

ENI S.p.A. - UPSTREAM DICS

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

**9° SURVEY SUCCESSIVO ALLE OPERAZIONI DI INSTALLAZIONE
(ESTATE 2014)**

**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
MIRENO BORGHINI
DANIELE CASSIN
ANNA DE BIASI
AMELIA DE LAZZARI
ALESSIO GOMIERO
LUDMILA KOZINKOVA
ALESSANDRA SPAGNOLO

ANCONA, Luglio 2016

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
2. MATERIALI E METODI	3
2.1. CAMPIONAMENTO IN MARE	4
2.1.1. MISURE CORRENTOMETRICHE	4
2.1.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA	4
2.1.2.1 Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina.....	6
2.1.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA	6
2.1.4. ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i>	6
2.1.5. INDAGINI FISICHE, CHIMICHE ED ECOTOSSICOLOGICHE DEI 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>	13
2.2.3. ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i>	15
2.2.3.1 Biomarkers	15
2.2.3.2 Metalli pesanti	20
2.2.3.3 Idrocarburi totali	21
2.2.4. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DEI SEDIMENTI.....	22
2.2.4.1 Granulometria	22
2.2.4.2 Idrocarburi totali	22
2.2.4.3 Metalli pesanti	23
2.2.5. ECOTOSSICOLOGIA DEI SEDIMENTI	24
2.2.5.1 <i>Dunaliella tertiolecta</i>	24
2.2.5.2 <i>Vibrio fischeri</i>	25
2.2.5.3 <i>Corophium orientale</i>	27
3. RISULTATI.....	29
3.1. MISURE CORRENTOMETRICHE	29
3.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA	31
3.2.1. TEMPERATURA, SALINITÀ, TORBIDITÀ, OSSIGENO DISCIOLTO E TRASPARENZA	31
3.2.2. FLUORESCENZA INDOTTA, CLOROFILLA A E TSM.....	32
3.2.3. RICERCA DI IDROCARBURI TOTALI SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA.....	33
3.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI D'ACQUA MARINA	35
3.3.1. <i>DUNALIELLA TERTIOLECTA</i>	35
3.3.2. <i>VIBRIO FISCHERI</i>	36
3.3.3. <i>TIGRIOPUS FULVUS</i>	37
3.4. ANALISI DI INQUINANTI IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i>	39
3.4.1. BIOMARKERS	39
3.4.2. METALLI PESANTI	43

3.4.3.	IDROCARBURI TOTALI	45
3.5.	INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DEI SEDIMENTI	46
3.5.1.	GRANULOMETRIA	46
3.5.2.	METALLI PESANTI	47
3.5.3.	IDROCARBURI TOTALI	50
3.6.	ECOTOSSICOLOGIA DEI SEDIMENTI	52
3.6.1.	<i>DUNALIELLA TERTIOLECTA</i>	52
3.6.2.	<i>VIBRIO FISCHERI</i>	53
3.6.3.	<i>COROPHIUM ORIENTALE</i>	54
4.	CONCLUSIONI	56
5.	BIBLIOGRAFIA	61
ALLEGATO A	Schede tecniche della strumentazione utilizzata nelle indagini	I
	- ALL. A1 Indagini idrologiche	II
	- ALL. A2 Sedimenti: Indagini fisiche e chimiche	V
	- ALL. A3 Analisi di inquinanti in <i>Mytilus galloprovincialis</i>	IX
ALLEGATO B	Schede granulometriche Estate 2013.....	XIII

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

A. Boldrin	CNR - ISMAR Venezia
F. Acri	CNR - ISMAR Venezia
S. Bruno	CNR - ISMAR Venezia
D. Cassin	CNR - ISMAR Venezia
M. Casula	CNR - ISMAR Venezia
L. Dametto	CNR - ISMAR Venezia
A. De Lazzari	CNR - ISMAR Venezia
S. Pasqual	CNR - ISMAR Venezia
S. Leoni	CNR - ISMAR Ancona
P. Polidori	CNR - ISMAR Ancona
M. Leonetti	CNR - ISMAR Ancona
M. Borghini	CNR - ISMAR La Spezia
S. Durante	CNR - ISMAR La Spezia

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

L. Kozinkova	CIBM Livorno
N. Bigongiari	CIBM Livorno

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 Tecnopesca 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 UOS Ancona è stato incaricato da ENI S.p.A. – UPSTREAM DICS 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 effettuati sino all'estate 2014. 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	x	x	
Caratteristiche fisiche e chimiche colonna d'acqua		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Ricerca di idrocarburi totali colonna d'acqua			x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Ecotossicologia colonna d'acqua			x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Caratteristiche fisiche e chimiche sedimenti	x	x	x		x		x		x		x	
Ecotossicologia su campioni di sedimento	x	x	x		x		x		x		x	
Biomarkers e inquinanti in <i>M. galloprovincialis</i>				x	x	x	x	x	x	x	x	
Macrozoobenthos	x	x										

Nel presente rapporto sono descritti i risultati relativi a tutti i punti del precedente elenco ottenuti nel corso del 9° survey post lavori (estate 2014). Per i risultati precedenti consultare Fabi et al., 2011a; 2011b; 2012; 2014a; 2014b; 2015a; 2015b; 2016.

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.

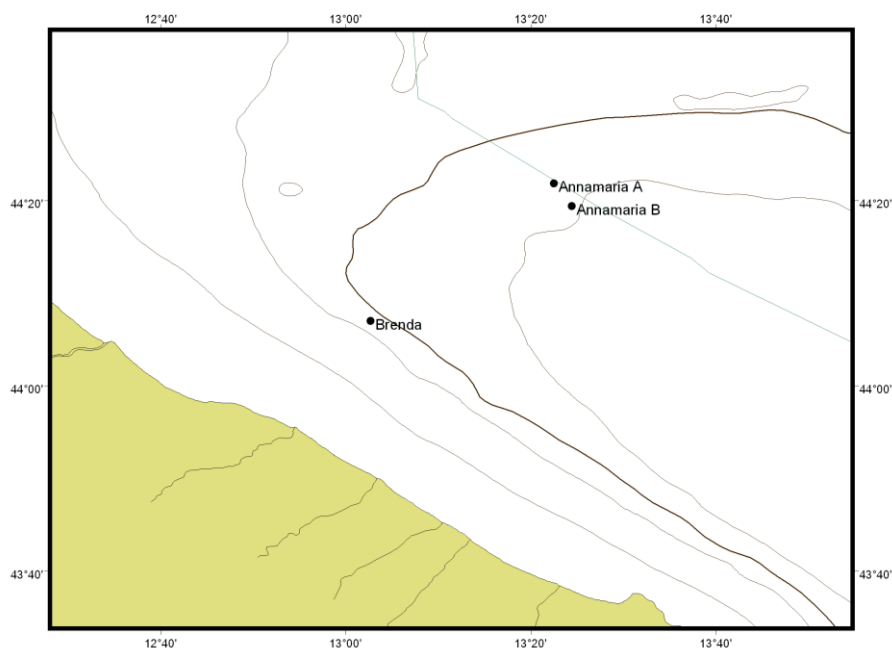


Fig. 2.1 – Ubicazione della piattaforma Annamaria B.



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 27/05/2014 al 31/12/2014 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 26 celle da 2 m, coprendo in questo modo 53 m di profilo. Il tempo di campionamento è stato impostato a 30' e 60 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 2014 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; 2015a; 2015b; 2016), 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).

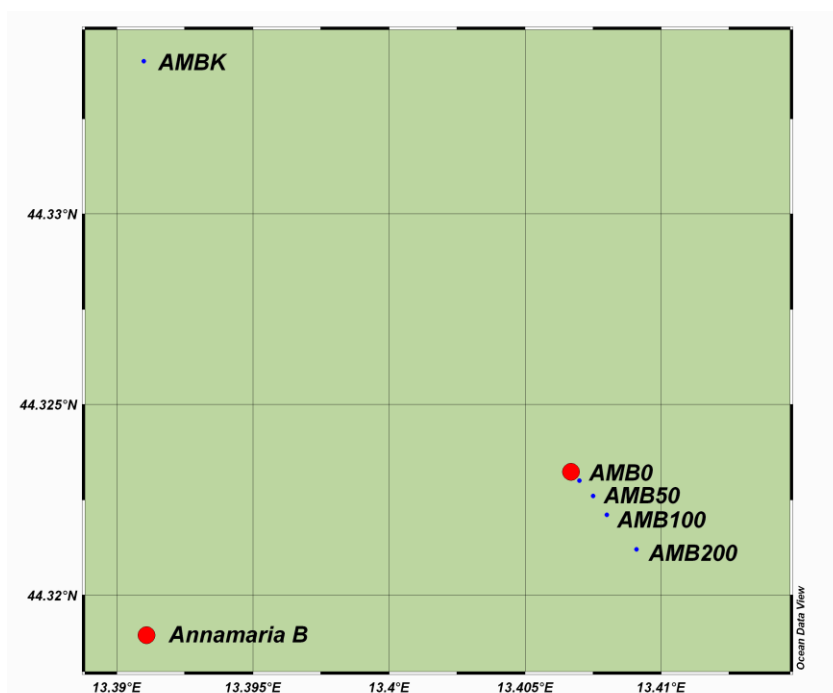


Fig. 2.3 - Schema delle stazioni di campionamento utilizzate dopo i lavori di installazione della piattaforma Annamaria B per le indagini idrologiche.

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. Le misure sono state ottenute utilizzando la sonda multiparametrica CTD (Conductivity-Temperature-Depth) della Sea-Bird Electronics modello SBE19plusV2 (All. A1-II), equipaggiata con un fluorimetro Turner - Cyclops7 per la misurazione della concentrazione di clorofilla *a*, con un torbidimetro (Backscatterometro) Turner - Cyclops7 per la misurazione del particolato sospeso (TSM) e con un sensore di ossigeno SBE43 per la determinazione della concentrazione di ossigeno disciolto (fig. 3; Tab. 2). La sonda ha una frequenza di acquisizione di 4 serie di dati al secondo (4 Hz).

La sonda SBE19plusV2 è stata calibrata dalla Ditta costruttrice per i parametri di

pressione, temperatura e conducibilità. I sensori di ossigeno disciolto, fluorescenza e torbidità sono stati calibrati con campioni raccolti *in situ* durante la campagna di monitoraggio e analizzati per il contenuto di ossigeno disciolto (metodo Winkler), di pigmenti clorofilliani (Chl, metodo HPLC) e per contenuto di materiale particellato totale (TSM, metodo gravimetrico).

In ogni stazione è stata misurata anche 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 2014 è pertanto avvenuto l'ottavo 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: $5,00 \pm 0,60$ cm;

VA: $5,60 \pm 0,50$ cm;

LA: $5,30 \pm 0,45$ 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, 2012 e 2013, anche in quella del 2014 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).

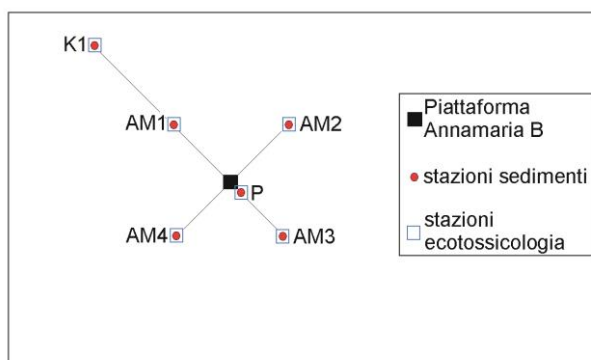


Fig. 2.4 - Schema di campionamento dei sedimenti (non in scala). P = stazione posta in corrispondenza della struttura; AM1, AM2, AM3, AM4 = stazioni poste a 60 m di distanza dalla struttura; K1 = stazione posta a 1000 m dalla struttura (controllo).

Le coordinate, la posizione rispetto alla piattaforma Annamaria B e le profondità delle singole stazioni campionate nell'estate 2014 sono riportate in Tab. 2-III.

Tab. 2-III - Dati identificativi delle stazioni di campionamento utilizzate nell'estate 2014 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'',68E	59,2
AM2	60	NE	44°19'23'',22N 13°24'28'',86E	59,3
AM3	60	SE	44°19'19'',86N 13°24'28'',80E	59,4
AM4	60	SW	44°19'19'',38N 13°24'22'',62E	59,4
P	0	SE	44°19'21'',00N 13°24'27'',12E	59,4
K1	1000	NW	44°19'39'',90N 13°23'52'',14E	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°C ad eccezione di quelli utilizzati per le analisi granulometriche, conservati a +4°C.

2.1.5.2 Ecotossicologia dei sedimenti

Durante il survey condotto nell'estate 2014 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.

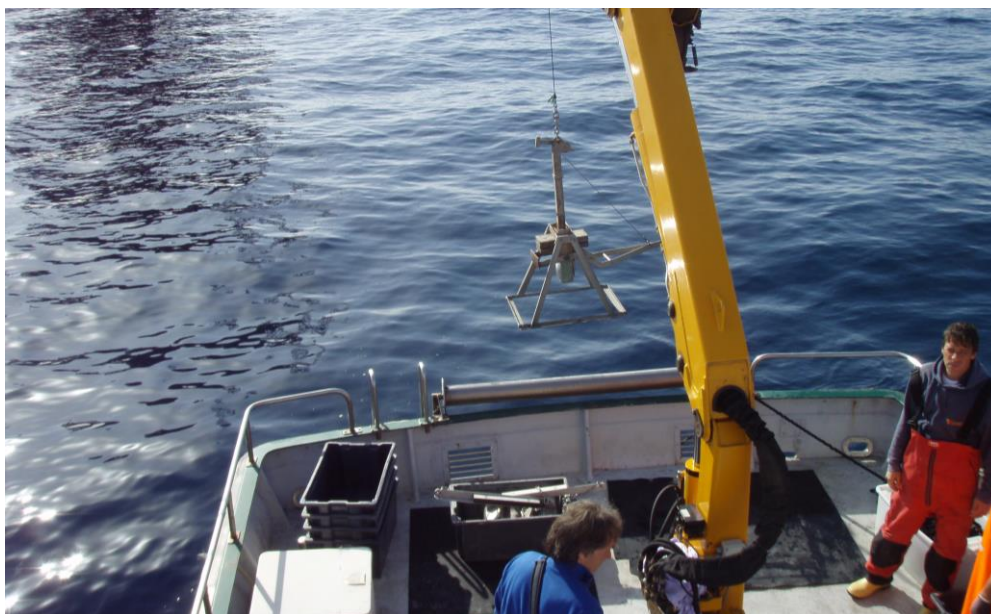


Fig. 2.5 – Box-corer utilizzato per le indagini fisiche e chimiche dei sedimenti.

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 a quote discrete, utilizzati per calibrare i sensori montati sulla sonda SBE 9plus, sono stati analizzati per valutare il contenuto dell'ossigeno disciolto, del sospeso totale come peso secco 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 3 ore dal campionamento (Strickland e Parsons, 1972; Saggiomo et al., 1990). Per la titolazione con tiosolfato di sodio è stata utilizzata una buretta automatica Metrohm Basic Titrino 794 (All. A1-III). La standardizzazione è stata effettuata mediante confronto con soluzione a titolo certificato di iodato di potassio.

I dati di ossigeno disciolto sono stati utilizzati per calibrare i valori misurati dal sensore SBE 43 installato sulle sonde CTD per i profili in continuo.

I campioni per la determinazione dei **pigmenti clorofilliani** sono stati filtrati immediatamente dopo il prelievo su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F (porosità = 0.7 μm ; Ø 47 mm), conservati in freezer a -20°C fino al momento dell'analisi. Le analisi delle clorofille componenti *a*, *b* e *c* sono state effettuate secondo il metodo Vidussi *et al.* (1996) mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) HP 1090 (All. A1-IV) dotato di detector DAD (*photodiode array detector*), utilizzando una colonna Synergy-

Hydro Reversed-phase (150 mm x 3 cm x 4 μ m). I dati sono stati acquisiti tramite integratore HP 3396 series II. L'identificazione dei pigmenti è stata effettuata per confronto con standard esterni (DHI Laboratories) settando la lunghezza d'onda per la lettura a 440 nm.

Il **carico solido totale** (TSM-Total Suspended Matter) è stato quantificato utilizzando la seguente procedura: i campioni prelevati mediante bottiglie idrologiche sono stati filtrati immediatamente dopo il prelievo su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F (porosità = 0.7 μ m; Ø 47 mm), prepesati a freddo con bilancia analitica Mettler 0,01 mg e riposti in singoli portafiltri numerati. La filtrazione è stata effettuata per aspirazione, con la minore depressione possibile per evitare la rottura delle cellule, in ogni caso ≤ 200 mm Hg. Per eliminare i residui salini il filtro è stato risciacquato nella fase finale della filtrazione del campione per 3 volte con acqua Milli-Q. Al termine della filtrazione i filtri sono stati conservati a -20°C in un essiccatore fino al momento dell'analisi. La determinazione in laboratorio del peso secco totale è avvenuta per via gravimetrica dopo essiccazione a 50-60°C per 4 ore, secondo le indicazioni riportate da Strickland e Parsons (1972). Il peso dei singoli filtri combusti è stato sottratto al peso del filtro corrispondente su cui è stato filtrato il campione. Le concentrazioni di TSM sono state espresse in mg/l.

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). Per la presentazione grafica dei risultati sono stati utilizzati il software Grapher™ Vers. 11.3. della Golden Software, Inc., e il software Ocean Data View © Vers: 4.6.3 (Schlitzer, 2015).

2.2.1.1 Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina

Il parametro idrocarburi totali per le acque è da intendersi come somma delle due seguenti classi:

- a) i composti che, dopo i processi di estrazione e purificazione sono rilevati mediante GC-FID, su colonna capillare non polare con tempi di ritenzione compresi tra quelli del n-decano (C₁₀H₂₂) e del n-tetracontano (C₄₀H₈₂) (frazione estraibile).
- b) i singoli idrocarburi, determinati mediante spazio di testa e analisi in gascromatografia con rivelatore FID, compresi tra il n-pentano (C₅H₁₂) e in n-decano (C₁₀H₁₂) inclusi (frazione volatile).

Analisi frazione volatile: Il metodo è applicabile a una vasta gamma di composti organici che hanno una volatilità sufficientemente elevata da essere efficacemente rimossi dal campione mediante la procedura di equilibrio in spazio di testa (EPA, 2003a).

In laboratorio, parte del campione d'acqua viene trasferito in una vial per spazio di testa. All'interno della vial viene inoltre aggiunto un modificatore di matrice e il relativo standard interno; successivamente la vial chiusa e ben mescolata e posizionata nell'autocampionatore è mantenuta a temperatura ambiente. Il modificatore di matrice ha lo scopo di ben separare i composti volatili all'interno dello spazio di testa. Circa 1 h prima dell'analisi, le singole fiale vengono riscaldate e miscelate per vibrazione meccanica.

L'autocampionatore poi pressurizza le vials con gas elio il quale spinge la miscela gassosa formatasi nello spazio di testa, attraverso una linea di trasferimento riscaldata, nella colonna GC. Le analisi sono eseguite utilizzando un GC con rilevatore a fiamma (FID).

Analisi frazione estraibile: Utilizzando un cilindro graduato è stato misurato 1 l (nominale) di campione, travasato poi dal cilindro nell'imbuto separatore utilizzando circa 60 ml di cloruro di metilene per sciacquare il cilindro. L'imbuto di separazione è stato quindi scosso energicamente per circa 2 minuti, con sfiato periodico per scaricare la pressione in eccesso. Lo strato organico è stato lasciato separato dalla fase acquosa per almeno 10'. L'estrazione è stata ripetuta per altre due volte con porzioni fresche di solvente e alla fine sono stati uniti i tre estratti di solvente. L'essiccazione del campione dell'estratto è avvenuta tramite passaggio dello stesso su colonna di vetro, riempita con 20 g di sodio solfato anidro. Successivamente è stata eseguita la concentrazione in evaporatore rotante per effettuare il cambio del solvente per la successiva analisi cromatografica, effettuata mediante l'impiego di gascromatografo con rilevatore a fiamma (FID) con colonna capillare (EPA, 2003b).

Gli idrocarburi totali sono stati determinati con un gascromatografo GC 8000 FISIONS INST. con colonna capillare e rivelatore F.I.D., munito di autocampionatore per spazio di testa statico a 50 posizioni (All. A1-V).

2.2.2. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA

2.2.2.1 *Dunaliella tertiolecta*

Il saggio di crescita algale con la cloroficea *Dunaliella tertiolecta* è stato eseguito secondo le indicazioni riportate nella linea guida ASTM E1218-04-E1 (2004). Il saggio consiste nell'esposizione di una quantità definita di clone algale in condizioni di crescita

esponenziale al campione e al controllo negativo costituito da sola acqua marina artificiale. Prima dell'inoculo del clone algale, tutti i trattamenti, compreso il controllo, sono stati arricchiti con macro- e micronutrienti secondo le specifiche riportate in USEPA (1995).

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

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

Sulla base dei risultati espressi in termini di inibizione/stimolazione della crescita e dell'analisi statistica del dato eco-tossicologico (eseguita secondo lo schema USEPA, 1991), i risultati del saggio 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_{20} (Christensen *et al.*, 2009) a causa dei dati ottenuti alle varie diluizioni.

QA/QC - La sensibilità di ogni clone algale impiegato per i test con i campioni di elutriato è stata verificata mediante il test di controllo positivo eseguito con bicromato di potassio il cui risultato, espresso come EC₅₀, 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 come cromo; altri parametri che devono essere rispettati affinché il test sia considerato valido sono:

- la densità cellulare dopo 72 h deve aumentare di un fattore non inferiore a 16 rispetto al valore di partenza (2×10^3 cellule/ml);
- 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 μ . Il risultato del test è stato espresso come differenza percentuale della bioluminescenza (Δ % biol.) del campione a una concentrazione del 90% rispetto al controllo (acqua di mare naturale). La significatività della differenza è stata valutata mediante il test-t di Student. Il giudizio qualitativo è stato formulato in base alla scala di tossicità riportata in Tab. 2-IV.

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

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

2.2.2.3 *Tigriopus fulvus*

Tigriopus fulvus Fischer (fig. 2.6) 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[®] (I.O.[®]), all'interno di fiasche per coltura in polistirene da 150cm² (0,5 l) con tappo ventilato, munito di membrana da 0,22 μ m alle seguenti condizioni (Faraponova *et al.*, 2005):

- salinità al 38 ± 1 PSU;
- temperatura di $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- fotoperiodo 16L/8B ad una luminosità di 500–1200 lux;
- alimentazione *ad libitum* con Tetramarin[®].

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

E' stata utilizzata una coltura sincronizzata di nauplii con età di 24–36 h provenienti da una coltura isolata di femmine ovigere (fig. 2.6) 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) stabilità delle membrane lisosomiali.
Indici di esposizione:	metallotioneine; livelli di lipofuscine; livelli di lipidi neutri.
Danno genotossico:	test della cometa.

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

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

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

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

1995).

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

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

In laboratorio le ghiandole digestive di 5 mitili provenienti da ciascun sito sono state tagliate in modo 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 naphtol 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 Metallotioneine - La valutazione del contenuto in metallotioneine rappresenta un importante indice di stress specifico in quanto Le metallotioneine sono proteine cellulari inducibili dall'accumulo nella cellula di cationi di metalli pesanti. Pertanto, la valutazione della loro concentrazione tissutale nelle cellule della ghiandola digestiva del mitilo risulta un parametro specifico per quantificare la risposta biologica degli animali all'inquinamento da metalli pesanti quali Cu, Cd, Hg, Zn, Pb, ecc.

Al momento dell'analisi i tessuti (3 pool di 5-7 individui per ogni stazione) sono stati omogeneizzati in 3 volumi di Saccoroso/Tris-HCl addizionati di Leupeptina e β -mercaptoetanolo. L'omogenato è stato quindi centrifugato (All. A3-III) per ottenere una frazione solubile contenente le metallotioneine. Il sopranatante è stato successivamente precipitato con etanolo-cloroformio con il duplice scopo di rimuovere i tioli a basso peso molecolare e concentrare le metallotioneine; 1 ml di citosol è stato quindi addizionato con 1,05 ml di etanolo freddo e cloroformio e centrifugato a 6.000 x g per 10'. Il sopranatante così ottenuto è stato addizionato di 3 volumi di etanolo freddo e mantenuto a -20°C per 1 h e quindi centrifugato a 6.000 x g per 10' in rotore oscillante. Il pellet è stato lavato una volta con etanolo e cloroformio nel buffer di omogeneizzazione, ri-centrifugato, insufflato con azoto e risospeso in NaCl 0,25 M addizionato di 150 μ 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 mn.

Accumulo di Lipofuscine nei lisosomi – Questo metodo permette di determinare l'accumulo nei lisosomi dei prodotti finali della perossidazione lipidica delle membrane cellulari: le lipofuscine. Con il termine di ossidazione lipidica si intende una serie di reazioni chimiche favorite da specie reattive dell'ossigeno (ROS) che causano danni alle molecole lipidiche delle membrane cellulari. Gli eventi perossidativi si verificano comunemente nelle cellule viventi anche in condizioni fisiologiche, in quanto rappresentano una via catabolica per gli acidi grassi insaturi di membrana. L'esposizione a sostanze xenobiotiche, tra cui i contaminati organici, può favorire fenomeni perossidativi provocando danni cellulari. Il processo di perossidazione porta alla formazione di miscele complesse di prodotti di degradazione lipidica altamente tossici in grado di interagire sia con le proteine di membrana che con altri componenti cellulari alterandone le funzioni. Al termine del processo i prodotti 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 ($\text{pH} > 13$) 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 USEPA 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°C in 30'. Si è quindi portato il campione a 115°C per 150' e si è proceduto al raffreddamento parziale e all'aggiunta di ulteriori 1,5 ml di HNO_3 , 3,5 ml di H_2SO_4 e 1 ml di HCl . Il campione è stato poi lasciato rifluire per ulteriori 150' a 110°C .

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

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

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

Gas carrier/flusso: Argon/ 15 l min^{-1}
 Flusso supplementare: 0,2 ml/min
 Flusso entrata campione: 1,5 ml/min

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

2.2.3.3 Idrocarburi totali

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

Una quantità nota di campione (5-10 g) è stata dapprima liofilizzata e successivamente estratta mediante sonicazione a freddo per 60' con 50 ml di acetone/n-eptano (1:1 v/v). Nella soluzione estraente è stata aggiunta la soluzione di riferimento per la finestra dei tempi di ritenzione contenente n-pentano (C_5), n-dodecano (C_{12}) e n-tetracontano (C_{40}). 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 C₅, C₁₂ e C₄₀. La quantità di idrocarburi è stata quindi determinata mediante confronto con la soluzione di riferimento esterno costituito da quantità uguali di tre standard. Inoltre, sono state disposte prove in bianco per ogni serie di analisi al fine di identificare la baseline.

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 µ. 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 µ, 2000 µ, 1000 µ, 500 µ, 250 µ, 125 µ, 63 µ). 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 µ) 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 (2003a)

ed EPA 8015D (2003b), 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⁻¹). Per gli idrocarburi pesanti (C>12) sono stati seguiti i metodi EPA 3545A (2007a), EPA 3620C (2007b) ed EPA 8015D (2003b). 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). 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 mg/kg 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 HNO₃, 3 ml di 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 (2007c).

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

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.

Ba	Cd	Zn
122	78	108

Tab. 2-VII - Limiti di quantificazione espressi in mg/kg. 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-E1 (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 2×10^3 cellule ml^{-1}), le piastre sono state trasferite per 72 h in camera fitologica a condizioni di temperatura e luminosità controllate ($T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$, luminosità < 10000 lux). Al termine dell'esposizione è stata verificata la crescita algale nel campione, espressa come densità algale, mediante lettura al Coulter Counter; si è proceduto quindi al conteggio delle tre repliche del campione tal quale e del controllo e al

loro confronto statistico, per verificare eventuali aumenti o diminuzioni significative della crescita algale nel campione rispetto al controllo e procedere eventualmente alla lettura delle altre diluizioni.

Espressione e analisi dei dati – I risultati del saggio sono stati riportati come percentuale di inibizione della crescita algale e, qualora la tossicità del campione lo consenta, in termini di EC₅₀ o EC₂₀. L'EC₅₀ e l'EC₂₀ 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'EC₂₀ (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 EC₅₀, 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 come cromo; altri parametri che devono essere rispettati affinché il test sia considerato valido sono:

- la densità cellulare dopo 72 h deve aumentare di un fattore non inferiore a 16 rispetto al valore di partenza (2×10^3 cellule/ml);
- 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 OmniTM v. 1.16), che consente di individuare l'EC₅₀ (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/EC₅₀), 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[®].

Specie Test	Colonna A Tossicità assente /trascurabile	Colonna B Tossicità presente	Colonna C Tossicità elevata	Colonna D Tossicità molto elevata
<i>Vibrio fischeri</i> (sedimento)	S.T.I. ≤ 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: $36 \pm 2\text{‰}$
- Illuminazione: continua
- O₂ 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 mg/l CdCl_2 .

All'inizio e alla fine del saggio biologico sono stati misurati i seguenti parametri dell'acqua sovrastante il sedimento: pH, salinità, 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 (24/05 - 31/12/2014) le correnti sono risultate sostanzialmente in direzione SW in prossimità sia della superficie, sia del fondo (figg. 3.1 e 3.2), con rotazioni verso NE in alcuni brevi periodi. L'intensità della corrente è apparsa abbastanza costante e di modesta intensità, compresa tra 17 e 21 cm/s. Nei cinque bin più vicini alla superficie (da -10 m), dove si è stabilizzata intorno ai 18-20 cm/s, è risultata mediamente superiore rispetto al fondo.

La temperatura misurata dal correntometro durante il periodo (fig. 3.3) ha presentato un andamento crescente da maggio ad agosto, passando da circa 14,2°C a 15,8°C; a fine mese si è ridotta lievemente restando più o meno costante sino a novembre (attorno a 15,2°C). E' seguito un picco (18,5°C) tra novembre e dicembre, coerentemente con le misure dell'anno precedente (Fabi *et al.*, 2015b).

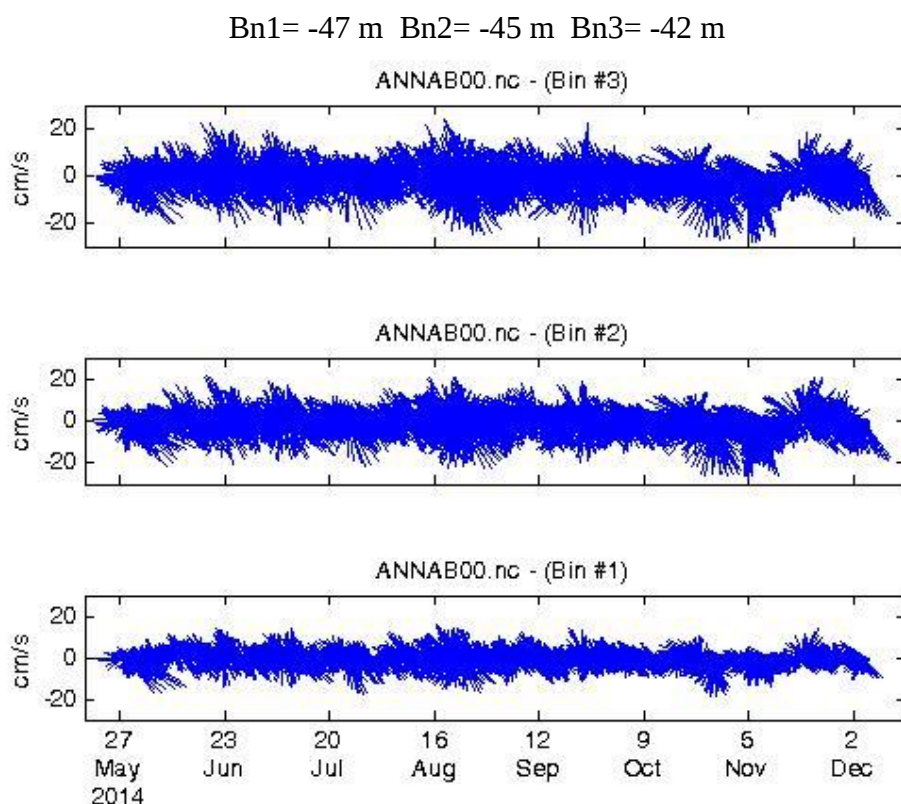


Fig. 3.1 - Stickplot della corrente (medie giornaliere) registrata dall'ADCP in prossimità del fondo nel periodo 27/05 - 31/12/2014.

Bn19= -9 m Bn20= -7 m Bn21= -5 m

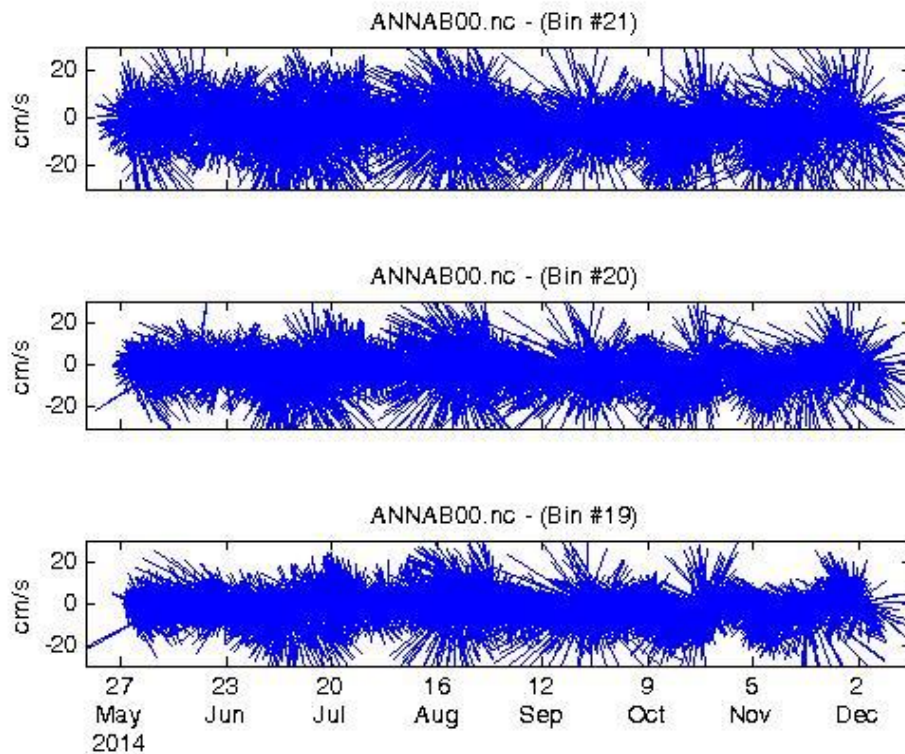


Fig. 3.2 - Stickplot della corrente (medie giornaliere) registrata dall'ADCP in prossimità della superficie nel periodo 27/05 - 31/12/2014.

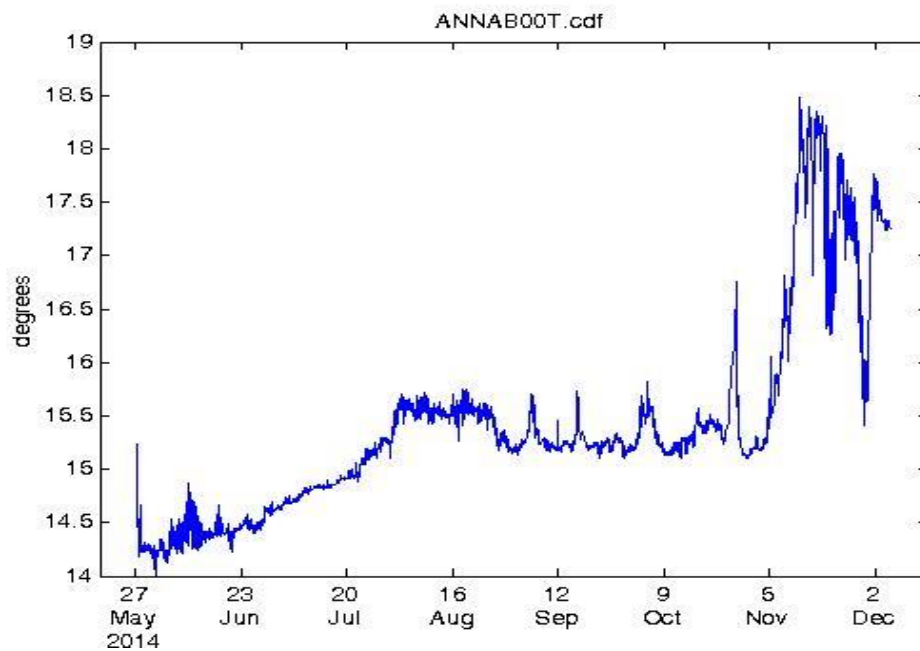


Fig. 3.3 - Andamento della temperatura registrata in prossimità del fondo (media mobile 36 ore).

3.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA

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

Nel monitoraggio condotto nel mese di **agosto 2014** la **temperatura** ha presentato nei primi 15-20 m valori di circa 25°C e un termoclino a circa 20 m, in corrispondenza del quale è avvenuto un decremento repentino (fino a 20°C) seguito da una diminuzione graduale più in profondità che ha portato a 15,3°C in prossimità del fondo (fig. 3.4). Non si sono evidenziate differenze tra le cinque stazioni poste lungo il transetto.

I valori di **salinità** sono risultati inferiori a 34 psu in superficie (fig. 3.4). Limitatamente a questo strato superficiale, in corrispondenza della stazione AMB0 è stata riscontrata una salinità lievemente superiore rispetto alle altre. Sotto lo strato superficiale è aumentata nettamente raggiungendo valori maggiori di 38 psu a circa 20 m. Negli strati inferiori è avvenuto un ulteriore ma lieve incremento che ha portato al massimo di salinità (38,4 psu) in corrispondenza del fondo in tutte le stazioni.

La **torbidità** è risultata intorno a 1,1-1,2 NTU in superficie, con un andamento lievemente decrescente con la profondità fino a raggiungere valori di 1,0 NTU intorno ai 50 m. Sotto tale quota la torbidità è aumentata decisamente in prossimità del fondo, raggiungendo un massimo di 1,9 NTU in AMB200.

L'**ossigeno disciolto** ha mostrato un andamento crescente dalla superficie, dove sono stati registrati valori di poco superiori alla saturazione, fino alla quota di 20 m, dove ha raggiunto circa il 120%. A profondità maggiori la saturazione si è ridotta fino al fondo dove sono stati registrati valori di circa 95% (fig. 3.4). Anche in questo caso non sono state evidenziate differenze rilevanti tra le stazioni.

La **trasparenza**, misurata mediante disco di Secchi, nel corso del monitoraggio condotto ad agosto 2014 è risultata compresa tra 8 e 11 m in tutte le stazioni (Tab. 3-I). Il valore più basso (8 m) è stato misurato nella stazione AMB0, più vicina alla piattaforma, molto simile a quanto rilevato in AMB50 (9 m), mentre nelle stazioni che distano più di 50 m i valori sono stati più elevati (10-11 m) e confrontabili con quello del controllo AMBK.

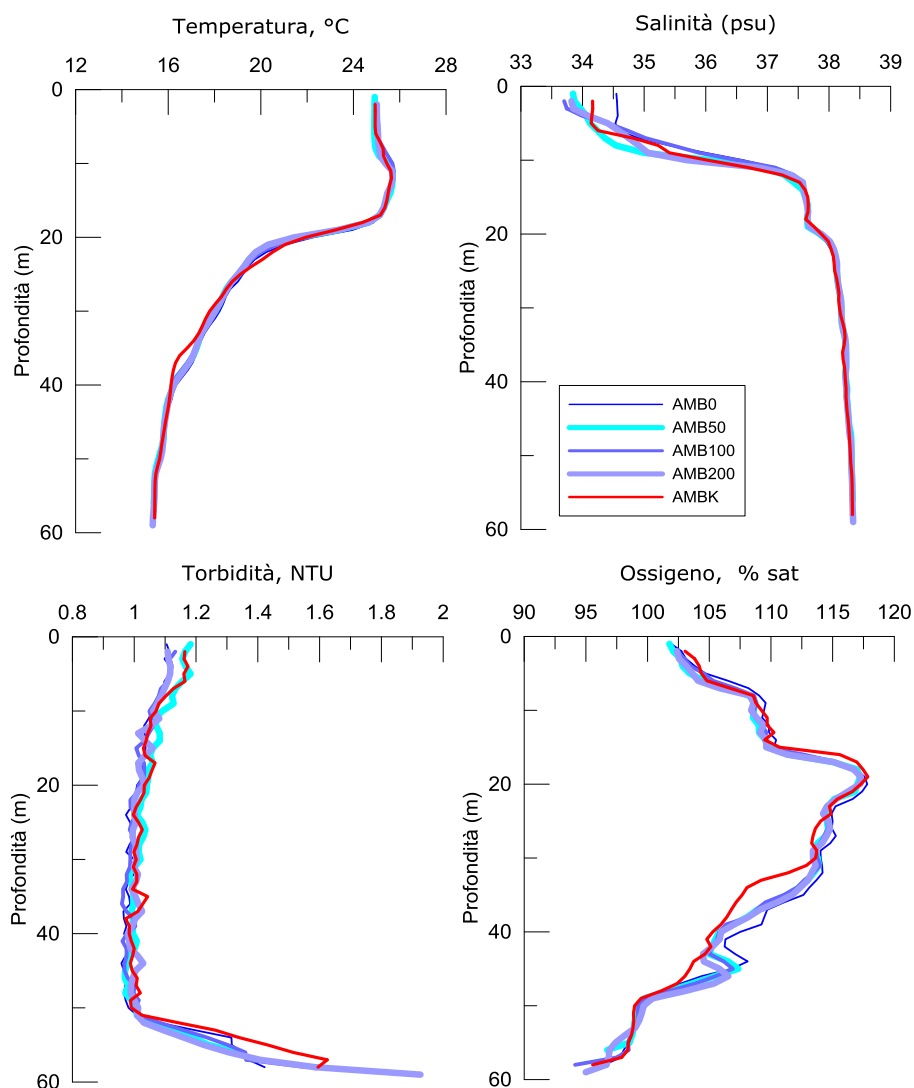


Fig. 3.4 - Profili di temperatura (°C), salinità (PSU), torbidità (NTU) e saturazione di ossigeno (%). Agosto 2014.

Tab 3-I -Trasparenza della colonna d'acqua, stimata dalla torbidità, lungo il transetto NW–SE nel survey effettuato nell'agosto 2014.

Stazione	Profondità stazione (m)	Disco Secchi (m)
AMBK	59	11
AMB0	59	8
AMB50	59	9
AMB100	59	11
AMB200	58	10

3.2.2. FLUORESCENZA INDOTTA, CLOROFILLA A E TSM

In agosto la concentrazione di clorofilla, misurata come **fluorescenza *in situ*** (espressa in µg/l di clorofilla), ha presentato valori attorno a 0,5 µg/l fino a circa 50 m di profondità e un rapido aumento alle quote maggiori (fig. 3.5a). Sul fondo i valori sono risultati ovunque >2 µg/l, con un massimo di 4,7 µg/l nella stazione AMB200.

I valori di **clorofilla a**, misurata mediante HPLC, sono risultati pari a circa 0,2 µg/l e pressoché costanti fino a circa 40 m di profondità (fig. 3.5b); sul fondo essi sono aumentati raggiungendo un massimo di 1,48 µg/l nella stazione AMB200.

Infine, il **TSM** misurato con metodo gravimetrico è risultato intorno a 2,7-2,8 mg/l in superficie, mostrando una diminuzione fino a 40 m e un successivo aumento al fondo fino a un massimo di 3,64 mg/l in AMB200 (fig. 3.5c).

Non sono state osservate variazioni di rilievo fra le varie stazioni.

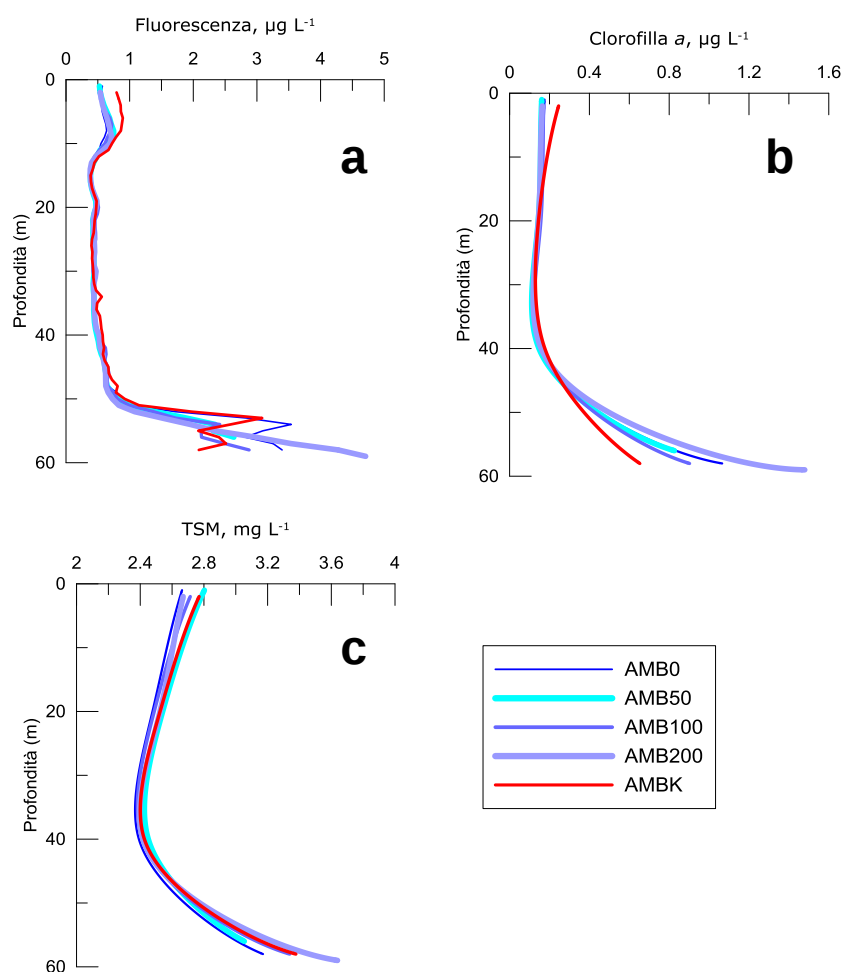


Fig. 3.5 - Profili di a) fluorescenza (µg/l), b) clorofilla *a* (µg/l) e c) Total Suspended Matter (mg/l). Agosto 2014.

3.2.3. RICERCA DI IDROCARBURI TOTALI SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA

I risultati relativi ai livelli di Idrocarburi totali (C₅-C₄₀) determinati nei campioni prelevati nell'estate 2014 (Tab. 3-II) confermano la totale assenza di questi composti organici come già evidenziato a partire dall'estate 2010 (Fabi *et al.*, 2016).

Tab. 3-II - Idrocarburi totali ($\mu\text{g/l}$) ricercati nell'estate 2014 in corrispondenza delle quattro quote di ciascuna stazione utilizzata per le indagini fisiche e chimiche della colonna d'acqua. $10 \mu\text{g/l}$ = 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 $K_2Cr_2O_7$ (11,2 mg/l come cromo) sono rientrati nei limiti della carta di controllo intra-laboratorio (5 – 16,0 mg/l); i coefficienti di variazione tra le repliche nei campioni non diluiti, alla massima concentrazione, sono risultati conformi perché in tutti i casi inferiori al 15%. La crescita algale nei controlli è sempre risultata superiore rispetto al limite minimo stabilito per il metodo di coltura ottimale (fattore ≥ 16).

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

Tab 3-III - Parametri di contorno e risultati relativi al saggio di tossicità con *D. tertiolecta* nei campioni di acqua prelevati nell'estate 2014. 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	8,25	-8%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-20	8,27	-14%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,23	-15%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,28	-13%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB0	Superficie	8,18	-36%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,21	-19%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,16	-18%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,18	-12%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB50	Superficie	8,20	-23%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,27	-13%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,23	-14%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,18	-10%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB100	Superficie	8,25	-24%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,26	-15%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,19	-15%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,17	-17%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB200	Superficie	8,23	-29%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,21	-13%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,20	-18%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,25	-11%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto

In tutti i 16 campioni non è stato notato alcun effetto tossico sulla crescita algale, confermando quanto evidenziato sin dall'estate 2011 (Fabi *et al.*, 2016). Nei campioni superficiali eccetto quello relativo ad AMBK è stato osservato un effetto eutrofizzante (crescita algale leggermente superiore rispetto al controllo) compreso tra -36% e -23% rispetto al controllo.

3.3.2. *VIBRIO FISCHERI*

QA-QC – I valori EC_{50} (0,75 mg/l e di 0,32 mg/l rispettivamente a 5' e 15') con la sostanza di riferimento (Cu^{++}) sono rientrati nel range di riferimento relativo al test Microtox® (0,42–1,16 mg/l e 0,03–0,75 mg/l rispettivamente) UNICHIM (Onorati *et al.*, 2007).

Risultati del saggio - I risultati del test hanno dimostrato l'assenza di tossicità acuta in tutti i campioni confermando i risultati ottenuti sin dall'estate 2010 (Fabi *et al.*, 2016). In Tab. 3-IV sono riportati i risultati del test, mentre in Tab. 3-V è indicata la relativa stima di tossicità.

Tab. 3-IV - Risultati del saggio biologico con il *V. fischeri* applicato ai campioni di acqua marina prelevati nell'estate 2014. 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	-3,72	-2,64	6,13	>0,05	5,55	1,84	9,27	>0,05
	-20 m	-1,47	-4,60	1,64	>0,05	0,88	-3,97	2,20	>0,05
	-40 m	-1,01	-3,15	4,21	>0,05	0,95	-4,09	4,28	>0,05
	Fondo	-2,05	-1,00	5,96	>0,05	0,21	-7,35	7,78	>0,05
AMB0	Superficie	5,66	-3,37	14,71	>0,05	6,51	-3,14	16,16	>0,05
	-20 m	0,42	-2,51	3,36	>0,05	-0,50	-3,45	2,44	>0,05
	-40 m	-1,23	-6,36	3,90	>0,05	-1,50	-7,94	4,94	>0,05
	Fondo	5,51	-2,38	13,41	>0,05	1,34	6,61	20,35	>0,05
AMB50	Superficie	-0,35	-4,09	3,39	>0,05	0,39	-3,61	4,40	>0,05
	-20 m	10,22	8,49	11,96	>0,05	14,27	12,07	16,47	>0,05
	-40 m	11,90	9,81	13,98	>0,05	15,66	13,77	17,55	>0,05
	Fondo	3,47	0,31	6,62	>0,05	11,00	8,04	13,95	>0,05
AMB100	Superficie	0,75	-2,78	4,29	>0,05	0,64	-5,18	3,88	>0,05
	-20 m	1,15	-2,33	4,64	>0,05	1,42	-4,67	7,51	>0,05
	-40 m	5,89	3,92	7,86	>0,05	12,18	9,30	15,06	>0,05
	Fondo	1,65	-3,15	6,45	>0,05	1,22	-1,84	4,29	>0,05
AMB200	Superficie	9,23	7,69	10,78	>0,05	10,64	7,55	13,73	>0,05
	-20 m	6,86	-9,75	23,49	>0,05	11,09	-3,31	25,51	>0,05
	-40 m	-1,18	-5,21	8,65	>0,05	-0,23	-4,60	10,31	>0,05
	Fondo	0,70	-3,01	5,20	>0,05	1,70	-3,56	6,13	>0,05

Tab. 3-V - Stima di tossicità relativa al saggio biologico con *V. fischeri* effettuato nell'estate 2014. 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 di sopravvivenza sono riportati in Tab. 3-VI.

Non è stato evidenziato alcun effetto tossico nei confronti della sopravvivenza del crostaceo *T. fulvus* confermando quanto osservato sin dall'estate 2010 (Fabi *et al.*, 2016).

Tab. 3-VI - Risultati del saggio biologico condotto con *Tigriopus fulvus* sui campioni di acqua marina prelevati nel corso dell'estate 2014. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

Stazione	Quota	$\Delta\%$ sopravvissuti vs controllo $\pm$ d.s.	T test	Giudizio
Controllo	---	100,0 $\pm$ 0,0	---	----
AMBK	Superficie	96,0 $\pm$ 1,53	p>0,05	Assente
	-20 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
	-40 m	97,0 $\pm$ 0,58	p>0,05	Assente
	Fondo	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
AMB0	Superficie	95,0 $\pm$ 0,98	p>0,05	Assente
	-20 m	100 $\pm$ 0,00	n.d.	Assente
	-40 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
	Fondo	94,0 $\pm$ 2,00	p>0,05	Assente
AMB50	Superficie	98,0 $\pm$ 1,73	n.d.	Assente
	-20 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
	-40 m	100,0 $\pm$ 0,00	p>0,05	Assente
	Fondo	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
AMB100	Superficie	98,0 $\pm$ 1,25	p>0,05	Assente
	-20 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
	-40 m	98,0 $\pm$ 0,98	p>0,05	Assente
	Fondo	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
AMB200	Superficie	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
	-20 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
	-40 m	100,0 $\pm$ 0,0	n.d.	Assente
	Fondo	97,0 $\pm$ 2,00	p>0,05	Assente

3.4. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

3.4.1. BIOMARKERS

In Tab. 3-VII sono riportati i valori dei biomarkers analizzati nei mitili prelevati vicino (VA) e lontano (LA) dall'anodo di sacrificio della piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nell'estate 2014.

Tab. 3-VI - Valori medi dei biomarker ($\pm$ dev.std.) determinati nei mitili campionati nell'estate 2014 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)	7,8	8,0	7,9
Stabilità lisosmiale	min	41,0 $\pm$ 3,5	30,0 $\pm$ 3,5	29,4 $\pm$ 5,0
Lipidi neutri	densità ottica / pixels ²	21354 $\pm$ 1528	21234 $\pm$ 2840	21734 $\pm$ 2740
Lipofuscine	densità ottica / pixels ²	8112 $\pm$ 301	8027 $\pm$ 412	8105 $\pm$ 492
Metallotioneine	μ g MT/g	85,3 $\pm$ 15,0	116,8 $\pm$ 8,5	121,5 $\pm$ 4,5
Test della Cometa	% di coda DNA	2,0 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 1,5	3,5 $\pm$ 1,5

Stress on stress - I mitili prelevati nell'estate 2014 hanno presentato una sopravvivenza all'aria, misura dello stress on stress, compresa tra 7,8 e 8,0 gg (controllo e VA rispettivamente). I valori nel complesso sono risultati omogeneamente distribuiti (fig. 3.6) come già osservato precedentemente (Fabi *et al.*, 2016). Ciò porta a confermare una scarsa alterazione a livello fisiologico nei bivalvi esaminati. I tempi di sopravvivenza osservati sono apparsi simili, e in alcuni casi superiori, a quelli ottenuti in studi analoghi condotti in precedenza su piattaforme come PCMS-1, Calipso, Naide, Clara Nord e Clara Est (Fabi *et al.*, 2005a; 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gomiero *et al.*, 2011; 2015).

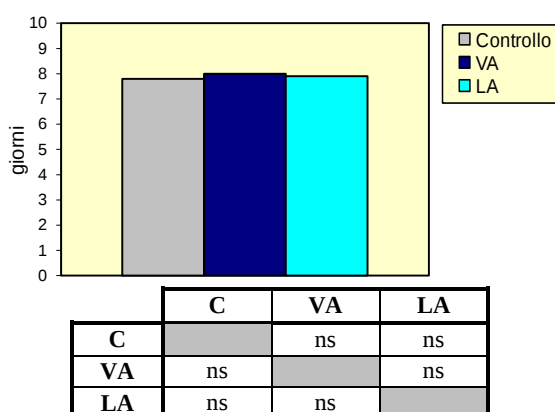


Fig. 3.6 - Distribuzione dei tempi di sopravvivenza all'aria riscontrati negli esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nel corso dell'estate 2014 e confronto statistico (test Kaplann-Meier, $p < 0,05$). VA = vicino all'anodo di sacrificio; LA = lontano dall'nodo di sacrificio.

Stabilità delle membrane lisosomiali - Nell'estate 2014 i mitili prelevati da

entrambi i siti della piattaforma hanno presentato un leggero ma significativo incremento della fragilità lisosomiale rispetto agli esemplari di controllo (fig. 3.7). Tale tendenza porta a confermare quanto osservato nel corso dell'intero periodo di indagine (Fabi *et al.*, 2016).

Nel complesso, comunque, i tempi di destabilizzazione registrati sono confrontabili a quelli di organismi in buono stato di salute (Donnini *et al.*, 2007). Essi appaiono inoltre simili, e in alcuni casi superiori, agli analoghi registrati in presso altre strutture estrattive offshore (Fabi *et al.*, 2005a; 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gomiero *et al.*, 2011; 2015) e in altre aree dell'alto Adriatico (Petrovic *et al.*, 2004), ma inferiori a quelli riportati da Gorbi *et al.* (2008) ottenuti però con una differente metodologia d'analisi.

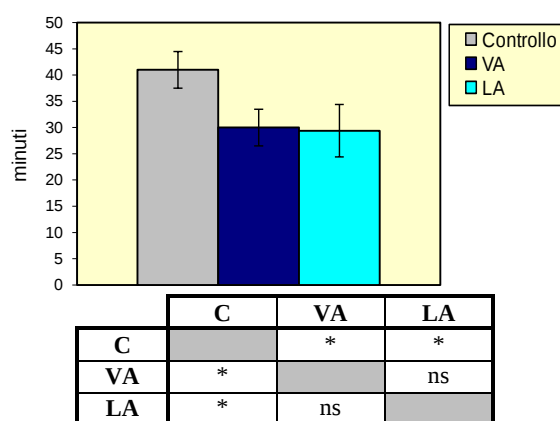


Fig. 3.7 - Valori medi dei tempi di destabilizzazione ($\pm$ ds) associati alla fragilità dei lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nell'estate 2014 e confronto statistico (test Anova, $p < 0,05$). VA = vicino anodo; LA = lontano dall'anodo.

Valutazione del contenuto di lipidi neutri - La distribuzione dei livelli di lipidi neutri è risultata omogenea nell'estate 2014 (fig. 3.8), come già osservato precedentemente (Fabi *et al.*, 2016). Nel complesso la distribuzione di valori tende ad escludere l'aumento delle alterazioni biologiche associate alla sintesi dei lipidi nei mitili prelevati dai siti della piattaforma e indotte dalla presenza di sostanze xeno-biotiche biodisponibili quali i composti organici, che sono sostanze capaci di alterare il normale metabolismo lipidico di un organismo marino. Confrontando i risultati ottenuti con la più recente letteratura si evidenziano risposte nella norma e assimilabili a organismi soggetti a una bassa pressione antropica (Gorbi *et al.*, 2008).

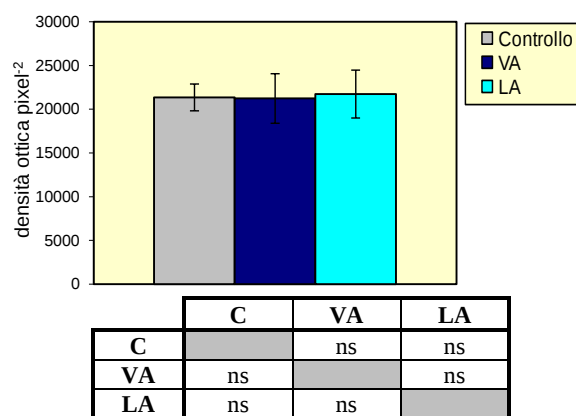


Fig. 3.8 - Valori medi di accumulo di lipidi neutri ($\pm$ ds) espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nel corso dell'estate 2014 e confronto statistico (test Anova, $p < 0,05$). VA = vicino anodo; LA = lontano dall'anodo.

Valutazione del livello di lipofuscine - Anche i livelli di lipofuscine evidenziati nei mitili prelevati nell'estate 2014 sono risultati omogenei nei tre siti di prelievo (fig. 3.9), come già osservato in quasi tutto il periodo di monitoraggio precedente (Fabi *et al.*, 2016).

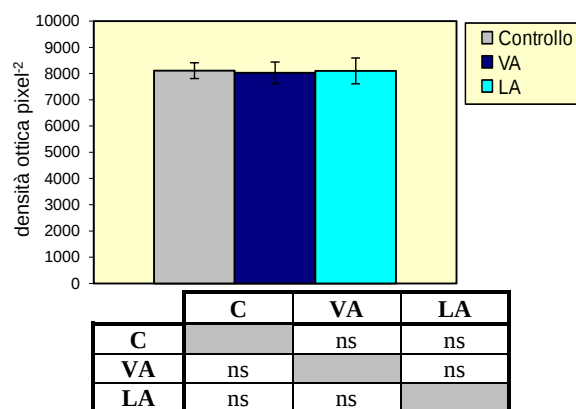


Fig. 3.9 - Valori medi di accumulo di lipofuscine ($\pm$ ds) espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nell'estate 2014 e confronto statistico (test Anova, $p < 0,05$). VA = vicino anodo; LA = lontano dall'anodo.

Nel complesso i livelli medi registrati non portano, quindi, a ipotizzare alcuna criticità correlabile alla presenza di stress perossidativo a carico degli organismi analizzati. Essi sono inferiori a quelli evidenziati nel corso di precedenti esperienze di monitoraggio in aree costiere dell'Adriatico settentrionale (Petrovic *et al.*, 2004) o su altre piattaforme offshore (Fabi *et al.*, 2005a; 2005b; 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gorbi *et al.*, 2008; Gomiero *et al.*, 2015).

Metallotioneine - Quanto rilevato nell'estate 2014 ha confermato gli incrementi significativi dei livelli di proteine metallo-chelanti nei mitili della piattaforma rispetto al

controllo (fig. 3.10) già osservati in quasi tutti i monitoraggi precedenti (Fabi *et al.*, 2016); ciò indica una significativa, seppur moderata, risposta biologica alla presenza di metalli pesanti. Comunque, le risposte finora rilevate rimangono più contenute rispetto a quanto osservato per altre piattaforme metanifere installate nella medesima zona di studio (Fabi *et al.*, 2005b; 2006; 2014c; Gomiero *et al.*, 2011; 2015).

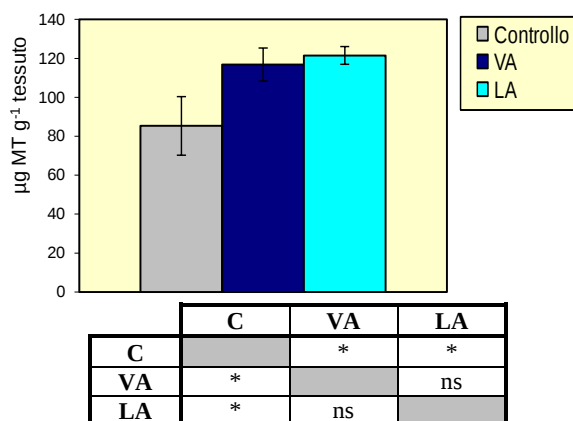


Fig. 3.10 - Concentrazioni di Metallothioneine ($\pm$ ds) rilevate nella ghiandola digestiva di mitilo (*M. galloprovincialis*) prelevati nell'estate 2014 e confronto statistico (test Mann-Whitney, $p < 0,05$). VA = vicino anodo; LA = lontano dall'anodo.

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 di controllo non ha evidenziato differenze significative tra i siti (fig. 3.11) come già precedentemente (Fabi *et al.*, 2016). Tale risposta biologica rientra all'interno di quanto è spesso osservabile naturalmente in organismi nativi prelevati presso aree marine e marino-costiere non soggette a significativa pressione antropica e non rappresenta, quindi, alcuna criticità ambientale (Klobučar *et al.*, 2008).

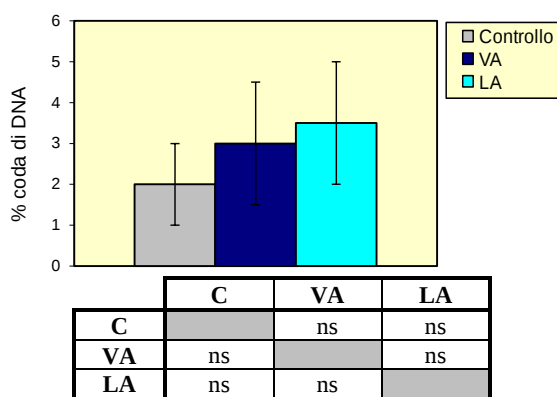


Fig. 3.11 - Livello di danno al DNA ($\pm$ ds) rilevato dal Test della Cometa negli emociti di esemplari di mitilo (*M. galloprovincialis*) prelevati nell'estate 2014 e confronto statistico (test Anova, $p < 0,05$). VA = vicino anodo; LA = lontano dall'anodo.

3.4.2. METALLI PESANTI

L'analisi della distribuzione evidenziata dagli organismi prelevati nell'estate 2014 conferma l'accumulo di Ba, Zn e Cd nei bivalvi prelevati dalle parti sommerse della piattaforma rispetto a quelli provenienti dal controllo (Tabb. 3-VII e 3-VIII; fig. 3.11), già osservato sin dal primo monitoraggio (Fabi *et al.*, 2016).

Nel complesso l'elemento maggiormente accumulato è risultato lo zinco, il cui massimo ($122,9 \pm 0,5$ mg/kg) è stato rilevato in LA, risultato statisticamente superiore agli altri due siti. Anche il contenuto registrato in VA è apparso significativamente maggiore rispetto al controllo. E' da rilevare che, rispetto al periodo di indagine precedente, lo zinco ha raggiunto i valori più bassi in entrambi i siti di Annamaria B, mentre al controllo è lievemente aumentato rispetto all'inverno 2014 (Fabi *et al.*, 2016).

Il cadmio ha evidenziato un livello di accumulo statisticamente superiore in LA ($0,27 \pm 0,01$ mg/kg) rispetto sia a VA ($0,20 \pm 0,01$ mg/kg) che al controllo ($0,14 \pm 0,01$ mg/kg). Una differenza significativa è stata rilevata anche tra VA e sito di riferimento. Analoga distribuzione era già stata osservata precedentemente nell'intero periodo di indagine (Fabi *et al.*, 2016). Comunque, presso LA è stato registrato il minimo dal primo monitoraggio, mentre in VA e al controllo le concentrazioni sono rimaste comparabili a quelle di quasi tutti i survey precedenti.

Infine, i contenuti di bario sono apparsi compresi tra $0,10 \pm 0,02$ mg/kg (controllo) e $3,50 \pm 0,05$ mg/kg (VA), con differenze significative tra tutti i tre siti. In questo caso, è stata confermata la distribuzione rilevata nell'inverno 2014, con il sito VA più contaminato di LA, mentre nei monitoraggi precedenti era stata sempre osservata una situazione opposta (Fabi *et al.*, 2016). Rispetto all'inverno 2014 è avvenuto un decremento in VA e un lieve aumento in LA, mentre il controllo è rimasto costante.

Nel complesso la distribuzione dei metalli osservata è in linea con quelle riportate da Fattorini *et al.* (2008) in uno studio mirato a valutare la biodisponibilità di metalli pesanti in mitili prelevati da diverse piattaforme offshore ubicate nell'Adriatico centro-settentrionale e da Gorbi *et al.* (2008), che ha indagato sull'accumulo di metalli pesanti in mitili prelevati dalle parti sommerse della piattaforma Giovanna. Quanto osservato è inoltre in linea con quanto riportato per altre strutture estrattive offshore installate in Adriatico (Fabi *et al.*, 2005a; 2005b; 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gomiero *et al.*, 2015).

Tab. 3-VII - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nel survey condotto nell'estate 2014. 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	110,5 $\pm$ 0,5	115,5 $\pm$ 0,5	122,9 $\pm$ 0,5
Cd	0,14 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01
Ba	0,10 $\pm$ 0,02	3,50 $\pm$ 0,05	3,22 $\pm$ 0,05

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

	Zinco				Cadmio				Bario		
	C	VA	LA		C	VA	LA		C	VA	LA
C		*	*			*	*			*	*
VA			*				*				*
LA											

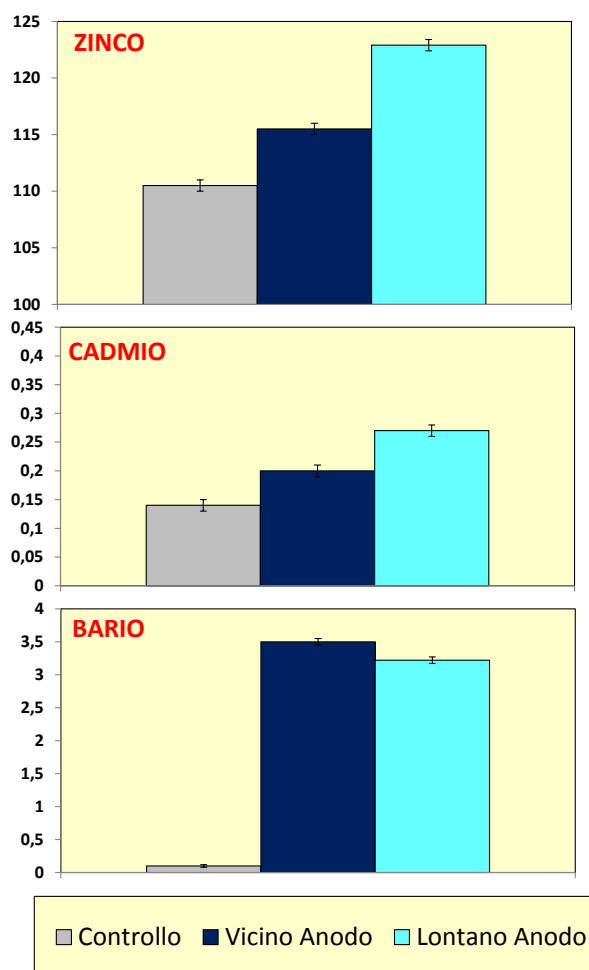


Fig. 3.13 - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nell'estate 2014. Valori espressi in mg/kg p.s. ($\pm$ ds).

3.4.3. IDROCARBURI TOTALI

Analogamente a quanto rilevato precedentemente (Fabi *et al.*, 2016), anche nell'estate 2014 è stata evidenziata una somma di idrocarburi (C5-C40) inferiore a 0,1 mg/kg p.s. in tutti siti, indicando l'assenza di 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 Annamaria B nell'estate 2014. Valori espressi in mg/kg p.s. n.c. = non calcolabile.

	Estate 2014		
	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 2014 apparivano costituiti in prevalenza da sabbia fine e finissima, con presenza di abbondante biodetrito conchifero (All. B).

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 Shepard (All. B). Tale componente è infatti risultata ovunque la più abbondante, seguita nell'ordine da quella siltosa e dall'argilla, in quantità decisamente inferiori. Non sono state rilevate differenze degne di nota tra le stazioni.

Nell'intero periodo di studio le variazioni sono risultate estremamente modeste, tutte inferiori al 5%, ad indicare un'elevata stabilità dei sedimenti analizzati.

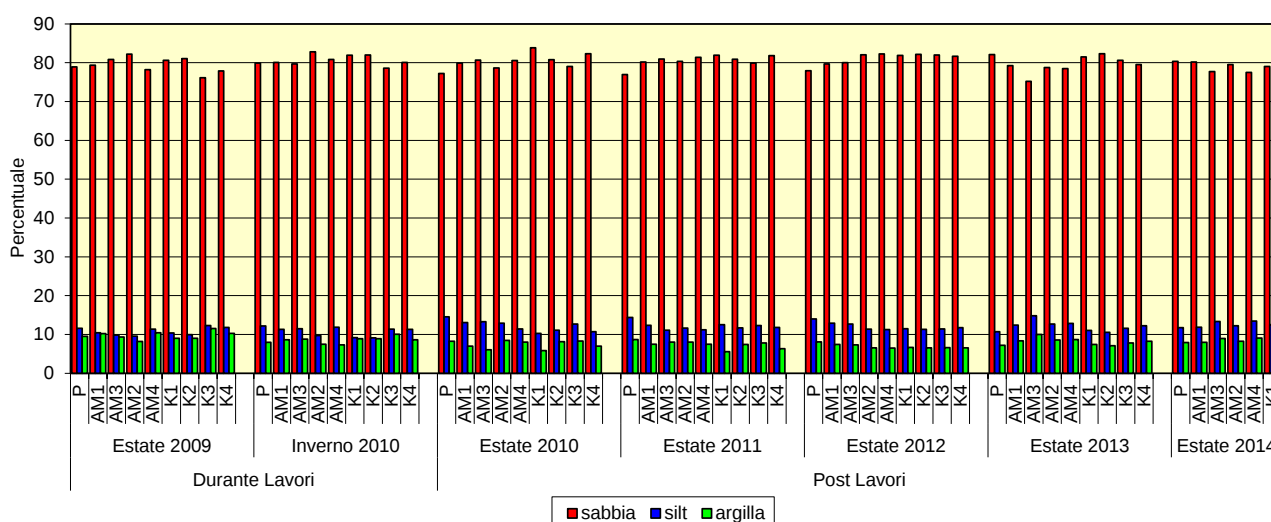


Fig. 3.14 - Composizione percentuale delle principali classi granulometriche dei sedimenti analizzati nei due monitoraggi condotti durante i lavori di installazione (estate 2009 e inverno 2010) e in quelli effettuati dopo la fine dei lavori (stagioni estive del 2010, 2011, 2012, 2013 e 2014). P = piattaforma Annamaria B. Il campionamento dei controlli K2, K3 e 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 (estate 2009 e inverno 2010) e in quelli effettuati dopo la fine dei lavori (stagioni estive del 2010, 2011, 2012, 2013 e 2014). 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						
Estate 2009				Inverno 2010		
	Sabbia	Pelite		Sabbia	Pelite	
		Silt	Argilla		Silt	Argilla
P	78,91	11,59	9,50	79,90	12,17	7,94
AM1	79,35	10,45	10,20	80,05	11,29	8,65
AM2	82,22	9,58	8,20	82,80	9,74	7,46
AM3	80,84	9,85	9,31	79,72	11,48	8,79
AM4	78,20	11,35	10,45	80,85	11,85	7,30
K1	80,64	10,36	9,00	81,94	9,16	8,90
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

	Survey Post Lavori di installazione														
	Estate 2010			Estate 2011			Estate 2012			Estate 2013			Estate 2014		
	Sabbia	Pelite		Sabbia	Pelite		Sabbia	Pelite		Sabbia	Pelite		Sabbia	Pelite	
		Silt	Argilla		Silt	Argilla		Silt	Argilla		Silt	Argilla		Silt	Argilla
P	77,24	14,51	8,25	76,94	14,37	8,70	77,92	13,99	8,09	82,09	10,70	7,21	80,33	11,75	7,92
AM1	79,92	13,08	6,99	80,17	12,37	7,46	79,69	12,87	7,44	79,24	12,40	8,35	80,18	11,84	7,98
AM2	78,65	12,92	8,44	80,36	11,63	8,01	82,07	11,36	6,57	78,74	12,70	8,56	77,71	13,32	8,97
AM3	80,67	13,30	6,03	80,93	11,07	8,00	80,03	12,65	7,32	75,22	14,81	9,97	79,55	12,22	8,23
AM4	80,56	11,39	8,04	81,37	11,17	7,46	82,28	11,23	6,49	78,47	12,86	8,66	77,49	13,45	9,06
K1	83,88	10,28	5,84	81,93	12,52	5,55	81,87	11,49	6,64	81,52	11,04	7,44	79,05	12,52	8,43

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 2010-2014. Solo per il cadmio si riporta un confronto con lo Standard di Qualità Ambientale (SQA) indicato nella Tab. 3/A del DM 2015/172, non essendo disponibili SQA per bario e zinco.

Bario - Le concentrazioni di bario rilevate nell'estate 2014 sono risultate modeste in valore assoluto e omogenee tra siti. Il massimo (53,45 mg/kg) è stato registrato in AM4, ma anch'esso è da considerare simile al controllo K1 (41,92 mg/kg), essendo pari a 1,2 volte tale concentrazione. Durante il 1° survey condotto nel 2010 il tenore di AM4 era risultato 4 volte quello di K1. Nel tempo le concentrazioni sono andate diminuendo pur rimanendo maggiori del controllo sino al 2014 quando però, come già detto, la differenza è apparsa pressoché trascurabile.

Per quanto concerne la stazione corrispondente alla piattaforma (P), dal 2010 al 2013 le

concentrazioni erano risultate sensibilmente più elevate rispetto al sito di riferimento. La differenza maggiore tra i due siti è stata rilevata nel 2010, quando il tenore osservato in P (3373,60 mg/kg) era quasi 50 volte quello di K1 (69,08 mg/kg). Nel 2011 e 2012 tale differenza si era notevolmente ridotta a seguito di un forte decremento in corrispondenza della struttura, mentre nel 2013 aveva subito una recrudescenza. In quel survey, infatti, la concentrazione registrata in P (543,31 mg/kg) era 15 volte quella di K1 (35,48 mg/kg), a testimonianza di un recupero non ancora avvenuto. Nell'estate 2014, invece, la piattaforma (50,10 mg/kg) è apparsa confrontabile con il controllo K1.

La stazione AM2 ha conservato concentrazioni inferiori a K1 per tutta la durata dello studio eccetto nell'estate 2012. Analogamente, il sito AM1 ha presentato nel tempo tenori modesti e variazioni contenute. Solo nel 2012 e nel 2013 aveva esibito un contenuto di bario maggiore rispetto al controllo.

Infine, il sito AM3 ha avuto nel tempo un andamento altalenante, caratterizzato da incrementi nel 2011 e 2013 e riduzioni nel 2012 e 2014, anno in cui è stato raggiunto il tenore più basso dell'intero periodo di monitoraggio.

I dati ottenuti nel 2014 sembrano indicare la scomparsa di segnali di alterazione dovuti alla presenza della piattaforma che erano stati invece rilevati sino all'anno precedente.

Cadmio - Per tutta la durata dello studio i tenori di cadmio sono apparsi modesti in termini assoluti, sempre ampiamente inferiori all'SQA riportato nella Tab. 3/A del DM 2015/172 (0,3 mg/kg s.s.). Nel 2011 era avvenuto un decremento diffuso rispetto all'anno precedente, variazioni comunque modeste essendo bassi i valori.

Anche le concentrazioni relative al 2012 risultavano modeste e omogenee tra siti e tali si sono conservate nel 2013 sebbene, rispetto al survey precedente, avessero esibito un aumento. Nell'ultimo monitoraggio si è verificato un incremento ovunque ma particolarmente accentuato in corrispondenza della struttura, dove è stato registrato il valore più elevato dell'intero periodo di studio (0,116 mg/kg) pari a 2,4 volte la concentrazione del controllo K1 (0,049 mg/kg). Si tratta ancora di un tenore estremamente modesto che, però, potrebbe indicare un'alterazione in corrispondenza della piattaforma, assente invece negli altri siti.

Zinco - Anche lo zinco ha presentato concentrazioni modeste per tutta la durata dello studio. Il picco di maggiore interesse e presumibilmente riconducibile alla presenza della piattaforma era stato registrato nel 2010 nel sito P (65,46 mg/kg), pari a 2,5 volte quello registrato in K1 (25,54 mg/kg). Nel 2011 presso P è avvenuto un notevole decremento e sino al 2013 le concentrazioni sono diventate solo leggermente superiori a quelle del

controllo, mentre nel 2014 è avvenuto un leggero incremento che ha portato a un contenuto pari a 1,8 volte quello di K1, ma si tratta in generale di tenori modesti.

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, questo metallo risulta poco influenzato dalla presenza della piattaforma.

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.

	Estate 2010			Estate 2011			Estate 2012			Estate 2013			Estate 2014		
	Bario	Cadmio	Zinco	Bario	Cadmio	Zinco	Bario	Cadmio	Zinco	Bario	Cadmio	Zinco	Bario	Cadmio	Zinco
P	3373,60	0,0498	65,46	121,50	0,0355	29,73	134,22	0,0292	30,44	543,31	0,0479	35,27	50,10	0,1159	49,54
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	39,14	0,0558	27,57
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	25,82	0,0438	23,10
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	47,10	0,0609	35,88
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	53,45	0,0529	29,54
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	41,92	0,0490	27,88

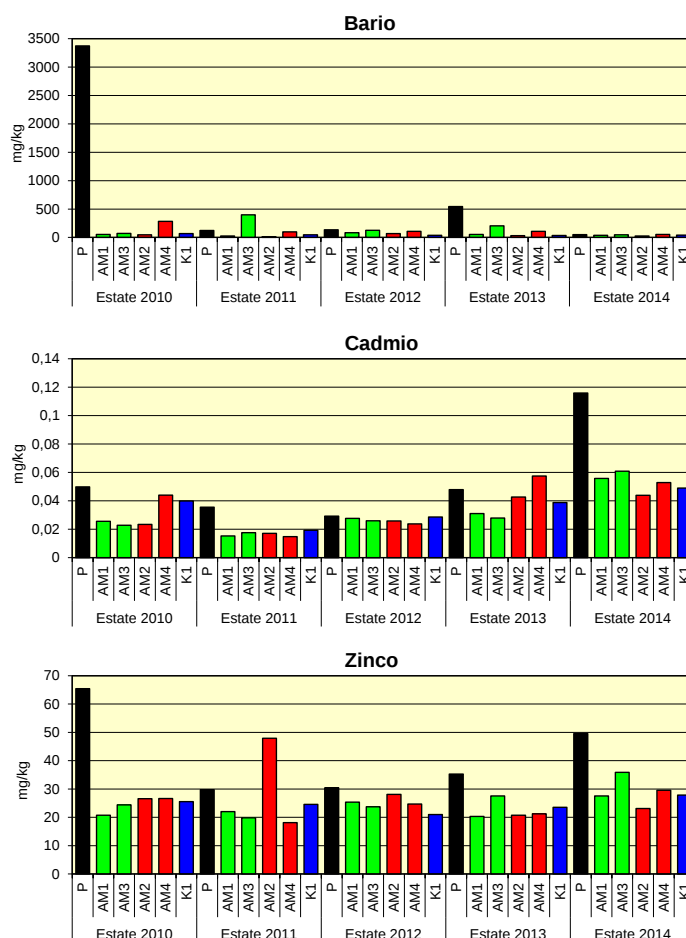


Fig. 3.15 – Contenuto di metalli pesanti (mg/kg) determinato nei sedimenti campionati dopo le operazioni di installazione della piattaforma Annamaria B. P = Piattaforma.

3.5.3. IDROCARBURI TOTALI

Durante l'intero periodo di indagine gli idrocarburi C<12 sono sempre risultati al di sotto del limite di quantificazione, mentre i C>12 sono stati sempre rilevati ma con tenori diffusamente bassi in tutte le stazioni (Tab. 3-XIV; fig. 3.16).

Dall'analisi dei singoli siti si osserva che, nel tempo, questi contaminanti hanno seguito trend non sempre concordi.

L'andamento di AM2 è apparso confrontabile con quello osservato al controllo dove gli idrocarburi sono aumentati nel 2011 e si sono ridotti nel 2012, risultando poi non più rilevabili nel 2014.

Anche in AM1 e AM3 questi contaminanti sono aumentati nel 2011 e si sono ridotti nel 2012, ma nel 2013 hanno presentato un nuovo incremento che si è protratto nel 2014 in AM1 (in AM3 si sono invece nuovamente ridotti); essi sono inoltre gli unici siti in cui sono stati rilevati idrocarburi totali nell'ultimo campionamento.

Tab. 3-XIV – Idrocarburi totali (mg/kg 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.

	P	AM1	AM2	AM3	AM4	K1
	Estate 2010					
Idrocarburi C>12	198	13	12	13	10	19
Idrocarburi C<12	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
TOTALE	198	13	12	13	10	19
	Estate 2011					
Idrocarburi C>12	46	47	21	116	27	34
Idrocarburi C<12	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
TOTALE	46	47	21	116	27	34
	Estate 2012					
Idrocarburi C>12	23	10	9	9	26	10
Idrocarburi C<12	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
TOTALE	23	10	9	9	26	10
	Estate 2013					
Idrocarburi C>12	70	22	11	44	15	10
Idrocarburi C<12	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
TOTALE	70	22	11	44	15	10
	Estate 2014					
Idrocarburi C>12	< 5	95	< 5	14	< 5	< 5
Idrocarburi C<12	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
TOTALE	-	95	-	14	-	-

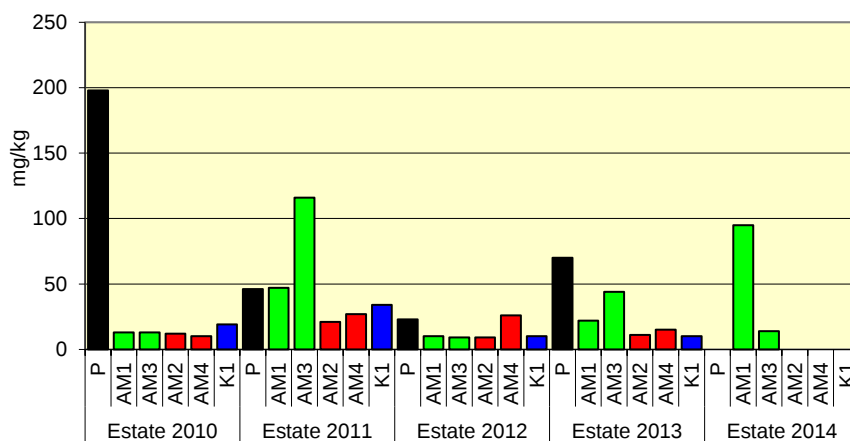


Fig. 3.16 – Idrocarburi totali (mg/kg s.s.) rilevati nei sedimenti campionati dopo le operazioni di installazione della piattaforma Annamaria B. Questi composti non sono stati ricercati nei sedimenti prelevati durante le campagne in corso d’opera. P = sito posto in corrispondenza della struttura.

Un diverso comportamento è stato osservato in AM4: in questa stazione gli idrocarburi totali sono incrementati nel 2011 e rimasti costanti nel 2012, per poi ridursi successivamente sino a risultare non più rilevabili.

Infine, il sito prossimo ad Annamaria B ha esibito il valore maggiore nel 2010, corrispondente al massimo assoluto dell’intero periodo di indagine. Nel 2011 è avvenuto un notevole decremento che si è protratto, più lievemente, nel 2012. Dopo un incremento osservato nel 2013, questi composti si sono nuovamente ridotti sino a risultare inferiori al limite di quantificazione.

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 nell'estate 2009 e uno nell'inverno 2010.

3.6.1. *DUNALIELLA TERTIOLECTA*

QA-QC – Il test eseguito come controllo positivo con $K_2Cr_2O_7$ (6,9 mg/l come cromo) è rientrato nei limiti della carta di controllo intralaboratorio (6,9 – 8,7 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 ≥ 16).

Risultati del saggio - I risultati del saggio applicato ai campioni prelevati nell'estate 2014 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.

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	Salinità %	% effetto/biostimolazione	EC ₅₀	Giudizio
P	8,20	36	-10,61	n.c.	Assenza di effetto
AM1	8,11	36	+12,36	n.c.	Assenza di effetto
AM2	8,05	36	+4,35	n.c.	Assenza di effetto
AM3	8,18	36	-13,37	n.c.	Assenza di effetto
AM4	7,99	36	+9,31	n.c.	Assenza di effetto
K1	8,03	36	-2,56	n.c.	Assenza di effetto

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 sino all'estate 2013, essendo stato sempre e ovunque evidenziato un effetto eutrofizzante significativo che non è stato più rilevato nell'ultimo survey (Tab. 3-XVI).

Per quanto concerne le altre stazioni monitorate durante la fase di produzione della

piattaforma, dopo il miglioramento evidenziato nel 2011 in AM2 la situazione è rimasta invariata nei due anni successivi. Nel 2014, analogamente ai tre siti precedentemente descritti, l'effetto eutrofizzante non è stato più rilevato.

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 cinque survey condotti nella fase di produzione. In rosso il sito corrispondente ad Annamaria B.

campione	Survey durante lavori di installazione	
	Estate 2009	Inverno 2010
p	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo
AM1	-	-
AM2	-	-
AM3	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo
AM4		-
K1	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo

campione	Survey Post Lavori di installazione				
	Estate 2010	Estate 2011	Estate 2012	Estate 2013	Estate 2014
p	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Assenza di effetto
AM1	Assenza di effetto	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Assenza di effetto
AM2	Lieve presenza di effetto tossico	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Assenza di effetto
AM3	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Assenza di effetto
AM4	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Assenza di effetto
K1	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Effetto eutrofizzante significativo	Assenza di effetto

3.6.2. *VIBRIO FISCHERI*

QA-QC I valori EC₅₀ 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 2014 ha dimostrato l'assenza di tossicità in tutti i campioni analizzati (Tab. 3-XVII).

Tab. 3-XVII - Risultati del saggio biologico *Vibrio fischeri* relativo all'estate 2014 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 ² (%)	S.T.I.	TOX
P	80,33	19,67	53,94	0,09	0,19	0,03	0,98	0,00	Assente
AM1	80,18	19,82	54,35	0,20	0,29	0,12	0,98	0,00	Assente
AM2	79,55	20,45	56,07	18,15	21,28	14,90	0,96	0,32	Assente
AM3	77,71	22,29	61,09	3,27	7,12	2,31	0,99	0,05	Assente
AM4	77,49	22,51	61,69	0,09	0,21	0,05	0,97	0,00	Assente
K1	79,05	20,95	57,43	9,05	12,44	7,41	0,98	0,16	Assente

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-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	Survey durante lavori di installazione		Survey Post Lavori di installazione				
	Estate 2009	Inverno 2010	Estate 2010	Estate 2011	Estate 2012	Estate 2013	Estate 2014
P	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AM1	-	-	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AM2	-	-	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AM3	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AM4	-	-	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
K1	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente

3.6.3. *COROPHIUM ORIENTALE*

QA-QC – La sensibilità rilevata degli organismi verso il tossico di riferimento (CdCl_2) $\text{LC}_{50} = 3,28$ ($\text{LC} = 2,95 \text{ mg/l}$ e $\text{UC} = 3,64 \text{ mg/l}$) 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.

Risultati del saggio: Nella Tab. 3-XX sono riportate le percentuali di mortalità degli organismi rilevati nel test di tossicità a breve termine e la stima della tossicità. Le percentuali medie 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-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 2014. In rosso è evidenziata la stazione posta in corrispondenza di Annamaria B.

campione	Inizio del test					Fine del test				
	Temp. (°C)	Salinità (%)	pH	NH ₄ ⁺ (mg l ⁻¹)	O ₂ (%)	Temp. (°C)	Salinità (%)	pH	NH ₄ ⁺ (mg l ⁻¹)	O ₂ (%)
Controllo	16 ± 1	34	8,13	0,5	>85	16 ± 1	35	8,20	2	>85
P		35	8,16	1			36	8,21	2	
AM1		35	8,21	0			36	8,39	2	
AM2		35	8,16	0,5			36	8,23	0,5	
AM3		35	8,18	2			36	8,18	1	
AM4		35	8,18	1			36	8,18	0,5	
K1		35	8,16	0,5			36	8,43	0	

Tab. 3-XX - Percentuali di mortalità degli organismi *C. orientale* osservati nel test di tossicità eseguito nell’estate 2014. In rosso è evidenziata la stazione corrispondente alla piattaforma.

campione	Numero degli organismi esposti	% degli organismi morti (± dev.st %)	% (corretta) degli organismi morti	Giudizio della tossicità
Controllo	100	0 ± 0	0	Assente
P	100	0 ± 0,00	0	Assente
AM1	100	5 ± 3,83	5	Assente
AM2	100	2 ± 2,31	2	Assente
AM3	100	8 ± 3,27	8	Assente
AM4	100	14 ± 2,31	14	Assente
K1	100	6 ± 2,31	6	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 in tre stazioni poste a 60 m dalla piattaforma che al controllo K1, nel 2013 si è ripristinata la situazione ecotossicologica rilevata sino al 2011 senza ulteriori variazioni nell’ultimo survey.

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.

campione	Survey durante lavori di installazione		Survey Post Lavori di installazione				
	Estate 2009	Inverno 2010	Estate 2010	Estate 2011	Estate 2012	Estate 2013	Estate 2014
P	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AM1	-	-	Assente	Assente	Bassa	Assente	Assente
AM2	-	-	Assente	Assente	Bassa	Assente	Assente
AM3	Assente	Assente	Assente	Assente	Bassa	Assente	Assente
AM4	-	-	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
K1	Assente	Assente	Assente	Assente	Bassa	Assente	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 è suddiviso 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 n. 1 survey riguardante le caratteristiche chimiche e fisiche della colonna d’acqua e n. 2 campionamenti comprendenti le indagini di cui ai punti e), f) e h) del suddetto elenco. Nella fase successiva all’installazione della piattaforma sono stati 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 quinto anno di indagine dopo la fine dei lavori di perforazione e installazione di Annamaria B (estate 2014); sono stati inoltre ricercati gli inquinanti in esemplari di *Mytilus galloprovincialis* insediati sulle parti sommerse della piattaforma. Per quanto concerne i sedimenti (fisica, chimica ed ecotossicologia) si tratta dell’ultimo campionamento previsto nel Programma di Monitoraggio.

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 2014) sono state riscontrate correnti di intensità compresa tra 17 e 21 cm/s e di direzione costante verso SW con brevi periodi verso NE. 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, analogamente a quanto riscontrato precedentemente (Fabi *et al.*, 2015b).

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.

Caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d'acqua – Nel monitoraggio condotto nell'agosto 2014 la colonna d'acqua è risultata caratterizzata da una stratificazione evidente con la presenza di acque più calde e meno salate in superficie.

L'ossigeno disciolto ha presentato in generale condizioni di sovrasaturazione e valori di lieve sottosaturazione solo in prossimità del fondo. Pertanto, non vi sono evidenze del verificarsi di fenomeni ipossici nell'area indagata.

Il carico solido sospeso, stimato dalle misure di torbidità, ha presentato in generale un aumento della concentrazione nelle acque di fondo, come osservato frequentemente in Adriatico, probabilmente determinato da processi di risospensione e trasporto di sedimenti (Wang e Pinardi, 2002; Wang *et al.*, 2006).

Le concentrazioni di clorofilla, stimata dalla fluorescenza *in situ* e misurata con HPLC, ha mostrato un netto aumento negli strati più profondi, confermando quanto già osservato per il medio Adriatico da Totti *et al.* (2000).

Tutti i parametri indagati nelle diverse stazioni, compresa quella di controllo, hanno mostrato valori e trend analoghi, e, quindi, non sono evidenti effetti indotti dalla presenza e/o dall'esercizio della piattaforma.

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 2014 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; 2015a; 2015b; 2016).

Al contrario, gli idrocarburi totali sono stati rinvenuti sia nel mare del Nord (0,04- 3,0

mg/l; Strømgren *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 C₅-C₃₅ 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 2014 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* alla quota superficiale del sito corrispondente alla piattaforma e di quelle posizionate sino a 200 m di distanza è stato rilevato un effetto eutrofizzante che, comunque, non indica la presenza di tossicità nei confronti dell'alga.

Analisi di inquinanti in *Mytilus galloprovincialis* - L'applicazione della batteria di biomarker ai campioni prelevati vicino e lontano dagli anodi sacrificali di Annamaria B e dal sito di controllo nell'estate 2014 tende ad evidenziare solo una residua sindrome di stress negli organismi prelevati presso la piattaforma. Infatti, non vengono osservate alterazioni a livello metabolico, come indicato dai risultati della sopravvivenza all'aria, mentre il test più sensibile condotto per verificare la presenza di cambiamenti a livello cellulare e subcellulare negli organismi sentinella riporta la diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali (indice aspecifico di stress) nei mitili della piattaforma. Non è stato evidenziato alcun danno al DNA nelle cellule degli organismi analizzati, che presentavano percentuali di frammentazione simili a quelle riscontrabili naturalmente su popolazioni di bivalvi prelevati in ambienti marino costieri poco impattati. La sintesi di proteine metallo-chelanti (metallotioneine), così come l'accumulo di Zn, Ba e Cd nei tessuti dei bivalvi esaminati evidenzia invece un significativo seppur modesto effetto biologico correlabile alla presenza di elementi metallici nei pressi della piattaforma già osservato sin dal primo monitoraggio (Fabi *et al.*, 2016). Infine, assente appare il livello di

accumulo di inquinanti organici nei mitili analizzati come anche la risposta biologica ad essi associata.

Caratteristiche sedimentologiche - L'area in cui è installata 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.

Gli idrocarburi totali sono stati influenzati dalla presenza della piattaforma nell'estate 2010, ovvero subito dopo l'entrata in produzione di Annamaria B, anno in cui era stato registrato un picco di concentrazione in corrispondenza della struttura non più rilevato nei survey successivi eccetto nel 2013 quando, comunque, è apparso molto più modesto. Nell'ultimo campionamento questi composti non sono più stati rilevati presso Annamaria B, così come nei due siti posizionati a 60 m di distanza in direzione NE e SW e nel controllo. Essi sono risultati invece ancora al di sopra del limite di quantificazione nelle due stazioni a 60 m poste a NW e SE rispetto alla piattaforma, ma, in generale, i tenori sono rimasti modesti per l'intero periodo di indagine.

Per quanto riguarda i metalli, in generale tenori maggiori sono stati rilevati nel sito P, ossia immediatamente sotto la struttura.

Già durante il primo survey (estate 2010) bario, cadmio e zinco avevano mostrato il valore più elevato proprio in corrispondenza di questa stazione. Negli anni successivi le concentrazioni si sono ridotte, ma nell'ultimo survey cadmio e zinco hanno presentato una recrudescenza che, nel caso del cadmio, ha portato al raggiungimento di un picco mai registrato in precedenza. E' comunque da rilevare che questo metallo è sempre risultato presente in concentrazioni ampiamente inferiori allo Standard di Qualità Ambientale riportato nella Tab. 3/A del DM 2015/172 (0,3 mg/kg s.s.). Tuttavia, il graduale incremento registrato presso la struttura a partire dal 2012 potrebbe indicare un processo di accumulo nei sedimenti.

Complessivamente, fra tutti i metalli, il bario era risultato quello maggiormente interessato dalla presenza di Annamaria B. Infatti nel 2010, oltre al picco presso la piattaforma, era stata osservata una più modesta alterazione in AM4 (60 m a SW); entrambe queste anomalie non sono state comunque più rilevate successivamente, così come quella registrata presso AM3 (60 m a SE) nel 2011. I dati del 2012 avevano indicato che gli effetti della piattaforma sulla distribuzione del bario nei sedimenti circostanti si erano ridotti, tuttavia nel 2013 si era assistito a un incremento di questo metallo presso la piattaforma e a 60 m di distanza da essa in direzione SE (AM3), a indicare il perdurare di uno stato di

disturbo. Le basse concentrazioni rilevate nel 2014 dimostrano che il recupero è ormai ultimato.

Ecotossicologia dei sedimenti – Come già evidenziato durante la fase di installazione della piattaforma Annamaria B e nei primi quattro survey post lavori (stagioni estive del 2010, 2011, 2012 e 2013), anche nel 2014 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 negli ultimi due survey, quando si sono ripristinate le condizioni ecotossicologiche ottimali per la sopravvivenza dell'anfipode già osservate precedentemente.

5. BIBLIOGRAFIA

- Artegianni 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.
- Asby J., Tinwell H., Lefevre P.A., Browne M.A. 1995. The single gel electrophoresis assay for induced DNA damage assay: measurement of tail length and moment. *Mutagenesis*, 10: 85-90.
- ASTM E1218-04-E1. 2004. *Standard guide for conducting static toxicity tests with microalgae*. ASTM E1218-04-E1. 14 pp.
- Azur Environmental. 1994. *Microtox® M500 manual* (A toxicity testing handbook). Carlsbad, CA, USA.
- Carli A., Fiori M.A. 1979. Sviluppo larvale del *Tigriopus fulvus* Fischer. *Atti IX Congr, Soc, Ital, Biol, Mar*; 181-190.
- Carli A., Mariottini G.L., Pane L. 1988. Reproduction of the rockpools Harpacticoid copepod *Tigriopus fulvus* (Fischer 1860), suitable for aquaculture. *XII Congrès international d'Aquariologie*: 295-300.
- Christensen E.R., Kusk K.O., Nyholm N. 2009. Dose-response regressions for algal growth and similar continuous endpoint: calculation of effective concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28: 826-835.
- Devlin M.J., Barry J., Mills D.K., Gowen R.J., Foden J., Sivyer D., Tett P. 2008. Relationships between suspended particulate material, light attenuation and Secchi depth in UK marine waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 79(3): 429-439.
- 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. 2003a. *Volatile organic compounds in various sample matrices using equilibrium headspace analysis*. 25 pp.
- EPA 8015D. 2003b. *Nonhalogenated organics using gc/fid*. 37 pp.
- EPA 3545A. 2007a. *Pressurized fluid extraction (pfe)*. Revision 1 February 2007. 16 pp.
- EPA 3620c. 2007b. *Florisil cleanup*. 27 pp.
- EPA 6010C. 2007c. *Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*. EPA METHOD 6010C. 34 pp.
- EPA 7010. 2007d. *Graphite furnace atomic absorption spectrophotometry*. EPA METHOD 7010. 24 pp.
- Fabi G., Ausili S., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2005a. *Servizi di monitoraggio ambientale piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Porto Corsini Mare Sud 1 (PCMS-1)"*. Rapporto conclusivo di due anni di indagine. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 95 + XI pp.
- Fabi G., Boldrin A., De Ranieri S., Manoukian S., Nasci C., Scarcella G., Spagnolo A. 2005b. *Servizi di monitoraggio ambientale Piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Naomi-Pandora"*. Rapporto conclusivo di due anni di indagine (2002-2003). Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 201 + XXVIII pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Manoukian S., Marini M., Meneghetti F., Paschini E., Scarcella G.,

- Spagnolo A. 2006. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Calipso. Rapporto finale di 4 anni di studio (2002-2005)*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 224 + XLII pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2010a. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 2° Survey durante le operazioni di installazione (inverno 2010). Indagini fisiche e chimiche della colonna d'acqua, indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti e indagini sulla comunità bentonica*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 47 + XIX pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2010b. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". I Survey durante le operazioni di installazione (settembre 2009). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti e indagini sulla comunità bentonica*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 29 + XIII pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Grilli F., Nasci C., Spagnolo A. 2010c. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Clara Nord. Rapporto conclusivo di tre anni di indagine (estate 2005 - inverno 2008)*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 240 + XLIII pp.
- Fabi G., Campanelli A., De Ranieri S., Nasci C., Polidori P., Punzo E. 2010d. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Clara Est. Rapporto conclusivo di tre anni di indagine (estate 2005 - inverno 2008)*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 353 + XLI pp.
- Fabi G., Campanelli A., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2011a. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 1° Survey successivo alle operazioni di installazione (estate 2010). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua, indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 53 + XVI pp.
- Fabi G., Campanelli A., De Ranieri S., Nasci C., Spagnolo A. 2011b. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 2° Survey successivo alle operazioni di installazione (I semestre 2011). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua, analisi di inquinanti in organismi marini*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 61 + IX pp.
- Fabi G., Bruno S., De Ranieri S., Gomiero A., Nasci C., Spagnolo A. 2012. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 3° Survey successivo alle operazioni di installazione (estate 2011). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua, Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti, Ricerca di inquinanti in organismi marini*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 83 + XXI pp.
- Fabi G., De Ranieri S., Gomiero A., Nasci C., Spagnolo A. 2014a. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 4° Survey successivo alle operazioni di installazione (I semestre 2012). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua, Analisi di inquinanti in organismi marini*. Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 56 + X pp.
- Fabi G., Campanelli A., De Ranieri S., Gomiero A., Spagnolo A. 2014b. *Programma di monitoraggio transfrontaliero ai sensi del decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B". 5° Survey successivo alle operazioni di installazione (estate 2012). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua, Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dei sedimenti, Ricerca di inquinanti in organismi marini*. Rapporto per

- Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 70 + XX pp.
- Fabi G., De Ranieri S, Girasole M., Gomiero G., Penna P., Spagnolo A. 2014c. *Servizi di monitoraggio ambientale Campo Naide. Rapporto finale dal pre-survey al IV anno dopo la posa in opera (2004-2009). Misure correntometriche, Indagini sedimentologiche, ecotossicologiche e Analisi di inquinanti in organismi marini.* Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 213 + xlviii pp.
- Fabi G., De Biasi A.M., Gomiero A., Spagnolo A. 2015a. *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.
- Fabi G., Campanelli A., De Biasi A.M., Gomiero A., Spagnolo A. 2015b. *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". 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.* Rapporto per Eni S.p.A. – Divisione E&P, Distretto di Ravenna. 68 + XX pp.
- Fabi G., Borghini M., Cassin D., De Lazzari A., Gomiero A., Kozinkova L., Spagnolo A. 2016. *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". 8° survey successivo alle operazioni di installazione (inverno 2014). Indagini fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua, Analisi di inquinanti in organismi marini.* Rapporto per Eni S.p.A. – UPSTREAM DICS. 53 + VIII 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. *Mar. Pollut. Bull.*, 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.
- 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., Maiociolek 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., Maiociolek 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., Brilli L., Bellaria V., Castiglioni S., Celetti A.M., Comin S., Di Gioia E., Fabbri S., Facchini L., Ferrara M., Guerra R., Leoni T., Lo Re R., Manzo S., Martini P., Mascilongo G., Meloni P., Meineri V., Milani S., Molina M., Rossi E., Ruggiero G., Sanguinetti M.S., Tamberlich F., Traldi D., Trichilo S. 2007. Interconfronto nazionale sul test di inibizione della bioluminescenza mediante *Vibrio fischeri*. *Biol. Mar. Medit.*, 14(1): 87-91.
- Pane L., Feletti M., Carli A.M. 1996. Fattori ambientali e fluttuazioni della popolazione del copepode *Tigriopus fulvus* delle pozze di scogliera di Genova - Nervi (Mar Ligure). *Atti Soc. Ital. Ecol.*, 17: 317-320.
- Petrovic S., Semencic L., Ozetic B., Orzetic M. 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Mar. Poll. Bull.*, 49(9-10): 713-720.
- Saggiomo V., Catalano G., Ribera d'Alcalà M. 1990. *Ossigeno disciolto*. Pagg. 91-103. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera d'Alcalà M. (Eds.), *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. Nova Thalassia, 11.
- Schlitzer R. 2015. Ocean Data View, <http://odv.awi.de>.
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, 167. 310 pp.
- Strømngren T., Sørstrøm S.E., Schou L., Kaarstad I., Aunaas T., Brakstad O.G. 1995. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. *Mar. Environ. Res.*, 40 (2): 147-169.
- Terman A., Brunk U.T. 2004. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36: 1400-1404.
- Totti C., Civitarese G., Acri F., Barletta D., Candelari G., Paschini E., Solazzi A. 2000. Seasonal variability of phytoplankton populations in the middle Adriatic sub-basin. *J. Plankton Res.*, 22(9): 1735-1756.
- 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 tricornutum*. 14 pp.
- USEPA. 1991. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms -Section 14- Green alga Selenastrum capricornutum growth test - Method 1003.0*. EPA/600/4-91/002. 334 pp.
- USEPA. 1995. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluent and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms*. EPA/600/R-95/136. 15 pp.
- USEPA. 1996. *Acid digestion of sediments, sludges, and soils*. US-EPA 3050B. 12 pp.
- USEPA. 2000. *Nonhalogenated organics by gas chromatography*. 8015c rev. 3. 36 pp.
- USEPA. 2007. *Ultrasonic Extraction of Solid Samples*. US-EPA 3550C rev. 3. 17 pp.
- Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Marcinelli G., Accomando R., Smaal A.C., Orunesu M. 1995.

- Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar. Environ. Res.*, 39: 245-248.
- Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146: 281–300.
- Vidussi F., Claustre H., Bustillos-Guzmán J., Cailliau C., Marty J.-C. 1996. Determination of Chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of Chlorophyll a from divinylChlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *J. Plankton Res.*, 8: 2377-2382.
- Visvardis E.E., Tassiou A.M., Piperakis S.M. 1997. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and γ -irradiation with alkaline comet assay. *Mutation Res.*, 383: 71-80.
- Wang X.H., Pinardi N. 2002. Modeling the dynamics of sediment transport and resuspension in the northern Adriatic Sea. *J. Geophys. Res.*, 107(C12): 3225 doi:10.1029/2001JC001303.
- Wang X.H., Pinardi N., Malacic V. 2006. Sediment transport and resuspension due to combined motion of wave and current in the northern Adriatic Sea during a Bora event in January 2001: A numerical modelling study. *Cont. Shelf Res.*, 27(5): 613 – 633.
- Winkler L.W. 1888. Die Bestimmung des im Wasser gelosten Sauerstoffes. *Chem. Ber.*, 21: 2843-2855.

ALLEGATO A

SCHEDA TECNICA DELLA STRUMENTAZIONE

UTILIZZATA NELLE INDAGINI

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

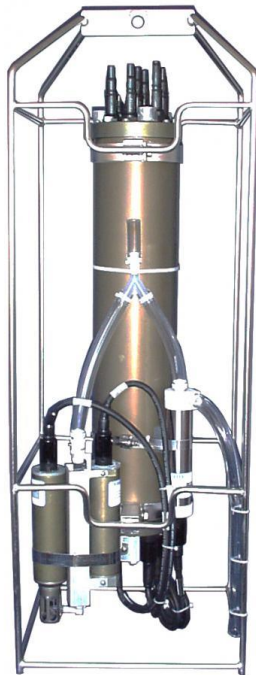
A1-IADCP (ACOUSTIC DOPPLER CURRENT PROFILER)



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

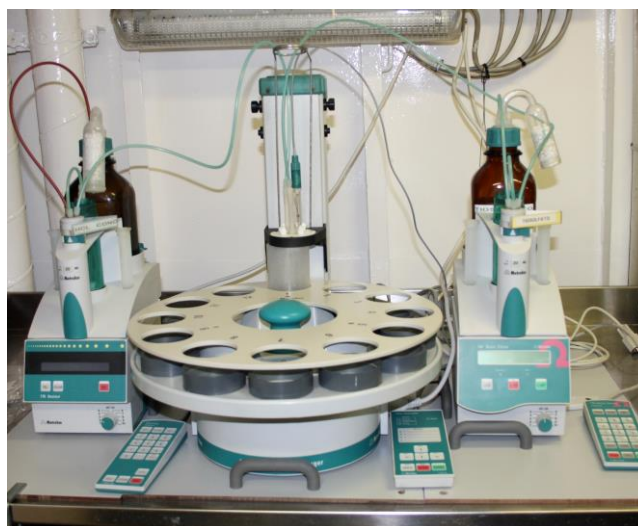
Sensore	Costruttore	Modello	Risoluzione	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione
Temperatura	Teledyne RD Instruments	Workhorse Sentinel 300 kHz	0,01°C	$\pm 0,4$ cm/s	da -5°C a + 45°C	ad ogni deployment

A1-II SONDA MULTIPARAMETRICA (CTD) SBE9plus



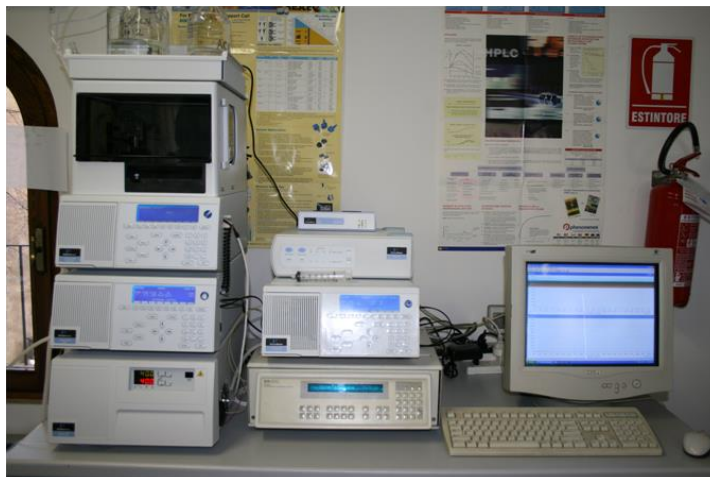
Campionatore: Rosette General Oceanics equipaggiato con 12 bottiglie idrologiche Niskin da 10 lt.

A1-III Analisi Ossigeno disciolto



Sistema Metrohm Basic Titrino 794 con autocampionatore Metrohm 824 Easy Sample Changer utilizzato per le analisi dell'ossigeno disciolto

A1-IV HPLC x l'analisi della clorofilla



A1-V GAS CROMATOGRAFO GC 8000 FISIONS INST per la determinazione degli Idrocarburi totali



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

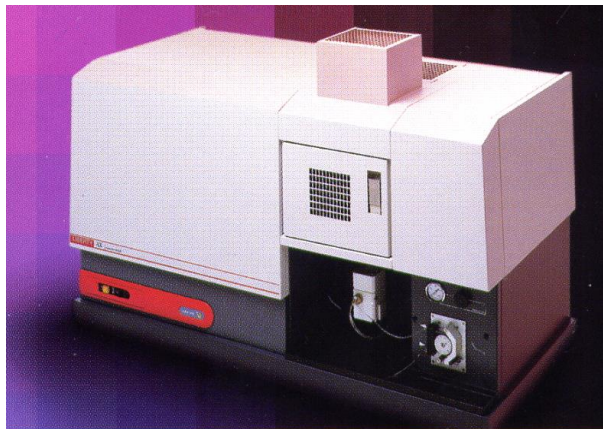
Lo strumento non necessita di verifica e taratura. Viene sostituito quando la scala graduata non è più visibile.

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



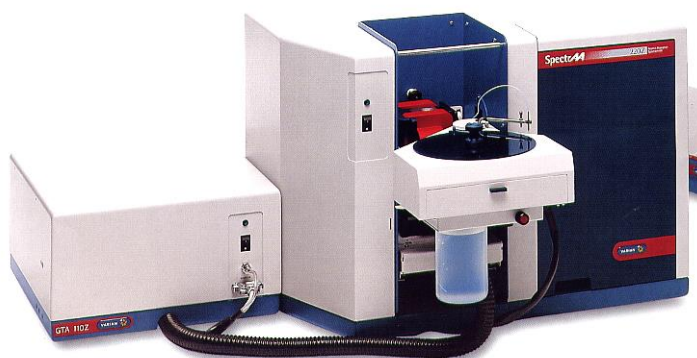
Il controllo interno della taratura dello strumento viene effettuato preliminarmente all'avvio di ogni indagine commissionata. Il controllo esterno e l'eventuale taratura ordinaria sono condotti annualmente da un Tecnico incaricato dalla Ditta costruttrice, quando il controllo interno risulta sfavorevole.

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 Optovar revolver 3x motorized 6x objective nosepiece for HD DIC, motorized
Optics	ICS optics for finest image quality: special application objectives with long working distance
Objectives	Reflected light: Epiplan, Epiplan-Neofluar, EC Epiplan-Neofluar Transmitted light: Achromplan, Plan-Neofluar Special: LD-Epiplan, LD-EC Epiplan-Neofluar (reflected light objective with long working distance)
Modules	Polarization optical shearing interferometer (TIC) to measure reflected light-phase objects(levels, differences in height), MHT 10, DeepView
Illumination Reflected light	12V, 100W halogen HBO 50W mercury vapor short arc lamp HBO 100W mercury vapor short arc lamp XBO 75W xenon lamp
Reflected light/filter slider	3 positions for filters with 25 mm diameter
Reflector turret	5 positions, manual or motorized, exchangeable
Light Trap	High contrast, minimized stray light
Transmitted light	6V, 30W 12V, 100W LCD-display, light manager

TelecameraAxiovert HS

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

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 -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 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 2014)**



Stazione P

Parametri Fisici		
Peso secco (g)	Ps	161,11
Peso umido (g)	Pu	201,31
Peso specifico	G	n.d.
Peso di volume (g/cm ³)	γ	n.d.
Peso di vol. secco (g/cm ³)	γ_d	n.d.
Umidità (%)	W	n.d.

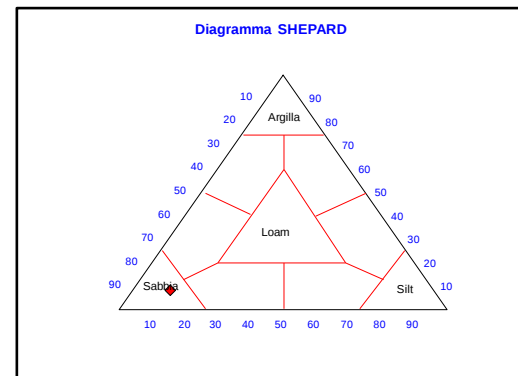
Parametri Statistici		
Media	M_ϕ	3,61
Classazione	σ_ϕ	1,08
Asimmetria	$S_{K\phi}$	0,10
Appuntimento	K_G	3,25
Mediana	Md	3,47

Percentile	ϕ
5°	2,01
16°	2,60
25°	3,03
50°	3,47
75°	3,91
84°	4,76
95°	8,99

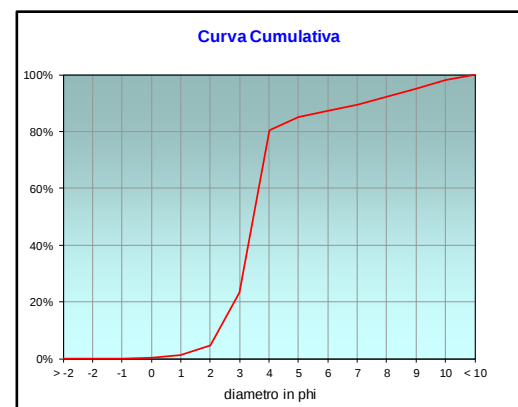
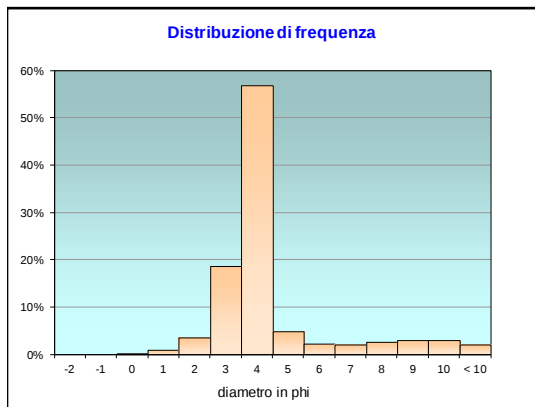
	g	phi	micron	%	Freq. Cumul.
Ghiaia	0,00	> -2	> 4000	0,00%	0,00%
	0,00	-2	4000	0,00%	0,00%
	0,00	-1	2000	0,00%	0,00%
Sabbia	0,38	0	1000	0,23%	0,23%
	1,63	1	500	1,01%	1,25%
	5,66	2	250	3,51%	4,76%
	30,06	3	125	18,66%	23,42%
	91,69	4	62,5	56,91%	80,33%
Limo	7,75	5	31	4,81%	85,14%
	3,55	6	15,6	2,20%	87,34%
	3,37	7	7,8	2,09%	89,44%
	4,26	8	3,9	2,65%	92,08%
Argilla	4,75	9	2,0	2,95%	95,03%
	4,82	10	0,98	2,99%	98,02%
	3,18	< 10	< 0,98	1,98%	#####

Classe granulometrica			
Ghiaia	Sabbia	Limo	Argilla
0,00%	80,33%	11,75%	7,92%

Note
10,92 g di materiale organogeno (conchiglie)



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



Stazione AM1

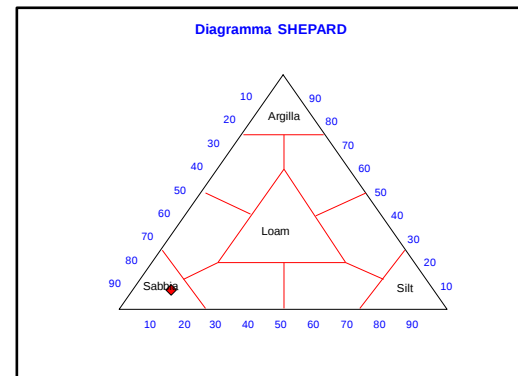
Parametri Fisici		
Peso secco (g)	Ps	155,79
Peso umido (g)	Pu	195,48
Peso specifico	G	n.d.
Peso di volume (g/cm ³)	γ	n.d.
Peso di vol. secco (g/cm ³)	γ_d	n.d.
Umidità (%)	W	n.d.

Parametri Statistici			Percentile	ϕ
Media	M_ϕ	3,61	5°	1,91
Classazione	σ_ϕ	1,10	16°	2,59
Asimmetria	$S_{K\phi}$	0,10	25°	3,03
Appuntimento	K_G	3,29	50°	3,47
Mediana	Md	3,47	75°	3,91
			84°	4,79
			95°	9,00

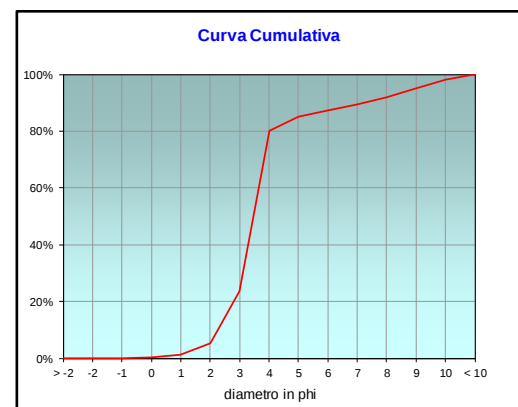
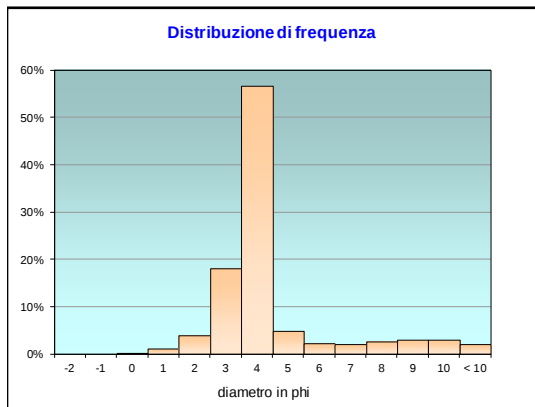
	g	phi	micron	%	Freq. Cumul.
Ghiaia	0,00	> -2	> 4000	0,00%	0,00%
	0,00	-2	4000	0,00%	0,00%
	0,00	-1	2000	0,00%	0,00%
Sabbia	0,40	0	1000	0,26%	0,26%
	1,76	1	500	1,13%	1,39%
	6,15	2	250	3,95%	5,34%
	28,26	3	125	18,14%	23,48%
	88,33	4	62,5	56,70%	80,18%
Limo	7,56	5	31	4,85%	85,03%
	3,46	6	15,6	2,22%	87,25%
	3,29	7	7,8	2,11%	89,36%
	4,16	8	3,9	2,67%	92,02%
Argilla	4,63	9	2,0	2,97%	94,99%
	4,70	10	0,98	3,02%	98,01%
	3,10	< 10	< 0,98	1,99%	#####

Classe granulometrica			
Ghiaia	Sabbia	Limo	Argilla
0,00%	80,18%	11,84%	7,98%

Note
12,63 g di materiale organogeno (conchiglie)



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



Stazione AM2

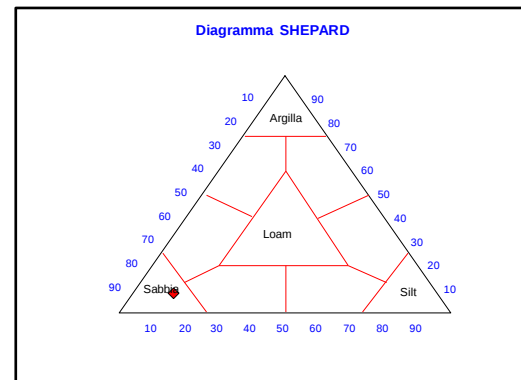
Parametri Fisici		
Peso secco (g)	Ps	151,52
Peso umido (g)	Pu	190,16
Peso specifico	G	n.d.
Peso di volume (g/cm ³)	γ	n.d.
Peso di vol. secco (g/cm ³)	γ_d	n.d.
Umidità (%)	W	n.d.

Parametri Statistici			Percentile	ϕ
Media	M_{ϕ}	3,65	5°	1,85
Classazione	σ_{ϕ}	1,15	16°	2,60
Asimmetria	$S_{K\phi}$	0,12	25°	3,04
Appuntimento	K_G	3,34	50°	3,48
Mediana	Md	3,48	75°	3,92
			84°	4,89
			95°	9,05

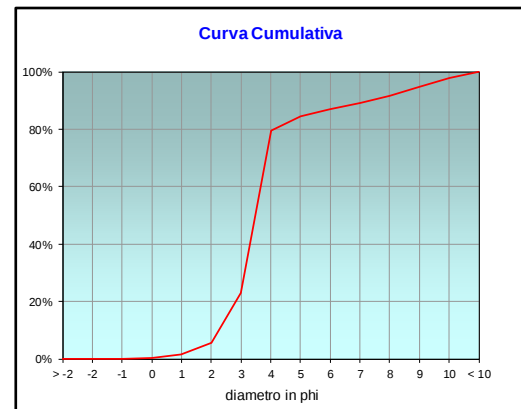
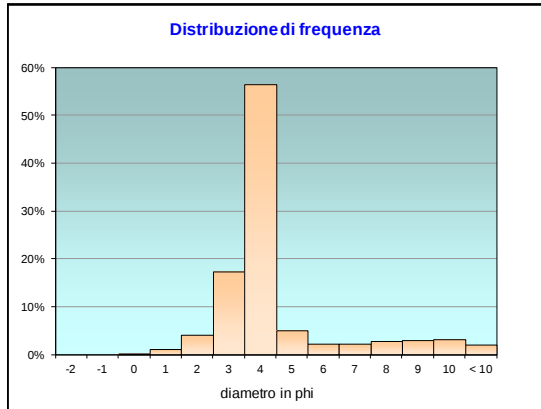
	g	phi	micron	%	Freq. Cumul.
Ghiaia	0,00	> -2	> 4000	0,00%	0,00%
	0,00	-2	4000	0,00%	0,00%
	0,00	-1	2000	0,00%	0,00%
Sabbia	0,41	0	1000	0,27%	0,27%
	1,83	1	500	1,21%	1,47%
	6,25	2	250	4,13%	5,60%
	26,39	3	125	17,42%	23,02%
	85,66	4	62,5	56,53%	79,55%
Limo	7,58	5	31	5,00%	84,55%
	3,47	6	15,6	2,29%	86,84%
	3,30	7	7,8	2,18%	89,02%
	4,17	8	3,9	2,75%	91,77%
Argilla	4,64	9	2,0	3,06%	94,83%
	4,72	10	0,98	3,11%	97,95%
	3,11	< 10	< 0,98	2,05%	#####

Classe granulometrica			
Ghiaia	Sabbia	Limo	Argilla
0,00%	79,55%	12,22%	8,23%

Note
12,81 g di materiale organogeno (conchiglie)



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



Stazione AM3

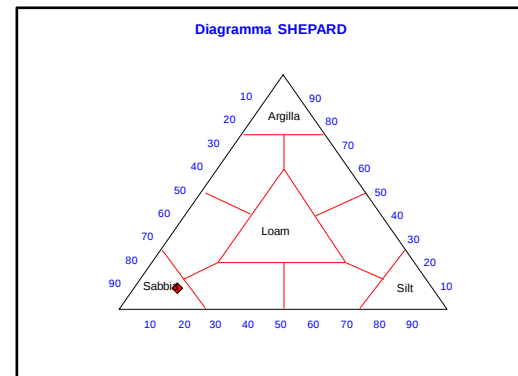
Parametri Fisici		
Peso secco (g)	Ps	157,36
Peso umido (g)	Pu	196,70
Peso specifico	G	n.d.
Peso di volume (g/cm ³)	γ	n.d.
Peso di vol. secco (g/cm ³)	γ_d	n.d.
Umidità (%)	W	n.d.

Parametri Statistici			Percentile	ϕ
Media	M_ϕ	3,83	5°	1,98
Classazione	σ_ϕ	1,34	16°	2,65
Asimmetria	$S_{K\phi}$	0,18	25°	3,06
Appuntimento	K_G	3,30	50°	3,50
Mediana	Md	3,50	75°	3,95
			84°	5,34
			95°	9,19

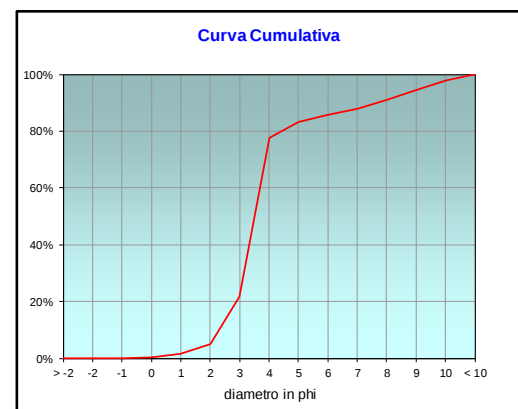
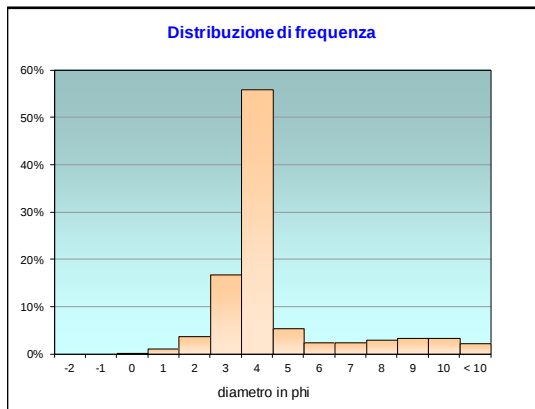
	g	phi	micron	%	Freq. Cumul.
Ghiaia	0,00	> -2	> 4000	0,00%	0,00%
	0,00	-2	4000	0,00%	0,00%
	0,00	-1	2000	0,00%	0,00%
Sabbia	0,33	0	1000	0,21%	0,21%
	1,90	1	500	1,21%	1,41%
	5,75	2	250	3,66%	5,07%
	26,34	3	125	16,74%	21,81%
	87,96	4	62,5	55,90%	77,71%
Limo	8,58	5	31	5,45%	83,16%
	3,93	6	15,6	2,49%	85,66%
	3,73	7	7,8	2,37%	88,03%
	4,72	8	3,9	3,00%	91,03%
Argilla	5,26	9	2,0	3,34%	94,37%
	5,34	10	0,98	3,39%	97,76%
	3,52	< 10	< 0,98	2,24%	#####

Classe granulometrica			
Ghiaia	Sabbia	Limo	Argilla
0,00%	77,71%	13,32%	8,97%

Note
11,83 g di materiale organogeno (conchiglie)



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



Stazione AM4

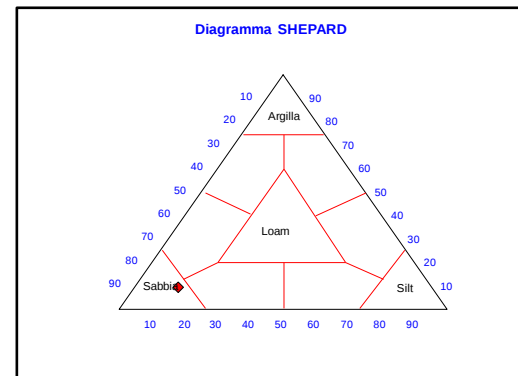
Parametri Fisici		
Peso secco (g)	Ps	155,43
Peso umido (g)	Pu	193,80
Peso specifico	G	n.d.
Peso di volume (g/cm ³)	γ	n.d.
Peso di vol. secco (g/cm ³)	γ_d	n.d.
Umidità (%)	W	n.d.

Parametri Statistici			Percentile	ϕ
Media	M_ϕ	3,85	5°	1,91
Classazione	σ_ϕ	1,37	16°	2,66
Asimmetria	$S_{K\phi}$	0,19	25°	3,06
Appuntimento	K_G	3,34	50°	3,51
Mediana	Md	3,51	75°	3,96
			84°	5,40
			95°	9,20

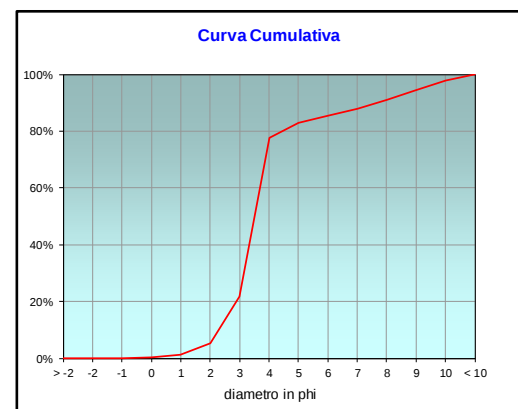
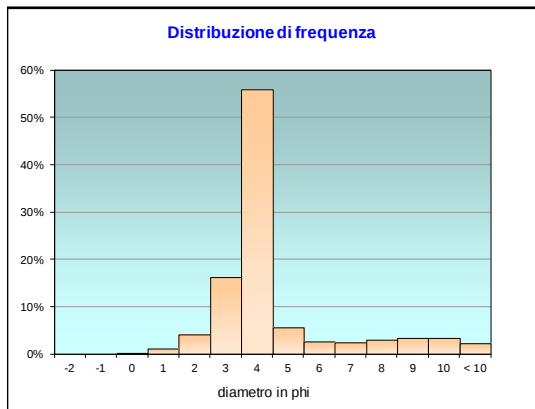
	g	phi	micron	%	Freq. Cumul.
Ghiaia	0,00	> -2	> 4000	0,00%	0,00%
	0,00	-2	4000	0,00%	0,00%
	0,00	-1	2000	0,00%	0,00%
Sabbia	0,35	0	1000	0,22%	0,22%
	1,65	1	500	1,06%	1,28%
	6,36	2	250	4,09%	5,37%
	25,21	3	125	16,22%	21,59%
	86,88	4	62,5	55,90%	77,49%
Limo	8,56	5	31	5,51%	83,00%
	3,92	6	15,6	2,52%	85,51%
	3,72	7	7,8	2,40%	87,91%
	4,71	8	3,9	3,03%	90,94%
Argilla	5,24	9	2,0	3,37%	94,31%
	5,32	10	0,98	3,43%	97,74%
	3,51	< 10	< 0,98	2,26%	#####

Classe granulometrica			
Ghiaia	Sabbia	Limo	Argilla
0,00%	77,49%	13,45%	9,06%

Note
12,07 g di materiale organogeno (conchiglie)



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



Stazione K1

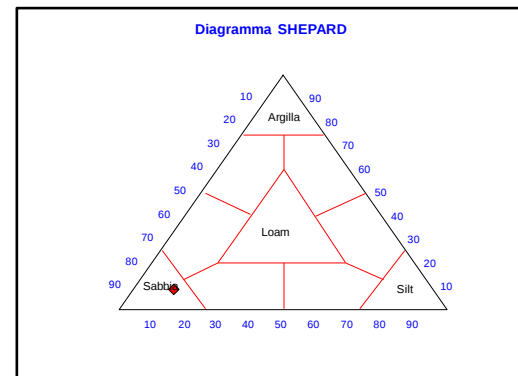
Parametri Fisici		
Peso secco (g)	P _s	159,09
Peso umido (g)	P _u	200,39
Peso specifico	G	n.d.
Peso di volume (g/cm ³)	γ	n.d.
Peso di vol. secco (g/cm ³)	γ_d	n.d.
Umidità (%)	W	n.d.

Parametri Statistici			Percentile	ϕ
Media	M _{ϕ}	3,69	5°	2,01
Classazione	σ_{ϕ}	1,18	16°	2,61
Asimmetria	S _{Kϕ}	0,13	25°	3,03
Appuntimento	K _G	3,25	50°	3,48
Mediana	Md	3,48	75°	3,93
			84°	4,97
			95°	9,09

	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	0,36	0	1000	0,22%	0,22%
	1,83	1	500	1,15%	1,38%
	5,52	2	250	3,47%	4,85%
	28,99	3	125	18,22%	23,07%
	89,06	4	62,5	55,98%	79,05%
Limo	8,15	5	31	5,13%	84,18%
	3,73	6	15,6	2,34%	86,52%
	3,55	7	7,8	2,23%	88,75%
	4,49	8	3,9	2,82%	91,57%
Argilla	4,99	9	2,0	3,14%	94,71%
	5,07	10	0,98	3,19%	97,90%
	3,35	< 10	< 0,98	2,10%	#####

Classe granulometrica			
Ghiaia	Sabbia	Limo	Argilla
0,00%	79,05%	12,52%	8,43%

Note
11,24 g di materiale organogeno (conchiglie)



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

