e lontano (LA) dall'anodo di sacrificio della piattaforma Anna Maria B e nel sito di controllo nell'estate 2013.

**Tab. 3-VI** - Valori medi dei biomarker ( $\pm$  dev.std.) determinati nei mitili campionati nell'estate 2013 nei siti di controllo, vicino (VA) e lontano (LA) dall'anodo di sacrificio di Annamaria B.

| Biomarker            | Unità di misura                      | Controllo        | VA               | LA               |
|----------------------|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Stress on Stress     | LT50 (gg)                            | 7,9              | 8,1              | 8,1              |
| Stabilità lisosmiale | min                                  | 40,0 $\pm$ 5,5   | 29,0 $\pm$ 2,5   | 25,5 $\pm$ 4,0   |
| Lipidi neutri        | densità ottica / pixels <sup>2</sup> | 23424 $\pm$ 2730 | 29852 $\pm$ 3820 | 27205 $\pm$ 4732 |
| Lipofuscine          | densità ottica / pixels <sup>2</sup> | 8239 $\pm$ 321   | 8216 $\pm$ 213   | 8111 $\pm$ 341   |
| Metallotioneine      | $\mu$ g MT/g                         | 99,0 $\pm$ 12,5  | 142,8 $\pm$ 11,0 | 141,6 $\pm$ 5,2  |
| Test della Cometa    | % di coda DNA                        | 3,0 $\pm$ 1,0    | 4,5 $\pm$ 0,5    | 4,1 $\pm$ 0,5    |

**Stress on stress** - I mitili prelevati presso la piattaforma Annamaria B nell'estate 2013 hanno presentato una sopravvivenza all'aria, misura dello stress on stress, di 8,1 gg in entrambi i siti, risultando statisticamente comparabili agli esemplari di controllo (7,9 gg; fig. 3.7).



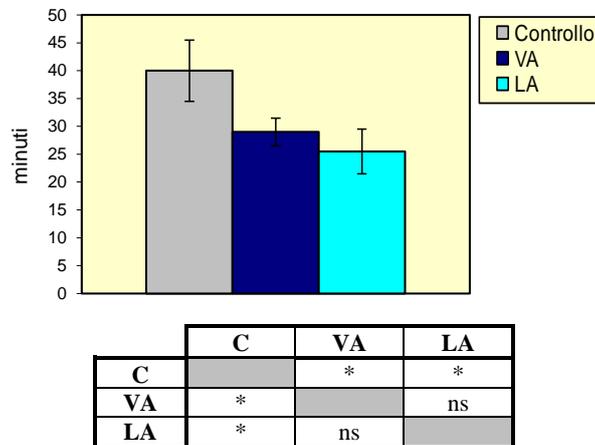
**Fig. 3.7** - Distribuzione dei tempi di sopravvivenza all'aria riscontrati negli esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nel corso dell'estate 2013 e confronto statistico (test Kaplan-Meier,  $p < 0,05$ ). VA = vicino all'anodo di sacrificio; LA = lontano dall'anodo di sacrificio.

Ciò porta a confermare una scarsa alterazione a livello fisiologico nei bivalvi esaminati. Le risposte osservate sono risultate simili, e in alcuni casi superiori, a quelle relative a risultati di studi analoghi condotti su altre piattaforme estrattive come PCMS-1 (Fabi *et al.*, 2005a), Calipso (Fabi *et al.*, 2006; Gomiero *et al.*, 2011;

2015), Naide (Fabi *et al.*, 2014c), Clara Nord (Fabi *et al.*, 2010c) e Clara Est (Fabi *et al.*, 2010d).

**Stabilità delle membrane lisosomiali** - Nell'estate 2013 si sono evidenziati tempi medi di destabilizzazione compresi tra  $25,5 \pm 4,0$  min e  $40,0 \pm 5,5$  min osservati rispettivamente presso LA e al controllo. Rispetto agli organismi di riferimento, entrambi i siti della piattaforma hanno presentato un leggero ma significativo incremento della fragilità lisosomiale (Anova,  $p < 0,05$ ). Tale tendenza tende a confermare quanto osservato nel corso delle precedenti campagne di studio (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015).

Comunque, nel complesso i tempi di destabilizzazione sono confrontabili con quelli riportati per organismi in buono stato di salute (Donini *et al.*, 2007); 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 (Fabi *et al.*, 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gomiero *et al.*, 2011; 2015) e ad altre aree dell'alto Adriatico (Petrovic *et al.*, 2004) e inferiori a quelli riportati da Gorbi *et al.*, (2008) ma ottenuti con una differente metodologia d'analisi.



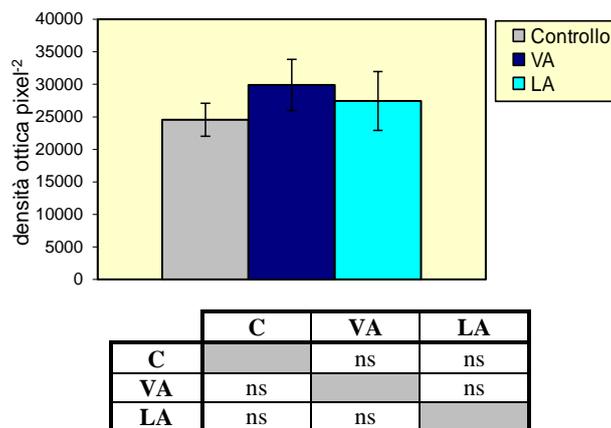
**Fig. 3.8** - Valori medi dei tempi di destabilizzazione espressi in min ( $\pm$  ds) e associati alla fragilità dei lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nel corso dell'estate 2013 e confronto statistico (test Anova,  $p < 0,05$ ). VA = vicino all'anodo di sacrificio; LA = lontano dall'nodo di sacrificio.

**Valutazione del contenuto di lipidi neutri** - La distribuzione dei livelli di lipidi neutri ha evidenziato nell'estate 2013 valori compresi tra  $23424 \pm 2730$  unità di densità ottica/pixel nel sito di controllo e  $29852 \pm 3820$  unità di densità ottica/pixel dei mitili prelevati presso il sito VA, statisticamente omogenei (fig. 3.9),

analogamente ai periodi di monitoraggio precedente (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015).

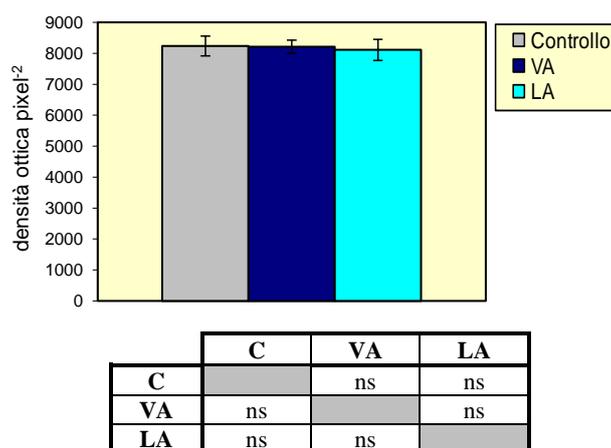
La distribuzione di valori finora osservati tende ad escludere l'aumento delle alterazioni biologiche associate alla sintesi dei lipidi nell'organismo indotta dalla presenza di sostanze xeno-biotiche biodisponibili quali i composti organici, sostanze capaci di alterare il normale metabolismo lipidico di un organismo marino. Il contenuto lipidico totale della ghiandola digestiva è, infatti, costituito per circa l'80% da lipidi neutri insaturi. Allo stesso modo, è stato osservato che in organismi esposti a contaminanti organici (PCB, IPA, diossine) vi è un incremento sostanziale dell'accumulo di lipidi neutri associati a lisosomi secondari.

Confrontando i risultati ottenuti con la più recente letteratura si evidenzia che le risposte ottenute appaiono nella norma e assimilabili a organismi soggetti a una bassa pressione antropica (Fabi *et al.*, 2006; 2010c; 2010d; Gorbi *et al.*, 2008; Gomiero *et al.*, 2011, 2015).



**Fig. 3.9** - Valori medi di accumulo di lipidi neutri ( $\pm$  ds) espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nel corso dell'estate 2013 e confronto statistico (test Anova,  $p < 0,05$ ). VA = vicino all'anodo di sacrificio; LA = lontano dall'nodo di sacrificio.

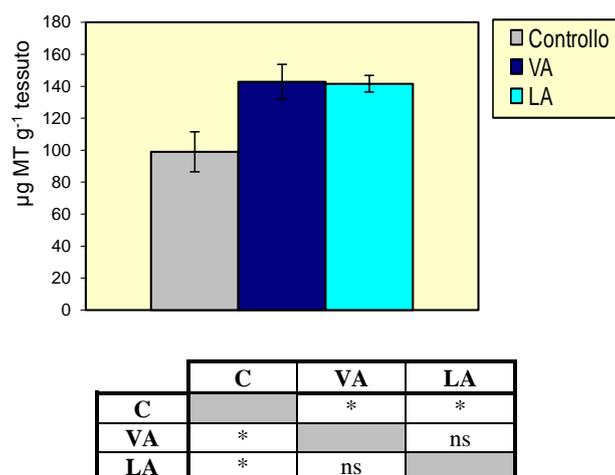
**Valutazione del livello di lipofuscine** - I livelli di lipofuscine evidenziati nei mitili prelevati nell'estate 2013 sono risultati compresi tra  $8111 \pm 341$  del sito LA e  $8239 \pm 321$  unità di densità ottica/pixel del sito di controllo. In nessun caso si sono evidenziati incrementi significativi dei livelli di accumulo di lipofuscine (fig. 3.10), analogamente a quanto evidenziato sin dall'inverno 2012 (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015).



**Fig. 3.10** - Valori medi di accumulo di lipofuscine ( $\pm$  ds) espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nel corso dell'estate 2013 e confronto statistico (test Anova,  $p < 0,05$ ). VA = vicino all'anodo di sacrificio; LA = lontano dall'nodo di sacrificio.

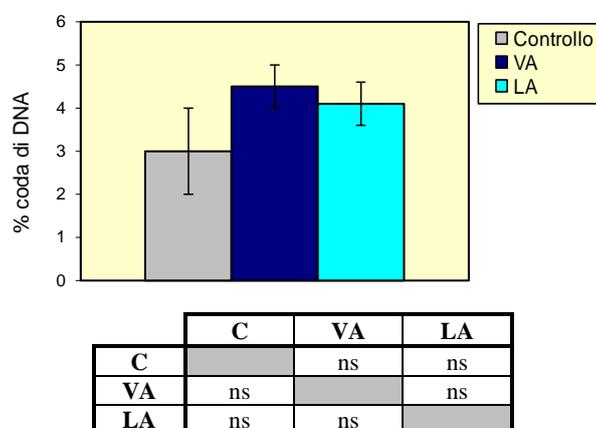
Nel complesso i livelli medi assunti dal parametro non portano, quindi, a ipotizzare alcuna criticità correlabile alla presenza di stress perossidativo a carico degli organismi analizzati. I livelli ottenuti, confrontati con quanto riportato in letteratura, sono inferiori a quelli evidenziati in aree costiere in Adriatico settentrionale (Petrovic *et al.*, 2004) o su analoghe piattaforme (Fabi *et al.*, 2006; 2010c; 2010d; Gorbi *et al.*, 2008; Gomiero *et al.*, 2015).

**Metallotioneine** - I livelli medi rilevati nell'estate 2013 hanno confermato incrementi significativi di proteine metallo-chelanti in entrambi i siti della piattaforma rispetto al controllo (fig. 3.11). Una risposta biologica simile con livelli superiori presso entrambi i siti della piattaforma era già stata osservata nelle stagioni estive del 2011 e 2012 e nell'inverno 2013 (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015). Quanto evidenziato tende pertanto a confermare una significativa, seppur moderata, risposta biologica alla presenza di metalli pesanti nei mitili prelevati dalla struttura. Le risposte biologiche finora rilevate rimangono comunque più contenute rispetto a quanto osservato presso altre piattaforme metanifere dell'Adriatico settentrionale quali Naomi-Pandora (Fabi *et al.*, 2005b), Calipso (Fabi *et al.*, 2006; Gomiero *et al.*, 2011) e Naide (Fabi *et al.*, 2014b).



**Fig. 3.11** - Concentrazioni di Metallothioneine ( $\pm$  ds) rilevate nella ghiandola digestiva di mitilo (*M. galloprovincialis*) prelevati nell'estate 2013 e confronto statistico (test Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). VA = vicino all'anodo di sacrificio; LA = lontano dall'nodo di sacrificio.

**Test della Cometa** - Il test della cometa (Comet assay) condotto per valutare l'integrità del DNA nei mitili prelevati presso entrambi i siti della piattaforma rispetto agli analoghi prelevati presso il controllo non ha evidenziato differenze significative tra i siti (fig. 3.12), analogamente a quanto riscontrato precedentemente eccetto l'inverno 2013, quando era stata riscontrata una differenza significativa tra controllo ed LA (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015). Tale risposta biologica rientra in quanto è spesso osservabile naturalmente in organismi nativi prelevati da aree marine e marino-costiere non soggette a significativa pressione antropica e non rappresenta, quindi, alcuna criticità ambientale (Klobučar *et al.*, 2008).



**Fig. 3.12** - Livello di danno al DNA ( $\pm$  ds) rilevato dal Test della Cometa negli emociti di esemplari di mitilo (*M. galloprovincialis*) prelevati nell'estate 2013 e confronto statistico (test Anova,  $p < 0,05$ ). VA = vicino all'anodo di sacrificio; LA = lontano dall'nodo di sacrificio.

### 3.4.2. METALLI PESANTI

L'analisi della distribuzione dei metalli pesanti evidenziata dagli organismi prelevati nell'estate 2013 tende a confermare l'accumulo di tutti i tre metalli ricercati (Ba, Zn e Cd) nei bivalvi provenienti dai due siti della piattaforma già osservato sin dal primo monitoraggio, con differenze significative tra questi e il controllo per tutti i tre metalli analizzati (Tabb. 3-VII e 3-VIII; fig. 3.13; Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015).

**Tab. 3-VII** - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Anna Maria B e nel sito di controllo nel survey condotto nell'estate 2013. Valori espressi in mg/kg p.s. ( $\pm$  ds). VA = vicino all'anodo di sacrificio; LA = lontano dall'anodo di sacrificio.

|    | Controllo       | VA              | LA              |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|
| Zn | 112,5 $\pm$ 0,5 | 135,2 $\pm$ 0,5 | 141,0 $\pm$ 0,5 |
| Cd | 0,17 $\pm$ 0,02 | 0,29 $\pm$ 0,02 | 0,42 $\pm$ 0,02 |
| Ba | 0,55 $\pm$ 0,05 | 2,75 $\pm$ 0,05 | 3,95 $\pm$ 0,05 |

**Tab. 3-VIII** – Risultati dei confronti statistici relativi alla distribuzione dei metalli pesanti nei siti della piattaforma Anna Maria B rispetto al controllo (test U - Mann-Whitney). \* =  $p < 0,05$ ; ns = non significativo.

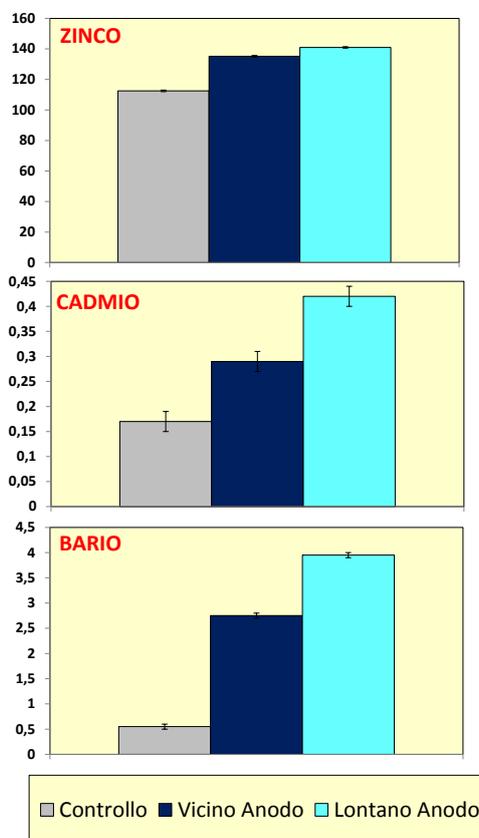
| Zinco |   |    |    |
|-------|---|----|----|
|       | C | VA | LA |
| C     |   | *  | *  |
| VA    | * |    | *  |
| LA    | * | *  |    |

| Cadmio |   |    |    |
|--------|---|----|----|
|        | C | VA | LA |
| C      |   | *  | *  |
| VA     | * |    | *  |
| LA     | * | *  |    |

| Bario |   |    |    |
|-------|---|----|----|
|       | C | VA | LA |
| C     |   | *  | *  |
| VA    | * |    | *  |
| LA    | * | *  |    |

Inoltre, sono sempre state rilevate differenze significative anche tra i due siti della piattaforma, con accumuli maggiori in LA. Nel complesso l'elemento maggiormente accumulato è risultato lo zinco, seguito da bario e cadmio. Nel complesso, comunque, le concentrazioni rilevate sono in linea con quelle riportate in un precedente studio pluriennale condotto da Fattorini *et al.* (2008) e mirato a valutare la biodisponibilità di metalli pesanti evidenziata da 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.*, (2005a; 2005b; 2006; 2010c; 2010d; 2014b) presso varie piattaforme offshore.



**Fig. 3.13** - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nell'estate 2013. Valori espressi in mg/kg p.s. ( $\pm$  ds). VA = vicino all'anodo di sacrificio; LA = lontano dall'nodo di sacrificio.

### 3.4.3. IDROCARBURI TOTALI

Analogamente a quanto rilevato precedentemente (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015), anche nell'estate 2013 è stata evidenziata una somma di idrocarburi (C5-C40) inferiore a 0,1 mg/kg p.s. in tutti siti, indicando uno scarso accumulo di tale classe di composti organici (Tab. 3-IX).

**Tab. 3-XI** - Distribuzione degli idrocarburi totali rilevati nei tessuti di mitili (media  $\pm$  dev.std) prelevati presso la piattaforma Anna Maria B nell'estate 2013. Valori espressi in mg/kg p.s. n.c. = non calcolabile.

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

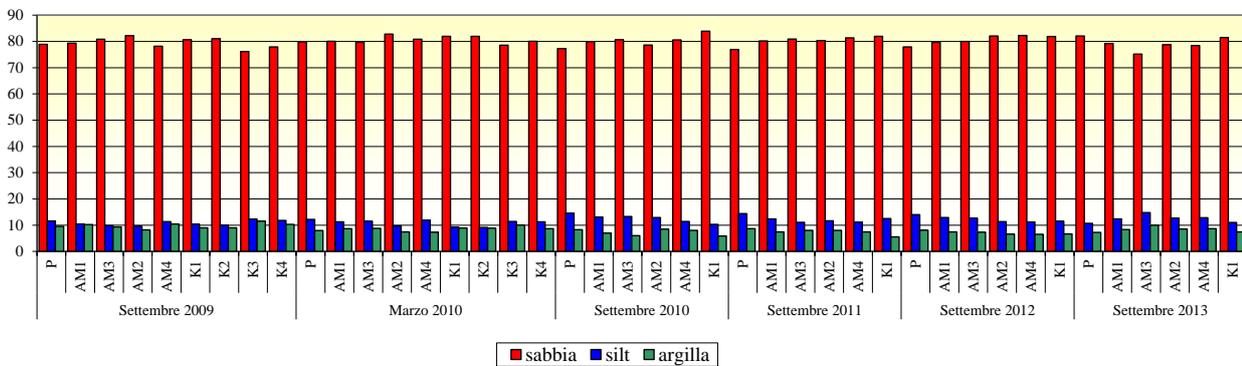
### 3.5. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DEI SEDIMENTI

#### 3.5.1. GRANULOMETRIA

All'analisi visiva i sedimenti campionati nell'estate 2013 apparivano costituiti in prevalenza dalla frazione sabbiosa, con presenza di abbondante biodetrito conchifero.

L'analisi granulometrica (fig. 3.14; Tab. 3-XII) ha confermato un'elevata omogeneità tra i campioni analizzati, tutti classificabili come sabbia secondo la classificazione di Sheppard (All. B). Tale componente è infatti risultata ovunque la più abbondante, seguita nell'ordine da quella siltosa e dall'argilla, in quantità decisamente inferiori.

Rispetto al monitoraggio precedente è stato notato un leggero aumento della sabbia in corrispondenza della piattaforma a scapito sia del silt che dell'argilla, e un decremento di sabbia in AM2, AM3 e AM4 a vantaggio di entrambe le altre componenti.



**Fig. 3.14** - Composizione percentuale delle principali classi granulometriche dei sedimenti analizzati nei due monitoraggi condotti durante i lavori di installazione (settembre 2009 e marzo 2010) e in quelli effettuati dopo la fine dei lavori (settembre 2010, settembre 2011, settembre 2012 e settembre 2013). P = piattaforma Annamaria B. Il campionamento dei controlli K2-K4 non è stato previsto nella fase di post lavori.

**Tab. 3-XII** - Composizione percentuale delle principali classi granulometriche dei sedimenti analizzati durante i lavori di installazione (settembre 2009 e marzo 2010) e dopo la fine dei lavori (settembre 2010, settembre 2011, settembre 2012 e settembre 2013). Il sito in corrispondenza della piattaforma è evidenziato in rosso. Il campionamento dei controlli K2-K4 non è stato previsto nella fase di post lavori.

|          | Survey durante lavori di installazione |              |             |              |              |             | Survey post lavori di installazione |              |             |                |              |             |                |              |             |                |              |             |
|----------|--|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------------------------------|--------------|-------------|----------------|--------------|-------------|----------------|--------------|-------------|----------------|--------------|-------------|
|          | Settembre 2009                         |              |             | Marzo 2010   |              |             | Settembre 2010                      |              |             | Settembre 2011 |              |             | Settembre 2012 |              |             | Settembre 2013 |              |             |
|          | Sabbia                                 | Pelite       |             | Sabbia       | Pelite       |             | Sabbia                              | Pelite       |             | Sabbia         | Pelite       |             | Sabbia         | Pelite       |             | Sabbia         | Pelite       |             |
| Silt     |  | Argilla      | Silt        |              | Argilla      | Silt        |                                     | Argilla      | Silt        |                | Argilla      | Silt        |                | Argilla      | Silt        |                | Argilla      |             |
| <b>P</b> | <b>78,91</b>                           | <b>11,59</b> | <b>9,50</b> | <b>79,90</b> | <b>12,17</b> | <b>7,94</b> | <b>77,24</b>                        | <b>14,51</b> | <b>8,25</b> | <b>76,94</b>   | <b>14,37</b> | <b>8,70</b> | <b>77,92</b>   | <b>13,99</b> | <b>8,09</b> | <b>82,09</b>   | <b>10,70</b> | <b>7,21</b> |
| AM1      | 79,35                                  | 10,45        | 10,20       | 80,05        | 11,29        | 8,65        | 79,92                               | 13,08        | 6,99        | 80,17          | 12,37        | 7,46        | 79,69          | 12,87        | 7,44        | 79,24          | 12,40        | 8,35        |
| AM2      | 82,22                                  | 9,58         | 8,20        | 82,80        | 9,74         | 7,46        | 78,65                               | 12,92        | 8,44        | 80,36          | 11,63        | 8,01        | 82,07          | 11,36        | 6,57        | 78,74          | 12,70        | 8,56        |
| AM3      | 80,84                                  | 9,85         | 9,31        | 79,72        | 11,48        | 8,79        | 80,67                               | 13,30        | 6,03        | 80,93          | 11,07        | 8,00        | 80,03          | 12,65        | 7,32        | 75,22          | 14,81        | 9,97        |
| AM4      | 78,20                                  | 11,35        | 10,45       | 80,85        | 11,85        | 7,30        | 80,56                               | 11,39        | 8,04        | 81,37          | 11,17        | 7,46        | 82,28          | 11,23        | 6,49        | 78,47          | 12,86        | 8,66        |
| K1       | 80,64                                  | 10,36        | 9,00        | 81,94        | 9,16         | 8,90        | 83,88                               | 10,28        | 5,84        | 81,93          | 12,52        | 5,55        | 81,87          | 11,49        | 6,64        | 81,52          | 11,04        | 7,44        |
| K2       | 81,05                                  | 9,95         | 9,00        | 81,98        | 9,14         | 8,88        |                                     |              |             |                |              |             |                |              |             |                |              |             |
| K3       | 76,16                                  | 12,29        | 11,55       | 78,60        | 11,38        | 10,02       |                                     |              |             |                |              |             |                |              |             |                |              |             |
| K4       | 77,89                                  | 11,82        | 10,29       | 80,05        | 11,29        | 8,65        |                                     |              |             |                |              |             |                |              |             |                |              |             |

### 3.5.2. METALLI PESANTI

In Tab. 3-XIII e in fig. 3.15 sono riportate le concentrazioni dei tre metalli analizzati rilevate nelle stagioni estive del 2010-2013.

**Bario** - Come già osservato nel 2010 e nel 2011, anche nel 2013 le concentrazioni di bario, eccetto presso la struttura, non sono apparse particolarmente elevate in valore assoluto, ma sensibilmente maggiori nei siti circostanti la piattaforma (tranne AM2) rispetto al controllo. In corrispondenza della piattaforma questo metallo ha invece raggiunto un picco pari a circa 15 volte il tenore registrato in K1 e decisamente superiore anche alle concentrazioni rilevate a 60 m di distanza da essa. Presso Annamaria B il bario si è ridotto rispetto all'estate 2010, ma è notevolmente incrementato rispetto al 2011 e 2012. Questo dato indica un effetto della piattaforma sulla dinamica del metallo.

Un altro segno di alterazione rilevato nel primo survey aveva riguardato AM4, i cui contenuti di bario sono diminuiti nel 2011 mantenendosi poi pressoché costanti pur rimanendo sempre maggiori rispetto al controllo.

AM2 ha sempre presentato, eccetto nell'estate 2012, concentrazioni inferiori a K1. Anche il sito AM1 ha conservato nel tempo tenori modesti e ha mostrato variazioni contenute. Tuttavia, nel 2013 e soprattutto nel 2012 ha presentato un tenore maggiore rispetto al controllo.

Infine, il sito AM3 ha mostrato nel tempo un andamento altalenante, esibendo un deciso incremento tra il 2010 e il 2011, un decremento consistente nel 2012 e un nuovo incremento nel 2013 quando, pur non avendo raggiunto il massimo registrato nel 2011, ha tuttavia presentato una concentrazione pari a oltre 5 volte quella del controllo.

Complessivamente, i dati suggeriscono un effetto della struttura su questo metallo.

**Cadmio** - In generale, le concentrazioni di cadmio sono sempre apparse modeste. Nell'ultimo survey, analogamente a quanto osservato nel 2010 e 2011, è stata riscontrata una certa disomogeneità nella distribuzione del metallo, con concentrazioni superiori in piattaforma, AM2 e AM4 rispetto al controllo.

Nel 2011 era stato registrato un decremento diffuso, continuato in piattaforma anche nel 2012. Nelle altre stazioni incluso il controllo, invece, era stato osservato un aumento delle concentrazioni che comunque apparivano omogenee. Nell'ultimo campionamento è avvenuto un ulteriore incremento che ha coinvolto questa volta anche la piattaforma. Le variazioni sin qui descritte sono da considerare modeste, poiché, come già detto, in termini assoluti i valori sono molto bassi. Tuttavia, i valori rilevati presso la struttura, AM2 e AM4 potrebbero indicare uno stato di alterazione che va valutato con i prossimi survey.

**Zinco** - Anche lo zinco ha presentato tenori modesti per tutta la durata dello studio. Il picco di maggiore interesse e presumibilmente riconducibile alla presenza della piattaforma è stato registrato nel 2010 nel sito P (65,46 mg/kg), pari a 2,5 volte la concentrazione rilevata in K1 (25,54 mg/kg).

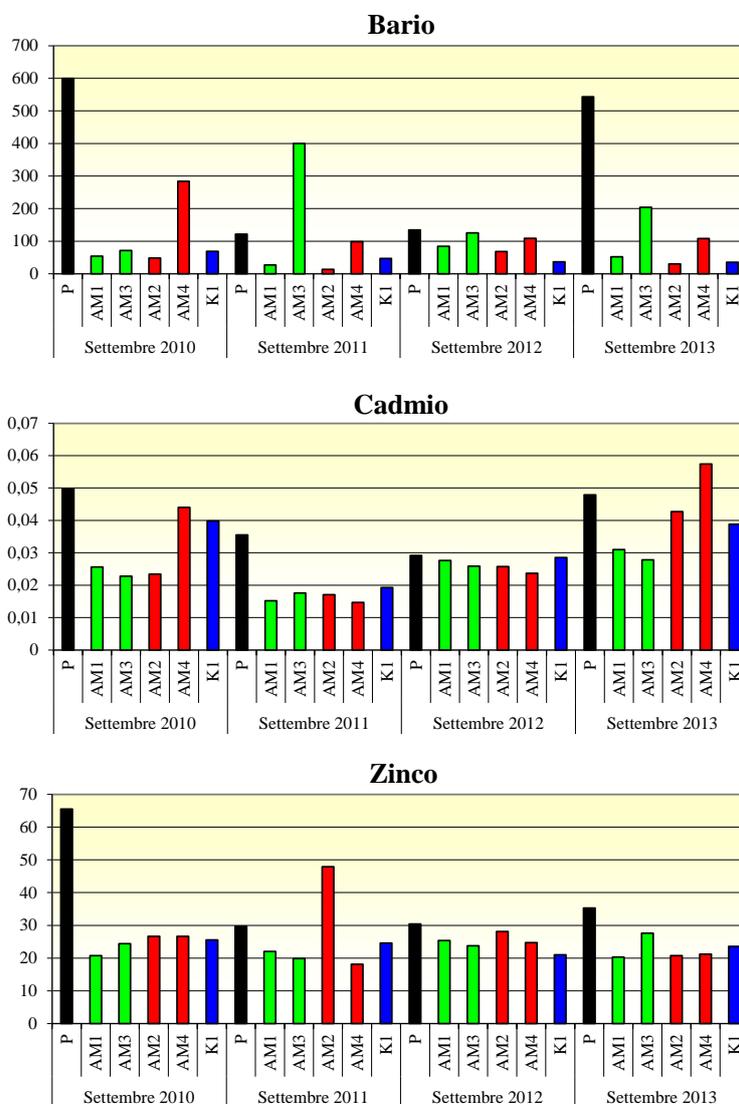
Tale picco non è stato più rilevato nei survey successivi durante i quali, tuttavia, le concentrazioni in P sono risultate leggermente superiori a rinvenute in K1 (fino a un massimo di 1,5 volte nel 2013).

Per quanto riguarda le altre stazioni, è da rilevare l'incremento registrato in AM2 nel 2011, che non è stato confermato nelle campagne successive.

Complessivamente, pertanto, le condizioni registrate nel 2013 nell'area intorno ad Annamaria B sono da considerare paragonabili a quelle del controllo.

**Tab. 3-XIII** – Contenuto di metalli pesanti in mg/kg determinato nei sedimenti campionati dopo le operazioni di installazione della piattaforma Annamaria B. Questi composti non sono stati ricercati nei sedimenti prelevati durante le campagne in corso d'opera. P = Piattaforma.

|          | Settembre 2010 |               |              | Settembre 2011 |               |              | Settembre 2012 |               |              | Settembre 2013 |               |              |
|----------|----------------|---------------|--------------|----------------|---------------|--------------|----------------|---------------|--------------|----------------|---------------|--------------|
|          | Bario          | Cadmio        | Zinco        |
| <b>P</b> | <b>3373,6</b>  | <b>0,0498</b> | <b>65,46</b> | <b>121,50</b>  | <b>0,0355</b> | <b>29,73</b> | <b>134,22</b>  | <b>0,0292</b> | <b>30,44</b> | <b>543,31</b>  | <b>0,0479</b> | <b>35,27</b> |
| AM1      | 54,29          | 0,0256        | 20,73        | 27,00          | 0,0152        | 22,05        | 84,40          | 0,0276        | 25,38        | 52,28          | 0,0310        | 20,30        |
| AM2      | 48,08          | 0,0234        | 26,61        | 13,28          | 0,0171        | 47,90        | 68,38          | 0,0258        | 28,12        | 30,21          | 0,0427        | 20,75        |
| AM3      | 71,32          | 0,0228        | 24,40        | 399,59         | 0,0176        | 19,86        | 125,31         | 0,0259        | 23,73        | 204,25         | 0,0278        | 27,57        |
| AM4      | 283,95         | 0,0440        | 26,67        | 98,19          | 0,0147        | 18,15        | 109,00         | 0,0237        | 24,71        | 107,82         | 0,0574        | 21,21        |
| K1       | 69,08          | 0,0398        | 25,54        | 46,67          | 0,0193        | 24,57        | 36,56          | 0,0285        | 20,98        | 35,48          | 0,0388        | 23,55        |



**Fig. 3.15** – Contenuto di metalli pesanti in mg/kg determinato nei sedimenti campionati dopo le operazioni di installazione della piattaforma Annamaria B. Questi composti non sono stati ricercati nei sedimenti prelevati durante le campagne in corso d'opera. P = Piattaforma.

### 3.5.3. IDROCARBURI TOTALI

Nell'estate 2013 gli idrocarburi totali hanno presentato valori bassi in tutte le stazioni, ma con un picco in corrispondenza di Annamaria B (70 mg/kg), pari a 7 volte la concentrazione del controllo (Tab. 3-XIV; fig. 3.16).

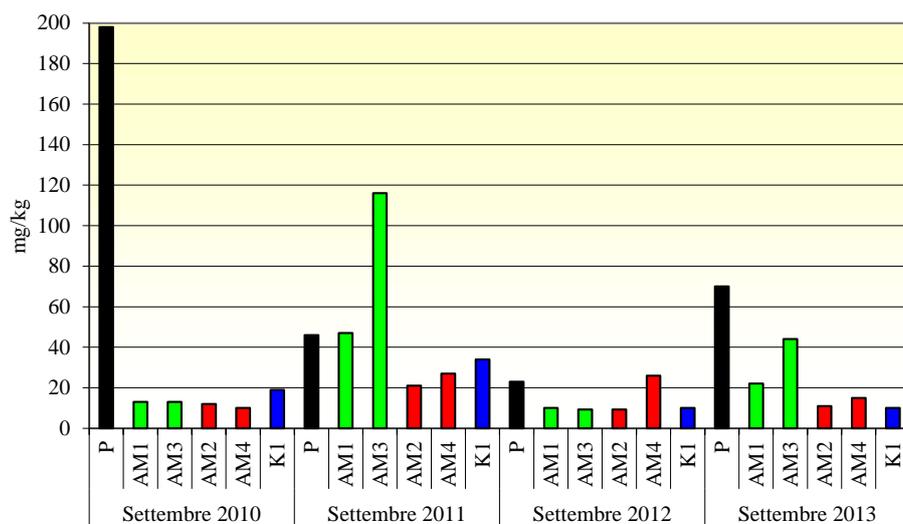
Rispetto al 2012 è avvenuto un aumento in tutti i siti entro 60 m dalla piattaforma eccetto AM4, piuttosto consistente presso la struttura e meno presso AM3, AM1 e, soprattutto, AM2.

Il picco più elevato dell'intero periodo è stato registrato in corrispondenza della struttura nell'estate 2010, seguito da quello in AM3 nel 2011, non più verificatisi in seguito. Tuttavia, è da evidenziare che nell'ultimo survey i valori maggiori sono stati rilevati proprio in questi due siti.

Mentre i dati del 2012 indicavano l'assenza di contaminazione dell'area da idrocarburi, quelli del 2013 sembrano invece indicare una leggera alterazione che andrà valutata successivamente.

**Tab. 3-XIV** – Idrocarburi totali (mg kg<sup>-1</sup> s.s.) rilevati nei sedimenti campionati dopo le operazioni di installazione della piattaforma Annamaria B. Questi composti non sono stati ricercati nei sedimenti prelevati durante le campagne in corso d'opera. P = sito della piattaforma.

|                  | <b>P</b>              | <b>AM1</b> | <b>AM2</b> | <b>AM3</b> | <b>AM4</b> | <b>K1</b> |
|------------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
|                  | <b>Settembre 2010</b> |            |            |            |            |           |
| Idrocarburi C>12 | 198                   | 13         | 12         | 13         | 10         | 19        |
| Idrocarburi C<12 | < 0,5                 | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5     |
| <b>TOTALE</b>    | <b>198</b>            | <b>13</b>  | <b>12</b>  | <b>13</b>  | <b>10</b>  | <b>19</b> |
|                  | <b>Settembre 2011</b> |            |            |            |            |           |
| Idrocarburi C>12 | 46                    | 47         | 21         | 116        | 27         | 34        |
| Idrocarburi C<12 | < 0,5                 | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5     |
| <b>TOTALE</b>    | <b>46</b>             | <b>47</b>  | <b>21</b>  | <b>116</b> | <b>27</b>  | <b>34</b> |
|                  | <b>Settembre 2012</b> |            |            |            |            |           |
| Idrocarburi C>12 | 23                    | 10         | 9          | 9          | 26         | 10        |
| Idrocarburi C<12 | < 0,5                 | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5     |
| <b>TOTALE</b>    | <b>23</b>             | <b>10</b>  | <b>9</b>   | <b>9</b>   | <b>26</b>  | <b>10</b> |
|                  | <b>Settembre 2013</b> |            |            |            |            |           |
| Idrocarburi C>12 | 70                    | 22         | 11         | 44         | 15         | 10        |
| Idrocarburi C<12 | < 0,5                 | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5      | < 0,5     |
| <b>TOTALE</b>    | <b>70</b>             | <b>22</b>  | <b>11</b>  | <b>44</b>  | <b>15</b>  | <b>10</b> |



**Fig. 3.16** – Idrocarburi totali ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) rilevati nei sedimenti campionati dopo le operazioni di installazione della piattaforma Annamaria B. Questi composti non sono stati ricercati nei sedimenti prelevati durante le campagne in corso d'opera. P = sito posto in corrispondenza della struttura.

### 3.6. ECOTOSSICOLOGIA DEI SEDIMENTI

Si ricorda che, analogamente a quanto previsto dal Programma di Monitoraggio Transfrontaliero per le indagini chimiche e fisiche sui sedimenti nella fase di produzione della piattaforma, anche quelle ecotossicologiche devono essere effettuate una sola volta l'anno durante la stagione estiva. Nella fase di installazione erano stati invece condotti due survey, uno nel settembre 2009 e uno nel marzo 2010.

#### 3.6.1. *DUNALIELLA TERTIOLECTA*

QA-QC – Il test eseguito come controllo positivo con  $K_2Cr_2O_7$  (7,0 mg/l come cromo) è rientrato nei limiti della carta di controllo intralaboratorio (6,5 – 18,4 mg/l) e i coefficienti di variazione tra le repliche nei campioni non diluiti, alla massima concentrazione, sono risultati conformi perché in tutti i casi inferiori al 20%. La crescita algale nei controlli è sempre risultata superiore rispetto al limite minimo consentito (fattore  $\geq 16$ ).

Risultati del saggio - I risultati del saggio applicato ai campioni prelevati nell'estate 2013 sono riportati in Tab. 3-XV, contestualmente ai principali parametri di contorno misurati. Non è stato rilevato alcun effetto tossico in nessuno dei campioni analizzati. Tutti i campioni hanno infatti evidenziato solo un significativo effetto biostimolante ( $p < 0,05$ ) rispetto alla crescita misurata nei rispettivi controlli eseguiti con acqua marina artificiale.

**Tab 3-XV** - Parametri di contorno e risultati relativi al saggio di tossicità con *D. tertiolecta* nei campioni prelevati nell'estate 2013. Valori negativi della percentuale di effetto indicano effetto stimolante. In rosso il sito corrispondente ad Annamaria B

| campione | pH   | S    | % effetto/biostimolazione | EC <sub>50</sub> | Giudizio                            |
|----------|------|------|---------------------------|------------------|-------------------------------------|
| P        | 8,11 | 32,1 | -9                        | n.c.             | Effetto eutrofizzante significativo |
| AM1      | 8,19 | 33,0 | -3                        | n.c.             | Effetto eutrofizzante significativo |
| AM2      | 8,24 | 34,0 | -4                        | n.c.             | Effetto eutrofizzante significativo |
| AM3      | 8,15 | 33,0 | -12                       | n.c.             | Effetto eutrofizzante significativo |
| AM4      | 8,23 | 33,0 | -18                       | n.c.             | Effetto eutrofizzante significativo |
| K1       | 8,21 | 32,0 | -19                       | n.c.             | Effetto eutrofizzante significativo |

Confronto con i monitoraggi precedenti - Il confronto con i dati ottenuti nel periodo di indagine relativo alla fase di installazione della piattaforma può essere effettuato solo per 3 siti (P, AM3 e K1) poiché era stato previsto un piano di campionamento differente rispetto a quello del post lavori. In questi tre siti non sono state osservate variazioni temporali, essendo stato sempre e ovunque evidenziato un effetto eutrofizzante significativo (Tab. 3-XVI).

Per quanto concerne le altre stazioni monitorate durante la fase di produzione della piattaforma, dopo i miglioramenti evidenziati nel 2011 in AM2 e AM1 la situazione è rimasta invariata nei due anni successivi.

**Tab. 3-XVI** - Risultati relativi al saggio di tossicità con *D. tertiolecta* nei campioni prelevati nel settembre 2009 e nel marzo 2010 durante i lavori di messa in opera della piattaforma e nei quattro survey sinora condotti nella fase di produzione. In rosso il sito corrispondente ad Annamaria B.

| campione | Durante lavori di installazione     |                                     | Fase di produzione                  |                                     |                                     |                                     |
|----------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|          | Settembre 2009                      | Marzo 2010                          | Settembre 2010                      | Settembre 2011                      | Settembre 2012                      | Settembre 2013                      |
| P        | Effetto eutrofizzante significativo |
| AM1      | -                                   | -                                   | Assenza di effetto                  | Effetto eutrofizzante significativo | Effetto eutrofizzante significativo | Effetto eutrofizzante significativo |
| AM2      | -                                   | -                                   | Lieve presenza di effetto tossico   | Effetto eutrofizzante significativo | Effetto eutrofizzante significativo | Effetto eutrofizzante significativo |
| AM3      | Effetto eutrofizzante significativo |
| AM4      |                                     | -                                   | Effetto eutrofizzante significativo | Effetto eutrofizzante significativo | Effetto eutrofizzante significativo | Effetto eutrofizzante significativo |
| K1       | Effetto eutrofizzante significativo |

### 3.6.2. *VIBRIO FISCHERI*

QA-QC I valori EC<sub>50</sub> a 5' (0,88 mg/l) e a 15' (0,47 mg/l) sono rientrati all'interno del range di riferimento relativo al test Microtox® (0,42–1,16 mg/l e 0,03–0,75 mg/l rispettivamente per il test a 5' e 15') come riportato dalla UNICHIM (Onorati *et al.*, 2007).

Risultati del saggio - L'assenza di inibizione della bioluminescenza nel saggio biologico Microtox® Solid-Phase relativo al survey condotto nell'estate 2013 ha dimostrato l'assenza di tossicità in tutti i campioni analizzati (Tab. 3-XVII).

Confronto con i survey precedenti - Non sono state riscontrate variazioni nei risultati di questo saggio ottenuti nel presente survey rispetto ai precedenti (Tab. 3-XVIII).

**Tab. 3-XVII** - Risultati del saggio biologico *Vibrio fischeri* relativo all'estate 2013 applicato al sedimento. In rosso è evidenziata la stazione campionata in corrispondenza di Annamaria B.

| campione | Sabbia <1mm (%) | Pelite (%)   | Soglia Tox Naturale (TU) | Tox Misurata (TU) | Range al 95% di confidenza(TU) |              | R <sup>2</sup> (%) | S.T.I.      | TOX            |
|----------|-----------------|--------------|--------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------|--------------------|-------------|----------------|
|          |                 |              |                          |                   |                                |              |                    |             |                |
| <b>P</b> | <b>79,65</b>    | <b>20,35</b> | <b>55,79</b>             | <b>17,43</b>      | <b>14,14</b>                   | <b>21,48</b> | <b>0,98</b>        | <b>0,31</b> | <b>Assente</b> |
| AM1      | 79,25           | 20,75        | 56,89                    | 6,03              | 2,78                           | 13,47        | 0,97               | 0,11        | Assente        |
| AM2      | 80,60           | 19,40        | 53,20                    | 19,26             | 16,48                          | 22,51        | 0,99               | 0,36        | Assente        |
| AM3      | 78,74           | 21,26        | 58,28                    | 14,54             | 13,47                          | 15,71        | 0,99               | 0,25        | Assente        |
| AM4      | 76,77           | 23,23        | 63,66                    | 6,47              | 3,66                           | 17,11        | 0,97               | 0,10        | Assente        |
| K1       | 75,22           | 24,78        | 67,89                    | 13,18             | 9,24                           | 18,64        | 0,97               | 0,19        | Assente        |

**Tab. 3-XVIII** - Confronto tra i livelli di tossicità stimati con il test Microtox® nei due monitoraggi condotti durante i lavori di installazione e perforazione dei pozzi di Annamaria B e in quelli effettuati dopo la messa in opera della struttura. In rosso il sito della piattaforma.

| campione | Durante i lavori di installazione |                | Durante la fase di produzione |                |                |                |
|----------|-----------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|          | Settembre 2009                    | Marzo 2010     | Settembre 2010                | Settembre 2011 | Settembre 2012 | Settembre 2013 |
| <b>P</b> | <b>Assente</b>                    | <b>Assente</b> | <b>Assente</b>                | <b>Assente</b> | <b>Assente</b> | <b>Assente</b> |
| AM1      | -                                 | -              | Assente                       | Assente        | Assente        | Assente        |
| AM2      | -                                 | -              | Assente                       | Assente        | Assente        | Assente        |
| AM3      | Assente                           | Assente        | Assente                       | Assente        | Assente        | Assente        |
| AM4      | -                                 | -              | Assente                       | Assente        | Assente        | Assente        |
| K1       | Assente                           | Assente        | Assente                       | Assente        | Assente        | Assente        |

### 3.6.3. COROPHIUM ORIENTALE

QA-QC – La sensibilità rilevata degli organismi verso il tossico di riferimento (CdCl<sub>2</sub>) LC 50=3,60 (LC=3,35 mg/l e UC=3,87 mg/l) è rientrata nella carta di controllo di laboratorio (1,28-4,48 mg/l).

In Tab. 3-XIX sono riportati i parametri (chimico-fisici) dell'acqua sovrastante il sedimento, registrati all'inizio e al termine del test.

**Tab. 3-XIX** – Parametri chimici e fisici dell'acqua sovrastante il sedimento testato osservati all'inizio e alla fine del test del monitoraggio effettuato nel survey condotto nell'estate 2013. In rosso è evidenziata la stazione posta in corrispondenza di Annamaria B.

| campione  | Inizio del test |              |             |  |                    | Fine del test |              |             |  |                    |
|-----------|-----------------|--------------|-------------|--|--------------------|---------------|--------------|-------------|--|--------------------|
|           | Temp. (°C)      | Salinità (%) | pH          | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> ) | O <sub>2</sub> (%) | Temp. (°C)    | Salinità (%) | pH          | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> ) | O <sub>2</sub> (%) |
| Controllo | 15 ± 1          | 36           | 8,19        | 0  | >85                | 15 ± 1        | 36           | 8,24        | 0,5  | >85                |
| <b>P</b>  |                 | <b>38</b>    | <b>8,10</b> | <b>0,5</b>   |                    |               | <b>37</b>    | <b>8,46</b> | <b>0,5</b>   |                    |
| AM1       |                 | 37           | 8,18        | 0  |                    |               | 37           | 8,31        | 0,5  |                    |
| AM2       |                 | 36           | 8,26        | 1  |                    |               | 37           | 8,41        | 0,5  |                    |
| AM3       |                 | 36           | 8,21        | 1  |                    |               | 36           | 8,36        | 0  |                    |
| AM4       |                 | 36           | 8,26        | 0,5  |                    |               | 37           | 8,46        | 0,5  |                    |
| K1        |                 | 36           | 8,31        | 0,5  |                    |               | 36           | 8,43        | 0  |                    |

Risultati del saggio: Nella Tab. 3-XX sono riportate le percentuali di mortalità degli organismi rilevati nel test di tossicità a breve termine e l'ulteriore stima della tossicità. Le percentuali degli organismi morti osservate dopo la loro esposizione ai sedimenti testati per 10 gg hanno dimostrato l'assenza di tossicità acuta per *C. orientale* in tutti i siti campionati.

**Tab. 3-XX** - Percentuali di mortalità degli organismi *C. orientale* osservati nel test di tossicità eseguito nell'estate 2013. In rosso è evidenziata la stazione corrispondente alla piattaforma.

| campione  | Numero degli organismi esposti | % degli organismi morti ( $\pm$ dev.st %) | % (corretta) degli organismi morti | Giudizio della tossicità |
|-----------|--------------------------------|---|------------------------------------|--------------------------|
| Controllo | 100                            | 0 $\pm$ 0                                 | 0                                  | Assente                  |
| <b>P</b>  | <b>100</b>                     | <b>5 <math>\pm</math> 3,83</b>            | <b>5</b>                           | <b>Assente</b>           |
| AM1       | 100                            | 7 $\pm$ 2,00                              | 7                                  | Assente                  |
| AM2       | 100                            | 5 $\pm$ 2,00                              | 5                                  | Assente                  |
| AM3       | 100                            | 5 $\pm$ 3,83                              | 5                                  | Assente                  |
| AM4       | 100                            | 3 $\pm$ 3,83                              | 3                                  | Assente                  |
| K1        | 100                            | 5 $\pm$ 2,00                              | 5                                  | Assente                  |

Confronto con i survey precedenti - Il confronto con i dati ottenuti nel periodo di indagine relativo alla fase di installazione della piattaforma può essere effettuato solo per 3 siti (P, AM3 e K1) poiché era stato previsto un piano di campionamento differente rispetto a quello del post lavori (Tab. 3-XXI).

Dopo un debole segnale di tossicità rilevato nel 2012 sia nell'area circostante la piattaforma che al controllo, nel 2013 si è ripristinata la situazione ecotossicologica rilevata sino al 2011.

**Tab. 3-XXI** - Confronto tra le tossicità stimate con il test "a più lungo termine" con *C. orientale* nei due monitoraggi condotti durante i lavori di installazione e perforazione dei pozzi di Annamaria B e in quelli effettuati dopo la messa in opera della struttura. In rosso il sito della piattaforma.

|          | Durante i lavori di installazione |                | Durante la fase di produzione |                |                |                |
|----------|-----------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|          | Settembre 2009                    | Marzo 2010     | Settembre 2010                | Settembre 2011 | Settembre 2012 | Settembre 2013 |
| <b>P</b> | <b>Assente</b>                    | <b>Assente</b> | <b>Assente</b>                | <b>Assente</b> | <b>Assente</b> | <b>Assente</b> |
| AM1      | -                                 | -              | Assente                       | Assente        | Bassa          | Assente        |
| AM2      | -                                 | -              | Assente                       | Assente        | Bassa          | Assente        |
| AM3      | Assente                           | Assente        | Assente                       | Assente        | Bassa          | Assente        |
| AM4      | -                                 | -              | Assente                       | Assente        | Assente        | Assente        |
| K1       | Assente                           | Assente        | Assente                       | Assente        | Bassa          | Assente        |

#### 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).

In base a quanto prescritto in tale Programma le indagini da condurre riguardano i seguenti aspetti: a) correntometria; b) caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d’acqua; c) ricerca di idrocarburi totali nella colonna d’acqua; d) ecotossicologia su campioni di acqua marina; e) caratteristiche fisiche e chimiche dei sedimenti; f) ecotossicologia su campioni di sedimento; g) biomarkers in organismi marini (*Mytilus galloprovincialis*); h) studio del macrozoobenthos.

Il Programma si suddivide in due fasi: fase di monitoraggio durante i lavori di installazione della piattaforma e fase successiva ai lavori. Durante la posa in opera della struttura era previsto lo svolgimento di 1 monitoraggio riguardante le caratteristiche chimiche e fisiche della colonna d’acqua e 2 monitoraggi comprendenti le indagini di cui ai punti e), f) e h) del suddetto elenco. Nella fase successiva all’installazione della piattaforma sono previsti 5 anni di monitoraggio completo (escluse le indagini sulle comunità macrozoobentoniche) da svolgersi 1 o 2 volte l’anno (inverno e/o estate) a seconda degli aspetti da indagare.

Nel presente rapporto sono descritte le caratteristiche fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d’acqua e dei sedimenti relative al quarto anno di indagini dopo la fine dei lavori di perforazione e installazione di Annamaria B (estate 2013); sono stati inoltre ricercati gli inquinanti in esemplari di *Mytilus galloprovincialis* insediati sulle parti sommerse della piattaforma.

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 Programma di Monitoraggio Transfrontaliero sono stati richiesti schemi di campionamento e/o tipologie di indagini differenti tra il durante e il post-lavori. Si ricorda inoltre che nel I monitoraggio post lavori (estate 2010) non è stato possibile condurre le analisi sui mitili in quanto, al momento del campionamento (settembre), sulle parti sommerse della piattaforma era presente solo una scarsa quantità di esemplari le cui dimensioni erano troppo ridotte per permettere l’esecuzione delle suddette analisi.

**Misure correntometriche** – In generale, nel periodo di riferimento (II semestre 2013) sono state riscontrate correnti di intensità media di 13 cm/s e di direzione costante verso SW e verso NW. Le correnti ad intensità più elevata sono risultate quelle più superficiali (punte sino a 25 cm/s), perché probabilmente correlate all'azione esercitata da venti.

La temperatura ha mostrato complessivamente un andamento legato alle variazioni stagionali della circolazione di fondo delle masse d'acqua, risultando coerente con quanto rilevato nell'anno precedente (Fabi *et al.*, 2014b).

**Caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d'acqua** – Nel monitoraggio condotto nell'estate 2013 è apparsa evidente la stratificazione termica dovuta al riscaldamento della colonna d'acqua durante i mesi estivi, con la presenza del caratteristico termocline stagionale. La salinità non ha mostrato gradienti particolari, indicando come l'area non fosse interessata al momento del monitoraggio dalla presenza di acque dolci di origine fluviale. La saturazione d'ossigeno non ha mostrato valori al di sotto del 100%, il che esclude la presenza di episodi ipossici nella zona indagata. I valori di fluorescenza e torbidità sono risultati ridotti in tutto il periodo. Il TSM è apparso maggiore nelle quote di superficie; le differenze osservate tra le varie stazioni non appaiono degne di nota. La trasparenza superficiale della colonna d'acqua è risultata omogenea tra i siti campionati vicino alla piattaforma e quelli più distanti.

La clorofilla *a* è risultata scarsa su tutta la colonna d'acqua, indicando come nell'area non fossero presenti abbondanze fitoplanctoniche rilevanti.

In generale l'area indagata non presenta peculiarità da un punto di vista fisico e chimico rispetto a quanto conosciuto in bibliografia (Artegiani *et al.*, 1997a e 1997b; Marini *et al.*, 2008).

**Idrocarburi totali lungo la colonna d'acqua** - La ricerca di idrocarburi totali 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) nell'estate 2013 non ha evidenziato la presenza di questa classe di contaminanti organici, analogamente ai periodi di indagine precedenti (Fabi *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015).

Al contrario, gli idrocarburi totali sono stati rinvenuti sia nel mare del Nord (0,04-3,0 mg/l; Strømgen *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 circostanti piattaforme installate nella costa orientale della Scozia (OGP, 2002). Presso alcune piattaforme del Golfo del Messico sono stati registrati livelli medi di alcani più contenuti del segmento C<sub>5</sub>-C<sub>35</sub> compresi tra 3 e 300 µg/l (Neff *et al.*, 1992), mentre concentrazioni più elevate (comprese tra 600 e 2680 µg/l) sono state nelle acque di strato di due piattaforme operanti in un'area marino-costiera della Luisiana (Neff, 1989). Pertanto, il confronto con i dati di letteratura tende a confermare, nel caso di Annamaria B, l'assenza di una qualche criticità correlata alla presenza di questa classe di inquinanti probabilmente dovuta al fatto che si tratta di una piattaforma metanifera e non petrolifera come la maggior parte di quelle presenti in altre aree.

**Ecotossicologia su campioni di acqua marina** - I saggi di tossicità effettuati nell'estate 2013 hanno confermato, nel complesso, l'assenza di effetti tossici in tutti gli indicatori ambientali che costituiscono la batteria. Solo con il test condotto con *Dunaliella tertiolecta* è stata rilevata la presenza di un effetto eutrofizzante dalla superficie a -40 m in corrispondenza della piattaforma che, comunque, non indica la presenza di tossicità nei confronti dell'alga.

**Analisi di inquinanti in *Mytilus galloprovincialis*** - L'applicazione della batteria di biomarkers tende ad evidenziare il persistere di una modesta sindrome di stress negli organismi prelevati presso la piattaforma Annamaria B. Al momento non sono state osservate alterazioni a livello metabolico, come evidenziato dai risultati della sopravvivenza all'aria. Diversamente, i test più sensibili, condotti per evidenziare cambiamenti a livello cellulare e subcellulare negli organismi sentinella, riportano diminuzioni di alcuni parametri tra cui la stabilità delle membrane lisosomiali (indice aspecifico di stress). Il danno al DNA nelle cellule degli organismi della piattaforma non è risultato evidente, essendo le percentuali di frammentazione simili a quelle riscontrabili naturalmente su popolazioni di bivalvi prelevati in ambienti marino costieri poco impattati (Klobučar *et al.*, 2008). La sintesi di proteine metallo-chelanti (metallotioneine) come l'accumulo di Zn, Ba e Cd nei tessuti dei bivalvi esaminati tende ad evidenziare un significativo seppur modesto effetto biologico correlabile alla presenza di elementi metallici in ambiente marino.

Limitato appare il livello di accumulo di inquinanti organici come anche la risposta biologica ad essi associata osservata nei mitili analizzati.

**Caratteristiche sedimentologiche** - L'area scelta come sede per Annamaria B è caratterizzata da un sedimento sabbioso con basse percentuali di silt e argilla che non hanno mostrato variazioni degne di nota nell'arco temporale considerato, se non un leggero incremento di sabbia nel 2013 rispetto al monitoraggio precedente in corrispondenza della piattaforma e un decremento della stessa componente in tre siti posti 60 m da essa. Si tratta comunque di variazioni riconducibili alla naturale dinamica dei sedimenti.

Al contrario, gli idrocarburi totali sembrano influenzati dalla presenza della struttura, come testimonia il picco di concentrazione rilevato nel 2010 presso Annamaria B e quello più modesto registrato a 60 m a SE da essa nel survey successivo. I dati del 2012 avevano fatto escludere il perdurare di uno stato di contaminazione; tuttavia nel 2013 questi contaminanti hanno mostrato, in particolare presso la piattaforma, una recrudescenza, segno di un seppur lieve disturbo ancora in atto.

Per quanto riguarda i metalli analizzati (bario, cadmio e zinco), i tenori maggiori erano stati rilevati in corrispondenza della struttura nell'estate 2010. Fra tutti, il bario risulta essere quello maggiormente interessato dalla presenza di Annamaria B. Questo metallo aveva mostrato un tenore molto elevato nel 2010, sebbene non più riscontrato nei survey successivi. Inoltre, nel medesimo campionamento una più modesta alterazione era stata osservata a 60 m a SW, anch'essa non più rilevata successivamente. Anche nel 2011 un'anomalia paragonabile era stata registrata a 60 m a SE, a testimonianza degli effetti da parte della piattaforma sulla dinamica del bario. I dati del 2012 avevano indicato che gli effetti sul bario si erano ridotti; tuttavia, nel 2013 si è verificato un incremento di questo metallo, in particolare presso la struttura, ad indicare il perdurare di uno stato di disturbo.

Per quanto riguarda il cadmio, il dato di maggiore interesse è rappresentato dalle modeste concentrazioni rilevate in tutte le stazioni. A fronte di questo, anche i cambiamenti osservati assumono scarsa rilevanza e testimoniano più una variabilità naturale che non l'effetto di fattori esterni. Tuttavia, le leggere anomalie riscontrate presso la struttura e a 60 m di distanza sia a NE che a SW rispetto al controllo potrebbero indicare uno stato di alterazione che va valutato con i prossimi survey.

Anche lo zinco ha esibito nel tempo concentrazioni piuttosto basse, sebbene alcuni picchi possano essere ricondotti alla presenza della piattaforma. Il più evidente è stato rilevato nel 2010 proprio in corrispondenza della struttura, il secondo a 60 m a NE nel survey successivo.

Nell'ultimo campionamento lo zinco ha presentato un modesto incremento presso Annamaria B, sebbene in valore assoluto si tratti di una concentrazione modesta.

**Ecotossicologia dei sedimenti** – Come già evidenziato durante la fase di installazione della piattaforma Annamaria B e nei primi tre survey post lavori (estati del 2010, 2011 e 2012), anche nel 2013 i saggi di tossicità condotti utilizzando *Dunaliella tertiolecta* e *Vibrio fischeri* hanno confermato l'assenza di effetti tossici. Per quanto concerne *Corophium orientale*, il lieve peggioramento generalizzato registrato nel 2012 non ha trovato riscontro nell'ultimo survey, quando si sono ripristinate le condizioni ecotossicologiche ottimali per la sopravvivenza dell'anfipode già osservate precedentemente.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Artegiani A. 1996. Temperature and salinity measurements of seawater. In: Handbook of method protocols. A pilot study of selected methods used in Mediterranean Targeted project., C.M. Turley (Ed.), Version 2, EU/MAST II/MPT, 6-12.
- Artegiani, A., Bregant D., Paschini E., Pinardi N., Raicich F., A. Russo 1997a. The Adriatic Sea general circulation. Part I. Air-sea interactions and water mass structure, *J. Phys. Oceanogr.*, 27: 1492–1514.
- Artegiani, A., . Bregant D, Paschini E., Pinardi N., Raicich F., Russo A. 1997b. The Adriatic Sea general circulation. Part II: Baroclinic Circulation Structure, *J. Phys. Oceanogr.*, 27: 1515–1532.
- Asby J., Tinwell H., Lefevre P.A., Browne M.A. 1995. The single gel electrophoresis assay for induced DNA damage assay: measurement of tail length and moment. *Mutagenesis*, 10: 85-90.
- ASTM E1218-04-E1. 2004. *Standard guide for conducting static toxicity tests with microalghe*. ASTM E1218-04-E1. 14 pp.
- Azur Environmental. 1994. *Microtox® M500 manual* (A toxicity testing handbook). Carlsbad, CA, USA.
- Carli A., Fiori M.A. 1979. Sviluppo larvale del *Tigriopus fulvus* Fischer. *Atti IX Congr, Soc, Ital, Biol, Mar.*; 181-190.
- Carli A., Mariottini G.L., Pane L. 1988. Reproduction of the rockpools Harpacticoid copepod *Tigriopus fulvus* (Fischer 1860), suitable for aquaculture. *XII Congrès international d'Aquariologie*: 295-300.
- Christensen E.R., Kusk K.O., Nyholm N. 2009. Dose-response regressions for algal growth and similar continuous endpoint: calculation of effective concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28: 826-835.
- de Zwaan A., de Kock W.C. 1988. The development of a general biochemical stress index. *Mar. Environ. Res.*: 24: 254-255.
- de Zwaan A., Wijsman T.M.C. 1976. Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 54B: 313-323.
- Donnini F., Dinelli E., Sangiorgi F., Fabbri E. 2007. A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). *Environ. Intern.*, 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.
- EPA 5021A. 2003. *Volatile organic compounds in various sample matrices using equilibrium headspace analysis*. 25 pp.
- EPA 8015D. 2003. *Nonhalogenated organics using gc/fid*. 37 pp.
- EPA 3545A. 2007. *Pressurized fluid extraction (pfe)*. Revision 1 February 2007. 16 pp.
- EPA 3620c. 2007. *Florisil cleanup*. 27 pp.
- EPA 7010. 2007. *Graphite furnace atomic absorption spectrophotometry*. EPA METHOD

7010. 24 pp.

- EPA 6010C. 2007. *Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*. EPA METHOD 6010C. 34 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". 1° 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., Bruno S., De Ranieri S., Gomiero A., 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 (inverno 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 (inverno 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. 55 + 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., Nasci C., Penna P., Spagnolo A. 2014c. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Naide. IV anno di monitoraggio dopo la posa in opera. Misure correntometriche, Indagini sedimentologiche, ecotossicologiche e Analisi di inquinanti in organismi marini. Rapporto semestrale (luglio - dicembre 2008).* Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 146 + xlvii pp.
- Fabi G., De Biasi A.M., Gomiero A., Spagnolo A. 2015. *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° 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.* Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 57 + IX 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., De Biasi A.M., Da Ros L., Nasci C., Spagnolo A., Fabi G. 2011. A multidisciplinary approach to evaluate the environmental impact of off-shore gas platforms in the western Adriatic Sea. *Chemistry and Ecology*, 27(S2): 1-13.
- Gomiero A., Volpato E., Nasci C., Perra G., Viarengo A., Dagnino A. Spagnolo A., Fabi G. 2015. Use of multiple cell and tissue-level biomarkers in mussels collected along two gas fields in the northern Adriatic Sea as a tool for long term environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 93 (1-2): 228-244.
- 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.
- ICRAM. 2001. *Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003)*.
- ICRAM-APAT. 2007. *Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini*. 72 pp.
- ISO. 2005. *Water quality - determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods*. ISO 16712:2005(E). 15 pp.
- 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.
- Moore M.N. 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochemistry*, 22: 187-191.
- Neff J.M., Sauer T.C., Maiociolk N. 1989. *Fate and Effects of Produced Water Discharges in Nearshore Marine Waters*. API Publication No. 4472. American Petroleum Institute, Washington, DC. 300 pp.
- Neff J.M., Sauer T.C., Maiociolk N. 1992. Composition, fate and effects of produced water discharges to near shore marine waters. Pages 371-385, in: Ray J.P., Ranier Engelhardt F. (Eds), *Produced water: Technological/environmental issues and solutions*. Plenum Press, NY.
- OGP. 2002. *Aromatics in produced water: occurrence, fate and effects and treatment*. OGP January 2002, Report No. 1.20/324. 6 pp.
- Onorati F., Pellegrini D., Ausili A. 1999. Valutazione della tossicità naturale nel saggio Microtox in fase solida. La normalizzazione pelitica. *Acqua&Aria*, 6: 83-89.
- Onorati F, Bandini F., Brillì L., Bellaria V., Castiglioni S., Celetti A.M., Comin S., Di Gioia E., Fabbri S., Facchini L., Ferrara M., Guerra R., Leoni T., Lo Re R., Manzo S., Martini P., Mascilongo G., Meloni P., Meineri V., Milani S., Molina M., Rossi E., Ruggiero G., Sanguinetti M.S., Tamberlich F., Traldi D., Trichilo S. 2007. Interconfronto nazionale sul test di inibizione della bioluminescenza mediante *Vibrio fischeri*. *Biol. Mar. Medit.*, 14(1): 87-91.
- Pane L., Feletti M., Carli A.M. 1996. Fattori ambientali e fluttuazioni della popolazione del copepode *Tigriopus fulvus* delle pozze di scogliera di Genova - Nervi (Mar Ligure). *Atti Soc. Ital. Ecol.*, 17: 317-320.
- Petrovic S., Semencic L., Ozetic B., Orzetic M. 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Mar. Poll. Bull.*, 49 (9-10): 713-720.

- Strømgren T., Sørstrøm S.E., Schou L., Kaarstad I., Aunaas T., Brakstad O.G. 1995. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. *Mar. Environ. Res.*, 40 (2): 147-169.
- Terman A., Brunk U.T. 2004. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36: 1400–1404.
- UNESCO. 1983. Algorithms for computation of fundamental properties of seawater, by N.P. Fofonoff and R.C. Millard Jr., *Tech. Pap. Mar. Sci.*, 44. 53 pp.
- UNESCO. 1988. The acquisition, calibration, and analysis of CTD data. *Tech. Pap. Mar. Sci.*, 54. 59 pp.
- UNI EN ISO 10253:2000. 2000. *Saggio di inibizione della crescita di alghe marine con Skeletonema costatum e Phaeodactylum tricornerutum*. 14 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.
- US-EPA. 1996. *Acid digestion of sediments, sludges, and soils*. US-EPA 3050B. 12 pp.
- US-EPA. 2000. *Nonhalogenated organics by gas chromatography*. 8015c rev. 3. 36 pp.
- US-EPA. 2007. *Ultrasonic Extraction of Solid Samples*. US-EPA 3550C rev. 3. 17 pp.
- Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Marcinelli G., Accomando R., Smaal A.C., Orunesu M. 1995. Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar. Environ. Res.*, 39: 245-248.
- Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 281–300.
- Visvardis E.E., Tassiou A.M., Piperakis S.M. 1997. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  $\gamma$ -irradiation with alkaline comet assay. *Mutation Res.*, 383: 71-80.
- Winkler L.W. 1888. Die Bestimmung des im Wasser gelosten Sauerstoffes. *Chem. Ber.*, 21: 2843-2855.
- Wright S.W., Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., Bjornland T., Repeta D., Welschmeyer N. 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 77: 183-196.

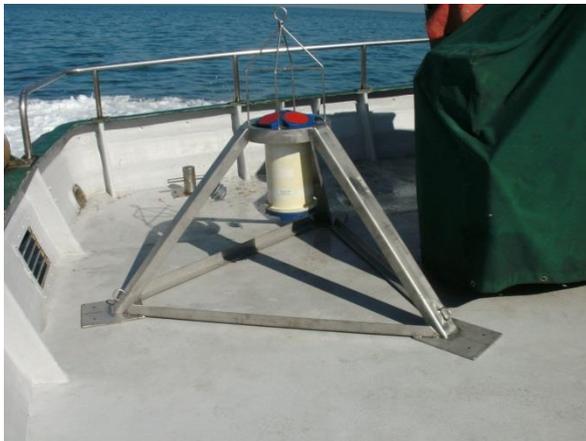
*ALLEGATO A*

**SCHEDE TECNICHE DELLA STRUMENTAZIONE**

**UTILIZZATA NELLE INDAGINI**

## INDAGINI IDROLOGICHE

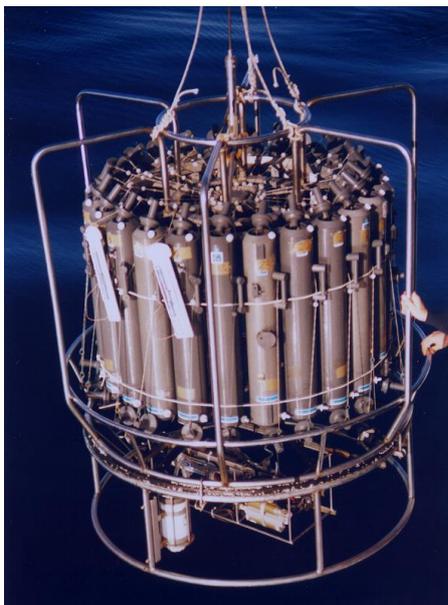
### A1-IADCP (ACOUSTIC DOPPLER CURRENT PROFILER)



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

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

## A1-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                    | $\pm 0,002 \text{ } ^\circ\text{C}$    | -5 : +35 $^\circ\text{C}$       |
| Conducibilità   | Sea Bird Electronics     | SBE 4                    | $\pm 0,0003 \text{ S m}^{-1}$          | 0 : 7 $\text{S m}^{-1}$         |
| Pompa           | Sea Bird Electronics     | SBE 5                    | ---                                    | 9 : 18 VDC                      |
| Ossigeno        | Sea Bird Electronics     | SBE 43                   | $\pm 0,1 \text{ ml L}^{-1}$            | 0 : 15 $\text{ml L}^{-1}$       |
| Fluorimetro     | Turner Designs           | SCUFA                    | $\pm 0,01 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ | 0,02 : 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| Torbidimetro    | Turner Designs           | SCUFA                    | $\pm 0,01 \text{ NTU}$                 | 0,05 : 100 NTU                  |
| Back-scattering | Seapoint Turbidity Meter | Seapoint Turbidity Meter | < 5cm (approx.)                        | 2 : 750 FTU                     |
| Altimetro       | Datasonics               | PSA-900                  | $\pm 0,75 \text{ cm}$                  | 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 <sup>-1</sup> | 2 : 6 ml l <sup>-1</sup> | giornaliera  |

### A1-IV HPLC



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

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



| Tipo Strumento   | Costruttore | Serie   | Detector | Iniezione | V <sub>Iniezione</sub> | Carrier |
|------------------|-------------|---------|----------|-----------|------------------------|---------|
| Gas Cromatografo | Varian      | CP-3800 | FID      | Spliless  | 2-100 µl               | 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**  
**SEDIMENTI**  
**INDAGINI FISICHE E CHIMICHE**

**A2-I BOX-CORER per il prelievo dei campioni**



| Materiale     | Dimensione scatola campionatore (cm) |
|---------------|--------------------------------------|
| Ferro zincato | 17x10x24,5h                          |

**A2-II BILANCIA ELETTRONICA**



| Strumento            | Costruttore                  | Modello | Sensibilità | Capacità |
|----------------------|------------------------------|---------|-------------|----------|
| Bilancia elettronica | Gibertini Elettronica S.r.l. | EU 2000 | ±0,01 g     | 1000 g   |

Le bilance elettroniche sono sensibili all'accelerazione di gravità; pertanto, in accordo con la direttiva 90/384, devono essere calibrate nel luogo di utilizzo con masse tarate in classe F1 che corrispondono a un peso di 200 g.

### **A2-III STUFA TERMOSTATA “HIGH PERFORMANCE”**



| Strumento        | Costruttore     | Modello | Capacità (litri) | Temperatura (°C) | Precisione (°C) |
|------------------|-----------------|---------|------------------|------------------|-----------------|
| Stufa termostata | F.lli Galli G&P | 2100    | 96               | 50 – 300         | ±2              |

Ogni sei mesi viene inserito un termometro per verificare che la temperatura della stufa resti costante. La lettura del termometro viene eseguita ogni 45 minuti per una durata totale della prova di 3 ore. E' accettata una variazione di 2°C rispetto alla temperatura iniziale.

### **A2-IV SETACCI**



| Strumento            | Costruttore                | Serie | Materiale    | Diametro (mm) | Dimensione delle maglie (μ)         |
|----------------------|----------------------------|-------|--------------|---------------|-------------------------------------|
| Setacci normalizzati | Giuliani Tecnologie S.r.l. | ASTM  | acciaio inox | 100 - 200     | 63, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 |

Periodicamente si verifica che le maglie abbiano mantenuto le dimensioni e la forma originaria e si testa la regolarità delle saldature.

## A2-V DENSIMETRO



| Strumento              | Costruttore  | Serie        | Scala (ml)    | Divisione (ml) | Zavorra | Taratura (°F) |
|------------------------|--------------|--------------|---------------|----------------|---------|---------------|
| Densimetro per terreni | Vetrotecnica | Normale ASTM | 0,995 – 1,040 | 0,001          | piombo  | 68/68         |

Lo strumento non necessita di verifica e taratura. Viene sostituito quando la scala graduata non è più visibile.

## A2-VI GAS-CROMATOGRAFO DOPPIA COLONNA, RIVELATORE FID - PERKIN ELMER SIGMA3B – DUAL FID



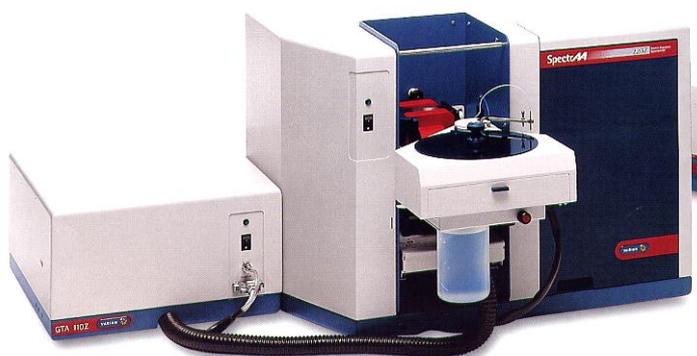
Il controllo interno della taratura dello strumento viene effettuato preliminarmente all'avvio di ogni indagine commissionata. Il controllo esterno e l'eventuale taratura ordinaria sono condotti annualmente da un Tecnico incaricato dalla Ditta costruttrice, quando il controllo interno risulta sfavorevole.

## A2-VII VARIAN LIBERTY AX ICP-AES



Spettrofotometro ad emissione atomica al plasma ad accoppiamento induttivo (ICP) e lettura sequenziale. Il sistema di raccolta della radiazione emessa dal plasma è di tipo assiale. Il generatore di radiofrequenze è 40 MHz. Per il raffreddamento del plasma viene impiegato argon ultrapuro.

## A2-VIII VARIAN SPECTRA AA-220



Spettrofotometro ad assorbimento atomico usato mediante l'impiego del fornello di grafite con piattaforma pirolitica. La correzione del rumore di fondo è assicurata dalla correzione di background trasversa "Zeeman" e dall'interpolazione polinomiale per la correzione delle interferenze. Al fine di ridurre il rumore di fondo e il limite di rivelabilità e di incrementare la sensibilità vengono utilizzate lampade monoelemento a catodo cavo.

### A3

## ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

### A3-I CRIOSTATO Leica CM1900



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

## A3-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<br>Optovar revolver 3x motorized<br>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<br>Transmitted light: Achroplan, Plan-Neofluar<br>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<br>HBO 50W mercury vapor short arc lamp<br>HBO 100W mercury vapor short arc lamp<br>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<br>12V, 100W<br>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  |

### A3-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<br>-30-40 a veloc. ridotta | ±1         | 215 mm          |

### A3-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<br>Assorbanza 0-4 A | ±0,005 A                |

Taratura giornaliera ed esecuzione di curva standard di riferimento.

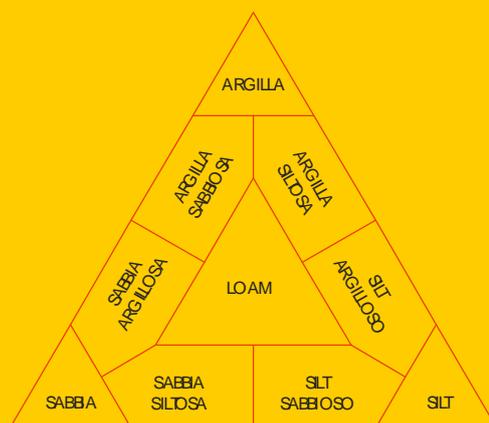
### A3-V OPTIMA 7300 V ICP-OES



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).

# **ALLEGATO B**

## **SCHEDE GRANULOMETRICHE 1° SURVEY SUCCESSIVO AI LAVORI DI INSTALLAZIONE DELLA PIATTAFORMA ANNAMARIA B (ESTATE 2013)**



## Stazione P

| Parametri Fisici                        |                |        |
|---|----------------|--------|
| Peso secco (g)                          | P <sub>s</sub> | 128,09 |
| Peso umido (g)                          | P <sub>u</sub> | 166,95 |
| Peso specifico                          | G              | n.d.   |
| Peso di volume (g/cm <sup>3</sup> )     | γ              | n.d.   |
| Peso di vol. secco (g/cm <sup>3</sup> ) | γ <sub>d</sub> | n.d.   |
| Umidità (%)                             | W              | n.d.   |

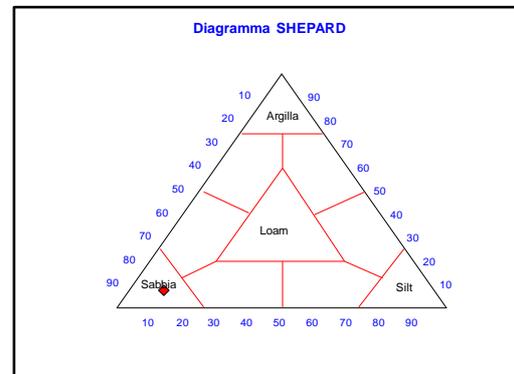
| Parametri Statistici |                 |      |
|----------------------|-----------------|------|
| Media                | M <sub>φ</sub>  | 3,47 |
| Classazione          | σ <sub>φ</sub>  | 0,95 |
| Asimmetria           | S <sub>Kφ</sub> | 0,01 |
| Appuntimento         | K <sub>G</sub>  | 3,55 |
| Mediana              | M <sub>d</sub>  | 3,46 |

| Percentile | φ    |
|------------|------|
| 5°         | 1,48 |
| 16°        | 2,53 |
| 25°        | 3,03 |
| 50°        | 3,46 |
| 75°        | 3,88 |
| 84°        | 4,44 |
| 95°        | 8,82 |

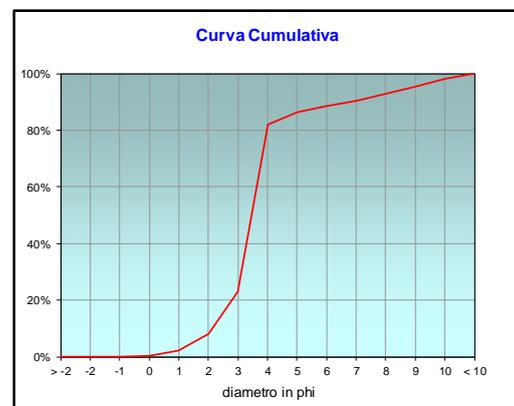
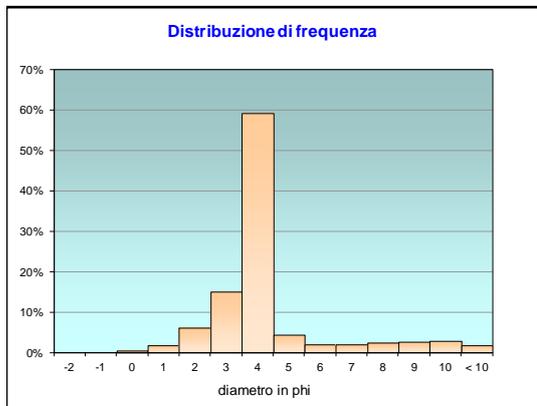
|         | g     | phi  | micron | %      | Freq. Cumul. |
|---------|-------|------|--------|--------|--------------|
| Ghiaia  | 0,00  | > -2 | > 4000 | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -2   | 4000   | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -1   | 2000   | 0,00%  | 0,00%        |
| Sabbia  | 0,49  | 0    | 1000   | 0,38%  | 0,38%        |
|         | 2,12  | 1    | 500    | 1,65%  | 2,03%        |
|         | 7,84  | 2    | 250    | 6,12%  | 8,15%        |
|         | 19,10 | 3    | 125    | 14,91% | 23,06%       |
|         | 75,61 | 4    | 62,5   | 59,03% | 82,09%       |
| Limo    | 5,61  | 5    | 31     | 4,38%  | 86,47%       |
|         | 2,57  | 6    | 15,6   | 2,00%  | 88,48%       |
|         | 2,44  | 7    | 7,8    | 1,91%  | 90,38%       |
|         | 3,09  | 8    | 3,9    | 2,41%  | 92,79%       |
| Argilla | 3,44  | 9    | 2,0    | 2,68%  | 95,48%       |
|         | 3,49  | 10   | 0,98   | 2,73%  | 98,20%       |
|         | 2,30  | < 10 | < 0,98 | 1,80%  | #####        |

| Classe granulometrica |        |        |         |
|-----------------------|--------|--------|---------|
| Ghiaia                | Sabbia | Limo   | Argilla |
| 0,00%                 | 82,09% | 10,70% | 7,21%   |

**Note**  
17,27 g di materiale organogeno (conchiglie)



| Classificazione |                           |
|-----------------|---------------------------|
| Shepard         | SABBIA                    |
| Wentworth       | SA - FI - MA              |
| Classazione     | moderatamente classato    |
| Asimmetria      | simmetrica                |
| Appuntimento    | estremamente leptocurtica |



## Stazione AM1

| Parametri Fisici                        |            |        |
|---|------------|--------|
| Peso secco (g)                          | Ps         | 150,45 |
| Peso umido (g)                          | Pu         | 189,38 |
| Peso specifico                          | G          | n.d.   |
| Peso di volume (g/cm <sup>3</sup> )     | $\gamma$   | n.d.   |
| Peso di vol. secco (g/cm <sup>3</sup> ) | $\gamma_d$ | n.d.   |
| Umidità (%)                             | W          | n.d.   |

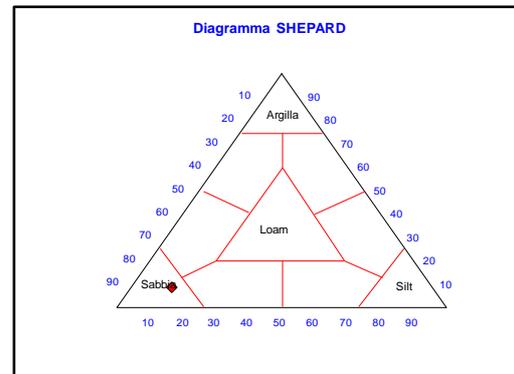
| Parametri Statistici |                 |      |
|----------------------|-----------------|------|
| Media                | $M_p$           | 3,69 |
| Classazione          | $\sigma_{\phi}$ | 1,15 |
| Asimmetria           | $S_{K\phi}$     | 0,13 |
| Appuntimento         | $K_G$           | 3,37 |
| Mediana              | Md              | 3,49 |

| Percentile | $\phi$ |
|------------|--------|
| 5°         | 1,92   |
| 16°        | 2,65   |
| 25°        | 3,05   |
| 50°        | 3,49   |
| 75°        | 3,93   |
| 84°        | 4,94   |
| 95°        | 9,08   |

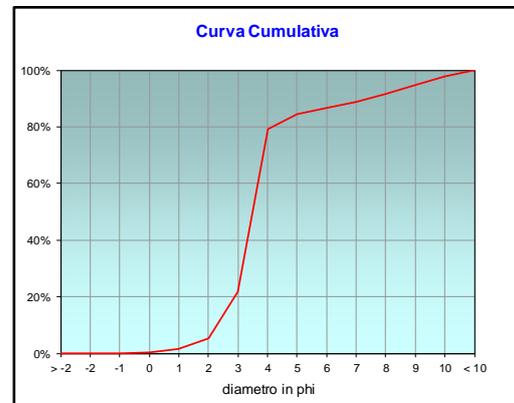
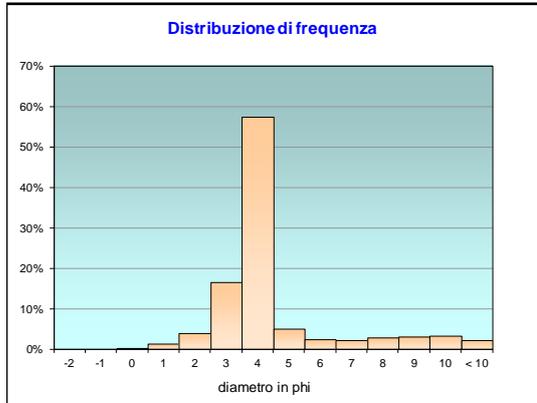
|         | g     | phi  | micron | %      | Freq. Cumul. |
|---------|-------|------|--------|--------|--------------|
| Ghiaia  | 0,00  | > -2 | > 4000 | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -2   | 4000   | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -1   | 2000   | 0,00%  | 0,00%        |
| Sabbia  | 0,41  | 0    | 1000   | 0,27%  | 0,27%        |
|         | 1,85  | 1    | 500    | 1,23%  | 1,50%        |
|         | 5,75  | 2    | 250    | 3,82%  | 5,32%        |
|         | 24,89 | 3    | 125    | 16,54% | 21,86%       |
|         | 86,33 | 4    | 62,5   | 57,38% | 79,24%       |
| Limo    | 7,64  | 5    | 31     | 5,08%  | 84,32%       |
|         | 3,49  | 6    | 15,6   | 2,32%  | 86,64%       |
|         | 3,32  | 7    | 7,8    | 2,21%  | 88,85%       |
|         | 4,20  | 8    | 3,9    | 2,79%  | 91,65%       |
| Argilla | 4,68  | 9    | 2,0    | 3,11%  | 94,76%       |
|         | 4,75  | 10   | 0,98   | 3,16%  | 97,91%       |
|         | 3,14  | < 10 | < 0,98 | 2,09%  | #####        |

| Classe granulometrica |        |        |         |
|-----------------------|--------|--------|---------|
| Ghiaia                | Sabbia | Limo   | Argilla |
| 0,00%                 | 79,24% | 12,40% | 8,35%   |

**Note**  
15,7 g di materiale organogeno (conchiglie)



| Classificazione |                           |
|-----------------|---------------------------|
| Shepard         | SABBIA                    |
| Wentworth       | SA - FI - MA              |
| Classazione     | mal classato              |
| Asimmetria      | asimmetrica positiva      |
| Appuntimento    | estremamente leptocurtica |



## Stazione AM2

| Parametri Fisici                        |            |  |        |
|---|------------|--|--------|
| Peso secco (g)                          | Ps         |  | 140,98 |
| Peso umido (g)                          | Pu         |  | 180,81 |
| Peso specifico                          | G          |  | n.d.   |
| Peso di volume (g/cm <sup>3</sup> )     | $\gamma$   |  | n.d.   |
| Peso di vol. secco (g/cm <sup>3</sup> ) | $\gamma_d$ |  | n.d.   |
| Umidità (%)                             | W          |  | n.d.   |

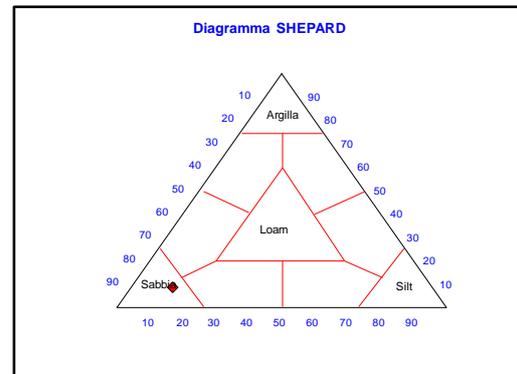
| Parametri Statistici |            |      |
|----------------------|------------|------|
| Media                | $M_p$      | 3,67 |
| Classazione          | $\sigma_p$ | 1,25 |
| Asimmetria           | $S_{kp}$   | 0,12 |
| Appuntimento         | $K_G$      | 3,33 |
| Mediana              | Md         | 3,47 |

| Percentile | $\phi$ |
|------------|--------|
| 5°         | 1,63   |
| 16°        | 2,52   |
| 25°        | 3,01   |
| 50°        | 3,47   |
| 75°        | 3,93   |
| 84°        | 5,02   |
| 95°        | 9,12   |

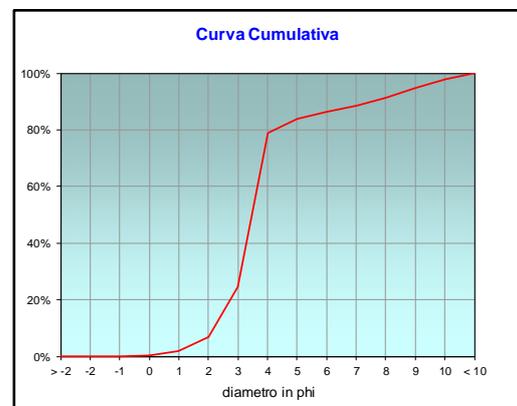
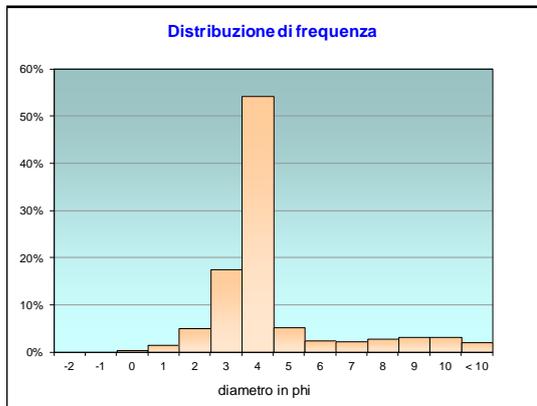
|         | g     | phi  | micron | %      | Freq. Cumul. |
|---------|-------|------|--------|--------|--------------|
| Ghiaia  | 0,00  | > -2 | > 4000 | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -2   | 4000   | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -1   | 2000   | 0,00%  | 0,00%        |
| Sabbia  | 0,48  | 0    | 1000   | 0,34%  | 0,34%        |
|         | 2,06  | 1    | 500    | 1,46%  | 1,80%        |
|         | 7,15  | 2    | 250    | 5,07%  | 6,87%        |
|         | 24,80 | 3    | 125    | 17,59% | 24,47%       |
|         | 76,51 | 4    | 62,5   | 54,27% | 78,74%       |
| Limo    | 7,33  | 5    | 31     | 5,20%  | 83,94%       |
|         | 3,35  | 6    | 15,6   | 2,38%  | 86,32%       |
|         | 3,19  | 7    | 7,8    | 2,26%  | 88,58%       |
|         | 4,03  | 8    | 3,9    | 2,86%  | 91,44%       |
| Argilla | 4,49  | 9    | 2,0    | 3,18%  | 94,63%       |
|         | 4,56  | 10   | 0,98   | 3,24%  | 97,86%       |
|         | 3,01  | < 10 | < 0,98 | 2,14%  | #####        |

| Classe granulometrica |        |        |         |
|-----------------------|--------|--------|---------|
| Ghiaia                | Sabbia | Limo   | Argilla |
| 0,00%                 | 78,74% | 12,70% | 8,56%   |

**Note**  
17,2 g di materiale organogeno (conchiglie)



| Classificazione |                           |
|-----------------|---------------------------|
| Shepard         | SABBIA                    |
| Wentworth       | SA - FI - MA              |
| Classazione     | mal classato              |
| Asimmetria      | asimmetrica positiva      |
| Appuntimento    | estremamente leptocurtica |



## Stazione AM3

| Parametri Fisici                        |                |        |
|---|----------------|--------|
| Peso secco (g)                          | P <sub>s</sub> | 146,43 |
| Peso umido (g)                          | P <sub>u</sub> | 186,62 |
| Peso specifico                          | G              | n.d.   |
| Peso di volume (g/cm <sup>3</sup> )     | γ              | n.d.   |
| Peso di vol. secco (g/cm <sup>3</sup> ) | γ <sub>d</sub> | n.d.   |
| Umidità (%)                             | W              | n.d.   |

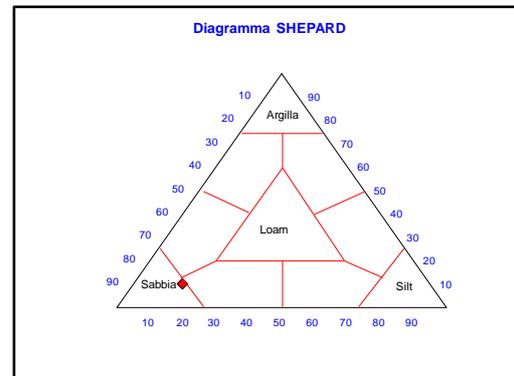
| Parametri Statistici |                 |      |
|----------------------|-----------------|------|
| Media                | M <sub>p</sub>  | 4,08 |
| Classazione          | σ <sub>p</sub>  | 1,64 |
| Asimmetria           | S <sub>Kp</sub> | 0,25 |
| Appuntimento         | K <sub>G</sub>  | 3,35 |
| Mediana              | Md              | 3,54 |

| Percentile | φ    |
|------------|------|
| 5°         | 1,89 |
| 16°        | 2,71 |
| 25°        | 3,08 |
| 50°        | 3,54 |
| 75°        | 4,00 |
| 84°        | 5,98 |
| 95°        | 9,34 |

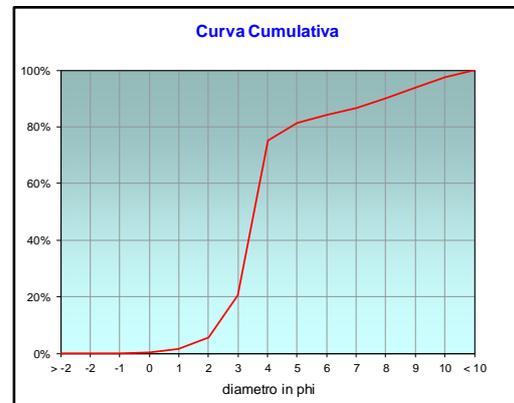
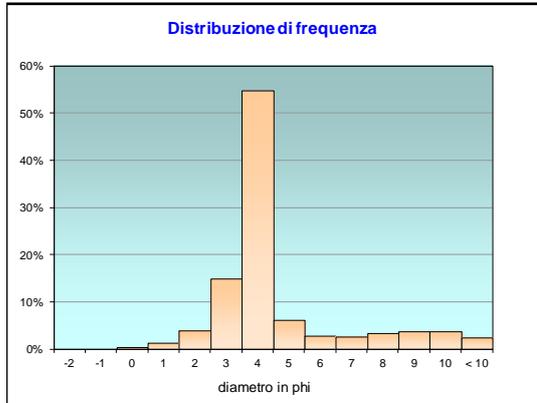
|         | g     | phi  | micron | %      | Freq. Cumul. |
|---------|-------|------|--------|--------|--------------|
| Ghiaia  | 0,00  | > -2 | > 4000 | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -2   | 4000   | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -1   | 2000   | 0,00%  | 0,00%        |
| Sabbia  | 0,43  | 0    | 1000   | 0,29%  | 0,29%        |
|         | 1,92  | 1    | 500    | 1,31%  | 1,60%        |
|         | 5,61  | 2    | 250    | 3,83%  | 5,44%        |
|         | 21,92 | 3    | 125    | 14,97% | 20,41%       |
|         | 80,25 | 4    | 62,5   | 54,81% | 75,22%       |
| Limo    | 8,88  | 5    | 31     | 6,06%  | 81,28%       |
|         | 4,06  | 6    | 15,6   | 2,77%  | 84,05%       |
|         | 3,86  | 7    | 7,8    | 2,64%  | 86,69%       |
|         | 4,88  | 8    | 3,9    | 3,34%  | 90,03%       |
| Argilla | 5,44  | 9    | 2,0    | 3,71%  | 93,74%       |
|         | 5,52  | 10   | 0,98   | 3,77%  | 97,51%       |
|         | 3,65  | < 10 | < 0,98 | 2,49%  | #####        |

| Classe granulometrica |        |        |         |
|-----------------------|--------|--------|---------|
| Ghiaia                | Sabbia | Limo   | Argilla |
| 0,00%                 | 75,22% | 14,81% | 9,97%   |

**Note**  
15,8 g di materiale organogeno (conchiglie)



| Classificazione |                           |
|-----------------|---------------------------|
| Shepard         | SABBIA                    |
| Wentworth       | SA - FI - MA              |
| Classazione     | mal classato              |
| Asimmetria      | asimmetrica positiva      |
| Appuntimento    | estremamente leptocurtica |



## Stazione AM4

| Parametri Fisici                        |            |        |
|---|------------|--------|
| Peso secco (g)                          | Ps         | 145,66 |
| Peso umido (g)                          | Pu         | 182,42 |
| Peso specifico                          | G          | n.d.   |
| Peso di volume (g/cm <sup>3</sup> )     | $\gamma$   | n.d.   |
| Peso di vol. secco (g/cm <sup>3</sup> ) | $\gamma_d$ | n.d.   |
| Umidità (%)                             | W          | n.d.   |

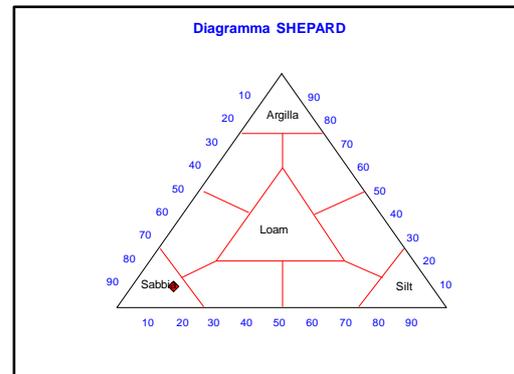
| Parametri Statistici |            |      |
|----------------------|------------|------|
| Media                | $M_p$      | 3,72 |
| Classazione          | $\sigma_p$ | 1,27 |
| Asimmetria           | $S_{kp}$   | 0,14 |
| Appuntimento         | $K_G$      | 3,48 |
| Mediana              | Md         | 3,49 |

| Percentile | $\phi$ |
|------------|--------|
| 5°         | 1,55   |
| 16°        | 2,56   |
| 25°        | 3,05   |
| 50°        | 3,49   |
| 75°        | 3,94   |
| 84°        | 5,11   |
| 95°        | 9,14   |

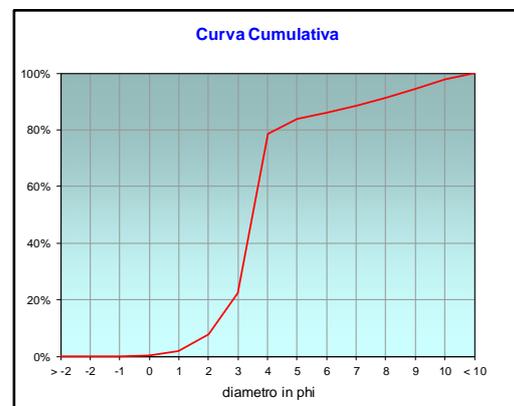
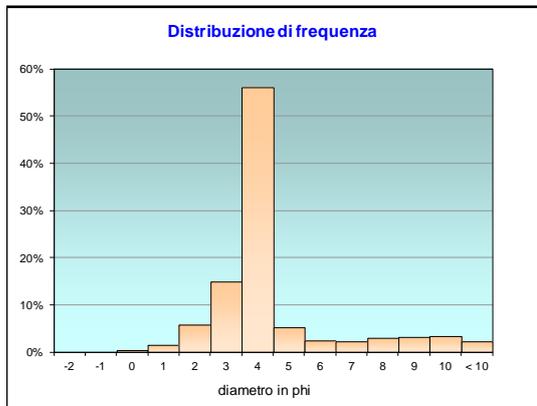
|         | g     | phi  | micron | %      | Freq. Cumul. |
|---------|-------|------|--------|--------|--------------|
| Ghiaia  | 0,00  | > -2 | > 4000 | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -2   | 4000   | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -1   | 2000   | 0,00%  | 0,00%        |
| Sabbia  | 0,50  | 0    | 1000   | 0,34%  | 0,34%        |
|         | 2,18  | 1    | 500    | 1,50%  | 1,84%        |
|         | 8,41  | 2    | 250    | 5,77%  | 7,61%        |
|         | 21,63 | 3    | 125    | 14,85% | 22,46%       |
|         | 81,59 | 4    | 62,5   | 56,01% | 78,47%       |
| Limo    | 7,67  | 5    | 31     | 5,27%  | 83,74%       |
|         | 3,51  | 6    | 15,6   | 2,41%  | 86,15%       |
|         | 3,34  | 7    | 7,8    | 2,29%  | 88,44%       |
|         | 4,22  | 8    | 3,9    | 2,90%  | 91,34%       |
| Argilla | 4,70  | 9    | 2,0    | 3,23%  | 94,56%       |
|         | 4,77  | 10   | 0,98   | 3,28%  | 97,84%       |
|         | 3,15  | < 10 | < 0,98 | 2,16%  | #####        |

| Classe granulometrica |        |        |         |
|-----------------------|--------|--------|---------|
| Ghiaia                | Sabbia | Limo   | Argilla |
| 0,00%                 | 78,47% | 12,86% | 8,66%   |

**Note**  
19,68 g di materiale organogeno (conchiglie)



| Classificazione |                           |
|-----------------|---------------------------|
| Shepard         | SABBIA                    |
| Wentworth       | SA - FI - MA              |
| Classazione     | mal classato              |
| Asimmetria      | asimmetrica positiva      |
| Appuntimento    | estremamente leptocurtica |



# Stazione K1

| Parametri Fisici                        |                |        |
|---|----------------|--------|
| Peso secco (g)                          | P <sub>s</sub> | 130,68 |
| Peso umido (g)                          | P <sub>u</sub> | 170,87 |
| Peso specifico                          | G              | n.d.   |
| Peso di volume (g/cm <sup>3</sup> )     | γ              | n.d.   |
| Peso di vol. secco (g/cm <sup>3</sup> ) | γ <sub>d</sub> | n.d.   |
| Umidità (%)                             | W              | n.d.   |

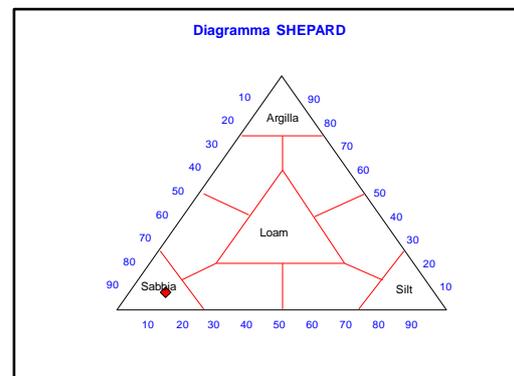
| Parametri Statistici |                 |      |
|----------------------|-----------------|------|
| Media                | M <sub>φ</sub>  | 3,55 |
| Classazione          | σ <sub>φ</sub>  | 0,97 |
| Asimmetria           | S <sub>Kφ</sub> | 0,05 |
| Appuntamento         | K <sub>G</sub>  | 3,60 |
| Mediana              | Md              | 3,48 |

| Percentile | φ    |
|------------|------|
| 5°         | 1,57 |
| 16°        | 2,61 |
| 25°        | 3,06 |
| 50°        | 3,48 |
| 75°        | 3,89 |
| 84°        | 4,55 |
| 95°        | 8,88 |

|         | g     | phi  | micron | %      | Freq. Cumul. |
|---------|-------|------|--------|--------|--------------|
| Ghiaia  | 0,00  | > -2 | > 4000 | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -2   | 4000   | 0,00%  | 0,00%        |
|         | 0,00  | -1   | 2000   | 0,00%  | 0,00%        |
| Sabbia  | 0,50  | 0    | 1000   | 0,38%  | 0,38%        |
|         | 1,80  | 1    | 500    | 1,38%  | 1,76%        |
|         | 7,39  | 2    | 250    | 5,65%  | 7,41%        |
|         | 18,30 | 3    | 125    | 14,00% | 21,41%       |
|         | 78,55 | 4    | 62,5   | 60,11% | 81,52%       |
| Limo    | 5,91  | 5    | 31     | 4,52%  | 86,04%       |
|         | 2,70  | 6    | 15,6   | 2,07%  | 88,11%       |
|         | 2,57  | 7    | 7,8    | 1,97%  | 90,08%       |
|         | 3,25  | 8    | 3,9    | 2,49%  | 92,56%       |
| Argilla | 3,62  | 9    | 2,0    | 2,77%  | 95,33%       |
|         | 3,68  | 10   | 0,98   | 2,81%  | 98,14%       |
|         | 2,43  | < 10 | < 0,98 | 1,86%  | #####        |

| Classe granulometrica |        |        |         |
|-----------------------|--------|--------|---------|
| Ghiaia                | Sabbia | Limo   | Argilla |
| 0,00%                 | 81,52% | 11,04% | 7,44%   |

**Note**  
17,35 g di materiale organogeno (conchiglie)



| Classificazione |                           |
|-----------------|---------------------------|
| Shepard         | SABBIA                    |
| Wentworth       | SA - FI - MA              |
| Classazione     | moderatamente classato    |
| Asimmetria      | simmetrica                |
| Appuntamento    | estremamente leptocurtica |

