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"

10° SURVEY SUCCESSIVO ALLE OPERAZIONI DI INSTALLAZIONE (INVERNO 2015)

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

RAPPORTO FINALE

OPERATORE SCIENTIFICO:
CNR – ISMAR SEDE DI ANCONA

RESPONSABILE SCIENTIFICO:
GIANNA FABI

RAPPORTO A CURA DI:
GIANNA FABI
ALESSANDRA SPAGNOLO
MIRENO BORGHINI
DANIELE CASSIN
AMELIA DE LAZZARI
ALESSIO GOMIERO
LUDMILA KOZINKOVA

ANCONA, Dicembre 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 *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* 6

2.2. ANALISI DI LABORATORIO E ANALISI DEI DATI 7

2.2.1. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA 7
2.2.1.1 Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina 8
2.2.2. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA 10
2.2.2.1 *Dunaliella tertiolecta* 10
2.2.2.2 *Vibrio fischeri* 11
2.2.2.3 *Tigriopus fulvus* 11
2.2.3. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* 13
2.2.3.1 Biomarkers 13
2.2.3.2 Metalli pesanti 18
2.2.3.3 Idrocarburi totali 19

3. RISULTATI 20

3.1. MISURE CORRENTOMETRICHE 20

3.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA 26

3.2.1. TEMPERATURA, SALINITÀ, TORBIDITÀ, OSSIGENO DISCIOLTO E TRASPARENZA 26
3.2.2. FLUORESCENZA INDOTTA E CLOROFILLA *A* E TSM 29
3.2.3. RICERCA DI IDROCARBURI TOTALI SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA 30

3.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI D'ACQUA MARINA 31

3.3.1. *DUNALIELLA TERTIOLECTA* 31
3.3.2. *VIBRIO FISCHERI* 35
3.3.3. *TIGRIOPUS FULVUS* 37

3.4. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* 39

3.4.1. BIOMARKERS 39
3.4.2. METALLI PESANTI 45
3.4.3. IDROCARBURI TOTALI 50

4. CONCLUSIONI 51

5. BIBLIOGRAFIA 55

ALLEGATO A Schede tecniche della strumentazione utilizzata nelle indagini I
- ALL. A1 Colonna d'acqua: Indagini fisiche e chimiche e Idrocarburi totali II
- ALL. A2 Analisi di inquinanti in *Mytilus galloprovincialis* V

PARTECIPANTI AL PROGRAMMA

Il presente programma è stato svolto in collaborazione con il Consorzio Interuniversitario di Biologia Marina ed Ecologia Applicata (CIBM) di Livorno.

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
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

Ecotossicologia su campioni di acqua marina

L. Kozinkova	CIBM Livorno
N. Bigongiari	CIBM Livorno

Analisi di inquinanti e biomarker 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 UOS Ancona utilizzata per le indagini.

1. INTRODUZIONE

In riferimento al Programma di Monitoraggio Transfrontaliero ai sensi del Decreto MATTM 2008-000271 del 12-12-2008 relativo all'installazione della piattaforma di estrazione di idrocarburi gassosi "Annamaria B" e redatto da ISPRA in collaborazione con il Centro di Ricerche Marine dell'Istituto Ruder Bošković (Croazia), il CNR-ISMAR UOS di 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.

Annamaria B è stata installata nell'estate 2010 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 la piattaforma è particolarmente interessante dal punto di vista idrodinamico in quanto, trovandosi sulla mid-line, ovvero la linea mediana che divide in due longitudinalmente l'Adriatico, non è influenzata in maniera consistente dalla circolazione generale del bacino (diretta verso Nord lungo il versante croato e verso Sud lungo quello italiano). Tuttavia, in alcuni periodi dell'anno, può essere soggetta a un maggiore idrodinamismo dovuto al passaggio sul fondo di acque dense formatesi nel Nord Adriatico durante la stagione invernale che, avendo caratteristiche chimiche e fisiche differenti da quelle presenti in zona, possono modificare le caratteristiche biogeochimiche e la distribuzione spaziale dei sedimenti. Inoltre, gli strati più superficiali della colonna d'acqua (10-20 m) possono essere interessati da eventi di Bora anche abbastanza consistenti, che possono determinare variazioni brusche di correnti.

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

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

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

Nella fase di monitoraggio successiva all'installazione della piattaforma, della durata

complessiva di 5 anni, gli aspetti da indagare erano i seguenti:

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

Nel presente rapporto sono descritti i risultati relativi ai punti 1-4 e 7 del precedente elenco, corrispondenti a tutte le analisi da condurre nelle stagioni sia estive che invernali, ottenuti nel corso del 1° semestre 2015 (10° survey post lavori; inverno 2015; Tab. 1-I) confrontati, ove possibile, con i dati pregressi.

I risultati completi relativi ai punti 5 e 6, corrispondenti alle analisi sedimentologiche (fisiche, chimiche ed ecotossicologiche) da condurre esclusivamente nei periodi estivi sono stati riportati nel Report relativo al 9° monitoraggio post lavori di installazione (Fabi *et al.*, 2016a).

Tab. 1-I –Cronoprogramma dei survey effettuati nell'intero periodo di indagine per il programma di monitoraggio ambientale transfrontaliero. In grigio le indagini richieste dal Piano di monitoraggio transfrontaliero; nc = non campionati per scarsa presenza di esemplari insediati sulle parti sommerse della piattaforma.

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

2. MATERIALI E METODI

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

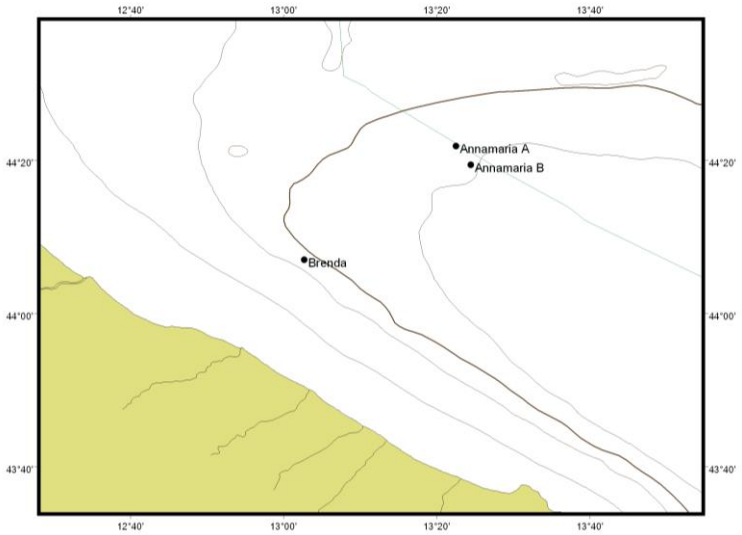


Fig. 2.1 – Ubicazione della piattaforma Annamaria B.

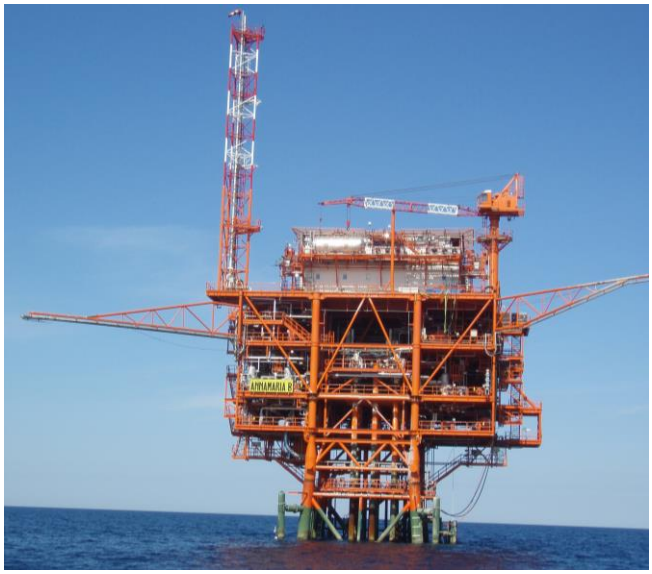


Fig. 2.2 - Piattaforma Annamaria B.

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

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

2.1. CAMPIONAMENTO IN MARE

2.1.1. MISURE CORRENTOMETRICHE

Come richiesto dal Piano di Monitoraggio Transfrontaliero nella fase di produzione di Annamaria B era prevista la registrazione di dati correntometrici due volte l'anno per almeno 1 mese. I dati raccolti dall'estate 2010 a quella del 2014 sono disponibili in Fabi *et al*., 2010a, 2010b, 2011a, 2011b, 2012, 2014a, 2014b, 2015a, 2015b, 2016a, 2016b.

Per quanto concerne il 2015, dal 01 gennaio al 19 febbraio 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 era costituito da un correntometro acustico del peso in acqua di circa 5 kg, una boa con spinta positiva di 55 kg e da 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) della ditta Teledyne RDI. Si tratta del modello WH Sentinel a 600 kHz, con un range di circa 50 m che, oltre a registrare la direzione e la velocità della corrente nei vari strati, misura la temperatura e la pressione nel luogo in cui è posizionato (All. A1-I).

L'accuratezza del correntometro è di 0,3 cm/s e la risoluzione di 0,1 cm/s.

Lo strumento è stato settato per misurare con 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 60 misure.

2.1.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA

Come richiesto dal Piano di Monitoraggio Transfrontaliero nella fase di produzione di Annamaria B sono stati condotti ogni anno due survey per questa tipologia di indagine, i cui risultati sino all'estate 2014 sono riportati in Fabi *et al*., 2010a, 2010b, 2011a, 2011b, 2012, 2014a, 2014b, 2015a, 2015b, 2016a, 2016b.

Nel 1° semestre 2015 è stato effettuato un survey a febbraio utilizzando la N/O G. Dallaporta. Analogamente a quanto già effettuato precedentemente 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).

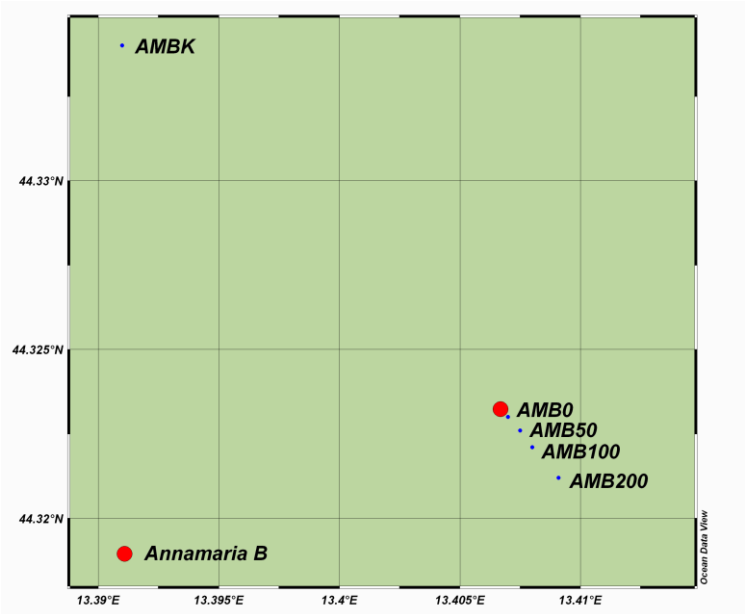


Fig. 2.3 - Schema delle stazioni di campionamento utilizzate dopo i lavori di installazione della piattaforma Annamaria B per le indagini idrologiche.

Tab. 2-II – Profondità e coordinate geografiche delle stazioni di campionamento utilizzate nel febbraio 2015 per le indagini idrologiche.

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

Presso tutti i siti sono stati registrati i valori di temperatura, salinità, fluorescenza *in situ*, torbidità (misura del materiale sospeso) e ossigeno disciolto lungo tutta la colonna d’acqua utilizzando una sonda multiparametrica CTD (Conductivity-Temperature-Depth) SBE9*plus* della Sea-Bird Electronics (All. A1-II), equipaggiata con un sensore di ossigeno SBE43 per la misurazione della concentrazione di ossigeno disciolto, con un sensore di torbidità Wet Labs ECO_NTU per la misurazione della concentrazione del particellato sospeso, con un fluorimetro Wet Labs ECO_AFL/FL per la misurazione della concentrazione di clorofilla e un altimetro della Datasonics per la misurazione della distanza dal fondo. La sonda ha una frequenza di acquisizione di 24 serie di dati per secondo (24 Hz).

La sonda è stata periodicamente calibrata per la temperatura e salinità presso il centro di calibrazione del SACLANT della NATO di La Spezia.
Per la raccolta dei campioni d'acqua a quote discrete, è stata utilizzata una rosette Sea-Bird Carousel, accoppiata al CTD, con bottiglie Niskin della General Oceanics della capacità di 10 lt.
In ogni stazione è stata anche misurata la trasparenza della colonna d'acqua.

2.1.2.1 Ricerca di Idrocarburi totali su campioni di acqua marina

Ad ogni survey condotto nella fase di produzione di Annamaria B in corrispondenza di tutte le 5 stazioni campionate per le indagini fisiche e chimiche della colonna d'acqua sono stati effettuati 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

Negli stessi periodi di cui ai Capp. 2.1.2. e 2.1.2.1 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 da 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 (Fabi *et al.*, 2011a). Nell'inverno 2015 è pertanto avvenuto il 9° campionamento che ha

previsto la raccolta di n. 2 campioni presso Annamaria B, di cui uno in prossimità e uno lontano dagli anodi sacrificali della piattaforma (VA e LA rispettivamente). Come controllo è stato prelevato un ulteriore campione da un impianto di mitilicoltura al largo di Senigallia (AN). Gli esemplari raccolti dai tre siti nell'inverno 2015 avevano le seguenti misure medie (lunghezza conchiglia ± dev.st.):

Controllo: 5,10±0,65 cm;

VA: 5,12±0,45 cm;

LA: 5,20±0,55 cm.

2.2. ANALISI DI LABORATORIO E ANALISI DEI DATI

2.2.1. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA

I campioni d'acqua raccolti a quote discrete, utilizzati per calibrare i sensori montati sulla sonda SBE 9*plus*, 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 µm). 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 µm; 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 dalla 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).

La trasparenza della colonna d'acqua è generalmente misurata come profondità della scomparsa del disco di Secchi (DS in m). In questo survey la trasparenza è stata stimata dal coefficiente di attenuazione K_d (Devlin *et al*., 2008), come:

$$DS = 1{,}4/K_d$$

Il coefficiente K_d (in m^{-1}) è stato calcolato mediante la seguente formula, valida per le acque offshore (Devlin *et al*., 2008):

$$K_d = 0{,}039 + 0{,}067 \times TSM$$

dove TSM (in mg/l) è la concentrazione di materiale particellato, ricavato dalle misure di torbidità.

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 (C40 H82) (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 estraibile**:* Utilizzando un cilindro graduato è stato misurato 1 lt (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', con sfiato periodico per scaricare la pressione in eccesso. Lo strato organico è stato lasciato separato dalla fase acquosa per almeno10'. 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 rivelatore a fiamma (FID) con colonna capillare (EPA, 2003a).

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

***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, 2003b).

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 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).

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 $2x10^3$ cellule ml^{-1}), le piastre sono state trasferite per 72 h in camera fitologica a condizioni di temperatura e luminosità controllate (T = 20±2°C, luminosità < 10000 lux). Al termine dell'esposizione è stata verificata la crescita algale nel campione, espressa come densità algale, mediante lettura al Coulter Counter; si è proceduto quindi al conteggio delle tre repliche del campione tal quale e del controllo e al loro confronto statistico, per verificare eventuali aumenti o diminuzioni significative della crescita algale nel campione rispetto al controllo e procedere eventualmente alla lettura delle altre diluizioni.

Espressione e analisi dei dati – I risultati del saggio possono essere riportati come percentuale di inibizione della crescita algale e, qualora la tossicità del campione lo consenta, in termini di EC_{50} o EC_{20} . L'EC_{50} e l'EC_{20} si calcolano utilizzando il foglio Excel sviluppato dalla DTU (Danmarks Tekniske Universitet) denominato "KOK457T3" che utilizza i programmi statistici LOG457.EXE e LOG457W.EXE elaborati per la determinazione della relazione concentrazione-effetto in endpoint continui (Christensen *et al*., 2009). Sulla base dei risultati espressi in termini di inibizione/stimolazione della crescita e dell'analisi statistica del dato eco-tossicologico (eseguita secondo lo schema USEPA, 1991), i risultati del saggio possono essere suddivisi nelle seguenti categorie:

- *assenza di effetto*: percentuale di inibizione/stimolazione <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 EC_{50}, è stato confrontato con i dati della carta di controllo del laboratorio il cui intervallo è compreso tra 5,0 – 16,0 mg/lt 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 ($2x10^3$ cellule ml^{-1});
- il coefficiente di variazione nei controlli e nel campione tal quale (CV%): ≤ 15%.

2.2.2.2 *Vibrio fischeri*

Il saggio è stato eseguito utilizzando acqua di mare naturale come controllo secondo il protocollo Comparison Test (Azur Environmental, 1994) e utilizzando 5 repliche del campione e 5 repliche del controllo, con letture in 2 tempi (5' e 15'). I campioni sono stati preventivamente filtrati attraverso membrana di 0,45 µ. Il risultato del test è stato espresso come differenza percentuale della bioluminescenza (Δ % biol.) del campione a una concentrazione del 90% rispetto al controllo (acqua di mare naturale). La significatività della differenza è stata valutata mediante il test t di Student. Il giudizio qualitativo è stato formulato in base alla scala di tossicità riportata in Tab. 2-III.

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

H_20 mare	**Test t**	**Tossicità**
Variazione biolumin. %		
Δb < -10	p < 0,05	Ormesi
-10 ≤ Δ ≤ 10	p qualunque	Assente
-10 ≤ Δ ≤ 20	p < 0,05	Bassa
20 ≤ Δ ≤ 40	p < 0,05	Media
Δb > 40	p < 0,05	Elevata

2.2.2.3 *Tigriopus fulvus*

Tigriopus fulvus Fischer (fig. 2.4) è un copepode arpacticoide meiobentonico, ampiamente

diffuso nell'area mediterranea e facilmente identificabile (Carli e Fiori 1979; Carli *et al*., 1988; Pane *et al.*, 1996).

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

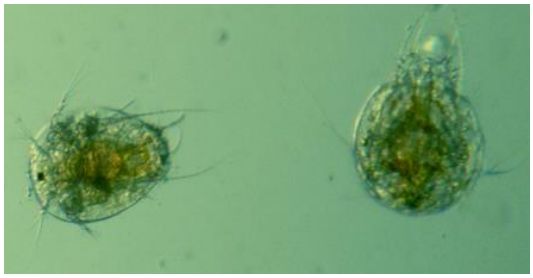


Fig. 2.4 - Nauplii di *Tigriopus fulvus.*

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 150cm^2 (0,5 lt) con tappo ventilato, munito di membrana da 0,22 µm alle seguenti condizioni (Faraponova *et al*., 2005):

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

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

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

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

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

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

utilizzando il software Primer 5.0.

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

2.2.3. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

2.2.3.1 Biomarkers

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

Indici di stress generale:	sopravvivenza in aria (stress on stress);
	stabilità delle membrane lisosomiali.
Indici di esposizione:	metallotioneine;
	livelli di lipofuscine;
	livelli di lipidi neutri;
Danno genotossico:	test della cometa.

Sopravvivenza in aria - Il tempo di sopravvivenza in aria, o "Stress On Stress", è un indice generale particolarmente sensibile nell'individuare le condizioni di stress ambientale a cui sono sottoposti i bivalvi. La definizione di tale parametro si basa sulla naturale capacità di questi organismi intertidali di resistere a brevi periodi di esposizione all'aria (Eertman e de Zwann, 1994). Durante i periodi di emersione i molluschi chiudono le loro valve lasciando una piccola apertura attraverso la quale l'ossigeno atmosferico può diffondere nella cavità palleale. La velocità con cui l'ossigeno viene consumato dipende da numerosi fattori, quali ad esempio temperatura, stagione, acclimatazione e periodo riproduttivo. In condizioni di prolungata esposizione i molluschi riescono a sopravvivere per molti giorni grazie all'evoluzione di una particolare strategia biochimica: il loro metabolismo, infatti, passa da aerobico ad anaerobico e in questo caso i carboidrati, e soprattutto il glicogeno, diventano la principale fonte d'energia attraverso processi di fermentazione che consentono di aumentare la normale produzione di ATP in condizioni anaerobiche (de Zwaan e Wijsman, 1976). I molluschi esposti a sostanze tossiche o a stress naturali in genere hanno un metabolismo accelerato (de Zwaan e de Kock, 1988) e, pertanto, ci si aspetta che una volta esposti all'aria il loro tempo di sopravvivenza sia minore.

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±1°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, a danno cellulare. E' importante ricordare che i diversi inquinanti presenti nell'ambiente marino presentano effetti sinergici sulla destabilizzazione delle membrane lisosomiali; questo indice di stress rappresenta, quindi, la risposta dell'organismo all'azione combinata di più tossici co-presenti nell'ambiente marino (Lowe *et al*., 1995).

In laboratorio le ghiandole digestive di 5 mitili provenienti da ciascun sito sono state tagliate in modo tale da ottenere delle sezioni trasversali dei tubuli disposti parallelamente all'asse longitudinale della ghiandola stessa e poste in fila su apposito supporto in alluminio (chuck) per criostato (All. A2-I) precedentemente raffreddato in ghiaccio. Successivamente, il supporto con i frammenti è stato posto per 15" in un piccolo recipiente contenente N-esano, precedentemente raffreddato con azoto liquido. Il chuck è stato poi avvolto in 4-5 strati di Parafilm e posto immediatamente a -80°C. Al momento dell'analisi, per mezzo di un criostato, sono state ottenute sezioni di 10-20 µm di spessore con un'angolatura di taglio di 15°. Le sezioni sono state quindi trasferite su vetrini tenuti a temperatura ambiente. La stabilità della membrana lisosmiale è stata testata attraverso l'enzima N-acetyl-hexosaminidase che ha come substrato il 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 napthol As-BI N-acetyl-β-D-glucosaminide precedentemente disciolto in 2,5 ml di 2-metossietanolo e portato a volume con il tampone citrato contenente Polipep, un polipeptide a bassa viscosità che agisce come stabilizzante per le sezioni. L'incubazione con il substrato è stata di 20' a 37°C nella vaschetta di Hellendal in un bagno agitante. I vetrini sono stati successivamente risciacquati in acqua di mare filtrata a temperatura ambiente o in una soluzione di NaCl al 3% a 37°C per 2' prima del loro trasferimento per 10' a temperatura ambiente in un tampone fosfato pH 7,4 contenente il colorante diazoinico fast violet B blue. I vetrini, risciacquati in acqua corrente per 5', sono stati successivamente fissati con gelatina glicerinata. Le sezioni così ottenute sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine al microscopio ottico (All. A2-II) per la determinazione del periodo di labilizzazione lisosomiale. Le analisi sono state eseguite almeno in quintuplicato.

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

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

dell'uso e quindi sono stati centrifugati a 3.000 x g. L'assorbanza è stata valutata per via spettrofotometrica (All. A2-IV) misurandola a 412 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 vanno ad accumularsi nel sistema vacuolare lisosomiale sotto forma di lipofuscine. Studi recenti (Terman e Brunk, 2004; Viarengo *et al*., 2007) evidenziano 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 è stato valutato utilizzando il metodo Schmorl (Moore, 1990).

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

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

Le sezioni, derivanti da 5 individui per ciascun sito preparate al criostato (All. A2-I) con la stessa modalità seguita per la valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali, sono state fissate in calcio-formolo per 15' a 4°C, risciacquate in acqua distillata e poste in una

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

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

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

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

<u>Versione Alcalina:</u> ogni vetrino è stato asciugato dal buffer di lisi e trasferito nella soluzione alcalina (pH>13) per 15' al buio e a temperatura ambiente. Esso è poi stato posizionato sul bagno di corsa elettroforetica precaricato con la medesima soluzione, settando il voltaggio a 0,7 V/cm e realizzando l'elettroforesi per 45'. Terminata la corsa il vetrino è stato prelevato e lasciato scolare. Con una pipetta sono stati prelevati 500 µl di soluzione neutra e posti sopra il preparato, incubando per 5'. Tale step, pur essendo opzionale, aiuta a ridurre l'effetto background. Il vetrino è stato quindi posizionato in etanolo 70% per 5' e successivamente asciugato all'aria e a temperatura ambiente. E' stata quindi preparata la fase di colorazione e lettura.

<u>Versione Neutra:</u> anche in questo caso, ogni vetrino è stato asciugato dal buffer di lisi e

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

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

2.2.3.2 Metalli pesanti

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

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

Circa 10 g di campione umido proveniente da ciascun sito (VA, LA e controllo) è stato opportunamente pesato e posto in provette di digestione in polipropilene da 65 ml non riutilizzabili con un indicatore di volume da 50 ml perfettamente calibrato di Classe "A". In contemporanea, è stato previsto un bianco di mineralizzazione costituito dai soli reagenti utilizzati per la fase di mineralizzazione e da una prova di recupero su materiale di riferimento certificato tipo IRMM ERM-CE278 o similare. Un vetrino nervato in polipropilene è stato applicato in ogni provetta di digestione per prevenire una cross-contaminazione dei campioni e per aiutare il riflusso durante la digestione. Su ogni campione sono stati aggiunti 18 ml di una miscela 1:2 di H_2O_2/HNO_3. Il campione è stato mescolato e lasciato digerire per 12 h. Successivamente, è stato applicato un gradiente termico attraverso una piastra riscaldante che ha previsto l'aumento della temperatura fino

a 65°C in 30'. Si è quindi portato il campione a 115°C per 150' e si è proceduto al raffreddamento parziale e all'aggiunta di ulteriori 1,5 ml di HNO_3, 3,5 ml di H_2SO_4 e 1 ml di HCl. I 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 cosi trasferito in matraccio tarato di classe A, portato al volume finale di 100 ml e filtrato su filtro monouso a trottola in Telon. I campioni liquidi così ottenuti sono stati analizzati tramite un sistema ICP-OES (Optima 7300, Perkin Elmer; All. A2-V) dotato di sistema di nebulizzazione/iniezione tipo MiraMist®. Le condizioni operative applicate per le analisi sono riportate in Tab. 2-IV.

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

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

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

Un'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. Un'aliquota dell'estratto purificato è stato analizzato in GG-FID. In particolare, è stata misurata l'area totale dei picchi presenti nell'intervallo delimitato dalle tre soluzioni di riferimento C_5,C_{12} e C_{40}. LA quantità di idrocarburi è stata quindi determinata mediante confronto con la soluzione di riferimento esterno costituito da quantità uguali di tre standard. Inoltre, sono state disposte prove in bianco per ogni serie di analisi al fine di identificare la baseline.

3. RISULTATI

3.1. MISURE CORRENTOMETRICHE

Il grafico della pressione relativo al periodo di indagine 01/01 - 19/02/2015 denota il mantenimento di buon equilibrio dell'ormeggio (fig. 3.1). Infatti, non si sono verificati abbattimenti significativi del correntometro tali da poter creare problemi alle misure.

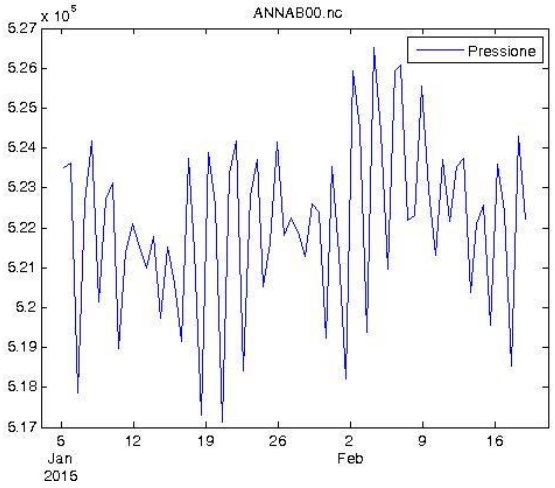


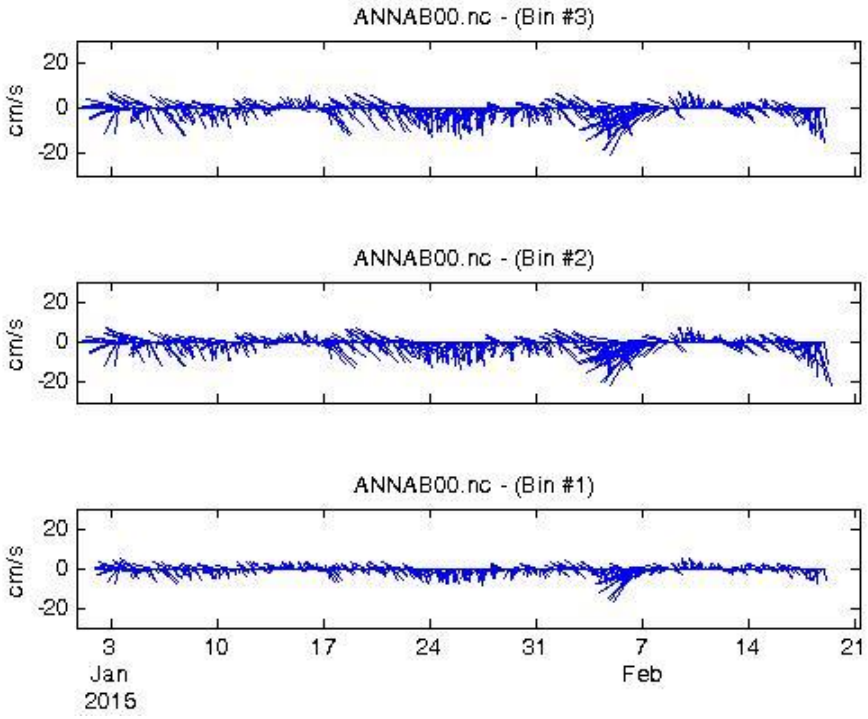
Fig. 3.1 - Pressione misurata dal correntometro nel periodo 01/01 - 19/02/2015 presso la piattaforma Annamaria B.

Per quanto concerne la corrente (fig. 3.2), la direzione prevalente è stata SW. In alcuni brevi periodi (17 gennaio, 16 febbraio) si sono verificate rotazioni verso NE.

L'intensità della corrente è apparsa abbastanza costante e modesta, tra 17 e 23 cm/s. Durante l'intero periodo la velocità della corrente è risultata mediamente superiore nei cinque bin più vicini alla superficie (da -10 m) dove, presumibilmente influenzata dal vento, si è stabilizzata intorno a 18-20 cm/s.

La temperatura misurata dal correntometro durante il periodo (fig. 3.3) ha presentato un andamento decrescente passando da 14,7°C a 12°C.

Bn1= -49 m Bn2= -47 m Bn3= -43 m



Bn4= -41 m Bn5= -39 m Bn6= -37 m

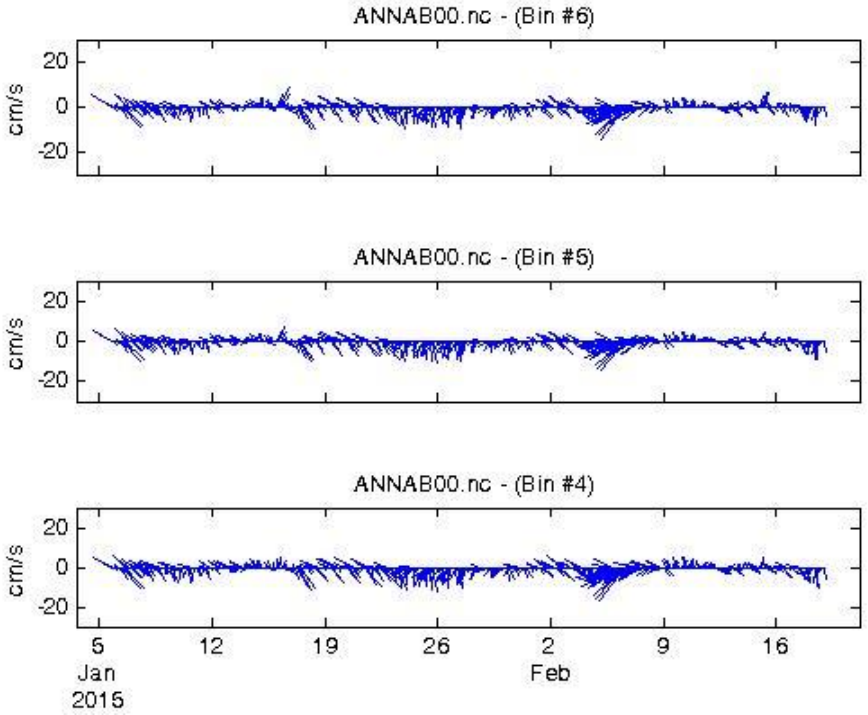
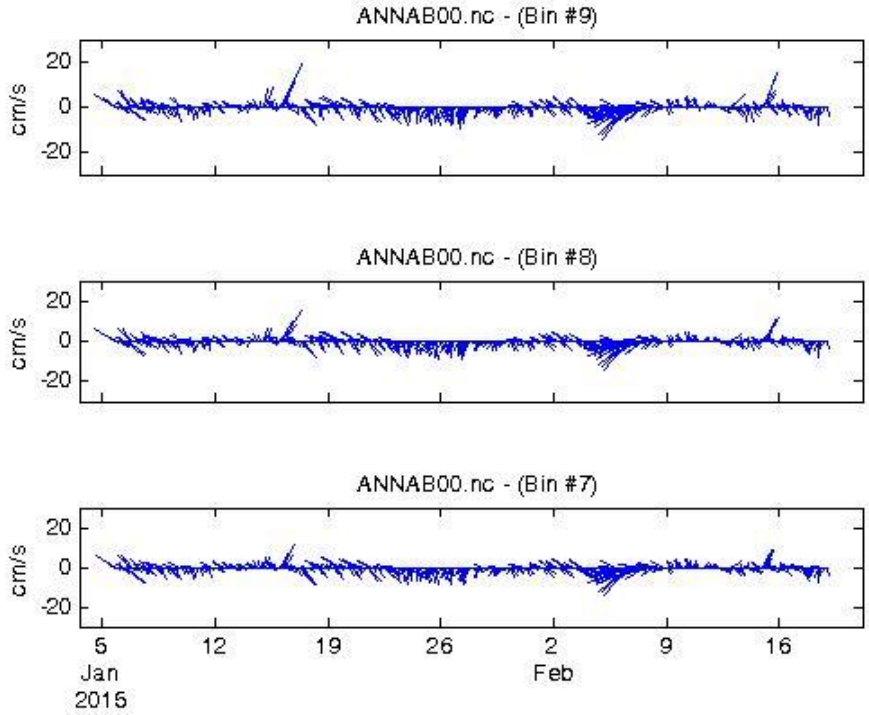


Fig. 3.2 - Componenti Nord ed Est dell'intensità delle correnti registrate dall'ADCP nel periodo 01/01 - 19/02/2015.

Bn7= -35 m Bn8= -33 m Bn9= -31 m



Bn10= -29 m Bn11= -27 m Bn12= -25 m

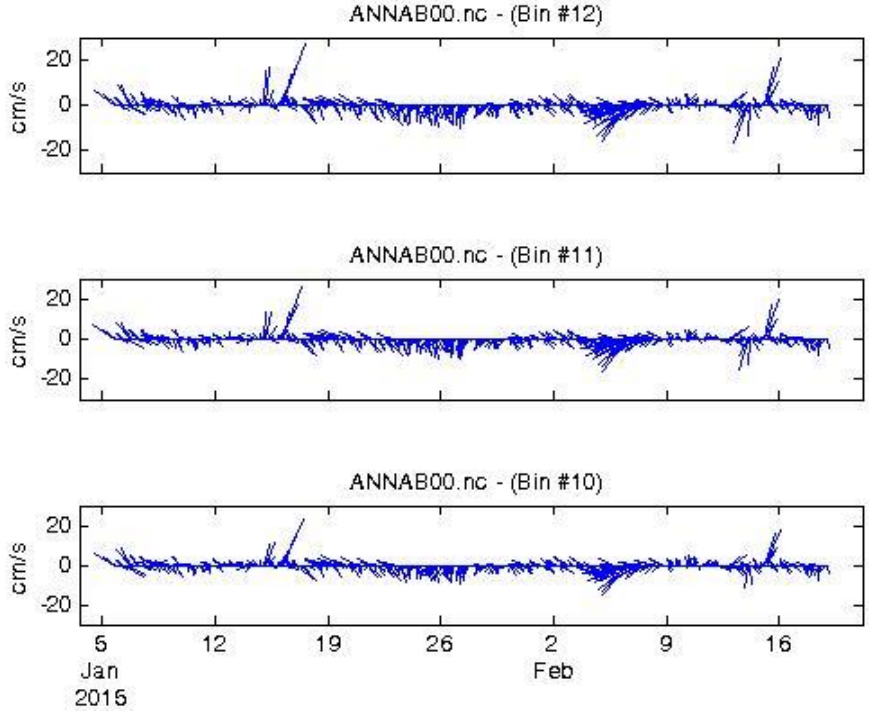
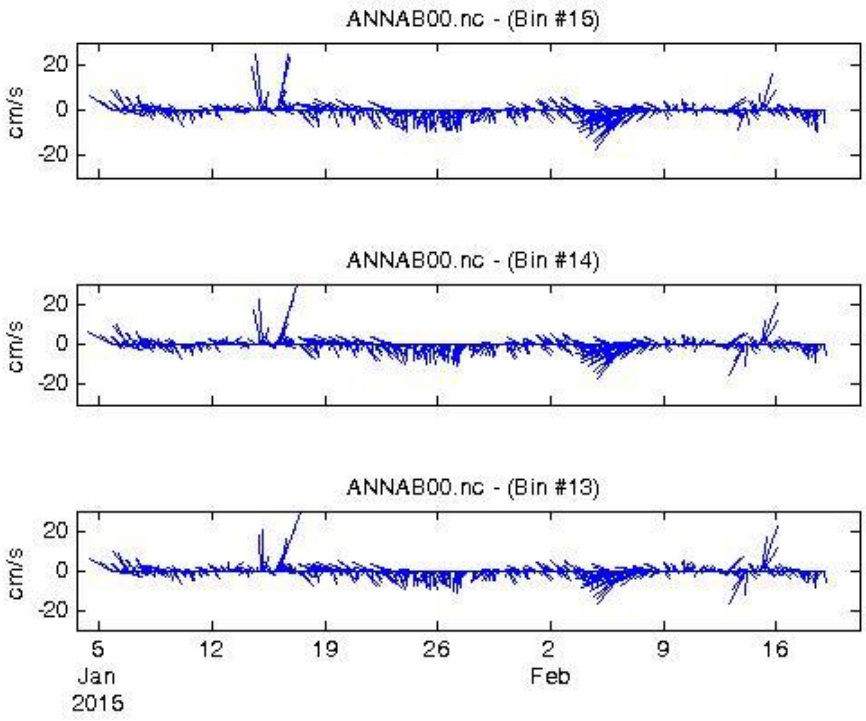


Fig. 3.2 - Continuo.

Bn13= -23 m Bn14= -21 m Bn15= -19 m



Bn16= -17 m Bn17= -15 m Bn18= -13 m

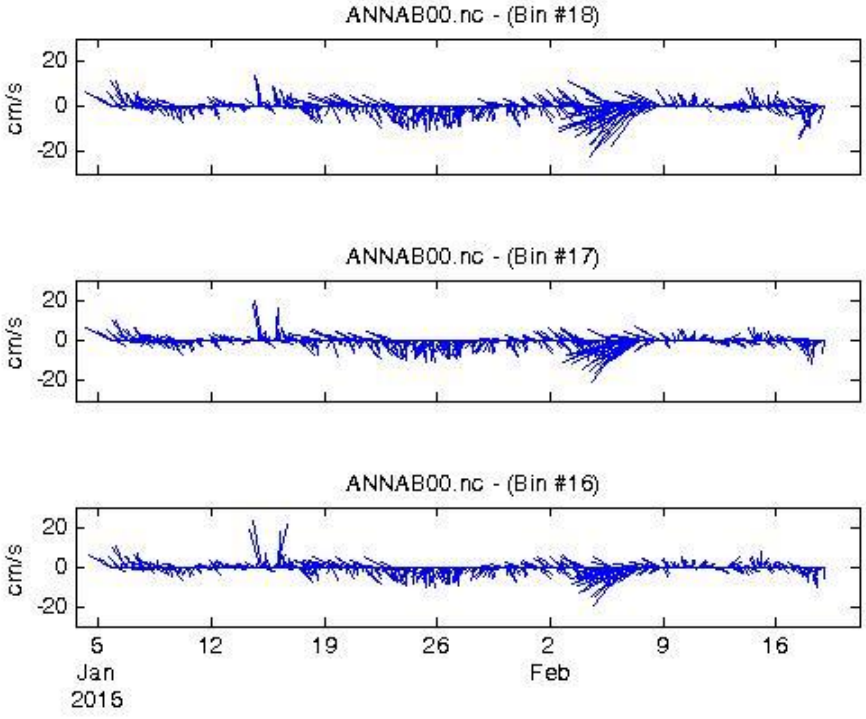
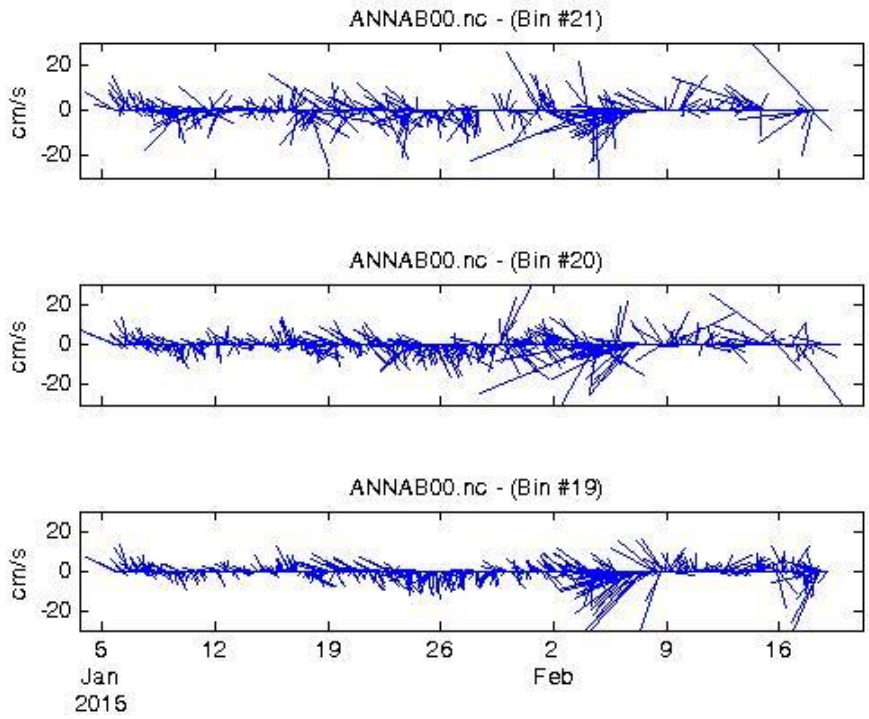


Fig. 3.2 - Continuo.

Bn19= -11 m Bn20= -9 m Bn21= -7 m



Bn22= -5 m Bn23= -3 m Bn24= 1m

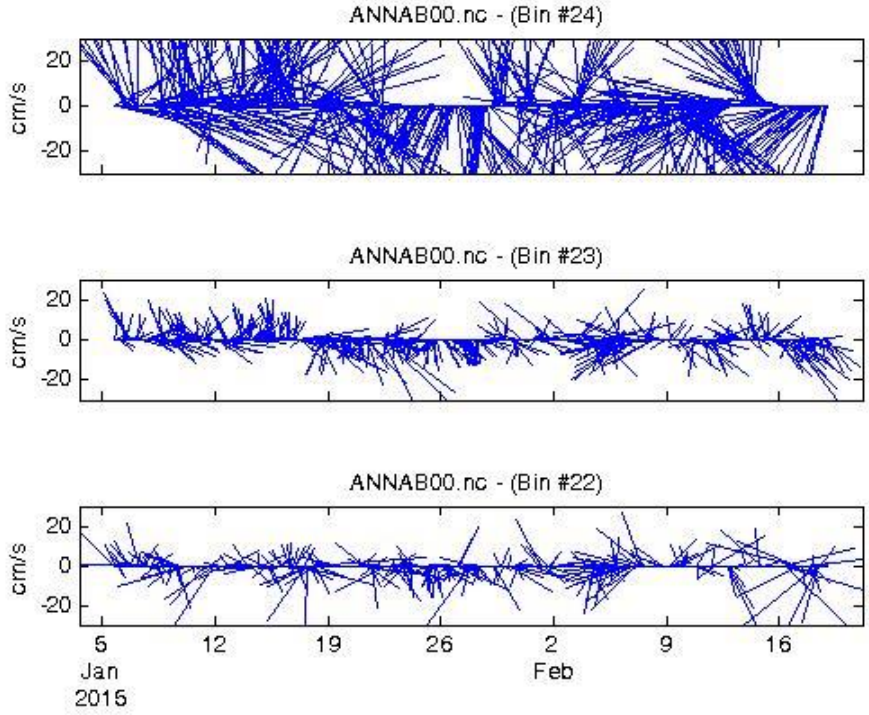


Fig. 3.2 - Continuo.

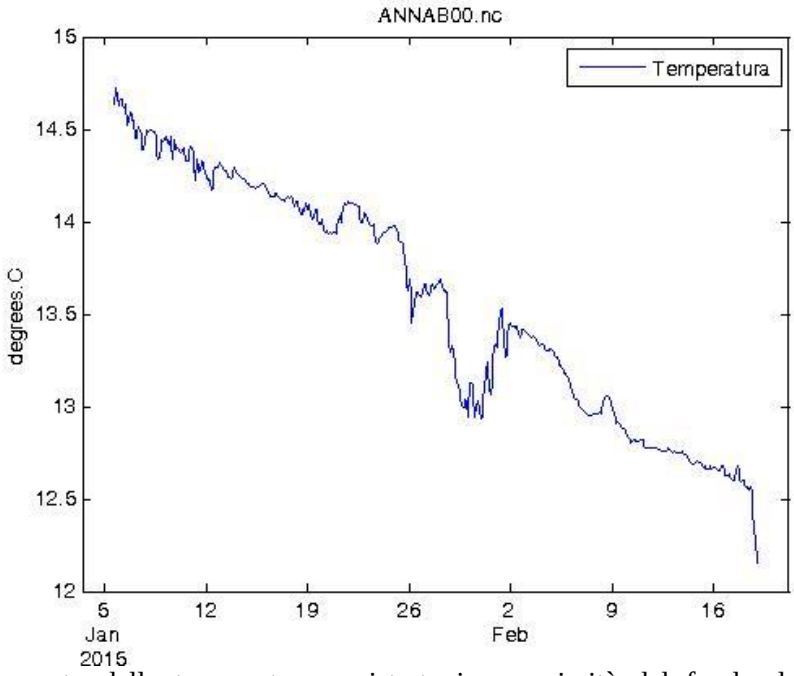


Fig. 3.3 - Andamento della temperatura registrata in prossimità del fondo dal sensore installato sull'ADCP dal 01/01 al 19/02/2015.

3.2. INDAGINI FISICHE E CHIMICHE DELLA COLONNA D'ACQUA

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

Nella presente relazione vengono riportati i dati relativi al monitoraggio condotto nel febbraio 2015.

Analogamente a quanto osservato nei medesimi periodi degli anni precedenti, anche nel 2015 la colonna d'acqua è risultata quasi totalmente rimescolata, condizione tipica del periodo invernale. In particolare la **temperatura** (fig. 3.4) è apparsa costante su tutta la colonna, con un'elevata omogeneità fra le stazioni più vicine alla piattaforma dove si è attestata su 12,0°C circa. Nel sito AMBK, localizzato 2000 m a NW della struttura, la temperatura è risultata di poco superiore (media 12,18±0,02°C).

La **salinità** è apparsa anch'essa pressoché costante lungo tutta la colonna d'acqua, con valori compresi tra 38,27 e 38,29 psu in tutte le stazioni ad eccezione della stazione AMBK, dove è stata registrata una salinità media di 38,34±0,00 psu.

Anche la **torbidità** non ha mostrato variazioni particolari lungo la colonna, essendo per lo più compresa tra 1,1 e 1,5 NTU con un picco in AMBK a 46 m di profondità (1,9 NTU).

L'**ossigeno disciolto** ha mostrato condizioni di lieve sovrasaturazione in tutta la colonna d'acqua, con valori superiori al 103%, senza distinzioni tra le stazioni.

La **trasparenza**, stimata dalle misure di torbidità, è risultata di 5,2 m in tutte le stazioni eccetto AMB50 (5,3 m), risultando pertanto inferiore a tutti i periodi di indagine precedenti (fig. 3.5).

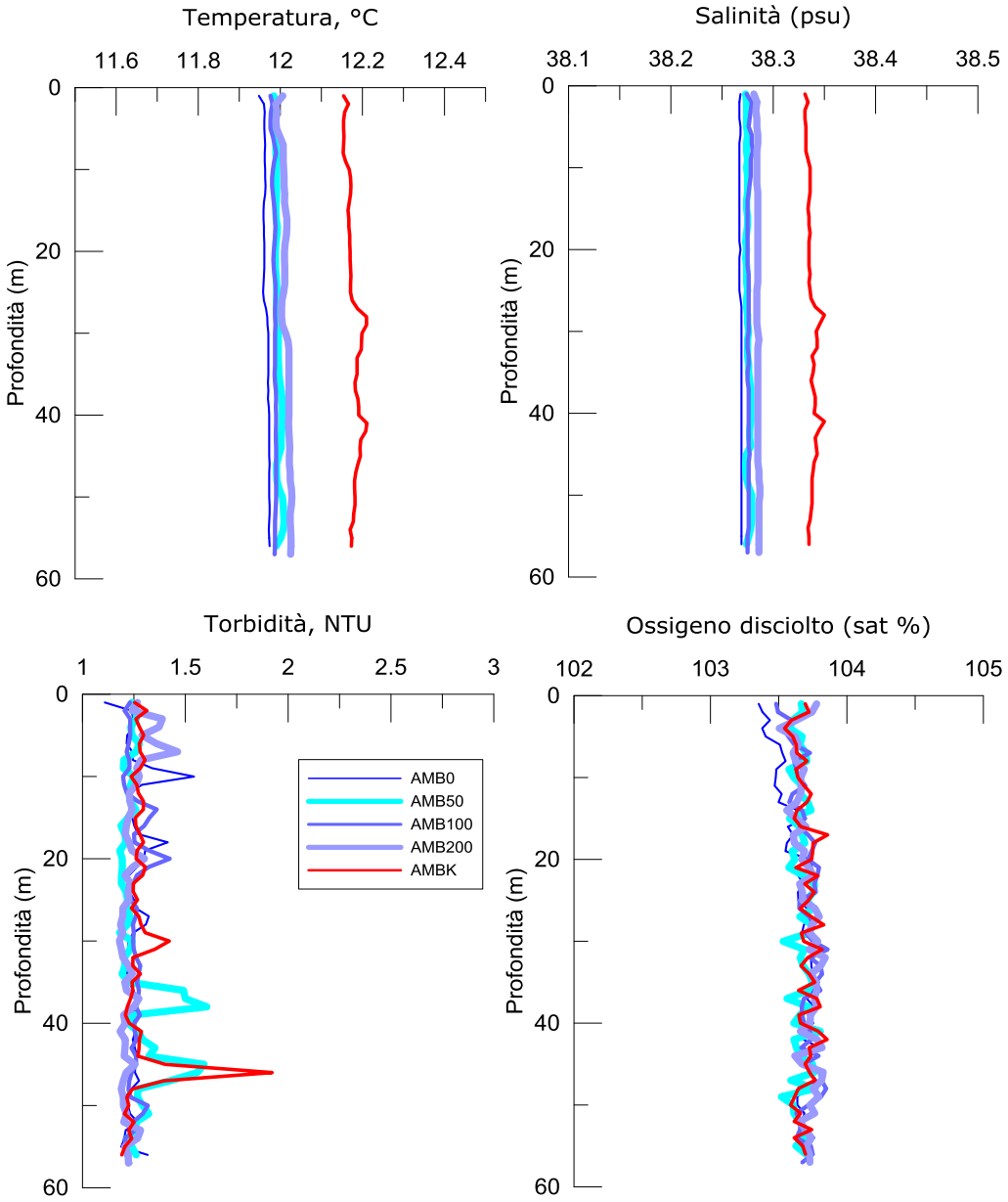


Fig. 3.4 - Profili di temperatura (°C), salinità (PSU), torbidità (NTU) e saturazione di ossigeno (%). Febbraio 2015.

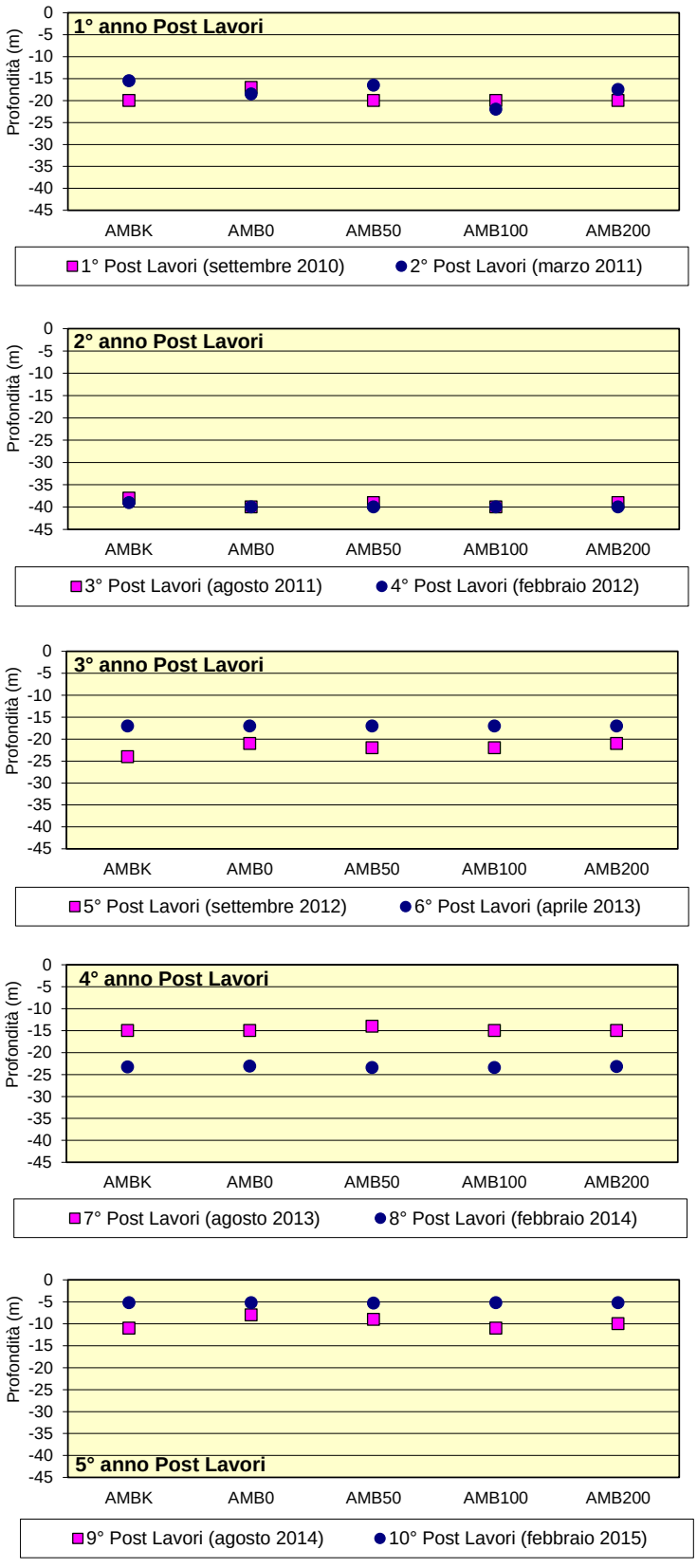


Fig. 3.5 -Trasparenza della colonna d'acqua, stimata dalla torbidità, lungo il transetto NW–SE nell'intero periodo di monitoraggio relativo alla fase di produzione di Annamaria B.

3.2.2. FLUORESCENZA INDOTTA, CLOROFILLA A E TSM

Nel febbraio 2015 le concentrazioni di clorofilla *a*, misurate come **fluorescenza** *in situ*, sono risultate comprese tra 1,39 µg/l (AMB0, 45 m) e 3,99 µg/l (AMB200, fondo; fig. 3.6a), mentre la **clorofilla *a*** misurata mediante HPLC (fig. 3.6b) è oscillata tra 0,68 µg/l e 2,43 µg/l (AMB200, rispettivamente a 30 m e fondo).

I valori di **TSM**, misurato con metodo gravimetrico (fig. 3.6c), sono risultati compresi tra 3,26 e 3,57 mg/l (rispettivamente AMB0, superficie e AMB100, 20 m), senza variazioni di rilievo fra le varie stazioni.

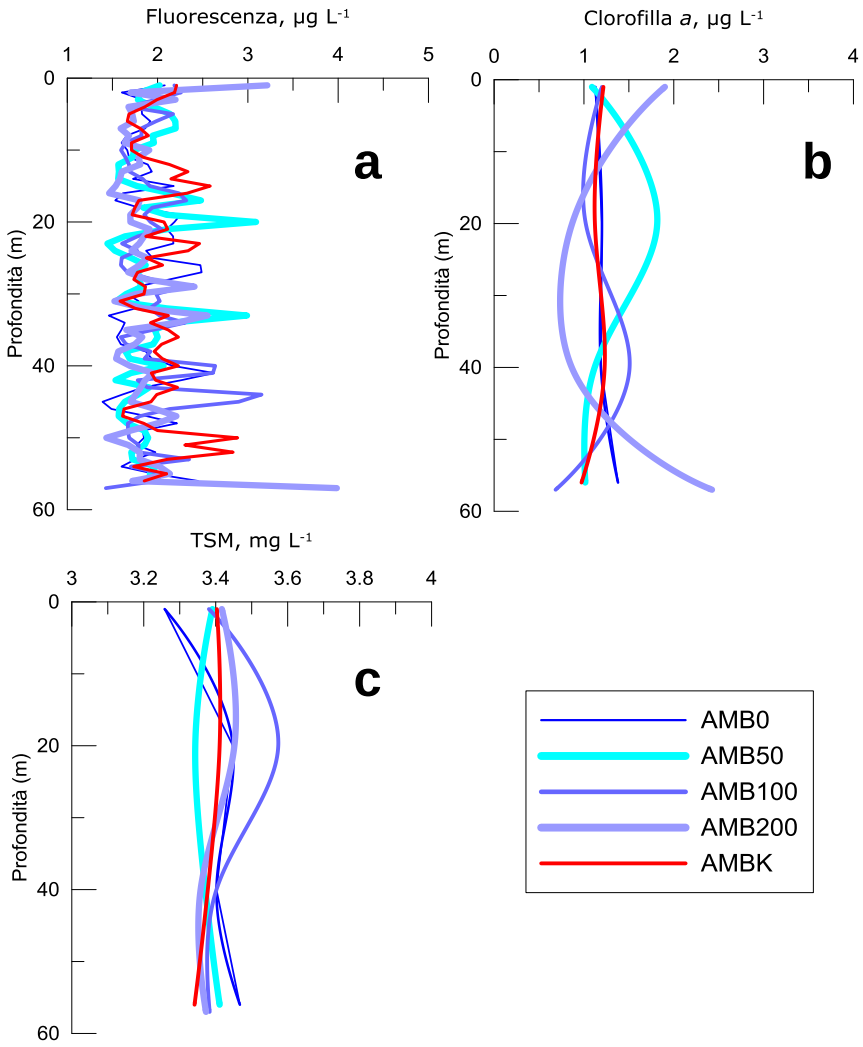


Fig. 3.6 - Profili di a) fluorescenza (µg/l), b) clorofilla a (µg/l) e c) Total Suspended Matter (mg/l) registrati durante il survey effettuato nel febbraio 2015.

3.2.3. RICERCA DI IDROCARBURI TOTALI SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA

I risultati relativi alla ricerca di Idrocarburi totali determinati nei campioni d'acqua raccolti nel febbraio 2015 hanno confermato quanto osservato in tutti i survey precedenti, ovvero la completa assenza di questi composti organici in tutti i siti esaminati e lungo l'intera colonna d'acqua (Tab. 3-I).

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

Stazione	Quota	Idrocarburi Totali (µg/l)									
		Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012	Estate 2012	Inverno 2013	Estate 2013	Inverno 2014	Estate 2014	Inverno 2015
AMBK	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
AMB0	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
AMB50	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
AMB100	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
AMB200	Superficie	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	-40	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	Fondo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

3.3. ECOTOSSICOLOGIA SU CAMPIONI DI ACQUA MARINA

3.3.1. *DUNALIELLA TERTIOLECTA*

QA-QC - Nell'inverno 2015 i risultati dei test eseguiti come controllo positivo con $K_2Cr_2O_7$ (10,7 mg/l come cromo) sono rientrati nei limiti della carta di controllo intralaboratorio (5,0 – 16,0 mg/l); i coefficienti di variazione tra le repliche nei campioni non diluiti, alla massima concentrazione, sono risultati conformi perché in tutti i casi inferiori al 15%. La crescita algale nei controlli è sempre risultata superiore rispetto al limite minimo consentito (fattore ≥16).

Risultati del saggio - I risultati del saggio applicato ai campioni d'acqua raccolti nell'inverno 2015 sono riportati in Tab. 3-II, contestualmente ai principali parametri di contorno misurati.

In tutti i campioni di acqua testati non è stato rilevato alcun effetto tossico sulla crescita algale. In alcuni è stato osservato un effetto eutrofizzante (crescita algale leggermente superiore rispetto al controllo).

Tab 3-II - Parametri di contorno e risultati relativi al saggio di tossicità con *D. tertiolecta* nei campioni di acqua raccolti nell'inverno 2015. I valori negativi della percentuale di effetto indicano effetto stimolante. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

Stazione	Quota	pH	% Effetto 100% campione	EC50 %	Intervallo fiduciale 95%	EC20 %	Intervallo fiduciale 95%	Giudizio
AMBK	superficie	8,19	-18%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-20	8,21	-16%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,17	-17%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,22	-14%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB0	superficie	8,25	-24%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,20	-21%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-40	8,20	-15%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,27	-17%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB50	superficie	8,24	-20%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,21	-23%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-40	8,26	-19%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,22	-16%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB100	superficie	8,21	-21%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	8,23	-12%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,22	-14%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,29	-18%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
AMB200	superficie	8,20	-17%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-20	8,19	-15%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	-40	8,25	-13%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto
	fondo	8,22	-9%	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Assenza di effetto

Confronto con i survey precedenti – Nell'inverno 2011 era stato notato un leggero peggioramento in AMBK (superficie e fondo) e in AMB200 (superficie) dove si era evidenziato un lieve effetto (Tab. 3-III). In corrispondenza della struttura (AMB0) le condizioni erano invece migliorate, essendo scomparso l'effetto riscontato a -20 m nell'estate 2010. Anche in AMB100 alle quote di 20 e 40 m la situazione era apparsa migliorata nell'inverno 2011. Nelle altre due stazioni le condizioni continuavano a non destare preoccupazioni, essendo ovunque assente l'effetto o essendo presente un effetto eutrofizzante. Nell'estate 2011 si confermava l'assenza di effetto già evidenziata nella maggior parte delle stazioni e un miglioramento nei siti in cui nel monitoraggio precedente si era rilevata una leggera presenza di effetto. Nulla da segnalare per quanto riguarda tutti i monitoraggi successivi (inverno 2012 - inverno 2015).

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

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

Tab 3-III – Continuo.

Sito		Inverno 2013	Estate 2013	Inverno 2014	Estate 2014	Inverno 2015
AMBK	superficie	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-20	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-40	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB0	superficie	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante
	-40	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB50	superficie	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante
	-40	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB100	superficie	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante	Presenza effetto eutrofizzante
	-20	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-40	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
AMB200	superficie	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Presenza effetto eutrofizzante	Assenza di effetto
	-20	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	-40	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto
	fondo	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto	Assenza di effetto

3.3.2. *VIBRIO FISCHERI*

QA-QC – I valori EC_{50} di 0,82 mg/l e di 0,47 mg/l ottenuti nell'inverno 2015 rispettivamente a 5' e a 15'con sostanza di riferimento (Cu^{++}) sono rientrati all'interno del range di riferimento relativo al test Microtox® (0,42–1,16 mg/l e 0,03–0,75 mg/l rispettivamente per il test a 5' e 15') UNICHIM (Onorati *et al*., 2007).

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

Tab. 3-IV - Risultati del saggio biologico con il *Vibrio fischeri* applicato ai campioni di acqua marina prelevati nell'inverno 2015. 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	-3,87	-5,36	-2,38	>0,05	-3,32	-6,40	-0,23	>0,05
	-20 m	-5,14	-7,93	-2,35	>0,05	-5,39	-8,57	-2,21	>0,05
	-40 m	-3,26	-5,01	-1,50	>0,05	-3,48	-4,66	-2,30	>0,05
	fondo	-4,89	-6,47	-3,30	>0,05	-4,74	-6,28	-3,19	>0,05
AMB0	superficie	0,51	-0,93	1,97	>0,05	0,43	-1,13	2,00	>0,05
	-20 m	0,88	-1,00	2,78	>0,05	-2,86	1,90	3,82	>0,05
	-40 m	-4,72	2,92	6,51	>0,05	6,09	4,64	7,54	>0,05
	fondo	4,58	3,09	6,07	>0,05	4,39	3,33	5,45	>0,05
AMB50	superficie	-4,09	-6,12	-2,04	>0,05	-3,90	-5,71	-2,09	>0,05
	-20 m	0,65	-2,30	0,98	>0,05	-0,67	-2,66	1,32	>0,05
	-40 m	3,84	2,25	5,42	>0,05	3,64	2,10	5,18	>0,05
	fondo	-0,03	-2,42	2,35	>0,05	0,14	-2,13	2,42	>0,05
AMB100	superficie	2,08	0,31	3,86	>0,05	2,01	0,03	4,00	>0,05
	-20 m	-2,75	-4,51	-0,99	>0,05	-2,61	-4,05	-1,16	>0,05
	-40 m	5,40	3,99	6,81	>0,05	5,46	3,84	7,08	>0,05
	fondo	5,30	3,04	7,55	>0,05	5,06	2,59	7,54	>0,05
AMB200	superficie	-1,47	-4,22	1,26	>0,05	-1,36	-4,42	1,69	>0,05
	-20 m	-0,06	-3,06	2,93	>0,05	-0,07	-3,04	2,89	>0,05
	-40 m	5,13	3,75	6,51	>0,05	5,60	3,66	7,55	>0,05
	fondo	5,63	4,26	7,01	>0,05	6,10	4,67	7,53	>0,05

Confronto con i survey precedenti - Nell'inverno 2015 sono stati completamente confermati i risultati ottenuti a partire dall'estate 2010 (Tab. 3-VI).

Tab. 3-V - Stima di tossicità relativa al saggio biologico con *Vibrio fischeri* effettuato nell'inverno 2015. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

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

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

Stazione	Quota	Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012	Estate 2012	Inverno 2013	Estate 2013	Inverno 2014	Estate 2014	Inverno 2015
AMBK	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB0	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB50	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB100	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB200	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente

3.3.3. *TIGRIOPUS FULVUS*

QA-QC – Nell'inverno 2015 la percentuale di crescita nei controlli è risultata conforme al controllo (< 10%).

Risultati del saggio - I risultati del saggio applicato ai campioni relativi all'inverno 2015 rispetto all'end point di sopravvivenza sono riportati in Tab. 3-VII. Non è stato evidenziato alcun effetto tossico nei confronti della sopravvivenza del crostaceo *T. fulvus* in quanto la percentuale di sopravvivenza degli organismi è risultata conforme a quella registrata al controllo.

Confronto con i survey precedenti - I risultati ottenuti nell'inverno 2015 confermano pienamente quanto già evidenziato nel corso dei monitoraggi precedenti (Tab. 3-VIII).

Tab. 3-VII - Risultati del saggio biologico condotto con *Tigriopus fulvus* sui campioni di acqua marina prelevati nell'inverno 2015. In rosso la stazione di campionamento corrispondente alla piattaforma Annamaria B.

Stazione	Quota	Δ% sopravvissuti *vs* controllo ± d.s.	T test	Giudizio
Controllo	---	100,0 ± 0,0	---	----
AMBK	superficie	98,0 ± 1,15	p>0,05	Tossicità assente
	-20 m	99,0 ± 0,0	p>0,05	Tossicità assente
	-40 m	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
AMB0	superficie	94,0 ± 2,52	p>0,05	Tossicità assente
	-20 m	99 ± 1,00	p>0,05	Tossicità assente
	-40 m	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
AMB50	superficie	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-20 m	94,0 ± 1,15	n.d.	Tossicità assente
	-40 m	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
AMB100	superficie	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-20 m	96,0 ± 1,15	p>0,05	Tossicità assente
	-40 m	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
AMB200	superficie	97,0 ± 1,25	p>0,05	Tossicità assente
	-20 m	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
	-40 m	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente
	fondo	100,0 ± 0,0	n.d.	Tossicità assente

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

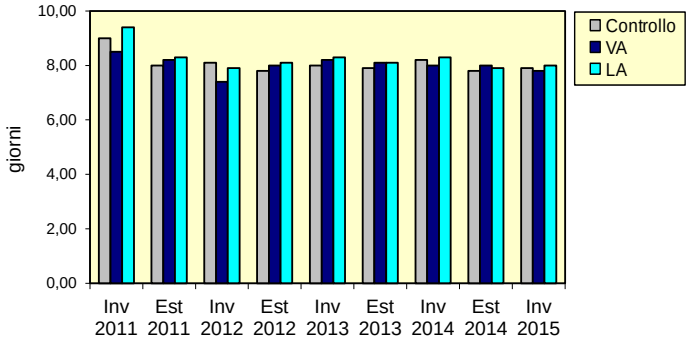
Stazione	Quota	Estate 2010	Inverno 2011	Estate 2011	Inverno 2012	Estate 2012	Inverno 2013	Estate 2013	Inverno 2014	Estate 2014	Inverno 2015
AMBK	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB0	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB50	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB100	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
AMB200	superficie	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-20 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	-40 m	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
	fondo	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente

3.4. ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

3.4.1. BIOMARKERS

In Tab. 3-IX sono riportati i valori dei biomarkers analizzati nei mitili prelevati vicino (VA) e lontano (LA) dall'anodo di sacrificio della piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nel corso dei nove monitoraggi effettuati dall'inverno 2011 a quello del 2015.

Sopravvivenza in aria - I mitili prelevati presso la piattaforma e al controllo nell'inverno 2015 hanno presentato una sopravvivenza all'aria compresa tra 7,8 (VA) e 8 gg (LA; fig. 3.7).



		SoS																										
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013			Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		ns	ns	*	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	*	*	*	*	*	*
	VA			ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*
	LA				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Estate 2011	C					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	*	*	ns
	LA							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	*	*	ns
Inverno 2012	C								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	VA									ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*
	LA										ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Estate 2012	C											ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA												ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA													ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Inverno 2013	C														ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA															ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	*	*	ns
	LA																ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	*	*	ns
Estate 2013	C																	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA																		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA																			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Inverno 2014	C																				ns	ns	*	ns	*	*	*	ns
	VA																					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA																						*	ns	*	*	*	ns
Estate 2014	C																							ns	ns	ns	ns	ns
	VA																								ns	ns	ns	ns
	LA																									ns	ns	ns
Inverno 2015	C																										ns	ns
	VA																											ns
	LA																											

Fig. 3.7 - Distribuzione dei tempi di sopravvivenza all'aria riscontrati negli esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nell'intero periodo di indagine. Test Kaplann-Meier (* = p<0,05; ns= non significativo).

I valori sono risultati omogeneamente distribuiti come già osservato precedentemente. Infatti, non si sono mai rilevate né differenze significative tra i mitili prelevati da Annamaria B e il controllo, né tra le stagioni eccetto tra quelle del 2011 e del 2014 in C ed LA. Ciò conferma una scarsa alterazione a livello fisiologico nei bivalvi esaminati. I tempi osservati sono simili, e a volte superiori, a quelli registrati presso altre piattaforme offshore (Fabi *et al*., 2005a; 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gomiero *et al*., 2011; 2015).

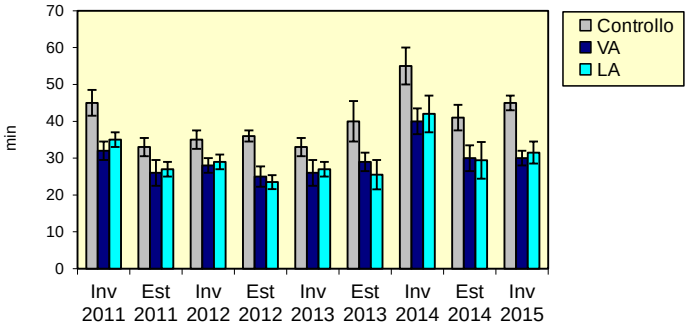
Tab. 3-X - Valori medi dei biomarker (± dev.std.) determinati nei mitili campionati dall'inverno 2011 a quello del 2015 nei siti di controllo, vicino (VA) e lontano (LA) dall'anodo di sacrificio di Annamaria B.

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

		Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013		
Biomarker	**Unità di misura**	**Controllo**	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**
Stress on Stress	LT50 (gg)	7,8	8,2	8,3	8,0	8,2	8,3	7,9	8,1	8,1
Stabilità lisosmiale	min	36,0±2,5	26,0±3,5	27,0±2,0	33,0±2,5	26,0±3,5	27,0±2,0	40,0±5,5	29,0±2,5	25,5±4,0
Lipidi neutri	densità ottica / $pixels^2$	24567±2541	30218±2401	32051±3591	28001±2541	30218±2401	32051±3591	23424±2730	29852±3820	27205±4732
Lipofuscine	densità ottica / $pixels^2$	8114±501	8000±321	8099±269	7308±361	8000±321	8099±269	8239±321	8216±213	8111±341
Metallotioneine	µg MT/g	87,9±7,2	129,9±4,7	133,9±6,4	96,1±5,4	129,9±4,7	133,9±6,4	99,0±12,5	142,8±11,0	141,6±5,2
Test della Cometa	% di coda DNA	3,6±1,0	5,5±0,1	5,1±0,5	2,8±1,0	4,9±2,0	5,8±1,8	3,0±1,0	4,5±0,5	4,1±0,5

		Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
Biomarker	**Unità di misura**	**Controllo**	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**
Stress on Stress	LT50 (gg)	8,2	8,0	8,3	8,2	8,0	8,3	8,2	8,0	8,3
Stabilità lisosmiale	min	55,0±5,0	40,0±3,5	42,0±5,0	55,0±5,0	40,0±3,5	42,0±5,0	55,0±5,0	40,0±3,5	42,0±5,0
Lipidi neutri	densità ottica / $pixels^2$	20362±4729	21248±5293	22357±5382	20362±4729	21248±5293	22357±5382	20362±4729	21248±5293	22357±5382
Lipofuscine	densità ottica / $pixels^2$	9106±432	9204±612	9102±521	9106±432	9204±612	9102±521	9106±432	9204±612	9102±521
Metallotioneine	µg MT/g	87,0±7,8	127,8±13,0	136,3±7,7	87,0±7,8	127,8±13,0	136,3±7,7	87,0±7,8	127,8±13,0	136,3±7,7
Test della Cometa	% di coda DNA	2,5±1,0	3,0±0,5	3,2±0,5	2,5±1,0	3,0±0,5	3,2±0,5	2,5±1,0	3,0±0,5	3,2±0,5

Stabilità delle membrane lisosomiali – Nell'inverno 2015 sono stati registrati tempi medi di destabilizzazione significativamente inferiori in entrambi i siti della piattaforma rispetto al controllo, confermando quanto già osservato nei survey precedenti (fig. 3.8). Nel complesso, comunque, i tempi osservati sono confrontabili con quelli di organismi in buono stato di salute (Donnini *et al*., 2007). Essi sono inoltre simili, e in alcuni casi superiori, agli analoghi registrati in indagini ambientali condotte presso altri campi di estrazione (Fabi *et al*., 2005a; 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gomiero *et al*., 2011; 2015) e in altre aree dell'alto Adriatico (Petrovic *et al*., 2004) e inferiori a quelli riportati da Gorbi *et al*. (2008), ottenuti tuttavia con una differente metodologia d'analisi.

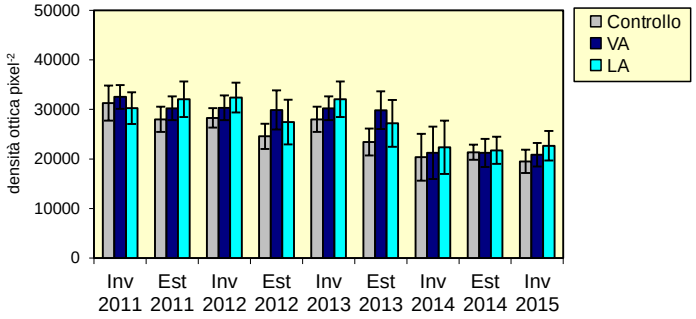


		Stabilità membrane lisosomiali																										
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013			Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	ns	ns	ns	*	*	ns	*	*
	VA			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA				ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
Estate 2011	C					*	*	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	*	*	ns	ns	*	ns	ns
	VA						ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA							*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
Inverno 2012	C								*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns
	VA									ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA										*	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
Estate 2012	C											*	*	ns	*	*	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	*	*	ns
	VA												ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	*	ns
	LA													*	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	*	*
Inverno 2013	C														*	*	ns	ns	*	*	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
	VA															ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA																*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
Estate 2013	C																	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
	VA																		ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA																			*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns
Inverno 2014	C																				*	*	*	*	*	*	*	*
	VA																					ns	ns	*	*	ns	*	*
	LA																						ns	*	*	ns	*	*
Estate 2014	C																							*	*	ns	*	*
	VA																								ns	*	ns	ns
	LA																									*	ns	ns
Inverno 2015	C																										*	*
	VA																											ns
	LA																											

Fig. 3.8 – Valori medi (± d.s.) dei tempi di destabilizzazione espressi in min e associati alla fragilità dei lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nell'intero periodo di indagine. Test Mann-Whitney; ns = non significativo; * = significativo.

Valutazione del contenuto di lipidi neutri - La distribuzione dei livelli di lipidi neutri è risultata omogenea nell'inverno 2015, come già osservato in precedenza (fig. 3.9), e non sono state evidenziate variazioni interstagionali. 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).

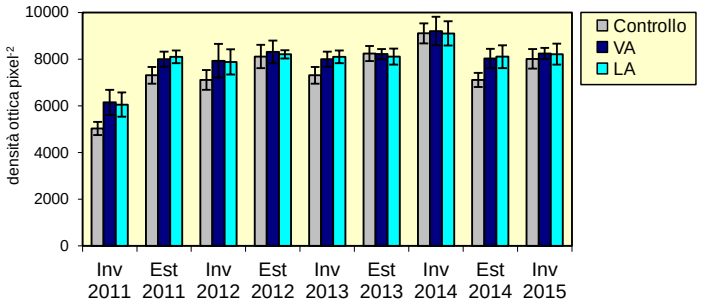


		Lipidi neutri																										
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013			Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
	VA			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	*	*
Estate 2011	C					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	*	*	ns
	VA						ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
	LA							ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
Inverno 2012	C								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	*	ns
	VA									ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	*	*
	LA										*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Estate 2012	C											ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA												ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	ns
	LA													ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
Inverno 2013	C														ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	*	*	ns
	VA															ns	*	ns	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
	LA																*	ns	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
Estate 2013	C																	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA																		ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	ns
	LA																			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Inverno 2014	C																				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA																					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA																						ns	ns	ns	ns	ns	ns
Estate 2014	C																							ns	ns	ns	ns	ns
	VA																								ns	ns	ns	ns
	LA																									ns	ns	ns
Inverno 2015	C																										ns	ns
	VA																											ns
	LA																											

Fig. 3.9 - Valori medi (± d.s.) di accumulo di lipidi neutri espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nel corso dell'intero periodo di indagine. Test ANOVA; ns = non significativo.

Valutazione del contenuto di lipofuscine - Anche i livelli di lipofuscine evidenziati nei mitili prelevati nell'inverno 2015 sono risultati omogenei nei tre siti di prelievo, come già osservato in quasi tutto il periodo di monitoraggio precedente (fig. 3.10). Infatti, solo nei primi due survey erano stati rilevati livelli significativamente superiori in uno o entrambi i siti della piattaforma rispetto al controllo. In pochi casi sono state inoltre rilevate differenze interstagionali. I livelli ottenuti nl complesso non portano, quindi, a ipotizzare alcuna criticità correlabile alla presenza di stress perossidativo a carico degli organismi analizzati.

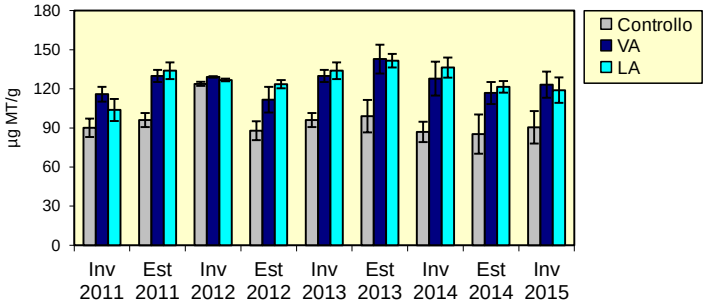
Essi sono inoltre inferiori a quelli evidenziati nel corso di precedenti esperienze di monitoraggio in aree costiere dell'Adriatico settentrionale (Petrovic *et al*., 2004) o su analoghe piattaforme offshore (Fabi *et al*., 2005a; 2005b; 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gorbi *et al*., 2008; Gomiero *et al*., 2015).



Lipofuscine		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013			Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA			ns	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA				*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Estate 2011	C					ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	*	ns
	VA						ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns
	LA							*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns
Inverno 2012	C								ns	ns	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns	*	*
	VA									ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA										ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Estate 2012	C											ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	VA												ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	LA													*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
Inverno 2013	C														ns	ns	*	*	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	*	ns
	VA															ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns
	LA																ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns
Estate 2013	C																	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	VA																		ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	LA																			*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
Inverno 2014	C																				ns	ns	*	*	ns	ns	*	ns
	VA																					ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	LA																						*	ns	ns	ns	ns	ns
Estate 2014	C																							ns	ns	*	*	*
	VA																								ns	ns	ns	ns
	LA																									ns	ns	ns
Inverno 2015	C																										ns	ns
	VA																											ns
	LA																											

Fig. 3.10 - Valori medi (± d.s.) di accumulo di lipofuscine espressi in unità di densità ottica associate ai lisosomi della ghiandola digestiva di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nell'intero periodo di indagine. Test ANOVA; ns = non significativo; * = significativo.

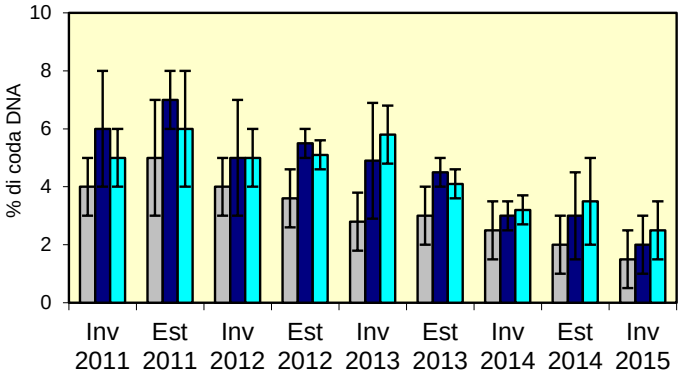
Metallotioneine - Quanto rilevato nell'inverno 2015 ha confermato gli incrementi significativi dei livelli di proteine metallo-chelanti nei mitili della piattaforma rispetto al controllo già osservati in quasi tutti i monitoraggi precedenti (fig. 3.11); ciò indica una significativa, seppur moderata, risposta biologica alla presenza di metalli pesanti negli esemplari prelevati in VA ed LA. Comunque, le risposte 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).



		Metallotioneine																								
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013			Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	ns	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA			ns	*	*	*	ns	*	*	*	ns	ns	*	*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA				ns	*	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Estate 2011	C					*	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA						ns	ns	ns	ns	*	*	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA							*	ns	ns	*	*	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
Inverno 2012	C								ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
	VA									ns	*	*	ns	*	ns	ns	*	ns	*	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA										*	*	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
Estate 2012	C											*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA												ns	ns	*	*	ns	*	*	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA													*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
Inverno 2013	C														*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA															ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA																*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
Estate 2013	C																	*	*	ns	*	*	ns	ns	*	ns	*	ns
	VA																		ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA																			*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	*
Inverno 2014	C																				*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA																					ns	*	ns	ns	*	ns	ns
	LA																						*	ns	ns	*	ns	ns
Estate 2014	C																							*	*	ns	*	*
	VA																								ns	*	ns	ns
	LA																									*	ns	ns
Inverno 2015	C																										*	*
	VA																											ns
	LA																											

Fig. 3.11 – Concentrazioni medie (± d.s.) di metallotioneine rilevate nella ghiandola digestiva di mitili (*M. galloprovincialis*) prelevati nell'intero periodo di indagine. Test di Mann – Whitney; ns = non significativo; * = significativo.

Comet assay - Il test della cometa (Comet assay) condotto per valutare l'integrità del DNA nei mitili prelevati nell'inverno 2015 da entrambi i siti della piattaforma non ha evidenziato differenze significative rispetto agli analoghi di controllo come già precedentemente (fig. 3.12). La risposta biologica osservata 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).



		Test della Cometa																										
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013			Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
	VA			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	*	*
	LA				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	*	*
Estate 2011	C					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
	VA						ns	*	ns	ns	*	ns	*	*	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*
	LA							ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	*	*
Inverno 2012	C								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
	VA									ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
	LA										ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	*	*
Estate 2012	C											ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA												ns	*	ns	ns	*	ns	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*
	LA													*	ns	ns	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*	*	*
Inverno 2013	C														ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA															ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
	LA																*	ns	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	*
Estate 2013	C																	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA																		ns	*	*	*	*	ns	ns	*	*	*
	LA																			ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	ns
Inverno 2014	C																				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	VA																					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	LA																						ns	ns	ns	*	ns	ns
Estate 2014	C																							ns	ns	ns	ns	ns
	VA																								ns	ns	ns	ns
	LA																									ns	ns	ns
Inverno 2015	C																										ns	ns
	VA																											ns
	LA																											

Fig. 3.12 - Livello di danno al DNA rilevato dal Test della Cometa negli emociti di esemplari di *M. galloprovincialis* prelevati nell'intero periodo di indagine. Test di Mann – Whitney; ns = non significativo; * = significativo.

3.4.2. METALLI PESANTI

L'analisi della distribuzione evidenziata dagli organismi prelevati nell'inverno 2015 conferma l'accumulo di Ba, Zn e Cd nei bivalvi prelevati dalle parti sommerse della piattaforma rispetto a quelli provenienti dal controllo, già osservato sin dal primo monitoraggio (fig. 3.13; Tabb. 3-XI e 3-XII).

Nel complesso l'elemento maggiormente accumulato è risultato lo zinco, il cui massimo (121,0±0,5 mg/kg) è stato rilevato in LA, risultato statisticamente superiore agli altri due siti (C: 90,1±0,5 mg/kg; VA 120,1±0,5 mg/kg). Anche il contenuto registrato in VA è apparso significativamente maggiore rispetto al controllo. Rispetto all'estate 2014 è avvenuto un decremento nei mitili di riferimento non osservato presso la piattaforma; anzi, in VA lo zinco è significativamente aumentato. Comunque, le concentrazioni rilevate sia in

VA che in LA negli ultimi due campionamenti sono apparse le più basse dell'intero periodo di indagine per quei siti, indicando una tendenza al decremento.

Il maggior contenuto di cadmio è stato rilevato in LA, che ha presentato differenze significative con entrambi gli altri siti. Anche la concentrazione in VA è risultata significativamente superiore rispetto ai mitili di riferimento. Analoga distribuzione era già stata osservata precedentemente sin dal primo monitoraggio. Al controllo i valori sono rimasti sempre stabili, mentre presso Annamaria B sono state rilevate alcune variazioni interstagionali. In particolare, in VA è stato registrato un incremento significativo delle concentrazioni in estate 2013, seguito da una riduzione nell'inverno successivo che ha riportato ai contenuti registrati precedentemente. Un'altra variazione significativa, consistente in un aumento, è avvenuta nell'ultimo campionamento. In LA, invece, dopo un decremento in estate 2012 il cadmio è aumentato significativamente sino all'estate 2013 per poi ridursi sino all'estate 2014.

Infine, i contenuti di bario sono apparsi compresi tra 0,11±0,02 mg/kg (controllo) e 3,99±0,05 mg/kg (VA), con differenze significative tra tutti i tre siti. In questo caso, sono state confermate le distribuzioni rilevate nelle due stagioni del 2014, con il sito VA più contaminato di LA, mentre nei monitoraggi precedenti era stata sempre osservata una situazione opposta. Rispetto all'estate 2014 è avvenuto un incremento in entrambi i siti della piattaforma, senza tuttavia raggiungere i massimi osservati nell'inverno 2014 per quanto riguarda VA e nell'estate 2013 per quanto concerne LA.

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 comparabile con quanto riportato per altre strutture estrattive offshore installate in Adriatico (Fabi *et al*., 2005a; 2005b; 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gomiero *et al*., 2015).

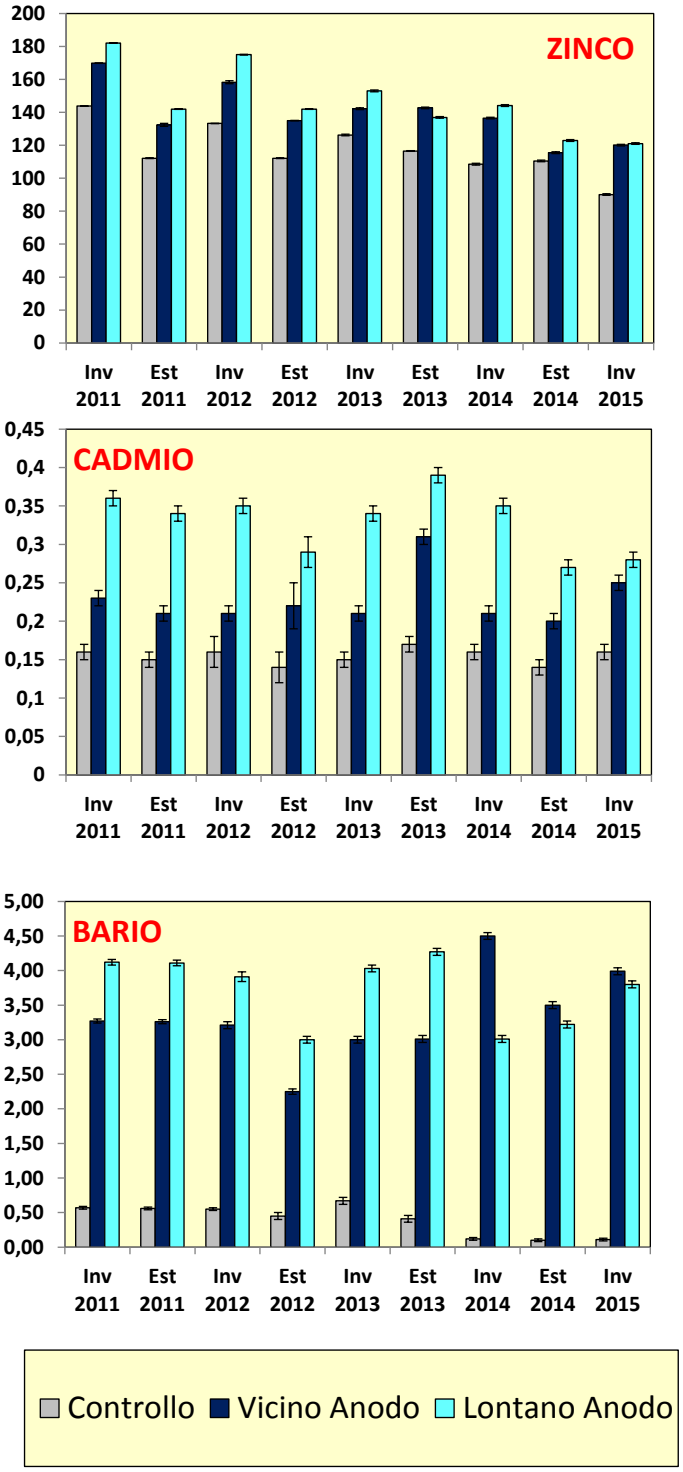


Fig. 3.13 - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nell'intero periodo di monitoraggio. Valori espressi in mg/kg p.s. (± d.s.).

Tab. 3-XI - Distribuzione dei metalli in traccia rilevati nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campionati presso la piattaforma Annamaria B e nel sito di controllo nell'intero periodo di campionamento. Valori espressi in mg/kg p.s. (± d.s.). LA = lontano anodo di sacrificio; VA = vicino anodo di sacrificio.

	Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012		
	Controllo	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**
Ba	0,57±0,02	3,27±0,03	4,12±0,04	0,56±0,02	3,26±0,03	4,11±0,04	0,55±0,02	3,21±0,05	3,91±0,07
Zn	143,8± 0,1	169,8±0,1	182,1 ±0,1	112,1±0,2	132,4±0,9	141,9±0,1	133,3±0,1	158,2±0,1	175,0±0,2
Cd	0,16±0,01	0,23±0,01	0,36±0,01	0,15±0,01	0,21±0,01	0,34±0,01	0,16±0,02	0,21±0,01	0,35±0,01

	Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013		
	Controllo	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**
Ba	0,45±0,05	2,25±0,04	3,00±0,05	0,67±0,05	3,00±0,05	4,03±0,05	0,55 ± 0,05	2,75 ± 0,05	3,95 ± 0,05
Zn	109,1± 1,10	135,0±1,0	141,9±0,1	126,2±0,5	142,2±0,5	153,0±0,5	112,5 ± 0,5	135,2 ± 0,5	141,0± 0,5
Cd	0,14±0,05	0,22±0,03	0,29±0,02	0,15±0,01	0,21±0,01	0,34±0,01	0,17± 0,02	0,29 ± 0,02	0,42 ± 0,02

	Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
	Controllo	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**
Ba	0,12 ± 0,02	4,50 ± 0,05	3,01 ± 0,05	0,10 ± 0,02	3,50 ± 0,05	3,22 ± 0,05	0,11 ± 0,02	3,99 ± 0,05	3,80 ± 0,05
Zn	108,5 ± 0,5	136,5 ± 0,5	144,1± 0,5	110,5 ± 0,5	115,5 ± 0,5	122,9± 0,5	90,1 ± 0,5	120,1 ± 0,5	121,0± 0,5
Cd	0,16± 0,01	0,21 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,14± 0,01	0,20 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,16± 0,01	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,01

Tab. 3-XII - Confronti statistici relativi alla distribuzione dei metalli pesanti nei siti vicino anodo (VA), lontano anodo (LA) e al controllo (test U - Mann-Whitney). * = p<0,05; ns = non significativo.

		Zn																										
		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013			Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
	VA			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Estate 2011	C					*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*
	VA						*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA							*	*	*	*	*	ns	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Inverno 2012	C								*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA									*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA										*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	+	*	*	*	*	*
Estate 2012	C											*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*
	VA												*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*
	LA													*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Inverno 2013	C														*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*
	VA															*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA																*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Estate 2013	C																	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*
	VA																		*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
	LA																			*	ns	*	*	*	*	*	*	*
Inverno 2014	C																				*	*	ns	*	*	*	*	*
	VA																					*	*	*	*	*	*	*
	LA																						*	*	*	*	*	*
Estate 2014	C																							*	*	*	*	*
	VA																								*	*	*	*
	LA																									*	ns	ns
Inverno 2015	C																										*	*
	VA																											ns
	LA																											

Tab. 3-XII - Continuo.

Cd

		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013			Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA			*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*
	LA				*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
Estate 2011	C					*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA						*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*
	LA							*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
Inverno 2012	C								*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA									*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*
	LA										*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
Estate 2012	C											*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA												*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*
	LA													*	*	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*
Inverno 2013	C														*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA															*	*	*	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*
	LA																*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
Estate 2013	C																	*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA																		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA																			*	*	*	*	*	*	*	*	*
Inverno 2014	C																				*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA																					*	*	ns	*	*	*	*
	LA																						*	*	*	*	*	*
Estate 2014	C																							*	*	ns	*	*
	VA																								*	*	*	*
	LA																									*	*	ns
Inverno 2015	C																										*	*
	VA																											*
	LA																											

Ba

		Inverno 2011			Estate 2011			Inverno 2012			Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013			Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
		C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA	C	VA	LA
Inverno 2011	C		*	*	ns	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA			*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*
	LA				*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*
Estate 2011	C					*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA						*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	ns	*	*	*
	LA							*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*
Inverno 2012	C								*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA									*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*
	LA										*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	ns
Estate 2012	C											*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA												*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	LA													*	ns	*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
Inverno 2013	C														*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA															*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
	LA																*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*
Estate 2013	C																	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	VA																		*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
	LA																			*	*	*	*	*	*	*	*	*
Inverno 2014	C																				*	*	ns	*	*	ns	*	*
	VA																					*	*	*	*	*	*	*
	LA																						*	*	*	*	*	*
Estate 2014	C																							*	*	ns	*	*
	VA																								*	*	*	*
	LA																									*	*	*
Inverno 2015	C																										*	*
	VA																											*
	LA																											

3.4.3. IDROCARBURI TOTALI

Analogamente ai survey precedenti, anche nell'inverno 2015 la somma degli idrocarburi totali (C5-C40) è risultata inferiore a 0,1 mg/kg p.s. in tutti siti, indicando quindi l'assenza di accumulo di tale classe di composti organici (Tab. 3-XIII).

Tab. 3-XIII - Distribuzione degli idrocarburi totali rilevati nei tessuti di mitili prelevati presso la piattaforma Annamaria B nell'intero periodo di monitoraggio. Valori espressi in mg/kg p.s. n.c. = non calcolabile. 0,1 mg/kg = limite di rilevabilità strumentale.

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

	Estate 2012			Inverno 2013			Estate 2013		
	Controllo	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**
$\Sigma_{IA\ C5\text{-}C40}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Test U		n.c.	n.c.		n.c.	n.c.		n.c.	n.c.

	Inverno 2014			Estate 2014			Inverno 2015		
	Controllo	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**	**Controllo**	**VA**	**LA**
$\Sigma_{IA\ C5\text{-}C40}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Test U		n.c.	n.c.		n.c.	n.c.		n.c.	n.c.

4. CONCLUSIONI

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

Tale programma è stato suddiviso in due fasi di cui la prima concomitante ai lavori di installazione della piattaforma (estate 2009 e inverno 2010) e la seconda, della durata di 5 anni, da effettuarsi con l'entrata in produzione di Annamaria B.

Il Programma di Monitoraggio ha previsto lo svolgimento delle seguenti indagini:

- colonna d'acqua: indagini chimiche e fisiche (effettuate a partire dall'inverno 2010 - fase di installazione), correntometria, ricerca di idrocarburi totali ed ecotossicologia richieste nella fase di produzione.
- Sedimenti: indagini fisiche e chimiche ed ecotossicologia (da svolgere in entrambe le fasi; durante la produzione solo nelle stagioni estive).
- Macrozobenthos: indagini da svolgere esclusivamente nella fase di installazione della piattaforma.
- Analisi in *Mytilus galloprovincialis*: biomarker e bioaccumulo in esemplari insediati sulle parti sommerse della piattaforma, da svolgere nella fase di produzione. Nel 1° survey (estate 2010) questa indagine non è stata effettuata poiché sul jacket di Annamaria B era presente solo una scarsa quantità di esemplari di mitilo le cui dimensioni erano troppo ridotte per permettere l'esecuzione delle analisi.

I risultati relativi alle comunità macrozoobentoniche indagate nella fase di installazione della piattaforma sono riportati in Fabi *et al*., 2010a, mentre quelli conseguiti nell'intero periodo di indagine per il comparto sedimenti sono stati disponibili in Fabi *et al*., 2016a.

Nel presente rapporto sono descritte le caratteristiche fisiche, chimiche ed ecotossicologiche della colonna d'acqua e le analisi di inquinanti in *Mytilus galloprovincialis* relative all'ultimo survey previsto dal Programma di monitoraggio effettuato nell'inverno 2015 confrontati con quelli precedenti.

Misure correntometriche – Nell'intero periodo di osservazione (estate 2010 - inverno 2015; Fabi *et al*., 2010a, 2010b, 2011a, 2011b, 2012, 2014a, 2014b, 2015a, 2015b, 2016a, 2016b), le correnti sia di fondo che di superficie hanno avuto prevalentemente direzione SW. L'intensità è apparsa piuttosto costante e modesta lungo tutta la colonna d'acqua, e

mediamente superiore in superficie, dove raramente ha superato i 20 cm/s.

Caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d'acqua – L'area in cui è installata la piattaforma Annamaria B è localizzata a circa 30 mn dalla costa ed è caratterizzata da condizioni oceanografiche di mare aperto, risentendo solo in parte della circolazione costiera (Artegiani *et al*., 1997a; 1997b). Le caratteristiche fisiche e chimiche della colonna d'acqua determinate sono in accordo con la climatologia del bacino (Artegiani *et al*., 1997a; Zavatarelli *et al*., 1998), con una notevole omogeneità dei parametri fici nelle stagioni invernali e la presenza di un termoclino e un aloclino in quelle estive.

Nel febbraio 2015 sono state pertanto rilevate le condizioni tipiche del periodo invernale, con un completo rimescolamento verticale e valori omogenei di tutti i parametri misurati. Non sono state osservate differenze rilevanti tra le diverse stazioni fatta eccezione per la quella più lontana considerata come controllo (stazione AMBK), che ha mostrato condizioni termo-aline leggermente differenti come già nell'inverno 2014. Si tratta comunque di variazioni estremamente modeste. L'ossigeno disciolto ha presentato valori di lieve sovrassaturazione in tutta la colonna d'acqua nella maggior parte dei survey e non vi sono evidenze di fenomeni ipossici verificatisi nell'area indagata in tutto il periodo di osservazione. Le concentrazioni di clorofilla sono sempre risultate basse su tutta la colonna indicando una limitata attività biologica nell'intero periodo monitorato; esse sono apparse spesso maggiori negli strati subsuperficiali e sul fondo dove le specie fitoplanctoniche trovano le condizioni migliori per la loro crescita, confermando quanto già descritto per il bacino medio Adriatico da Totti *et al*. (2000).

La torbidità è stata sempre bassa e a volte maggiore in prossimità del fondo, presumibilmente a causa di fenomeni di trasporto e/o risospensione.

La trasparenza dell'acqua si è sempre aggirata tra 15 e 25 m con due eccezioni, ovvero il 2° anno della fase di produzione (agosto 2011 e febbraio 2012) durante il quale ha raggiunto i massimi livelli (attorno a 40 m) e l'ultimo anno (agosto 2014 e febbraio 2015) in cui invece ha raggiunto i minimi (tra 5 e 10 m). In ogni caso, non sono mai state rilevate differenze tra le stazioni posizionate entro 200 m dalla piattaforma e il controllo, così come per tutti gli altri parametri.

Tale omogeneità porta ad escludere effetti indotti dalla presenza e/o dall'esercizio della piattaforma.

Idrocarburi totali lungo la colonna d'acqua - La ricerca di idrocarburi totali condotta nel febbraio 2015 presso le medesime stazioni utilizzate per le indagini chimiche e fisiche della colonna d'acqua in corrispondenza di 4 quote (superficie, -20 m, -40 m e fondo) non

ha evidenziato la presenza di questa classe di contaminanti organici, confermando i risultati precedenti.

Al contrario, gli idrocarburi totali sono stati rinvenuti sia nel mare del Nord (0,04- 3,0 mg L^{-1}; 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 di piattaforme installate nella costa orientale della Scozia (OGP, 2002). Presso alcune piattaforme del Golfo del Messico sono stati registrati livelli medi di alcani più contenuti, del segmento C_5-C_{35}, compresi tra 3 e 300 μg/l (Neff *et al*., 1992), mentre concentrazioni più elevate (comprese tra 600 e 2680 μg/l) sono state rilevate nelle acque di strato di due piattaforme operanti in un area marino-costiera della Louisiana (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 per il 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 impiegati nella fase di produzione della piattaforma Annamaria B (estate 2010 - inverno 2015) hanno confermato, nel complesso, l'assenza di effetti tossici in tutti gli indicatori ambientali che costituiscono la batteria. Ciò vale per i test condotti sia con *Vibrio fischeri* che con *Tigropus fulvus*. Il test effettuato con *Dunaliella tertiolecta* aveva evidenziato un lieve peggiormanento nell'inverno 2011 presso la stazione di controllo AMBK posta a 2000 m a NW da Annamaria B, pertanto non influenzata dalla struttura, mantenendo invece inalterate le condizioni nelle stazioni da 50 e 200 m a SE dalla piattaforma (ad eccezione della quota superficiale di quella posizionata a 200 m) e indicando un miglioramento nelle immediate vicinanze della piattaforma e a 100 m a SE di distanza da essa. A partire dall'estate 2011 anche per questo organismo non è stato più rilevato alcun segnale di criticità in tutti i siti monitorati.

Analisi di inquinanti in *Mytilus galloprovincialis* - L'applicazione della batteria di biomarker ai campioni di mitilo prelevati nell'inverno 2015 vicino e lontano gli anodi di sacrificio di Annamaria B e da un sito di controllo ha confermato l'assenza di alterazioni a livello metabolico, come indicato dai risultati della sopravvivenza all'aria e dal contenuto di lipidi neutri, o di stress perossidativo, essendo risultate le lipufuscine omogeneamente distribuite. Diversamente, i test più sensibili condotti per registrare eventuali variazioni a livello cellulare e subcellulare negli organismi sentinella hanno confermato la diminuzione

di alcuni parametri tra cui la stabilità delle membrane lisosomiali (indice aspecifico di stress), già osservata precedentemente.

Scarso è apparso il danno al DNA nelle cellule degli organismi provenienti dalla struttura, che hanno presentato 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), come l'accumulo di Zn, Ba e Cd nei tessuti dei bivalvi esaminati, ha invece evidenziato un significativo effetto biologico correlabile alla presenza di elementi metallici nell'ambiente marino circostante Annamaria B, risultati sempre maggiormente bioaccumulati nei mitili della piattaforma rispetto a quelli di controllo; le concentrazioni dei metalli ricercati sono apparse simili a quelle riscontrate in Adriaco centro-settentrionale presso numerose altre piattaforme estrattive offshore (Fattorini *et al.*, 2008; Gorbi *et al.*, 2008; Fabi *et al*., 2005a; 2006; 2010c; 2010d; 2014c; Gomiero *et al.*, 2015). Gli idrocarburi totali, sotto il limite di quantificazione lungo la colonna d'acqua, non sono mai stati rilevati nei mitili analizzati.

5. BIBLIOGRAFIA

Artegiani A. 1996. *Temperature and salinity measurements of seawaters, Handbook of method protocols.* MAST II Mediterranean Targeted Project. 34 pp.

Artegiani A., Bregant D., Paschini E., Pinardi N., Raicich F., A. Russo 1997a. The Adriatic Sea general circulation. Part I. Air-sea interactions and water mass structure, *J. Phys. Oceanogr*., 27: 1492–1514.

Artegiani A., Bregant D, Paschini E., Pinardi N., Raicich F., Russo A. 1997b. The Adriatic Sea general circulation. Part II: Baroclinic Circulation Structure, *J. Phys. Oceanogr.*, 27: 1515–1532.

Asby J., Tinwell H., Lefevre P.A., Browne M.A. 1995. The single gel electrophoresis assay for induced DNA damage assay: measurement of tail length and moment. *Mutagenesis*, 10: 85-90.

ASTM E1218-04-E1. 2004. *Standard guide for conducting static toxitcity tests with microalghe*. ASTM E1218-04-E1. 14 pp.

Azur Environmental. 1994. *Microtox® M500 manual* (A toxicity testing handbook). Carlsbad, CA, USA

Carli A., Fiori M.A. 1979. Sviluppo larvale del *Tigriopus fulvus* Fischer. *Atti IX Congr, Soc, Ital, Biol, Mar*.: 181-190.

Carli A., Mariottini G.L., Pane L. 1988. Reproduction of the rockpools Harpacticoid copepod *Tigriopus fulvus* (Fischer 1860), suitable for aquaculture. *XII Congrès international d'Aquariologie*: 295-300.

Christensen E.R., Kusk K.O., Nyholm N. 2009. Dose-response regressions for algal growth and similar continuous endpoint: calculation of effective concentrations. *Environ. Toxicol. Chem*., 28: 826-835.

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). *Env. Int*., 33(7): 919-928.

Eertman R.H.M., de Zwann A. 1994. Survival of the fittest: resistance of mussels to aerial exposure. Pagg. 269-284, *in*: Kramer (Ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton.

Ekins P., Vanner R., Firebrace J. 2005. *Management of produced water on offshore oil installations: A comparative Assessment using Flow analysis*. Final Report for UK Offshore Operators Association and its member companies. 89 pp.

EPA 2003a. *Nonhalogenated organics using gc/fid*. EPA 8015D. 37 pp.

EPA 2003b. *Volatile organic compounds in various sample matrices using equilibrium headspace analysis*. EPA 5021A. 25 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., Campanelli A., De Biasi A.M., Gomiero A., Spagnolo A**.** 2016a. *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". 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*. Rapporto per Eni S.p.A. UPSTREAM DICS. 65 + XIX pp.

Fabi G., Borghini M., Cassin D., De Lazzari A., Gomiero A., Kozinkova L., Spagnolo A**.** 2016b. *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., Da Ros L., Nasci C., Meneghetti F., Spagnolo A., Fabi G. 2011. Integrated use of biomarkers in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing off-shore gas platforms in the Adriatic Sea: results of a two year biomonitoring program. *Mar. Poll. Bull.*, 62(11): 2483-2495.

Gomiero A., 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. Poll. 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.

ISO/FDIS 14669. 1999. *Water quality- Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea).* ISO/TC147/SC5N, Draft version. 16 pp.

ITRC - Interstate Technology & Regulatory Council. 2006. *Protocol for the single cell gel electrophoresis/comet assay for rapid genotoxicity assessment*. 10 pp.

Klobučar G.I.V., Štambuka A., Hylland K., Pavlica M. 2008. Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir bays, Croatia. *Sci. total Environ.*, 405: 330-337.

Lee R.F., Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(1): 43-64.

Lowe D.M., Fossato V.U., Depledge M.H. 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 129: 189-196.

Moore M.N. 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochemistry*, 22: 187-191.

Neff J.M. 2002. *Bioaccumulation in marine organisms. Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water*. Elsevier Ltd, Oxford, UK. 452 pp.

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.

OGP. 2002. *Aromatics in produced water: occurrence, fate and effects and treatment*. OGP Jannuary 2002, Report No. 1.20/324. 6 pp.

Onorati F, Bandini F., Brilli L., Bellaria V., Castiglioni S., Celetti A.M., Comin S., Di Gioia E., Fabbri S., Facchini L., Ferrara M., Guerra R., Leoni T., Lo Re R., Manzo S., Martini P., Mascilongo G., Meloni P., Meineri V., Milani S., Molina M., Rossi E., Ruggiero G., Sanguinetti M.S., Tamberlich F., Traldi D., Trichilo S. 2007. Interconfronto nazionale sul test di inibizione della bioluminescenza mediante *Vibrio fischeri*. *Biol. Mar. Medit*., 14(1): 87-91.

Pane L., Feletti M., Carli A.M. 1996. Fattori ambientali e fluttuazioni della popolazione del copepode *Tigriopus fulvus* delle pozze di scogliera di Genova - Nervi (Mar Ligure). *Atti Soc. Ital. Ecol*., 17: 317-320.

Petrovic S., Semencic L., Ozetic B., Orzetic M. 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Mar. Poll. Bull*., 49(9-10): 713-720.

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.

Strømgren T., Sørstrøm S.E., Schou L., Kaarstad I., Aunaas T., Brakstad O.G. 1995. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. *Mar. Environ. Res*., 40(2): 147-169.

Terman A., Brunk U.T. 2004. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*., 36: 1400–1404.

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.

USEPA. 1991. *Short-term methods for estimating the cronic 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. Phys.*, 146: 281–300.

Vidussi F., Claustre H., Bustillos-Guzmàn 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 H_2O_2 and y-irradiation with alkaline comet assay. *Mutation Res*., 383: 71-80.

Winkler L.W. 1888. Die Bestimmung des im Wasser gelosten Sauerstoffes. *Chem. Ber*., 21: 2843-2855.

Zavatarelli M., Raicich F. Bregant D., Russo A., Artegiani A., 1998, Climatological biogeochemical characteristics of the Adriatic Sea, *J. Mar. Syst.*, 18: 227-263.

ALLEGATO A

SCHEDE TECNICHE DELLA STRUMENTAZIONE

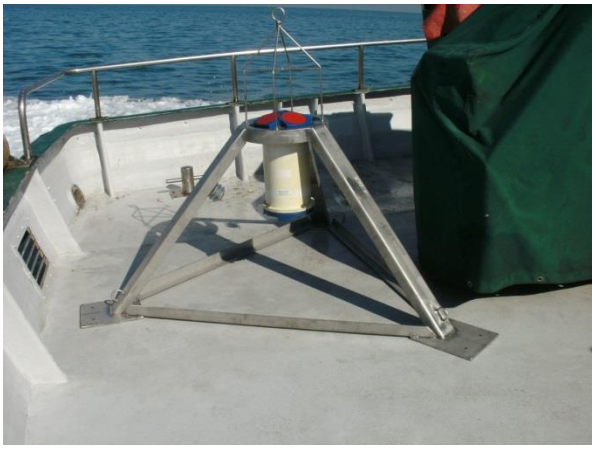
UTILIZZATA NELLE INDAGINI

A1

COLONNA D'ACQUA

INDAGINI FISICHE E CHIMICHE
e
IDROCARBURI TOTALI

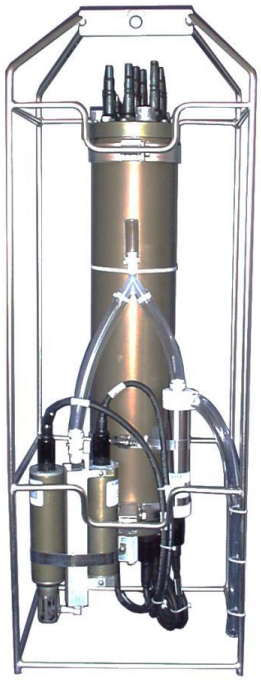
A1-I ADCP (ACOUSTIC DOPPLER CURRENT PROFILER)



Strumento	Costruttore	Modello	Risoluzione	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione
ADCP	Teledyne RD Instruments	Workhorse Sentinel 600 kHz	0,1 cm/s	± 0,3 cm/s	± 5 m/s (default) ±20 m/s (maximum)	Ad ogni deployment

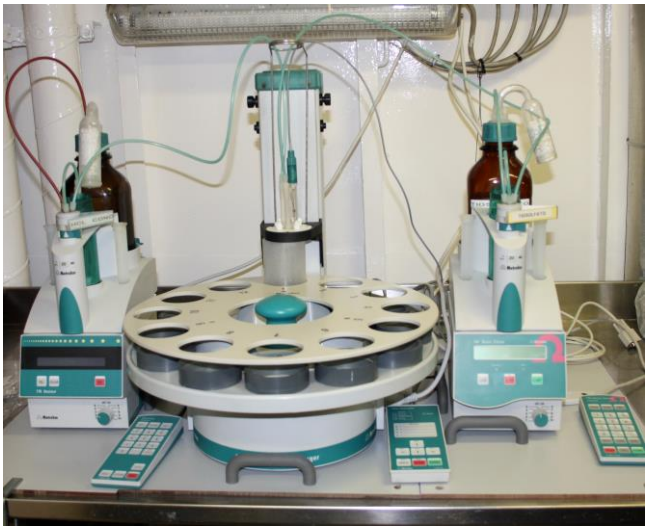
Sensore	Costruttore	Modello	Risoluzione	Accuratezza	Intervallo di misura	Calibrazione
Temperatura	Teledyne RD Instruments	Workhorse Sentinel 600 kHz	0,01°C	± 0,4 cm/s	da -5°C a + 45°C	ad ogni deployment

A1-II SONDA MULTIPARAMETRICA (CTD) SBE9plus



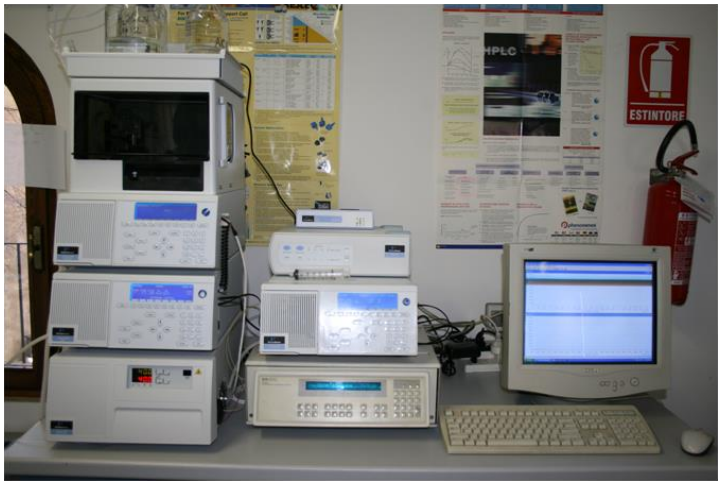
Campionatore: Rosette General Oceanics equipaggiato con 12 bottiglie idrologiche Niskin da 10 lt.

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 FISONS INST per la determinazione degli Idrocarburi totali

A2

ANALISI DI INQUINANTI IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

A2-I CRIOSTATO Leica CM1900

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

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

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

TelecameraAxiovert HS

Sensore	Sony ICX 414, progressives readout
Risoluzione	660(H) x 494 (V) = 330 K Pixels
Pixel Size	9.9 µm (H) x 9.9 µm (V)
Dimensione sensore	6,5 mm x 4,9 mm, equivalent to ½
Sensibilità spettale	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	l 17 e
Dark Current	0,7 LSB/s, equivalenti a to 5,4 e / Pixel/s
Fotogrammi / sec	Appr. 54 fotogrammi/s in risoluzione normale fino a . 140 fotogrammi/s a
Tempo di esposizione	da 0,25 ms fino a 60 s
Color optimisation	Available for color model, default white point 3200 k

A2-III CENTRIFUGA Beckman Allegra 25R

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

A2-IV SPETTROFOTOMETRIA Shimadzu UV-1700 Pharma

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

Taratura giornaliera ed esecuzione di curva standard di riferimento.

A2-V OPTIMA 7300 V ICP-OES

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