

In riferimento alla Richiesta ISPRA prot. Nr 0037856 del 11/06/2018 inviamo in allegato i risultati del piano di monitoraggio dell'Ambiente Marino relativo alle piattaforme Rospo Mare (AIA DM n°67 del 15/04/2015).

A causa delle dimensioni degli allegati inviamo con la presente la prima parte della documentazione, segue una seconda ed ultima parte.

Distinti saluti.

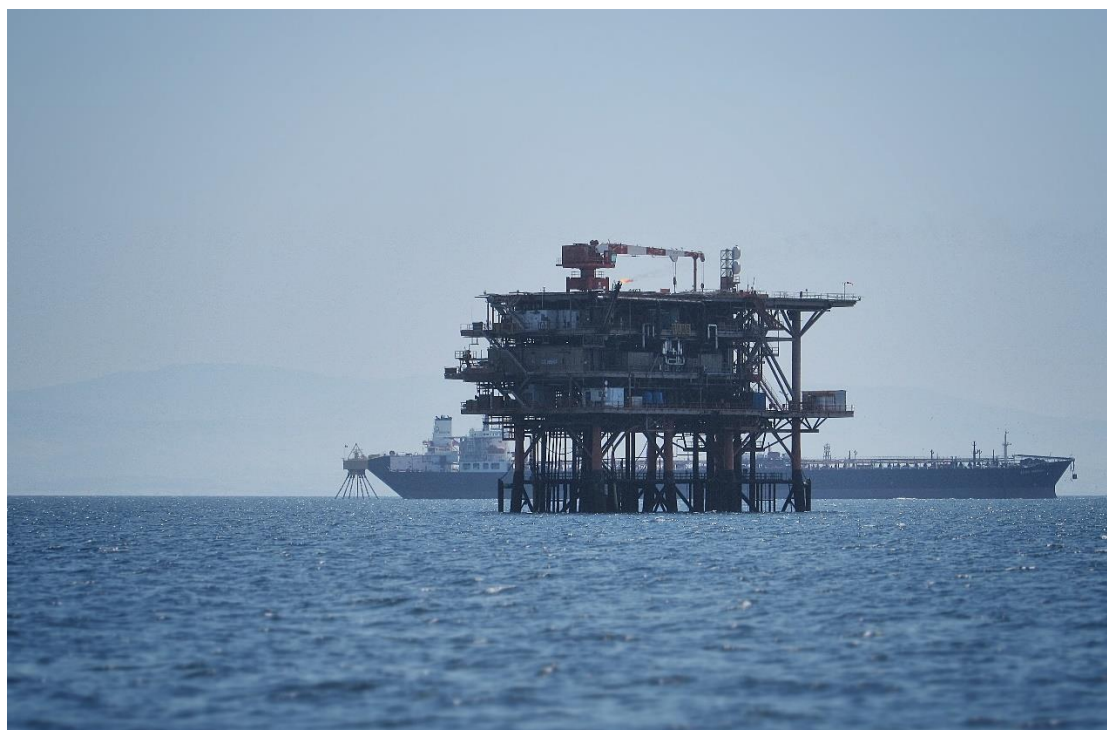
Edison Spa

Segreteria Direzione



## **RELAZIONE FINALE**

**MONITORAGGIO AMBIENTALE DELLE AREA MARINA DI CAMPO  
ROspo MARE IN PROSSIMITÀ DELLE PIATTAFORME RSM-A, RSM-B,  
RSM-C: INDAGINI DEL LUGLIO E DICEMBRE 2016.**



**Università Politecnica delle Marche  
Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente**

**Responsabile Prof. Francesco Regoli**

*Relazione a cura di:*

*M. Benedetti, M. Di Carlo, G. d'Errico, D. Fattorini, L. Morroni, A. Nardi, F. Regoli.*

**Luglio 2017**

## INDICE

1. PREMESSA .....	5
2. ATTIVITÀ DI CAMPIONAMENTO: POSIZIONAMENTO DELLE STAZIONI, PRELIEVO DEI SEDIMENTI, DEGLI ORGANISMI ED ESPERIMENTI DI TRASLOCAZIONE DEI MITILI .....	7
2.1 Campionamento dei sedimenti per la caratterizzazione fisica e chimica (Campagna estiva, luglio 2016)	7
2.2 Campionamento dei sedimenti per le analisi ecotossicologiche e per le analisi di bioaccumulo sul polichete <i>Hediste diversicolor</i> (Campagna estiva ed invernale, luglio e dicembre 2016)	9
2.3 Campionamento dei sedimenti per le analisi delle comunità bentoniche (Campagna estiva, luglio 2016)	11
2.4 Campionamento di mitili naturali dai piloni delle piattaforme per le analisi di bioaccumulo e di biomarker (Campagna estiva, luglio 2016)	11
2.5 Attività di traslocazione dei mitili per le analisi di bioaccumulo e di biomarker (Campagna estiva, luglio 2016)	12
3. METODOLOGIE ANALITICHE .....	13
3.1 SEDIMENTI DEL FONDO MARINO	13
3.1.1 Analisi dei parametri fisici e chimici dei sedimenti	13
<i>Caratteristiche granulometriche</i>	13
<i>Sostanza organica (SO) e carbonio organico totale (TOC)</i>	13
<i>Determinazione dei metalli in traccia</i>	14
<i>Determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)</i>	15
<i>Determinazione degli idrocarburi alifatici totali (C10-C40)</i>	15
3.1.2 Analisi ecotossicologiche	18
<i>Saggio biologico con <i>Vibrio fischeri</i> in fase solida</i>	18
<i>Saggio biologico con <i>Phaeodactylum tricornutum</i></i>	19
<i>Saggio biologico con <i>Acartia tonsa</i></i>	21
<i>Saggio biologico con <i>Paracentrotus lividus</i></i>	23
3.1.3 Analisi delle comunità bentoniche	24
3.2. INQUINANTI E BIOMARKER IN ORGANISMI MARINI	25
3.2.1 Bioaccumulo di metalli in <i>Hediste diversicolor</i>	25
3.2.2 Bioaccumulo di metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici nei mitili naturali e trapiantati	26
3.2.3 Analisi dei biomarker nei mitili naturali e trapiantati	27
3.3. Analisi statistiche ed elaborazione dei dati in un modello di analisi di rischio ecologico Weight Of Evidence (WOE)	32
4. RISULTATI .....	47

4.1 SEDIMENTI DEL FONDO MARINO	47
4.1.1 Analisi dei parametri fisici e chimici dei sedimenti	47
4.1.1.1 Caratteristiche granulometriche	47
4.1.1.2 Sostanza organica (SO) e carbonio organico totale (TOC)	50
4.1.1.3 Analisi chimiche di metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici nei sedimenti	51
4.1.2 Risposte ecotossicologiche	64
4.1.3 Comunità bentoniche	71
4.2 INQUINANTI E BIOMARKER IN ORGANISMI MARINI	77
4.2.1 Bioaccumulo di metalli in <i>Hediste diversicolor</i>	77
4.2.2 Bioaccumulo di metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici nei mitili naturali e trapiantati	94
4.2.3 Risposte dei biomarker nei mitili naturali e trapiantati	103
4.3 ELABORAZIONI ED ANALISI DI RISCHIO ECOLOGICO WEIGHT OF EVIDENCE (WOE)	117
5. DISCUSSIONE .....	120
5.1 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEI SEDIMENTI	120
5.2 RISPOSTE ECOTOSSICOLOGICHE	132
5.3 COMUNITÀ BENTONICHE	133
5.4 BIOACCUMULO NEI POLICHETI E NEI MITILI NATURALI E TRAPIANTATI	139
5.4.1 Bioaccumulo di metalli pesanti in <i>Hediste diversicolor</i>	139
5.4.2 Bioaccumulo in mitili naturali e trapiantati:	145
5.5 BIOMARKER NEI MITILI NATURALI E TRAPIANTATI	153
5.6 ELABORAZIONI E VALUTAZIONI CONCLUSIVE	157
5.6.1. Modello di analisi di rischio Weight of Evidence (WOE)	157
5.6.2. Elaborazioni WOE: singole tipologie di dati, integrazione secondo DM 173/2015, integrazione complessiva	161
5.6.3. Trend spaziali e temporali dei risultati ottenuti e raccomandazioni per monitoraggi futuri	164
6. CONCLUSIONI.....	170
7. BIBLIOGRAFIA.....	171

## Elenco degli allegati riportati

ALLEGATO 1. Schema delle attività di monitoraggio e codici dei campioni di sedimento prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 2. Risultati analitici della caratterizzazione granulometrica dei sedimenti prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 3. Risultati delle analisi chimiche (metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici) effettuate nei sedimenti prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 4. Lista delle specie rinvenute e risultati complessivi delle analisi delle comunità bentoniche effettuate sui sedimenti prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 5. Risultati analitici del bioaccumulo di metalli in traccia nei policheti *Hediste diversicolor* esposti ai sedimenti prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 6. Risultati analitici delle concentrazioni di metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici misurate nei tessuti dei mitili naturali e di quelli trapiantati sulle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 7. Risultati analitici dei biomarker misurati nei tessuti dei mitili naturali e di quelli trapiantati sulle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 8. Output del modello Sediqualsoft per l'elaborazione complessiva di tutti i risultati chimici dei campioni di sedimento prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare. I dati sono stati elaborati nei confronti degli Standard di Qualità Ambientale (SQA) riportati nel D. Lgs 172/2015, e dei limiti L1 e L2 previsti dal DM 173/2016 sulla caratterizzazione e classificazione della qualità dei sedimenti marini soggetti ad attività di movimentazione.

ALLEGATO 9. Output del modello Sediqualsoft per l'elaborazione complessiva dei risultati ecotossicologici sui sedimenti prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare. Vengono fornite le elaborazioni ottenute sui singoli saggi (*Phaeodactylum tricornutum*, *Acartia tonsa*, *Paracentrotus lividus*, *Vibrio fischeri* in fase solida) e la loro integrazione nella batteria.

ALLEGATO 10. Output del modello Sediqualsoft per l'elaborazione complessiva dei risultati delle comunità bentoniche in tutti i campioni di sedimento prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 11. Output del modello Sediqualsoft per l'elaborazione complessiva dei dati relativi al bioaccumulo di metalli nei tessuti di *H. diversicolor* esposti a sedimenti prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare durante la campagna estiva (luglio 2016).

ALLEGATO 12. Output del modello Sediqualsoft per l'elaborazione complessiva dei dati relativi al bioaccumulo di metalli nei tessuti di *H. diversicolor* esposti a sedimenti prelevati intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare durante la campagna invernale (dicembre 2016).

ALLEGATO 13. Output del modello Sediqualsoft per l'elaborazione complessiva dei risultati di bioaccumulo di metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici nei tessuti dei mitili naturali e trapiantati sulle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 14. Output del modello Sediqualsoft per l'elaborazione complessiva dei dati relativi ai biomarker analizzati nei mitili naturali e trapiantati sulle piattaforme di Campo Rospo Mare.

ALLEGATO 15. Output del modello SediquaSoft per l'integrazione complessiva Weight of Evidence (WOE) e sintesi delle singole elaborazioni ponderate (LOE1, LOE2a, LOE2b, LOE3, LOE4 e LOE5) ottenute per le piattaforme di Campo Rospo Mare (RSM A, RSM B, RSM C).

## 1. PREMESSA

Questa relazione presenta i risultati del piano di monitoraggio svolto nel 2016 dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (Università Politecnica delle Marche, UNIVPM) presso le piattaforme del Campo Rospo Mare, rispettivamente Rospo Mare A, Rospo Mare B e Rospo Mare C.

Lo scopo complessivo dello studio è stato quello di effettuare una valutazione approfondita delle condizioni ambientali nell'area marina del campo petrolifero di Rospo Mare, evidenziando possibili impatti legati alla presenza o alle attività delle piattaforme. Le indagini eseguite da UNIVPM hanno seguito lo schema richiesto per rispondere al DM n. 67 del 15/04/2015 "Autorizzazione Integrata Ambientale-Campo Rospo Mare" e agli adempimenti per l'Attuazione del Piano di Monitoraggio e Controllo (PMC), con particolare riferimento alle prescrizioni fornite da ISPRA nel documento "Allegato 1 Monitoraggio ambientale delle aree in prossimità delle piattaforme Rospo Mare A-B-C". Le attività richieste sono state integrate con ulteriori analisi ed elaborazioni aggiuntive, ritenute importanti per approfondire e definire meglio aspetti critici nella valutazione della qualità dell'ambiente marino e del possibile impatto causato dalle piattaforme del Campo Rospo Mare.

In accordo alle prescrizioni ISPRA, UNIVPM ha eseguito le seguenti analisi relative ai "SEDIMENTI DEL FONDO MARINO" e "INQUINANTI E BIOMARKER IN ORGANISMI MARINI":

- Caratteristiche fisiche e chimiche dei sedimenti (aspetto macroscopico, granulometria, sostanza organica totale, carbonio organico totale, idrocarburi totali, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), metalli pesanti).
- Analisi ecotossicologiche dei sedimenti (utilizzando una batteria di saggi biologici con *Vibrio fischeri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Acatia tonsa*, *Paracentrotus lividus*).
- Comunità bentoniche.
- Bioaccumulo di metalli in *Hediste diversicolor*.
- Analisi di metalli ed idrocarburi policiclici aromatici nei mitili insediati sui piloni delle piattaforme.
- Analisi di alterazioni cellulari (biomarker) nei mitili insediati sui piloni delle piattaforme.

In aggiunta alle analisi previste sui mitili naturali, sono stati condotti anche esperimenti di traslocazione con organismi provenienti da un sito di controllo che sono stati posizionati all'interno di specifiche reti e mantenuti immersi per circa 5 settimane presso le piattaforme oggetto dell'indagine. Il confronto tra le risposte ottenute nei mitili naturali e trapiantati rappresenta un valore aggiunto per l'indagine, consentendo di discriminare meglio la biodisponibilità attuale dei contaminanti e i loro possibili effetti, da quella derivante da episodi passati o da fenomeni di esposizioni a basse dosi ma croniche e dunque prolungate nel tempo.

Anche la batteria dei biomarker analizzati, sia nei mitili naturali che in quelli trapiantati, ha previsto una selezione molto ampia di parametri che potessero riflettere lo stato di salute degli organismi, dalla comparsa delle prime e più sensibili forme di risposta, fino all'insorgenza di fenomeni di tossicità: tra questi, l'attivazione di specifici sistemi di detossificazione, i parametri di funzionalità immunitaria, le difese antiossidanti, i sistemi di trasmissione dell'impulso nervoso, la stabilità delle membrane lisosomiali, i prodotti di perossidazione lipidica, la comparsa di danni genotossici.

Uno degli aspetti fondamentali di questo studio è stata l'elaborazione dei risultati mediante l'applicazione di criteri di valutazione ponderata e la loro integrazione secondo un approccio Weight Of Evidence (WOE). È oggi ampiamente riconosciuto che la valutazione della qualità dell'ambiente marino e l'analisi del rischio ecologico sono problematiche molto complesse che devono essere affrontate mediante approcci multidisciplinari, in grado di fornire il maggior numero di elementi utili a descrivere la complessità di un ecosistema. È al tempo stesso fondamentale che la complessità scientifica di dati ambientali eterogenei possa essere elaborata in maniera integrata, con lo sviluppo di indici e scale sia quantitativi che qualitativi, per arrivare ad una caratterizzazione sintetica del rischio che, pur mantenendo il rigore scientifico delle elaborazioni, permetta una sua più facile comunicazione. In questo studio abbiamo applicato un modello WOE recentemente sviluppato (Sediqualsoft) che, attraverso un approccio integrato considera differenti tipologie di dati (o Linea di Evidenza, LOE), tra cui la caratterizzazione chimica dei sedimenti, l'applicazione di saggi ecotossicologici, la misura del bioaccumulo in organismi bioindicatori, le risposte dei biomarker e la valutazione delle comunità bentoniche. I risultati di ciascuna LOE vengono inizialmente elaborati all'interno di uno specifico modulo, che utilizza flowchart e algoritmi matematici appropriati per elaborare ampi data-sets di dati eterogenei applicando criteri ponderati. Al termine di questa fase vengono forniti indici di pericolo specifici per ciascuna LOE, che sono poi integrati, dando loro un peso diverso in funzione della rilevanza ecologica di ciascuna tipologia di indagine, per l'elaborazione finale di un indice di rischio complessivo.

L'applicazione dei criteri di integrazione ponderata presenta il vantaggio di abbandonare la logica delle valutazioni basate esclusivamente su approcci tabellari, ed è già stata validata in numerosi casi studio relativi alla caratterizzazione di sedimenti inquinati, risorgenze naturali e sversamenti di idrocarburi, emergenze ambientali come il naufragio della Costa Concordia, valutazioni in aree marine complesse tra cui le zone portuali o impattate da scarichi minerari e industriali (Piva *et al.*, 2011; Benedetti *et al.*, 2012, 2014; Regoli *et al.*, 2014; Bebianno *et al.*, 2015; Frantzen *et al.*, 2016; Mestre *et al.*, 2017). L'applicazione dei criteri di integrazione ponderata utilizzati in questo studio per la caratterizzazione chimica dei sedimenti e la loro valutazione ecotossicologica, è stata recepita nella recente normativa sulla classificazione della qualità dei sedimenti marini soggetti ad attività di dragaggio (DM 173, 16 luglio 2016). I risultati complessivi e



la loro elaborazione hanno permesso non solo di fornire un quadro esaustivo ed integrato delle caratteristiche e del rischio ambientale in prossimità del Campo Rospo Mare, ma anche di valutare l'efficacia della strategia di monitoraggio utilizzata e di possibili modifiche da proporre nei campionamenti futuri.

## **2. ATTIVITÀ DI CAMPIONAMENTO: POSIZIONAMENTO DELLE STAZIONI, PRELIEVO DEI SEDIMENTI, DEGLI ORGANISMI ED ESPERIMENTI DI TRASLOCAZIONE DEI MITILI**

Le attività di campionamento sono state eseguite nei mesi di luglio e dicembre 2016 (rispettivamente Campagna estiva ed invernale), a bordo della Motonave Destriero II, in stretto coordinamento con la Società Ecotech Systems (ETS) responsabile dei campionamenti ed analisi della colonna d'acqua e dei popolamenti ittici, con l'assistenza del personale di bordo della Guidotti Ships S.r.l., e la supervisione di Edison S.p.A.

### ***2.1 Campionamento dei sedimenti per la caratterizzazione fisica e chimica (Campagna estiva, luglio 2016)***

Per ciascuna delle 3 piattaforme, Rospo Mare A-B-C, il prelievo dei sedimenti è stato effettuato nel mese di luglio 2016 tramite benna Van Veen da 16 stazioni disposte lungo 2 transetti ortogonali tra loro e aventi come punto di intersezione il sito della piattaforma stessa. Il primo transetto è stato orientato da NW verso SE, mentre il secondo da NE verso SW, ortogonalmente alla linea di costa. Le stazioni sono state posizionate ad una distanza dalle piattaforme pari a 25 m, 50 m, 100 m e 250 m; altre 4 stazioni, considerate come controllo, sono state posizionate lungo le direttrici ad una distanza di 1000 m dalla piattaforma (Figure 1, 2). Le coordinate geografiche dei punti di campionamento sono riportate nelle Tabelle I-III dell'Allegato 1.

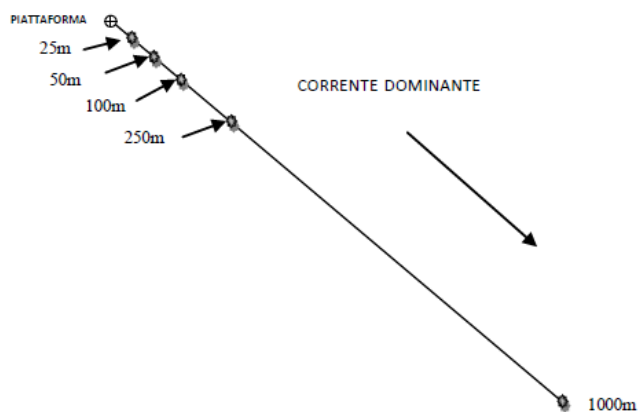


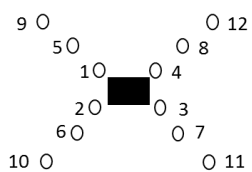
Figura 1. Disposizione lungo un semi-transetto delle stazioni di campionamento dei sedimenti.

17 ○

○ 20

13 ○

○ 16



14 ○

○ 15

18 ○

○ 19

- Piattaforma
- Stazioni di prelievo sedimenti

Figura 2. Schema generale riportante la numerazione attribuita alle stazioni di prelievo dei sedimenti per le successive analisi chimico-fisiche, chimiche, ecotossicologiche e delle comunità bentoniche.

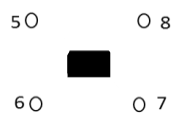
L'aspetto macroscopico (colore, odore, presenza di concrezioni o frammenti), la tessitura e la presenza di strutture sedimentarie di varia natura sono state osservate in situ, subito dopo il prelievo. I campioni di sedimento sono stati conservati a -20°C per le successive analisi dei seguenti parametri:

- Granulometria
- Sostanza organica totale
- Carbonio Organico Totale (TOC)
- Metalli pesanti (Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, V, Zn).
- Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)
- Idrocarburi alifatici totali

Nelle tabelle IV-VI dell'Allegato 1 sono riportati i codici e il numero delle repliche prelevate da ogni stazione.

## ***2.2 Campionamento dei sedimenti per le analisi ecotossicologiche e per le analisi di bioaccumulo sul polichete *Hediste diversicolor* (Campagna estiva ed invernale, luglio e dicembre 2016)***

Il prelievo di sedimenti per le indagini ecotossicologiche e per le analisi di bioaccumulo nel polichete *Hediste diversicolor*, è stato effettuato contemporaneamente al campionamento dei sedimenti per le analisi chimico fisiche, ma su un totale di 8 stazioni per piattaforma. Di queste, 4 stazioni sono state posizionate a 50 m da ciascuna piattaforma sugli stessi transetti ortogonali descritti precedentemente; altre 4 stazioni sono invece state posizionate a 1000 m lungo il transetto delle correnti dominanti, 2 a monte e 2 a valle della piattaforma (Figura 3). I campionamenti di sedimento sono stati ripetuti negli stessi punti anche nel mese di dicembre 2016 solo per le analisi di bioaccumulo nel polichete *Hediste diversicolor*. Le coordinate geografiche dei punti di campionamento sono riportate nelle Tabella I-III dell'Allegato 1.



O 19a O 19b

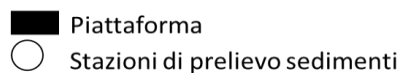


Figura 3. Schema generale riportante la numerazione attribuita alle stazioni di prelievo dei sedimenti per le analisi ecotossicologiche e di bioaccumulo su *Hediste diversicolor* (luglio e dicembre 2016).

Per la caratterizzazione ecotossicologica dei sedimenti è stata applicata la seguente batteria di saggi biologici che prendono in considerazione diversi livelli trofici, diverse matrici (sedimento in fase solida ed elutriato) e diversi tempi di durata (test di tossicità acuta e sub-cronica):

- Saggio di bioluminescenza con il batterio marino *Vibrio fischeri* in fase solida
- Saggio di accrescimento dell'alga *Phaeodactylum tricornutum*
- Saggio di mortalità con il crostaceo copepode *Acartia tonsa*
- Saggio di embriotossicità con l'echinoderma (riccio di mare) *Paracentrotus lividus*

I sedimenti destinati alle analisi ecotossicologiche sono stati mantenuti a +4°C fino alla preparazione degli elutriati, effettuata entro le 72 h dal campionamento. Per quanto riguarda il test sul bioaccumulo nel polichete *Hediste diversicolor*, il sedimento è stato mantenuto a +4°C fino al momento dell'allestimento del saggio sperimentale in laboratorio. Nelle Tabelle VII-IX dell'Allegato 1 sono riportati i codici e il numero delle repliche per le indagini ecotossicologiche con la batteria di saggi ed il bioaccumulo in *H. diversicolor*.

### **2.3 Campionamento dei sedimenti per le analisi delle comunità bentoniche (Campagna estiva, luglio 2016)**

Per ogni piattaforma, nelle stesse 20 stazioni di prelievo dei sedimenti destinati alle analisi dei parametri fisici e chimici (Figura 2), sono state campionate altre tre aliquote di sedimento con benna di tipo Van Veen, immediatamente fissate con Formalin Free Fixative, Accustain™ (Sigma-Aldrich) e conservate per effettuare le analisi delle comunità bentoniche. Nelle Tabelle X-XII dell'Allegato 1 sono riportati i codici e il numero delle repliche prelevate da ogni stazione per queste analisi.

### **2.4 Campionamento di mitili naturali dai piloni delle piattaforme per le analisi di bioaccumulo e di biomarker (Campagna estiva, luglio 2016)**

Durante i campionamenti del mese di luglio 2016, per ciascuna piattaforma sono stati raccolti mitili, *Mytilus galloprovincialis*, recuperati mediante rastrello manuale ad una profondità di circa 3 m da due piloni diversamente posizionati rispetto agli anodi sacrificali. Contemporaneamente al campionamento dei mitili presso le piattaforme, gli stessi organismi sono stati prelevati da un impianto di mitilicoltura presente nell'area costiera di Termoli e utilizzati come controlli non influenzati dalle attività delle piattaforme.

Dopo il recupero, tutti gli organismi sono stati mantenuti in panni umidi alla temperatura di +12°C, rapidamente trasportati nei laboratori del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche, e processati per le successive analisi chimiche e biologiche. Per le analisi chimiche, per ogni punto di campionamento sono stati preparati 10 pool, ciascuno costituito dalle intere parti molli di circa 10 organismi, rapidamente congelati in azoto liquido e successivamente conservati a -20°C fino alla determinazione delle concentrazioni tissutali degli idrocarburi policiclici aromatici, idrocarburi alifatici e metalli pesanti.

Per le analisi dei biomarker, per ogni punto di campionamento sono state dissezionate le ghiandole digestive di 30 organismi, suddivise in 10 pool ciascuno costituito dai tessuti di 3 organismi, congelate in azoto liquido e mantenute successivamente a -80°C fino al momento delle analisi. Sempre per ogni punto di campionamento, sono state dissezionate ulteriori ghiandole digestive di altri 5 organismi opportunamente congelate in azoto liquido, per le analisi istochimiche; 5 pool di emolinfa ciascuno costituito dall'emolinfa di 3 organismi, sono stati preparati, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C per la determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi. In aggiunta, 5 pool di emolinfa fresca, ciascuno costituito dall'emolinfa di 3 organismi, sono stati opportunamente preparati, ed immediatamente sottoposti alle analisi di destabilizzazione delle membrane lisosomiali, dei parametri immunitari e del danno al DNA.

## **2.5 Attività di traslocazione dei mitili per le analisi di bioaccumulo e di biomarker (Campagna estiva, luglio 2016)**

Per quanto riguarda le attività di traslocazione dei mitili, sono state utilizzate strutture simili a quelle già utilizzate in altri programmi di monitoraggio di piattaforme offshore, rappresentate schematicamente in Figura 4. I mitili sono stati posizionati all'interno di retini fissati ad una fune principale (che può essere protetta da una rete a cogollo) fissata ad una estremità alla struttura dell'imbarcadero e tenuta in tensione da 2 corpi morti dal peso di circa 30 kg ciascuno.

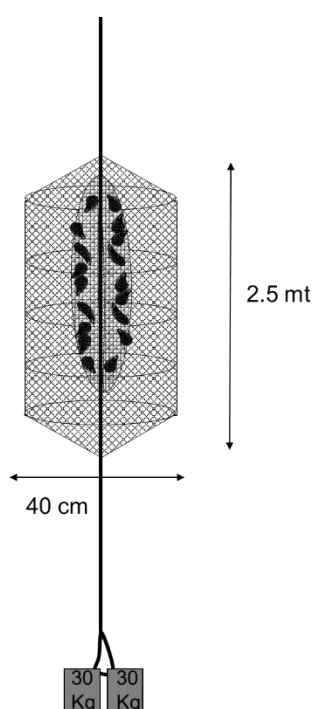


Figura 4. Schema generale della struttura utilizzata per la traslocazione dei mitili sulle piattaforme RSM-A, RSM-B, RSM-C del "Campo Rospo Mare".

Come mitili di controllo per la traslocazione, sono stati utilizzati quelli prelevati dall'impianto di mitilicoltura nei pressi di Termoli. Due strutture per ogni piattaforma sono state installate in modo che i mitili fossero immersi ad una profondità di circa 5 m dalla superficie. Dopo un periodo di circa 5 settimane, gli organismi sono stati recuperati, mantenuti al fresco e rapidamente trasportati nei laboratori del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche, dove sono stati rapidamente processati per le analisi chimiche e per quelle biologiche. Pool di intere parti molli sono stati dissezionati per le analisi di bioaccumulo di metalli in traccia ed idrocarburi (alifatici e aromatici) e mantenuti a -20°C fino al momento delle analisi.

Per le analisi dei biomarker, gli organismi sono stati rapidamente dissezionati, organi e tessuti (ghiandole digestive ed emolinfa) opportunamente processati e/o congelati in azoto liquido e mantenuti a -80°C fino al momento delle analisi. Il numero di campioni e pool preparati sia per le analisi chimiche che per i biomarker corrispondono a quanto descritto precedentemente per la dissezione dei mitili naturali.

### **3. METODOLOGIE ANALITICHE**

#### **3.1 SEDIMENTI DEL FONDO MARINO**

##### **3.1.1 Analisi dei parametri fisici e chimici dei sedimenti**

###### Caratteristiche granulometriche

Per la determinazione delle caratteristiche granulometriche dei sedimenti marini ogni campione (circa 70 g), opportunamente conservato, è stato trattato con una soluzione di perossido di idrogeno ed acqua distillata (1:8) per 48 h a temperatura ambiente, per facilitare la separazione dei granuli. Successivamente il campione di sedimento è stato setacciato su maglia 63 µm in umido con acqua distillata, al fine di ottenere la separazione di due frazioni, che sono state essiccate in stufa a 60°C ed infine pesate. Dopo questa prima fase di separazione, si è proceduto con la separazione del sedimento con granulometria > 63 µm (sabbia e ghiaia) con pile di setacci da 2000, 1000, 500, 250, 125 e 63 µm della serie ASTM; si è pesato il sedimento corrispondente a ciascun intervallo e al termine delle operazioni si è calcolata la percentuale delle varie frazioni all'interno del campione.

###### Sostanza organica (SO) e carbonio organico totale (TOC)

Per la determinazione della sostanza organica sono stati pesati circa 3 g di campione che sono stati lasciati in muffola a 365° per 12 ore. Sono state effettuate 2 pesate, una prima dell'esposizione in muffola ed una subito dopo, determinando la sostanza organica per sottrazione.

Per quanto concerne la determinazione del carbonio organico totale (TOC), i campioni sono stati essiccati in stufa ad una temperatura di 80°C per almeno 8 ore, fino a raggiungimento del peso secco costante. Sono quindi stati trattati con acido cloridrico puro (HCl) per ottenere la completa eliminazione del carbonio inorganico sotto forma di anidride carbonica; i campioni sono stati lavati, centrifugati e lasciati asciugare a temperatura ambiente, prima della determinazione del carbonio organico totale (TOC), conforme al metodo UNI EN 13137:2002, utilizzando l'analizzatore elementare Perkin Elmer 2400, Serie II ed applicando le specifiche del costruttore.

I risultati della Sostanza Organica e del Carbonio Organico Totale vengono espressi in percentuale in peso, riferite al peso secco dei campioni (% m/m).

## *Analisi chimiche di metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici nei sedimenti*

I parametri chimici analizzati riguardano le principali classi di inquinanti tra cui:

- metalli in traccia (Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, V, Zn);
- idrocarburi policiclici aromatici (IPA);
- idrocarburi alifatici totali (C10-C40);

### Determinazione dei metalli in traccia

Per la determinazione dei metalli in traccia, tra cui alluminio (Al), arsenico (As), bario (Ba), cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), vanadio (V) e zinco (Zn), i campioni di sedimento sono stati scongelati, omogenati, posti in idonee piastre petri di vetro e mantenuti in stufa alla temperatura di  $55 \pm 2^\circ\text{C}$  per almeno 8 ore, al fine di ottenere un peso costante dei tessuti essiccati; per ciascun punto di prelievo è stata processata una replica di sedimento. I campioni risultanti sono quindi stati polverizzati, ed aliquote omogenee pari a circa 0.5 g sono state trasferite in appositi contenitori per mineralizzazione sotto pressione in forno a microonde, previa aggiunta di 2 mL di  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 5 mL di  $\text{HNO}_3$ . La mineralizzazione è stata condotta mediante sistema a microonde CEM Mars 5 (CEM Corporation), dotato di sistema controllo e regolazione di temperatura. Al termine del ciclo di mineralizzazione i campioni sono stati raffreddati a temperatura ambiente quindi recuperati e portati a volume noto (10 mL).

La determinazione analitica dei metalli è stata effettuata mediante tecniche di spettrofotometria ad assorbimento atomico; rame e zinco sono stati determinati mediante atomizzazione in fiamma con lo spettrofotometro SpectrAA 220FS (Agilent Technologies), mentre per quanto riguarda alluminio, arsenico, bario, cadmio, cromo, nichel, piombo e vanadio, questi sono stati analizzati mediante spettrofotometro SpectrAA 240Z (Agilent Technologies), munito di elettrofornace GTA120 con microforno di grafite ed effetto Zeeman; quando necessario l'interferenza della matrice è stata risolta utilizzando apposite soluzioni di modificatori di matrice (palladio 1 g/L, 10% acido citrico, 20%  $\text{HNO}_3$ ), mentre le interferenze spettrali sono state verificate utilizzando standardizzazioni con metodo delle aggiunte. La determinazione del mercurio è stata eseguita tramite generazione di vapori freddi utilizzando un apposito analizzatore di mercurio CETAC QuickTrace M-6100 Mercury Analyzer (Agilent Technologies) munito di auto campionatore ASX-130.

Tutte le determinazioni analitiche sono state effettuate previa calibrazione della strumentazione analizzando apposite soluzioni di bianco e standard di riferimento (SRM-NIST 2977) a concentrazione nota e certificata; i risultati finali sono stati espressi in  $\mu\text{g/g}$  (peso secco). I limiti analitici di quantificazione (LOQ) sono riportati in Tabella 1.



### Determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

La determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei campioni di sedimento è stata effettuata utilizzando un'aliquota omogenea di campione, pari a circa 2-3 g. Al momento della preparazione, i campioni sono stati addizionati con 5 mL di una soluzione di KOH 0.5 M in metanolo puro per cromatografia liquida e mantenuti in agitazione per almeno 8 ore, al fine di operare una preliminare estrazione solido-liquido. Il completamento dell'estrazione è stato eseguito mediante microonde a 55°C per 15 min (Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM). I campioni sono stati concentrati a circa 0.5 mL mediante centrifuga evaporante (Speedvack, Juan), a 45°C per 60-120 min, successivamente purificati attraverso una cromatografia a bassa pressione con resine per estrazione in fase solida (SPE) del tipo Backerbond SPE C18 (500 mg, 6 mL) ed infine recuperati in 1 mL di acetonitrile puro per cromatografia liquida. Tale purificazione è stata effettuata utilizzando il sistema automatico Gilson Aspec GX271 (Gilson Inc.). Le determinazioni analitiche sono state effettuate mediante tecniche di cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) utilizzando un sistema di pompe per gradiente binario e coppia di detector in fluorescenza e serie di diodi Agilent Infinity 1260 Series (Agilent Technologies).

L'analisi è stata condotta mediante gradiente dinamico utilizzando acqua ultrapura e acetonitrile come fasi mobili. Il volume di campione iniettato è stato pari a 20 µL ed è garantito costante per tutte le analisi utilizzando un apposito auto campionatore. La determinazione qualitativa e quantitativa degli analiti è stata eseguita attraverso il confronto dei cromatogrammi e dei segnali, con quelli ottenuti iniettando soluzioni standard a concentrazioni note e scalari, preparate utilizzando una miscela di idrocarburi aromatici puri (EPA 610, Supelco). Gli analiti determinati mediante il metodo appena descritto possono essere classificati in IPA a basso peso molecolare (acenaftene, acenaftilene, antracene, fenantrene, fluorene e naftalene), IPA ad alto peso molecolare (benzo(a)antracene, benzo(a)pirene, benzo(b)fluorantrene, benzo(g,h,i)perilene, benzo(k)fluorantrene, crisene, dibenzo(a,h)antracene, fluorantrene, indeno(1,2,3-cd)pirene, pirene) ed IPA metilati (1-metilnaftalene, 2-metilnaftalene e 7,12-dimetilbenzo(a)antracene); l'accuratezza e la precisione analitica sono state verificate analizzando apposite soluzioni di bianco e standard di riferimento (SRM-NIST 2977). Le concentrazioni sono espresse in ng/g di campione (peso secco). I limiti analitici di quantificazione (LOQ) sono riportati in Tabella 1.

### Determinazione degli idrocarburi alifatici totali (C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub>)

La determinazione di idrocarburi alifatici totali (C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub>) è stata effettuata mediante tecniche di gascromatografia (GC); aliquote pari a circa 2-3 g ottenute rispettivamente da una replica di campione di sedimento sono state addizionate con una soluzione di *n*-esano:acetone (2:1) in un rapporto di 1:3, peso campione rispetto al volume di solvente (m:v). Dopo una vigorosa agitazione, i campioni sono stati estratti utilizzando un sistema di estrazione controllata a microonde, alla

temperatura di 110°C per 15 minuti (Microwave Digestion and Extraction System Mars-5, CEM Corporation).

Le soluzioni così ottenute sono state purificate con tecniche di estrazione in fase solida (SPE) utilizzando resine di estrazione del tipo Strata-X (Phenomenex, Strata-X 33u Polymeric Reversed Phase) da 500 mg e 6 mL, oltre a resine del tipo Strata-FL (Phenomenex, FL-PR) da 1000 mg e 6 mL, utilizzando il sistema automatico Gilson Aspec GX271. I campioni eluiti con l'ausilio di soluzioni di acetone ed esano, sono stati raccolti in appositi tubi pyrex e quindi posizionati all'interno di un evaporatore centrifugo (SpeedVack Juan RC 1009), dove sono stati concentrati fino a secchezza, alla temperatura ambiente. Infine i campioni sono stati solubilizzati in 1 ml di *n*-esano. L'analisi degli idrocarburi alifatici è stata effettuata mediante gascromatografia con detector a ionizzazione di fiamma (FID) (Perkin Elmer Clarus 500); il metodo analitico prevede le seguenti specifiche: temperatura iniziale dell'iniettore di 40°C per 0.5 min; rampa pari a 120°C/min fino al raggiungimento di 270°C e mantenimento per 8 min; flusso di elio in colonna costante e pari a 1.5 mL/min; rapporto di splittaggio iniziale pari a 1:20, chiusura dello splittaggio dopo 0.47 min; ripristino del rapporto di splittaggio di 1:20 dopo 1.35 min; temperatura del forno iniziale pari a 40°C e mantenimento per 6 min; rampa di temperatura del forno di 45°C/min fino a 320°C e mantenimento per 10 min; temperatura del detector FID pari a 320°C costante, rapporto di fiamma pari a 10:1, aria:idrogeno. Al termine delle curve di riscaldamento di iniettore e forno, le temperature vengono riportate ai valori iniziali; la durata complessiva della separazione gas-cromatografica è di circa 25 min.

La determinazione quantitativa è stata effettuata calibrando il sistema mediante uno standard puro costituito da un mix di specie chimiche di idrocarburi con pari numero di carbonio da C<sub>10</sub> a C<sub>40</sub>, lineari ed insaturi, conforme alle specifiche EN ISO 9377-3; i risultati finali sono stati espressi in µg/g (peso secco). I limiti analitici di quantificazione (LOQ) sono riportati in Tabella 1.

Metalli pesanti µg/g (ps)	Al	5
	As	0.1
	Ba	0.01
	Cd	0.001
	Cr	0.01
	Cu	0.05
	Fe	0.5
	Hg	0.005
	Ni	0.01
	Mn	0.5
	Pb	0.005
	V	0.05
	Zn	0.5
Idrocarburi policiclici aromatici ng/g (ps)	Naftalene	1
	Acenaftilene	1
	1MN	1
	2MN	1
	Acenaftene	1
	Fluorene	0.5
	Fenantrene	0.5
	Antracene	0.05
	Fluorantene	0.05
	Pirene	0.01
	Benzo(a)antracene	0.01
	Crisene	0.01
	712DMBA	0.05
	Benzo(b)fluorantene	0.01
	Benzo(k)fluorantene	0.01
	Benzo(a)pirene	0.01
	Dibenzo(ah)antracene	0.01
Benzo(ghi)perilene	0.01	
Indeno(123cd)pirene	0.01	
Idrocarburi alifatici totali µg/g (ps)	>C10-C12	0.01
	>C12-C14	0.01
	>C14-C16	0.01
	>C16-C18	0.01
	>C18-C20	0.01
	>C20-C22	0.01
	>C22-C24	0.01
	>C24-C26	0.01
	>C26-C28	0.01
	>C28-C30	0.01
	>C30-C32	0.01
	>C32-C34	0.01
	>C34-C36	0.01
	>C36-C38	0.01
>C38-C40	0.01	

Tabella 1. Limiti di quantificazione (LOQ) per i parametri chimici analizzati.

### **3.1.2 Analisi ecotossicologiche**

#### Saggio biologico con *Vibrio fischeri* in fase solida

*Vibrio fischeri* è un batterio marino Gram-negativo ed eterotrofo, appartenente alla famiglia delle Vibrionaceae. È cosmopolita, ma con maggior diffusione nelle fasce temperate e subtropicali. Il sistema Microtox® è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di questa specie. Poiché in presenza di contaminanti l'emissione di luce da parte di *V. fischeri* diminuisce, la misura dell'eventuale inibizione della bioluminescenza a seguito dell'esposizione del batterio ad una sostanza nota o ad un campione naturale di acqua o sedimento, consente di valutare il grado di tossicità della sostanza o della matrice testata.

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

#### *Preparazione delle matrici ambientali*

I saggi biologici sono stati applicati direttamente alla fase solida. Questa è stata preparata per semplice centrifugazione refrigerata (3500 rpm a 4°C per 30'), eliminando successivamente l'acqua interstiziale come sovranatante.

#### *Protocolli di riferimento e procedura adottata*

L'emissione della bioluminescenza è stata misurata all'interno del luminometro termostato M500, dotato di pozzetti termostatati a 15 °C per i controlli e i campioni, e a 4°C per il reagente.

I metodi utilizzati sono riconducibili al protocollo standard ISO 11348 (2006). In particolare ai campioni di sedimento centrifugato è stato applicato il protocollo Solid Phase Test (SPT) con la procedura Large Sample Method (Azur Environmental, 1995) organizzato con 9-12 diluizioni e 3 controlli a seconda della granulometria del campione. Il test prevede una prima esposizione di 20 minuti durante i quali i batteri si trovano a diretto contatto con il sedimento ed una seconda fase di ulteriori 10 minuti in cui la risospensione batterica viene incubata nel luminometro.

La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, è stata elaborata mediante un software dedicato (Microtox Omni™ v. 1.16). Poiché il test in fase solida viene effettivamente applicato sulla frazione granulometrica < 1 mm e poiché la componente naturale della tossicità è funzione della frazione pelitica, è stata eseguita anche un'analisi granulometrica mirata ad individuare la proporzione tra le due frazioni citate, indispensabile per la valutazione del reale livello di tossicità acuta. Le modalità utilizzate per l'individuazione di tali frazioni granulometriche si dividono in 3 fasi:

1. Trattamento del campione con una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per facilitare la separazione e la disgregazione del sedimento;
2. Setacciatura su getto di acqua distillata mediante setacci ASTM da 63 mm e da 1 mm;

3. Recupero delle frazioni ottenute ed essiccamento in stufa, scartando quella > di 1 mm.

L'emissione della bioluminescenza è stata misurata all'interno del luminometro termostato M500, dotato di pozzetti termostati a 15 °C per i controlli e i campioni e a 4°C per il reagente. I metodi utilizzati sono riconducibili al protocollo standard ISO 11348. La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, è stata elaborata mediante un software dedicato (Microtox Omni™ v. 1.16).

#### Saggio biologico con *Phaeodactylum tricornutum*

La metodica del saggio algale è stata recentemente aggiornata nella norma UNI ISO 10253 (2006) che prevede l'utilizzo di *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin e *Skeletonema costatum*. Entrambe le alghe possono essere impiegate, utilizzando tale protocollo, per saggi con elutriati o estratti da sedimento intero o con acqua sovrantante o interstiziale.

Il principio del test consiste nell'esporre una coltura algale pura in fase di crescita esponenziale per diverse generazioni a concentrazioni note di campione, in condizioni fisico-chimiche standardizzate e con un definito e omogeneo apporto di nutrienti. Al termine del periodo d'incubazione viene confrontata la crescita algale nel campione con quella del controllo.

Il saggio biologico è stato eseguito seguendo i protocolli ISO 10253 (2006) e ARPAT (1998), con alcune modifiche specifiche.

#### *Mantenimento della coltura algale madre e fasi preparatorie*

Le colture cellulari madri sono state mantenute in opportuno mezzo di crescita con periodici rinnovi per mantenerle nella fase di crescita esponenziale. A partire dalla coltura madre, una pre-coltura con una densità cellulare compresa tra  $2 \times 10^3$  e  $10^4$  cells/mL è stata preparata 2-4 giorni prima dell'inizio del test ed incubata alle stesse condizioni previste per il test. La densità cellulare raggiunta dalla pre-coltura è stata poi valutata immediatamente prima dell'utilizzo, per la preparazione della coltura di inoculo a densità cellulare definita.

#### *Preparazione dell'elutriato*

L'elutriato è stato preparato in accordo con il protocollo standard US EPA (1991) combinando in peso quattro parti di acqua filtrata prelevata da una zona non contaminata con una parte di sedimento. Il tutto è stato messo ad agitare per 1 h a 400 giri/min. La fase liquida è stata quindi raccolta e centrifugata per 20 min a 3500 rpm/min. Subcampioni di surnatante sono stati congelati e utilizzati nei vari test, in modo da impiegare sempre lo stesso campione nel corso dei vari esperimenti. Il congelamento infatti non altera in modo significativo le caratteristiche dei nutrienti ( $\text{NO}_3$  e  $\text{PO}_4$ ) della fase liquida (Clementson e Wayte, 1992) e uno studio condotto da Carr e Chapman (1995) ha permesso di verificare l'assenza di differenze significative tra la tossicità di

campioni di matrici acquose appena estratte o congelate. Il congelamento è pertanto un passaggio indispensabile per garantire la confrontabilità fra i dati sperimentali, in quanto permette di stoccare adeguatamente i subcampioni rendendoli disponibili per la ripetizione del saggio in periodi diversi.

### *Campioni testati*

L'elutriato ottenuto da ciascun campione di sedimento è stato testato tal quale (concentrazione effettiva testata 80%) e diluito in differenti rapporti con acqua di mare artificiale (concentrazioni finali testate 40% e 20%).

### *Metodologia di esecuzione del test*

Un'aliquota della coltura di inoculo è stata quindi addizionata alla soluzione test (elutriato puro o diluito) e ad una appropriata quantità di mezzo di coltura concentrato. La soluzione così ottenuta, con una densità cellulare compresa tra  $8 \times 10^3$  e  $1.2 \times 10^4$  cells/mL, è stata quindi distribuita in triplice replica in piastre monouso sterili a 6 pozzetti (Environment Canada, 1992) e posta per 72h in camera termostatica a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , con regime di illuminazione continua del tipo cool white e con una intensità compresa tra 7.000 e 8.000 lux.

Acqua di mare artificiale è stata considerata come controllo negativo. In contemporanea, un controllo positivo è stato effettuato utilizzando dicromato di potassio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) come tossico di riferimento per controllare la procedura e la sensibilità del test (concentrazioni testate 25, 12.5 e 6.25 mg/L). Al termine del prefissato periodo di incubazione è stata determinata la densità algale di ogni replicato, previa omogenizzazione della soluzione contenuta in ciascun pozzetto. Tutte le valutazioni della densità algale sono state effettuate tramite Coulter Counter.

### *Analisi dei risultati*

Per ciascun campione e per il controllo le densità cellulari registrate al termine del test sono state comparate con la concentrazione cellulare iniziale, determinando:

Fattore di Crescita (FC) =  $C_f/C_i$ ,

Tasso di Crescita (TC) =  $(\ln C_f - \ln C_i)/3$ ,

Coefficiente di Variazione (CV) = Scarto tipo dei valori di Fattore di Crescita delle singole repliche/Media dei Fattori di crescita delle repliche \* 100, in cui risulta:

$C_f$  = concentrazione finale (cells/mL)

$C_i$  = concentrazione iniziale (cells/mL).

Affinché il test fosse ritenuto valido, il controllo negativo (SW) ha dovuto rispettare i seguenti criteri di validazione: FC minimo: 16; TC minimo: 0.9 d-1; CV  $\leq$  5 %.

### Saggio biologico con *Acartia tonsa*

Il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848) è una specie cosmopolita delle regioni temperate, dove è comunemente ritrovato in aree costiere ed estuari. Esso rappresenta un importante membro delle comunità zooplanctoniche e costituisce una fonte primaria per consumatori secondari. *Acartia tonsa* è stato proposto per i test di tossicità e gli studi di inquinamento marino a partire dal 1977 (Lee, 1977) ed è ampiamente utilizzato in studi ecotossicologici sia in Europa che negli Stati Uniti, rientrando tra le specie indicate dalla International Organization for Standardization (ISO, 1999) per l'esecuzione di saggi tossicologici applicati agli ambienti marini e salmastri. In tal senso, recentemente è stato pubblicato il protocollo ISO 16778:2015 che standardizza tale tipo di test (Larval Development Rate test) con *A. tonsa*.

### *Caratteristiche generali del saggio LDR (Larval Development Rate Test)*

Il principio del test consiste nell'esporre embrioni di *A. tonsa*, rilasciati al massimo da 48 ore (prevedendo una conservazione a freddo degli embrioni raccolti i giorni precedenti l'inizio del test) ed i successivi stadi di sviluppo, a quantità definite di sedimento in condizioni fisico-chimiche standard. Al termine del periodo d'incubazione (5-7 giorni) viene confrontato il tasso di stadi giovanili (copepoditi) ottenuto con l'esposizione al sedimento con i valori registrati nel controllo (costituito da sola acqua di mare naturale filtrata a 0.22  $\mu$ m) e determinando un valore di inibizione percentuale che viene poi confrontato con la tabella per la valutazione della tossicità del sedimento analizzato. Il saggio biologico è stato eseguito seguendo il protocollo ISO 16778:2015 con alcune modifiche specifiche.

### *Campioni testati*

I sedimenti sono stati testati tal quali entro un mese dal campionamento e previa conservazione a 4°C.

### *Mantenimento della coltura di *A. tonsa**

La coltura di *A. tonsa* è stata allevata in vasche da 20 L contenenti acqua di mare naturale filtrata 0.22  $\mu$ m (FSW) (salinità 30 ‰, pH 8.2  $\pm$  0.1) ed alimentata con una dieta multi algale costituita dalle specie *Rhinomonas reticulata*, *Rhodomonas baltica* e *Isochrysis galbana*, alla concentrazione finale totale superiore ai 300  $\mu$ g C L<sup>-1</sup> per day. I tre ceppi algali sono stati coltivati come descritto da Zhang *et al.* (2013) ed utilizzati per l'alimentazione degli animali durante la fase esponenziale di crescita. La coltura di *A. tonsa* è stata mantenuta in una camera termostata a 20  $\pm$  1°C con un

fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 ore di buio. L'acqua di coltura è stata parzialmente rinnovata ogni mese.

#### *Fasi preparatorie del test*

Adulti di *A. tonsa* sono stati selezionati dalla coltura principale ed incubati ad una densità  $\leq 40$  ind L<sup>-1</sup> in becher contenenti una miscela di alghe *R. reticulata* e *R. baltica* ad una concentrazione totale  $> 500 \mu\text{gC L}^{-1}$ . Dopo 24 ore, gli embrioni prodotti e accumulati sul fondo dei becher sono stati raccolti mediante filtrazione del mezzo di allevamento con un filtro da 55  $\mu\text{m}$ ; gli adulti sono stati trasferiti in becher con mezzo fresco al fine di ripetere la raccolta di embrioni anche nelle successive 24-48 ore. Gli embrioni raccolti sono stati conservati a 4°C fino all'inizio del test. Il giorno prima dell'inizio del saggio, 3.5 g di sedimento sono stati introdotti in ciascuna camera test (contenitori in polistirene da 125 mL) aggiungendo FSW (60 mL) e mantenuti in camera termostata per 24 ore circa fino all'inoculo degli embrioni.

#### *Esecuzione del test*

Il volume finale in ciascuna camera test è stato poi portato a 80 mL mediante aggiunta di FSW. Le camere test sono state quindi incubate in armadio termostato a  $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 16h:8h luce:buio (500 – 1000 lux). Parallelamente, e con la stessa metodologia utilizzata per i campioni sperimentali di sedimento, è stato eseguito un test con un sedimento di controllo (sabbia quarzifera del Po), sedimento che in prove precedenti non ha evidenziato effetti sullo sviluppo di *A. tonsa*. Acqua di mare filtrata e sterilizzata con aggiunta di uova e alimento alle stesse proporzioni utilizzate per i campioni di sedimento (volume finale 25 mL) è stata considerata invece come controllo negativo; come controllo positivo è stato preso in considerazione un test effettuato successivamente (entro due mesi dalla conduzione del test con i sedimenti di prova) con 3,5-diclorofenolo ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$ ) (Pestanal® analytical standard, Fluka, Sigma-Aldrich, concentrazioni testate comprese tra 10 e 750  $\mu\text{g/L}$ ) utilizzato come tossico di riferimento periodicamente testato per controllare la procedura e la sensibilità della coltura di *A. tonsa*.

La prova è stata effettuata prevedendo 6 repliche per ciascun campione di sedimento, 10 repliche per il controllo negativo FSW e 3 repliche per il sedimento di controllo (e 4 repliche per ciascuna delle 5 concentrazioni di 3,5-diclorofenolo testate). Dopo due giorni di incubazione in ciascuna camera test contenente sedimento (e sedimento di controllo) è stato aggiunto un volume definito di coltura algale tale da avere  $5 \cdot 10^4$  cells/mL finale mentre i replicati di controllo negativo sono invece stati addizionati con FSW e soluzione concentrata di *R. baltica* determinando un parziale rinnovo delle soluzioni (volume finale 50 mL). Le condizioni di incubazione sono state quindi mantenute costanti. Al termine del quinto giorno una replica del controllo negativo è stata fissata aggiungendo 0.5 mL di lugol filtrata su maglia da 55  $\mu\text{m}$  e concentrata in un volume minore (20-30 mL). Il numero di nauplii e copepoditi è stato quindi valutato utilizzando uno stereo microscopio Leica



ed utilizzato per calcolare il rapporto nauplii:copepoditi. Il test è stato concluso per tutte le altre camere test (campioni di sedimento, controllo negativo e controllo positivo) se tale rapporto è risultato di circa 0,5 (50 % nauplii, 50% di copepoditi), altrimenti il test è stato proseguito per ulteriori 6-12 ore. I valori di nauplii e copepoditi ottenuti al termine del test sono stati quindi utilizzati per calcolare l'LDR ratio utilizzando la formula:

$$\text{LDR ratio} = [\text{N. copepoditi}/(\text{N. Nauplii} + \text{N. Copepoditi})].$$

#### *Condizioni di accettabilità per LDR-test*

Affinché il test condotto fosse ritenuto valido, le seguenti condizioni di accettabilità sono state prese in considerazione:

- percentuale media di copepoditi nel controllo negativo:  $50 \pm 20\%$  degli animali sopravvissuti alla fine dell'esposizione (sia test su fase liquida, sia su sedimento).
- valore di EC50 per il 3,5-diclorofenolo per il parametro Inibizione: 33 – 380  $\mu\text{g/L}$ .

#### *Saggio biologico con *Paracentrotus lividus**

La matrice ambientale soggetta alla valutazione ecotossicologica in questo saggio biologico è l'elutriato che fornisce informazioni sulla tossicità di tutte le componenti estraibili in acqua.

#### *Campioni testati*

L'elutriato, preparato come descritto precedentemente, viene testato sia non diluito (100%) che diluito ai valori di diluizione di 25%, 50% e 75%. In questo caso l'elutriato viene diluito sia con acqua di mare filtrata che con acqua ricostituita.

#### *Raccolta degli organismi*

Per assicurare la maturità sessuale, i ricci di mare adulti vengono raccolti tra settembre e maggio (Fenaux, 1968). Esemplari adulti sono stati prelevati da una zona costiera non influenzata da fonti di inquinamento antropico o industriale. Tutti i ricci (40-50) vengono raccolti ad una profondità tra 1 e 3 m. Gli animali raccolti sono posti in un contenitore di plastica e ricoperti con abbondante carta bibula umida per minimizzare lo stress da trasporto ed evitare così possibili emissioni di gameti. In laboratorio gli esemplari vengono posti in una camera termostata, in acquari di vetro contenenti acqua di mare raccolta nello stesso sito di campionamento e dotati di un sistema di areazione e di filtraggio (20-30 individui per 100 l di acqua). Periodicamente vengono controllati temperatura ( $16 \pm 1^\circ\text{C}$ ), salinità (34‰ - 38‰), pH (7,8 - 8,2), ammoniaca e nitrati. In questo modo i ricci sono mantenuti in condizioni stabili, almeno per una settimana.

### *Modalità di esecuzione del test di embriotossicità*

La fase vera e propria del test consiste nell'ottenere gli zigoti attraverso l'unione della sospensione spermatica (concentrazione desiderata) con la sospensione di uova in un rapporto spermatozoi:uova di 10:1. Il beaker viene mantenuto a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  per almeno 20 min affinché possa avvenire la fecondazione delle uova. Il saggio di embriotossicità viene eseguito esponendo 1 mL di soluzione di uova fecondate a 10 mL della soluzione test (elutriato puro o diluito) in cella termostatica al buio a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  per 72h. Normalmente gli zigoti si sviluppano e raggiungono lo stadio larvale in 48h, ma il tempo di esposizione scelto per il test, garantisce che tutti gli zigoti raggiungano lo stadio di larva (pluteo) nel controllo negativo. Il test viene fissato con 1 ml di formalina concentrata tamponata. La stima della percentuale di plutei normali avviene contando 100 larve. Per ottenere una stima più accurata degli effetti embriotossici, si distinguono le anomalie dello sviluppo distinguendo tra plutei malformati, cioè larve sviluppate ma che presentano malformazioni scheletriche e/o all'apparato digerente, e fasi pre-larvali di blastula, gastrula, prisma e pluteo precoce, che si sono bloccate prima del raggiungimento del completo sviluppo.

### *Elaborazione dei dati*

L'effetto della sostanza testata, di cui si vuole valutare la tossicità, viene rilevato dalla percentuale di embrioni malformati rispetto a un controllo di acqua di mare. Come abbiamo detto in precedenza, il test viene considerato accettabile se il tasso di sviluppo del controllo oscilla tra il 70%-90% e se il valore di EC50 con il rame rientra nella carta di controllo del laboratorio (34.598 - 68.344  $\mu\text{g/l}$ ).

### **3.1.3 Analisi delle comunità bentoniche**

In laboratorio i campioni di sedimento sono stati sciacquati su setaccio di maglia inferiore a 0,5 mm e quindi posti allo stereomicroscopio per l'individuazione e lo smistamento degli organismi nei principali taxa animali. Finite le operazioni di sorting gli organismi sono stati classificati, quando possibile, a livello di specie. La nomenclatura utilizzata fa riferimento ai volumi pubblicati da Minelli *et al.* (1995) nella loro versione aggiornata (2008/2010) pubblicata sul sito della Società Italiana di Biologia Marina ([www.sibm.it](http://www.sibm.it)). Gli organismi, una volta identificati sono stati conservati in alcool etilico al 70%. Per ogni stazione di campionamento sono state compilate le liste faunistiche delle specie raccolte. Per ogni specie è stata indicata, quando possibile, l'appartenenza alle biocenosi-tipo in base alla standardizzazione di Pèrés e Picard (1964) in modo da definirne l'inquadramento bionomico ed ecologico (Picard, 1965).

## **3.2. INQUINANTI E BIOMARKER IN ORGANISMI MARINI**

### **3.2.1 Bioaccumulo di metalli in *Hediste diversicolor***

Per la valutazione del bioaccumulo mediante *Hediste diversicolor*, circa 600 esemplari sono stati ottenuti presso una attività specializzata nel campionamento, stabulazione e commercio di esche vive (Escaviva, World Trading S.r.l., Venezia); gli organismi sono stati prelevati da sedimenti lagunari nell'area di Venezia ed ottenuti vivi entro 24 ore dal prelievo. In laboratorio gli organismi sono stati stabulati in vasche da 50 litri d'acqua marina filtrata, prive di sedimenti, alla temperatura di  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , salinità pari a 30 psu ed ossigenazione continua per 72 ore per l'acclimatazione.

Al termine dell'acclimatazione, gli organismi sono stati controllati ad uno ad uno al fine di isolare eventuali esemplari con sintomi di sofferenza o danneggiati (inferiori al 10% del totale degli organismi) e per identificare una coorte di animali di taglia omogenea (circa  $5.0 \pm 1.0$  cm di lunghezza). A questo punto, 20 esemplari di *H. diversicolor* sono stati immediatamente sacrificati, immergendoli in azoto liquido e quindi conservati alla temperatura di  $-20^\circ\text{C}$ , costituendo il gruppo di organismi di controllo al tempo iniziale del test (CTRL iniziale,  $T=0$ ). Circa 20 organismi sono stati invece inseriti all'interno di ciascuno dei contenitori per il test di bioaccumulo, contenente un volume pari a 500 mL di sedimento (corrispondenti a circa 600-800 grammi di fanghi umidi) e 500 mL di acqua di mare filtrata alla temperatura di  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , salinità pari a 30 psu ed ossigenazione continua; infine, altri organismi sono stati stabulati all'interno di una vasca da 50 litri, contenente uno strato omogeneo pari a circa 6 cm di sabbie di controllo, provenienti da un'area non soggetta a fenomeni di contaminazione (Senigallia) ed acqua di mare filtrata alla temperatura di  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , salinità pari a 30 psu ed ossigenazione continua; quest'ultimo gruppo, stabulato nelle medesime condizioni degli animali utilizzati per il test di bioaccumulo, costituisce un controllo sulla buona esecuzione dell'esperimento.

Tutti gli organismi sono stati mantenuti nelle condizioni descritte per 28 giorni (4 settimane), controllando periodicamente la presenza di eventuali animali morti (non osservati) e aggiustando il volume d'acqua qualora fosse necessario; settimanalmente il volume d'acqua all'interno di ciascuno dei contenitori per il test è stato rimosso e rinnovato con volumi di acqua fresca alle medesime condizioni già descritte. Al termine degli esperimenti (28 giorni), tutti gli animali, compresi quelli del controllo finale, sono stati rimossi dai sedimenti, gentilmente risciacquati con acqua di mare e stabulati in nuovi contenitori da 1 L ciascuno, contenenti d'acqua di mare ( $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , salinità pari a 30 psu ed ossigenazione continua), priva di sedimenti, e mantenuti in queste condizioni per 72 ore al fine di consentire l'espulsione dei grani di sedimento dall'intestino degli organismi stessi.

Quindi tutti gli animali sono stati sacrificati immergendoli in azoto liquido e conservati alla temperatura di  $-20^\circ\text{C}$  fino al momento della preparazione dei campioni per le successive analisi di laboratorio.

Per ciascuno dei sedimenti provenienti dalle differenti stazioni da testare, sono state selezionate 3 repliche costituite da un pool di 5-7 esemplari di *H. diversicolor*; gli organismi sono stati essiccati in stufa, overnight (per almeno 8 ore), alla temperatura di 60°C, fino all'ottenimento di un peso costante, quindi i tessuti sono stati finemente sminuzzati e resi omogenei mediante un mortaio. Aliquote pari a circa 0.3 g sono state trasferite in appositi contenitori per mineralizzazione sotto pressione in forno a microonde, addizionati con 2 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5 ml di HNO<sub>3</sub> (puriss.p.a. plus) e lasciati riposare per circa 15 minuti. La mineralizzazione è stata condotta con un forno a microonde CEM (Microwave Accelerated Reaction System, MARS5, CEM Corporation). La digestione prevede il raggiungimento di 160°C in 15 minuti ed un successivo mantenimento della temperatura di 5 minuti. I campioni sono stati lasciati raffreddare fino a temperatura ambiente e portati a volume noto (10 ml) con acqua ultrapura. Le determinazioni analitiche sono state effettuate mediante la costruzione di apposite curve di taratura, ottenute con l'ausilio di almeno 5 soluzioni a concentrazioni scalari e note, di standard di sostanze pure di riferimento.

Le concentrazioni di Al, As, Ba, Cd, Cr, Ni, Pb e V nei tessuti dei policheti sono state misurate mediante Spettrofotometria in Assorbimento Atomico con atomizzazione in fornello di grafite e correzione del fondo mediante effetto Zeeman (Varian, SpectrAA-240Z), utilizzando, quando necessario, apposite soluzioni di modificatore di matrice, costituito da palladio 2 g/L, al 20% di acido citrico e 50% di acido nitrico, ed applicando standardizzazioni mediante metodo delle aggiunte per risolvere eventuali interferenze spettrali. La determinazione di Cu e Zn è stata invece effettuata mediante atomizzazione a fiamma aria/acetilene, a flusso laminare (Varian, SpectrAA 220FS), con correzione del fondo mediante lampada al deuterio. Infine il mercurio (Hg) è stato determinato mediante metodo della generazione di vapori freddi (Varian, Cetac Quick Trace Mercury Analyzer M-6100), utilizzando campioni mineralizzati, per escludere qualsiasi incertezza legata alla standardizzazione mediante matrici solide; il metodo prevede la riduzione per via chimica del mercurio in soluzione in Hg<sup>0</sup>, mediante una soluzione concentrata di cloruro stannoso (SnCl<sub>3</sub>) in ambiente fortemente acido per acido cloridrico e separazione dei vapori freddi di mercurio mediante gas inerte (argon).

### **3.2.2 Bioaccumulo di metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici nei mitili naturali e trapiantati**

Le analisi dei parametri chimici nei tessuti dei mitili sono state condotte, per ogni punto di campionamento, su 5 aliquote omogenee di campione, ognuna costituita dai tessuti di almeno 3 individui. Le procedure di preparazione dei campioni, di controllo dell'accuratezza e precisione analitica, e le tecniche analitiche sono le stesse già descritte per le analisi dei sedimenti.

### 3.2.3 Analisi dei biomarker nei mitili naturali e trapiantati

I biomarker analizzati ed i relativi metodi analitici sono riportati brevemente di seguito:

- livelli di metallotioneine (biomarker di esposizione a metalli in traccia);
- attività dell'acetilcolinesterasi (biomarker di neurotossicità);
- analisi delle difese antiossidanti, catalasi, glutatione S-transferasi, glutatione reduttasi, glutatione perossidasi Se-dipendenti e Se-indipendenti, glutatione totale (biomarker generali di stress ossidativo);
- analisi della Capacità Antiossidante Totale (biomarker di stress ossidativo);
- contenuto di malondialdeide (biomarker di fenomeni di perossidazione lipidica);
- stabilità delle membrane lisosomiali (biomarker generale di danno cellulare);
- analisi parametri immunitari (test di fagocitosi e rapporto granulociti/ialinociti) (biomarker generale di danno cellulare);
- frammentazione del DNA e frequenza di micronuclei, come parametri indicativi di genotossicità.

Per quantificare i livelli di metallotioneine, proteine citosoliche indotte dalla esposizione a metalli pesanti, le ghiandole digestive dei mitili sono stati omogenate (1:3 p/v) in tampone Tris-HCl 20 mM, pH 8.6, con saccarosio 0.5 M, leupeptina 0.006 mM, fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF) 0.5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanololo 0.01%. Dopo centrifugazione a 30.000 xg per 45 minuti a 4°C, la purificazione delle metallotioneine è stata effettuata attraverso una serie di precipitazioni etanoliche. Il pellet ottenuto da questi procedimenti e contenente le metallotioneine, è stato asciugato sotto flusso d'azoto, risospeso nuovamente in una soluzione di NaCl 0.25 M e HCl 1 N, contenente EDTA 4 mM per eliminare i cationi metallici legati alle metallotioneine. Alla soluzione così ottenuta è stato aggiunto tampone Na-fosfato 200 mM, pH 8, NaCl 2 M e l'acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0.43 mM ed il campione ulteriormente centrifugato a 3.000 xg per 5 minuti a 4°C. La concentrazione delle metallotioneine è stata valutata in rapporto ai gruppi -SH determinati spettrofotometricamente a  $\lambda = 412$  nm mediante reazione con DTNB. La quantificazione è stata effettuata attraverso una retta standard di calibrazione realizzata con concentrazioni note di GSH (50-500 $\mu$ M) (Viarengo *et al.*, 1997).

L'attività dell'acetilcolinesterasi è stata determinata nei campioni di emolinfa opportunamente centrifugata per 5 minuti a 3.000 xg. Il sovrantante è stato utilizzato per determinare l'attività della acetilcolinesterasi (ACh) secondo il metodo di Ellman, alla temperatura di  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ , alla lunghezza d'onda di 412 nm, con  $\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Ellman *et al.*, 1961).

Per le analisi degli *enzimi antiossidanti* le ghiandole digestive sono state omogenate (1:5 p/v) in tampone K-fosfato 100 mM, pH 7.5, con cloruro di sodio 1.8% e PMSF 0.1 mM. Dopo centrifugazione a 100.000 xg per 1h e 10 min a 4°C, la frazione citosolica è stata aliquotata e conservata a -80 °C. Le attività enzimatiche sono state misurate con specifici saggi spettrofotometrici utilizzando uno strumento Varian (modello Cary 5) termostato a temperatura costante di  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  (Benedetti *et al.*, 2012). La *catalasi* trasforma il perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in acqua e ossigeno molecolare, rimuovendo così oltre che un potente ossidante cellulare, anche il principale precursore del radicale idrossilico, il più reattivo e tossico fra le specie reattive dell'ossigeno. L'attività della catalasi è stata misurata seguendo la diminuzione di assorbanza in funzione del tempo, dovuta alla riduzione del perossido di idrogeno ad acqua; la lunghezza d'onda utilizzata è stata  $\lambda = 240 \text{ nm}$  ed il coefficiente di estinzione millimolare applicato è stato  $\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Il saggio è condotto per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.0, con  $\text{H}_2\text{O}_2$  12 mM ed opportune aliquote di campione.

Le *glutazione S-transferasi* catalizzano la coniugazione di una molecola di glutazione ridotto (GSH) ai gruppi elettrofili di composti organici. Delle molte isoforme, alcune possono avere funzione antiossidante, ma la maggior parte sono coinvolte nella detossificazione di substrati organici, resi più idrosolubili e di più facile escrezione. L'attività catalitica delle glutazione S-transferasi è stata analizzata seguendo l'aumento di assorbanza dovuto alla formazione del complesso di coniugazione tra GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), ad una lunghezza d'onda  $\lambda=340 \text{ nm}$  e con un coefficiente di estinzione millimolare  $\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La reazione è seguita per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM pH 6.5, CDNB 1.5 mM, GSH 1 mM ed opportune aliquote di campione.

La *glutazione reduttasi* ha la funzione di riconvertire il glutazione ossidato nella sua forma ridotta, cioè quella funzionalmente attiva, utilizzando come cofattore riducente il NADPH. Il saggio della glutazione reduttasi è stato condotto alla lunghezza d'onda  $\lambda=340 \text{ nm}$  e con coefficiente di estinzione millimolare  $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , misurando il decremento di assorbanza dovuto al consumo di NADPH nel tempo. La reazione è stata effettuata in un volume di saggio finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.0, GSSG 1 mM, NADPH 0.12 mM ed opportune aliquote di campione. Gli enzimi *glutazione perossidasi*, *Se-dipendenti* e *Se-indipendenti*, svolgono la loro funzione agendo su perossidi organici ed inorganici riducendoli all'alcool corrispondente. L'attività enzimatica è stata misurata seguendo l'azione di un sistema di enzimi accoppiati dove il GSSG formato nella reazione delle perossidasi viene convertito nella forma ridotta GSH dalla glutazione reduttasi. Il consumo di NADPH è stato seguito come diminuzione di assorbanza a  $\lambda = 340 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). L'attività delle forme enzimatiche Se-dipendenti e dell'insieme di quelle Se-dipendenti e Se-indipendenti è stata misurata usando come substrato rispettivamente, perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), per verificare l'efficacia di detossificazione degli enzimi su perossidi inorganici, e

idroperossido di cumene (CuPx) per valutarne l'azione su perossidi organici. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, EDTA 1 mM, GSH 2 mM, NADPH 0.24 mM, 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 0.8 mM CuPx, 1U GR ed opportune aliquote di campione.

Il *glutathione* è un tripeptide citosolico formato da  $\gamma$  glutamil-cistetil-glicina e oltre ad essere un importante cofattore di svariati sistemi enzimatici glutathione-dipendenti, è in grado di neutralizzare numerose forme di radicali liberi reagendovi direttamente ed ossidandosi. Per la determinazione del glutathione totale gli omogenati di ghiandola digestiva sono stati preparati in acido sulfosalicilico 5% con EDTA 4 mM (1:5 p/v). I campioni sono quindi stati lasciati in ghiaccio per 45 min al fine di ottenere una completa deproteinizzazione e centrifugati a 37.000 xg per 15 min. Il contenuto di glutathione totale è stato determinato nel sovranatante misurando per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda  $\lambda=412$  nm, l'intensità di reazione tra i gruppi -SH e DTNB. Il saggio è stato condotto in tampone K-fosfato 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTNB 0.1 mM, NADPH 0.24 mM, glutathione riduttasi 1 U ed opportune aliquote di campione. I valori di assorbanza ottenuti sono stati quantificati mediante una curva di calibrazione standard a concentrazioni note di glutathione ridotto.

La *Capacità Antiossidante Totale* è stata stimata tramite il saggio TOSC che misura l'efficienza complessiva di un tessuto biologico di neutralizzare diverse forme di ROS tra cui i *radicali perossilici* (ROO•) e i *radicali idrossilici* (HO•) (Winston *et al.*, 1998; Regoli e Winston, 1999). Le analisi sono state effettuate sulla componente citosolica della ghiandola digestiva ottenuta dopo omogenizzazione (1:5 p/v) in un working-buffer costituito da tampone K-fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 1.8%. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 100.000 xg per 1 ora e 10 minuti a 4°C, e la frazione citosolica subaliquotata e conservata a -80°C fino al momento delle analisi. Il saggio TOSC-A (Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay) prevede la reazione tra le diverse forme di radicali che sono artificialmente generati, e l'acido  $\alpha$ -cheto- $\gamma$ -metiolbutirrico (KMBA), che funge da substrato e si ossida liberando gas etilene. La produzione di etilene risulta quantitativamente diminuita in presenza di agenti antiossidanti (come quelli contenuti nel materiale biologico) che reagiscono con i radicali neutralizzandoli e sottraendoli alla reazione con il KMBA. I radicali perossilici (ROO•) sono stati generati attraverso l'omolisi termica del 2,2'-azo-bis-amidinopropano (ABAP) mentre i radicali idrossilici (HO•) attraverso la reazione di Fenton ferro-ascorbato. Le reazioni sono state condotte in appositi contenitori di vetro da 10 ml (vials), sigillati con speciali tappi muniti di setto, mantenuti alla temperatura costante di 35°C in bagno termostatico continuamente agitato per consentire una generazione costante delle varie forme di radicali. Le condizioni finali di saggio sono state le seguenti:

- per l'analisi con i radicali perossilici (ROO•): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM e ABAP 20 mM in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4;

- per l'analisi con i radicali idrossilici ( $\bullet\text{OH}$ ): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM,  $\text{Fe}^{3+}$  1.8  $\mu\text{M}$ , EDTA 3.6  $\mu\text{M}$  e acido ascorbico 180  $\mu\text{M}$  in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4.

Il KMBA viene ossidato dalle diverse forme di radicali generando gas etilene. La formazione dell'etilene è stata monitorata nel tempo mediante analisi gas-cromatografica su colonna capillare "Supelco SPB-1" (30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) e mediante rivelatore FID (Flame Ionization Detector), utilizzando le seguenti condizioni strumentali: temperatura del forno pari a 35°C, temperatura del FID pari a 220°C, temperatura d'iniezione pari a 160°C, flusso d'idrogeno pari a 30 ml/minuto; flusso d'elio pari a 3 ml/minuto. La differenza di produzione d'etilene tra la reazione nei vials di controllo e la reazione nei vials contenenti i campioni, è calcolata matematicamente, integrando l'area al di sotto delle rispettive curve cinetiche della produzione d'etilene in funzione del tempo, considerando che ogni campione viene letto ogni 12 minuti per un tempo totale di saggio pari a 96 minuti. I risultati ottenuti permettono di quantificare il parametro TOSC, compreso tra 0 e 100, indice della capacità complessiva del campione analizzato, di neutralizzare le varie forme di specie reattive dell'ossigeno.

Il valore TOSC sperimentale è ottenuto secondo la formula:

$$\text{TOSC} = 100 - (\int\text{SA} / \int\text{CA} \times 100)$$

dove  $\int\text{SA}$  e  $\int\text{CA}$  sono gli integrali delle aree al di sotto delle curve che rappresentano rispettivamente le reazioni di un campione SA (Sample Area) e del controllo CA (Control Area).

Un campione che sia privo di qualsiasi capacità di neutralizzare i radicali mostrerà una produzione di etilene in funzione del tempo uguale a quella dei controlli ( $\int\text{SA} / \int\text{CA}=1$ ) ed il risultante valore TOSC sarà pertanto pari a 0. Al contrario un ipotetico valore TOSC=100 corrisponderebbe ad un campione che neutralizza tutte le specie reattive prodotte, inibendo completamente la formazione di etilene nell'intera durata del saggio ( $\int\text{SA}=0$ ). Dai risultati sperimentali viene ottenuto un valore TOSC specifico, rapportato al contenuto di proteine ed espresso come unità TOSC/mg di proteine. Le *proteine* sono state analizzate secondo il metodo di Lowry, utilizzando albumina di siero bovino (BSA) come standard (Lowry *et al.*, 1951).

Il contenuto di *malondialdeide*, principale prodotto di perossidazione lipidica, è stato determinato attraverso una reazione di coniugazione con 1-metil-2-fenilindolo, che dà luogo alla formazione di un composto con assorbanza massima alla lunghezza d'onda  $\lambda=586$  nm (Shaw *et al.*, 2004). Per queste analisi i campioni di ghiandola digestiva sono stati omogenati in Tris-HCl 20 mM pH 7.4 (1:5 p/v) e centrifugati a 3.000 xg per 20 min. La reazione di coniugazione è stata condotta a 45°C per 40 min in un volume finale di 1 ml costituito da: 650  $\mu\text{l}$  di 1-metil-2-fenilindolo 10.3 mM in acetonitrile diluito in rapporto 3:1 con metanolo; 100  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ ; 150  $\mu\text{l}$  di HCl 37%. Dopo centrifugazione a 15.000 xg per 10 min, il contenuto di malondialdeide è stato misurato per via spettrofotometrica, utilizzando come standard 1,1,3,3-tetrametossipropano in Tris-HCl 20 mM.



La *stabilità delle membrane lisosomiali* (TRRN) rappresenta un biomarker estremamente sensibile, indicativo dello stato di salute generale dell'organismo e della comparsa precoce di condizioni di stress ossidativo (Moore, 1982, 1988; Regoli, 1992; Moore *et al.*, 2006). Tale parametro è stato misurato nell'emolinfa dei mitili (0.5 ml) prelevata dal muscolo adduttore anteriore, mediante siringa ipodermica contenente un eguale volume di soluzione fisiologica (ICES, 2015). Una aliquota di tale sospensione è stata poi dispersa su un vetrino da microscopia dove le cellule sono state lasciate aderire per 15 min a 4°C in camera buia e umida. Dopo la rimozione dell'eccesso di emolinfa, le cellule sono quindi state incubate con una soluzione di Rosso Neutro ed esaminate ad intervalli di 15 min (fino ad un tempo massimo di 120 min) per determinare il tempo al quale il 50% degli emociti presenta il Rosso Neutro non più compartimentalizzato nei lisosomi ma rilasciato nel citosol. La soluzione stock di Rosso Neutro è stata preparata dissolvendo 28.8 mg di colorante in 1 ml di dimetilsolfossido (DMSO) e conservata a 4°C per non più di 3 settimane; al momento dell'analisi 10 µl di soluzione stock sono stati diluiti in 5 ml di soluzione fisiologica.

Il *Test di fagocitosi*, è stato misurato su emolinfa fresca, prelevata con siringhe ipodermiche, dal muscolo adduttore degli organismi. Nello specifico 50 µL di emolinfa vengono incubati al buio in camera umida per due ore con 50 µL di Zymosan (lieviti fluorescenti in polvere). La soluzione di lieviti fluorescenti si ottiene preparando una soluzione madre composta da 1 mg di polvere di Zymosan in 50 µL di PBS e 1 µL di NaN<sub>3</sub>, successivamente 1 µL di questa soluzione viene diluita in 150 µL di soluzione fisiologica (acqua di mare sintetica al 37 ‰ filtrata). Dopo l'incubazione, i campioni vengono sciacquati in soluzione fisiologica (acqua di mare sintetica), fissati in Baker's Ca-formolo e montati tramite Eukitt; l'analisi, tramite microscopia ottica e a fluorescenza, valuta il numero di granulociti su un totale di cento cellule che al termine delle due ore di incubazione hanno fagocitato almeno tre cellule di lievito fluorescente.

Il *rapporto granulociti/ialinociti*, rappresenta un'altra risposta del sistema immunitario dei mitili. Nello specifico, 50µL di emolinfa prelevata dal muscolo adduttore degli organismi, vengono fatti aderire su vetrino da microscopia per circa 10 minuti e, dopo averne eliminato l'eccesso, vengono fissati in Baker's Ca-formolo per 15 minuti. Dopo un risciacquo in acqua deionizzata, il campione viene lasciato per 3 minuti in ematossilina, la quale colora di viola gli acidi nucleici, le membrane e le proteine di membrana. Seguono una serie di lavaggi in acqua corrente e acido cloridrico (HCl 0,5%) e la successiva colorazione in eosina (fa risultare rosa le componenti acidofile, come mitocondri e proteine cellulari) al 1% per 3 minuti. Dopo il risciacquo finale ed il montaggio in Eukitt, il rapporto cellulare granulociti ialinociti viene misurato tramite microscopia ottica; il numero dei granulociti (cellule rosa con pseudopodi) e degli ialinociti (cellule viola, con un nucleo evidente) vengono contati su un totale di 200 cellule.

Il grado di danneggiamento al DNA è stato valutato nell'emolinfa dei mitili attraverso il *test della cometa*. Gli emociti sono stati prelevati dal muscolo adduttore posteriore e per ogni sito sono stati

analizzati 5 individui in replicato. Le cellule lavate in buffer salino (12.5 mM KCl; 0.5 M NaCl; 20 mM Hepes; 10 mM EDTA) e portate alla concentrazione di  $40 \times 10^4$  cellule  $\times$  ml<sup>-1</sup>, sono state incluse entro un triplice strato di agarosio a basso punto di fusione, allestito su vetrini da microscopia pretrattati con agarosio a punto di fusione normale. I vetrini così allestiti sono stati immersi per 90 minuti in una soluzione di lisi cellulare (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Trizma-base; 1% Triton X-100 e 10% DMSO), 4°C, al buio, pH 10 e sottoposti a denaturazione alcalina (75 mM NaOH; 1 mM EDTA a pH > 12 per 10 minuti) e a corsa elettroforetica (1V/cm per 10 minuti, a 4°C, al buio). Dopo lavaggio di 10 minuti in soluzione di neutralizzazione (400 mM TRIS HCl, pH 7.5) e fissaggio in metanolo (3 min, a -20°C), i vetrini sono stati colorati con il 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), colorante fluorescente specifico per il DNA. L'entità della frammentazione del DNA è stata misurata per via microscopica; attraverso l'utilizzo di un software appropriato, Image Pro-Plus 6.2, sono stati creati dei mosaici di foto, costituiti dalle fotografie di circa 70 nuclei, che sono stati successivamente analizzati con il programma di analisi di immagine CometScore 1.5. La quantificazione della perdita di integrità strutturale del DNA valutata attraverso tale programma viene espressa come percentuale di DNA nella coda su una media di 70 nuclei analizzati per singolo vetrino.

La *frequenza dei micronuclei* (MN), è stata determinata nelle sospensioni di emolinfa conservate in fissativo di Carnoy (acido acetico:metanolo 1:3), successivamente strisciate su vetrino da microscopia e colorate con un colorante specifico per il DNA, il 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI), alla concentrazione di 1  $\mu$ gml<sup>-1</sup>. Per il loro riconoscimento e conteggio i micronuclei vengono descritti come piccole strutture rotonde e ben definite, con una grandezza inferiore a un terzo del diametro del nucleo principale, completamente separati dal esso e posizionati sullo stesso piano ottico. La valutazione della frequenza di comparsa dei MN è effettuata attraverso l'osservazione con microscopio a fluorescenza e conta cellulare; Il numero di cellule da contare per singolo vetrino è  $\geq$  a 2000 e i risultati sono espressi come percentuale di cellule con micronuclei, su un totale di 1000 cellule contate. In alternativa alla colorazione con DAPI, la frequenza dei Micronuclei può essere misurata anche grazie alla colorazione di Gimsa che permette di visualizzare le cellule al microscopio ottico (Bolognesi *et al.*, 2004; ICES No 315, 2012).

### **3.3. Analisi statistiche ed elaborazione dei dati in un modello di analisi di rischio ecologico Weight Of Evidence (WOE)**

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software R-cran (<http://www.Rproject.org>). L'analisi della varianza (ANOVA) a una via è stata applicata per testare la significatività delle differenze nei risultati di bioaccumulo in *H. diversicolor*, nei mitili naturali e trapiantati, e quelle dei biomarker nei mitili naturali e trapiantati. L'omogeneità della varianza è stata verificata mediante il test di Cochran C e l'analisi *post-hoc* (Newman-Keuls) ha permesso di verificare la significatività

delle differenze tra le diverse stazioni. Per quanto riguarda l'abbondanza del macrozoobenthos, il test del *t* di Student è stato effettuato tra i valori ottenuti per ciascun sito rispetto a quelli dei punti di riferimento campionati ad una distanza di 1000 metri dalle piattaforme (95% di confidenza). Le Analisi multivariate sono state condotte sia in termini di Analisi delle Componenti Principali (PCA) che come “non-metric Multi Dimensional Scaling (nMDS)”. L'analisi PCA è stata applicata ai dati di bioaccumulo e dei biomarker ottenuti per i mitili naturali e trapiantati, per osservare, in uno spazio bidimensionale, la distribuzione delle diverse popolazioni. La funzione metaMDS ottenuta dal pacchetto Vegan R (Oksanen *et al.*, 2011) è stata applicata ai dati di abbondanza delle comunità bentoniche per osservare, in funzione della loro similarità, le distanze tra i campioni di ogni piattaforma e la distribuzione dei campioni tra le tre piattaforme in una rappresentazione grafica.

Tutti i dati sono stati infine elaborati in un modello di analisi di rischio (SediquaSoft) basato su un approccio quantitativo del tipo Weight Of Evidence (WOE), in grado di integrare i risultati ottenuti da diverse tipologie di indagine (o linee di evidenza, LOEs), nella valutazione di rischio ecologico. Il modello SediquaSoft è stato recentemente sviluppato per una sua specifica applicazione alla valutazione della qualità e del rischio ecologico associato a sedimenti ed ambienti inquinati (Piva *et al.*, 2011; Benedetti *et al.*, 2012).

Questo modello contiene specifici algoritmi e diagrammi di flusso che, sulla base di precisi obiettivi ed assunzioni da giudizio esperto, permettono di applicare criteri di integrazione ponderata ad ampi data-sets di dati ottenuti da 5 linee di evidenza: caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE-1), biodisponibilità dei contaminanti in organismi bioindicatori (LOE-2), effetti subletali misurati tramite batterie di biomarker (LOE-3), effetti tossici misurati tramite applicazione di saggi ecotossicologici (LOE-4), analisi delle comunità bentoniche (LOE-5). Ciascuna linea di evidenza è stata sviluppata all'interno di un singolo modulo in grado di fornire per ciascuna tipologia di dati, sia un indice quantitativo di pericolo (HQ, Hazard Quotient), che un giudizio sintetico del livello di pericolo (suddiviso in 5 classi da assente a molto alto). Queste procedure di calcolo sono state ulteriormente sviluppate all'interno di un Software dedicato che, nonostante l'elaborazione di dati complessi in indici sintetici, mantiene tuttavia informazioni di grande importanza e valore scientifico utili per eventuali approfondimenti. Il modello SediquaSoft prevede poi un modulo di elaborazione finale WOE che integra le diverse linee di evidenza, dando un peso diverso in funzione della loro rilevanza ai fini dell'indagine, per arrivare alla valutazione sia quantitativa che qualitativa del Rischio Ecologico. I principali criteri scientifici e i relativi flow-charts sviluppati per le 5 LOEs nell'ambito del modello SediquaSoft sono di seguito riportati.

#### LOE1-Caratterizzazione chimica dei sedimenti

Per la elaborazione dei dati relativi alle concentrazioni delle sostanze chimiche nei sedimenti, i criteri di integrazione ponderata elaborano un indice di pericolo complessivo che, nei confronti di

diversi riferimenti normativi o standard di qualità ambientale (SQA) per i sedimenti, considera il numero dei contaminanti che eccedono il riferimento specifico, la pericolosità di tali parametri, e l'entità degli sforamenti rispetto ai limiti previsti. Viene dunque abbandonata la logica del mero superamento del valore tabellare, anche minimo e da parte di un unico parametro, come principio fondamentale per la classificazione chimica.

Tutti i parametri chimici di cui è prevista l'analisi, hanno un "peso" (da 1 a 1.3) a seconda che non siano contemplati dalla Direttiva 2013/39/UE (peso 1), o che al contrario siano inseriti nella lista delle sostanze "prioritarie" (peso 1.1) o in quella delle sostanze "pericolose e prioritarie" (peso 1.3). Il diverso peso assegnato ai vari composti ha lo scopo di conferire una maggiore rilevanza nella classificazione chimica dei sedimenti alla variazione di quegli inquinanti che siano caratterizzati da una più elevata tossicità, tendenza al bioaccumulo e persistenza nell'ambiente.

L'elaborazione dei dati chimici inizia con il confronto delle concentrazioni misurate per ciascun parametro rispetto ai valori indicati nei riferimenti normativi o SQA adottati in funzione dell'obiettivo di protezione scelto. In questo studio i riferimenti utilizzati per i vari parametri chimici sono quelli relativi agli Standard di Qualità Ambientale riportati nel D. Lgs 172/2015, ed i limiti L1 e L2 previsti dal DM 173/2016 sulla caratterizzazione e classificazione della qualità dei sedimenti marini soggetti ad attività di movimentazione. In funzione del riferimento, per ciascun parametro chimico analizzato, viene calcolata la variazione rispetto al limite, ovvero il Ratio To Reference (RTR) (equazione 3 del flow-chart di Figura 5); il valore di RTR viene corretto in funzione del "peso" del contaminante per ottenere un valore di RTRw (equazione 4), al fine di enfatizzare l'importanza delle variazioni osservate per i contaminanti più pericolosi. Il calcolo dell'indice di pericolo quantitativo (Hazard Quotient), specifico per la caratterizzazione chimica dei sedimenti (HQ<sub>C</sub>), è ottenuto dalla media di tutti gli RTRw dei parametri con RTR ≤ 1 (cioè valori inferiori rispetto al limite del riferimento), addizionato con la sommatoria  $\Sigma$  degli RTRw di tutti i contaminanti con RTR > 1 (equazione 5), dove N e M sono il numero dei parametri con RTR rispettivamente ≤ o > 1, mentre j e k sono indici che permettono di ripetere il calcolo per N o M volte.

Con tale procedura di calcolo, l'indice di pericolo chimico (HQ<sub>C</sub>) varia in funzione del numero di parametri che superano i riferimenti (i cui RTRw sono addizionati nella sommatoria  $\Sigma$ ), dell'entità del superamento e della tipologia dei contaminanti. La scelta di non calcolare l'HQ<sub>C</sub> come media degli RTRw di tutti i parametri chimici analizzati (indipendentemente dalle loro variazioni), permette di evitare che il pericolo chimico legato ad alcuni contaminanti possa essere abbassato dall'analisi di molti altri composti che non superano i propri limiti e che, nel calcolo di un valore mediato, andrebbero a "diluire" il contributo di poche sostanze. In assenza di parametri che superano i propri limiti normativi, l'indice HQ<sub>C</sub> è in grado di discriminare anche sedimenti solo moderatamente inquinati, con parametri che presentano concentrazioni vicine ai valori di riferimento.

L'indice chimico  $HQ_C$  è assegnato ad una classe di pericolo (da assente a molto alto), identificata da un diverso colore: Assente/bianco se  $HQ_C < 0.7$ ; Trascurabile/verde se  $0.7 \geq HQ_C < 1.3$ ; Basso/azzurro se  $1.3 \geq HQ_C < 2.6$ ; Medio/giallo se  $2.6 \geq HQ_C < 6.5$ ; Alto/rosso se  $6.5 \geq HQ_C < 13$ ; Molto Alto/nero se  $HQ_C \geq 13$  (equazione 6). Poiché la procedura di calcolo non cambia in funzione del tipo di riferimento scelto per il confronto, i dati chimici vengono elaborati contemporaneamente per ottenere un valore di  $HQ_C$  ed una classe di pericolo chimico nei confronti di più riferimenti (es. SQA, L1 e L2).

L'analisi della varianza (ANOVA) a una via è stata applicata per testare la significatività delle differenze tra i valori di  $HQ_C$  elaborato per i campioni di sedimento in funzione della distanza dalla piattaforma e della disposizione geografica dei transetti.

### LOE2-Bioaccumulo

L'elaborazione dei dati di biodisponibilità è fondamentale in quanto permette di stabilire il pericolo associato al possibile trasferimento di contaminanti ambientali al comparto biotico. Nel calcolo del pericolo biodisponibilità ( $HQ_{BA}$ ), per ciascun parametro viene calcolata la variazione di concentrazione rispetto ai controlli (RTR), corretta ancora una volta in funzione della tipologia del contaminante e della significatività statistica delle differenze (RTRw). La significatività statistica della variazione rispetto ai controlli viene pesata applicando il coefficiente Z, calcolato in funzione del valore ottenuto dal test T per dati con varianza disomogenea (punto 4 del flow chart di Figura 6). Il coefficiente Z ha un valore pari a 1 (nessuna riduzione dell'effetto) quando il campione risulta significativamente diverso dal controllo ( $p < 0.05$ ), mentre decresce con il diminuire della significatività, passando in maniera lineare da 1 a 0.5 quando  $p$  cresce da 0.05 a 0.06; per valori di  $p$  superiori a 0.06, il coefficiente Z diminuisce rapidamente in maniera non lineare fino a 0.2 quando  $p$  tende a 1. Questa correzione riduce progressivamente il peso complessivo di un parametro la cui variazione media non sia statisticamente significativa, ma non ne elimina completamente il contributo al calcolo dell' $HQ_{BA}$ .

A seconda dell'entità della variazione, che considera anche la variabilità naturale delle concentrazioni tissutali dei contaminanti, i singoli parametri analizzati vengono attribuiti a una di 5 classi di effetto (da assente a molto alto): da assente a lieve se  $RTRw < 2.6$ , moderato se  $2.6 \leq RTRw < 6.5$ , elevato se  $6.5 \leq RTRw < 13$ , e molto alto se  $RTRw \geq 13$ . Il valore cumulativo di  $HQ_{BA}$  viene poi calcolato senza considerare i parametri con  $RTRw < 1.3$  (effetto assente), facendo la media per quelli con  $RTRw$  tra 1.3 e 2.6 (effetto basso), e sommando ( $\Sigma$ ) tutti gli  $RTRw > 2.6$  (effetti medio, alto e molto alto): in funzione della distribuzione % dei parametri nelle varie classi di effetto, il modello indica la classe complessiva di pericolo per la biodisponibilità.

### LOE3-Biomarker

Il modulo sulle analisi dei Biomarker può elaborare i risultati ottenuti da un'ampia lista di biomarker tra quelli maggiormente utilizzati dalla comunità scientifica. A ciascun biomarker è associato un peso diverso (tra 1 e 3) a seconda della rilevanza biologica della risposta e del livello di conoscenze sui meccanismi coinvolti; per ciascun biomarker inoltre, in funzione della specie e del tessuto, è stabilita anche una soglia di variazione biologicamente significativa (*Threshold*) che tiene conto delle possibili risposte bi-fasiche di certi biomarker che possono essere sia indotti che inibiti. Per garantire un approccio multi-biomarker, il modello richiede alcuni requisiti minimi in termini di numero ed importanza dei biomarker analizzati. Per calcolare l'indice cumulativo di pericolo per i biomarker  $HQ_{BM}$  (flow chart di Figura 7), la variazione misurata per ciascun biomarker è confrontata con la soglia specifica e corretta sia per l'importanza biologica della risposta, che per la significatività statistica della differenza rispetto al controllo applicando il coefficiente  $Z$  già descritto per l'elaborazione dei dati di biodisponibilità. Ogni biomarker è quindi assegnato ad una classe di effetto (da assente a molto alto) a seconda dell'entità della variazione rispetto alla soglia: assente o basso se  $E < 1$ , medio con  $E$  compreso tra 1 e 2, alto se  $E$  è tra 2 e 3, molto alto per i biomarker con  $E > 3$ . I risultati di tutti i biomarker sono diversamente pesati nel calcolo del pericolo cumulativo  $HQ_{BM}$ , che non considera il contributo dei biomarker con effetto assente o basso, calcola la media degli  $E_w$  per le risposte con effetto moderato e addiziona ( $\Sigma$ ) gli  $E_w$  delle risposte con effetto alto o molto alto. L'attribuzione di una di 5 classi di gravità deriva dalla distribuzione percentuale delle risposte dei biomarker nelle 5 classi di effetto. Il modello indica il numero di biomarker all'interno di ciascuna delle 5 classi, il valore di pericolo cumulativo  $HQ_{BM}$  e la classe di pericolo complessivo per i biomarker.

### LOE4-Saggi Ecotossicologici

I criteri di integrazione ponderata per i risultati ecotossicologici considerano aspetti importanti e caratteristiche specifiche dei saggi biologici utilizzati nella batteria, tra cui la rilevanza tossicologica della risposta biologica misurata, l'entità e la significatività statistica della differenza di effetto tra campione e controllo, la sensibilità della specie testata, la tipologia di esposizione (acuta o cronica) e la matrice testata. In questo senso, per ciascuno dei saggi previsti nelle diverse tipologie di batterie è prevista una "soglia" di effetto che rappresenta la variazione minima ritenuta biologicamente significativa per ciascuna condizione sperimentale, e dei "pesi" che vengono attribuiti a ciascun saggio in funzione della rilevanza biologica dell'end-point misurato, della durata dell'esposizione, della matrice testata.

Vengono di seguito descritti i passaggi e le procedure di calcolo per l'integrazione dei risultati e la formulazione del giudizio di tossicità di cui è riportato uno schema complessivo nella Figura 8:

- dopo la verifica dei dati, per ciascun saggio biologico viene calcolato l'effetto ( $E_i$ ), inteso come variazione percentuale dell'endpoint misurato e compensato tramite la correzione di Abbott rispetto alle variazioni osservate nel controllo (equazione 2 del flow chart di Figura 8);
- l'effetto  $E_i$  viene corretto in base alla significatività statistica della variazione rispetto ai controlli, applicando il coefficiente  $Z$  già descritto per l'elaborazione dei dati di biodisponibilità (punto 3). Questa correzione riduce progressivamente il peso complessivo di un saggio non statisticamente significativo, ma non ne elimina completamente il contributo alla batteria;
- ciascun effetto ( $E_i$ ) moltiplicato per il suo coefficiente  $Z$ , viene rapportato con la "soglia" specifica per quel saggio (equazione 4); l'effetto corretto ( $E_{iw}$ ) così ottenuto indica di quante volte la variazione misurata in un saggio supera quella ritenuta biologicamente rilevante;
- solo per determinati saggi, quando sia possibile ottenere un eventuale effetto ormetico, viene assegnato un valore di  $E_{iw}$  pari a 0 se l'effetto ormetico è  $< 40\%$ , 1.25 se l'effetto ormetico è  $> 40\%$  ma  $< 100\%$ , pari a 1.5 se l'effetto ormetico è  $> 100\%$ ;
- l'indice di pericolo complessivo della batteria di saggi ecotossicologici (Hazard Quotient,  $HQ_{Batteria}$ ) viene calcolato come sommatoria degli effetti pesati ( $E_{iw}$ ) dei singoli saggi (equazione 5 del flow-chart), ulteriormente corretti secondo il fattore  $W_2$  che corrisponde al prodotto dei pesi assegnati in funzione della rilevanza biologica dell'endpoint considerato, della rilevanza ecologica della matrice testata, della esposizione acuta o cronica degli organismi.
- Per l'attribuzione del livello di pericolo derivante dalla batteria di saggi ecotossicologici, il valore ottenuto per l'indice  $HQ_{Batteria}$  è normalizzato ad una scala compresa tra 0 e 10 (equazione 6), dove 1 corrisponde al valore di soglia della batteria (cioè il valore di  $HQ$  che si otterrebbe se tutti i saggi della batteria mostrassero un effetto pari alla rispettiva soglia) e 10 corrisponde al valore massimo della batteria (quando tutti i saggi mostrano il 100% di effetto). A seconda del valore dell' $HQ_{Batteria}$  normalizzato, il livello di pericolo ecotossicologico viene attribuito ad una classe di gravità (da assente a molto alto), identificata da un diverso colore: Assente/bianco se  $< 1$ ; Basso/azzurro se  $HQ_{Batteria} \geq 1$  e  $< 1.5$ ; Medio/giallo se  $HQ_{Batteria} \geq 1.5$  e  $< 3$ ; Alto/rosso se  $HQ_{Batteria} \geq 3$  e  $< 6$ ; Molto Alto/nero se  $HQ_{Batteria} \geq 6$  (punto 6 del flow chart della Figura 8).

### LOE5-Comunità bentoniche

Il modulo di elaborazione dei dati delle comunità bentoniche non prevede nessun indice aggiuntivo rispetto ai numerosi già presenti in letteratura. Dalla lista delle specie e del relativo numero di individui ritrovati, vengono calcolati in automatico i seguenti descrittori di comunità, indici di diversità tassonomica e indicatori ecologici:

#### - *Densità (N)*

Numero complessivo di individui all'interno del campione;

- *Ricchezza specifica (S)*

Rappresentata dal numero di specie presente all'interno di ogni campione;

- *Indice di Margalef (D) o ricchezza specifica*

L'indice di Margalef (Margalef, 1969) è la misura del numero di specie ( $S$ ) sul totale degli individui presenti  $N$ :

$$D = \frac{S - 1}{\ln(N)}$$

- *Diversità di specie o eterogeneità complessiva (H')*

Utilizzando l'indice di Shannon (Shannon e Wiener, 1963) dato dalla formula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i$$

Dove  $S$  è il numero totale di specie e  $P$  la frequenza dell' $i$ -esima specie.

Inoltre il modulo restituisce lo stato ecologico di qualità ( $EcoQ$ ) basato sull'indice di diversità di Shannon-Wiener proposto da Simboura e Zenetos ( $EcoQ_i$ ; Simboura e Zenetos, 2001) e quello proposto da Vincent ( $EcoQ_{II}$ ; Vincent, 2002);

- *Equidistribuzione (J)*

Calcolata tramite l'indice di Pielou (Pielou, 1969) che considera la ripartizione delle abbondanze degli individui all'interno delle specie presenti nel campione:

$$J = \frac{H'}{H'_{max}} = \frac{H'}{\log_2 S}$$

dove  $H'$  è dato dall'indice di Shannon e  $S$  è il numero totale di specie;

- *AMBI (ATZI Marine Biotic Index)*

L'indice AMBI (Borja *et al.* 2000) utilizzato per comunità di substrati molli, si basa sulla classificazione delle specie bentoniche in cinque gruppi ecologici che corrispondono a differenti livelli di sensibilità. L'indice considera la composizione del popolamento, assegnando ciascuna specie a un gruppo ecologico a seconda della sua sensibilità o tolleranza allo stress ambientale, consentendo di classificare, come richiesto dalla Direttiva 2000/60/EC, gli ambienti marini costieri.

La formula proposta da Borja *et al.* (2000) è la seguente:

$$AMBI = \frac{[(0 \times \%GI) + (1.5 \times \%GII) + (3 \times \%GIII) + (4.5 \times \%GIV) + (6 \times \%GV)]}{100}$$



dove *G*=specie sensibili; *GII*=specie indifferenti; *GIII*=specie tolleranti; *GIV*=specie opportuniste di secondo ordine; *GV*=specie opportuniste di primo ordine. Il valore di *AMBI* varia da 0 (ambiente non inquinato o disturbato), a 7 (ambiente estremamente inquinato, azoico).

- *M-AMBI*

L'indice *M-AMBI* (Muxika *et al.*, 2007) è un indice multimetrico che combina con una tecnica di analisi multivariata l'indice *AMBI*, l'indice di diversità di Shannon e l'indice di ricchezza specifica.

*M-AMBI* fornisce un indice che varia da 0 (stato ecologico cattivo) a 1 (stato ecologico elevato) e i valori di riferimento utilizzati per ciascuna metrica sono quelli previsti dal DM 260 del 2010.

- *BENTIX*

L'indice *BENTIX* (Simboura e Zenetos, 2002) è un altro indice per la valutazione dell'*EcoQ* e considera la sensibilità/tolleranza degli organismi al disturbo e la loro suddivisione in tre gruppi ecologici. Di seguito la formula per l'indice *BENTIX*:

$$BENTIX = \frac{[6 \times \%GI + 2 \times (\%GII + \%GIII)]}{100}$$

dove *G*: specie sensibili agli eventi di disturbo; *GII*: specie tolleranti all'inquinamento; *GIII*: include gli opportunisti di primo ordine.

Come per l'*AMBI*, il valore di *BENTIX* restituisce una classificazione del grado di inquinamento e dello stato ecologico.

- *BOPA (Benthic Opportunistic Polychaetes Amphipods Index)*

L'indice *BOPA* (Dauvin e Ruellet, 2007) è basato sul rapporto tra policheti opportunisti e anfipodi (ad eccezione del genere *Jassa*). Gli organismi vengono classificati a livello di famiglia non a livello di specie come gli indici precedenti. L'indice *BOPA* è calcolato come:

$$BOPA = \log \left[ \frac{f_p}{f_a + 1} + 1 \right]$$

dove *f<sub>p</sub>* è la frequenza dei policheti opportunisti; *f<sub>a</sub>* è la frequenza degli anfipodi.

il valore di *BOPA* è basso quando lo stato ambientale è buono, con poche specie opportuniste, e aumenta all'aumentare dell'arricchimento organico.

- *BITS (Benthic Index based on Taxonomic Sufficiency)*

Il *BITS* è un indice sviluppato da Mistri e Munari (2008) specificamente per le lagune costiere mediterranee ed è un indice che classifica gli organismi a livello di famiglia. La formula proposta da Mistri e Munari è la seguente:

$$BITS = \log \left[ \frac{6fI + fII}{fIII + 1} + 1 \right] + \log \left[ \frac{nI}{nII + 1} + \frac{nI}{nIII + 1} + \frac{0.5nII}{nIII + 1} + 1 \right]$$

dove *fi*, *fii* e *fiil* rappresentano il rapporto tra il numero di individui appartenenti a famiglie sensibili (*fi*), tolleranti (*fii*) ed opportuniste (*fiil*) sul totale degli individui raccolti nel campione, mentre *ni*, *nii* e *niii* rappresentano il numero di famiglie, sensibili (*ni*), tolleranti (*nii*) ed opportuniste (*niii*), presenti nel campione.

Il valore di BITS è nullo quando nel campione non sono presenti famiglie sensibili e tolleranti, mentre è elevato quando lo stato ambientale è buono con poche famiglie opportuniste.

La valutazione dell'*EcoQ* con BITS varia a seconda del tipo di substrato (sabbia o fango).

Questi indici sono stati elaborati con il modello SediquaSoft (Figura 9) partendo da una matrice di dati importata da excel che contiene il numero di individui per ogni specie e per ogni campione (Tabella II dell'Allegato 4). Il valore di ogni indice è stato calcolato per ciascuna replica e successivamente è stato calcolato il valore medio per tutti i campioni.

#### Elaborazione finale Weight Of Evidence WOE

I risultati ottenuti dalle singole LOEs vengono integrati nella fase finale attraverso un classico approccio WOE che attribuisce pesi diversi alle varie tipologie di dati. Dopo la normalizzazione degli indici di pericolo ad una scala comune (Figura 10), l'elaborazione complessiva WOE porta ad una caratterizzazione del rischio che fornisce sia un valore quantitativo che una assegnazione qualitativa ad un livello che va da assente a molto alto.

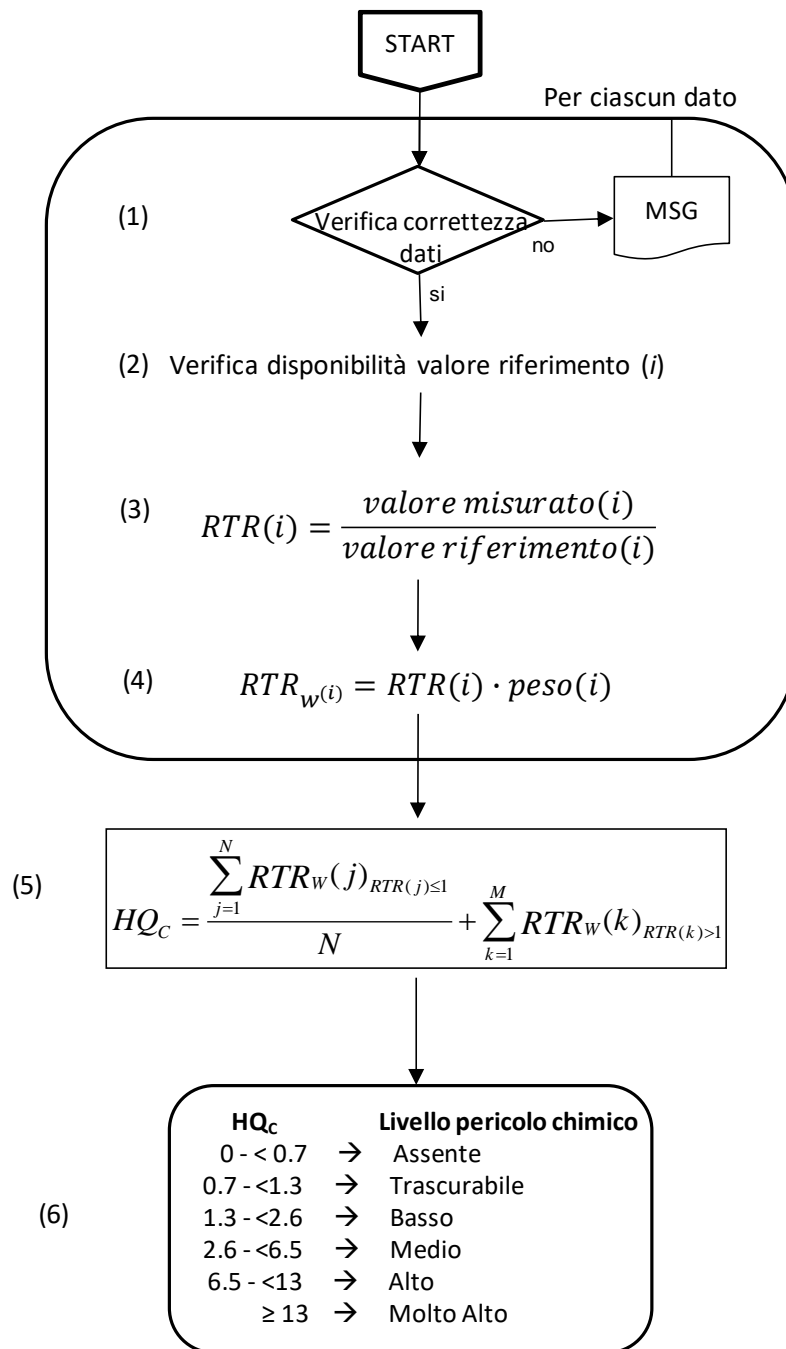


Figura 5 - Procedura per l'elaborazione dei dati di caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE 1).

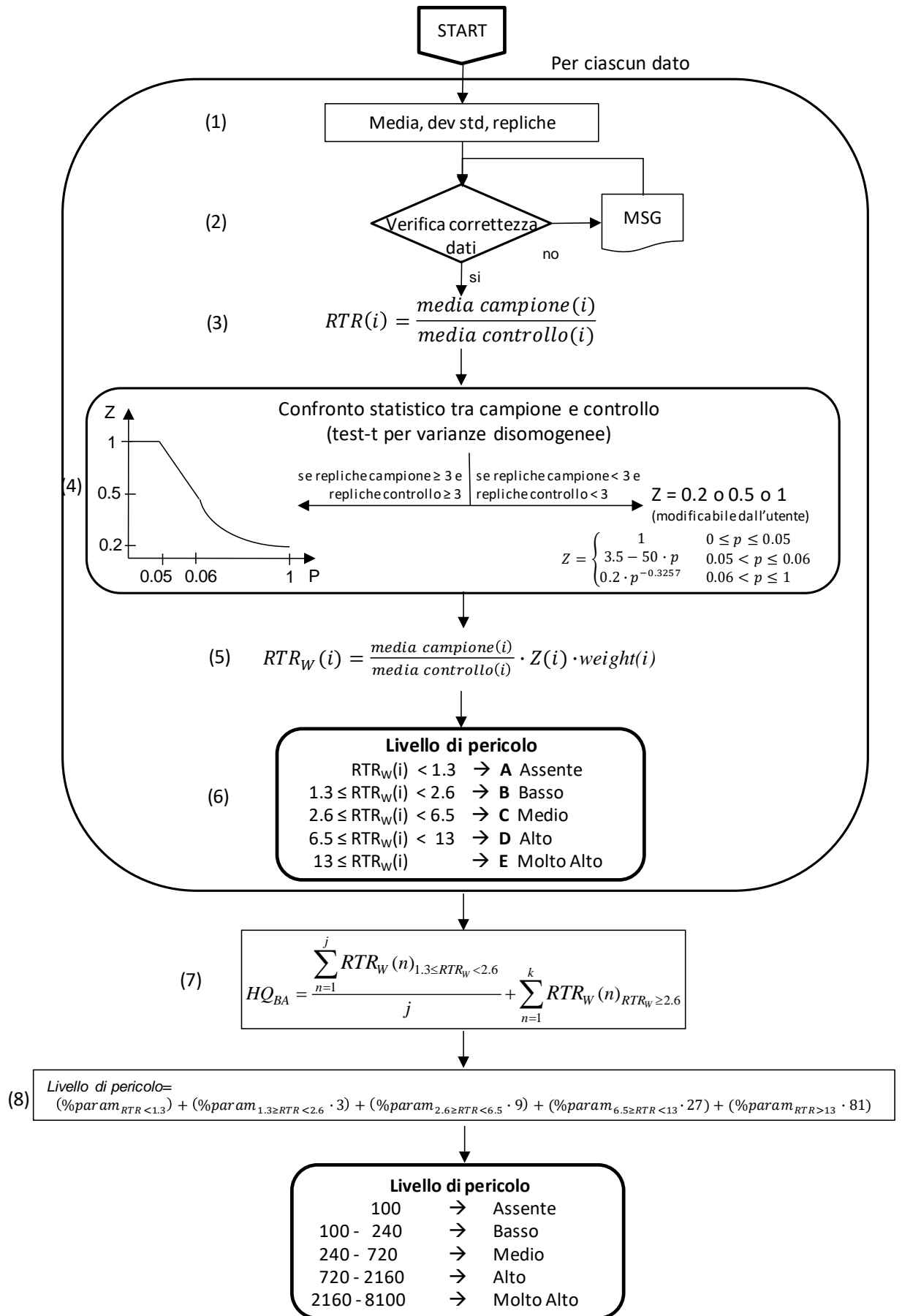


Figura 6. Procedura per l'elaborazione dei dati di bioaccumulo in organismi sentinella (LOE 2).

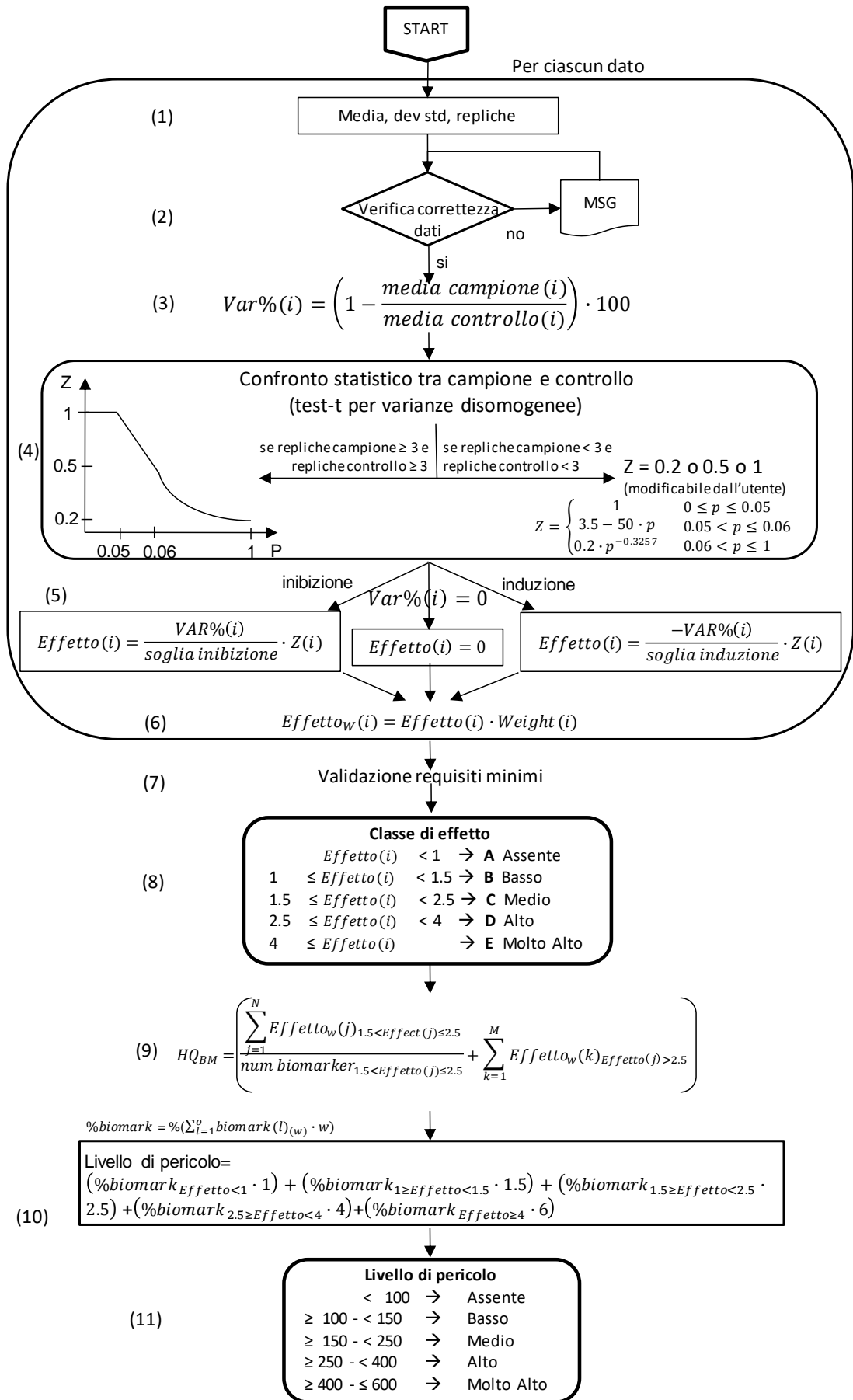


Figura 7. Procedura per l'elaborazione dei dati dei biomarker (LOE 3).

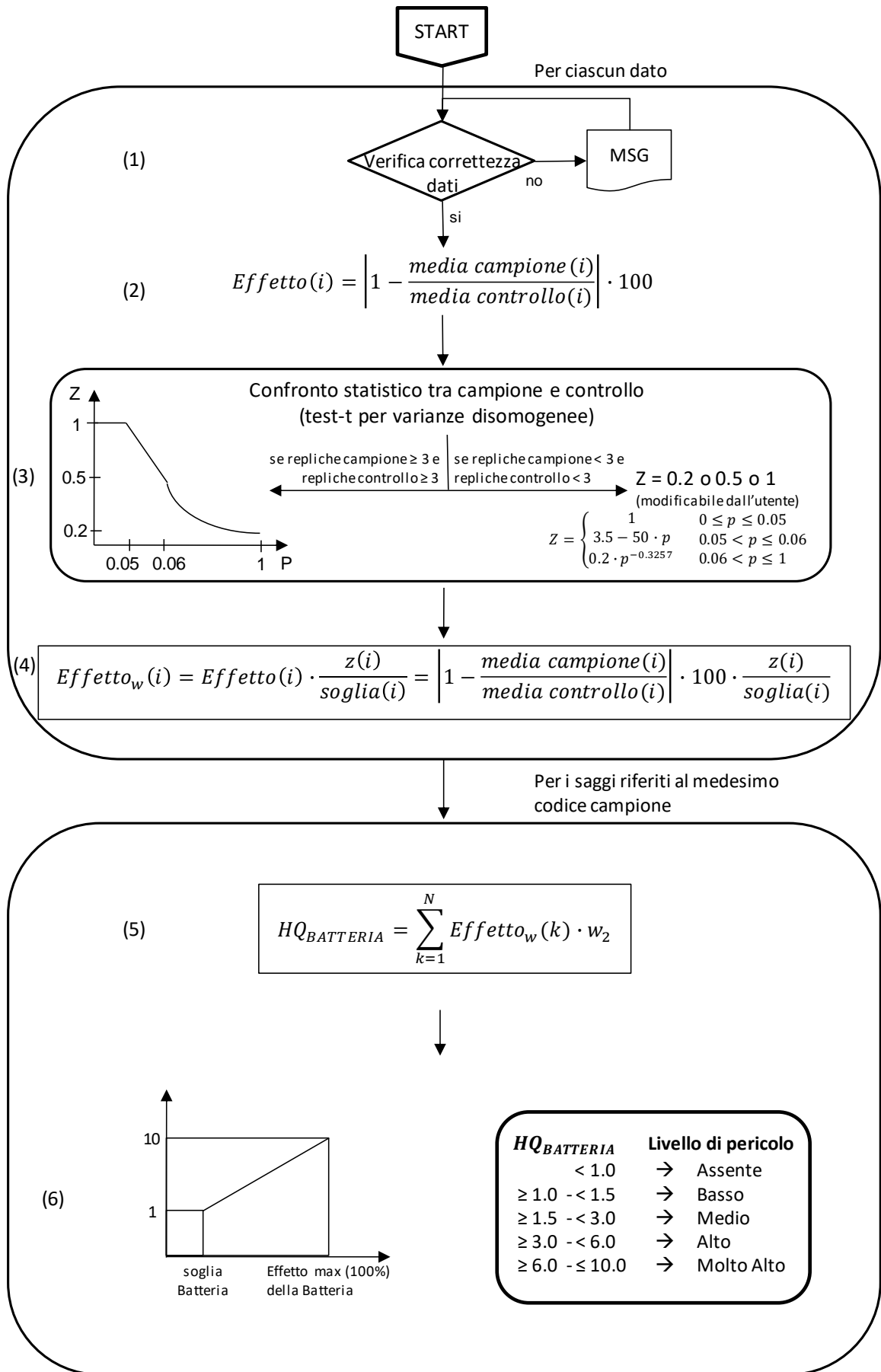


Figura 8. – Procedura per l'elaborazione dei dati dei saggi ecotossicologici (LOE 4).

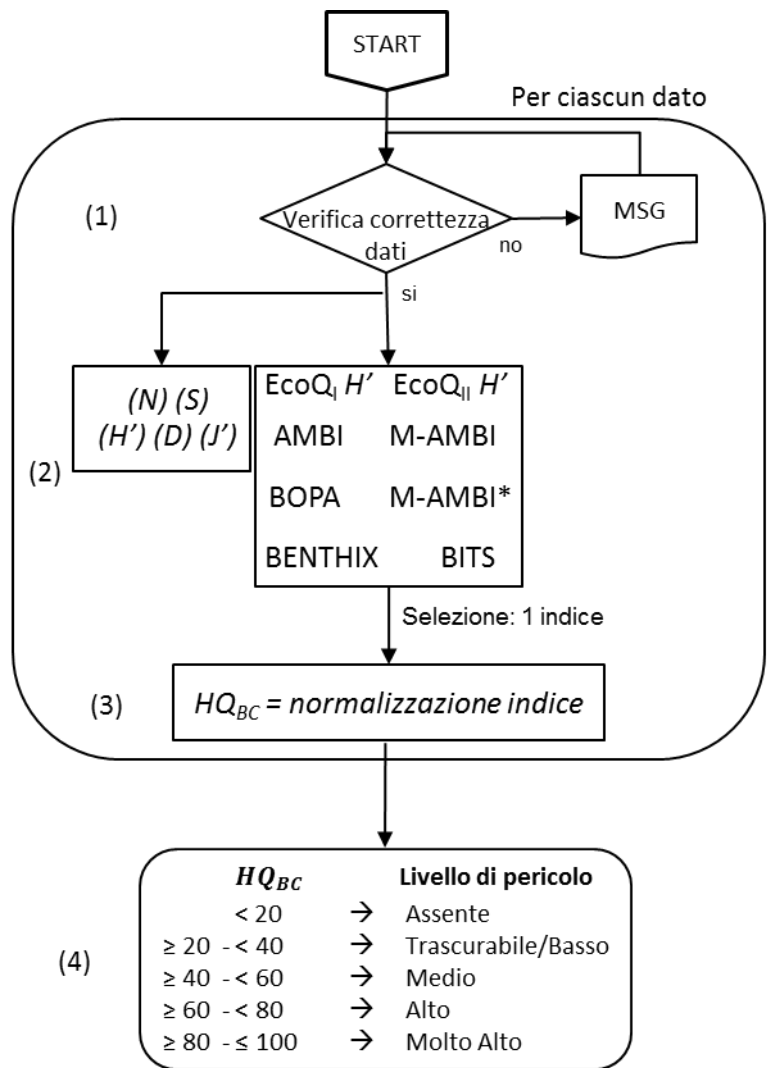


Figura 9. - Procedura per l'elaborazione dei dati delle comunità bentoniche (LOE 5).

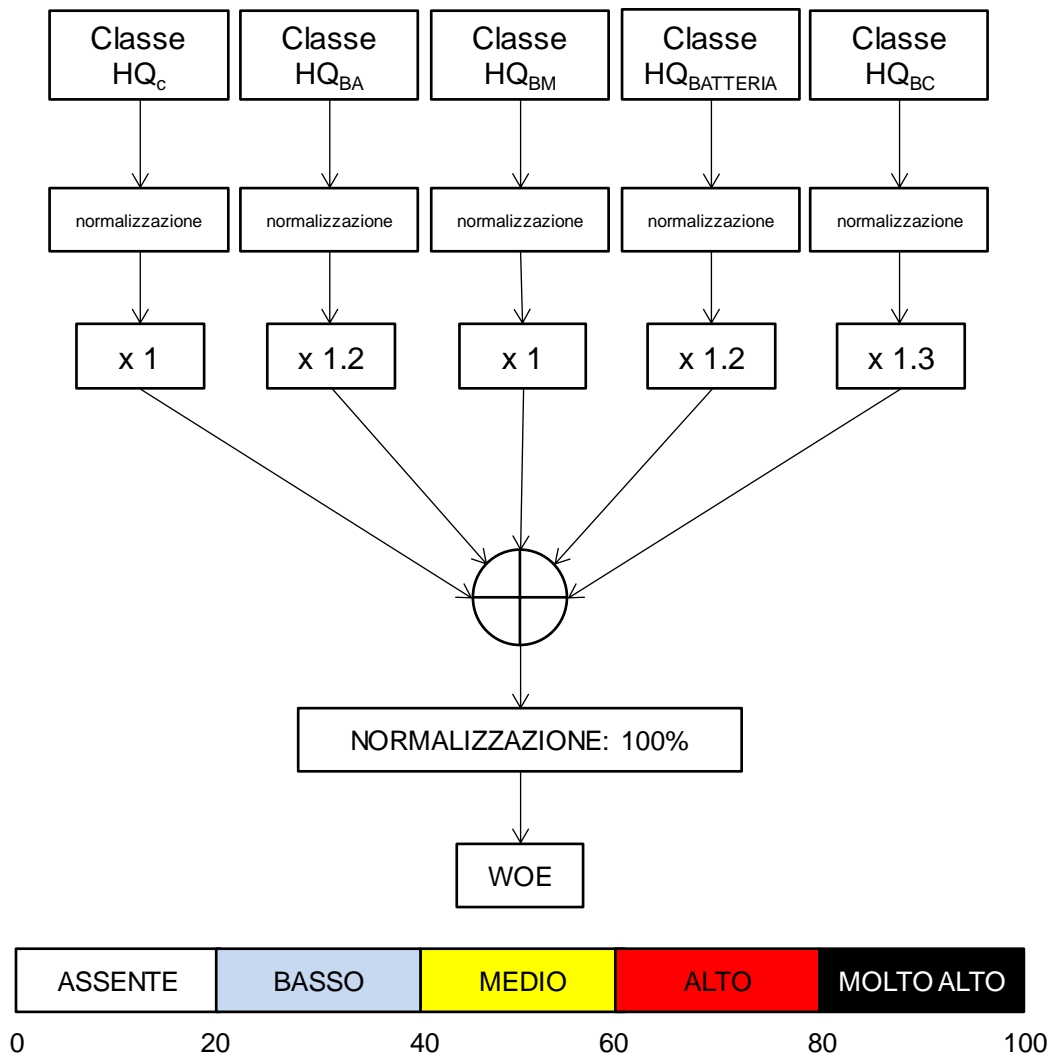


Figura 10. – Procedura per l'elaborazione finale WOE dai risultati delle singole LOE.



## 4. RISULTATI

### 4.1 SEDIMENTI DEL FONDO MARINO

#### 4.1.1 *Analisi dei parametri fisici e chimici dei sedimenti*

##### 4.1.1.1 *Caratteristiche granulometriche*

Nelle Figure 11 e 12 vengono riportati i risultati delle caratteristiche granulometriche dei sedimenti delle 3 piattaforme Rospo Mare-A, B e C, mentre tutti i risultati analitici sono stati riportati nelle Tabelle I-III dell'Allegato 2. In quasi tutte le stazioni considerate nelle tre diverse piattaforme, la pelite è la frazione granulometrica prevalente con una media del 75.6% e punte fino al 94.3% (RSM-A18), mentre solo poche stazioni presentano valori di pelite inferiore al 50% (ad esempio 39% in RSM-A 15) (Figura 11). Per quanto riguarda la ghiaia, questa frazione granulometrica è presente solamente in poche stazioni, tra cui le stazioni 4 e 8 della piattaforma RSM-A, la stazione 8 di RSM-B e la stazione 9 di RSM-C, ma con un contributo sempre inferiore al 3%. La percentuale delle sabbie ha il suo valore minimo nel campione RSM-A 16 (0.8%) e massimo nel campione RSM-A 8 (40 %) con una media complessiva del 4.9% (Figura 11).

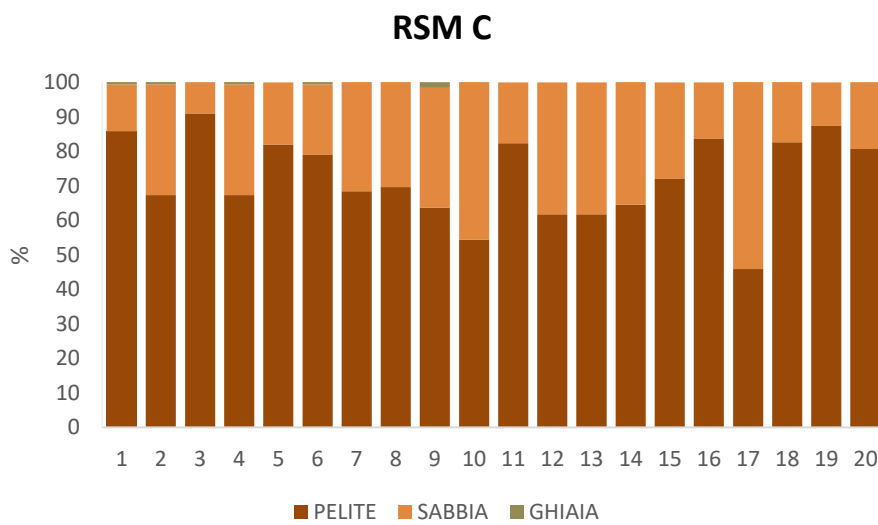
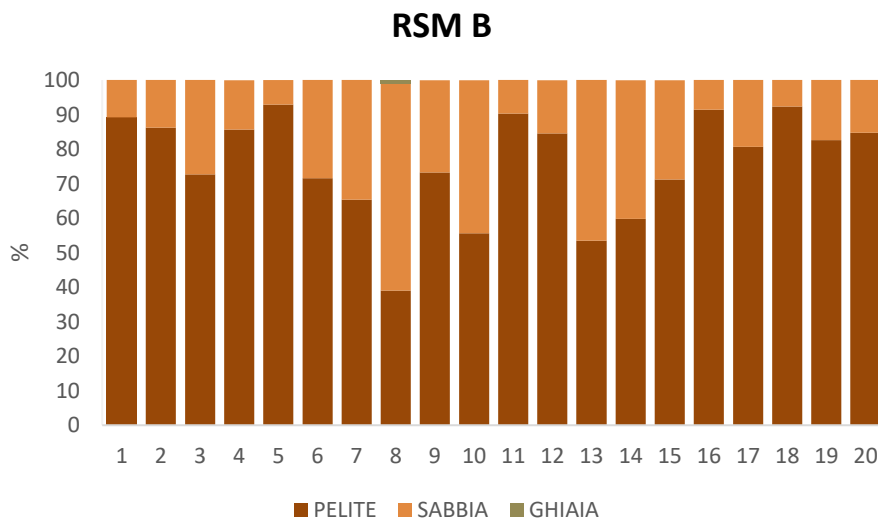
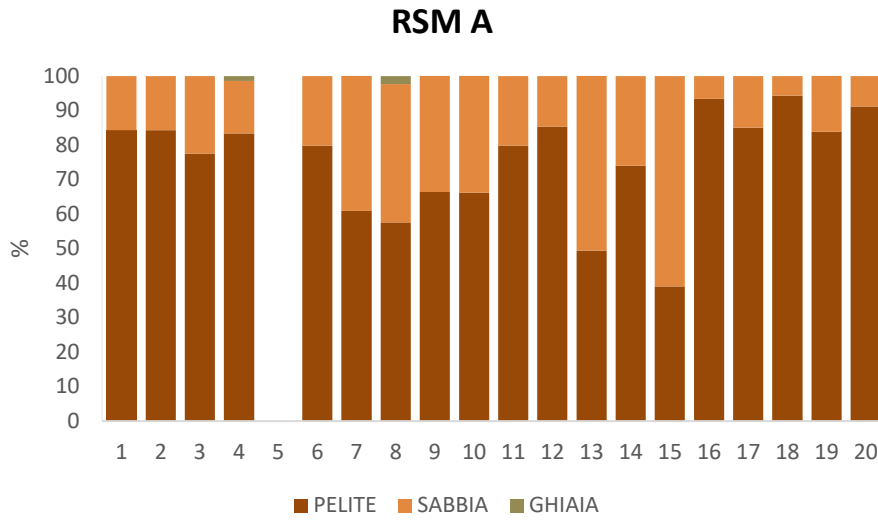


Figura 11. Percentuali di ghiaia, sabbia e pelite nei sedimenti delle piattaforme Rospo Mare-A (RSM A), Rospo Mare-B (RSM B) e Rospo Mare-C (RSM C).

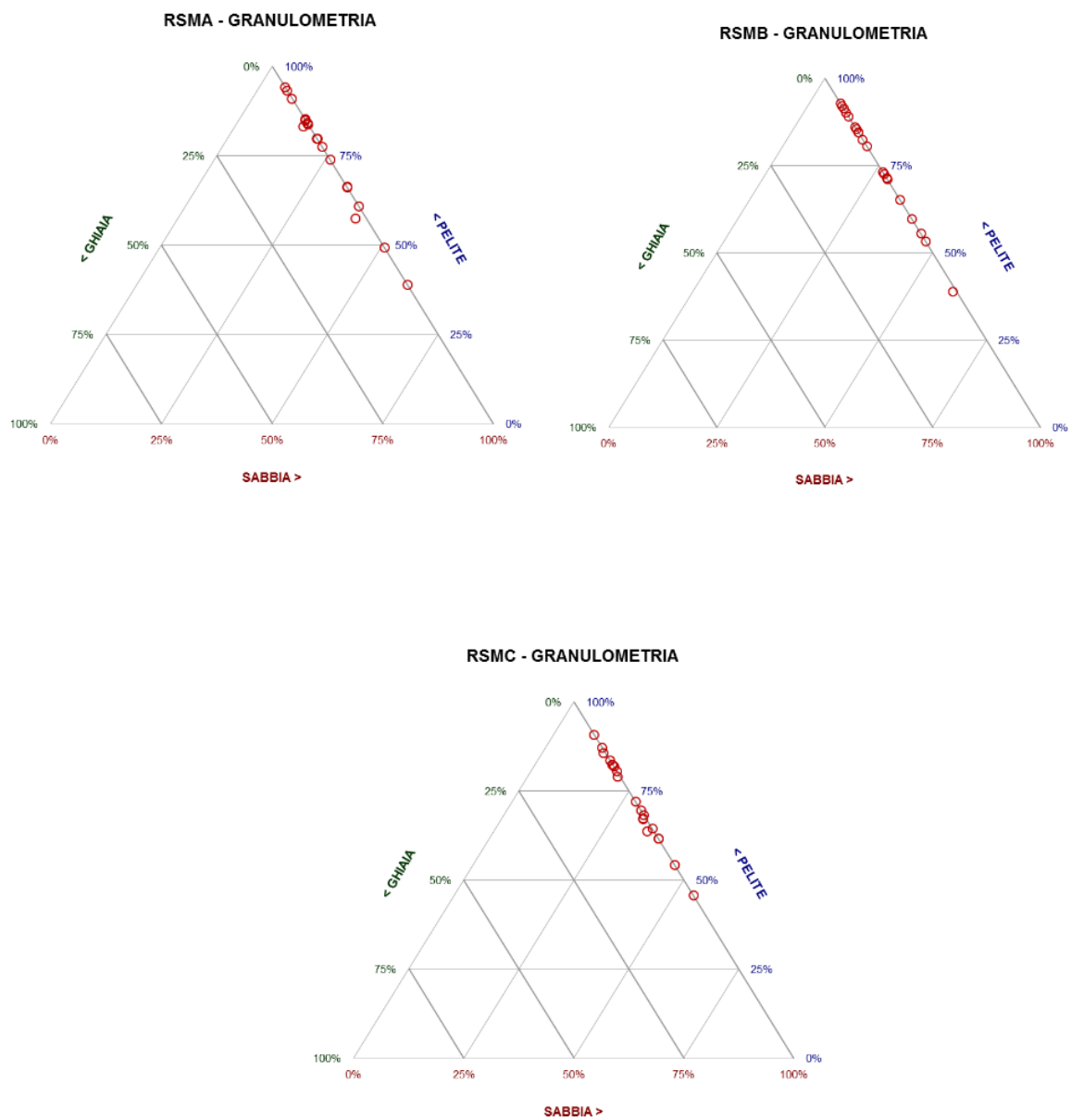


Figura 12. Diagramma della distribuzione di ghiaia, sabbia e pelite nei sedimenti delle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C.

#### 4.1.1.2 Sostanza organica (SO) e carbonio organico totale (TOC)

Di seguito vengono mostrati i risultati analitici relativi al contenuto di sostanza organica (SO) e carbonio organico totale (TOC) nei sedimenti delle 3 piattaforme del Campo Rospo Mare (Tabella 2). I valori di sostanza organica sono molto simili, da 2.4% a 6.3% con media di 3.1% in RSM-A, da 2.2% a 5.0% con media di 3.2% in RSM-B, da 2.2% a 11.1% con media di 3.5% in RSM-C. Analogamente i valori di carbonio organico totale sono piuttosto simili e variano tra circa 0.4% e 2.1% nei sedimenti di RSM-A (media 0.96%), tra 0.5% e 2.3% in quelli di RSM-B (media 0.84%) ed infine tra 0.5% e 2.7% in quelli di RSM-C (media 0.89) (Tabella 2).

Stazione	SO (%)			TOC (%)		
	RSM-A	RSM-B	RSM-C	RSM-A	RSM-B	RSM-C
1	2.95	2.54	2.83	1.10	1.40	1.10
2	2.38	2.68	2.48	1.20	1.30	1.20
3	2.78	2.43	2.75	0.96	0.85	0.62
4	2.47	2.21	2.25	0.87	0.62	1.00
5	-	5.04	3.41	0.81	0.62	0.52
6	6.34	3.70	3.08	0.67	0.69	2.70
7	3.46	3.92	3.37	0.65	2.10	1.30
8	2.98	3.80	4.40	1.60	0.68	0.47
9	3.24	2.61	2.33	0.48	0.54	0.60
10	2.38	2.29	2.27	1.60	0.49	0.67
11	3.06	3.41	2.80	0.55	0.61	0.58
12	2.80	2.84	3.11	0.61	0.67	0.57
13	2.68	3.27	11.13	0.42	2.30	0.64
14	2.74	2.58	2.47	2.10	0.54	0.61
15	3.11	2.25	2.18	0.63	0.53	0.92
16	2.52	2.41	2.73	0.70	0.49	0.57
17	3.19	4.32	5.58	1.60	0.63	1.90
18	2.78	3.72	3.01	0.72	0.54	0.59
19	4.12	4.76	3.74	1.10	0.77	0.54
20	2.72	2.77	3.03	0.85	0.52	0.61

Tabella 2. Contenuto di sostanza organica (SO) e di carbonio organico totale (TOC) nei sedimenti delle 3 piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C.

#### 4.1.1.3 Analisi chimiche di metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici nei sedimenti

I valori relativi alle concentrazioni dei vari metalli (Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, V, Zn), degli idrocarburi policiclici aromatici e degli idrocarburi alifatici misurati nei sedimenti intorno alle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C sono rappresentati nelle Figure 13-19, mentre tutti i valori analitici sono stati riportati nell'Allegato 3 (Tabelle I-IX).

Come si può osservare nella Figura 13, i valori di **alluminio** nei sedimenti prelevati in prossimità delle piattaforme Rospo Mare A (RSM-A) e Rospo Mare C (RSM-C) si aggirano rispettivamente tra 1.500-2.800 µg/g e 1.000-3.500 µg/g, mentre le concentrazioni misurate nei sedimenti prelevati dalla piattaforma Rospo Mare B (RSM-B) si attestano a valori significativamente più elevati, compresi tra 9.600 e 44.000 µg/g. Per quanto concerne l'**arsenico** nei sedimenti prelevati dalle piattaforme in esame, le concentrazioni sono risultate tutte piuttosto simili e comprese tra 2.8 e 4.9 µg/g (RSM-A), 3.2 e 6.0 µg/g (RSM-B), 2.4 e 4.9 µg/g (RSM-C). Anche il **bario** mostra valori confrontabili in tutta l'area investigata, con concentrazioni nei sedimenti attorno alle piattaforme che si attestano all'interno di un range di variabilità di 45-180 µg/g (RSM-A), 70-300 µg/g (RSM-B) e 16-270 µg/g (RSM-C).

La Figura 14 mostra i valori ottenuti rispettivamente per cadmio, cromo e rame nei sedimenti di RSM-A, RSM-B e RSM-C. Per quanto concerne il **cadmio**, i livelli misurati rientrano in un range di valori piuttosto simili, pari a 0.08-0.19 µg/g (RSM-A), 0.08-0.38 µg/g (RSM-B) e 0.07-0.15 µg/g (RSM-C): solamente il campione RSM-B03 presenta una concentrazione di cadmio lievemente superiore a 0.3 µg/g. Le concentrazioni di **cromo** sono pari a 30-45 µg/g nei sedimenti di RSM-A, 30-73 µg/g in quelli di RSM-B e 24-56 µg/g in quelli di RSM-C. I valori di **rame** oscillano tra 11 e 40 µg/g nei sedimenti di RSM-A e tra 9 e 27 µg/g in quelli di RSM-B e C.

I risultati di ferro, mercurio e manganese sono illustrati nella Figura 15. Per quanto riguarda il **ferro**, i valori ottenuti risultano omogenei in tutta l'area, con concentrazioni comprese tra 5.600 e 6.500 µg/g. Anche il **mercurio** mostra concentrazioni paragonabili, con livelli tra 0.03 e 0.09 µg/g nei sedimenti provenienti dalle piattaforme RSM-A, B e C. Range di variabilità tendenzialmente più ampi si possono osservare per il manganese con concentrazioni nei sedimenti comprese tra 330 e 380 µg/g in RSM-A, 320 e 740 µg/g in RSM-B, 480 e 690 µg/g in RSM-C; tali valori appaiono comunque uniformemente distribuiti attorno alle 3 piattaforme investigate.

I risultati relativi a nichel, piombo e vanadio, sono descritti nella Figura 16. Per quanto riguarda il **nichel**, le concentrazioni sono uniformi in tutta l'area investigata, pari a 14-30 µg/g, 14-25 µg/g e 5-23 µg/g nei sedimenti rispettivamente di RSM-A, B e C. Le concentrazioni di **piombo** sono 12-50 µg/g nei sedimenti di RSM-A, 14-85 µg/g in quelli di RSM-B, e 3-33 µg/g in quelli di RSM-C. I livelli di **vanadio** sono piuttosto simili ed uniformi in tutti i sedimenti prelevati nell'area del Campo Rospo,

con valori che si assestano tra 17 e 25 µg/g in RSM-A, 14 e 38 µg/g in RSM-B, 16 e 44 µg/g in RSM-C. I valori di **zinco** nei sedimenti evidenziano una certa variabilità, con range abbastanza estesi anche se simili nelle 3 piattaforme del Campo Rospo (Figura 17), pari a 9-100 µg/g (RSM-A), 9-140 µg/g (RSM-B) e 32-164 µg/g (RSM-C).

Come si può osservare nella Figura 18, gli **idrocarburi policiclici aromatici (IPA) a basso peso molecolare**, ovvero quelli caratterizzati da 2 o 3 anelli aromatici, risultano i congeneri predominanti, con concentrazioni che variano tra 40 e 150 ng/g nei sedimenti di RSM-A, tra 70 e 210 ng/g in quelli di RSM-B, e tra 45 e 200 ng/g in quelli di RSM-C, risultando quindi piuttosto simili ed uniformemente distribuiti all'interno dell'intera area investigata. Molto più bassi sono invece gli **IPA ad alto peso molecolare**, che comprendono i congeneri con 4 e 5 anelli aromatici; i valori misurati sono quasi sempre inferiori a 5 ng/g nei sedimenti delle tre piattaforme investigate, con le uniche eccezioni dei campioni RSM-A 01 (40 ng/g), RSM-C 9 (6 ng/g) e RSM-C 14 (10 ng/g). Gli **IPA totali** mostrano concentrazioni di 50-150 ng/g nei sedimenti di RSM-A, 75-215 ng/g in quelli di RSM-B, 50-200 ng/g in quelli di RSM-C. Anche per quanto riguarda i vari congeneri analizzati, questi risultano sempre piuttosto simili tra i vari campioni analizzati (Tabelle IV-VI dell'Allegato 3).

I risultati relativi agli **idrocarburi alifatici totali (C10-C40)**, possono essere osservati in Figura 19. Le concentrazioni risultano pari a 26-106 µg/g nei sedimenti prelevati da RSM-A, 18-65 µg/g in quelli di RSM-B e 27-80 µg/g in quelli di RSM-C. I range di variabilità sono confrontabili nell'intera area del Campo Rospo. Inoltre, i singoli congeneri degli idrocarburi alifatici mostrano delle distribuzioni simili in tutti i campioni analizzati ed in tutte tre le aree di provenienza (Tabelle VII-IX dell'Allegato 3); i composti C16-C22 contribuiscono da soli per il 40-50% dei livelli totali, mentre un ulteriore contributo del 20-30% è dato dai C36-C38.

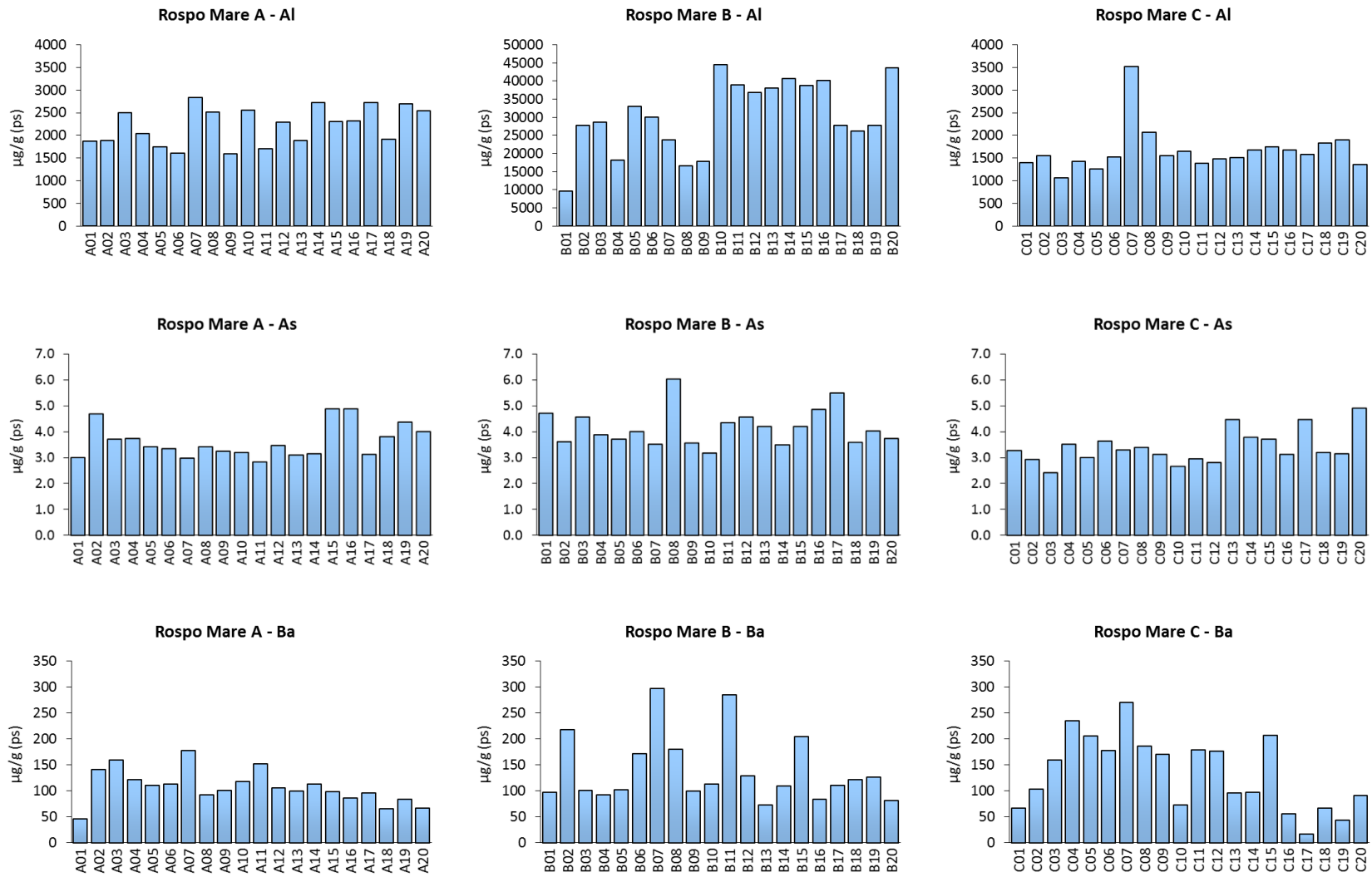


Figura 13. Concentrazioni di alluminio, arsenico e bario nei sedimenti prelevati in prossimità delle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C; valori espressi in µg/g di sostanza secca.

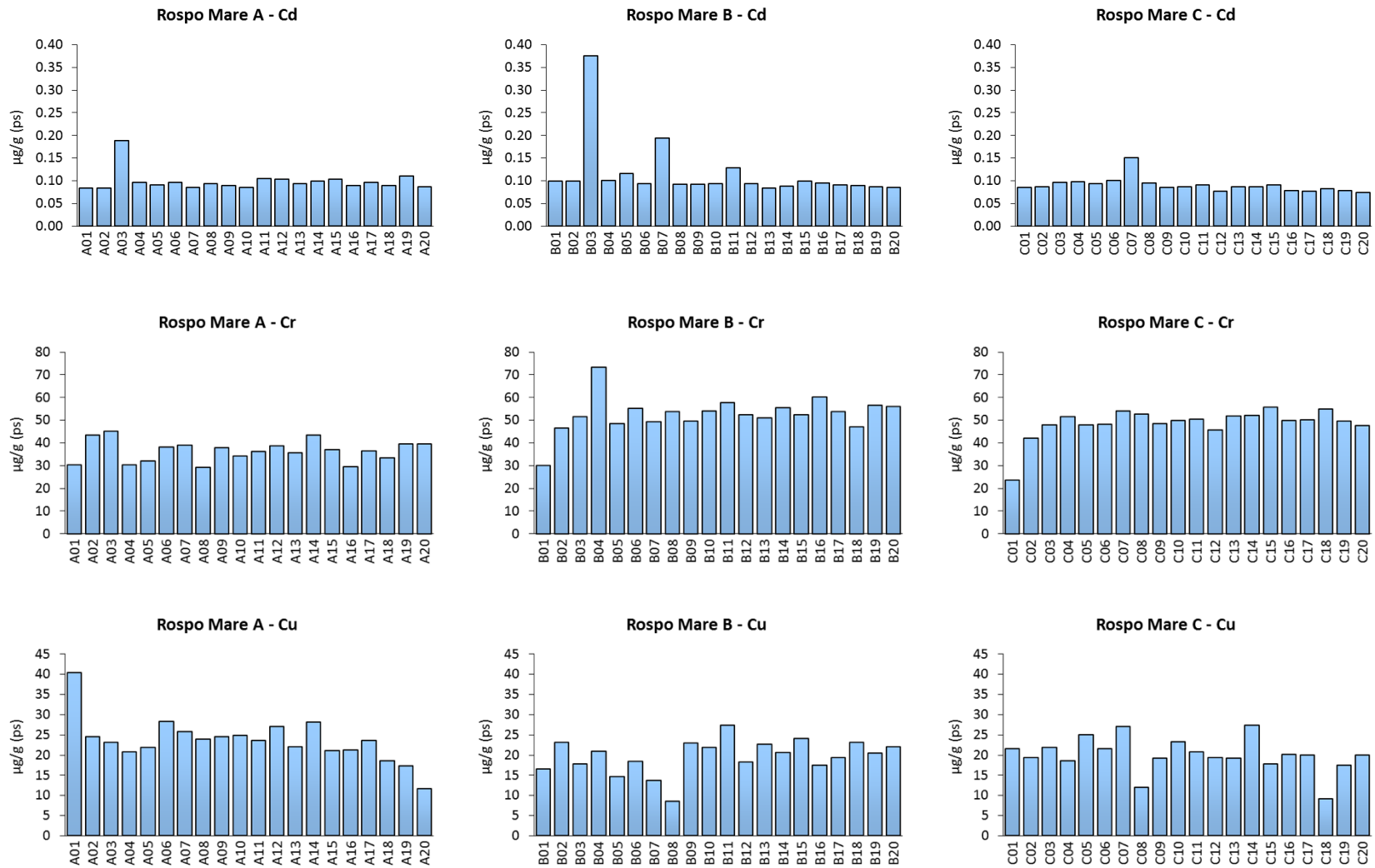


Figura 14. Concentrazioni di cadmio, cromo e rame nei sedimenti prelevati in prossimità delle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C; valori espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.



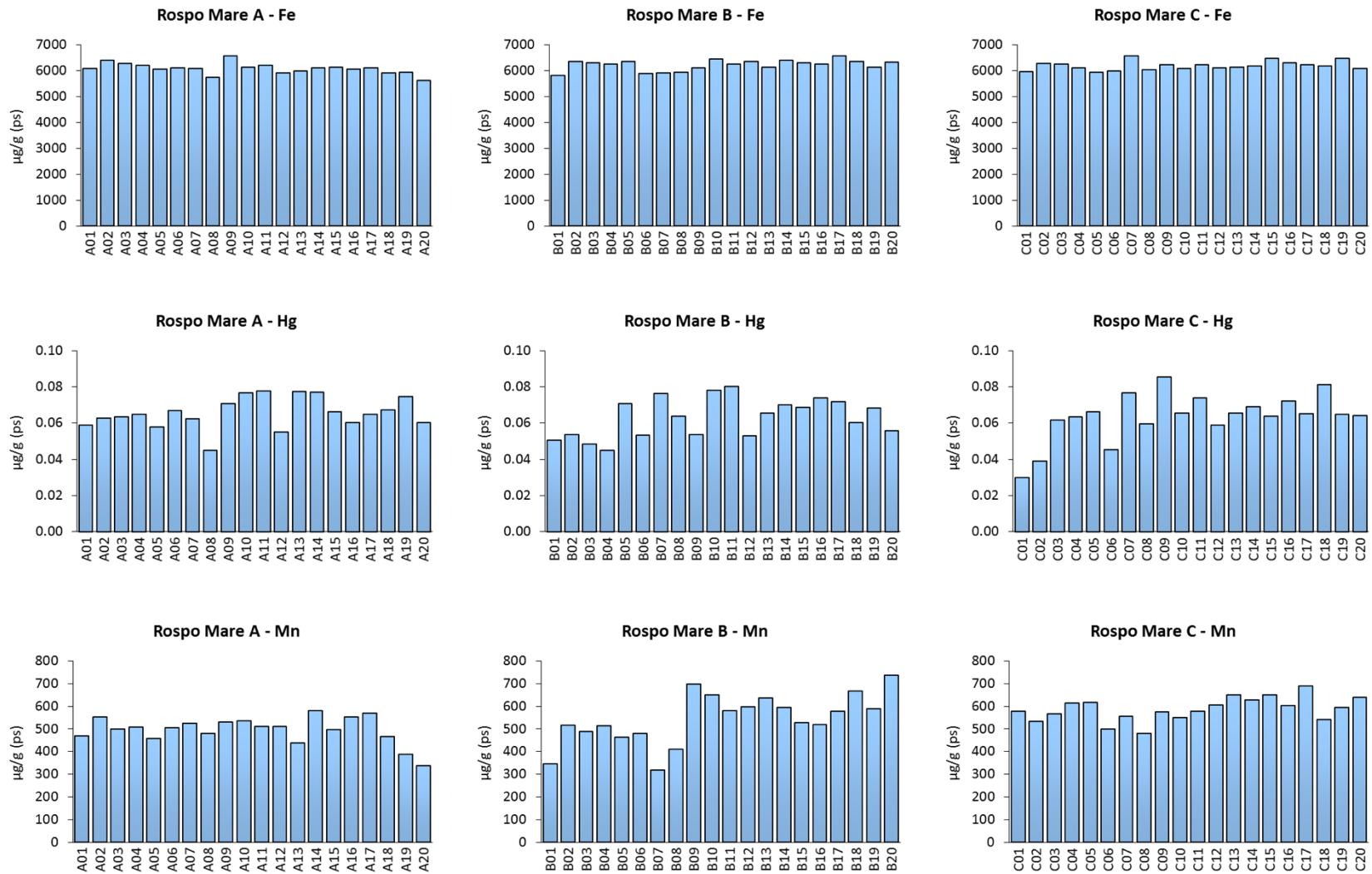


Figura 15. Concentrazioni di ferro, mercurio e manganese nei sedimenti prelevati in prossimità delle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C; valori espressi in µg/g di sostanza secca.

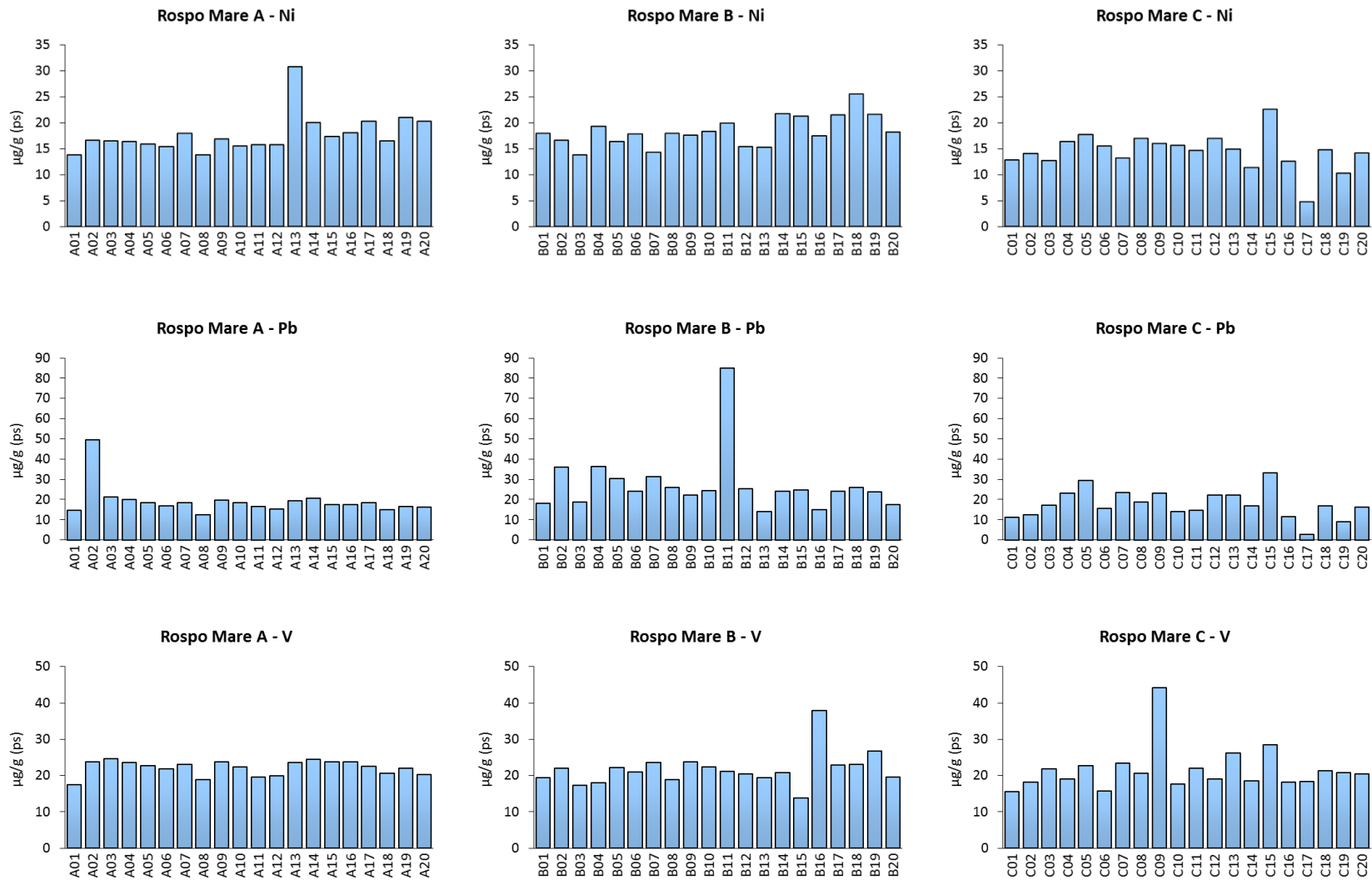


Figura 16. Concentrazioni di nichel, piombo e vanadio nei sedimenti prelevati in prossimità delle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C; valori espressi in µg/g di sostanza secca.

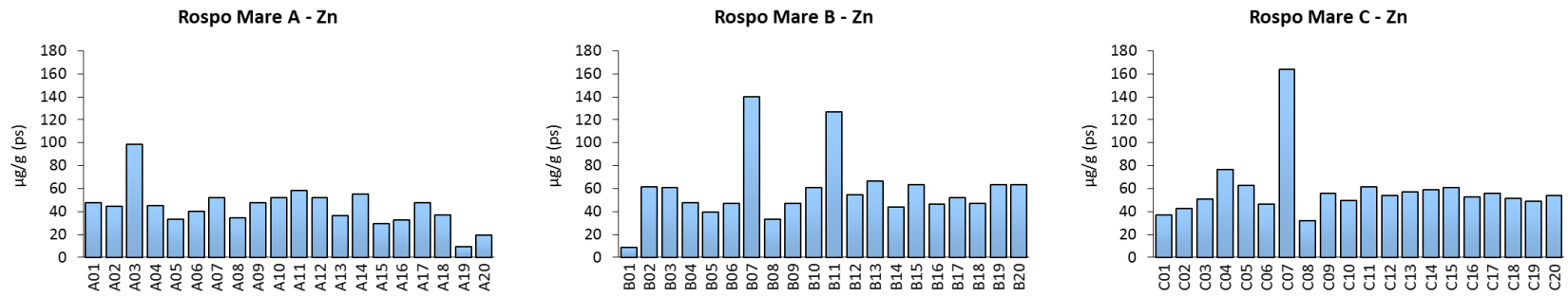


Figura 17. Concentrazioni di zinco nei sedimenti prelevati in prossimità delle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C; valori espressi in µg/g di sostanza secca.

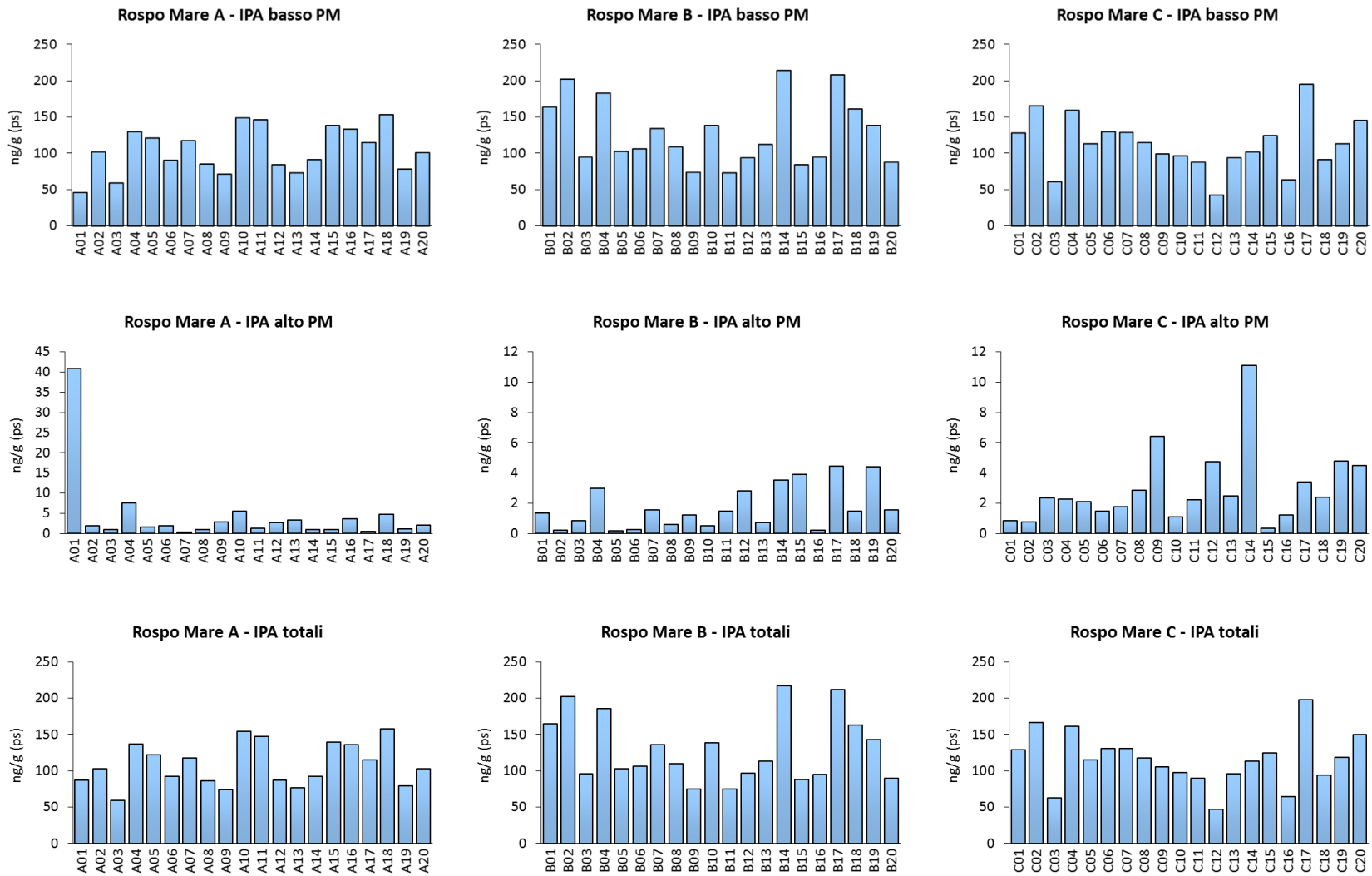


Figura 18. Concentrazioni di idrocarburi policiclici aromatici a basso peso molecolare, alto peso molecolare e totali, nei sedimenti prelevati in prossimità delle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C; valori espressi in ng/g di sostanza secca.

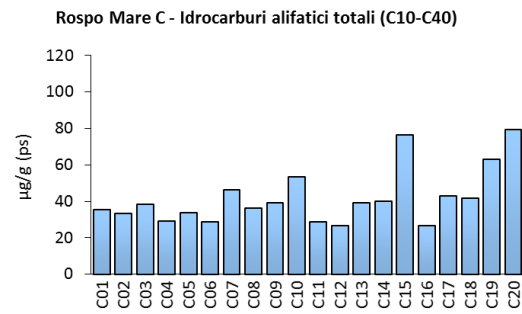
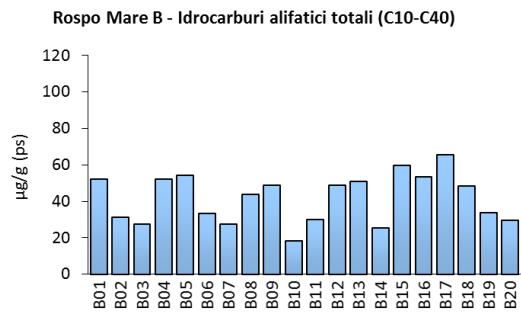
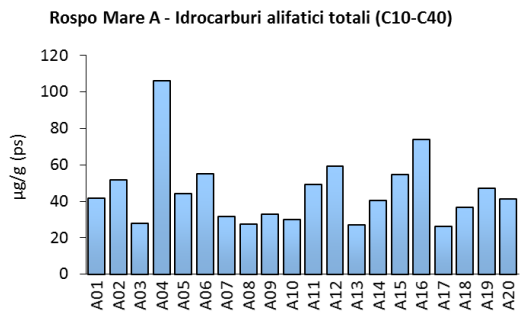


Figura 19. Concentrazioni di idrocarburi alifatici totali (C10-C40) nei sedimenti prelevati in prossimità delle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C; valori espressi in µg/g di sostanza secca.

Oltre alla presentazione dei risultati suddivisi per classi di composti chimici, uno degli aspetti innovativi di questo studio è stata l'applicazione di criteri di valutazione ponderata sulla caratterizzazione chimica dei sedimenti. Viene abbandonata la logica dell'approccio tabellare e del singolo (anche se lieve) superamento di un riferimento normativo, considerando invece i risultati nel loro complesso e dando un peso al numero dei parametri che sfiorano il valore di riferimento, all'entità di tali sforamenti e alla pericolosità dei composti in questione. I criteri di integrazione ponderata utilizzati sono gli stessi previsti nel recente DM 173/2016 per la caratterizzazione e la classificazione della qualità dei sedimenti marini soggetti a movimentazione. Come obiettivi di qualità sono stati considerati in questo studio quelli previsti dagli standard di qualità ambientale (SQA) del D. Lgs 172/2015, ed i valori L1 e L2 del DM 173/2016.

Come riportato nella Tabelle 3, 4 e 5, l'elaborazione complessiva di tutti i risultati nei confronti degli SQA (D. Lgs 172/2015) e di L1 (DM 173/2016) ha fornito una classe di pericolo da Assente a Basso in quasi tutti i campioni di sedimento delle tre piattaforme, con l'eccezione di 4 campioni di RSM-B (03, 04, 07, 11) ed un campione di RSM-C (07) dove è stata elaborata una classe Media. Interessante notare che in tutti questi casi, i composti che hanno fornito il contributo percentualmente superiore all'indice complessivo finale sono sempre stati metalli (Cd, Cr, Pb e Zn).

La classe di pericolo elaborata nei confronti di L2 (DM 173/2016) è risultata Assente per quasi tutti i campioni, con 2 sole eccezioni per RSM-B11 (Basso) e RSM-C07 (Trascurabile), (Tabelle 3, 4, 5, Figura 20 e schede di elaborazione dei dati dell'Allegato 8).

In Figura 21 viene riportata la distribuzione della classe di pericolo chimico elaborata nei confronti degli SQA (D. Lgs 172/2015), di L1 e L2 (DM 173/2016) per tutti i sedimenti campionati lungo i 4 semi-transetti delle 3 piattaforme. L'analisi statistica ha inoltre evidenziato che non vi sono differenze statisticamente significative tra i valori di HQ chimico elaborato per i campioni di sedimento in funzione della distanza dalla piattaforma, considerando sia 2 semi-transetti sulla stessa direttiva, che i 4 semi-transetti separati. Non vi sono inoltre differenze statisticamente significative nemmeno tra le singole piattaforme.

Sito	distanza (m)	Stazione	SQA (D.Lgs. 172/2015)		L1 (D.Lgs. 173/2016)		L2 (D.Lgs. 173/2016)	
			% max/RTR	Classe di pericolo	% max/RTR	Classe di pericolo	% max/RTR	Classe di pericolo
RSM-A	25	RSM A01	100% (Pb)	ASSENTE	100% (Cu)	TRASCURABILE	100% (Pb)	ASSENTE
	25	RSM A02		BASSO	100% (Pb)	BASSO		ASSENTE
	25	RSM A03		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	25	RSM A04		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	50	RSM A05		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	50	RSM A06		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	50	RSM A07		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	50	RSM A08		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	100	RSM A09		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	100	RSM A10		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	100	RSM A11		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	100	RSM A12		ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		
	250	RSM A13	100% (Ni)	BASSO	100% (Ni)	BASSO		ASSENTE
	250	RSM A14		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	250	RSM A15		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	250	RSM A16		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	1000	RSM A17		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	1000	RSM A18		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	1000	RSM A19		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	1000	RSM A20		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE

Tabella 3. Classi di pericolo chimico ottenute dalla elaborazione ponderata dei dati chimici di tutti i sedimenti della piattaforma RSM-A, in riferimento ai limiti degli SQA (D. Lgs 172/2015), L1 e L2 (DM 173/2016).

Sito	distanza (m)	Stazione	SQA (D.Lgs. 172/2015)		L1 (D.Lgs. 173/2016)		L2 (D.Lgs. 173/2016)			
			% max/RTR	Classe di pericolo	% max/RTR	Classe di pericolo	% max/RTR	Classe di pericolo		
RSM-B	25	RSM B01	100% (Pb)	ASSENTE	100% (Pb)	ASSENTE	100% (Pb)	ASSENTE		
	25	RSM B02		BASSO		BASSO		ASSENTE		
	25	RSM B03		61,2% (Cd)		MEDIO		61,2% (Cd)	MEDIO	ASSENTE
	25	RSM B04		52,3% (Cr tot)		MEDIO		52,3% (Cr tot)	MEDIO	ASSENTE
	50	RSM B05		100% (Pb)		BASSO		100% (Pb)	TRASCURABILE	ASSENTE
	50	RSM B06		100% (Cr tot)		BASSO		100% (Cr tot)	BASSO	ASSENTE
	50	RSM B07		100% (Pb)		BASSO		54,9% (Zn)	MEDIO	ASSENTE
	50	RSM B08		100% (Cr tot)		TRASCURABILE		100% (Cr tot)	TRASCURABILE	ASSENTE
	100	RSM B09		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE	ASSENTE	
	100	RSM B10		100% (Cr tot)		TRASCURABILE		100% (Cr tot)	TRASCURABILE	ASSENTE
	100	RSM B11		73% (Pb)		MEDIO		56,2% (Pb)	MEDIO	BASSO
	100	RSM B12		100% (Cr tot)		TRASCURABILE		100% (Cr tot)	TRASCURABILE	ASSENTE
	250	RSM B13		100% (Cr tot)		TRASCURABILE		100% (Cr tot)	TRASCURABILE	ASSENTE
	250	RSM B14		100% (Cr tot)		BASSO		100% (Cr tot)	BASSO	ASSENTE
	250	RSM B15		100% (Cr tot)		BASSO		100% (Cr tot)	TRASCURABILE	ASSENTE
	250	RSM B16		100% (Cr tot)		BASSO		100% (Cr tot)	BASSO	ASSENTE
	1000	RSM B17		100% (Cr tot)		BASSO		100% (Cr tot)	TRASCURABILE	ASSENTE
	1000	RSM B18		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE	ASSENTE	
	1000	RSM B19		100% (Cr tot)		BASSO		100% (Cr tot)	BASSO	ASSENTE
	1000	RSM B20		100% (Cr tot)		TRASCURABILE		100% (Cr tot)	TRASCURABILE	ASSENTE

Tabella 4. Classi di pericolo chimico ottenute dalla elaborazione ponderata dei dati chimici di tutti i sedimenti della piattaforma RSM-B, in riferimento ai limiti degli SQA (D. Lgs 172/2015), L1 e L2 (DM 173/2016).

Sito	distanza (m)	Stazione	SQA (D.Lgs. 172/2015)		L1 (D.Lgs. 173/2016)		L2 (D.Lgs. 173/2016)	
			% max/RTR	Classe di pericolo	% max/RTR	Classe di pericolo	% max/RTR	Classe di pericolo
RSM-C	25	RSM C01		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	25	RSM C02		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	25	RSM C03		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	25	RSM C04	100% (Cr tot)	TRASCURABILE	100% (Cr tot)	TRASCURABILE		ASSENTE
	50	RSM C05		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	50	RSM C06		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	50	RSM C07	100% (Cr tot)	TRASCURABILE	60,2% (Zn)	MEDIO	100% (Zn)	TRASCURABILE
	50	RSM C08	100% (Cr tot)	TRASCURABILE	100% (Cr tot)	TRASCURABILE		ASSENTE
	100	RSM C09		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	100	RSM C10		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	100	RSM C11	100% (Cr tot)	TRASCURABILE	100% (Cr tot)	TRASCURABILE		ASSENTE
	100	RSM C12		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	250	RSM C13	100% (Cr tot)	TRASCURABILE	100% (Cr tot)	TRASCURABILE		ASSENTE
	250	RSM C14	100% (Cr tot)	TRASCURABILE	100% (Cr tot)	TRASCURABILE		ASSENTE
	250	RSM C15	52,1% (Pb)	BASSO	52,1% (Pb)	BASSO		ASSENTE
	250	RSM C16		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	1000	RSM C17	100% (Cr tot)	TRASCURABILE	100% (Cr tot)	TRASCURABILE		ASSENTE
	1000	RSM C18	100% (Cr tot)	TRASCURABILE	100% (Cr tot)	TRASCURABILE		ASSENTE
	1000	RSM C19		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE
	1000	RSM C20		ASSENTE		ASSENTE		ASSENTE

Tabella 5. Classi di pericolo chimico ottenute dalla elaborazione ponderata dei dati chimici di tutti i sedimenti della piattaforma RSM-C, in riferimento ai limiti degli SQA (D. Lgs 172/2015), L1 e L2 (DM 173/2016).

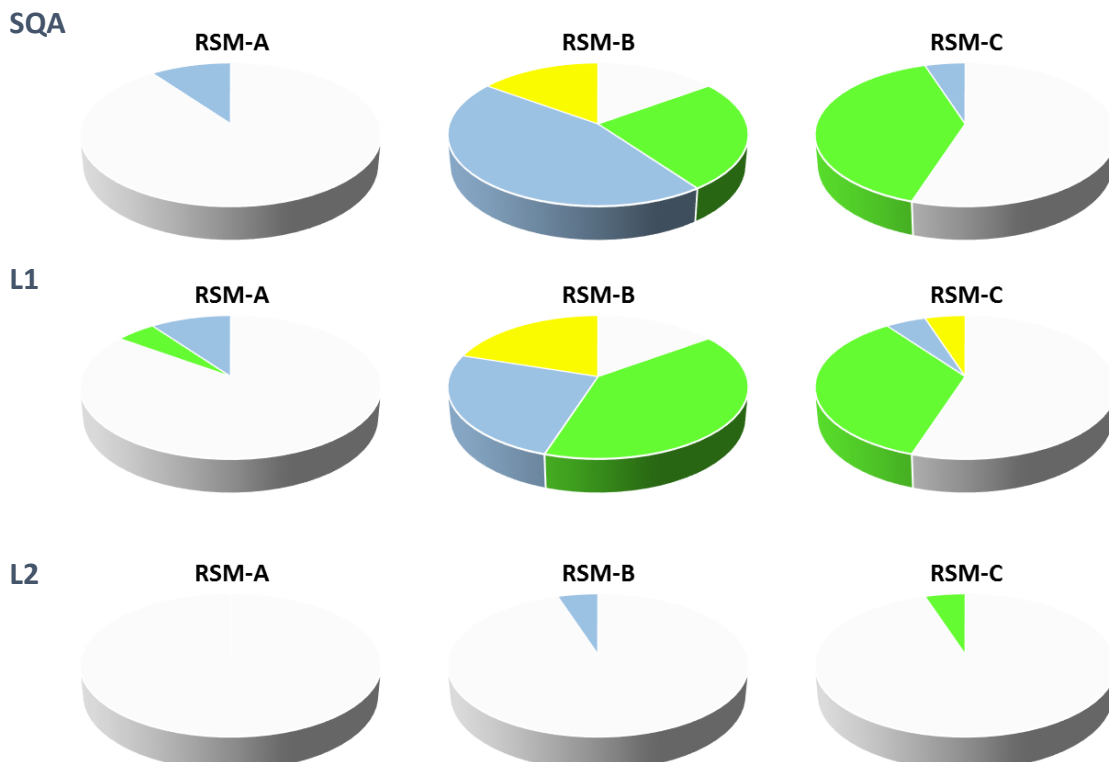


Figura 20. Distribuzione percentuale delle classi di pericolo chimico ottenute dalla elaborazione dei dati chimici nei sedimenti delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C, in riferimento a SQA (D.Lgs. 172/2015), L1 e L2 (D.Lgs. 173/2016). Le classi di pericolo sono espresse tramite i seguenti colori: bianco: assente; verde: trascurabile; celeste: basso; giallo: medio; rosso: alto; nero: molto alto.



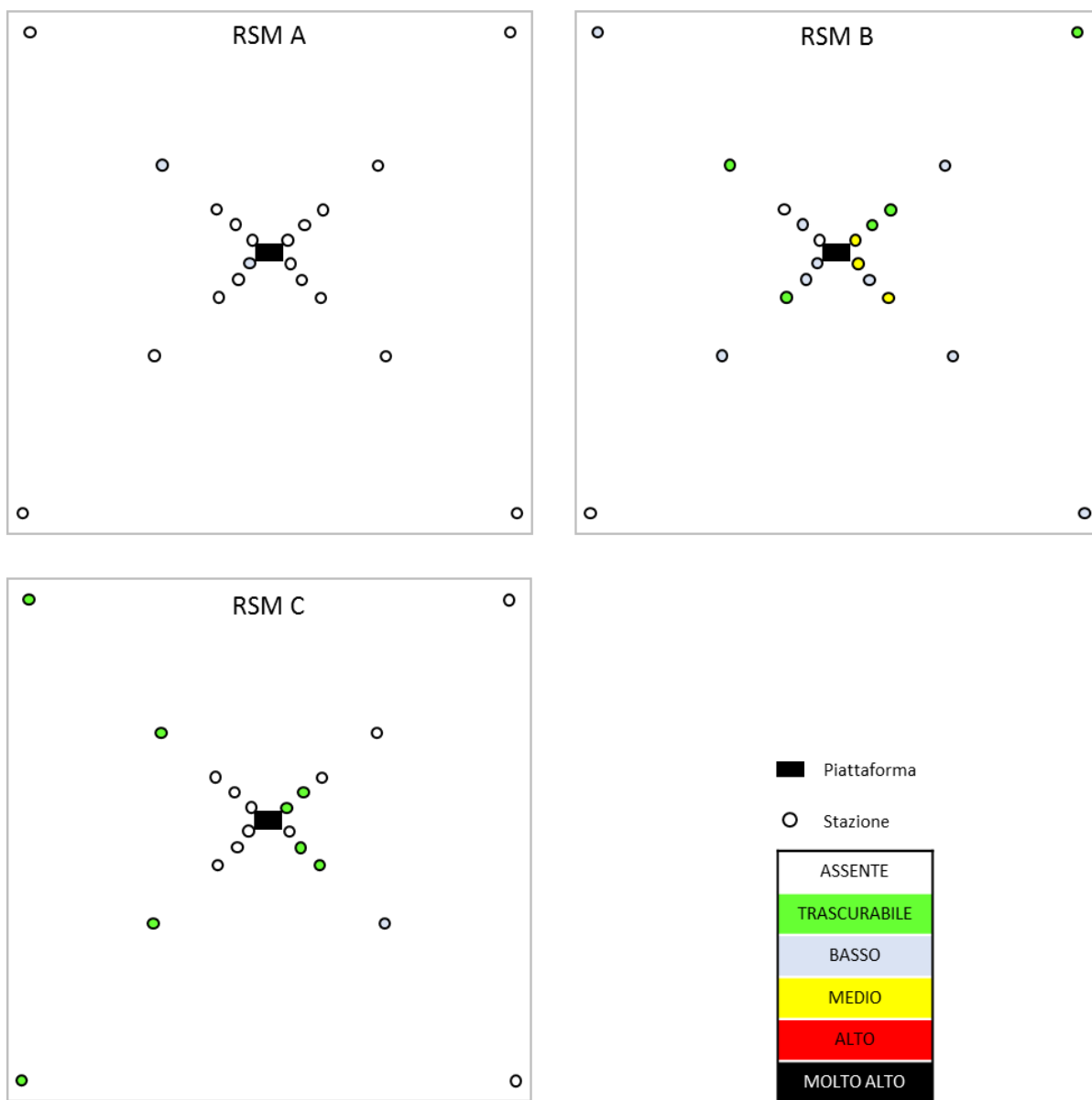


Figura 21. Distribuzione lungo i transetti di campionamento per le piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C, delle classi di pericolo chimico dei sedimenti elaborate in riferimento agli SQA (D.Lgs. 172/2015).

#### **4.1.2 Risposte ecotossicologiche**

Nelle Tabelle 6, 7, 8 e 9 vengono mostrati i risultati ottenuti per i singoli saggi ecotossicologici (*Vibrio fisheri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Acartia tonsa*, *Paracentrotus lividus*), mentre le Tabelle 10, 11 e 12 (insieme alle schede di elaborazione dei dati dell'Allegato 9) mostrano i risultati della elaborazione complessiva della batteria di saggi ottenuta mediante l'applicazione di criteri di integrazione ponderata, per i sedimenti delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C.

Anche in questo caso, come per l'elaborazione dei dati di caratterizzazione chimica dei sedimenti, sono stati utilizzati gli stessi criteri recepiti all'interno del nuovo DM 173/2016 per la classificazione della qualità e la scelta delle opzioni gestionali per i sedimenti marini da sottoporre a movimentazione. Queste procedure consentono di abbandonare il principio che la classificazione ecotossicologica sia determinata dal risultato peggiore: il giudizio sull'intera batteria dipende dalla rilevanza tossicologica dell'endpoint misurato da ciascun saggio, dalla soglia di sensibilità di risposta della specie, dalla significatività statistica ed entità delle variazioni misurate, dalle condizioni di saggio.

L'unico saggio ad aver mostrato qualche debole effetto di tossicità è stato quello sullo sviluppo embrionale del riccio (*P. lividus*), ma l'elaborazione complessiva di tutta la batteria ha sempre evidenziato un livello complessivo di pericolo ecotossicologico Assente per tutti i campioni di sedimenti raccolti intorno alle 3 piattaforme RSM-A, B, C.

CAMPIONE	CONTROLLO	TRATTATO
	U.T.	U.T.
RSMA 5	326.00 ± 24.35	316.16 ± 7.27
RSMA 6	381.31 ± 12.99	287.96 ± 17.81
RSMA 7	354.23 ± 2.09	223.85 ± 9.98
RSMA 8	362.08 ± 40.68	216.34 ± 2.88
RSMA 17a	388.51 ± 19.57	291.53 ± 5.73
RSMA 17b	392.81 ± 21.71	291.53 ± 22.06
RSMA 19a	332.60 ± 9.88	287.80 ± 5.22
RSMA 19b	411.78 ± 24.31	287.80 ± 6.23
RSMB 5	381.01 ± 53.65	281.85 ± 10.08
RSMB 6	418.45 ± 36.57	259.51 ± 11.55
RSMB 7	375.75 ± 38.88	231.94 ± 4.01
RSMB 8	353.76 ± 53.64	149.17 ± 3.33
RSMB 17a	317.96 ± 17.37	280.19 ± 17.05
RSMB 17b	339.83 ± 24.86	280.19 ± 2.20
RSMB 19a	302.12 ± 10.28	284.02 ± 3.35
RSMB 19b	320.13 ± 10.89	284.02 ± 11.09
RSMC 5	327.09 ± 30.22	313.94 ± 11.43
RSMC 6	365.78 ± 22.75	277.85 ± 13.34
RSMC 7	359.65 ± 20.20	239.38 ± 16.75
RSMC 8	385.82 ± 31.52	243.30 ± 13.19
RSMC 17a	209.78 ± 30.00	168.88 ± 10.92
RSMC 17b	307.73 ± 36.20	168.88 ± 6.90
RSMC 19a	452.46 ± 10.89	298.68 ± 8.59
RSMC 19b	448.11 ± 24.81	298.68 ± 19.41

Tabella 6. Risultati del saggio con *Vibrio fischeri*. Valori di bioluminescenza espressi in unità tossiche (U.T.) (medie ± deviazioni standard).

<b>CAMPIONE</b>	<b>RSM-A</b> cell/ml	<b>RSM-B</b> cell/ml	<b>RSM-C</b> cell/ml
5	856250.00 ± 51835.07	1169583.33 ± 40817.17	1009166.67 ± 45488.09
6	1068333.33 ± 66231.92	1090833.33 ± 40145.57	962083.33 ± 97997.66
7	979583.33 ± 40106.63	955833.33 ± 22397.92	1092500.00 ± 78549.35
8	894583.33 ± 45918.86	1022916.67 ± 97460.46	1230000.00 ± 64420.49
17a	1094583.33 ± 66547.29	1165833.33 ± 95598.99	967083.33 ± 82225.55
17b	1070416.67 ± 89894.61	1295833.33 ± 90893.71	854166.67 ± 87201.87
19a	1285416.67 ± 35896.26	933333.33 ± 84921.53	1072500.00 ± 69534.16
19b	1303750.00 ± 74995.83	1210416.67 ± 65123.28	1112083.33 ± 22046.35
Ctrl	777916.67 ± 50259.74	777916.67 ± 50259.74	777916.67 ± 50259.74

Tabella 7. Risultati del saggio con *Phaeodactylum tricornutum*. Valori di crescita algale espressi in cell/ml (medie ± deviazioni standard).

<b>CAMPIONE</b>	<b>RSM-A</b> %	<b>RSM-B</b> %	<b>RSM-C</b> %
5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
6	3.75 ± 5.86	5.56 ± 9.30	0.00 ± 0.00
7	0.00 ± 0.00	2.08 ± 5.10	3.33 ± 5.16
8	3.33 ± 5.16	5.00 ± 8.37	1.85 ± 4.54
17a	0.00 ± 0.00	4.05 ± 6.42	0.00 ± 0.00
17b	3.75 ± 5.86	0.00 ± 0.00	3.33 ± 8.16
19a	1.85 ± 4.54	3.70 ± 5.74	1.85 ± 4.54
19b	4.17 ± 6.45	1.67 ± 4.08	5.19 ± 5.69
Ctrl	0.00 ± 0.00	1.85 ± 4.54	0.00 ± 0.00

Tabella 8. Risultati del saggio con *Acartia tonsa*. Valori di mortalità espressi in % (esemplari privi di movimento) (medie ± deviazioni standard).

<b>CAMPIONE</b>	<b>RSM-A</b> %	<b>RSM-B</b> %	<b>RSM-C</b> %
5	84,67 ± 0,58	84,67 ± 0,58	85,33 ± 0,58
6	63,67 ± 9,07	79,67 ± 2,52	23,67 ± 1,53
7	79,00 ± 2,00	82,00 ± 2,00	82,33 ± 2,52
8	81,67 ± 1,53	82,33 ± 2,08	81,33 ± 1,15
17a	40,67 ± 3,51	63,00 ± 4,58	81,00 ± 3,61
17b	60,00 ± 2,00	68,33 ± 7,64	17,00 ± 15,39
19a	84,67 ± 1,53	84,67 ± 2,89	80,33 ± 0,58
19b	82,00 ± 2,00	84,67 ± 2,89	72,00 ± 2,00
Ctrl	84,67 ± 0,58	84,67 ± 0,58	84,67 ± 0,58

Tabella 9. Risultati del saggio con *Paracentrotus lividus*. Valori di sviluppo espresso in % di esemplari normoformati (medie ± deviazioni standard).

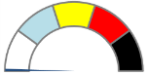

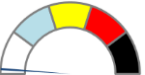
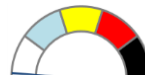
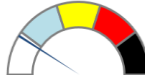
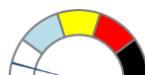
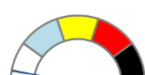
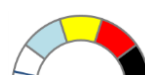
STAZIONE	SPECIE	HQ <sub>i</sub>	HQ <sub>batteria</sub>	CLASSE DI PERICOLO
RSM-A 5	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.00	0	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-A 6	<i>Paracentrotus lividus</i>	1.54	0.33	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.21		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-A 7	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.42	0.08	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-A 8	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.22	0.07	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.17		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-A 17a	<i>Paracentrotus lividus</i>	3.22	0.86	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-A 17b	<i>Paracentrotus lividus</i>	1.81	0.38	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.21		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-A 19a	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.00	0.26	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.08		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-A 19b	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.08	0.3	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.23		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		

Tabella 10. Risultati della elaborazione complessiva del pericolo ecotossicologico per la piattaforma RSM-A mediante criteri di integrazione ponderata sulle batterie di saggi costituite da *Phaeodactylum tricornutum*, *Acartia tonsa*, *Paracentrotus lividus*, *Vibrio fischeri* in fase solida.

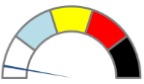
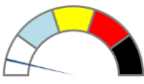
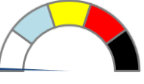
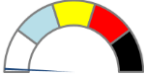
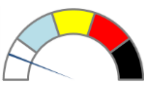
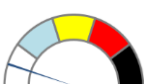
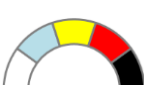
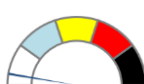
STAZIONE	SPECIE	HQ <sub>i</sub>	HQ <sub>batteria</sub>	CLASSE DI PERICOLO
RSM-B 5	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.00	0.24	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-B 6	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.36	0.34	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.15		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-B 7	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.08	0.02	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-B 8	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.07	0.04	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.13		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-B 17a	<i>Paracentrotus lividus</i>	1.59	0.56	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.08		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-B 17b	<i>Paracentrotus lividus</i>	1.20	0.47	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-B 19a	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.00	0.01	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.06		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-B 19b	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.00	0.24	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		

Tabella 11. Risultati della elaborazione complessiva del pericolo ecotossicologico per la piattaforma RSM-B mediante criteri di integrazione ponderata sulle batterie di saggi costituite da *Phaeodactylum tricornutum*, *Acartia tonsa*, *Paracentrotus lividus*, *Vibrio fischeri* in fase solida.

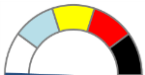


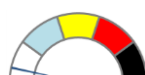
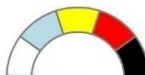
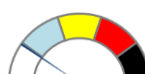
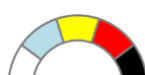
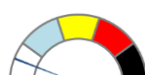
STAZIONE	SPECIE	HQ <sub>i</sub>	HQ <sub>batteria</sub>	CLASSE DI PERICOLO
RSM-C 5	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.00	0	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-C 6	<i>Paracentrotus lividus</i>	4.47	0.85	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-C 7	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.06	0.29	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.17		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-C 8	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.24	0.31	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.08		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-C 17a	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.09	0.02	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.00		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-C 17b	<i>Paracentrotus lividus</i>	4.96	0.97	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.13		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-C 19a	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.32	0.08	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.00		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.08		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		
RSM-C 19b	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.93	0.56	ASSENTE 
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.29		
	<i>Acartia tonsa</i>	0.73		
	<i>Vibrio fischeri</i>	0.00		

Tabella 12. Risultati della elaborazione complessiva del pericolo ecotossicologico per la piattaforma RSM-C mediante criteri di integrazione ponderata sulle batterie di saggi costituite da *Phaeodactylum tricornutum*, *Acartia tonsa*, *Paracentrotus lividus*, *Vibrio fischeri* in fase solida.



### 4.1.3 Comunità bentoniche

Le analisi delle comunità bentoniche effettuate sui campioni di sedimento delle tre piattaforme hanno permesso di individuare un totale di 6.473 organismi, di cui 1.911 per la piattaforma RSM-A, 2.243 per RSM-B e 2.319 per RSM-C. Tali organismi sono risultati appartenere a 112 gruppi tassonomici, 50 associati ai policheti, 37 ai crostacei, 14 ai molluschi, 5 agli echinodermi e 6 tra sipunculidi, nemertini e cnidari. All'interno dell'Allegato 4 sono state incluse tutte le informazioni relative all'elenco dei *taxa* osservati (Tabella I), oltre ad un elenco completo delle elaborazioni ed indici ottenuti su tutte le repliche ed i vari punti di campionamento (Tabella II), le medie dei valori in funzione delle Classi (Tabella III), dell'Ordine (Tabella IV) e delle Famiglie (Tabella V) degli organismi macrobentonici osservati.

Le comunità bentoniche caratterizzate intorno alle piattaforme sono risultate costituite prevalentemente da policheti (85%-90%), seguiti da crostacei (5%-8%), echinodermi (2%-3%) e molluschi (1%-2%). I restanti *taxa*, con percentuali intorno a 1%, sono rappresentati da nemertini (0.6%-1.2%), sipunculidi (0.1%-0.9%) e cnidari (0%-0.09%) (Figura 22).

I *taxa* più numerosi in tutti i punti di campionamento sono risultati essere i policheti *Paraonidae*, *Levinsenia demiri* (29%) e *Aricidea assimilis* (10%), ed i Cirratulidae, *Kirkegaardia dorsobranchialis* (21%) e *Chaetozone setosa* (7%), superando il numero di 100 individui per piattaforma.

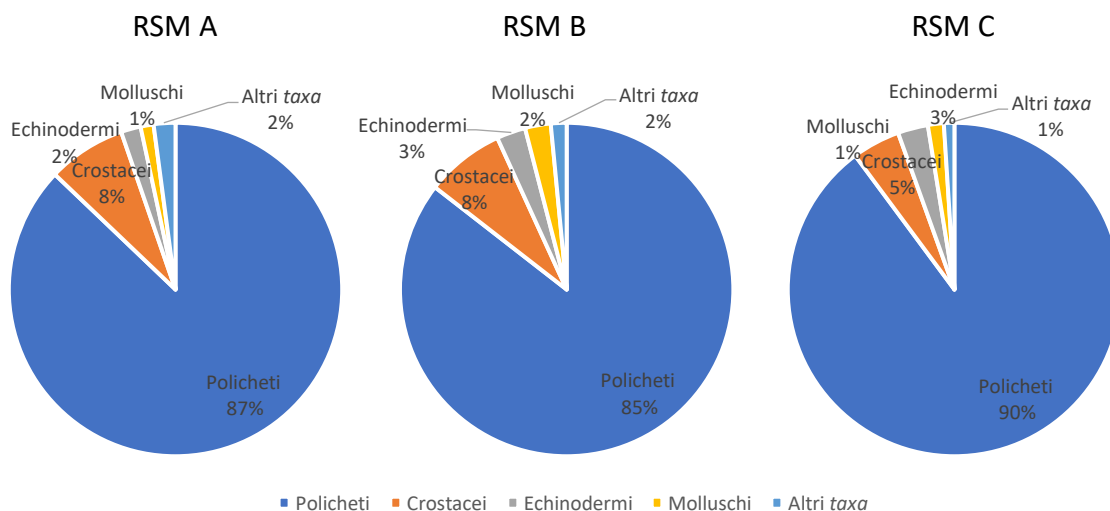


Figura 22. Distribuzione percentuale dei *taxa* osservati nei sedimenti prelevati in prossimità delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C.

Le abbondanze totali del macrozoobenthos per la piattaforma RSM-A sono risultate comprese tra  $60.0 \pm 34.6$  e  $610 \pm 182$ , rispettivamente nei campioni RSM-A2 e RSM-A16 (valore medio: 318.5), per la piattaforma RSM-B tra  $66.7 \pm 11.5$  (RSM-B6) e  $727 \pm 444$  (RSM-B19) con un valore medio pari a 373.8, e per la piattaforma RSM-C tra  $33.3 \pm 15.3$  nel campione RSM-A2 e  $813 \pm 5.8$  nel campione RSM-A17, con un valore medio di 425.6 (Figura 23). L'analisi statistica è stata effettuata considerando come valori di riferimento le abbondanze ritrovate nei campioni a 1000 m e non si è osservata nessuna differenza statisticamente significativa per le piattaforme RSM-A e RSM-B, mentre la piattaforma RSM-C ha presentato una differenza significativa solamente per i campioni RSM-C1 e RSM-C2 (Figura 23).

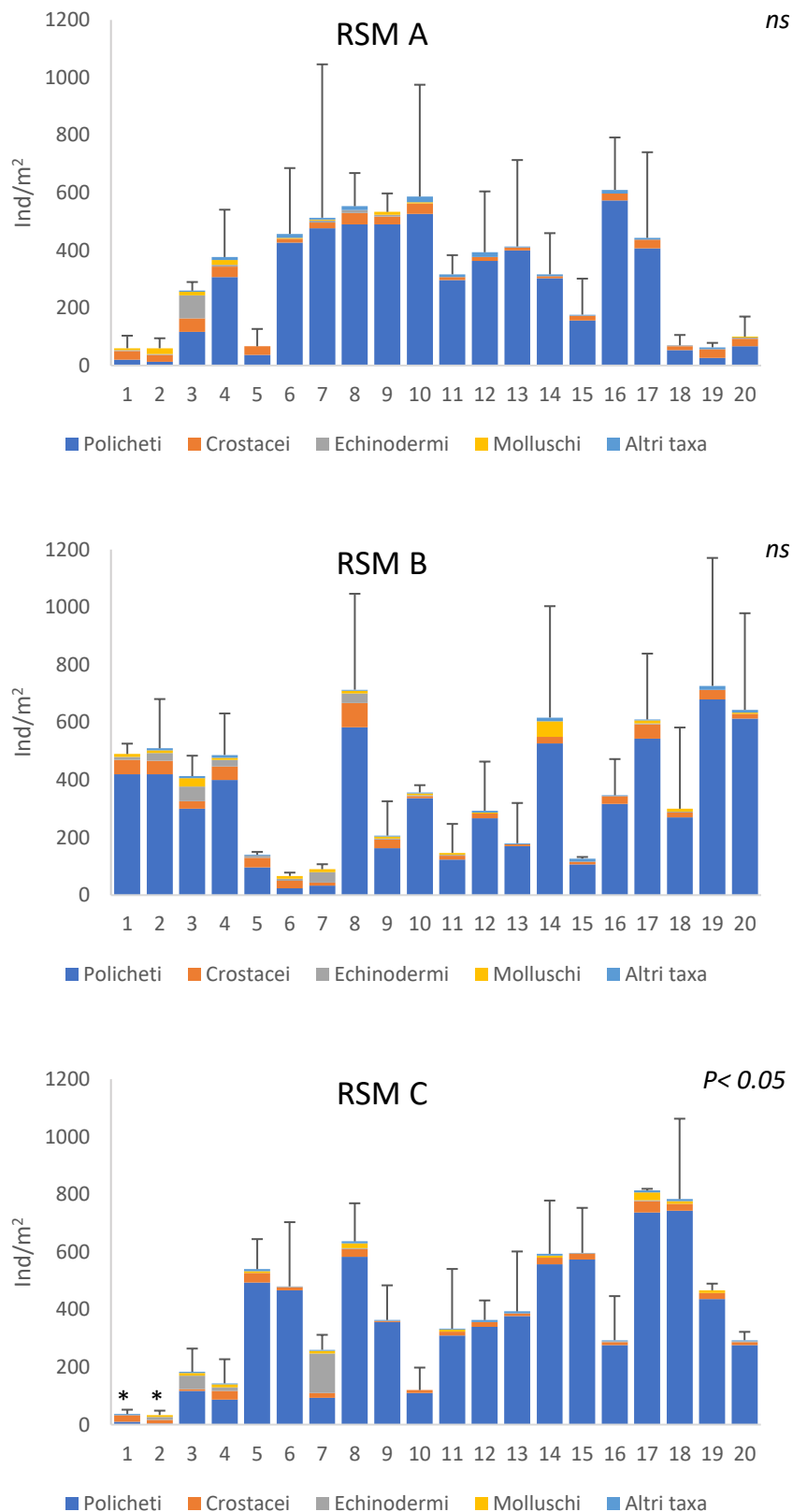


Figura 23. Abbondanze totali del macrozoobenthos e suddivisione dei principali gruppi tassonomici nelle aree delle tre piattaforme (RSM-A, RSM-B e RSM-C); valori espressi in numero di individui al m<sup>2</sup>, medie  $\pm$  deviazioni standard; gli asterischi indicano gruppi significativamente differenti rispetto a quelli di riferimento (siti a 1000 m dalle piattaforme), secondo *t*-Student al 95% di confidenza.

Nelle Tabelle 13, 14 e 15 sono riportati i valori degli indici ecologici elaborati per le comunità bentoniche in ciascuna stazione delle tre piattaforme: abbondanza degli organismi (N), ricchezza specifica (S), indice di Margalef (d), indice di Shannon (H'), indice di Pielou (J'), indice AMBI, BENTHIX, BOPA, BITS, e mAMBI (schede di elaborazione dati dell'Allegato 10).

In questo studio, per la valutazione delle comunità nell'ambiente intorno alle piattaforme, è stata ritenuta appropriata l'applicazione dell'indice AMBI: questo indice è stato ottimizzato per riassumere lo stato ecologico sulla base della risposta delle comunità bentoniche di fondi mobili a disturbi di tipo antropico.

I risultati complessivi hanno evidenziato uno stato ecologico tra buono ed elevato per tutti i campioni delle tre piattaforme. Il range dei valori dell'indice AMBI per RSM-A è compreso tra 0.6 (RSM A5) e 2.5 (RSM A15), per RSM-B tra 0.9 (RSM B5) e 2.7 (RSM B16), e per RSM-C tra 0.7 (RSM C2) e 2.9 (RSM C13) (Tabelle 13, 14 e 15). I dati raccolti hanno evidenziato che il popolamento presente nell'area delle tre piattaforme risulta essere omogeneo.

Stazione	N (ind/m <sup>2</sup> )	S	d	H'	J'	AMBI	BENTHIX	BOPA	BITS	m AMBI	
RSM A	1	60.0 ± 43.6	4.7 ± 2.1	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.6	1.4 ± 0.0	0.9 ± 0.6	4.6 ± 0.5	0.1 ± 0.0	2.7 ± 0.9	0.5 ± 0.1
	2	60.0 ± 34.6	5.3 ± 3.2	2.4 ± 1.0	2.2 ± 0.8	1.4 ± 0.0	0.9 ± 0.5	3.3 ± 0.3	0.1 ± 0.1	3.2 ± 0.4	0.5 ± 0.1
	3	260.0 ± 30.0	12.7 ± 4.7	3.6 ± 1.3	3.1 ± 0.6	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.3	3.5 ± 0.4	0.2 ± 0.1	2.0 ± 0.6	0.7 ± 0.1
	4	376.7 ± 164.4	15.0 ± 5.3	3.8 ± 1.0	3.2 ± 0.5	1.2 ± 0.0	0.8 ± 0.3	2.7 ± 1.1	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1
	5	66.7 ± 11.5	4.7 ± 1.2	2.0 ± 0.7	2.0 ± 0.5	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.4	4.7 ± 1.2	0.2 ± 0.1	1.2 ± 1.1	0.5 ± 0.1
	6	456.7 ± 229.0	10.3 ± 2.1	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.5	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.0
	7	513.3 ± 532.6	10.7 ± 6.7	2.6 ± 1.1	2.4 ± 0.8	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.9	2.6 ± 0.8	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.8	0.6 ± 0.1
	8	553.3 ± 115.0	20.7 ± 1.2	4.9 ± 0.2	3.5 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.4 ± 0.6	0.3 ± 0.0	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.0
	9	533.3 ± 64.3	14.7 ± 3.2	3.5 ± 0.9	3.1 ± 0.6	1.2 ± 0.1	2.4 ± 0.5	2.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	10	586.7 ± 388.4	15.0 ± 5.3	3.5 ± 0.9	3.0 ± 0.4	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.5	1.8 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.1
	11	316.7 ± 66.6	12.0 ± 1.0	3.2 ± 0.4	3.1 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.4	3.5 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.0
	12	393.3 ± 211.3	11.7 ± 4.7	2.9 ± 0.9	3.0 ± 0.3	1.3 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.4	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1
	13	413.3 ± 300.2	9.0 ± 1.0	2.5 ± 1.0	2.6 ± 0.5	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.5	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.1
	14	316.7 ± 142.9	10.7 ± 1.2	2.9 ± 0.5	3.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1	2.1 ± 0.3	2.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.0
	15	176.7 ± 125.0	8.7 ± 3.8	2.7 ± 0.6	2.8 ± 0.4	1.3 ± 0.1	2.5 ± 0.7	2.3 ± 0.4	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1
	16	610.0 ± 181.9	13.3 ± 1.2	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.3 ± 0.4	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0
	17	443.3 ± 297.4	12.0 ± 4.6	3.1 ± 0.5	2.8 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.7	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.1
	18	70.0 ± 36.1	5.3 ± 2.1	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.6	1.4 ± 0.0	1.0 ± 1.0	2.2 ± 0.9	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.0
	19	63.3 ± 15.3	4.7 ± 1.2	2.0 ± 0.4	2.1 ± 0.3	1.4 ± 0.0	1.9 ± 0.6	2.7 ± 1.3	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.0
	20	100.0 ± 70.0	6.3 ± 3.1	2.4 ± 0.5	2.3 ± 0.6	1.3 ± 0.1	1.7 ± 1.2	2.4 ± 0.5	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.9	0.5 ± 0.0

Tabella 13. Valori degli indici di qualità ecologica elaborati per la piattaforma RSM-A: abbondanza degli organismi (N), ricchezza specifica (S), indice di Margalef (d), indice di Shannon (H'), indice di Pielou (J'), indice AMBI, BENTHIX, BOPA, BITS, m AMBI. Le classi di qualità secondo l'indice AMBI sono espresse tramite i colori convenzionali (blu: elevato; verde: buono; giallo: sufficiente; arancio: scarso; rosso: cattivo).

Stazione	N (ind/m <sup>2</sup> )	S	d	H'	J'	AMBI	BENTHIX	BOPA	BITS	m AMBI
1	490.0 ± 36.1	14.3 ± 1.5	3.4 ± 0.3	3.1 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.3	2.6 ± 0.5	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.3	0.7 ± 0.0
2	510.0 ± 170.9	18.0 ± 5.2	4.3 ± 1.0	3.6 ± 0.4	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.4	2.7 ± 0.4	0.3 ± 0.0	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.1
3	413.3 ± 70.9	17.7 ± 1.5	4.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	1.2 ± 0.0	0.9 ± 0.1	3.7 ± 0.3	0.2 ± 0.0	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.0
4	500.0 ± 144.2	20.3 ± 1.2	5.0 ± 0.2	3.7 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	3.2 ± 0.7	0.2 ± 0.0	1.5 ± 0.4	0.8 ± 0.0
5	140.0 ± 10.0	7.3 ± 0.6	2.4 ± 0.3	2.5 ± 0.3	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2.6 ± 1.4	0.2 ± 0.1	1.1 ± 0.6	0.6 ± 0.0
6	66.7 ± 11.5	6.0 ± 1.0	2.6 ± 0.4	2.5 ± 0.3	1.4 ± 0.0	0.9 ± 0.3	2.9 ± 0.8	0.1 ± 0.0	1.6 ± 1.5	0.6 ± 0.0
7	90.0 ± 17.3	5.3 ± 2.5	1.9 ± 1.0	2.2 ± 0.8	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.5	3.4 ± 1.1	0.1 ± 0.1	2.6 ± 1.2	0.5 ± 0.1
8	713.3 ± 333.2	21.7 ± 4.7	4.9 ± 0.6	3.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.3	2.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1
9	206.7 ± 119.3	10.0 ± 3.5	3.0 ± 0.6	2.8 ± 0.5	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.5	1.9 ± 0.6	0.2 ± 0.0	1.2 ± 0.2	0.6 ± 0.1
10	356.7 ± 25.2	8.3 ± 3.2	2.0 ± 0.9	2.1 ± 0.7	1.0 ± 0.2	2.1 ± 1.0	1.4 ± 0.8	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.0
11	146.7 ± 100.7	6.0 ± 3.5	1.8 ± 1.0	1.9 ± 1.0	1.2 ± 0.0	0.9 ± 0.4	2.0 ± 1.3	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.5	0.5 ± 0.1
12	293.3 ± 170.4	9.3 ± 1.2	2.6 ± 0.4	2.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.4	2.1 ± 1.2	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0
13	180.0 ± 140.0	7.7 ± 4.9	2.4 ± 0.9	2.3 ± 1.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 1.2	2.9 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.4	0.5 ± 0.1
14	616.7 ± 386.8	10.3 ± 3.5	2.3 ± 0.5	2.4 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.5 ± 0.6	1.8 ± 0.3	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1
15	126.7 ± 5.8	8.3 ± 2.1	2.9 ± 0.8	2.8 ± 0.5	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.6	4.1 ± 0.3	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.1
16	346.7 ± 125.8	9.0 ± 2.0	2.3 ± 0.3	2.5 ± 0.3	1.2 ± 0.0	2.7 ± 0.3	2.1 ± 0.7	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.1
17	610.0 ± 228.7	11.0 ± 1.0	2.5 ± 0.4	2.5 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.9 ± 0.3	1.4 ± 0.3	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.6 ± 0.0
18	300.0 ± 282.1	7.0 ± 3.0	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.4	2.2 ± 1.2	0.3 ± 0.1	1.0 ± 1.4	0.5 ± 0.0
19	726.7 ± 444.3	14.0 ± 5.2	3.2 ± 0.9	2.7 ± 0.6	1.1 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.9 ± 1.0	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.1
20	643.3 ± 335.6	13.7 ± 2.5	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.2	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.7	1.9 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.0

Tabella 14. Valori degli indici di qualità ecologica elaborati per la piattaforma RSM-B: abbondanza degli organismi (N), ricchezza specifica (S), indice di Margalef (d), indice di Shannon (H'), indice di Pielou (J'), indice AMBI, BENTHIX, BOPA, BITS, m AMBI. Le classi di qualità secondo l'indice AMBI sono espresse tramite i colori convenzionali (blu: elevato; verde: buono; giallo: sufficiente; arancio: scarso; rosso: cattivo).

Stazione	N (ind/m <sup>2</sup> )	S	d	H'	J'	AMBI	BENTHIX	BOPA	BITS	m AMBI
1	36.7 ± 15.3	2.0 ± 1.0	0.7 ± 0.6	0.8 ± 0.8	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	4.9 ± 1.8	0.1 ± 0.1	2.5 ± 1.1	0.4 ± 0.1
2	33.3 ± 15.3	3.0 ± 1.0	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.5	1.4 ± 0.0	0.7 ± 0.2	5.3 ± 0.7	0.0 ± 0.0	3.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1
3	183.3 ± 80.8	9.3 ± 3.2	2.9 ± 0.8	2.8 ± 0.6	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.6	2.2 ± 0.4	0.2 ± 0.0	2.0 ± 0.7	0.6 ± 0.1
4	143.3 ± 83.9	9.3 ± 1.5	3.3 ± 0.2	3.1 ± 0.1	1.4 ± 0.0	1.0 ± 0.7	1.9 ± 0.3	0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.3	0.7 ± 0.0
5	540.0 ± 104.4	11.7 ± 0.6	2.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.2 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.0
6	480.0 ± 223.4	8.7 ± 2.3	2.0 ± 0.5	2.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	2.5 ± 0.5	1.6 ± 0.4	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.3	0.5 ± 0.0
7	260.0 ± 52.0	10.0 ± 1.7	2.8 ± 0.5	2.7 ± 0.4	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.3	3.0 ± 0.8	0.1 ± 0.0	2.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1
8	640.0 ± 132.3	15.7 ± 2.1	3.5 ± 0.5	3.0 ± 0.4	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.6	1.9 ± 0.3	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1
9	363.3 ± 120.6	9.0 ± 0.0	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.3	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.0
10	120.0 ± 78.1	6.3 ± 1.5	2.3 ± 0.2	2.5 ± 0.3	1.4 ± 0.0	2.0 ± 0.2	3.5 ± 1.0	0.3 ± 0.0	0.9 ± 0.4	0.5 ± 0.0
11	333.3 ± 207.4	7.3 ± 0.6	2.0 ± 0.5	2.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.4	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.0
12	363.3 ± 68.1	9.7 ± 2.1	2.4 ± 0.7	2.6 ± 0.4	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.4	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.1
13	393.3 ± 208.2	9.0 ± 2.6	2.2 ± 0.4	2.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.1 ± 0.3	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.1
14	593.3 ± 185.0	12.7 ± 2.1	2.9 ± 0.5	2.7 ± 0.3	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.0
15	596.7 ± 156.3	12.0 ± 2.0	2.7 ± 0.3	2.4 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.4	1.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.0
16	293.3 ± 153.1	11.3 ± 0.6	3.3 ± 0.7	2.9 ± 0.5	1.2 ± 0.2	2.4 ± 0.6	2.7 ± 1.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.6	0.6 ± 0.1
17	813.3 ± 5.8	14.0 ± 1.0	3.0 ± 0.2	2.7 ± 0.3	1.0 ± 0.1	2.0 ± 0.3	1.6 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.0
18	783.3 ± 279.3	11.3 ± 4.0	2.4 ± 0.8	2.3 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.1
19	466.7 ± 23.1	12.3 ± 0.6	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.2	1.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.0
20	293.3 ± 28.9	8.7 ± 0.6	2.3 ± 0.2	2.5 ± 0.4	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.5	1.8 ± 0.4	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.0

Tabella 15. Valori degli indici di qualità ecologica elaborati per la piattaforma RSM-C: abbondanza degli organismi (N), ricchezza specifica (S), indice di Margalef (d), indice di Shannon (H'), indice di Pielou (J'), indice AMBI, BENTHIX, BOPA, BITS, m AMBI. Le classi di qualità secondo l'indice AMBI sono espresse tramite i colori convenzionali (blu: elevato; verde: buono; giallo: sufficiente; arancio: scarso; rosso: cattivo).

Come riportato nella Tabella 16, l'elaborazione complessiva dei dati sulle comunità bentoniche attraverso la LOE 5 del modello weight of evidence (Sediqualsoft), ha fornito una classe di pericolo da Assente a Trascurabile in tutti i campioni di sedimento delle tre piattaforme (vedi anche Allegato 10).

Stazione		Classe di pericolo	Stazione		Classe di pericolo	Stazione		Classe di pericolo
<b>RSM A</b>	1	ASSENTE	<b>RSM B</b>	1	TRASCURABILE	<b>RSM C</b>	1	TRASCURABILE
	2	ASSENTE		2	TRASCURABILE		2	ASSENTE
	3	ASSENTE		3	ASSENTE		3	TRASCURABILE
	4	ASSENTE		4	TRASCURABILE		4	ASSENTE
	5	ASSENTE		5	ASSENTE		5	TRASCURABILE
	6	TRASCURABILE		6	ASSENTE		6	TRASCURABILE
	7	ASSENTE		7	TRASCURABILE		7	TRASCURABILE
	8	TRASCURABILE		8	TRASCURABILE		8	TRASCURABILE
	9	TRASCURABILE		9	TRASCURABILE		9	TRASCURABILE
	10	TRASCURABILE		10	TRASCURABILE		10	TRASCURABILE
	11	TRASCURABILE		11	ASSENTE		11	ASSENTE
	12	TRASCURABILE		12	TRASCURABILE		12	TRASCURABILE
	13	TRASCURABILE		13	TRASCURABILE		13	TRASCURABILE
	14	TRASCURABILE		14	TRASCURABILE		14	TRASCURABILE
	15	TRASCURABILE		15	TRASCURABILE		15	TRASCURABILE
	16	TRASCURABILE		16	TRASCURABILE		16	TRASCURABILE
	17	TRASCURABILE		17	TRASCURABILE		17	TRASCURABILE
	18	ASSENTE		18	ASSENTE		18	TRASCURABILE
	19	TRASCURABILE		19	TRASCURABILE		19	TRASCURABILE
	20	TRASCURABILE		20	TRASCURABILE		20	TRASCURABILE

Tabella 16. Classi di pericolo ecologico ottenute mediante elaborazione complessiva di tutti i dati disponibili per le comunità bentoniche delle tre piattaforme RSM A, RSM B e RSM C.

## 4.2 INQUINANTI E BIOMARKER IN ORGANISMI MARINI

### 4.2.1 Bioaccumulo di metalli in *Hediste diversicolor*

Il polichete *Hediste diversicolor* è stato utilizzato per effettuare il test di bioaccumulo di metalli pesanti, mediante una stabulazione di quattro settimane nei sedimenti prelevati sia durante la campagna estiva che in quella invernale. Per ciascuna piattaforma sono stati testati quattro campioni di sedimenti presi a 50 m dalla struttura (campioni 5, 6, 7 e 8), ed ulteriori 4 campioni prelevati ad un chilometro dalle piattaforme stesse (17a, 17b, 19a e 19b): questi ultimi presentano caratteristiche geochemiche del tutto simili a quelle degli altri siti più prossimi alla piattaforma ma, essendo meno influenzati da eventuali attività antropiche in virtù della distanza, possono essere considerati come sedimenti di riferimento. I valori medi ( $\pm$  deviazioni standard) delle concentrazioni misurate nei policheti sono riportati nella Tabella I dell'Allegato 5, per gli esperimenti di luglio 2016 e nella Tabella II dell'Allegato 5, per quelli di dicembre 2016.

Per quanto riguarda i risultati della **campagna estiva (luglio 2016)**, pur con una marcata variabilità, non si evidenziano mai differenze rilevanti tra gli organismi esposti ai sedimenti prelevati più in prossimità delle piattaforme o a quelli ottenuti ad un chilometro (Figure 24, 25, 26, 27 e 28). Nello specifico, le concentrazioni di **alluminio** variano tra 15 e 100  $\mu\text{g/g}$  negli organismi testati con i sedimenti di RSM-A, 15-50  $\mu\text{g/g}$  in quelli di RSM-B e 10-170 in quelli di RSM-C. Valori tendenzialmente maggiori, anche se caratterizzati da una marcata variabilità (deviazione standard), sono stati osservati negli organismi esposti ai sedimenti 17a di RSM-A e 19a di RSM C, ovvero tra quelli prelevati ad una distanza di 1 Km dalla piattaforma e che rappresentano i campioni di riferimento all'interno dell'area investigata. Le concentrazioni di **arsenico** nei tessuti di *H. diversicolor* sono estremamente simili in tutti i campioni analizzati e si collocano tra livelli piuttosto bassi, non superando mai i 5  $\mu\text{g/g}$ . Per quanto concerne il **bario**, questo elemento mostra alcune differenze, con valori che variano tra 0.15 e 6  $\mu\text{g/g}$  nei tessuti dei policheti esposti ai sedimenti della piattaforma RSM-A, tra 0.15 e 0.8  $\mu\text{g/g}$  in quelli di RSM-B e tra 0.1 e 1.7 in quelli di RSM-C; tuttavia, dove sono state osservate le differenze più marcate, le medie ottenute sono sempre soggette ad una elevata variabilità che rende tali differenze non statisticamente significative. Le concentrazioni di **cadmio**,  **nichel**, **rame** e **zinco** risultano sempre molto simili nei tessuti di tutti gli organismi esposti ai sedimenti provenienti dalle tre piattaforme: valori nei range 0.02-0.06  $\mu\text{g/g}$  (Cd), 0.5-1.3  $\mu\text{g/g}$  (Ni), 20-35  $\mu\text{g/g}$  (Cu) e 100-175  $\mu\text{g/g}$  (Zn) suggeriscono una totale assenza di biodisponibilità per questi elementi. **Cromo**, **ferro** e **vanadio** mostrano valori di concentrazione rispettivamente compresi tra 0.5 e 2  $\mu\text{g/g}$  (Cr), tra 500 e 1500  $\mu\text{g/g}$  (Fe), e tra 0.5 e 1.5  $\mu\text{g/g}$  (V) con valori tendenzialmente maggiori negli organismi esposti al sedimento RSM-A 8, che non risultano tuttavia diversi da quelli ottenuti per il campione di riferimento RSM-A 17a. Il **mercurio** mostra valori di concentrazione piuttosto simili nei tessuti di tutti gli organismi, tra 0.05 e 0.09  $\mu\text{g/g}$ , leggermente superiori per il sedimento RSM-C 6 con valori di 0.13  $\mu\text{g/g}$ . Il **manganese** evidenzia una marcata variabilità e le

variazioni osservate tra gli organismi esposti ai diversi sedimenti non risultano di fatto rilevanti; i livelli si attestano all'interno di un range compreso tra 5 e 30 µg/g, spesso tendenzialmente maggiori negli organismi esposti ai sedimenti di riferimento raccolti ad 1 Km dalle piattaforme investigate (es. RSM-A 17a e RSM-C 19a e 19b). Il **piombo** mostra valori di concentrazione sempre molto simili e compresi tra 0.5 e 1 µg/g nei tessuti di tutti gli organismi esposti ai sedimenti più esterni e a quelli prelevati attorno alle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C. Solo i policheti stabulati nel sedimento RSM-A 17a mostrano un livello medio più alto, pari a circa 2 µg/g, anche se caratterizzato da una elevata variabilità.

I risultati degli esperimenti con *H. diversicolor* eseguiti con i sedimenti raccolti durante la **campagna invernale (dicembre 2016)** sono riportati nelle Figure 29, 30, 31, 32 e 33. Le concentrazioni di **alluminio** sono risultate basse in tutti gli organismi trattati, rientrando in range di valori compresi tra 8 e 40 µg/g per quelli esposti ai sedimenti di RSM-A, tra 12 e 45 µg/g per quelli di RSM-B, e tra 15 e 47 µg/g per quelli di RSM-C. I sedimenti che hanno determinato i livelli tendenzialmente maggiori, precisamente i campioni RSM-A 8, RSM-B 5 e meno marcatamente RSM-C 6, hanno evidenziato effetti simili o addirittura inferiori rispetto a quelli misurati negli organismi trattati con i rispettivi sedimenti raccolti ad 1 chilometro di distanza dalle piattaforme (17a, 17b, 19a e 19b). In generale queste concentrazioni sono risultate inferiori a quelle misurate negli organismi esposti ai sedimenti della campagna estiva. Concentrazioni di **arsenico** nell'intervallo di 3-11 µg/g sono state misurate nei policheti esposti ai sedimenti delle tre piattaforme, livelli del tutto paragonabili a quelli precedentemente ottenuti per gli organismi esposti ai sedimenti della campagna estiva. In generale i valori sono simili in tutti i gruppi analizzati, ad eccezione dei policheti esposti ai sedimenti RSM-A 8 e RSM-C 8 che mostrano concentrazioni tendenzialmente maggiori. Risultati confrontabili sono stati ottenuti anche per **cadmio, mercurio, nichel, rame e zinco** con concentrazioni medie che oscillano rispettivamente tra 0.03 e 0.19 µg/g (Cd), tra 0.01 e 0.07 µg/g (Hg), tra 0.15 e 0.8 µg/g (Ni), tra 5 e 35 µg/g (Cu) e tra 84 e 380 µg/g (Zn), livelli molto vicini a quelli precedentemente osservati per gli organismi stabulati nei sedimenti raccolti a luglio. Anche per questi elementi, concentrazioni tendenzialmente maggiori sono state osservate negli organismi esposti ai sedimenti RSM-A 8 e RSM-C 8. Le concentrazioni di **bario, cromo, ferro e vanadio** sono sovrapponibili negli esemplari di *H. diversicolor* esposti ai diversi sedimenti: i livelli misurati rientrano all'interno di range compresi tra 0.1-4 µg/g per il bario, 0.3-4 µg/g per il cromo, 130-1100 µg/g per il ferro e 0.1-0.8 µg/g per il vanadio, valori vicini a quelli misurati con i sedimenti di luglio. Il **manganese** mostra concentrazioni che oscillano da un minimo di 0.6 µg/g fino a 20 µg/g negli organismi esposti ai sedimenti delle piattaforme RSM-A e RSM-B, risultati simili a quelli precedentemente osservati per gli esperimenti della campagna estiva: tendenzialmente maggiori risultano le concentrazioni misurate negli organismi esposti ai sedimenti di RSM-C, con valori che arrivano quasi a 40 µg/g nel campione 8, risultando più elevati di quelli ottenuti per i sedimenti di riferimento prelevati ad 1 chilometro dalla piattaforma. I livelli di **piombo** nei tessuti di *H. diversicolor* rientrano sempre all'interno di un range



di valori compreso tra 0.3 e 2 µg/g, senza variazioni particolari tra i gruppi e simili a quelli precedentemente osservati durante la campagna estiva.

In conclusione, anche se le concentrazioni dei metalli non sono state misurate nei sedimenti della campagna invernale, la stima del bioaccumulo nei policheti utilizzati offre un'immagine pressoché sovrapponibile a quella precedentemente osservata per la campagna estiva. Non si evidenziano aspetti rilevanti, anche se livelli leggermente maggiori di **alluminio, arsenico, cadmio, mercurio, nichel, manganese e rame** sono stati misurati nei policheti esposti ai sedimenti **RSM-A 8** e **RSM-C 8**.

Queste valutazioni trovano conferma dall'elaborazione complessiva dei dati di bioaccumulo attraverso l'applicazione dei criteri di integrazione ponderata che considerano, nel loro insieme, il numero, la tipologia e l'entità delle differenze di concentrazione misurate per i vari elementi nei policheti esposti a diversi campioni di sedimenti. Il livello di pericolo per il bioaccumulo è stato elaborato come Assente o Basso in tutti gli organismi testati con i sedimenti estivi, senza differenze in funzione della piattaforma o della distanza di campionamento (Tabelle 17, 18 e 19). Situazione sostanzialmente simile nei campioni di dicembre, con l'unica eccezione dei sedimenti RSM-A8 e RSM-C8 che hanno determinato un bioaccumulo Medio negli organismi (Tabelle 20, 21 e 22).

La distribuzione percentuale delle classi di pericolo, dedotte per il bioaccumulo di metalli in *H. diversicolor* per le 3 piattaforme, è riassunta nelle Figure 34 e 35, relativamente ai risultati di luglio e dicembre: viene sempre evidenziata la netta prevalenza delle classi Assente e Basso. Le schede relative a tutte le elaborazioni svolte per ciascun sedimento testato sono disponibili nell'Allegato 11 per gli esperimenti di luglio e nell'Allegato 12 per quelli di dicembre.

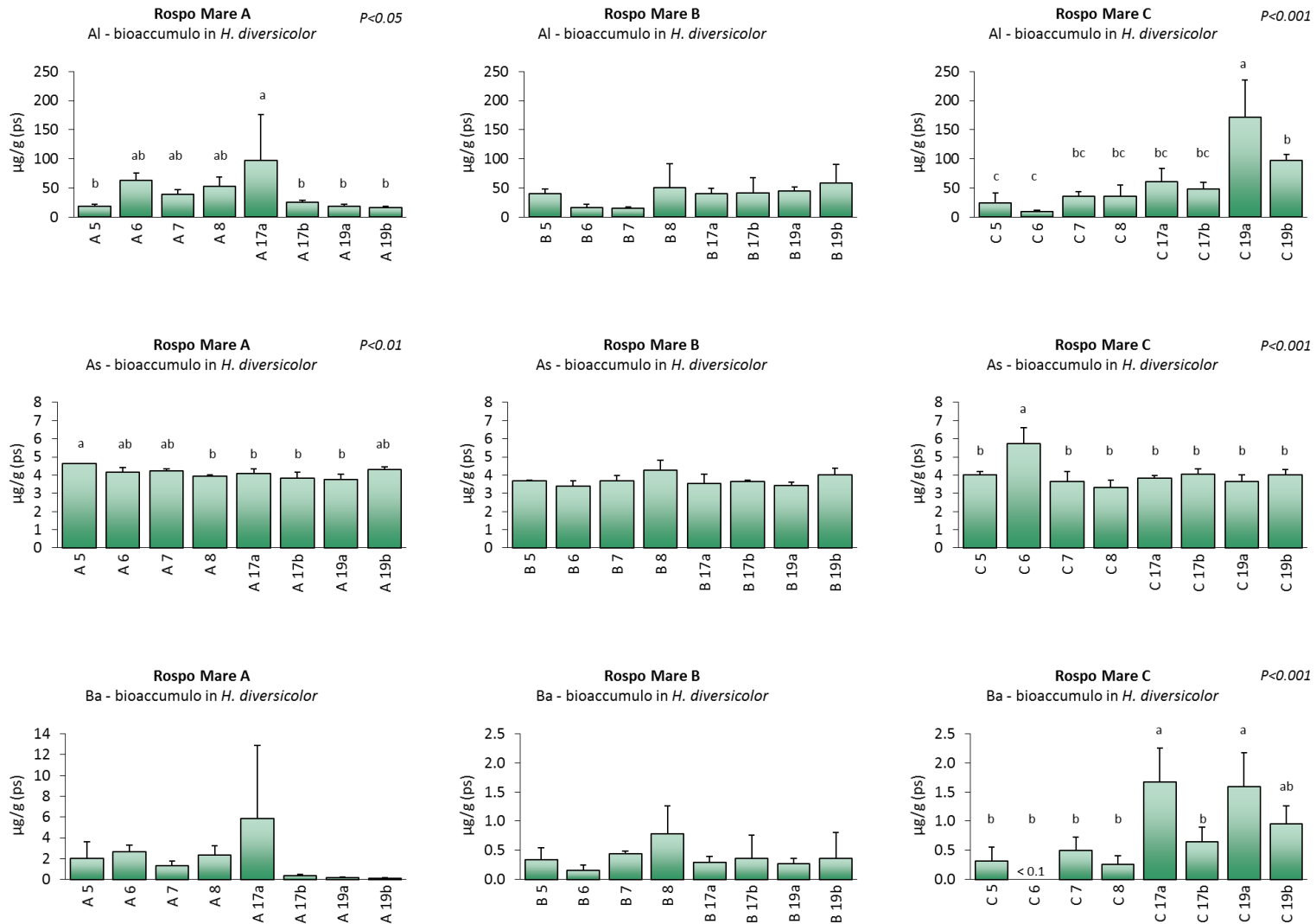


Figura 24. Concentrazioni di Al, As e Ba nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionati durante la campagna estiva (luglio 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.

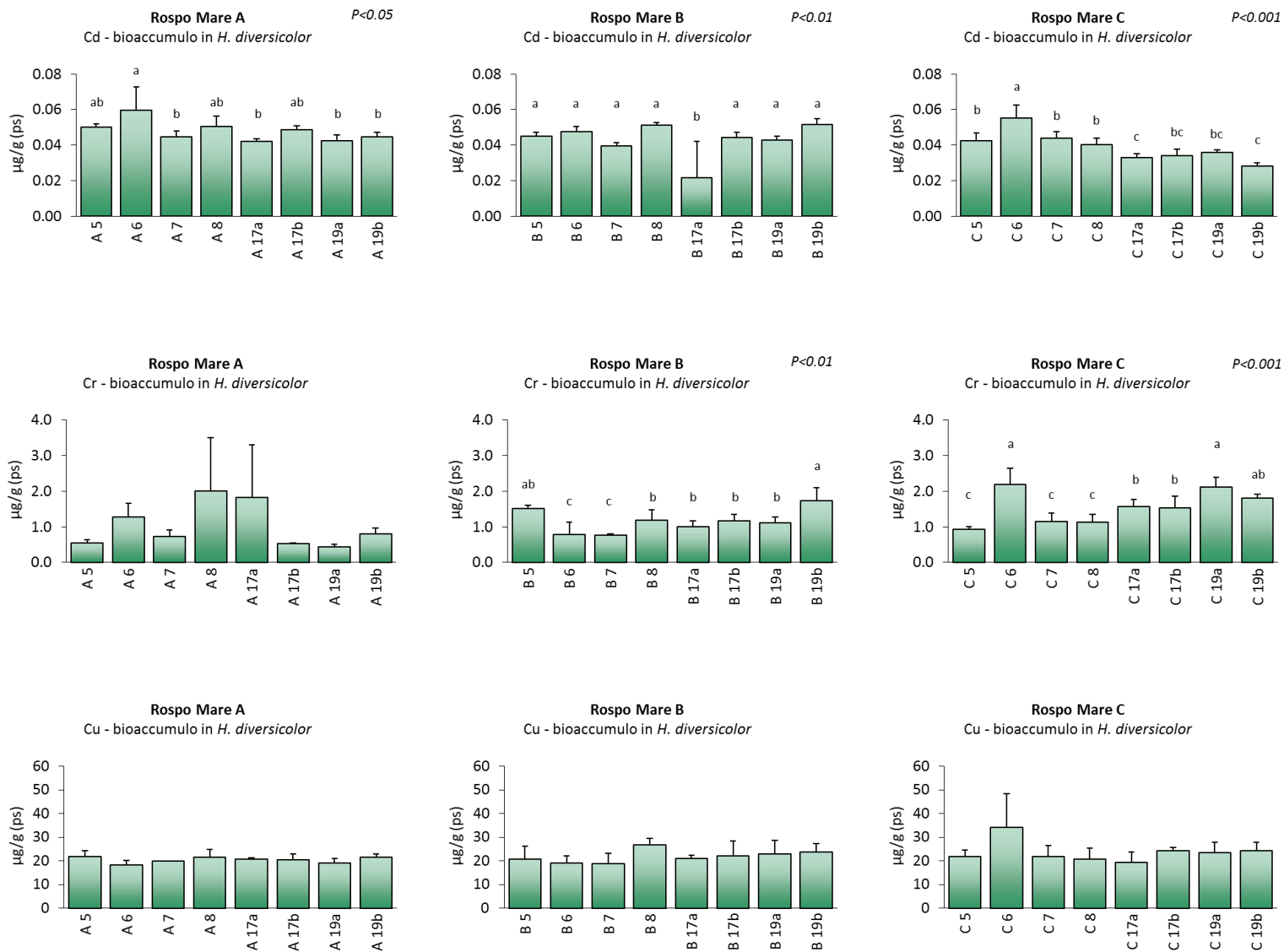


Figura 25. Concentrazioni di Cd, Cr e Cu nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionati durante la campagna estiva (luglio 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.

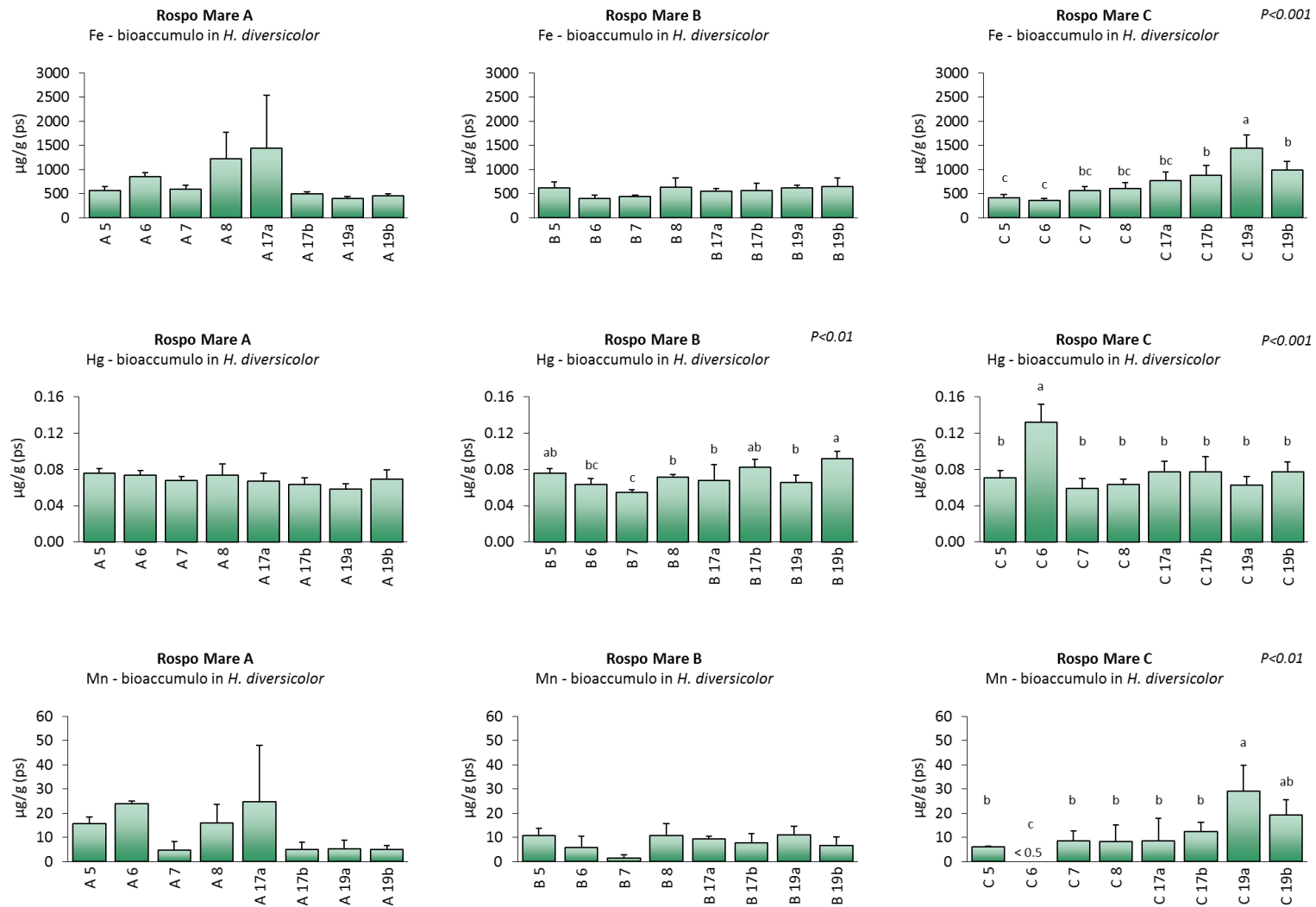


Figura 26. Concentrazioni di Fe, Hg e Mn nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionati durante la campagna estiva (luglio 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.

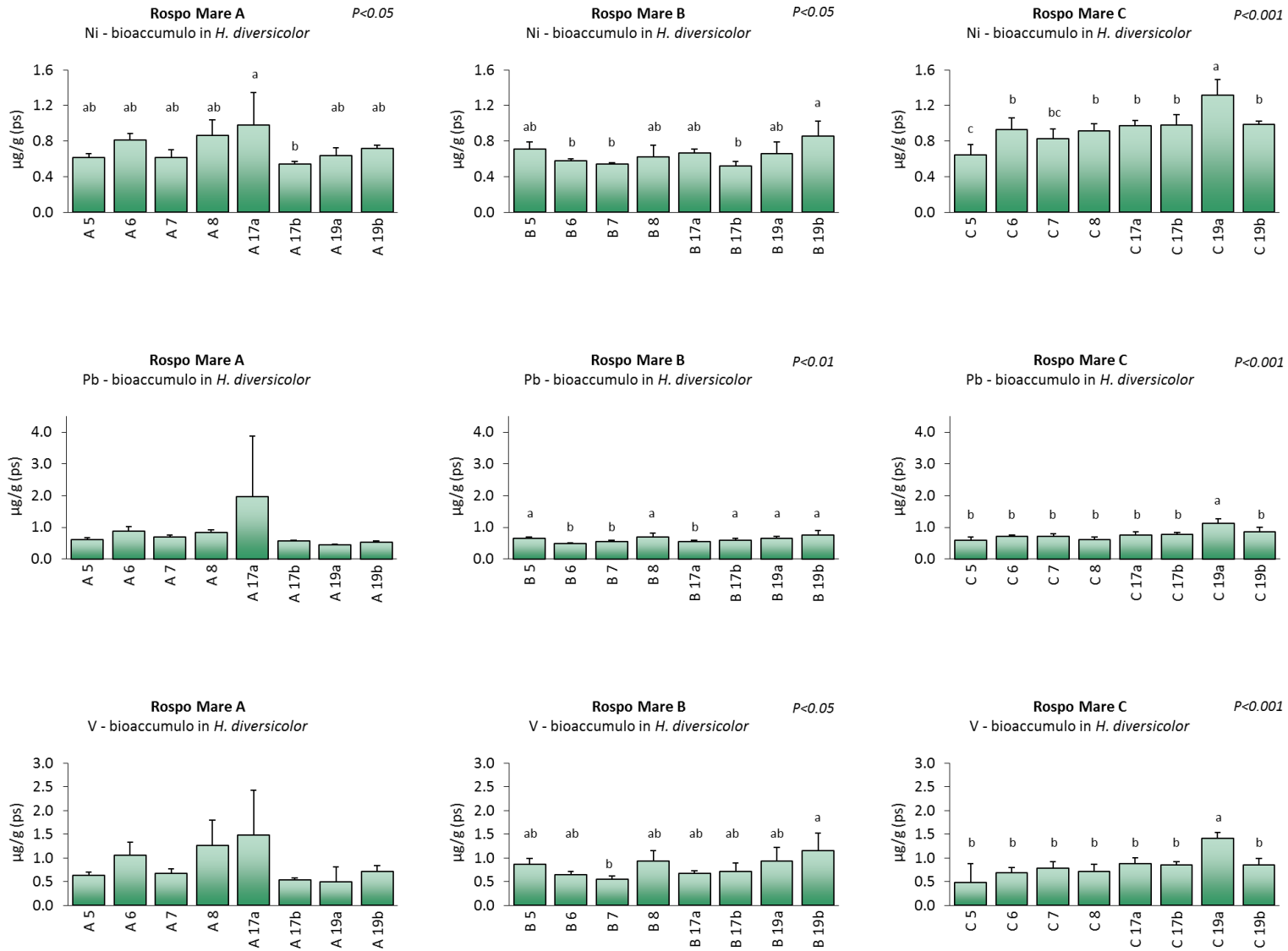


Figura 27. Concentrazioni di Ni, Pb e V nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionati durante la campagna estiva (luglio 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.

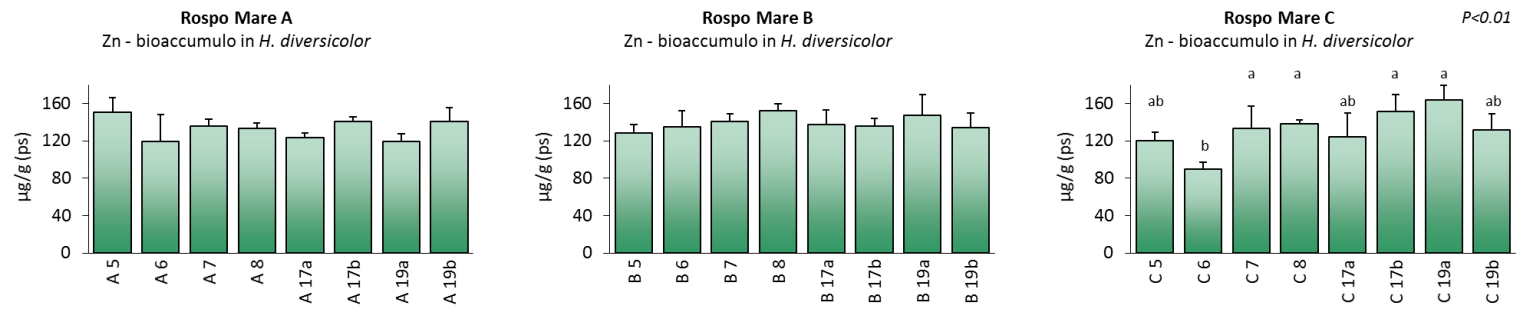


Figura 28. Concentrazioni di Zn nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionati durante la campagna estiva (luglio 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.

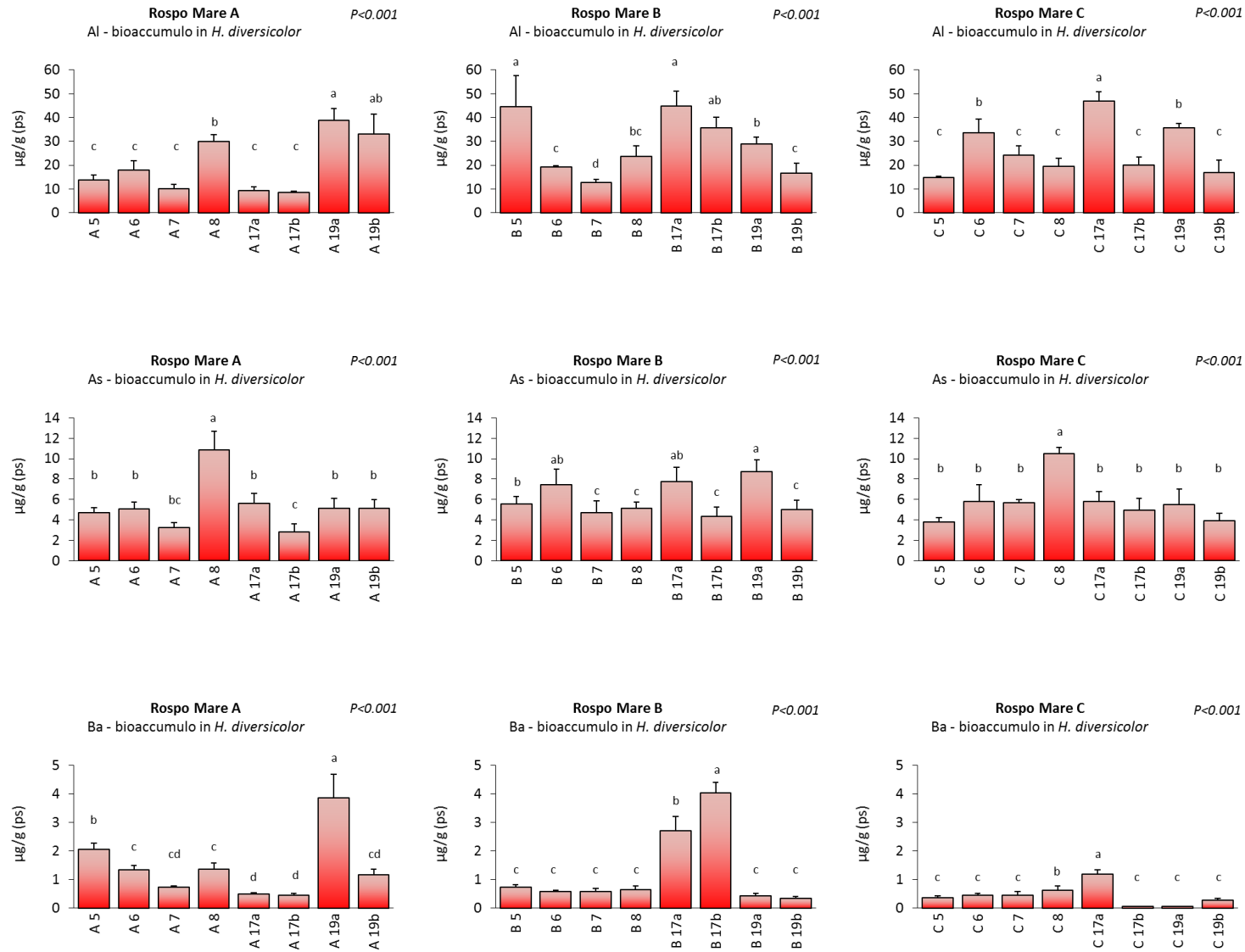


Figura 29. Concentrazioni di Al, As e Ba nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionate durante la campagna invernale (dicembre 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.

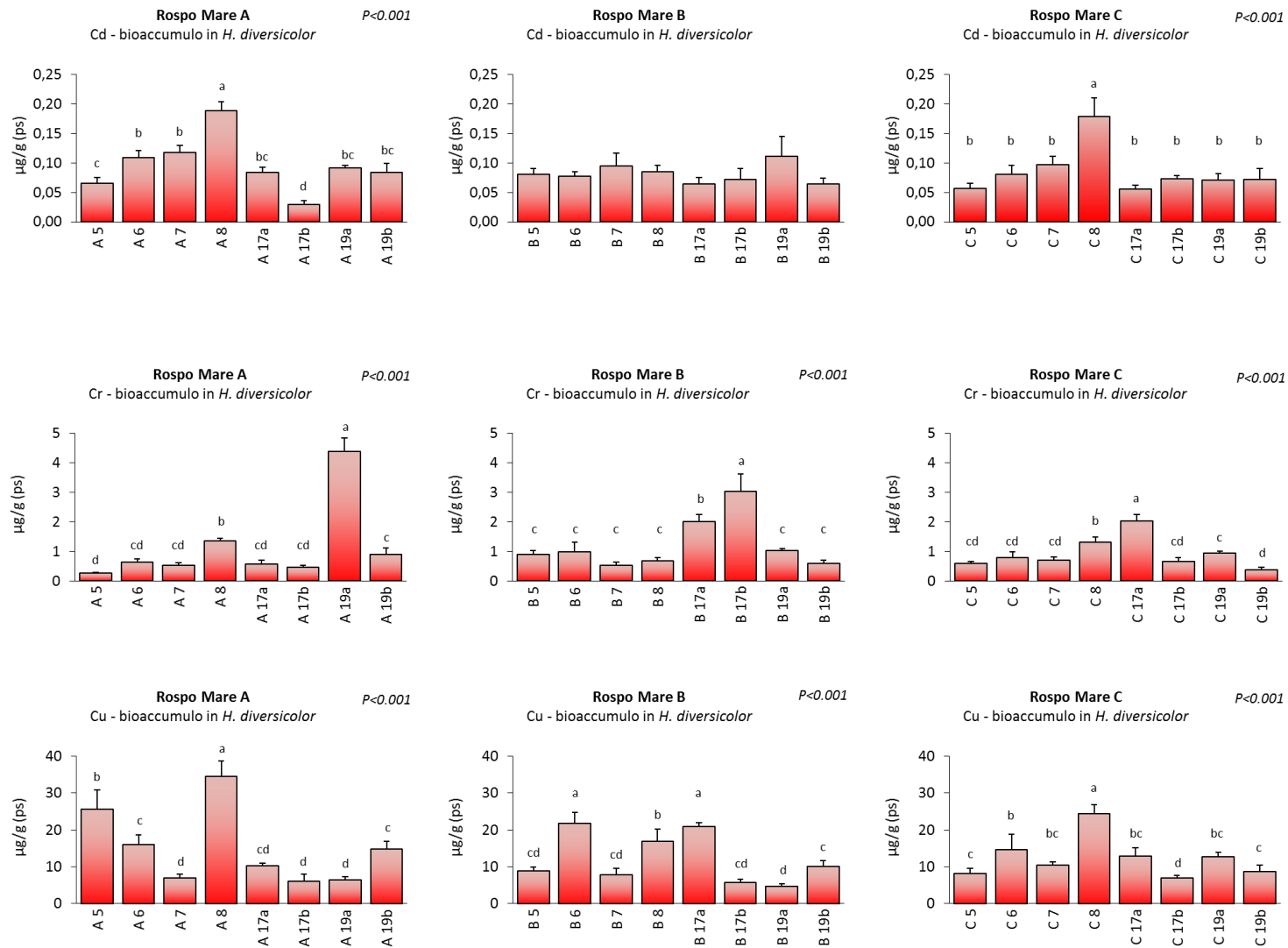


Figura 30. Concentrazioni di Cd, Cr e Cu nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionati durante la campagna invernale (dicembre 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.



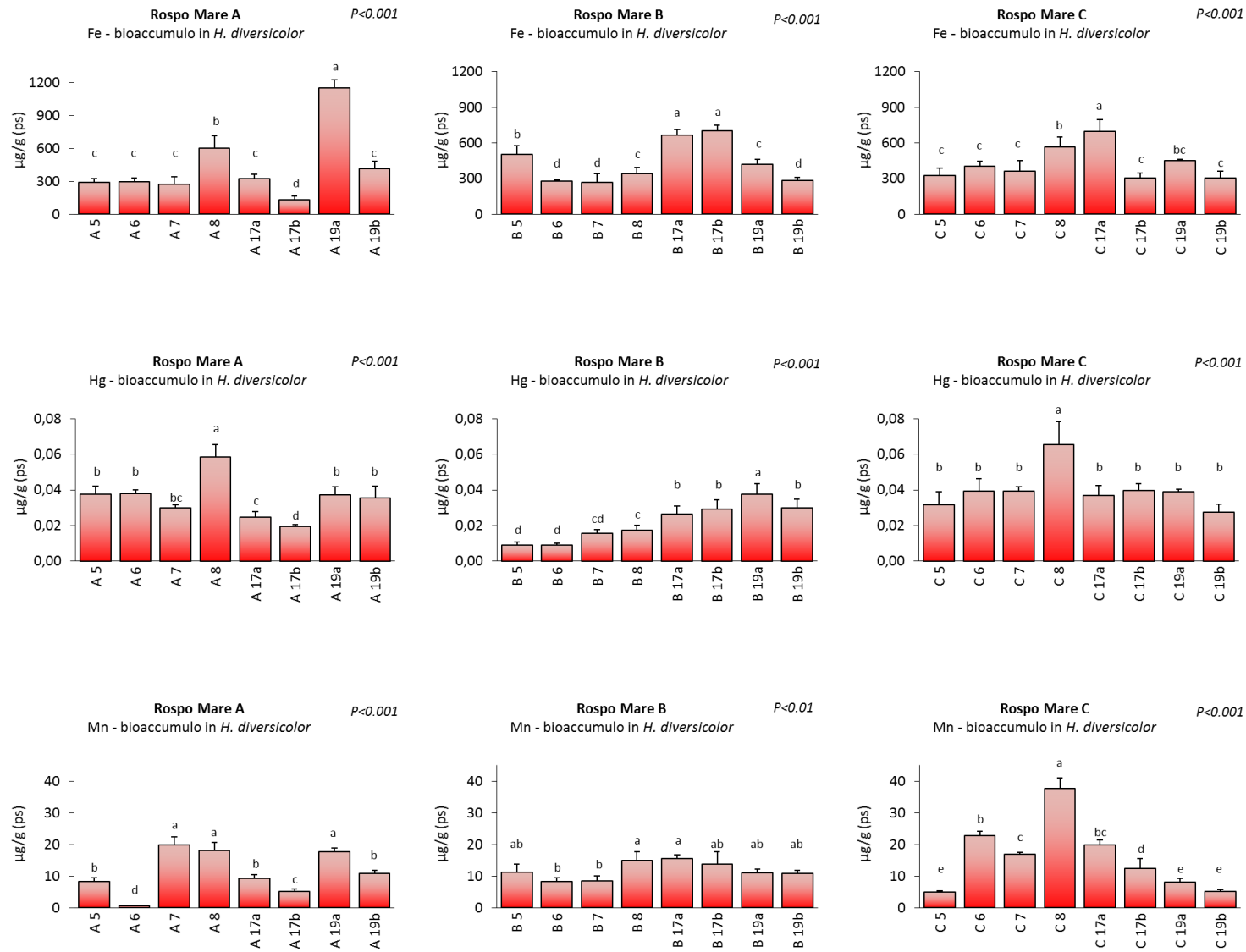


Figura 31. Concentrazioni di Fe, Hg e Mn nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionati durante la campagna invernale (dicembre 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in µg/g di sostanza secca.

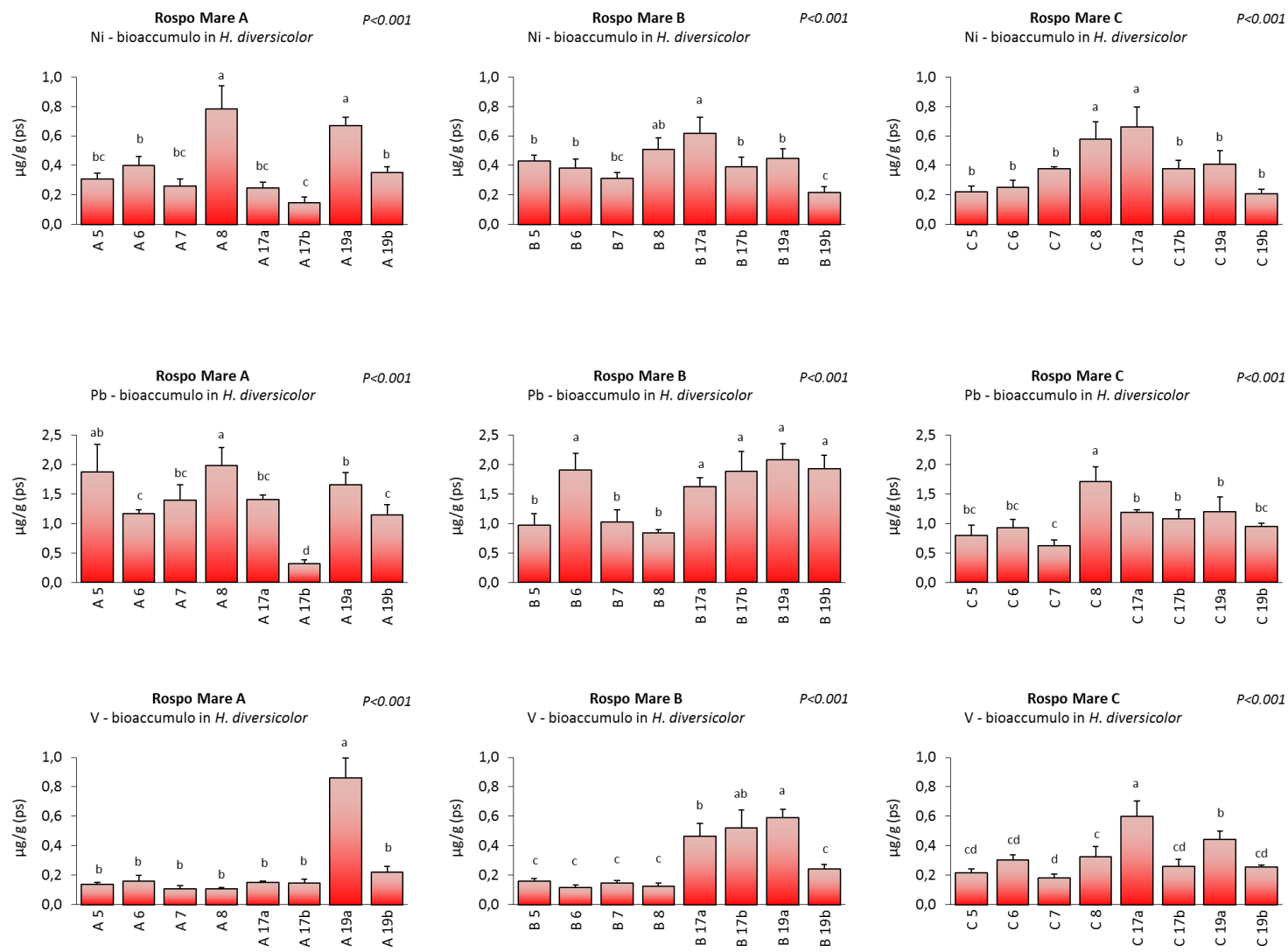


Figura 32. Concentrazioni di Ni, Pb e V nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionati durante la campagna invernale (dicembre 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.

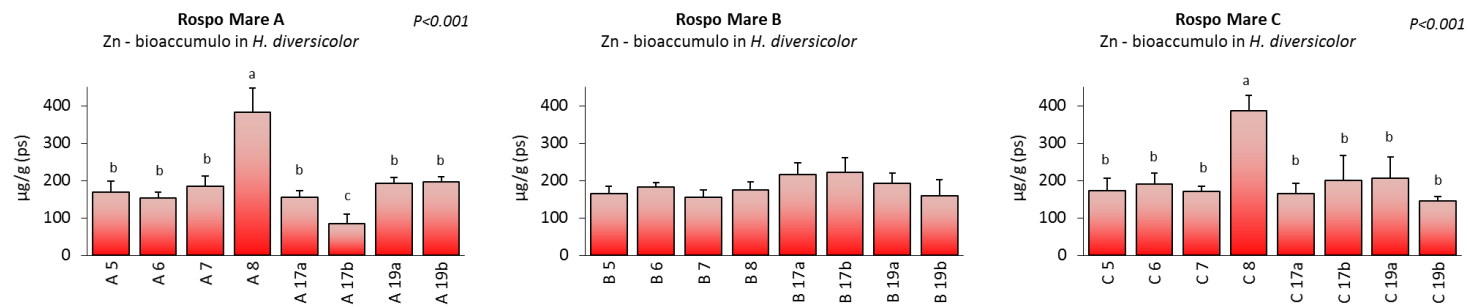


Figura 33. Concentrazioni di Zn nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle tre piattaforme campionati durante la campagna invernale (dicembre 2016). Valori medi  $\pm$  deviazioni standard, dati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.


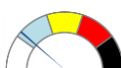

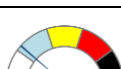
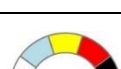


Stazione	Numero parametri assegnati alle diverse classi					Classe di pericolo	
	Assente	Basso	Medio	Alto	Molto Alto		
RSM-A5	11	2	0	0	0	BASSO	
RSM-A6	12	1	0	0	0	BASSO	
RSM-A7	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-A8	13	0	0	0	0	BASSO	
RSM-A17a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-A19a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	

Tabella 17. Risultati della elaborazione del pericolo biodisponibilità relativo ai metalli accumulati nei tessuti di *H. diversicolor* esposti a sedimenti della piattaforma RSM-A (campagna estiva, luglio 2016).

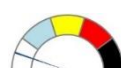
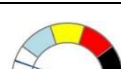
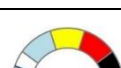
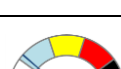



Stazione	Numero parametri assegnati alle diverse classi					Classe di pericolo	
	Assente	Basso	Medio	Alto	Molto Alto		
RSM-B5	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-B6	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-B7	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-B8	12	1	0	0	0	BASSO	
RSM-B17a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-B19a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	

Tabella 18. Risultati della elaborazione del pericolo biodisponibilità relativo ai metalli accumulati nei tessuti di *H. diversicolor* esposti a sedimenti della piattaforma RSM-B (campagna estiva, luglio 2016).

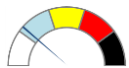
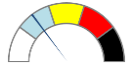




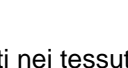
Stazione	Numero parametri assegnati alle diverse classi					Classe di pericolo	
	Assente	Basso	Medio	Alto	Molto Alto		
RSM-C5	12	1	0	0	0	BASSO	
RSM-C6	9	4	0	0	0	BASSO	
RSM-C7	12	1	0	0	0	BASSO	
RSM-C8	12	1	0	0	0	BASSO	
RSM-C17a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-C19a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	

Tabella 19. Risultati della elaborazione del pericolo biodisponibilità relativo ai metalli accumulati nei tessuti di *H. diversicolor* esposti a sedimenti della piattaforma RSM-C (campagna estiva, luglio 2016).

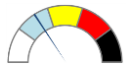





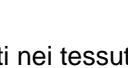
Stazione	Numero parametri assegnati alle diverse classi					Classe di pericolo	
	Assente	Basso	Medio	Alto	Molto Alto		
RSM-A5	11	1	1	0	0	BASSO	
RSM-A6	11	2	0	0	0	BASSO	
RSM-A7	11	2	0	0	0	BASSO	
RSM-A8	5	5	3	0	0	MEDIO	
RSM-A17a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-A19a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	

Tabella 20. Risultati della elaborazione del pericolo biodisponibilità relativo ai metalli accumulati nei tessuti di *H. diversicolor* esposti a sedimenti della piattaforma RSM-A (campagna invernale, dicembre 2016).

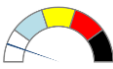
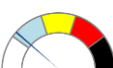
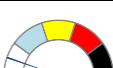
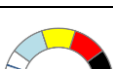
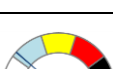
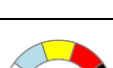

Stazione	Numero parametri assegnati alle diverse classi					Classe di pericolo	
	Assente	Basso	Medio	Alto	Molto Alto		
RSM-B5	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-B6	12	1	0	0	0	BASSO	
RSM-B7	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-B8	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-B17a.b	12	1	0	0	0	BASSO	
RSM-B19a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	

Tabella 21. Risultati della elaborazione del pericolo biodisponibilità relativo ai metalli accumulati nei tessuti di *H. diversicolor* esposti a sedimenti della piattaforma RSM-B (campagna invernale, dicembre 2016).

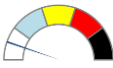
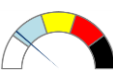
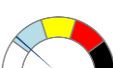
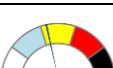
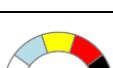
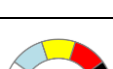
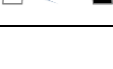
Stazione	Numero parametri assegnati alle diverse classi					Classe di pericolo	
	Assente	Basso	Medio	Alto	Molto Alto		
RSM-C5	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-C6	12	1	0	0	0	BASSO	
RSM-C7	12	1	0	0	0	BASSO	
RSM-C8	6	5	2	0	0	MEDIO	
RSM-C17a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	
RSM-C19a.b	13	0	0	0	0	ASSENTE	

Tabella 22. Risultati della elaborazione del pericolo biodisponibilità relativo ai metalli accumulati nei tessuti di *H. diversicolor* esposti a sedimenti della piattaforma RSM-C (campagna invernale, dicembre 2016).

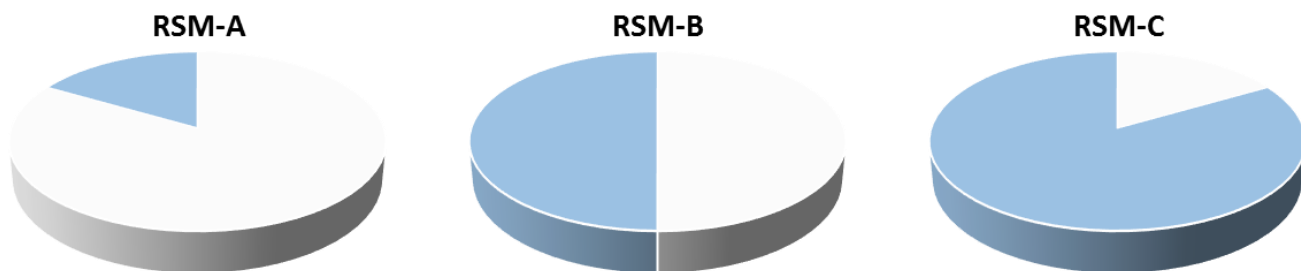


Figura 34. Classi di pericolo di biodisponibilità di metalli per *H. diversicolor* elaborate per i sedimenti raccolti nel luglio 2016. Le classi di pericolo sono espresse tramite i seguenti colori: bianco: assente; verde: trascurabile; celeste: basso; giallo: medio; rosso: alto; nero: molto alto.

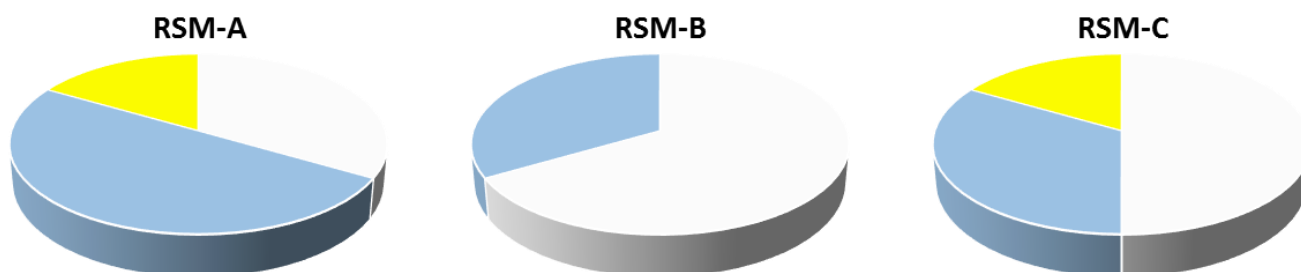


Figura 35. Classi di pericolo di biodisponibilità di metalli per *H. diversicolor* elaborate per i sedimenti raccolti nel dicembre 2016. Le classi di pericolo sono espresse tramite i seguenti colori: bianco: assente; verde: trascurabile; celeste: basso; giallo: medio; rosso: alto; nero: molto alto.

#### **4.2.2 Bioaccumulo di metalli in traccia, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici nei mitili naturali e trapiantati**

Le concentrazioni di metalli misurate nelle intere parti molli dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) non hanno mai evidenziato fenomeni di aumentato bioaccumulo in prossimità delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C. I livelli medi nei tessuti degli organismi naturali, prelevati direttamente dai piloni delle piattaforme, sono sempre paragonabili a quelli misurati in mitili di controllo e, con pochissime eccezioni, del tutto simili anche a quelli osservati nei mitili trapiantati, ovvero organismi che dalla popolazione di riferimento sono stati traslocati per circa 5 settimane in prossimità delle piattaforme investigate (Figure 36, 37, 38, 39 e Tabelle I e IV dell'Allegato 6). Valori molto simili tra tutte le diverse condizioni sperimentali sono stati evidenziati per arsenico, bario, cadmio, cromo, rame, vanadio e zinco. Le concentrazioni di **arsenico** sono sempre comprese tra 8 e 10 µg/g nei mitili naturali e pari a circa 11 µg/g in quelli di riferimento; i livelli nei mitili traslocati sono 14-15 µg/g e 12 µg/g in quelli di riferimento. Il **bario** oscilla tra 1.2 e 5 µg/g nei mitili naturali, ed è 3.4 µg/g nei mitili di riferimento; anche nei mitili trapiantati i valori si aggirano tra 3 e 4 µg/g. I livelli di **cadmio** sono molto simili in tutti i mitili analizzati, sia naturali che trapiantati compresi i rispettivi riferimenti, oscillando tra 0.4 e 0.7 µg/g. Anche il **cromo** mostra concentrazioni uniformi comprese tra 0.7 e 2 µg/g. Il **rame** varia da 0.8 a 1.6 µg/g nei mitili naturali, da circa 1.1 a 1.5 in quelli trapiantati, con valori di 1.7 µg/g nei rispettivi riferimenti. I livelli medi di **vanadio** sono compresi nell'intervallo 0.3-0.7 µg/g nei mitili naturali, in quelli trapiantati e in quelli di riferimento, mentre lo **zinco** oscilla tra 55 e 140 µg/g nei mitili naturali, e tra circa 80 e 113 µg/g nei mitili trapiantati, inclusi gli organismi di riferimento.

Per quanto riguarda alluminio e mercurio, concentrazioni tendenzialmente maggiori sono addirittura state misurate nei mitili di riferimento, tra 5 e 30 µg/g per l'**alluminio**, tra 0.03 e 0.08 µg/g per il **mercurio**. Gli unici elementi che hanno mostrato valori leggermente più alti nei mitili naturali delle piattaforme, sono nichel e piombo; per il **nichel**, le concentrazioni medie nei mitili di controllo non superano gli 0.05 µg/g, mentre oscillano nell'intervallo di 0.15-0.22 µg/g negli organismi delle piattaforme. Analogamente il **piombo** mostra un livello pari a 0.3-0.4 µg/g nei tessuti dei mitili di riferimento ed in quelli trapiantati, mentre le sue concentrazioni medie oscillano tra 1.2 e 2 µg/g nei mitili naturali delle piattaforme. Va comunque sottolineato sin da adesso che, anche per questi elementi, le concentrazioni misurate possono essere considerate come estremamente basse.

La Figura 40 mostra i livelli medi di idrocarburi policiclici aromatici a basso peso molecolare (due o tre anelli benzenici), quelli ad alto peso molecolare (4 e 5 anelli aromatici), ed i valori di IPA totali nei tessuti dei mitili naturali e trapiantati.

Per quanto riguarda gli **IPA a basso peso molecolare**, le concentrazioni variano tra 150 e 220 ng/g nei mitili naturali prelevati dalle piattaforme, tra 200 e 250 ng/g in quelli trapiantati ed intorno a 250 nei mitili utilizzati come riferimenti. Gli **IPA ad alto peso molecolare** sono molto più bassi e variano tra 5 e 18 ng/g nei mitili naturali, 4 ng/g in quelli di riferimento, tra 5 e 7 ng/g nei mitili trapiantati e



nei rispettivi organismi di riferimento. I livelli di **IPA totali** mostrano un andamento simile a quello dei congeneri a basso peso molecolare, risultando pressoché simili in tutte le condizioni sperimentali, con concentrazioni medie tra 150 e 250 ng/g.

Oltre il 90% degli IPA totali nei mitili naturali delle piattaforme sono costituiti da congeneri a basso peso molecolare, profilo del tutto simile a quello osservato anche negli organismi di riferimento ed in quelli trapiantati. La distribuzione dei vari congeneri risulta piuttosto uniforme e costante in tutti i mitili analizzati, come riportato nelle Tabelle II e V dell'Allegato 6.

Le concentrazioni medie di **idrocarburi alifatici totali** (C10-C40) oscillano tra 250 e 520 µg/g, nelle intere parti molli di mitili dei riferimento e di quelli delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C (Figura 41), con l'eccezione dei mitili del punto RSM C-I, che mostrano valori di circa 1200 µg/g. Differenze abbastanza evidenti, anche se non statisticamente significative in virtù di una elevata variabilità, sono state ottenute per i mitili trapiantati; in questo caso, valori medi di 250 µg/g sono stati misurati nei mitili di riferimento ed in quelli traslocati nella piattaforma RSM-B, mentre le concentrazioni raggiungono i 750 µg/g nei mitili traslocati nelle piattaforme RSM-A e RSM-C. Questi dati sono parzialmente in linea con i livelli più elevati misurati nei mitili naturali di RSM C-I, ma non trovano riscontri se si confrontano con i risultati ottenuti per la piattaforma RSM-A. Le Tabelle III e VI dell'Allegato 6 riportano la distribuzione dei singoli idrocarburi che risulta piuttosto uniforme, con un contributo importante della componente compresa nell'intervallo C16-C22 che rappresenta il 35-42% degli idrocarburi totali nei mitili naturali e trapiantati (40-47% in quelli di riferimento); la componente C30-C36 contribuisce ad un ulteriore 25-40% del contenuto totale di idrocarburi nei mitili naturali e al 32-48% in quelli trapiantati (circa 22-30% in quelli di riferimento). Vi è sempre uno scarso contributo dei C22-C30 e dei C36-C38.

L'elaborazione complessiva dei risultati tramite i criteri di integrazione ponderata ha confermato un livello di bioaccumulo Basso o Assente in tutti i mitili delle piattaforme, sia in quelli naturali che in quelli trapiantati (Tabella 23, Figura 42 e schede delle elaborazioni per il bioaccumulo nei mitili dell'Allegato 13).

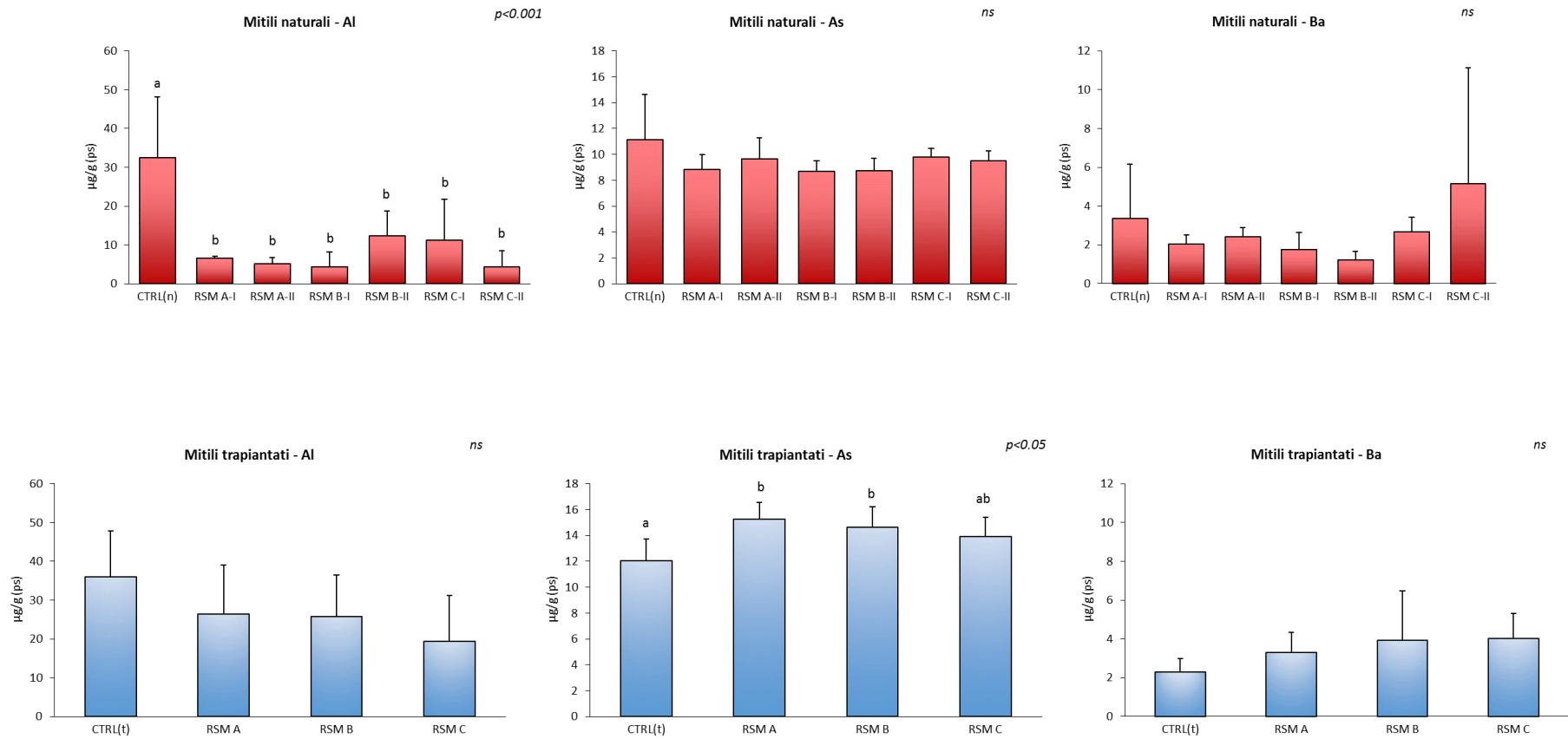


Figura 36. Concentrazioni di Al, As e Ba nei tessuti dei mitili naturali e trapiantati delle 3 piattaforme del Campo Rosso e relativi controlli (µg/g, peso secco, valori espressi come media ± deviazione standard, n=5).

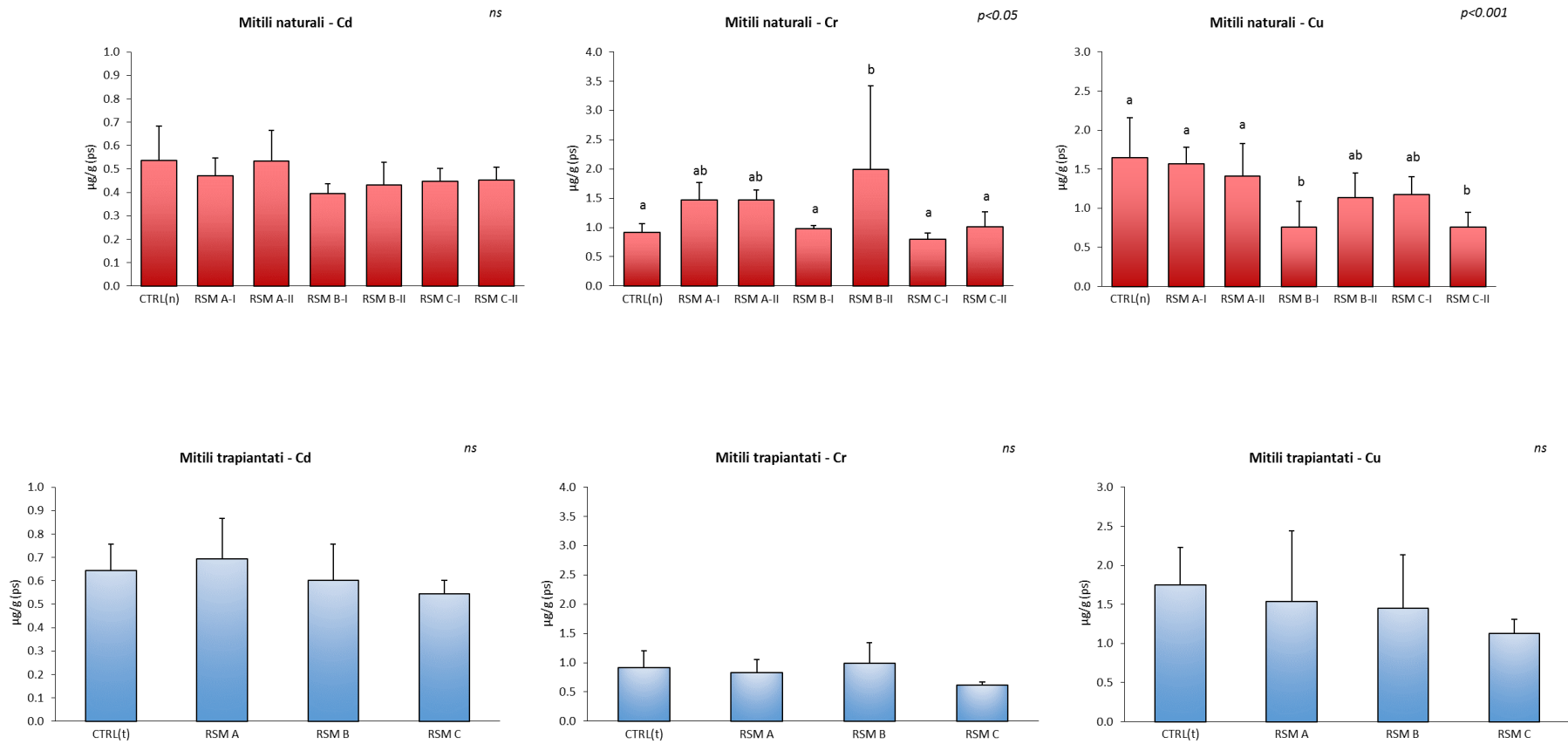


Figura 37. Concentrazioni di Cd, Cr e Cu nei tessuti dei mitili naturali e trapiantati delle 3 piattaforme del Campo Rospo e relativi controlli (µg/g, peso secco, valori espressi come media ± deviazione standard, n=5).

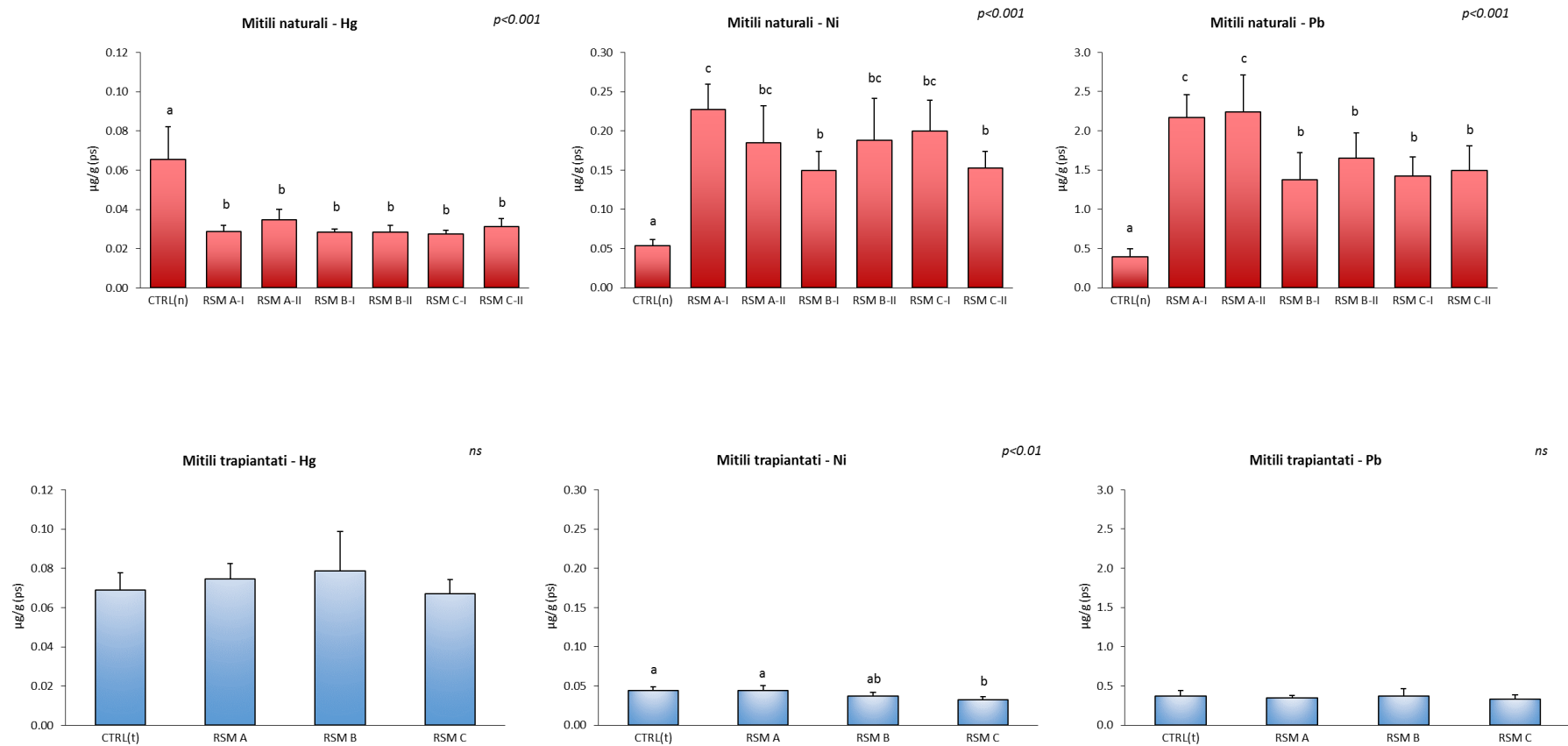


Figura 38. Concentrazioni di Hg, Ni e Pb nei tessuti dei mitili naturali e trapiantati delle 3 piattaforme del Campo Rosso e relativi controlli (µg/g, peso secco, valori espressi come media ± deviazione standard, n=5).

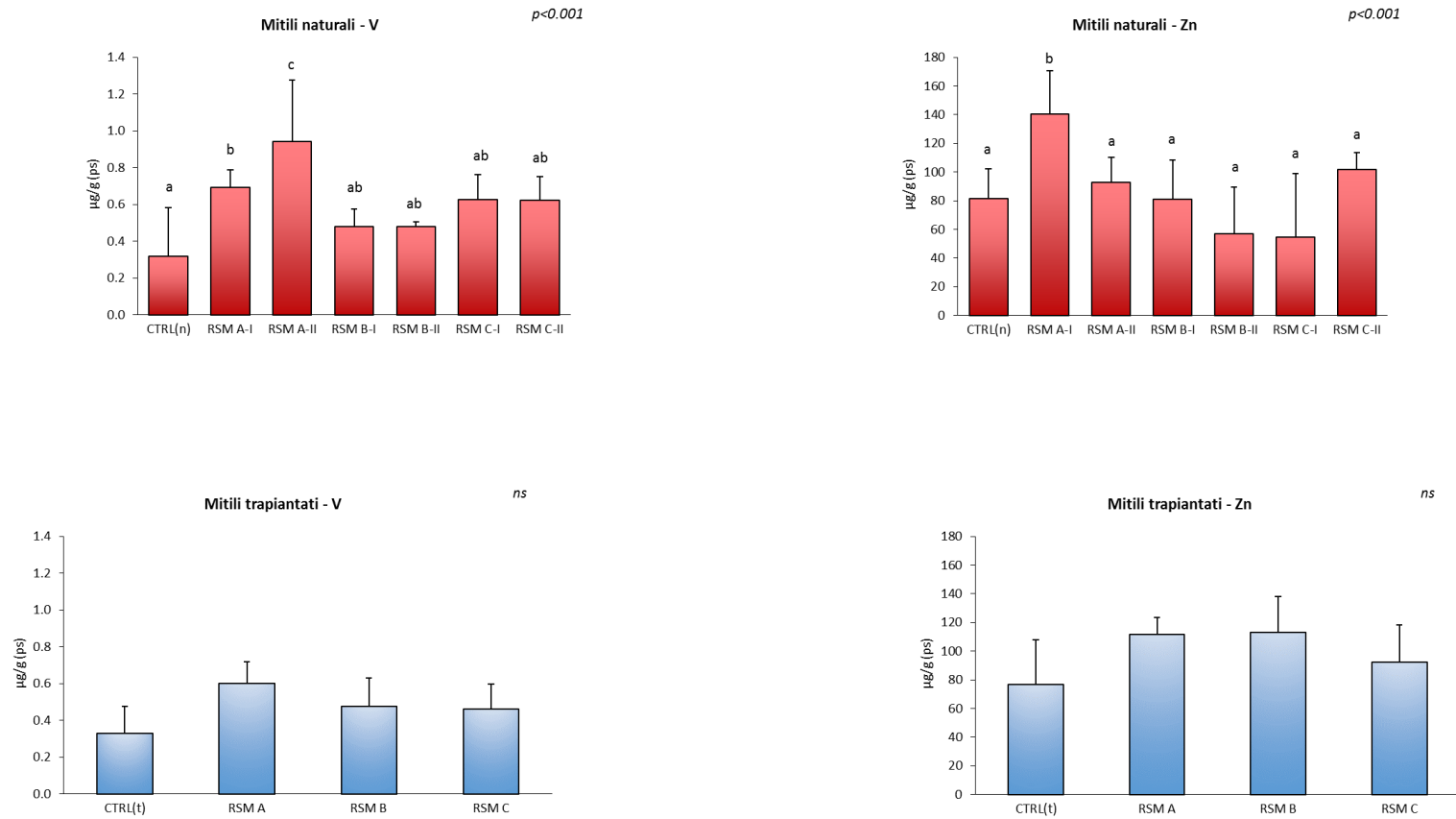


Figura 39. Concentrazioni di V e Zn nei tessuti dei mitili naturali e trapiantati delle 3 piattaforme del Campo Rosso e relativi controlli (µg/g, peso secco, valori espressi come media ± deviazione standard, n=5).

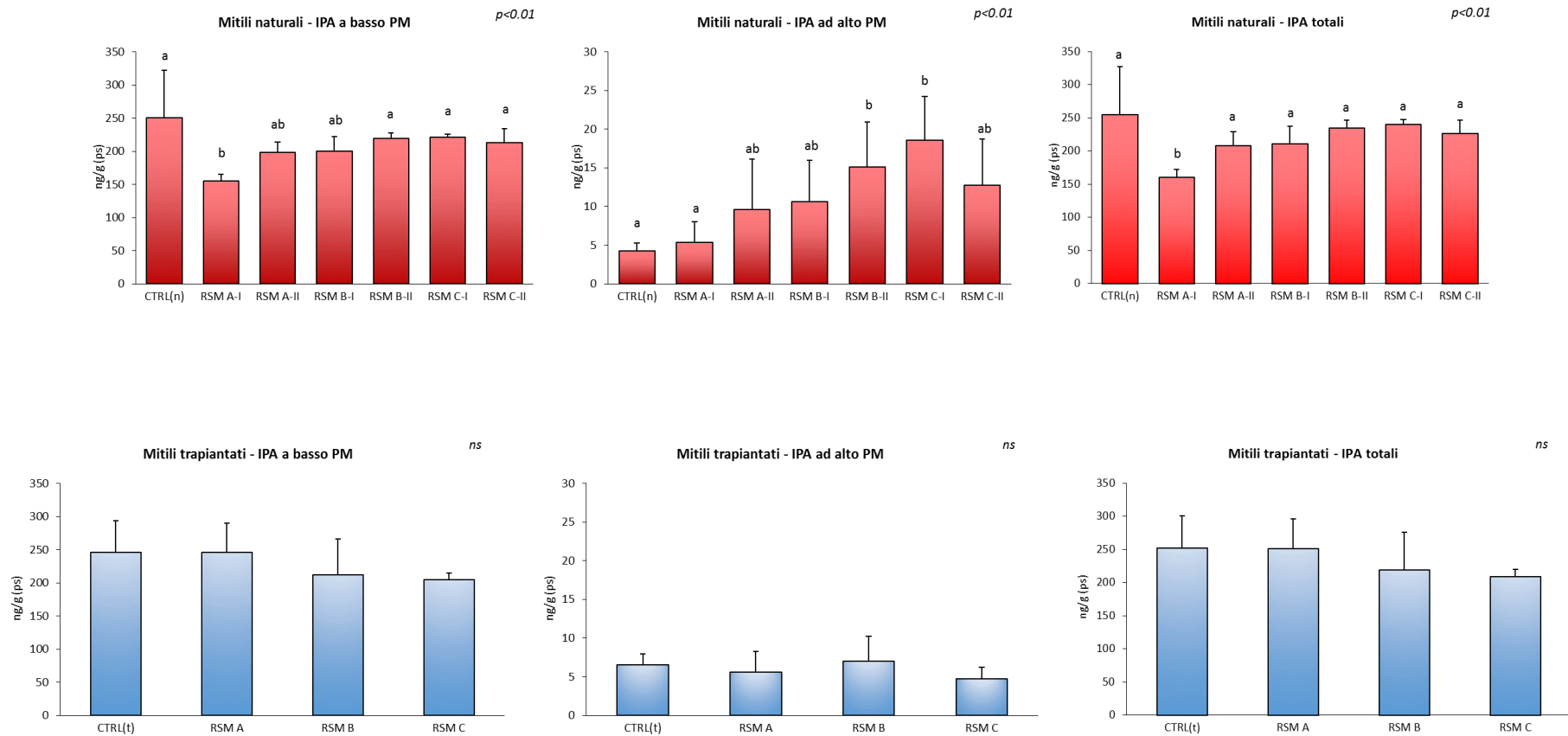


Figura 40. Concentrazioni di idrocarburi policiclici aromatici a basso peso molecolare, alto peso molecolare e totali nei tessuti dei mitili naturali e trapiantati delle 3 piattaforme del Campo Rospo e relativi controlli (ng/g, peso secco, valori espressi come media  $\pm$  deviazione standard, n=5).

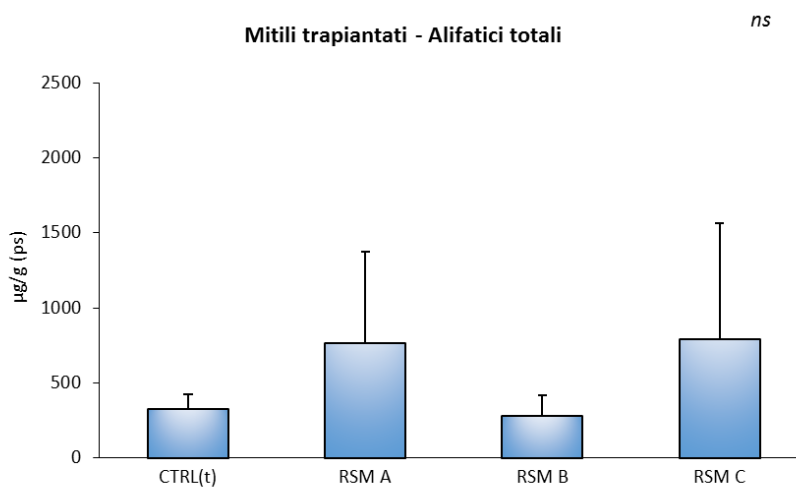
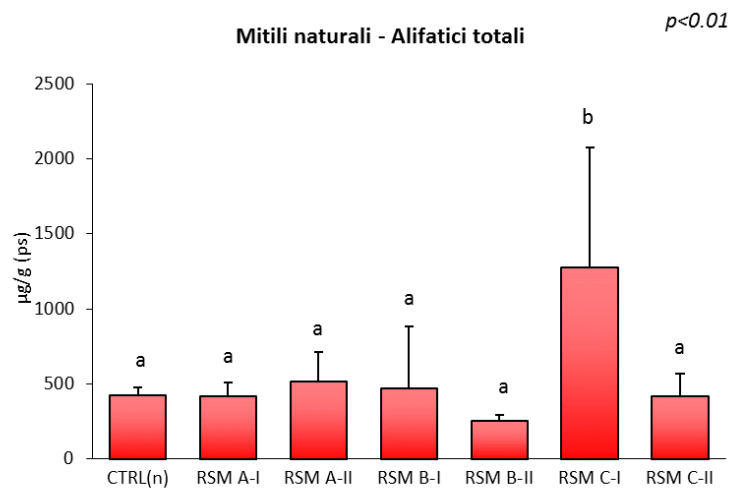


Figura 41. Concentrazioni di idrocarburi alifatici totali (C10-C40) nei tessuti dei mitili naturali e trapiantati delle 3 piattaforme del Campo Rospo e relativi controlli (µg/g, peso secco, valori espressi come media ± deviazione standard, n=5).

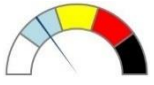

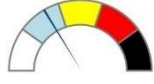
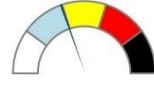
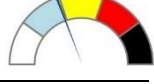
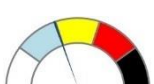
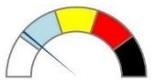
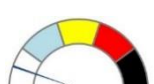
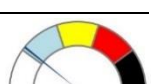
Stazione	Numero parametri assegnati alle diverse classi					Classe di pericolo	
	Assente	Basso	Medio	Alto	Molto Alto		
N-RSMA-I	28	3	2	0	0	BASSO	
N-RSMA-II	28	1	4	0	0	BASSO	
N-RSMB-I	28	2	3	0	0	BASSO	
N-RSMB-II	29	0	3	1	0	BASSO	
N-RSMC-I	26	2	5	0	0	BASSO	
N-RSMC-II	29	0	3	1	0	BASSO	
T-RSMA	31	2	0	0	0	BASSO	
T-RSMB	33	0	0	0	0	ASSENTE	
T-RSMC	32	1	0	0	0	BASSO	

Tabella 23. Risultati della elaborazione complessiva del pericolo di bioaccumulo di metalli, idrocarburi policiclici aromatici ed idrocarburi alifatici nei tessuti di mitili naturali e trapiantati delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C.

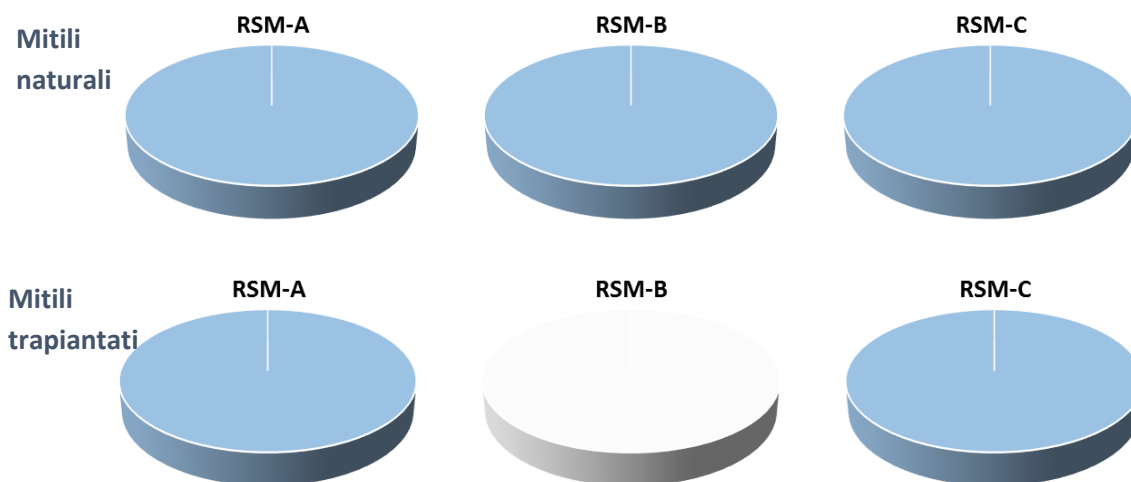


Figura 42. Distribuzione delle classi di pericolo di biodisponibilità elaborate mediante criteri di integrazione ponderata su tutti i dati di bioaccumulo nei mitili naturali e trapiantati delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C.



### **4.2.3 Risposte dei biomarker nei mitili naturali e trapiantati**

Le risposte biologiche (biomarker) analizzate nei mitili naturali ed in quelli trapiantati sui piloni di ciascuna delle 3 piattaforme off-shore del campo Rospo Mare sono state le seguenti: stabilità delle membrane lisosomiali, parametro estremamente sensibile, indicativo dello stato di salute generale dell'organismo e della comparsa precoce di condizioni di stress ossidativo; alterazione nella percentuale di fagocitosi e rapporto granulociti/ialinociti indicativi di alterazioni di tipo immunitario; livelli di metallotioneine, proteine citosoliche indotte dalla esposizione ad alcuni metalli pesanti; attività dell'acetilcolinesterasi scelta come biomarker di neurotossicità; analisi delle difese antiossidanti, utilizzate come biomarker generali dello stato di salute degli organismi, estremamente sensibili nell'evidenziare variate condizioni di pressione ossidativa (catalasi, glutazione S-transferasi, glutazione reduttasi, glutazione perossidasi Se-dipendenti e Se-indipendenti, glutazione); capacità antiossidante totale, che misura l'efficienza complessiva dei tessuti di neutralizzare diverse forme di specie reattive dell'ossigeno, integrando i risultati delle singole difese antiossidanti ma con un importante valore predittivo sull'insorgenza di possibili forme di tossicità a livello cellulare e di organismo; contenuto di malondialdeide, uno dei principali composti che si formano durante i processi di perossidazione lipidica a carico delle membrane cellulari; frammentazione del DNA e insorgenza dei micronuclei, parametri indicativi di alterazione genotossica.

I risultati relativi a queste risposte biologiche nei mitili naturali prelevati dalle piattaforme Rospo Mare-A, Rospo Mare-B e Rospo Mare-C, sono mostrati nelle Figure 43 e 44 e nella Tabella I dell'Allegato 7.

Per quanto riguarda i biomarker di risposta immunitaria, l'analisi della stabilità delle membrane lisosomiali misurata nell'emolinfa dei mitili con il test tempo di ritenzione del rosso neutro non ha mostrato differenze tra gli organismi provenienti dai diversi siti, con valori che oscillano tra  $87.8 \pm 12.4$  e  $111 \pm 10.7$  minuti, in linea con quelli misurati nei mitili di controllo ( $115 \pm 10.1$  minuti, Figura 43). Differenze significative tra i mitili di controllo e quelli provenienti dai piloni delle piattaforme sono state osservate per quanto riguarda il rapporto tra granulociti e ialinociti, con valori medi compresi tra circa 2.3 e 7.5 nei mitili in prossimità delle strutture offshore, che risultano inferiori a quelli degli organismi di riferimento ( $11.1 \pm 1.1$ ) (Figura 43). Nonostante tali fluttuazioni, la capacità fagocitaria degli emociti, che oscilla tra  $27.7 \pm 5.5\%$  e  $48.1 \pm 4.3\%$ , è simile a quella misurata negli organismi di controllo (Figura 43). Per quanto riguarda i biomarker di risposta specifica, sono stati misurati livelli leggermente più alti di metallotioneine nei mitili prelevati dalle piattaforme, con valori che oscillano tra  $3.9 \pm 0.7$  e  $7.1 \pm 0.6$  nmol eq. (G)SH/mg proteine, rispetto a  $3.7 \pm 0.5$  nmol eq.(G)SH/mg proteine negli organismi di controllo (Figura 43). L'attività della acetilcolinesterasi è risultata simile tra i mitili delle diverse condizioni sperimentali, con valori che oscillano tra  $56.3 \pm 3.8$  e  $93.1 \pm 16.0$  nmol/min/mg proteine nei mitili delle piattaforme e  $79.5 \pm 10.3$  nmol/min/mg proteine nei mitili di riferimento (Figura 43).

Le analisi dei biomarker di stress ossidativo hanno mostrato lievi fluttuazioni limitate ad alcuni parametri in alcuni siti. Il contenuto di glutazione totale è risultato invariato nei mitili provenienti dai due siti delle diverse piattaforme, con valori pari a circa  $1.0 \mu\text{mol}/\text{gr}$  tessuto, del tutto paragonabili ai livelli misurati nei mitili di controllo ( $0.93 \pm 0.12 \mu\text{mol}/\text{gr}$  tessuto) (Figura 43). Per quanto riguarda gli enzimi antiossidanti, l'attività della catalasi è risultata significativamente più alta negli organismi provenienti da uno dei due siti della piattaforma A (RSM A-I) con valori di circa  $32.4 \pm 3.8 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine, rispetto a quelli misurati nei mitili di controllo ( $20.3 \pm 3.3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine); al contrario, nessuna variazione dell'attività della catalasi è stata osservata negli organismi provenienti dagli altri piloni e dalle altre piattaforme, con valori compresi tra  $15.1 \pm 0.5$  e  $26.0 \pm 9.3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine (Figura 43). L'attività delle glutazione S-transferasi è risultata simile nei mitili provenienti dai diversi piloni delle tre piattaforme ed in quelli dell'area di riferimento, con valori che oscillano tra  $109 \pm 8.5$  e  $152 \pm 26.4 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine per i mitili delle piattaforme e  $113 \pm 31.6 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine nei mitili di controllo (Figura 43). Analogamente, l'attività della glutazione reduttasi non ha mostrato differenze tra organismi provenienti da piloni e/o piattaforme differenti, e gli organismi di controllo, con valori misurati che vanno da  $12.3 \pm 3.3$  a  $18.4 \pm 3.8 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine (Figura 43).

Valori paragonabili sono stati misurati anche per quanto riguarda l'attività delle glutazione perossidasi che oscillano tra  $2.4 \pm 0.7$  e  $3.2 \pm 0.8 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine per le perossidasi Se-dipendenti, e tra  $6.7 \pm 0.6$  e  $10.4 \pm 2.2 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine per le perossidasi totali (Se-dipendenti e Se-indipendenti) (Figura 44). L'analisi della capacità antiossidante totale nei confronti del radicale perossilico (TOSC ROO•) ha mostrato una significativa riduzione seppur lieve negli organismi campionati nei due siti della piattaforma Rospo Mare A con valori rispettivamente pari a  $206 \pm 22$  UTOSC/mg proteine (RSM A-I),  $198 \pm 17.0$  UTOSC/mg proteine (RSM A-II) rispetto agli organismi provenienti dal sito di controllo con valori di  $281 \pm 48.0$  UTOSC/mg proteine. Al contrario, l'analisi della capacità antiossidante totale nei confronti del radicale idrossilico (TOSC HO•) non ha mostrato nessuna differenza significativa negli organismi provenienti dalle diverse piattaforme e il sito di riferimento con valori che oscillano rispettivamente tra  $220 \pm 10.7$ ,  $325 \pm 53.0$  e  $292 \pm 26.7$  UTOSC/mg proteine (Figura 44). Lievi differenze sul contenuto di malondialdeide sono state osservate in alcuni organismi provenienti dalle piattaforme Rospo Mare A e B rispetto agli organismi di riferimento, con valori di  $18.3 \pm 7.7 \text{ nmol}/\text{g}$  tessuto (RSM A-II)  $90.7 \pm 27.0 \text{ nmol}/\text{g}$  tessuto (RSM B-I) e  $61.2 \pm 19.8 \text{ nmol}/\text{g}$  tessuto nel controllo (Figura 44).

Per quanto riguarda il danno genotossico, alcune differenze sono state osservate tra gli organismi prelevati dalle piattaforme e quelli di controllo. In particolare, il grado di frammentazione del DNA espresso come % di DNA nella coda è risultato più elevato in tutti gli organismi prelevati nelle tre piattaforme rispetto a quello misurato negli organismi di controllo, con valori di frammentazione che oscillano tra  $45.6 \pm 2.8\%$  e  $62.4 \pm 9.0\%$ ; analogamente, anche la frequenza dei

micronuclei è risultata più elevata negli organismi delle piattaforme rispetto a quelli di controllo, con valori compresi tra  $1.2 \pm 0.3\%$  e  $2.6 \pm 0.3\%$  (Figura 44).

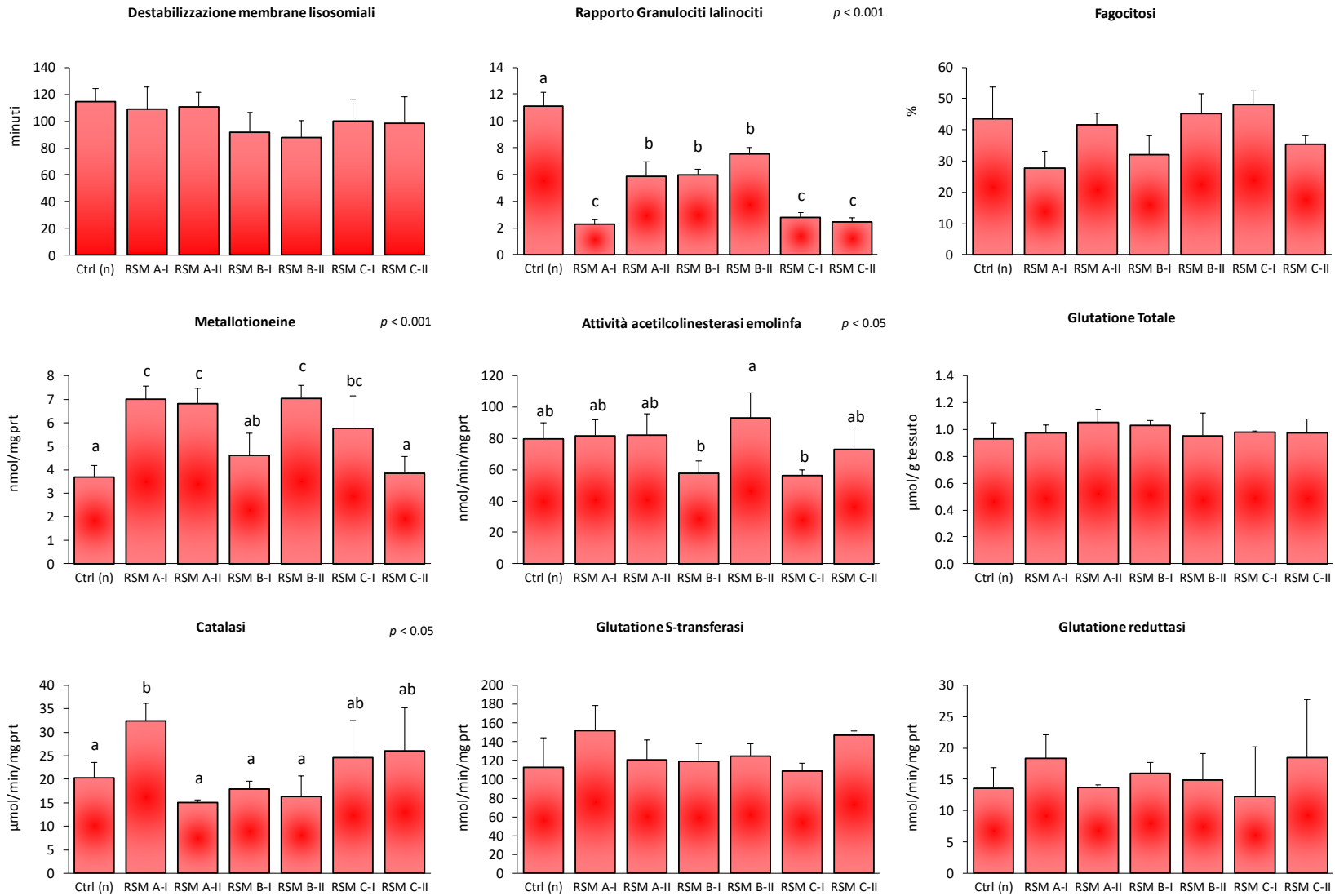


Figura 43. Biomarker analizzati nei mitili naturali prelevati durante la campagna di luglio 2016 dalle piattaforme RSM A, RSM B, RSM C e dal sito di controllo: destabilizzazione delle membrane lisosomiali, rapporto granulociti/ialinociti, fagocitosi, metallotioneine, attività di acetilcolinesterasi, glutazione totale, attività di catalasi, di glutazione S-transferasi e di glutazione riduttasi (medie  $\pm$  deviazioni standard, n=5).

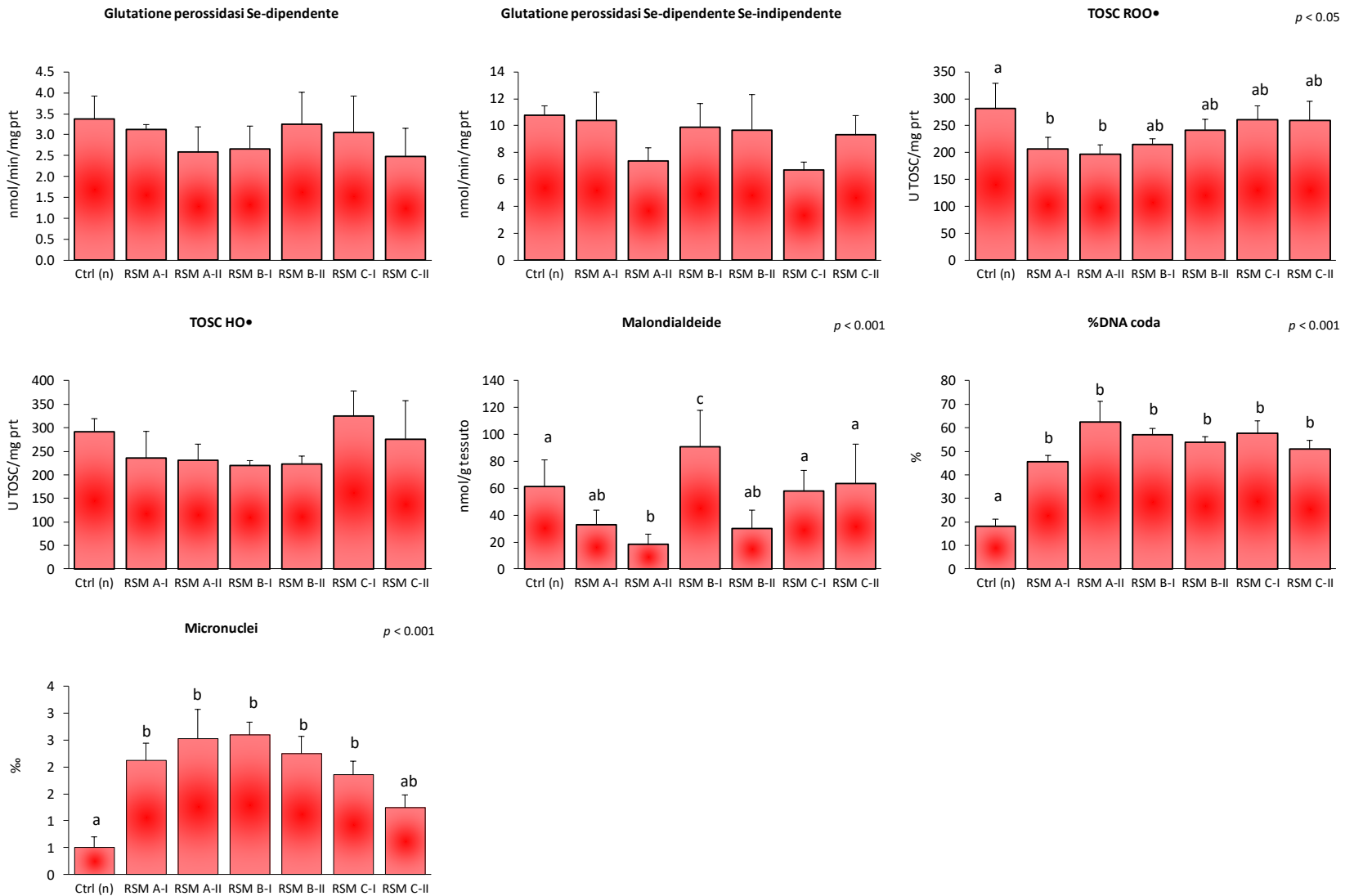


Figura 44. Biomarker analizzati nei mitili naturali prelevati durante la campagna di luglio 2016 dalle piattaforme RSM A, RSM B, RSM C e dal sito di controllo: attività di glutazione perossidasi, capacità antiossidante totale, livelli di malondialdeide e danno al DNA (medie  $\pm$  deviazioni standard, n=5).

Gli stessi parametri appena descritti sono stati analizzati anche nei tessuti dei mitili traslocati per un periodo di cinque settimane sulle piattaforme del Campo Rospo, ed i risultati sono rappresentati nelle Figure 45, 46 e nella Tabella II dell'Allegato 7. Per quanto riguarda le risposte immunitarie, i mitili trapiantati nelle diverse piattaforme non hanno evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa per quanto riguarda la destabilizzazione delle membrane lisosomiali, con valori compresi tra  $97.6 \pm 16.2$  e  $109 \pm 21.4$  minuti, in linea con quanto misurato negli organismi di controllo ( $102 \pm 11.9$  minuti) (Figura 45), e con risultati simili a quelli ottenuti nei mitili naturali. Il rapporto tra granulociti e ialinociti è risultato significativamente più elevato negli organismi trapiantati nella piattaforma Rospo Mare C ( $18.3 \pm 4.1$ ), sia rispetto ai mitili trapiantati nelle altre piattaforme sia rispetto ai mitili di controllo che hanno mostrato valori compresi tra  $8.2 \pm 1.0$  e  $10.0 \pm 2.2$  per le altre piattaforme e  $5.9 \pm 0.4$  per il controllo (Figura 45); il risultato ottenuto per i mitili trapiantati su RSM-C risulta quindi tendenzialmente maggiore anche rispetto a quello dei mitili naturali. Queste oscillazioni non hanno compromesso la capacità fagocitaria dei mitili che mostrano valori compresi tra  $36.2 \pm 2.3\%$  e  $41.5 \pm 2.3\%$  negli organismi trapiantati sulle piattaforme e  $34.4 \pm 3.5\%$  in quelli di riferimento (Figura 45), valori che non si discostano da quelli precedentemente descritti per i mitili naturali.

Per quanto riguarda i livelli di metallotioneine, gli organismi trapiantati nelle diverse piattaforme mostrano valori comparabili a quelli misurati negli organismi trapiantati nell'area di riferimento ed in linea con i range ottenuti per i mitili naturali: i valori sono compresi tra  $2.9 \pm 0.5$  e  $3.5 \pm 0.6$  nmol eq. (G)SH/mg proteine nei mitili trapiantati sulle piattaforme, e  $3.0 \pm 0.7$  nmol eq. (G)SH/mg proteine nei mitili di controllo (Figura 45). L'attività della acetilcolinesterasi è risultata significativamente più alta nell'emolinfa dei mitili trapiantati nella piattaforma Rospo Mare B ( $113 \pm 21.5$  nmol/min/mg proteine) rispetto a quella misurata nei mitili trapiantati nelle altre piattaforme (tra  $69.5 \pm 5.4$  nmol/min/mg proteine e  $85.7 \pm 7.6$  nmol/min/mg proteine) e in quelli di controllo ( $69.2 \pm 8.6$  nmol/min/mg proteine) (Figura 45). I risultati ottenuti per i mitili trapiantati su RSM-B sono tendenzialmente maggiori anche rispetto ai mitili naturali, mentre non si osservano variazioni degne di nota per gli altri gruppi di organismi analizzati.

Come per i mitili naturali, anche negli organismi trapiantati, le singole difese antiossidanti hanno mostrato variazioni molto limitate. Nello specifico, i livelli di glutazione totale sono comparabili in tutti gli organismi trapiantati nelle diverse piattaforme, con valori compresi tra  $1.1 \pm 0.2$  e  $1.3 \pm 0.3$   $\mu\text{mol/g}$  tessuto e quelli di controllo con valori pari a  $1.0 \pm 0.2$   $\mu\text{mol/g}$  tessuto (Figura 45): tali valori sono simili a quelli ottenuti per i mitili naturali. Anche l'attività della catalasi è risultata invariata tra gli organismi trapiantati nelle diverse aree, con valori che oscillano tra  $27.4 \pm 3.9$  e  $34.6 \pm 7.0$   $\mu\text{mol/min/mg}$  proteine (Figura 45), solo tendenzialmente maggiori rispetto a quelli precedentemente descritti per gli organismi naturali. Analogamente, l'attività delle glutazione S-transferasi non è risultata variare né tra i mitili trapiantati nelle diverse piattaforme né in relazione a quelli di controllo

con valori compresi tra  $84.7 \pm 18.8$  a  $103 \pm 9.8$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine (Figura 45): questi risultati indicano gli stessi livelli (o poco più bassi) di quelli misurati per gli organismi naturali. Al contrario, i mitili trapiantati nelle piattaforme Rospo Mare A e B hanno mostrato un aumento statisticamente significativo dell'attività della glutatione reduttasi con valori di  $16.0 \pm 0.8$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine (RSM-A) e  $18.0 \pm 3.3$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine (RSM-B), rispetto agli organismi di controllo ( $12.0 \pm 0.9$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine) e di quelli traslocati sulla piattaforma Rospo Mare C ( $13.8 \pm 1.0$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine) (Figura 45); nonostante tali differenze, i valori non si discostano in maniera rilevante dai range di fluttuazione osservati per i mitili naturali.

Nessuna variazione statisticamente significativa è stata riscontrata per le glutatione perossidasi, i cui valori risultano sempre tendenzialmente in linea con quelli già descritti per le popolazioni di mitili naturali: i valori delle forme Se-dipendenti oscillano tra  $2.2 \pm 0.3$  e  $3.1 \pm 0.1$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine nei mitili di piattaforma rispetto a  $2.7 \pm 0.7$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine del controllo, mentre la somma delle forme Se-dipendenti e Se-indipendenti varia tra  $7.6 \pm 1.6$  e  $8.8 \pm 2.8$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine nei mitili di piattaforma rispetto a  $7.1 \pm 2.0$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  proteine misurati nei mitili di controllo (Figura 46). Nessuna variazione è stata osservata per la capacità antiossidante totale nei confronti dei radicali perossilico e idrossilico (TOSC ROO• e TOSC HO•), con valori che oscillano tra  $231 \pm 33.4$  e  $252 \pm 21.0$  UTOSC/mg proteine per il radicale perossilico e tra  $274 \pm 20.7$  e  $286 \pm 27.0$  UTOSC/mg proteine per il radicale idrossilico (Figura 46), valori del tutto in linea con quelli ottenuti per i mitili naturali. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per il contenuto di malondialdeide, che ha mostrato valori compresi tra  $45.4 \pm 18.7$  e  $65.7 \pm 10.7$   $\text{nmol}/\text{g}$  tessuto nei mitili trapiantati nelle diverse piattaforme, e  $66.2 \pm 11.7$   $\text{nmol}/\text{g}$  tessuto nei mitili di controllo (Figura 46); benché i valori precedentemente misurati per i mitili naturali mostravano una maggiore variabilità, i range ottenuti risultano comunque pressoché sovrapponibili.

Infine, le risposte di danno genotossico non hanno evidenziato differenze nella frammentazione del DNA e nella frequenza dei micronuclei nei mitili trapiantati nelle diverse piattaforme rispetto a quelli trapiantati nel sito di riferimento, non confermando dunque i risultati ottenuti per gli organismi naturali. Per quanto riguarda la frammentazione del DNA, i valori bassi, che oscillano tra  $25.6 \pm 1.2\%$  e  $35.4 \pm 3.5\%$  negli organismi trapiantati nelle piattaforme sono lievemente ma non significativamente più elevati di quelli misurati negli organismi di controllo che mostrano una percentuale di frammentazione pari a  $23.6 \pm 0.9\%$ . Analogamente, la frequenza dei micronuclei non è variata in maniera statisticamente significativa tra i mitili di controllo e quelli trapiantati nelle piattaforme con una frequenza rispettivamente di  $0.5 \pm 0.2\%$  per i mitili traslocati nelle piattaforme RSM-A e RSM-B e  $1.2 \pm 0.3\%$  negli organismi di RSM-C (Figura 46).

Tutti i risultati dei biomarker ottenuti per le popolazioni di mitili naturali raccolti dai piloni delle tre piattaforme dell'area del Campo Rospo e per gli organismi traslocati per un periodo di cinque settimane negli stessi siti di indagine sono stati elaborati tramite l'applicazione di criteri di integrazione ponderata che riassumono un indice di pericolo basato sul numero e sulla rilevanza tossicologica dei biomarker che variano, sulla significatività statistica e sull'entità di tali variazioni rispetto a specifiche soglie di riferimento; i risultati di queste elaborazioni sono rappresentati nella Tabella 24 e nelle schede contenute nell'Allegato 14.

Per quanto riguarda i mitili naturali, il pericolo elaborato per i biomarker è stato Medio per gli organismi prelevati dalla piattaforma RSM-A e da uno dei piloni di RSM-C, e Basso in tutti gli altri punti di campionamento. Per quanto riguarda i mitili trapiantati, il pericolo elaborato per i biomarker è risultato Basso per tutte e 3 le piattaforme (Tabella 24).

Nelle Tabelle 25, 26 sono riportate le correlazioni multiple effettuate tra i risultati del bioaccumulo e dei biomarker nei mitili naturali e in quelli trapiantati per le 3 piattaforme di Campo Rospo Mare. Tali risultati evidenziano un limitato numero di relazioni statisticamente significative senza tuttavia particolari trend ascrivibili a specifici contaminanti o target cellulari. Le differenze precedentemente commentate tra concentrazioni e biomarker nei mitili naturali trapiantati permettono una certa separazione di queste popolazioni di organismi quando tutti i dati sono stati elaborati attraverso l'analisi delle componenti principali, PCA (Figura 47).



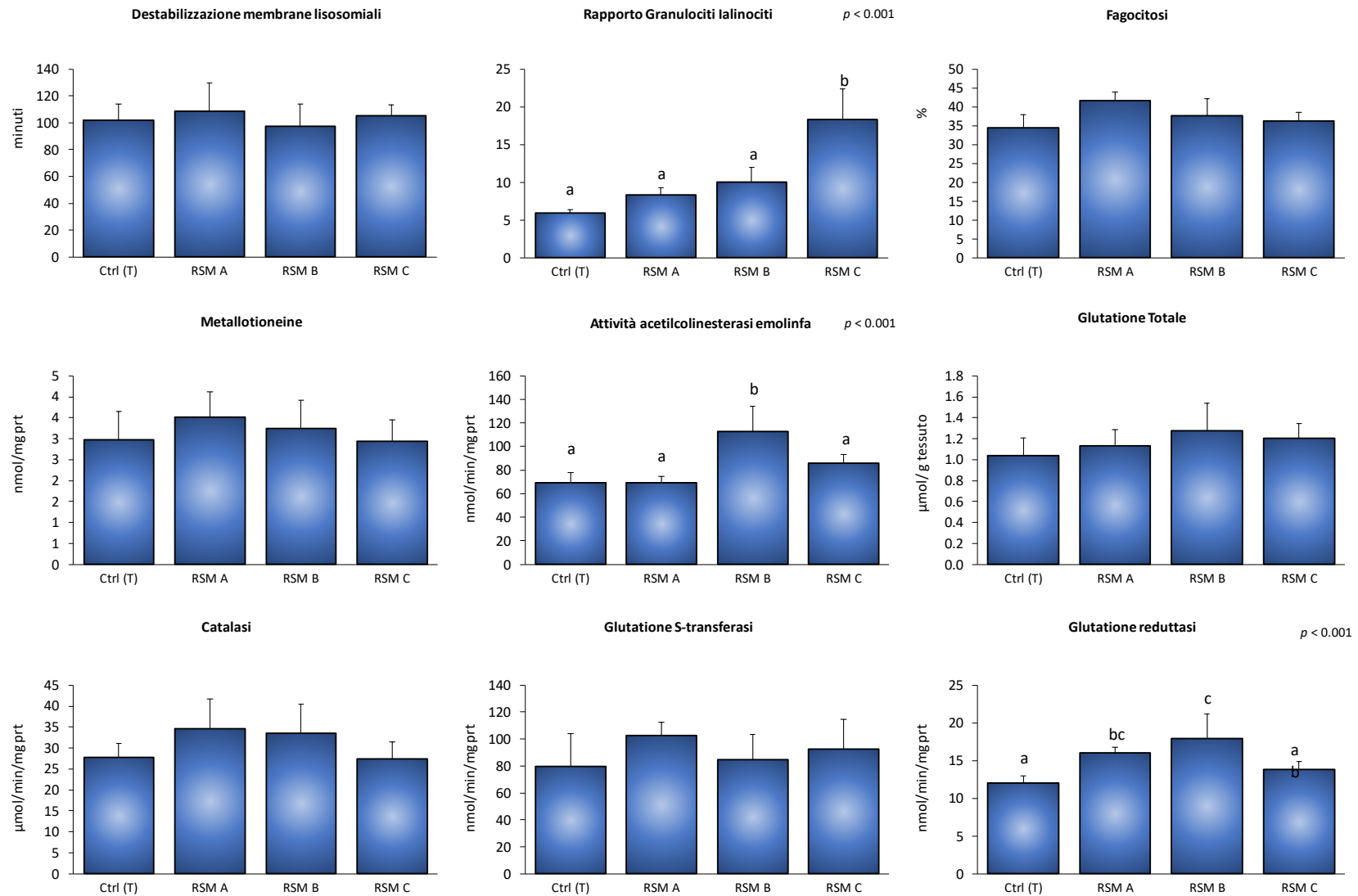


Figura 45. Biomarker analizzati nei mitili traslocati per 5 settimane nelle piattaforme RSM A, RSM B, RSM C e nel sito di riferimento: destabilizzazione delle membrane lisosomiali, rapporto granulociti/ialinociti, fagocitosi, metallotioneine, attività di acetilcolinesterasi, glutazione totale, attività di catalasi, di glutazione S-transferasi e di glutazione reduttasi (medie  $\pm$  deviazioni standard, n=5).

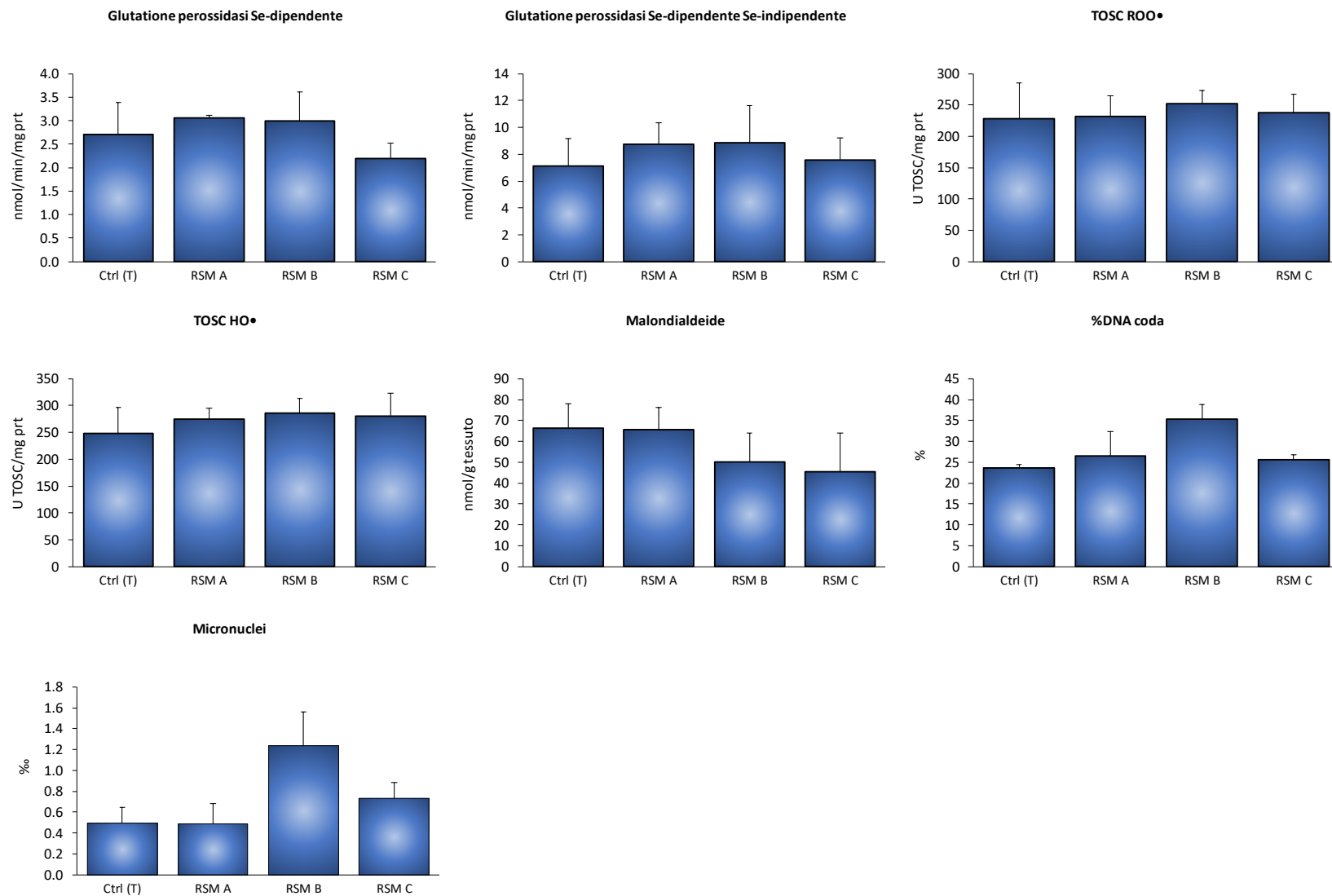


Figura 46. Biomarker analizzati nei mitili traslocati per 5 settimane nelle piattaforme RSM A, RSM B, RSM C e nel sito di riferimento: attività di glutazione perossidasi, capacità antiossidante totale, livelli di malondialdeide e danno al DNA (medie  $\pm$  deviazioni standard, n=5).

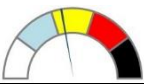
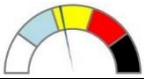
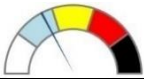
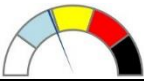
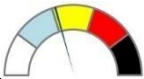
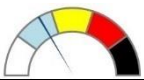
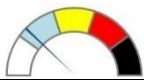
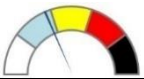
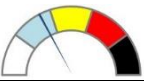
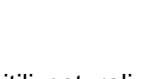
Stazione	Numero biomarker assegnati alle diverse classi					Classe di pericolo	
	Assente	Basso	Medio	Alto	Molto Alto		
N-RSMA-I	9	1	5	1	0	MEDIO	
N-RSMA-II	8	3	4	1	0	MEDIO	
N-RSMB-I	11	2	3	0	0	BASSO	
N-RSMB-II	10	2	4	0	0	BASSO	
N-RSMC-I	10	2	3	1	0	MEDIO	
N-RSMC-II	13	1	1	1	0	BASSO	
T-RSMA	13	3	0	0	0	BASSO	
T-RSMB	11	1	4	0	0	BASSO	
T-RSMC	14	1	0	0	1	BASSO	

Tabella 24. Risultati della elaborazione complessiva del pericolo relativo ai biomarker nei mitili naturali e trapiantati delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C.

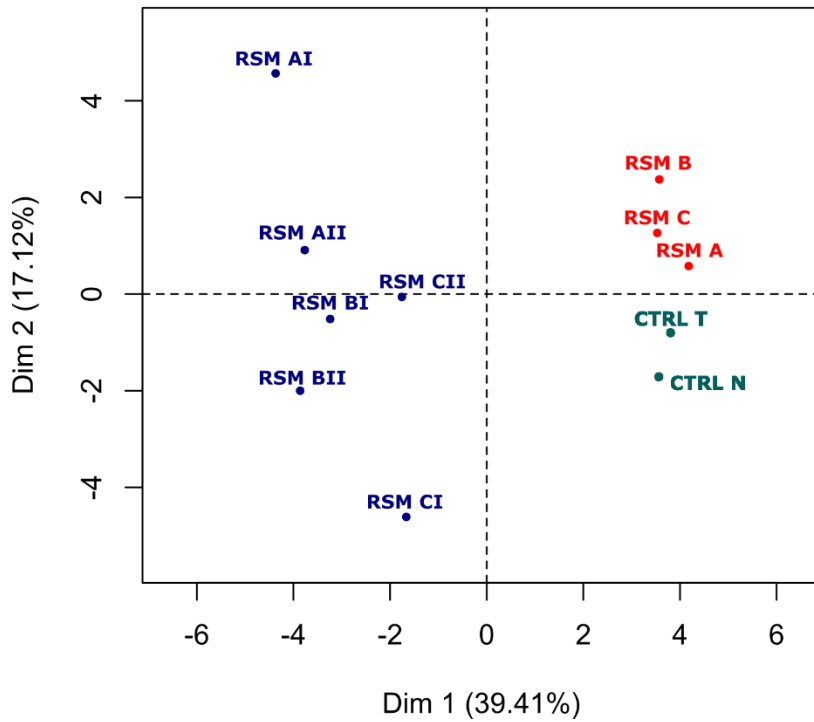
Mitili Naturali		Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	V	Zn	IPA	IPA	IPA	Alif. tot.
														basso PM	alto PM	totali
Glutazione totale	Coeff. Pearson	0.028133	-0.280874	-0.010390	0.000316	-0.386249	-0.021809	0.148424	-0.299924	0.092943	0.270795	0.357192	-0.298357	-0.473841	-0.350027	0.005897
	Sig. (2 code)	0.914645	0.274817	0.968431	0.999041	0.125672	0.933786	0.569684	0.242162	0.722745	0.293131	0.159277	0.244753	0.054676	0.168417	0.982079
Catalasi	Coeff. Pearson	0.069215	-0.043127	0.004481	-0.159578	-0.271191	0.353357	-0.349397	0.138518	0.012594	-0.079497	0.111552	-0.350905	-0.016937	-0.292807	0.119248
	Sig. (2 code)	0.765613	0.852745	0.984621	0.489598	0.234400	0.116109	0.120544	0.549306	0.956789	0.731948	0.630231	0.118841	0.941911	0.197710	0.606661
Glutazione S-transferasi	Coeff. Pearson	-0.302239	-0.203433	-0.300497	-0.025896	-0.007297	0.039297	0.048333	0.033432	0.266955	0.004953	0.340424	-0.503506	-0.250975	-0.474820	-0.251308
	Sig. (2 code)	0.171594	0.363861	0.174198	0.908929	0.974289	0.862160	0.830866	0.882583	0.229756	0.982548	0.121081	0.016898	0.259907	0.025551	0.259254
Glutazione reductasi	Coeff. Pearson	-0.360001	-0.212184	-0.315482	0.039823	-0.170537	-0.233009	-0.172170	-0.311434	0.198599	-0.219250	0.382954	-0.412128	-0.203588	-0.392550	-0.300630
	Sig. (2 code)	0.083994	0.319549	0.133178	0.853424	0.425614	0.273193	0.421128	0.138503	0.352211	0.303312	0.064737	0.045373	0.339994	0.057775	0.153457
Glutazione perossidasi (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Coeff. Pearson	0.229257	-0.232463	-0.174416	-0.189145	0.360757	0.112999	-0.505981	0.118566	-0.066794	-0.224857	-0.399552	0.219056	0.392225	0.266743	0.169320
	Sig. (2 code)	0.304752	0.297852	0.437566	0.399212	0.099063	0.616593	0.016280	0.599222	0.767738	0.314382	0.065436	0.327356	0.071004	0.230140	0.451278
Glutazione perossidasi (Cu)	Coeff. Pearson	-0.114746	-0.417913	-0.611714	-0.151043	0.008968	-0.118717	-0.194734	-0.075726	0.076666	-0.187848	0.319708	-0.530495	-0.346902	-0.522770	-0.345720
	Sig. (2 code)	0.611119	0.052941	0.002484	0.502243	0.968406	0.598751	0.385162	0.737673	0.734531	0.402512	0.146942	0.011088	0.113715	0.012552	0.115034
TOSCA (ROO ·)	Coeff. Pearson	0.035901	0.266557	0.177547	-0.146776	-0.305364	-0.221003	-0.438128	-0.297259	-0.544196	-0.147962	-0.344372	0.429924	0.374905	0.440010	0.285980
	Sig. (2 code)	0.887535	0.284973	0.480922	0.561123	0.217860	0.378159	0.068975	0.230941	0.019553	0.557926	0.161694	0.074955	0.125290	0.067654	0.249964
TOSCA (HO ·)	Coeff. Pearson	-0.004283	0.278312	0.533509	-0.119046	-0.301907	-0.014292	-0.155292	0.054062	-0.250157	0.199414	-0.381376	0.246509	0.349443	0.283527	0.623641
	Sig. (2 code)	0.986543	0.263445	0.022597	0.638006	0.223380	0.955115	0.538357	0.831283	0.316746	0.427591	0.118386	0.324086	0.155200	0.254228	0.005682
Malondialdeide	Coeff. Pearson	-0.264383	0.190766	0.120258	-0.232640	-0.355809	-0.507571	-0.297512	-0.299407	-0.552765	-0.267507	0.011076	0.083429	0.143586	0.100946	0.161546
	Sig. (2 code)	0.191837	0.350566	0.558434	0.252759	0.074431	0.008123	0.139924	0.137298	0.003406	0.186445	0.957174	0.685338	0.484064	0.623660	0.430455
Metalloioneine	Coeff. Pearson	0.343077	-0.284969	-0.280064	0.177901	0.373565	0.726966	0.033266	0.621096	0.461469	-0.078789	-0.069266	-0.133659	-0.179417	-0.151396	-0.183531
	Sig. (2 code)	0.163381	0.251717	0.260327	0.480032	0.126754	0.000631	0.895745	0.005941	0.053891	0.755985	0.784774	0.596985	0.476238	0.548720	0.466012
Acetilcolinesterasi	Coeff. Pearson	0.029877	-0.241286	-0.324557	0.476917	0.614960	0.329382	0.462744	0.491423	0.604437	0.453426	0.478442	-0.390927	-0.423652	-0.421056	-0.359276
	Sig. (2 code)	0.909376	0.350842	0.203729	0.052908	0.008608	0.196697	0.061425	0.045139	0.010168	0.067552	0.052047	0.120767	0.090150	0.092350	0.156683
Frammentazione DNA	Coeff. Pearson	-0.155702	0.298232	0.125362	0.149823	0.050234	-0.252473	0.252173	-0.182141	0.124169	0.418486	-0.245650	0.426675	0.414068	0.443634	0.311167
	Sig. (2 code)	0.500341	0.189148	0.588198	0.516850	0.828800	0.269532	0.270122	0.429406	0.591783	0.059022	0.283122	0.053741	0.062031	0.043962	0.169751
Micronuclei	Coeff. Pearson	0.125438	0.004386	-0.247459	-0.038192	0.256832	0.127692	0.116101	0.047505	0.133111	-0.105404	-0.014967	-0.086214	-0.057984	-0.085241	-0.091232
	Sig. (2 code)	0.559201	0.983770	0.243687	0.859367	0.225705	0.552107	0.589027	0.825540	0.535216	0.624010	0.944663	0.688745	0.787835	0.692089	0.671589
Stab. membrane lisosomiali	Coeff. Pearson	-0.369035	0.123764	0.290651	0.022339	-0.174218	0.355963	0.121529	0.219833	0.284599	0.374175	0.153515	-0.060508	-0.068620	-0.065490	0.169057
	Sig. (2 code)	0.075959	0.564500	0.168253	0.917480	0.415541	0.087785	0.571605	0.301996	0.177695	0.071655	0.473878	0.778816	0.750030	0.761101	0.429700
Granulociti/falinociti	Coeff. Pearson	0.109230	-0.130986	-0.602326	0.111923	0.315300	-0.112416	0.092492	-0.034598	0.017984	-0.336448	-0.149733	0.209106	-0.094937	0.156996	-0.255069
	Sig. (2 code)	0.646654	0.582012	0.004948	0.638507	0.175700	0.637021	0.698136	0.884864	0.940011	0.146936	0.528643	0.376279	0.690531	0.508600	0.277775
Fagocitosi	Coeff. Pearson	0.103552	0.319982	0.125664	0.394218	-0.267475	0.404677	0.225264	0.013555	0.047057	-0.105086	-0.432616	0.537925	0.304157	0.520770	0.308252
	Sig. (2 code)	0.638218	0.136630	0.567778	0.062692	0.217254	0.055443	0.301398	0.951051	0.831164	0.633224	0.039228	0.008107	0.158236	0.010840	0.152428

Tabella 25. Correlazioni multiple di Pearson tra i risultati del bioaccumulo di metalli, idrocarburi policiclici aromatici ed alifatici con i risultati dei biomarker nei mitili naturali delle 3 piattaforme di Campo Rospo; le caselle in evidenza indicano una correlazione significativa con  $p < 0.05$  (verde),  $p < 0.01$  (giallo),  $p < 0.001$  (rosso).

Mitili Trapiantati		Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	V	Zn	IPA basso PM	IPA alto PM	IPA totali	Alif. tot. C10-C40
Glutazione totale	Coeff. Pearson	-0.493334	0.003765	0.311428	0.000028	-0.021104	-0.229739	0.399088	-0.080679	0.071434	0.083375	-0.088476	-0.142822	-0.003501	-0.138277	-0.332108
	Sig. (2 code)	0.103138	0.990736	0.324444	0.999930	0.948095	0.472571	0.198737	0.803168	0.825396	0.796709	0.784523	0.657911	0.991385	0.668236	0.291577
Catalasi	Coeff. Pearson	0.126732	-0.029781	-0.093401	-0.008161	-0.019415	0.154947	-0.147607	0.134667	0.418900	-0.294026	0.639989	-0.346594	-0.129097	-0.342971	-0.537392
	Sig. (2 code)	0.694704	0.926797	0.772799	0.979919	0.952245	0.630632	0.647097	0.676476	0.175291	0.353599	0.024996	0.269726	0.689254	0.275099	0.071566
Glutazione S-transferasi	Coeff. Pearson	0.037514	0.189743	-0.701075	0.365752	0.277706	0.357987	0.126722	0.168194	-0.157554	0.351565	-0.010623	0.481681	-0.117337	0.458011	0.240063
	Sig. (2 code)	0.912802	0.576300	0.016235	0.268649	0.408343	0.279710	0.710426	0.621061	0.643609	0.289047	0.975271	0.133561	0.731157	0.156582	0.477071
Glutazione riduttasi	Coeff. Pearson	-0.308233	0.350413	0.504396	0.159008	-0.053145	0.191016	0.117352	-0.034447	0.555625	-0.274251	0.724779	-0.442679	-0.316739	-0.444654	-0.285787
	Sig. (2 code)	0.419687	0.355212	0.166140	0.682819	0.891989	0.622504	0.763660	0.929894	0.120372	0.475144	0.027172	0.232775	0.406283	0.230449	0.455983
Glutazione perossidasi (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Coeff. Pearson	0.450657	0.260256	-0.099125	0.440802	0.448504	0.546861	0.125164	0.486518	0.501798	-0.006349	0.676238	-0.019530	-0.071033	-0.023241	-0.363583
	Sig. (2 code)	0.141483	0.413954	0.759226	0.151484	0.143631	0.065773	0.698322	0.108733	0.096461	0.984375	0.015758	0.951963	0.826364	0.942847	0.245339
Glutazione perossidasi (Cu)	Coeff. Pearson	0.064756	0.505906	-0.520112	0.415077	0.569563	0.320615	0.484097	0.087973	0.409806	0.101466	0.411159	0.423003	0.112632	0.415823	-0.267679
	Sig. (2 code)	0.841526	0.093328	0.083023	0.179674	0.053221	0.309602	0.110768	0.785723	0.185827	0.753694	0.184235	0.170664	0.727455	0.178813	0.400270
TOSCA (ROO -)	Coeff. Pearson	-0.262121	0.130964	0.526332	0.268620	-0.019402	-0.021472	0.090247	-0.139857	0.458837	-0.166697	-0.137587	-0.316227	-0.313489	-0.324939	-0.061803
	Sig. (2 code)	0.410495	0.684963	0.078764	0.398553	0.952276	0.947192	0.780303	0.664641	0.133514	0.604593	0.669810	0.316644	0.321081	0.302750	0.848679
TOSCA (HO -)	Coeff. Pearson	-0.538356	0.343605	0.548269	-0.140963	-0.377716	-0.440838	0.160048	-0.245584	0.227304	-0.032442	0.303177	-0.217649	0.018453	-0.209263	0.184506
	Sig. (2 code)	0.070960	0.274154	0.064940	0.662128	0.226081	0.151446	0.619278	0.441670	0.477406	0.920273	0.338099	0.496800	0.954610	0.513925	0.565931
Malondialdeide	Coeff. Pearson	0.275317	0.033643	0.504315	-0.038181	-0.261149	0.003964	-0.272996	0.507287	0.014972	0.128134	0.234009	-0.102859	-0.033394	-0.101483	0.310403
	Sig. (2 code)	0.362601	0.913117	0.078845	0.901446	0.388790	0.989745	0.366826	0.076811	0.961282	0.676554	0.441598	0.738090	0.913758	0.741487	0.301984
Metalloionine	Coeff. Pearson	0.033525	0.064791	0.222902	0.126167	-0.260903	-0.101928	-0.202015	0.219042	0.368247	-0.065286	0.701730	-0.473462	-0.297873	-0.474708	-0.125291
	Sig. (2 code)	0.922050	0.849890	0.510019	0.711647	0.438401	0.765545	0.551384	0.517561	0.265147	0.848753	0.016093	0.141294	0.373652	0.140104	0.713576
Acetilcolinesterasi	Coeff. Pearson	-0.047149	-0.102862	0.023260	-0.186026	0.419601	-0.032541	0.639692	-0.039155	-0.120603	0.073031	-0.137652	0.155925	0.715123	0.191321	-0.333177
	Sig. (2 code)	0.890510	0.763448	0.945881	0.583931	0.198888	0.924330	0.034043	0.909002	0.723924	0.831022	0.686502	0.647084	0.013371	0.573071	0.316718
Frammentazione DNA	Coeff. Pearson	0.062184	0.501981	-0.002295	0.174044	0.611937	0.406451	0.594317	-0.002689	0.016033	0.014547	0.123659	0.550423	0.434741	0.558777	-0.112824
	Sig. (2 code)	0.847756	0.096320	0.994352	0.588524	0.034452	0.189811	0.041560	0.993382	0.960556	0.964212	0.701803	0.063680	0.157852	0.058954	0.727007
Micronuclei	Coeff. Pearson	0.016428	-0.107722	-0.348307	0.153795	0.446938	0.520182	0.266297	-0.110118	0.119989	0.009603	0.177645	-0.196620	-0.120852	-0.197489	-0.129184
	Sig. (2 code)	0.959586	0.738963	0.267205	0.633204	0.145206	0.082974	0.402800	0.733339	0.710311	0.976370	0.580708	0.540220	0.708306	0.538395	0.689055
Stab. membrane lisosomiali	Coeff. Pearson	0.417046	0.526440	-0.336120	0.329526	0.421231	0.780428	-0.013028	0.225715	0.207088	0.185885	0.288162	0.396681	-0.270652	0.368734	0.436671
	Sig. (2 code)	0.201923	0.096186	0.312198	0.322377	0.196967	0.004593	0.969674	0.504552	0.541215	0.584220	0.390164	0.227089	0.420836	0.264467	0.179323
Granulociti/Ialnociti	Coeff. Pearson	0.023260	-0.210245	0.530248	-0.632511	-0.479531	-0.207763	-0.467431	-0.366553	0.134762	-0.271500	-0.195272	-0.460967	-0.089860	-0.452211	0.315066
	Sig. (2 code)	0.945879	0.534924	0.093367	0.036766	0.135556	0.539867	0.147144	0.267522	0.692803	0.419325	0.565020	0.153580	0.792746	0.162575	0.345310
Fagocitosi	Coeff. Pearson	0.376384	0.188993	-0.447887	0.242363	0.265882	0.605041	-0.230754	0.080128	0.305377	-0.270132	0.499424	0.027279	-0.337463	0.005649	-0.227434
	Sig. (2 code)	0.227857	0.556350	0.144249	0.447871	0.403561	0.037121	0.470561	0.804489	0.334430	0.395800	0.098304	0.932933	0.283386	0.986100	0.477148

Tabella 26. Correlazioni multiple di Pearson tra i risultati del bioaccumulo di metalli, idrocarburi policiclici aromatici ed alifatici con i risultati dei biomarker nei mitili trapiantati presso le 3 piattaforme di Campo Rospo; le caselle in evidenza indicano una correlazione significativa con  $p < 0.05$  (verde),  $p < 0.01$  (giallo),  $p < 0.001$  (rosso).

### Individuals factor map (PCA)



### Variables factor map (PCA)

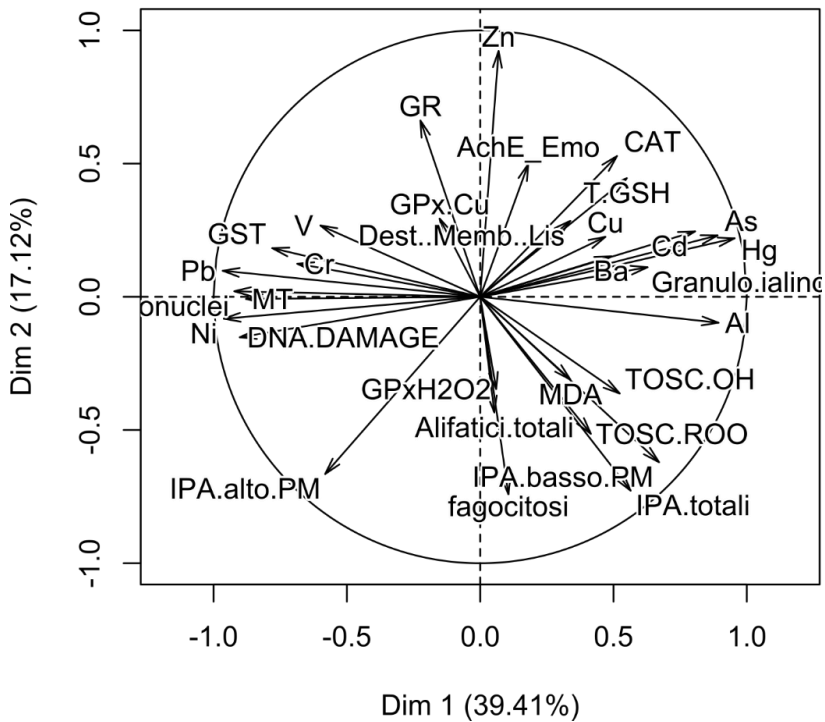


Figura 47. Rappresentazione grafica dell'analisi delle componenti principali (PCA) effettuata utilizzando tutti i dati relativi al bioaccumulo e ai biomarker nei mitili naturali e trapiantati delle 3 piattaforme di campo Rospo. In rosso i mitili naturali, in azzurro quelli trapiantati sui due piloni di ciascuna piattaforma, in verde i controlli per i mitili naturali (N) e trapiantati (T).

#### **4.3 ELABORAZIONI ED ANALISI DI RISCHIO ECOLOGICO WEIGHT OF EVIDENCE (WOE)**

Come discusso nei paragrafi precedenti, l'applicazione dei criteri di integrazione ponderata per l'elaborazione dei dati, ha permesso di riassumere ampi data-sets di risultati scientifici complessi in una serie di indici sintetici di pericolo, ciascuno specifico per ogni tipologia di indagine (o linea di evidenza, LOE) effettuata sulle piattaforme dell'area di Campo Rospo Mare.

Tali indici di pericolo si riferiscono alle caratteristiche chimiche dei sedimenti in riferimento sia agli SQA del D. Lgs 172/2015 che ai valori L1 e L2 del DM 173/2016 (LOE1), alle caratteristiche ecotossicologiche dei sedimenti valutate tramite una batteria di saggi biologici (LOE4), alla biodisponibilità dei metalli associati ai sedimenti per il polichete *H. diversicolor* (LOE2b), alla biodisponibilità di metalli, idrocarburi policiclici aromatici ed alifatici per i mitili naturali e trapiantati delle piattaforme (LOE2a), alle risposte biologiche misurate tramite biomarker nei mitili naturali e trapiantati delle piattaforme (LOE3), alle comunità bentoniche nei sedimenti raccolti intorno alle piattaforme (LOE5).

Al di là dell'importanza di avere tutti questi indici sintetici che permettono una più facile valutazione del significato complessivo dei risultati ottenuti per ciascun tipo di analisi, un ulteriore valore aggiunto è l'integrazione ponderata di tipologie di dati diversi ed eterogenei: questo consente di valorizzare un approccio multidisciplinare, ottenendo livelli di valutazione sempre più complessi, fino alla caratterizzazione del rischio ecologico.

Nell'elaborazione dei risultati chimici ed ecotossicologici dei sedimenti sono stati applicati gli stessi criteri di integrazione ponderata recepiti dal recente DM 173/2016 che disciplina la caratterizzazione e le conseguenti opzioni gestionali nel caso di movimentazione di sedimenti marini. È stato così possibile simulare quale sarebbe stata la "classe di qualità" assegnata ai sedimenti delle piattaforme di Campo Rospo da questo riferimento normativo.

Tutti i campioni (con l'eccezione di RSM-B17 e RSM-C19) sono risultati avere la migliore classe di qualità (A), compatibile addirittura con il ripascimento delle spiagge (in funzione della granulometria) o l'immersione deliberata in aree marine non costiere oltre le 3 MN (Tabella 27). I 2 campioni RSM-B17 e RSM-C19 hanno mostrato caratteristiche chimiche ed ecotossicologiche compatibili con la classe di qualità B, che può ancora prevedere l'immersione deliberata in aree marine non costiere con monitoraggio ambientale, dimostrando la sostanziale assenza di criticità ambientali nei sedimenti delle tre piattaforme RSM-A, B e C.

Stazione	Classe di pericolo ecotossicologico	Classe di pericolo chimico	Classe di qualità del materiale
RSM A 5	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM A 6	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM A 7	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM A 8	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM A 17	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM A 19	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM B 5	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM B 6	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM B 7	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM B 8	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM B 17	ASSENTE	HQc(L2) ≥ Basso e HQc(L2) ≤ Medio	B
RSM B 19	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM C 5	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM C 6	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM C 7	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM C 8	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM C 17	ASSENTE	HQc(L2) <= Trascurabile	A
RSM C 19	ASSENTE	HQc(L2) ≥ Basso e HQc(L2) ≤ Medio	B

Tabella 27. Classe di qualità dei sedimenti di RSM-A, RSM-B e RSM-C ottenuta applicando i criteri di integrazione ponderata recepiti dal DM 173/2016.

Tutti i risultati ottenuti ed elaborati per le diverse tipologie di analisi effettuate (caratterizzazione chimica dei sedimenti, biodisponibilità di metalli in *H. diversicolor*, biodisponibilità e biomarker nei mitili naturali e trapiantati, saggi ecotossicologici, comunità bentoniche) sono stati alla fine elaborati mediante l'approccio classico Weight Of Evidence (WOE) che assegna a ciascuna tipologia di dati un peso diverso in funzione della sua rilevanza ecologica nel particolare contesto di indagine.

Nel nostro studio, i pesi assegnati alle varie linee di evidenza sono stati: 1.0 per la caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE1), 1.2 per la biodisponibilità di metalli, idrocarburi policiclici aromatici ed alifatici per i mitili naturali e trapiantati (LOE2a), 0.6 per la biodisponibilità dei metalli associati ai sedimenti per il polichete *H. diversicolor* (LOE2b), 1.0 per i biomarker nei mitili naturali e trapiantati



delle piattaforme (LOE3), 1.2 per la batteria di saggi ecotossicologici (LOE4), 1.3 per le comunità bentoniche (LOE5).

Nella Tabella 28 viene riportato, per ciascuna delle 3 piattaforme, sia l'indice di pericolo elaborato e già precedentemente discusso per ciascuna LOE che l'indice di rischio integrato WOE, mentre nell'Allegato 15 sono riportate le singole elaborazioni.

L'indice di rischio WOE risulta Basso per tutte e 3 le piattaforme, consentendo di escludere situazioni compromesse sia a livello di singoli comparti ambientali che come caratteristiche complessive dell'area marina di Campo Rospo.

	<b>RSM A</b>	<b>RSM B</b>	<b>RSM C</b>
<b>LOE1</b> (Chimica dei sedimenti)	ASSENTE	BASSO	TRASCURABILE
<b>LOE2a</b> (Biodisponibilità nei mitili)	BASSO	BASSO	BASSO
<b>LOE2b</b> (Biodisponibilità nelle <i>H. diversicolor</i> )	BASSO	BASSO	BASSO
<b>LOE3</b> (Biomarker nei mitili)	BASSO	BASSO	BASSO
<b>LOE4</b> (Batteria di saggi ecotossicologici)	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
<b>LOE5</b> (Comunità bentoniche)	BASSO	BASSO	BASSO
<b>WOE (Weight of Evidence)</b>	BASSO	BASSO	BASSO

Tabella 28. Riassunto dei risultati relativi alle singole elaborazioni ponderate (LOE1, LOE2a, LOE2b, LOE3, LOE4 e LOE5) ed integrazione complessiva WOE (Weight of Evidence).

## 5. DISCUSSIONE

### 5.1 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEI SEDIMENTI

Le concentrazioni dei parametri chimici misurati nei sedimenti intorno alle 3 piattaforme RSM-A, B e C non hanno mai evidenziato situazioni anomale o elementi presenti a livelli ambientalmente elevati, come si evince anche dal confronto, quando possibile, con i valori degli Standard di Qualità Ambientale (SQA) del D. Lgs 172/2015, o i valori L1 e L2 del DM 173/2016 che disciplina la caratterizzazione e classificazione della qualità dei sedimenti sottoposti ad attività di movimentazione (Tabella 29).

Per quanto riguarda i **metalli**, i valori di alluminio nei sedimenti in prossimità di RSM-A e RSM-C si aggirano rispettivamente tra 1.500-2.800 µg/g e 1.000-3.500 µg/g, mentre le concentrazioni misurate nei sedimenti di RSM-B si attestano a valori significativamente più elevati, compresi tra 9.600 e 44.000 µg/g. È noto che l'alluminio rappresenta uno dei principali costituenti naturali della crosta terrestre e la sua abbondanza relativa contribuisce a determinare le caratteristiche stesse dei sedimenti, nei quali può abbondare fino a oltre 100.000 µg/g (corrispondente al 10%) (Schropp e Windom, 1988). Studi pregressi hanno evidenziato che i valori basali medi di alluminio nei sedimenti superficiali ottenuti in tutto il bacino del Mare Adriatico sono normalmente compresi tra circa 22.000 e 63.000 µg/g (Dolenec *et al.*, 1998): le concentrazioni misurate per le tre piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C rientrano pertanto all'interno del range di variabilità tipico per questo elemento.

Le concentrazioni di arsenico nei sedimenti sono tutte piuttosto simili, generalmente comprese tra 2.8-4.9 µg/g (RSM-A), 3.2-6.0 µg/g (RSM-B) e 2.4-4.9 µg/g (RSM-C). Tali valori possono essere considerati bassi e sempre inferiori ai limiti normativi di riferimento come ad esempio quelli degli SQA del D. Lgs 173/2015 o i valori L1 e L2 del DM 273/2016 (Tabella 29). È noto inoltre che le concentrazioni di arsenico normalmente misurate nei sedimenti superficiali costieri o estuariali sono frequentemente comprese tra 5 e 15 µg/g, mentre si attestano attorno a valori medi di circa 40 µg/g in sedimenti più profondi (Neff, 2002).

I valori di bario misurati nei sedimenti presentano un range di variabilità simile per le 3 piattaforme, pari a 45-180 µg/g in RSM-A, 70-300 µg/g in RSM-B e 16-270 µg/g in RSM-C. Anche il bario rappresenta uno dei principali costituenti naturali della crosta terrestre, e le sue concentrazioni nei sedimenti possono variare abbondantemente in un intervallo compreso tra 1 e 2.000 µg/g (Trefry, 1982; Neff, 2002). Molto frequentemente le attività estrattive prevedono l'utilizzo di fanghi di perforazione, ovvero fluidi densi che hanno lo scopo di lubrificare e raffreddare la trivella di perforazione ed esercitare una contro pressione idrostatica al fondo foro e lungo le pareti non tubate. I fanghi di perforazione possono avere diverse composizioni ma la loro densità viene tipicamente aumentata con l'aggiunta di polveri ad elevato peso specifico, come barite o ematite. È pertanto noto che in prossimità di piattaforme estrattive, i sedimenti possono risultare arricchiti di bario e ferro.

Studi pregressi hanno tuttavia messo in evidenza che le concentrazioni di bario in sedimenti provenienti da aree marine non direttamente contaminate dallo scarico di fluidi di perforazione sono generalmente comprese in un range che può arrivare ad oltre 900 µg/g (Neff, 2002); i valori misurati nei sedimenti prospicienti le piattaforme del Campo Rospo rientrano dunque abbondantemente all'interno di queste fluttuazioni naturali, e sono del tutto simili a quelli precedentemente osservati nell'intero bacino del Mare Adriatico, pari a circa 100-330 µg/g (Dolenec *et al.*, 1998).

Le concentrazioni di cadmio nei sedimenti sono pari a 0.08-0.19 µg/g (RSM-A), 0.08-0.38 µg/g (RSM-B) e 0.07-0.15 µg/g (RSM-C). Questi valori sono tutti piuttosto simili ed in un solo caso (campione RSM B03) la concentrazione di cadmio è risultata lievemente maggiore rispetto al limite degli SQA (D. Lgs 172/2015) e di L1 (DM 173/2016) pari a 0.3 µg/g (Tabella 29). Tutti i valori misurati possono essere considerati bassi, sempre inferiori al valore di L2 (0.8 µg/g), e ben all'interno del range di livelli normalmente compresi tra 0.1 e 0.6 µg/g per i sedimenti marini superficiali (Warren, 1981; Neff, 2002).

Le concentrazioni di cromo sono pari a 30-45 µg/g nei sedimenti intorno a RSM-A, 30-73 µg/g in quelli di RSM-B e 24-56 in quelli di RSM-C. Nonostante tutte le concentrazioni si attestino all'interno di range molto simili tra loro, un certo numero di campioni delle piattaforme RSM-B e C risultano di poco superiori rispetto al livello degli SQA (D. Lgs 172/2015) e di L1 (DM 173/2016) pari a 50 µg/g (Tabella 29), ma comunque sempre abbondantemente inferiori a quelli di L2 (150 µg/g). Dati di letteratura suggeriscono che valori normali di cromo in sedimenti marini superficiali solitamente rientrano tra 50 e 100 µg/g (Salomons e Förstner, 1984; Mayer, 1988, Neff, 2002). In questo senso, alcuni dati disponibili per sedimenti provenienti dal Mare Adriatico evidenziano un range di valori basali medi compreso tra circa 40 e 250 µg/g (Dolenec *et al.*, 1998), confermando che i valori misurati nei sedimenti del Campo Rospo possono essere considerati livelli basali all'interno delle normali fluttuazioni note per questo elemento.

I valori di rame sono pari a 11-40 µg/g nei sedimenti di RSM-A, e 9-27 in quelli di RSM-B e C; considerando che il valore di L1 (DM 173/2016) per il rame è pari a 40 µg/g (Tabella 29), solamente un campione (RSM-A01) si approssima a questo limite. In generale le concentrazioni di rame in tutti i campioni di sedimenti sono simili a quelle precedentemente osservate nei sedimenti dell'Adriatico, comprese tra 4 e 33 µg/g (Dolenec *et al.*, 1998), e paragonabili a quelle considerate tipiche per sedimenti superficiali, tra 10 e 50 µg/g (Salomons e Förstner, 1984; Ridgway e Price, 1987; Neff, 2002); in aree contaminate le concentrazioni di rame nei sedimenti possono essere fino ad oltre due ordini di grandezza maggiori (Neff, 2002).

I valori di ferro risultano simili in tutti i sedimenti prelevati dal Campo Rospo e variano tra circa 5.600 e 6.500 µg/g. Anche questo elemento rappresenta uno dei più abbondanti della crosta terrestre, con livelli ambientali estremamente variabili e concentrazioni spesso elevate. Non sono disponibili limiti

normativi di riferimento, ma tuttavia le concentrazioni misurate presso Campo Rospo possono essere considerate basse, considerando che i livelli medi di ferro nei sedimenti del Mare Adriatico oscillano tra circa 12.000 e 42.000  $\mu\text{g/g}$  (Dolenec *et al.*, 1998).

Il mercurio varia tra 0.03 e 0.09  $\mu\text{g/g}$  nei sedimenti provenienti dalle 3 piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C, evidenziando quindi valori sempre inferiori a vari limiti normativi di riferimento degli SQA del D. Lgs 172/2015 e di L1 del DM 173/2016 (Tabella 29). Tutte le concentrazioni misurate sono basse, considerando che i valori di mercurio in sedimenti non contaminati generalmente sono inferiori a 0.2  $\mu\text{g/g}$  (Crecelius *et al.*, 1975; Salomons e Förstner, 1984; Neff, 2002), se si escludono aree con depositi naturali di mercurio come ad esempio quelle del Mar Tirreno.

I valori di manganese nei sedimenti delle piattaforme del Campo Rospo sono pari a 330-380  $\mu\text{g/g}$  (RSM-A), 320-740  $\mu\text{g/g}$  (RSM-B) e 480-690  $\mu\text{g/g}$  (RSM-C), uniformemente distribuiti attorno alle piattaforme investigate e senza differenze degne di nota tra le tre differenti aree. Il manganese è un elemento piuttosto abbondante nella crosta terrestre e nei sedimenti marini, e non sono presenti limiti normativi di riferimento. Benché i valori descritti possano sembrare elevati, studi pregressi hanno messo in evidenza che i livelli normalmente osservati nei sedimenti dell'Adriatico sono compresi tra 200 e 3.700  $\mu\text{g/g}$ , con una peculiare distribuzione spaziale e concentrazioni più alte in specifiche aree più profonde nell'Adriatico centro-meridionale (Dolenec *et al.*, 1998): alcuni autori hanno ipotizzato che livelli anomali di manganese presenti nell'Adriatico centro-meridionale possano riflettere la diffusione di detriti derivanti da alcune aree dell'Albania ricche di basalto e di minerali di ferro e magnesio, che a loro volta conterrebbero elevati tenori di manganese (Paul e Meischner, 1976; Wedepohl, 1978, Dolenec *et al.*, 1998). Questa caratteristica, unitamente al fatto che le concentrazioni di manganese risultano uniformemente distribuite all'interno del Campo Rospo, lascia ipotizzare che le concentrazioni misurate riflettano i livelli basali caratteristici dell'area investigata.

Le concentrazioni di nichel nei sedimenti sono pari a 14-30  $\mu\text{g/g}$ , 14-25  $\mu\text{g/g}$  e 5-23  $\mu\text{g/g}$  rispettivamente nei campioni di RSM-A, B e C. Queste concentrazioni sono sempre al di sotto dei limiti normativi di riferimento degli SQA del D. Lgs 172/2015 e di L1 del DM 173/2016 (Tabella 29), e rientrano perfettamente all'interno dei range precedentemente misurati in sedimenti non contaminati del Mare Adriatico (20-260  $\mu\text{g/g}$ ) (Dolenec *et al.*, 1998).

I livelli di piombo sono 12-50  $\mu\text{g/g}$  nei sedimenti di RSM-A, 14-85  $\mu\text{g/g}$  in quelli di RSM-B, e 3-33  $\mu\text{g/g}$  in quelli di RSM-C. Benché le differenze non siano particolarmente marcate, si può osservare una certa tendenza a valori più elevati nei sedimenti raccolti attorno alla piattaforma RSM-B che risultano spesso maggiori rispetto ai valori degli SQA (D. Lgs 172/2015) e di L1 (DM 173/2016) pari a 30  $\mu\text{g/g}$  (Tabella 29), e nel singolo caso del campione RSM-B11 anche rispetto a L2 (70  $\mu\text{g/g}$ ); i campioni delle piattaforme RSM-A e C solo occasionalmente superano il valore degli SQA (D. Lgs

172/2015) e di L1 (DM 173/2016). Normalmente le concentrazioni di piombo in sedimenti non contaminati ricadono all'interno di un range da circa 5 a 30 µg/g (Salomons e Förstner, 1984; Neff, 2002), ma è altresì noto che i livelli medi in sedimenti contaminati possono essere di uno o addirittura due ordini di grandezza più elevati (Neff, 2002); le concentrazioni di piombo misurate nei sedimenti del Campo Rospo possono pertanto essere considerate come livelli di base dell'area di studio, o riflettere solo una debole pressione antropica.

Le concentrazioni di vanadio nei sedimenti di Campo Rospo sono piuttosto simili ed uniformi, pari a 17-25 µg/g (RSM-A), 14-38 µg/g (RSM-B) e 16-44 (RSM-C). Benché non siano disponibili limiti normativi di riferimento, tutte le concentrazioni osservate possono essere considerate basse e rientrano perfettamente all'interno dei normali range di variazione per questo elemento (50-140 µg/g) già misurati in tutta l'area dell'Adriatico (Dolenec *et al.*, 1998).

I valori di zinco evidenziano una certa variabilità nei sedimenti delle piattaforme del Campo Rospo, con range abbastanza estesi, se paragonati con quelli precedentemente descritti per gli altri elementi, rispettivamente pari a 9-100 µg/g (RSM-A), 9-140 µg/g (RSM-B) e 32-164 µg/g (RSM-C). Tali valori sono tuttavia bassi, solo occasionalmente maggiori rispetto al valore L1 (100 µg/g) o L2 (150 µg/g) del DM 173/2016 (Tabella 29). I range descritti sono inoltre del tutto simili a quelli precedentemente riportati per sedimenti dell'area Adriatica, pari a 40-170 µg/g (Dolenec *et al.*, 1998). Considerando che non si osservano differenze tra i risultati delle tre piattaforme, i valori misurati possono essere considerati come livelli basali tipici dell'area investigata.

Anche gli **idrocarburi policiclici aromatici (IPA)** misurati in tutti i sedimenti dell'area di Campo Rospo, possono essere considerati assolutamente bassi e del tutto simili ai valori basali riscontrabili in aree non contaminate in mare aperto. Le concentrazioni sono pari a 40-150 ng/g nei sedimenti di RSM-A, 70-215 ng/g in quelli di RSM-B, e 45-200 ng/g in quelli prelevati da RSM-C.

Gli IPA sono oggi componenti ubiquitari nell'ambiente e presenti in quantità misurabili nei sedimenti marini in tutto il mondo (Laflamme e Hites, 1978; Larsen *et al.*, 1986; Lipiatou e Saliot, 1991; Neff, 1997, 2002). Le concentrazioni di IPA totali nei sedimenti provenienti da aree marine non contaminate sono comprese tra poche unità fino a diverse centinaia di ng/g (Neff, 2002). Al contrario, concentrazioni di IPA totali nell'intervallo di 3.000-30.000 ng/g possono essere osservate in sedimenti provenienti da aree interessate da fenomeni di contaminazione diretta da petrolio e suoi derivati (Neff, 2002). Inoltre, è noto che l'area dell'Adriatico centro-meridionale è soggetta a fenomeni di risorgenze naturali di idrocarburi, che possono contribuire alla distribuzione e ai livelli basali di composti alifatici ed aromatici nei sedimenti superficiali (Benedetti *et al.*, 2014; Etiope *et al.*, 2014). In questo senso, le concentrazioni totali misurate nei sedimenti di Campo Rospo, che raramente superano 200 ng/g, si attestano tra i valori più bassi dei normali range di variabilità

riscontrabili in aree non contaminate, e sono del tutto simili a quelli precedentemente osservati nell'area costiera dell'Adriatico (Benedetti *et al.*, 2014).

Ad ulteriore conferma della scarsa rilevanza delle concentrazioni totali misurate, si consideri che queste risultano sempre inferiori ai limiti degli SQA (D. Lgs 172/2015), di L1 e L2 (DM 173/2016), pari rispettivamente a 800 ng/g, 900 ng/g e 4.000 ng/g. Anche per quanto riguarda i vari congeneri analizzati, questi non sono mai risultati maggiori dei corrispondenti valori degli SQA (D. Lgs 172/2015) e di L1 o L2 (DM 173/2016), qualora disponibili (Tabella 29).

La distribuzione dei vari congeneri può fornire ulteriori indicazioni sull'origine e sul significato degli IPA misurati (Tobiszewski e Namiesnik, 2012). Alcuni autori hanno proposto che il rapporto tra IPA a basso peso molecolare (bPM), ovvero congeneri con 2 e 3 anelli aromatici, e gli IPA ad alto peso molecolare (aPM), con 4 e 5 anelli aromatici (congeneri non alchilati), possa suggerire un'origine pirogenica di tipo industriale qualora sia inferiore ad 1, mentre indicherebbe una origine petrogenica quando è superiore allo stesso valore (Zhang *et al.* 2008; Tobiszewski e Namiesnik, 2012). Come si può vedere nella Figura 48, il rapporto tra IPA bPM e quelli ad aPM è sempre piuttosto elevato, con un valore minimo pari a circa 6, ma spesso superiore alle decine o alle centinaia di unità, suggerendo chiaramente che gli IPA osservati nell'area del Campo Rospo hanno un'origine petrogenica non legata dunque a fenomeni di contaminazione industriale.

Analogamente, l'abbondanza di IPA alchilati rispetto ai propri omologhi rappresenta un indice di formazione remota, poiché le forme alchilate sono pressoché assenti nelle miscele di IPA di più recente formazione, associabili a combustioni, trasformazioni pirogeniche ed altre fonti di impatto antropico (Zhang *et al.* 2008; Tobiszewski e Namiesnik, 2012). Come si può osservare nella Figura 49, il rapporto tra la somma di 1-metilnaftalene e 2-metil-naftalene rispetto alla concentrazione di naftalene è sempre maggiore di 2, corroborando l'ipotesi di un'origine petrogenica per gli IPA misurati nell'area del Campo Rospo.

Un ulteriore indice è quello che considera l'incidenza di IPA tipici di fenomeni di combustione e trasformazione pirogenica, tra i quali benzo(a)antracene, benzo(a)pirene, benzo(b)fluorantene, benzo(ghi)perilene, benzo(k)fluorantene, crisene, fluorantene, indeno(1,2,3-cd)pirene e pirene, rispetto ai livelli di IPA totali (non alchilati) (Ravindra *et al.*, 2008; Tobiszewski e Namiesnik, 2012): quando questi composti di combustione abbondano, il valore dell'indice di rapporto è molto vicino ad 1. Come si può osservare nella Figura 50, i valori ottenuti per tutti i sedimenti prelevati nell'area del Campo Rospo sono sempre estremamente bassi, solo occasionalmente maggiori di 0.1 e molto frequentemente inferiori addirittura a 0.05: ancora una volta, una origine differente da quella petrogenica può pertanto essere scartata per gli IPA presenti in questi sedimenti.

In conclusione, tutti i risultati fino ad ora discussi permettono di escludere che le piattaforme RSM-A, B e C producano un impatto rilevante per quanto riguarda la presenza e le concentrazioni di idrocarburi policiclici aromatici nei sedimenti dell'area marina di Campo Rospo.

			SQA	L1	L2
Metalli	As	µg/g	12	12	20
	Cd	µg/g	0.3	0.3	0.8
	Cr	µg/g	50	50	150
	Cu	µg/g	n.d.	40	52
	Hg	µg/g	0.3	0.3	0.8
	Ni	µg/g	30	30	75
	Pb	µg/g	30	30	70
	Zn	µg/g	n.d.	100	150
IPA	Naftalene	ng/g	35	35	391
	Fluorene	ng/g	n.d.	21	144
	Fenantrene	ng/g	n.d.	87	544
	Antracene	ng/g	24	24	245
	Fluorantene	ng/g	110	110	1494
	Pirene	ng/g	n.d.	153	1398
	Benzo(a)antracene	ng/g	n.d.	75	500
	Crisene	ng/g	n.d.	108	846
	Benzo(b)fluorantene	ng/g	40	40	500
	Benzo(k)fluorantene	ng/g	20	20	500
	Benzo(a)pirene	ng/g	30	30	100
	Benzo(g,h,i)perilene	ng/g	55	55	100
	Indeno(1,2,3,c,d)pirene	ng/g	70	70	100
	S IPA (TOT)	ng/g	800	900	4000
	Id. alifatici	C20-C40	µg/g	n.d.	n.d.

Tabella 29. Elenco dei valori riportati dagli Standard di Qualità Ambientale (SQA) del D. Lgs 172/2015 e limiti L1 e L2 del DM 173/2016.

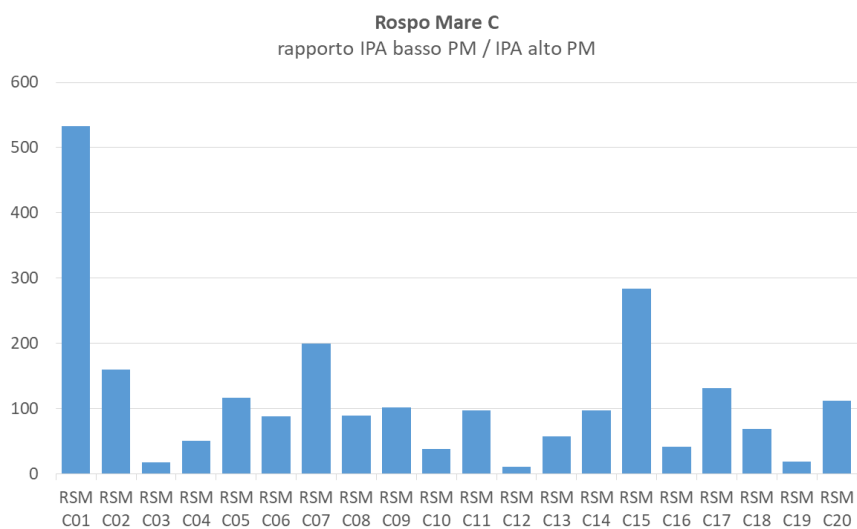
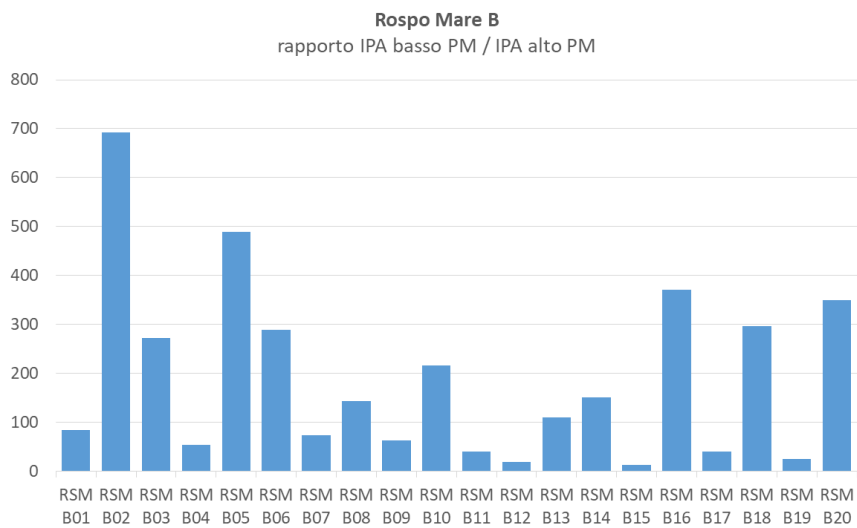
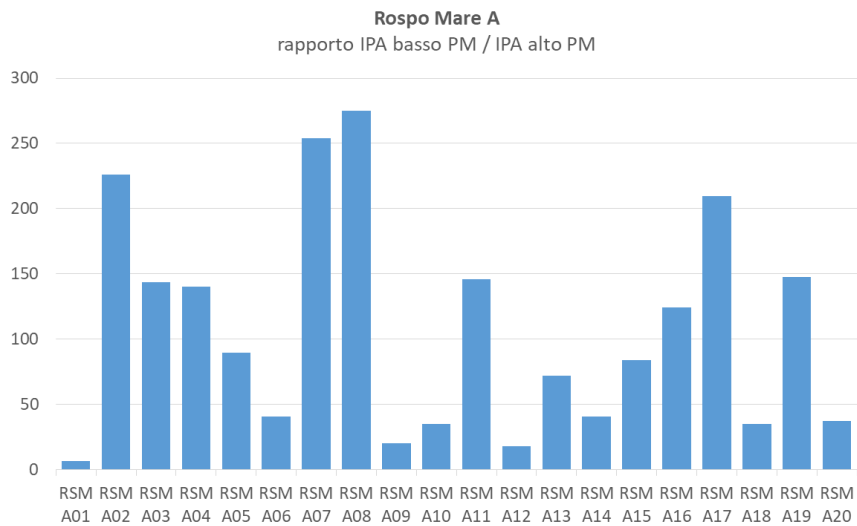


Figura 48. Rapporto tra IPA a basso ed alto peso molecolare. Valori del rapporto inferiori a 1 indicano una origine pirogenica (antropica) degli IPA, mentre valori maggiori di 1 suggeriscono una origine petrogenica (Zhang *et al.* 2008; Tobiszewski e Namiesnik, 2012).



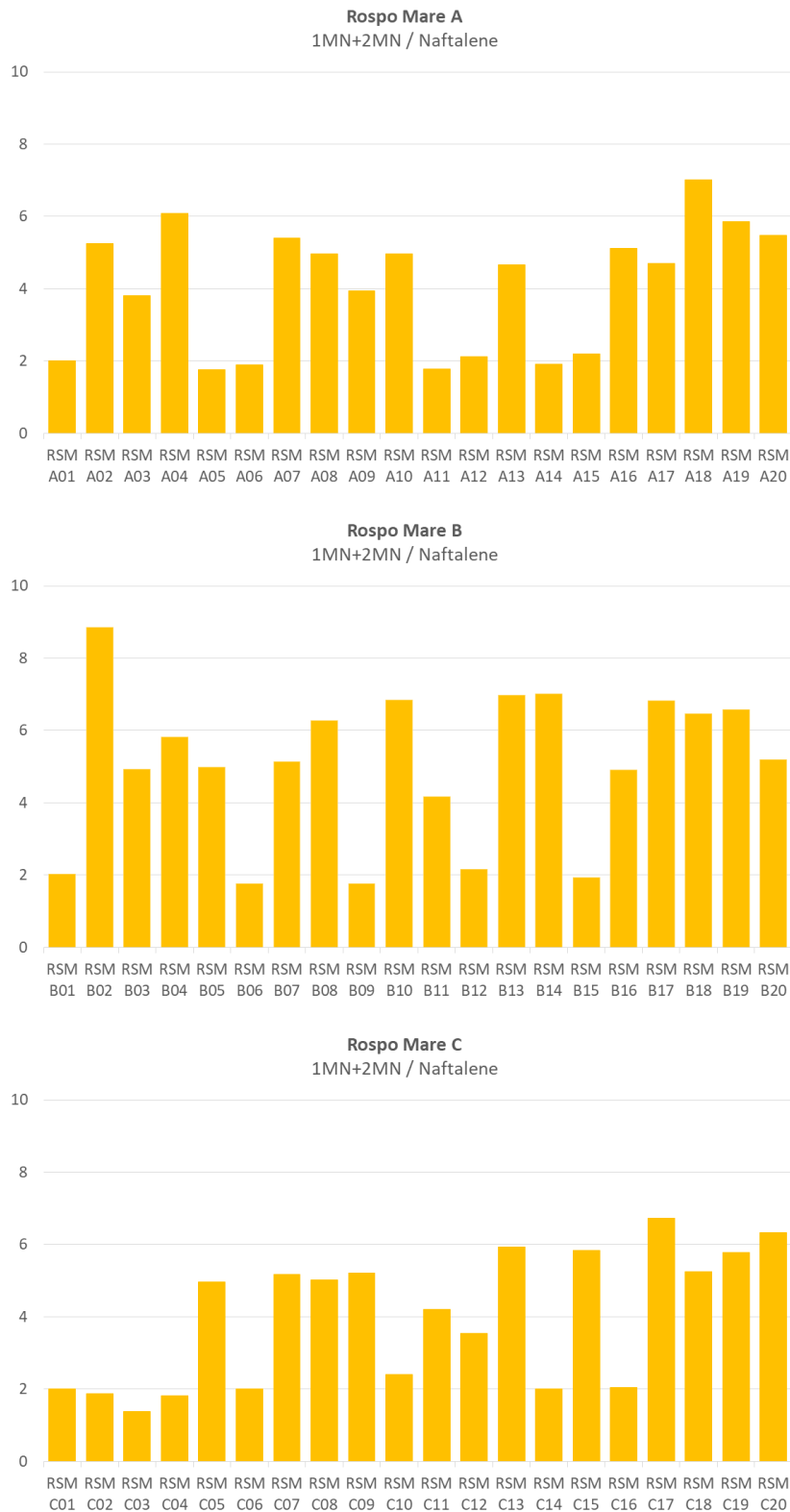


Figura 49. Rapporto tra congeneri alchil-derivati del naftalene e naftalene. Valori del rapporto progressivamente maggiori di 1 indicano miscele di remota formazione, riconducibili ad una origine petrogenica piuttosto che pirogenica (Zakaria *et al.*, 2002; Neff, 2002).

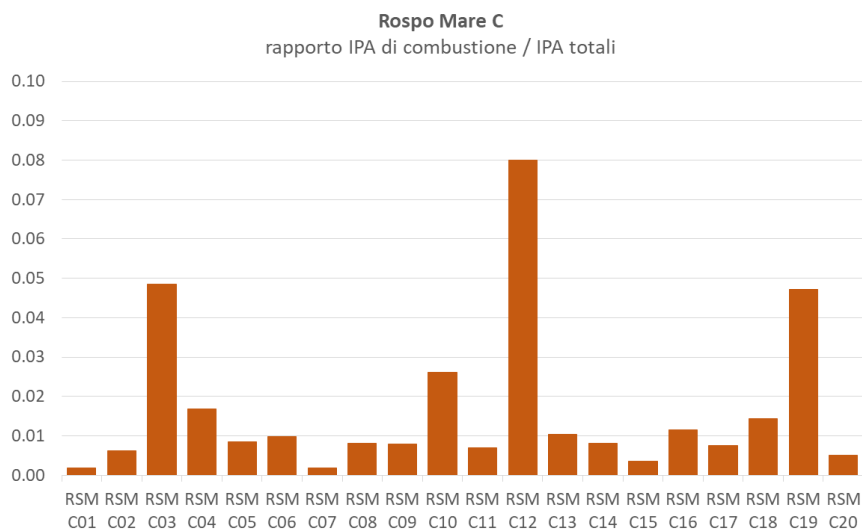
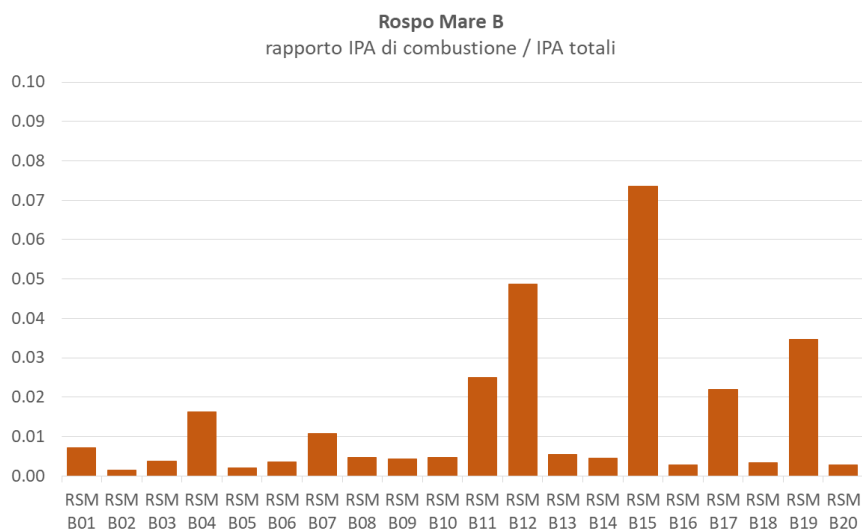
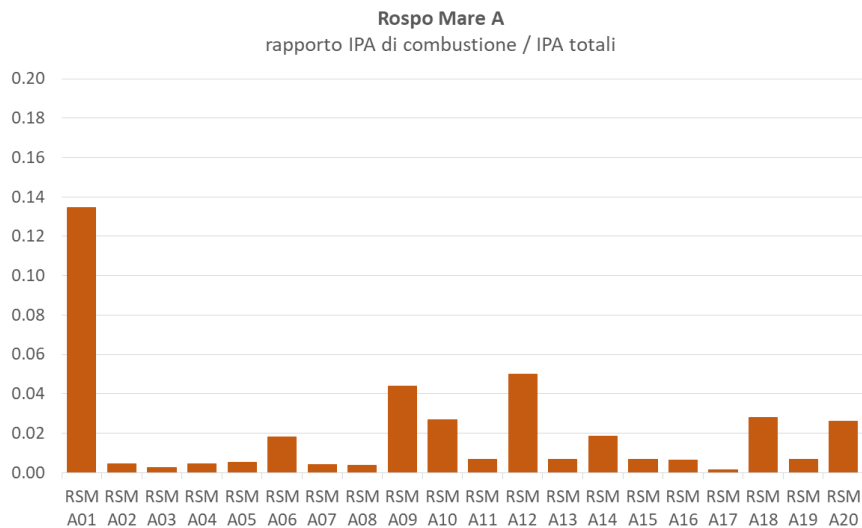


Figura 50. Rapporto tra IPA di combustione e IPA totali. La predominanza di IPA tipici dei processi di combustione e trasformazione pirogenica determina valori del rapporto che si approssimano ad 1 (Ravindra *et al.*, 2008; Tobiszewski e Namiesnik, 2012); valori molto inferiori indicano che l'origine degli IPA non è da imputarsi a fenomeni antropici di questo tipo.

Le concentrazioni di **idrocarburi alifatici totali** C10-C40 oscillano tra 26 e 106 µg/g nei sedimenti prelevati da RSM-A, 18-65 µg/g in quelli di RSM-B e 27-80 µg/g in quelli ottenuti di RSM-C. Anche per questi composti i range ottenuti risultano pressoché simili nelle tre aree investigate, suggerendo quindi che le concentrazioni di idrocarburi alifatici rappresentino livelli caratteristici dell'intera area del Campo Rospo. Nel complesso i livelli osservati sono simili a quelli recentemente misurati in altre aree dell'Adriatico centrale (Benedetti *et al.*, 2014; Etiope *et al.*, 2014). L'unico riferimento normativo disponibile per queste sostanze è rappresentato dal valore di L2 (DM 173/2016) pari a 50 µg/g, riferito all'intervallo di idrocarburi da C20 a C40 (Tabella 29); prendendo in considerazione questi dati parziali, un solo caso isolato, precisamente il campione di sedimento RSM A04, supera di poco il suddetto limite e mostra un valore di idrocarburi alifatici totali (C10-C40) di poco superiore a 100 µg/g.

La distribuzione dei diversi congeneri degli idrocarburi alifatici lungo la serie C10-C40 mostra un andamento molto simile in tutti i sedimenti analizzati dalle 3 piattaforme (Figura 51): la componente predominante è risultata quella tra C16 e C22 che rappresenta circa il 47-49% dei livelli totali di idrocarburi, mentre risultano molto basse le concentrazioni di idrocarburi pesanti (>C24), con la sola eccezione dalla componente C36-C38 che contribuisce da sola per circa il 27-30%. L'abbondanza di idrocarburi C16-C22 e la sostanziale mancanza della componente C24-C30 può essere riconducibile ad una origine biogenica naturale, principalmente legata alla presenza di sostanza organica derivante dalla decomposizione di macrofite sommerse o galleggianti (Ficken *et al.*, 2000; Ekpo *et al.*, 2012). Al contrario, la presenza di idrocarburi più pesanti, ma concentrati nell'intervallo C36-C38, lascia ipotizzare una origine petrogenica di questa componente, che interessa in maniera ubiquitaria l'intera area e contribuisce per non più del 30% alle concentrazioni di idrocarburi totali, confermando livelli piuttosto bassi (sempre molto al di sotto di 50 µg/g) e non rilevanti da un punto di vista di contaminazione ambientale.

Queste ultime considerazioni sono in linea con l'ipotesi dell'origine petrogenica precedentemente discussa per gli idrocarburi policiclici aromatici: queste due classi di idrocarburi (alifatici ed aromatici) hanno infatti evidenziato una correlazione significativa considerando l'intera distribuzione di dati ottenuti nell'area investigata di Campo Rospo ( $n=60$ ,  $r=0.2554$ ,  $r^2=0.0652$ ,  $t=2.03$ ,  $df=59$ ,  $p<0.05$ ). Come si può osservare in Figura 52, i dati suddivisi in funzione della piattaforma di provenienza (RSM-A, B o C), risultano omogeneamente distribuiti, con correlazioni parziali molto simili che contribuiscono a rafforzare l'origine naturale di queste sostanze organiche.

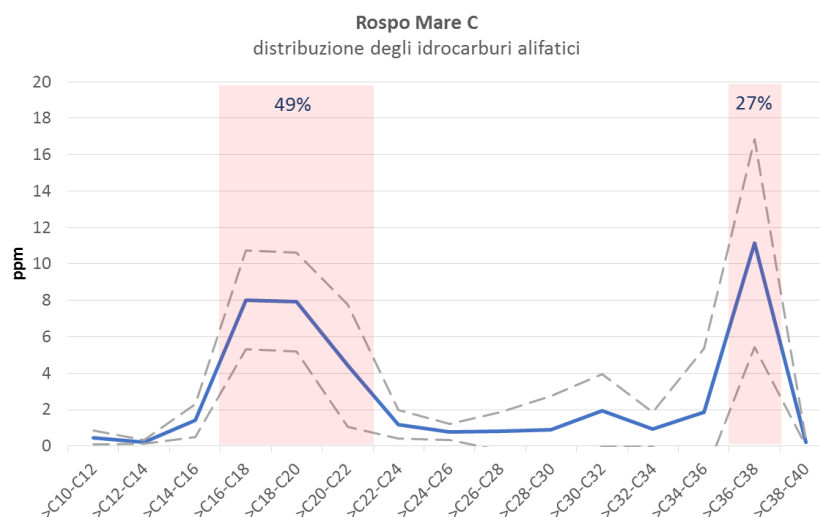
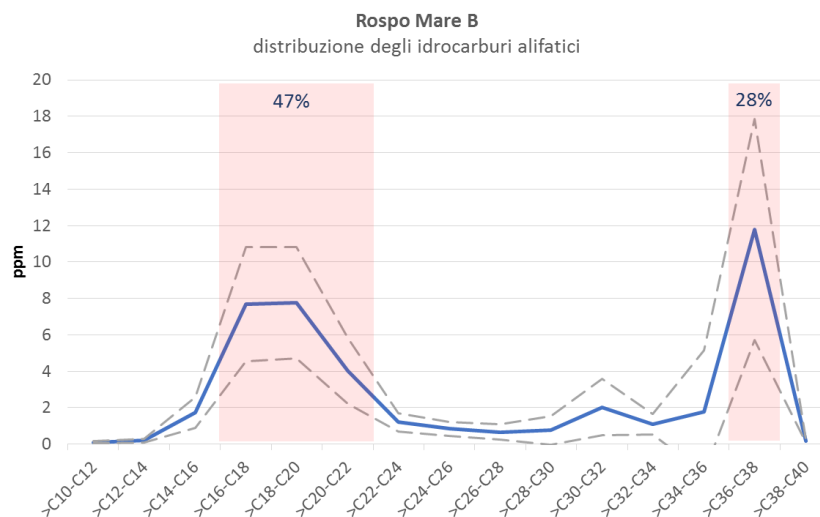
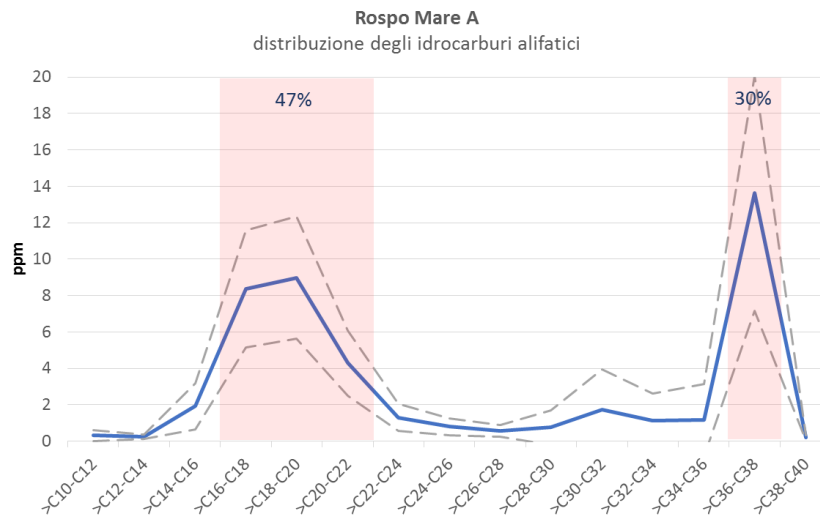


Figura 51. Distribuzioni medie dei singoli idrocarburi alifatici nei sedimenti delle piattaforme RSM-A, B e C. Valori medi di concentrazione (linea continua) e deviazioni standard (linea tratteggiata), espressi in  $\mu\text{g/g}$ : il contributo percentuale degli idrocarburi C16-C22 e C36-C38 viene mostrato rispetto ai livelli totali.

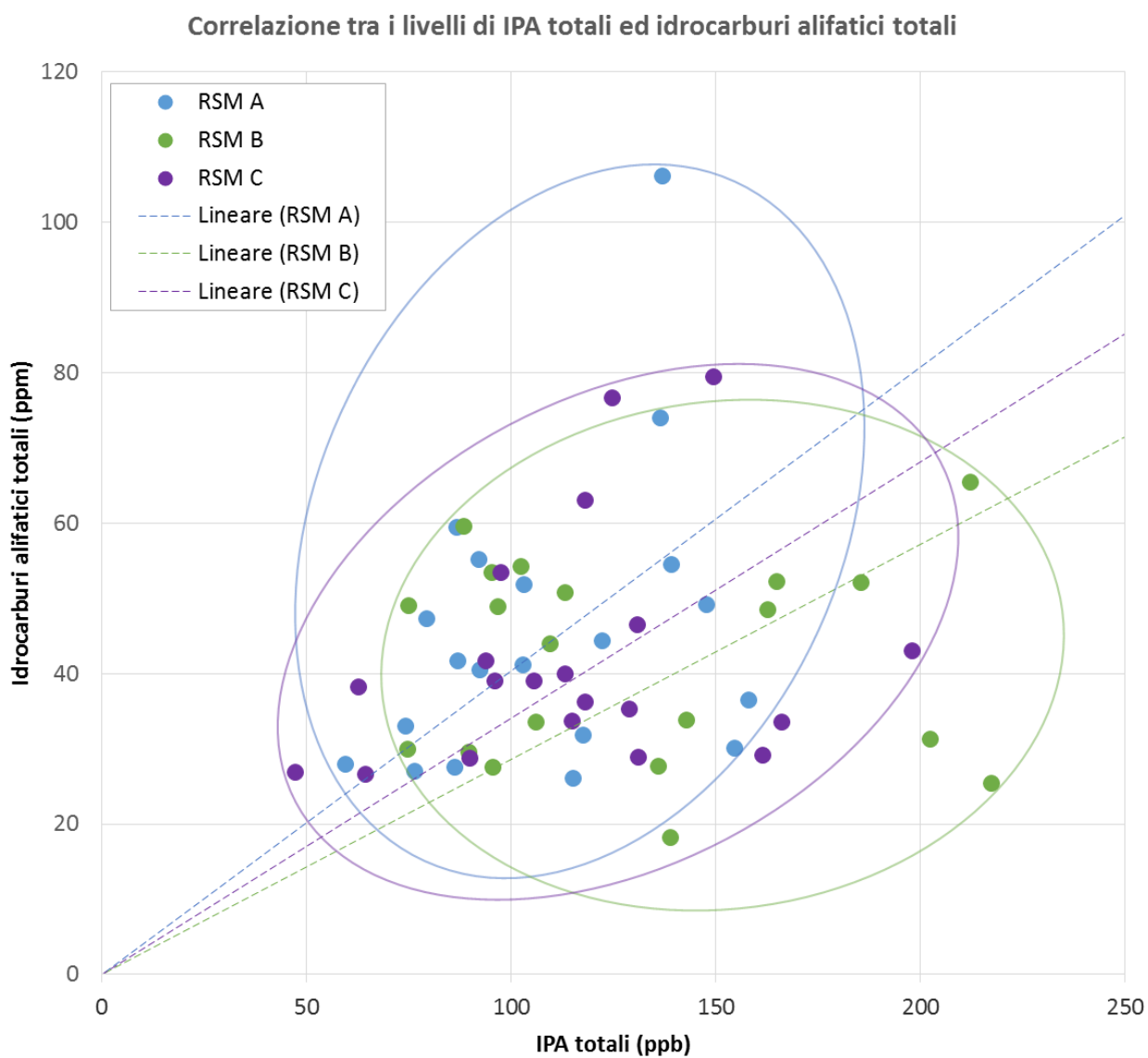


Figura 52. Correlazioni tra livelli di idrocarburi alifatici ed aromatici nei sedimenti di Campo Rospo. Regressioni lineari parziali per gruppi di dati ottenuti da aree differenti (RSM-A, RSM-B e RSM-C).

## **5.2 RISPOSTE ECOTOSSICOLOGICHE**

L'utilizzo di saggi ecotossicologici è una procedura fondamentale per affiancare alle analisi chimiche, una valutazione del pericolo biologico associato a varie tipologie di matrici sia liquide (scarichi, acque, elutriati) che solide (sedimenti). I vantaggi di questo tipo di analisi derivano dalla possibilità di utilizzare organismi omogenei per specie, sesso, età, nonché l'elevata standardizzazione delle procedure metodologiche, la generale rapidità, semplicità e sensibilità dei saggi, l'ampia scelta delle specie e degli end-point biologici misurabili. Al tempo stesso però, pur essendo molto utili per indicare pericoli di tossicità acuta, sono meno appropriati per valutare possibili effetti cronici, e le condizioni standardizzate di laboratorio forniscono risultati non sempre direttamente estrapolabili a condizioni ambientali complesse, a specie diverse o a condizioni fisiologiche particolari.

In questo senso, l'approccio con i saggi ecotossicologici richiede sempre l'utilizzo di una batteria di test che includa specie rappresentative di vari *taxa* e con posizioni trofiche o ruolo ecologico diversi (dai batteri alle alghe, invertebrati e pesci, dai decompositori ai consumatori). Anche la scelta degli endpoint deve includere parametri caratterizzati da molteplici livelli di sensibilità e significato tossicologico, e quelli più frequentemente misurati sono la mortalità, le anomalie dello sviluppo e l'embriotossicità, i cambiamenti nel successo riproduttivo, le alterazioni della crescita, la bioluminescenza, le modificazioni comportamentali.

In questo studio, la batteria utilizzata ha previsto l'analisi della bioluminescenza nel batterio *Vibrio fischeri* esposto alla fase solida, la crescita algale di *Phaeodactylum tricorutum*, la mortalità del crostaceo copepode *Acartia tonsa*, l'embriotossicità nel riccio di mare *Paracentrotus lividus*. Tutte queste specie sono ampiamente utilizzate e rientrano da tempo in Manuali ISPRA che raccomandano l'esecuzione di saggi ecotossicologici (es. APAT-ICRAM 2007, Manuale per la Movimentazione dei Sedimenti Marini; ISPRA 2011, Manuale sulle Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e marine). In questi Manuali era previsto che, sulla base dei risultati ottenuti, a ciascun test fosse assegnata una classe di tossicità e che al campione venisse attribuito il grado di tossicità corrispondente al peggiore dei risultati ottenuti nell'ambito della batteria dei saggi utilizzati.

Tale approccio, pur sembrando apparentemente cautelativo, in realtà non permette una valutazione reale ed un confronto tra matrici analizzate con batterie di saggi diversi. Ovviamente i vari endpoint biologici differiscono in termini di sensibilità di risposta, ma anche le specie non hanno le stesse risposte, e la stessa specie può cambiare in funzione del periodo o della fase del ciclo biologico. Ad esempio, il riccio di mare che è l'unico saggio ad aver mostrato qualche debole effetto di tossicità in alcuni dei campioni analizzati in questo studio, può mostrare effetti sullo sviluppo embrionale indipendenti dalla presenza di contaminanti e legati invece ad altre caratteristiche chimico-fisiche dei sedimenti (Morrone *et al.*, 2016).

Nel caso dei campioni di sedimento di Campo Rospo, le risposte ottenute con i saggi biologici sono comunque state talmente poche e di così lieve entità che non avrebbero richiesto nessun tipo di elaborazione ulteriore, evidenziando chiaramente l'assenza di pericoli ecotossicologici per tutti i campioni analizzati. Tuttavia, come sarà maggiormente dettagliato nei paragrafi successivi, anche questi dati sono stati sottoposti ad una elaborazione basata su criteri di valutazione ponderata per rispondere alle indicazioni più recenti sull'interpretazione dei dati ecotossicologici, così come recepito anche all'interno del DM 173/2015, e per permettere la loro successiva integrazione con i risultati delle altre linee di evidenza.

### **5.3 COMUNITÀ BENTONICHE**

Per quanto riguarda l'analisi delle comunità bentoniche, i risultati complessivi hanno evidenziato uno stato di buona qualità dei fondali intorno alle tre piattaforme, con popolamenti tipici dei fanghi terrigeni costieri (Pérès e Picard, 1964). È stata riscontrata una discreta omogeneità tra le stazioni per ogni piattaforma, e non si evidenziano differenze rilevanti né tra le stazioni a largo e quelle più vicine alla piattaforma, e neppure tra le stazioni prese lungo il transetto delle correnti dominanti e quelle lungo il transetto perpendicolare alle correnti (Figure 53, 54 e 55). Inoltre, mediante l'analisi multivariata si è osservata una distribuzione omogenea dei campioni anche tra le tre piattaforme, senza alcuna separazione tra i campioni dei tre siti (Figura 56).

L'unica differenza statisticamente significativa è stata ottenuta a livello di abbondanze totali nei campioni RSM-C1 e RSM-C2 rispetto ai valori di riferimento a 1000 m, che conferma una generale tendenza con abbondanze in diminuzione in alcuni dei punti in prossimità delle piattaforme. Queste differenze tuttavia sono probabilmente imputabili alla diversa composizione dei sedimenti piuttosto che ad un eventuale impatto antropico dovuto alle attività delle piattaforme. Infatti, mettendo in relazione la distribuzione e l'abbondanza delle specie macrozoobentoniche ritrovate con la composizione dei sedimenti, la quantità degli organismi è risultata direttamente proporzionale alla quantità di sabbie più fini (63  $\mu\text{m}$ ), che costituiscono quindi il substrato maggiormente adatto alla colonizzazione delle specie predominanti; al contrario, le altre tipologie di materiale sedimentario (ghiaia, sabbie di dimensioni da 125 a 1000  $\mu\text{m}$  e peliti) non sembrano mai influenzare la distribuzione o l'abbondanza delle specie macrozoobentoniche.

Come si può osservare nella Figura 57, l'abbondanza dei policheti e dei crostacei, che rappresentano le due classi di organismi maggiormente rappresentative nell'intera area del Campo Rospo, condividono la stessa relazione statisticamente significativa con la quantità di sabbie fini (63  $\mu\text{m}$ ), di fatto determinando la medesima correlazione positiva osservata anche per l'insieme di tutti i *taxa*. In aggiunta, i punti risultano uniformemente distribuiti tra le tre piattaforme investigate, non descrivendo pertanto alcuna differenza in funzione del sito di prelievo dei sedimenti. È noto che dalle

strutture portanti delle piattaforme si staccano costantemente gusci di molluschi, quali mitili o ostriche, che si depositano sul fondale circostante, assieme ad altro materiale aggregato di origine biotica, come ad esempio formazioni calcaree di serpulidi, balanidi o briozoi; questo materiale, decomponendosi lentamente, fa sì che i sedimenti nelle immediate vicinanze delle piattaforme possano essere caratterizzati dalla presenza di aggregati e materiale grossolano, costituendo quindi un substrato sfavorevole alla colonizzazione di molte specie bentoniche.

Le caratteristiche fisiche dei sedimenti sono quindi in grado di influenzare l'abbondanza e la distribuzione delle specie macrozoobentoniche, molto più della loro composizione chimica, come si può facilmente evincere dalla Tabella 30, che riassume i risultati delle correlazioni multiple di Pearson testate tra l'abbondanza delle specie osservate nei sedimenti, in funzione della Classe e dell'Ordine di appartenenza, con il contenuto di sostanza organica (SO), carbonio organico totale (TOC), metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici ed alifatici totali.

Sono molto pochi i casi in cui i livelli di determinate specie chimiche influenzano negativamente l'abbondanza delle specie bentoniche presenti, per lo più rappresentati dal mercurio, manganese e, più limitatamente, ferro e zinco. Questo comunque non stupisce se si considera che i livelli delle sostanze chimiche misurate nei sedimenti sono sempre stati bassi, e comunque in linea con i range di concentrazione noti per i sedimenti del medio Adriatico; l'indice ecologico AMBI ha largamente evidenziato un buon livello di qualità dei sedimenti.

Le basse concentrazioni di sostanze chimiche nei sedimenti sono probabilmente la spiegazione per le numerose correlazioni positive riscontrate, spesso caratterizzate da una elevata significatività statistica ( $p < 0.001$ ), che riguardano principalmente bario, cadmio, ferro, zinco ed IPA e in maniera meno rilevante anche SO, TOC, alluminio, arsenico, manganese, piombo ed idrocarburi alifatici. È evidente infatti che per queste sostanze sarebbe difficilmente ipotizzabile un meccanismo diretto che faciliti la colonizzazione del macrobentos, con forse l'unica eccezione per lo zinco che è implicato in numerosi processi biologici, tra cui l'omeostasi cellulare, l'accrescimento di strutture esoscheletriche e calcaree. Alcuni organismi potrebbero dunque essere caratterizzati da elevati tassi di accumulo ed escrezione di questo metallo, influenzandone i livelli nei sedimenti. Da questo punto di vista, le concentrazioni di alcuni composti chimici sarebbero la conseguenza, piuttosto che la causa, della composizione ed abbondanza delle comunità macrozoobentoniche.

I risultati delle comunità bentoniche suggeriscono, ancora una volta, una origine biogenica o comunque naturale delle sostanze chimiche presenti nei sedimenti dell'intera area di Campo Rospo, piuttosto che una potenziale origine antropica dovuta alle attività delle piattaforme.



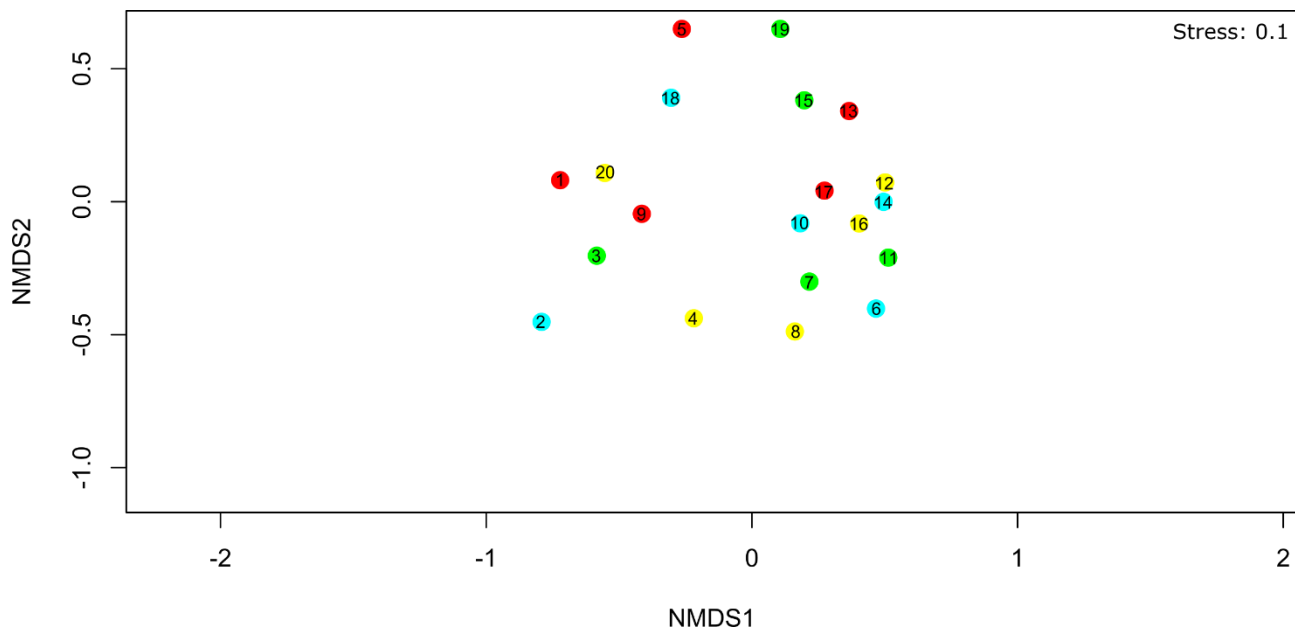


Figura 53. Analisi multifattoriale nMDS della distribuzione delle abbondanze del macrozoobenthos per la piattaforma RSM-A; i diversi colori identificano transetti differenti (rosso: transetto nord-ovest; celeste: transetto sud-ovest; verde: transetto sud-est; giallo: transetto nord-est), la numerazione crescente identifica la distanza dalla piattaforma (25 m, 50 m, 100 m, 250 m e 1000 m).

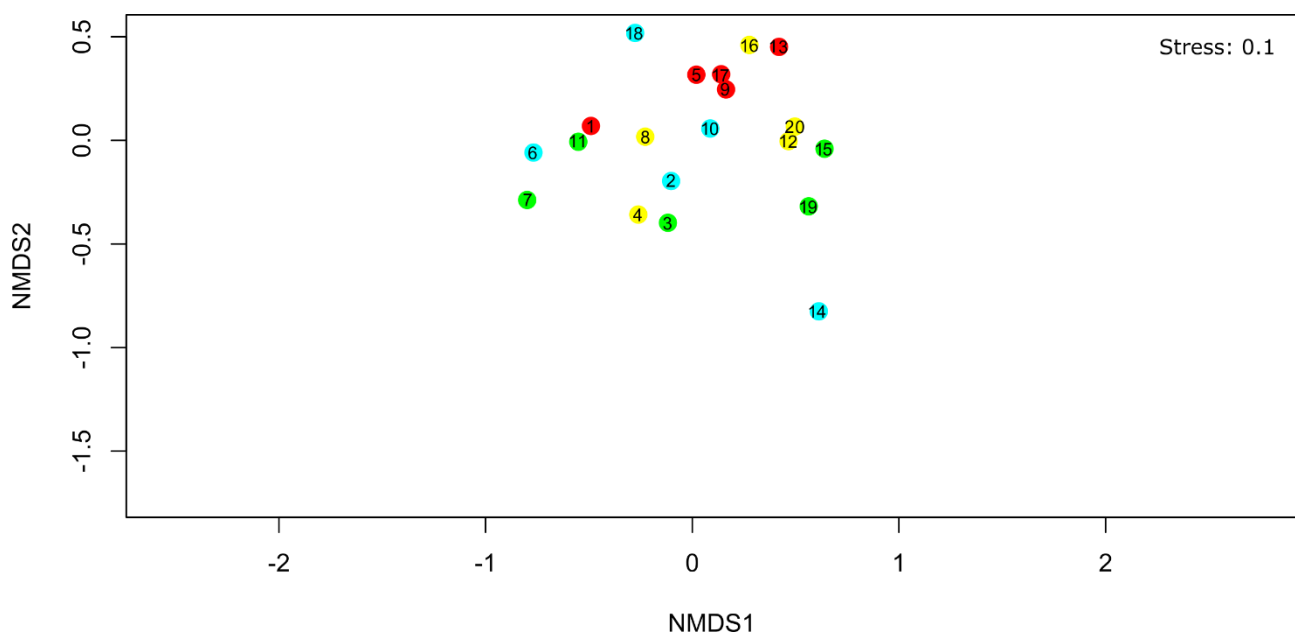


Figura 54. Analisi multifattoriale nMDS della distribuzione delle abbondanze del macrozoobenthos per la piattaforma RSM-B; i diversi colori identificano transetti differenti (rosso: transetto nord-ovest; celeste: transetto sud-ovest; verde: transetto sud-est; giallo: transetto nord-est), la numerazione crescente identifica la distanza dalla piattaforma (25 m, 50 m, 100 m, 250 m e 1000 m).

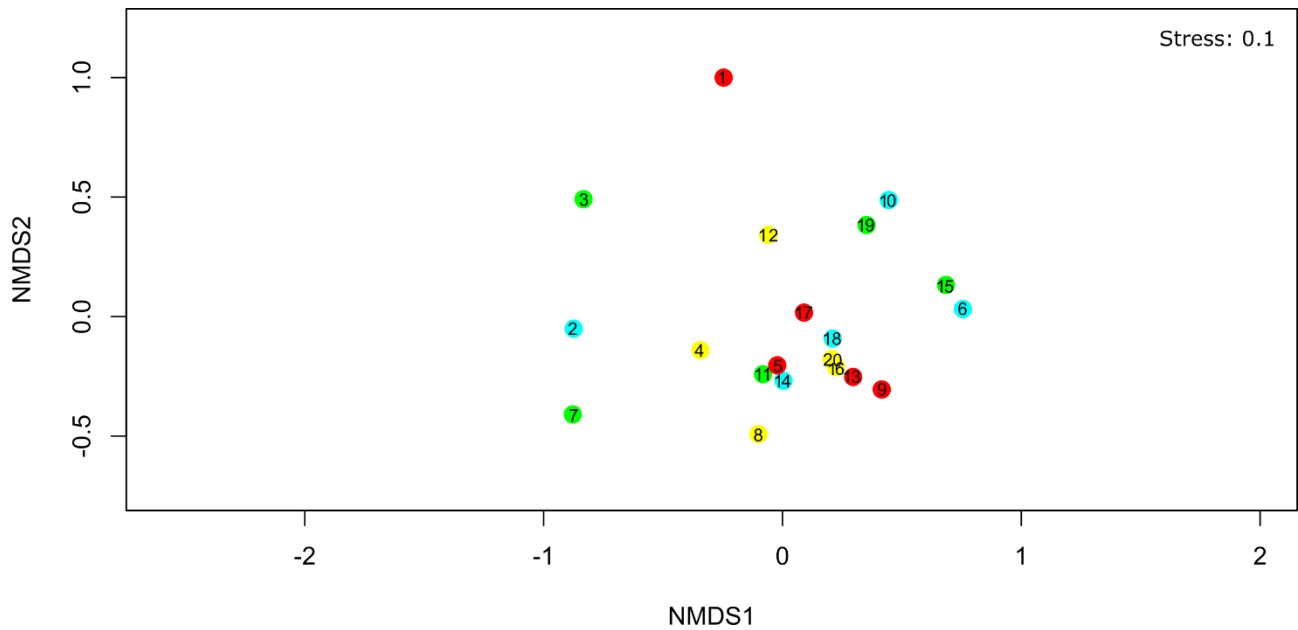


Figura 55. Analisi multifattoriale nMDS della distribuzione delle abbondanze del macrozoobenthos per la piattaforma RSM-C; i diversi colori identificano transetti differenti (rosso: transetto nord-ovest; celeste: transetto sud-ovest; verde: transetto sud-est; giallo: transetto nord-est), la numerazione crescente identifica la distanza dalla piattaforma (25 m, 50 m, 100 m, 250 m e 1000 m).

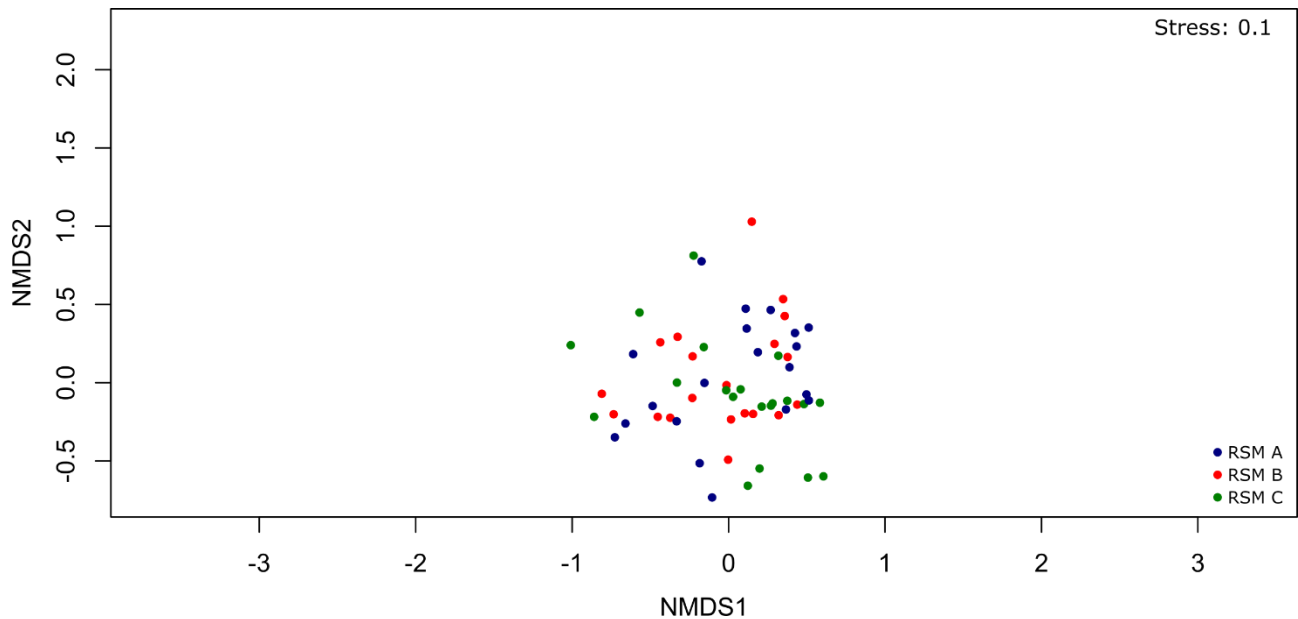


Figura 56. Analisi multifattoriale nMDS dei risultati relativi alla distribuzione delle abbondanze del macrozoobenthos per le piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C; i diversi colori identificano punti relativi alle differenti piattaforme.

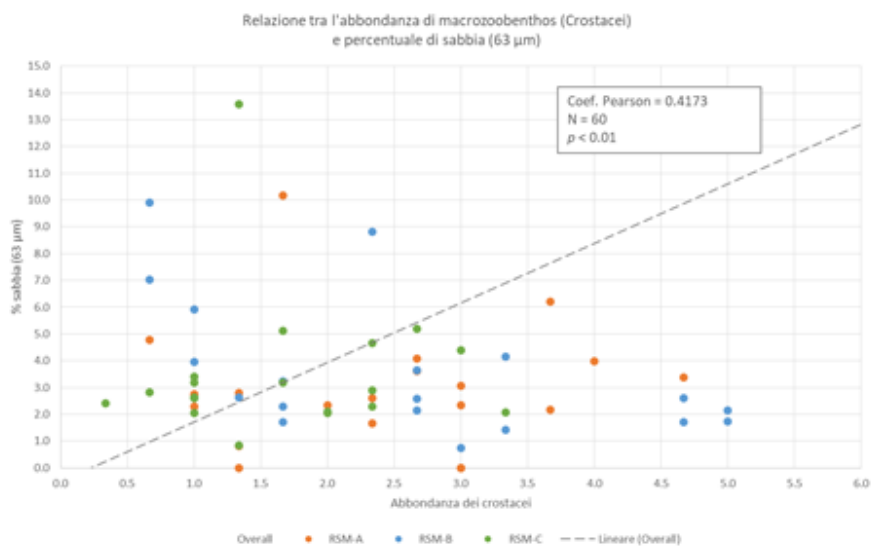
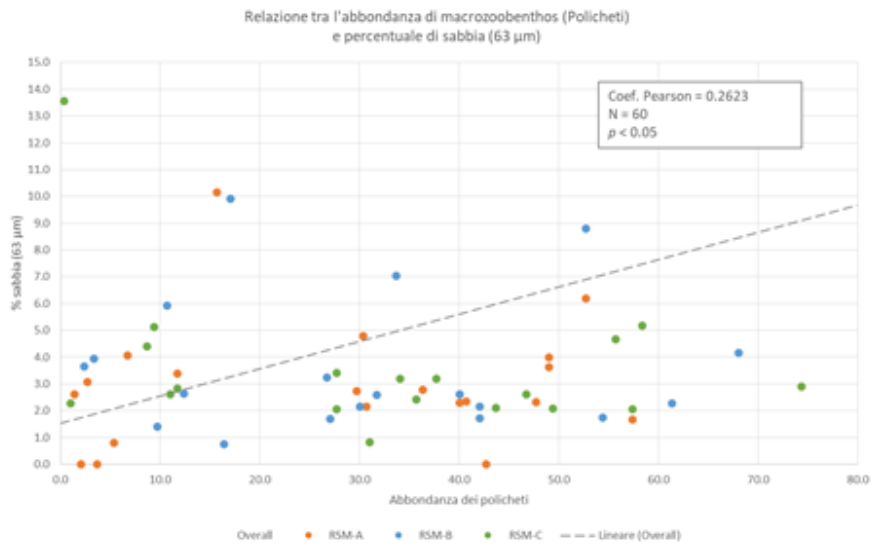
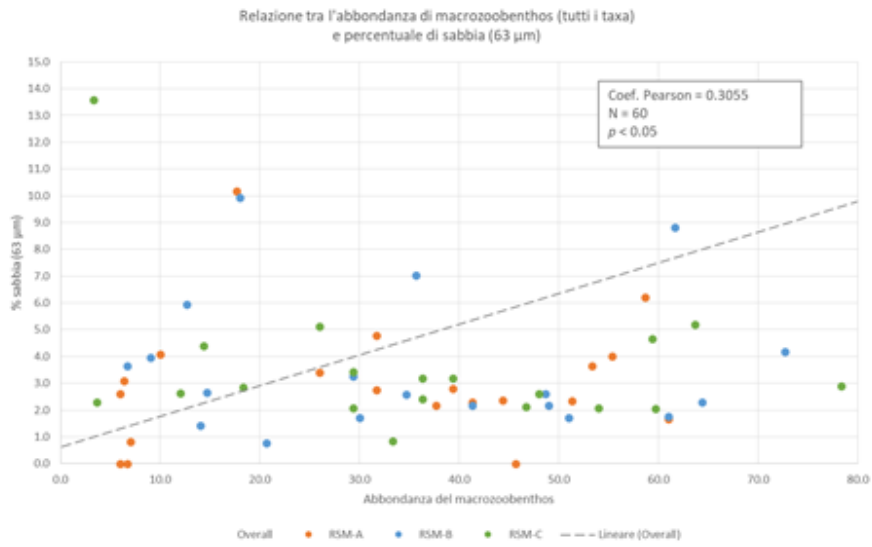


Figura 57. Correlazioni lineari di Pearson tra l'abbondanza di tutti i taxa osservati e di quelli maggiormente rappresentativi (policheti e crostacei) con la quantità di sabbie fini presenti nei sedimenti (63 µm).

Classe	Ordine	Abb.%	%SO	%TOC	Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	V	Zn	IPA	Alif.
Polychaeta	(tutti)	87.5%											+						
	Eunicida	3.89%																	
	Phyllodoidea	5.73%					+												
	Sabellida	0.46%					+												
	Sponida	1.22%																	
	Terebellida	76.3%											++						
Bivalvia	(tutti)	0.99%					++	+++					-				+		
	Adapedonta	0.02%													++				
	Cardida	0.08%						+++			+							+++	
	Imbricentia	0.11%					+											+	
	Mytilida	0.08%																	+
	Nuculida	0.66%						+++						-					
	Venerida	0.05%					+++								+++		+++		
Gastropoda	(tutti)	0.80%									+		+						+++
	Caenogastropoda	0.02%																	+++
	Littorinimorpha	0.79%									+		+						+++
Mollusca	(tutti)	6.57%				+++							-						+
	Amphipoda	1.90%				+							-						
	Cumacea	0.37%																	
	Decapoda	3.35%																	
	Isopoda	0.14%																	
	Tanaidacea	0.80%					++	+											
Echinoidea	Spatangoida	0.06%																	
Ophiuroidea	(tutti)	2.53%					++	+++											+++
	Apodida	0.28%									++								+
	Ophiurida	2.25%					+++	+++											+++
Nemertea	Nemertea	0.85%																	+
Phascolosomatida	Aspidosiphonida	0.02%																	++
Sipunculidea	Golfingiida	0.51%																	
Anthozoa	Actiniaria	0.05%																	++
																			+

Tabella 30. Correlazioni tra l'abbondanza delle specie macrobentoniche, in funzione delle Classi e rispettivi Ordini di appartenenza, ed il contenuto di sostanza organica (SO), carbonio organico totale (TOC), metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici totali (IPA) ed idrocarburi alifatici totali C10-C40 (Alif.). Il simbolo positivo indica una correlazione significativa e positiva (+)  $p < 0.05$ , (++)  $p < 0.01$ , (+++)  $p < 0.001$ ; il simbolo negativo indica una relazione significativa ed inversa (-)  $p < 0.05$ , (--)  $p < 0.01$ .

## **5.4 BIOACCUMULO NEI POLICHETI E NEI MITILI NATURALI E TRAPIANTATI**

### **5.4.1 Bioaccumulo di metalli pesanti in *Hediste diversicolor***

La biodisponibilità di metalli associati ai sedimenti è stata valutata in condizioni di laboratorio con il polichete *Hediste diversicolor*. Le variazioni nei livelli tissutali dei diversi elementi sono state misurate dopo una stabulazione di 4 settimane nei sedimenti prelevati a due diverse distanze (50 m e 1 Km) dalle tre piattaforme: il test è stato condotto sia in estate che in inverno, sebbene il contenuto di elementi in tracce nei sedimenti sia stato misurato solamente per il primo periodo. Come già precedentemente commentato, i valori di concentrazione dei metalli nei sedimenti di Campo Rospo rientrano sempre nei normali range di variabilità osservati in Adriatico, ed il risultato dei saggi condotti con *H. diversicolor* può dare una ulteriore indicazione sulla biodisponibilità di tali elementi. È utile premettere che confrontare le concentrazioni misurate negli organismi trattati con quelle di controlli esterni (organismi prelevati all'inizio ed alla fine degli esperimenti e mantenuti in sabbie di provenienza differente rispetto all'area investigata) non sempre fornisce risultati attendibili in termini di tossicità o di rilevanza ambientale. Infatti i livelli basali degli elementi in traccia nei tessuti dei policheti utilizzati sono estremamente bassi, soprattutto in certi periodi, e percentualmente possono mostrare una spiccata variabilità (Bryan e Hummerstone, 1971). Le diverse caratteristiche dei sedimenti, ad esempio in termini di sostanza organica e detrito, possono avere un ruolo fondamentale durante le 4 settimane di stabulazione degli animali: un aumento o una diminuzione nel peso dei tessuti può determinare, a parità di contenuto di metalli, una variazione di concentrazione tissutale indipendente però dalla biodisponibilità ambientale di questi elementi. Per questo motivo, organismi di controllo (sia iniziale che finale), mantenuti in sabbie incontaminate esterne, sono estremamente utili al fine di verificare l'integrità della popolazione e degli individui utilizzati, escludere condizioni di generale stress che potrebbero compromettere il test stesso, valutare la vitalità degli animali per tutto il periodo previsto di esposizione e caratterizzare i livelli basali di metalli nei tessuti degli organismi utilizzati: al tempo stesso però, non rappresentano il riferimento migliore per una corretta valutazione dei livelli di biodisponibilità dei metalli in relazione ai sedimenti dell'area investigata. Per questo motivo, nello studio della biodisponibilità dei metalli nei sedimenti di Campo Rospo, quelli prelevati ad una distanza di 1 Km dalle rispettive piattaforme sono stati considerati come matrici di riferimento più attendibili perché del tutto simili ai sedimenti prelevati in prossimità delle strutture, ma non influenzati dalle attività antropiche condotte sulle piattaforme stesse.

In questo senso, dai risultati della campagna estiva (luglio 2016), si può notare che le concentrazioni misurate negli organismi trattati con i sedimenti di Campo Rospo risultano talvolta superiori a quelle dei controlli esterni; in nessun caso però i valori ottenuti con i sedimenti in prossimità delle piattaforme sono maggiori o significativamente differenti da quelli misurati nei policheti stabulati nei sedimenti ottenuti ad 1 Km di distanza dalle piattaforme. In aggiunta, i dati ottenuti, anche se evidenziano spesso una marcata variabilità, rientrano sempre nei normali range conosciuti per questi

organismi, confermando l'assenza di una contaminazione biologicamente rilevante dei sedimenti. Le differenze nei livelli di biodisponibilità tra i vari punti di prelievo attorno alle piattaforme, seppur raramente risultino statisticamente significative e senza implicazioni di rilevanza ambientale, restano comunque utili ad incrementare il livello di accuratezza e di interpretazione complessiva dei dati a nostra disposizione.

Nello specifico, le concentrazioni di **alluminio** nei policheti esposti ai sedimenti raccolti attorno alla piattaforma RSM-B sono simili o tendenzialmente inferiori a quelle misurate nei test condotti per le altre piattaforme, nonostante i sedimenti di RSM-B avessero concentrazioni di alluminio almeno un ordine di grandezza maggiori. Questo risultato denota quindi la totale assenza di biodisponibilità di tale elemento e, come precedentemente ipotizzato, le differenze di concentrazione osservate per i sedimenti intorno alle tre piattaforme investigate sono riconducibili alla loro composizione geologica e minerale, piuttosto che ad una diversa presenza di alluminio libero e solubilizzato.

Benché i dati di riferimento relativi alle concentrazioni basali di alluminio nei tessuti di *H. diversicolor* siano particolarmente scarsi, le concentrazioni misurate possono essere considerate basse, molto simili o inferiori ai normali valori conosciuti per questi policheti. In popolazioni provenienti da aree non soggette a contaminazione diretta di alluminio sono state misurate concentrazioni medie pari a circa 360 µg/g, con valori massimi fino a circa 600 µg/g (English *et al.*, 2015). Gli stessi autori hanno anche evidenziato che le concentrazioni di alluminio possono normalmente variare di qualche ordine di grandezza nei tessuti degli organismi marini, misurando livelli tra 10 e 600 µg/g nei policheti *Clymenella torquata* e *Glydura dibranchiata*, ed oltre 2000 µg/g nei tessuti di altri invertebrati (English *et al.*, 2015).

Le concentrazioni di **arsenico** nei tessuti di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti delle 3 piattaforme RSM-A, B e C sono estremamente simili in tutti i campioni analizzati e, non superando mai i 5 µg/g, si collocano tra i livelli più bassi riportati per l'arsenico in questo tipo di invertebrati (Fattorini *et al.*, 2005). È noto infatti che molte specie di policheti, tra le quali anche quelle del genere *Hediste*, sono in grado di accumulare e tollerare concentrazioni elevate di arsenico, anche nelle sue forme maggiormente tossiche (Geiszinger *et al.*, 2002; Fattorini *et al.*, 2005): pertanto, i livelli misurati negli organismi del presente studio permettono di escludere una biodisponibilità di arsenico nei sedimenti del Campo Rospo Mare.

Analogamente, le concentrazioni di **cadmio**, **nicel**, **rame** e **zinco** risultano sempre molto simili nei tessuti di tutti gli organismi esposti ai sedimenti provenienti dalle tre piattaforme, ed i valori sono paragonabili a quelli già descritti per i policheti, 0.02-0.06 µg/g (Cd), 0.5-1.3 µg/g (Ni), 20-35 µg/g (Cu) e 100-175 µg/g (Zn), (Casado-Martinez *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2010; Hans *et al.*, 2011; English *et al.*, 2015). Anche per questi metalli è pertanto evidente una totale assenza di biodisponibilità associata ai sedimenti dell'area di Campo Rospo.

Per quanto riguarda le concentrazioni di **bario**, i valori oscillano tra circa 0.1 a 6 µg/g con poche differenze sempre soggette ad elevata variabilità e non statisticamente significative. Le concentrazioni misurate rientrano inoltre nei normali range riportati per il bario in questi organismi (English *et al.*, 2015). Infine, i valori tendenzialmente maggiori ottenuti negli animali esposti ai sedimenti prelevati ad un chilometro di distanza dalle piattaforme (come nel caso dei campioni RSM-A 17a e RSM-C 17a e 19a), contribuiscono ulteriormente a escludere la biodisponibilità del bario nei sedimenti sottoposti al test.

Le concentrazioni di **cromo**, **ferro** e **vanadio** nei policheti esposti ai sedimenti di tutte e tre le piattaforme esaminate, sono risultate del tutto simili a quelli misurati negli organismi del controllo esterno; i valori tendenzialmente maggiori osservati negli organismi esposti al sedimento RSM-A 8, non sono differenti a quelli ottenuti per il campione RSM-A 17a, ovvero uno dei campioni prelevati ad 1 Km dalla piattaforma e che rappresenta un riferimento interno al test. In generale, i valori ottenuti per questi metalli sono da considerarsi bassi ed in linea con quelli che possono essere normalmente misurati in policheti da aree di controllo (Bocchetti *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2010; Fattorini *et al.*, 2010; English *et al.*, 2015).

Il **mercurio** ha mostrato concentrazione piuttosto simili nei tessuti di tutti gli organismi esposti, tra 0.05 e 0.13 µg/g, valori bassi anche rispetto a quelli tipici di molti invertebrati marini (Bocchetti *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2010).

I risultati di **manganese** evidenziano una marcata variabilità e le variazioni osservate tra i tessuti dei policheti esposti ai diversi sedimenti non risultano di fatto significative. I livelli, tipicamente compresi tra 5 e 30 µg/g, sono spesso tendenzialmente maggiori nei policheti esposti ai sedimenti raccolti ad 1 Km dalle piattaforme investigate (ad esempio RSM-A 17a e RSM-C 19a e 19b), ma comunque sempre confrontabili con quelli di riferimento riportati per invertebrati marini di aree non contaminate (Bocchetti *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2010; English *et al.*, 2015).

Anche le concentrazioni tissutali di **piombo**, sempre comprese tra 0.5 e 1 µg/g con l'unica eccezione di 2 µg/g nei tessuti dei policheti stabulati nel sedimento RSM-A 17a, risultano assolutamente in linea con quelle tipiche di organismi di controllo (Bocchetti *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2010), permettendo di escludere, anche per questo metallo, una biodisponibilità biologicamente significativa nei sedimenti dell'area di Campo Rospo.

Al fine di ottenere informazioni aggiuntive sulla possibile biodisponibilità di specie chimiche presenti nei sedimenti, molti autori hanno adottato indici che mettono in relazione i livelli di bioaccumulo nei tessuti degli organismi bioindicatori con le concentrazioni delle stesse sostanze misurate nei sedimenti (Thomann *et al.*, 1992; Schrock *et al.*, 1997; Ferguson *et al.*, 1998; Word *et al.*, 2005). Questo rapporto, comunemente indicato come Fattore di accumulo sedimento-biota, o Biota-sediments accumulation factor (BSAF) (U.S. Department of Energy. 1998), è stato nel tempo

perfezionato includendo alcuni parametri correttivi che tengono conto ad esempio del contenuto di lipidi negli organismi, la percentuale di sostanza organica nella matrice abiotica oppure la valutazione della frazione labile e biodisponibile dei sedimenti, al fine di ottenere un modello predittivo della contaminazione dei sedimenti attraverso l'utilizzo di organismi bioindicatori (U.S. Department of Energy. 1998; Word *et al.*, 2005). Non essendo questo lo scopo del presente studio, il semplice rapporto tra le concentrazioni ottenute negli organismi e nel sedimento è stato utilizzato come un indice aggiuntivo al confronto dei risultati ottenuti per i sedimenti dei differenti siti intorno alle 3 piattaforme.

Poiché i livelli dei vari elementi spaziano su alcuni ordini di grandezza sia nel biota che nei sedimenti, i BSAF dei diversi metalli non possono essere direttamente confrontati tra loro o sommati. Al fine di ottenere un indice BSAF cumulativo, che tenga conto del contributo di ciascun metallo analizzato e che quindi possa riflettere il generale livello di biodisponibilità degli elementi considerati, è stata effettuata una media ponderata dei singoli BSAF applicando una costante di correzione specifica per ciascun metallo (dedotta mediante la stima del rapporto delle medie geometriche ottenute per ciascun elemento all'interno dell'intera popolazione di *H. diversicolor* e sedimenti utilizzati). I risultati ottenuti sono riportati nella Figura 58, che mostra il confronto tra le medie ponderate dei BSAF ottenuti da tutti i metalli analizzati e relativi ai vari siti di campionamento in prossimità delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C; le etichette all'interno delle barre, quando presenti, indicano l'elemento che maggiormente contribuisce al valore totale dell'indice e la relativa percentuale.

Le medie ponderate dei BSAF ottenute per la piattaforma RSM-A mostrano valori piuttosto simili e che suggeriscono una scarsa biodisponibilità di metalli, tendenzialmente maggiore nel campione 17a, prelevato ad 1 Km di distanza dove circa il 33% del contributo complessivo del BSAF è dato dal bario.

I valori medi di BSAF per i sedimenti di RSM-B sono in assoluto i più bassi ed estremamente simili tra loro, suggerendo una scarsa biodisponibilità di metalli per i sedimenti di questa piattaforma, nonostante fossero quelli con i più elevati livelli di alluminio e, in maniera meno marcata, di cromo e piombo.

Infine, i risultati ottenuti per i sedimenti della piattaforma RSM-C evidenziano una scarsa biodisponibilità di metalli nei campioni prelevati nelle immediate vicinanze della struttura (5, 6, 7 e 8), con valori di BSAF ponderati inferiori a quelli calcolati per i sedimenti prelevati ad 1 Km di distanza dalla piattaforma; in questi campioni, bario e alluminio suggeriscono nuovamente un'influenza delle caratteristiche geochimiche di tutta l'area investigata, piuttosto che eventuali fenomeni di impatto antropico del Campo Rospo.



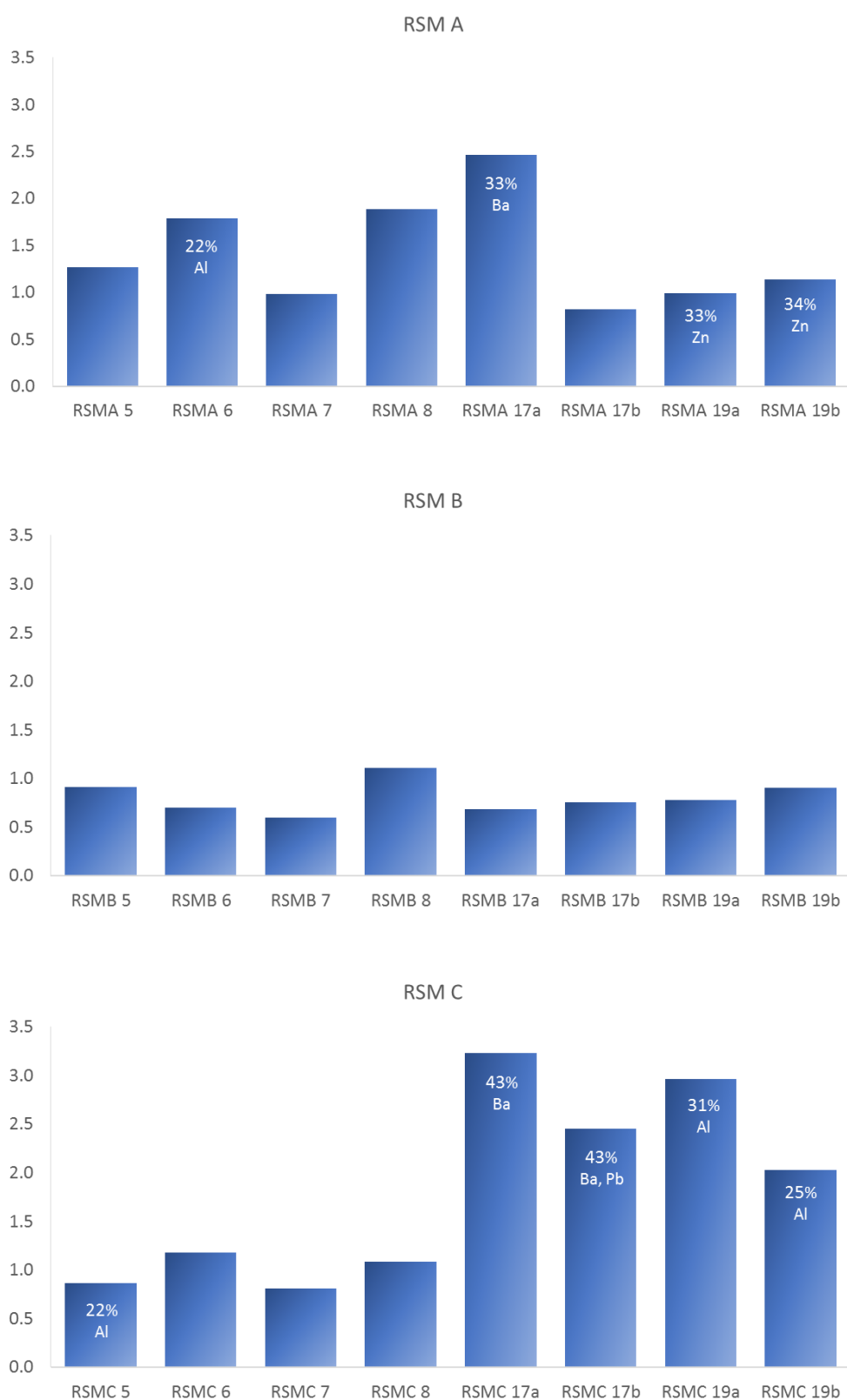


Figura 58. Medie ponderate degli indici cumulativi BSAF ottenuti come rapporti delle concentrazioni nei tessuti di *H. diversicolor* e nei sedimenti; le etichette all'interno delle barre, quando presenti, indicano gli elementi che maggiormente contribuiscono al valore totale dell'indice e relative percentuali.

La biodisponibilità dei metalli mediante l'utilizzo di *H. diversicolor* è stata valutata anche per i sedimenti prelevati durante il dicembre 2016, benché non siano disponibili, per questa campagna, i dati relativi al contenuto di metalli nei sedimenti stessi. Anche in questo caso, i controlli condotti con sabbie non contaminate di provenienza differente rispetto all'area investigata, sono da intendersi come utili a monitorare lo stato degli organismi utilizzati, ma poco rilevanti per quanto riguarda il bioaccumulo. Come per la campagna estiva, i sedimenti prelevati ad un chilometro di distanza dalle piattaforme (17a, 17b, 19a e 19b), ovvero ad una distanza che permette di escludere l'influenza diretta delle attività antropiche delle piattaforme, sono stati utilizzati come riferimenti interni ai test eseguiti con *H. diversicolor*.

Le concentrazioni di **alluminio** sono risultate nuovamente basse in tutti gli organismi trattati, tra 8 e 47 µg/g, addirittura inferiori a quelle misurate negli organismi esposti ai sedimenti della campagna estiva, ed ai valori riportati per organismi provenienti da aree non contaminate (English *et al.*, 2015). I sedimenti che hanno determinato i livelli tendenzialmente maggiori (come RSM-A 8, RSM-B 5 e meno marcatamente RSM-C 6), mostrano effetti simili o addirittura inferiori a quelli misurati negli organismi trattati con i sedimenti raccolti ad 1 Km di distanza dalle piattaforme, permettendo così di escludere qualsiasi fenomeno di aumentata biodisponibilità di alluminio per effetto delle attività antropiche.

I livelli di **arsenico** misurati nei tessuti dei policheti esposti ai sedimenti delle tre piattaforme investigate (3-11 µg/g), sono paragonabili a quelli ottenuti durante la campagna estiva, e rappresentano ancora tra i valori in assoluto più bassi che sono stati misurati nei tessuti di questo tipo di invertebrati (Fattorini *et al.*, 2005).

Risultati del tutto simili sono stati ottenuti anche per **cadmio**, **mercurio**, **nicel**, **rame** e **zinco**, con concentrazioni medie confrontabili a quelle precedentemente osservate negli organismi stabulati con i sedimenti di luglio (2016) ed in linea con i valori di riferimento riportati per policheti ed altri invertebrati (Bocchetti *et al.*, 2004; Casado-Martinez *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2010; Hans *et al.*, 2011; English *et al.*, 2015).

Per quanto riguarda **bario**, **cromo**, **ferro** e **vanadio**, le concentrazioni sono piuttosto simili negli esemplari di *H. diversicolor* esposti ai sedimenti raccolti in prossimità delle piattaforme, spesso inferiori a quelle misurate negli organismi esposti ai sedimenti prelevati ad 1 Km dalle piattaforme. Anche in questo caso i livelli risultano simili a quelli misurati nei test condotti con i sedimenti estivi ed in linea con i valori normalmente misurati in organismi di aree incontaminate (Bocchetti *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2010; Fattorini *et al.*, 2010; English *et al.*, 2015).

Il **manganese** mostra valori di concentrazioni piuttosto simili e bassi in tutti gli organismi esposti ai sedimenti delle piattaforme RSM-A e RSM-B, con livelli già osservati per gli organismi della campagna estiva. Le concentrazioni tendenzialmente maggiori nei policheti esposti ai sedimenti di

RSM-C rientrano comunque all'interno dei normali range di variabilità riportati per questo elemento (Bocchetti *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2010; English *et al.*, 2015).

Anche per il **piombo**, i livelli nei tessuti di *H. diversicolor* sono sempre bassi e simili a quelli osservati durante la campagna estiva, oltre che in linea con i valori di riferimento noti per i policheti provenienti da aree non contaminate (Bocchetti *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2010).

In conclusione, benché non siano noti i valori di concentrazione dei vari metalli nei sedimenti della campagna invernale, la stima del bioaccumulo nei policheti offre una immagine pressoché sovrapponibile a quella precedentemente osservata per la campagna estiva, permettendo quindi di escludere fenomeni di biodisponibilità dei diversi elementi nei sedimenti di Campo Rospo.

#### **5.4.2 Bioaccumulo in mitili naturali e trapiantati:**

##### **Metalli pesanti**

In generale, le concentrazioni di metalli in traccia misurate nelle intere parti molli dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) prelevati e traslocati sui piloni delle 3 piattaforme di Campo Rospo sono sempre risultate del tutto simili a quelle riscontrabili in popolazioni di riferimento non soggette a particolari fenomeni di impatto antropico, e ben all'interno dei normali range di fluttuazione stagionale tipici di questi organismi (Fattorini *et al.*, 2008). A conferma di questo, le concentrazioni medie nei tessuti degli organismi naturali, con pochissime eccezioni, sono sempre paragonabili a quelle osservate nei mitili trapiantati e negli organismi di controllo.

Non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i mitili naturali prelevati dalle strutture e quelli di riferimento per arsenico (As), bario (Ba), cadmio (Cd), cromo (Cr), rame (Cu), vanadio (V) e zinco (Zn), mentre alluminio (Al) e mercurio (Hg) mostrano concentrazioni leggermente maggiori addirittura nei mitili di controllo.

Gli unici elementi che hanno mostrato differenze significative sono il nichel (Ni) e il piombo (Pb). Per quanto riguarda il Ni, le concentrazioni medie nei mitili di controllo non superano il valore di 0.05 µg/g, mentre oscillano nell'intervallo di 0.15-0.22 negli organismi delle piattaforme; il range di fluttuazione stagionale del Ni in mitili da aree non contaminate dell'Adriatico centrale normalmente rientra nell'intervallo di 1-5 µg/g (Fattorini *et al.*, 2008). Inoltre, non si apprezzano differenze degne di nota tra i valori di Ni ottenuti negli organismi provenienti da differenti siti di prelievo delle 3 piattaforme, suggerendo quindi che tali livelli possano essere considerati come basali e tipici della popolazione di mitili dell'area investigata.

Analogamente il Pb mostra un livello pari a circa 0.5 µg/g nei tessuti dei mitili di riferimento, mentre le sue concentrazioni medie oscillano tra circa 1.2-2 µg/g nei mitili naturali delle piattaforme, valori che anche in questo caso, rientrano nei normali range di fluttuazione stagionale conosciuti per questi organismi e pari a circa 0.5-3 µg/g in popolazioni di riferimento dell'Adriatico centrale (Fattorini *et al.*, 2008). Concentrazioni tendenzialmente maggiori, benché con differenze che non sono mai statisticamente significative, sono state misurate nei mitili provenienti da RSM-A, rispetto a quelli delle altre due piattaforme, per il piombo (Pb), per il vanadio (V), e per lo zinco (Zn) limitatamente agli organismi del punto di prelievo I: anche in questi casi, come già descritto, i valori rientrano comunque nei normali range di fluttuazione stagionale conosciuti per popolazioni di riferimento (Fattorini *et al.*, 2008).

Tra gli elementi che hanno evidenziato livelli più alti, seppur non statisticamente significativi, in mitili da punti di campionamento specifici, vale la pena notare anche il bario (Ba), con valori tendenzialmente più elevati negli organismi da RSM C-II ed il cromo (Cr) in quelli prelevati da RSM B-II: tuttavia in entrambi i casi i valori medi ottenuti sono caratterizzati da elevate deviazioni standard, aspetto che suggerisce una variabilità intraspecifica dovuta a condizioni naturali (ciclo biologico, fluttuazioni naturali), piuttosto che ad una aumentata biodisponibilità.

L'utilizzo di mitili di riferimento traslocati sui piloni delle piattaforme ha offerto la possibilità di effettuare una valutazione molto più accurata dei livelli di biodisponibilità nell'area di Campo Rospo, confrontando i risultati di un'esposizione cronica (mitili naturali) con quelli derivanti da un'esposizione controllata e di breve durata (mitili naturali), (Regoli *et al.*, 2004; Gorbi *et al.*, 2008). In questo senso, le concentrazioni di tutti i metalli misurati nei tessuti degli organismi trapiantati sono risultate sempre del tutto simili a quelle dei mitili di riferimento, e con range pressoché sovrapponibili a quelli dei mitili naturali delle piattaforme del Campo Rospo, confermando che tali valori riflettono i livelli basali naturali per queste popolazioni.

Nel complesso, i risultati ottenuti consentono di escludere qualsiasi fenomeno di contaminazione da metalli nell'area di Campo Rospo. Le diverse popolazioni di mitili (costiere ed offshore), vivendo in aree caratterizzate da condizioni chimico-fisiche ed idrodinamiche leggermente diverse (soprattutto in termini di nutrienti, clorofilla, particellato, correnti, ecc...), possono avere dei cicli biologici temporalmente non sincroni. In questo senso è noto che le concentrazioni tissutali di molti elementi possono subire fluttuazioni stagionali anche molto importanti in funzione dei normali cicli biologici e riproduttivi di questi molluschi bivalvi (Regoli e Orlando, 1994a, 1994b; Regoli, 1998; Fattorini *et al.*, 2008): poiché i valori osservati nei mitili provenienti dall'area del Campo Rospo, si attestano sempre nei range tipici di organismi di controllo, le lievi differenze osservate sono da imputarsi semplicemente a differenze fisiologiche tra gli organismi delle due popolazioni.

## **Idrocarburi policiclici aromatici**

I livelli di IPA totali misurati nelle intere parti molli dei mitili naturali delle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C, sono simili in tutti i punti campionati e con i valori degli organismi di riferimento, senza differenze statisticamente significative tra i vari gruppi. Le concentrazioni medie oscillano tra 150 e 250 ng/g, risultando pertanto basse e simili a quelle normalmente riscontrabili in mitili provenienti da aree non contaminate (Neff, 2002; Benedetti *et al.*, 2014). Gli IPA sono oggi composti ubiquitari nell'ambiente marino e livelli misurabili di queste sostanze si ritrovano nei tessuti di tutti gli organismi marini, in particolare negli invertebrati; questi organismi hanno infatti una scarsa espressione del sistema multienzimatico del citocromo P450, e pertanto possono bioaccumulare queste sostanze poiché non sono in grado di biotrasformarle ed eliminarle efficacemente (Neff, 2002). Le concentrazioni medie di IPA totali nei tessuti dei bivalvi normalmente oscillano tra le decine e qualche centinaia di parti per miliardo (ng/g) in popolazioni provenienti da aree pristinie o di riferimento (Neff, 2002; Benedetti *et al.*, 2014), mentre tali livelli possono aumentare di uno o due ordini di grandezza in organismi soggetti a fenomeni di contaminazione (Neff, 2002; Bocchetti *et al.*, 2008). I risultati ottenuti nei mitili naturali di Campo Rospo sono confermati da quelli ottenuti per i mitili trapiantati, nei quali gli IPA totali oscillano tra 200 e 250 ng/g, anche in questo caso senza variazioni significative tra gli organismi traslocati nelle tre piattaforme investigate (RSM-A, RSM-B e RSM-C) e nei mitili di riferimento.

Oltre il 90% degli IPA totali nei mitili naturali sono costituiti da congeneri a basso peso molecolare, profilo del tutto simile a quello osservato negli organismi di controllo; questo aspetto contribuisce a confermare l'assenza di un impatto antropico nell'area investigata, poiché è noto che organismi soggetti a fonti di contaminazione diretta mostrano un contributo dei congeneri ad alto peso molecolare ben più elevato, che può talvolta arrivare fino al 50-70% delle concentrazioni totali di IPA (Bocchetti *et al.*, 2008). La bassa percentuale di idrocarburi ad alto peso molecolare è in linea con i risultati precedentemente commentati per i sedimenti, per i quali si è ipotizzata una origine petrogenica pressoché naturale degli IPA presenti nell'area di Campo Rospo.

Rappresentando la componente più abbondante degli IPA totali ed influenzandone quindi gli andamenti generali, anche i singoli congeneri a basso peso molecolare non mostrano differenze significative tra i vari gruppi di mitili naturali prelevati dalle piattaforme RSM-A, B e C e quelli di riferimento; tra questi congeneri, il naftalene, assieme ai corrispettivi composti metilati (1-metilnaftalene e 2-metilnaftalene), rappresenta in assoluto il composto predominante, rappresentando circa il 74-83% degli IPA a basso peso molecolare. Anche nei mitili traslocati la distribuzione degli IPA non cambia, con oltre il 90% del contributo totale rappresentato dai congeneri a basso peso molecolare e soprattutto da naftalene, 1-metilnaftalene e 2-metilnaftalene (82-94% degli IPA a basso PM), confermando ulteriormente che i livelli e la distribuzione di queste sostanze

possono essere considerate tipiche di organismi non soggetti a fenomeni locali di contaminazione da idrocarburi policiclici aromatici.

Per quanto riguarda gli IPA ad alto peso molecolare, si sono osservate alcune differenze tra i mitili naturali delle piattaforme e quelli di riferimento. Le concentrazioni medie negli organismi di riferimento si aggirano attorno a 5 µg/g, simili a quelle misurate nei mitili di RSM-A (5-10 ng/g): valori tendenzialmente maggiori, benché non statisticamente significativi, sono stati misurati negli organismi di RSM-B (10-15 ng/g) e di RSM-C (12 e 20 ng/g). Nonostante queste differenze potrebbero far ipotizzare una maggiore biodisponibilità di alcuni congeneri nelle aree investigate, le concentrazioni misurate risultano assolutamente basse e all'interno dei normali range di variabilità osservabili in popolazioni di mitili da aree pristinie e di riferimento (Neff, 2002; Bocchetti *et al.*, 2008; Benedetti *et al.*, 2014). Nella maggior parte dei casi, le differenze osservate sono da ricondurre principalmente al dibenzo(a,h)antracene che rappresenta, con qualche eccezione, il 43-60% della somma degli IPA ad alto PM nei mitili naturali, mentre tale congenere risulta pressoché assente nei mitili di riferimento. Negli organismi trapiantati, le concentrazioni di IPA ad alto peso molecolare risultano invece sempre molto basse ed in generale più simili ai controlli, suggerendo che una eventuale maggiore biodisponibilità di questi congeneri, osservata nei mitili naturali, sia da ricondurre a fenomeni progressi. Come già commentato, i molluschi bivalvi possiedono una scarsa attività del sistema del citocromo P450, deputato alla trasformazione ed escrezione di queste sostanze, che rende tali organismi in grado di accumulare e trattenere efficacemente gli IPA per tempi relativamente lunghi, soprattutto i composti ad alto peso molecolare (Neff, 2002).

In ogni caso, è opportuno sottolineare ancora una volta che i valori di concentrazione ottenuti per i vari congeneri di IPA, oltre che bassi, sono anche uniformemente distribuiti in tutta l'area di indagine, come confermato dalla buona correlazione tra IPA a basso ed alto peso molecolare mostrata in Figura 59. Come si può osservare, sia i mitili naturali che quelli trapiantati (RSM-A, RSM-B, RSM-C e mitili di riferimento) esprimono trend molto simili con correlazioni lineari statisticamente significative (mitili naturali:  $n=30$ ,  $r=0.6097$ ,  $r^2=0.3718$ ,  $t=4.14$ ,  $df=29$ ,  $p<0.001$ ; mitili trapiantati:  $n=15$ ,  $r=0.6607$ ,  $r^2=0.4366$ ,  $t=3.29$ ,  $df=14$ ,  $p<0.01$ ): questi risultati contribuiscono a confermare che i livelli e la distribuzione degli IPA nei mitili delle piattaforme di Campo Rospo sono del tutto simili a quelli degli organismi di riferimento.

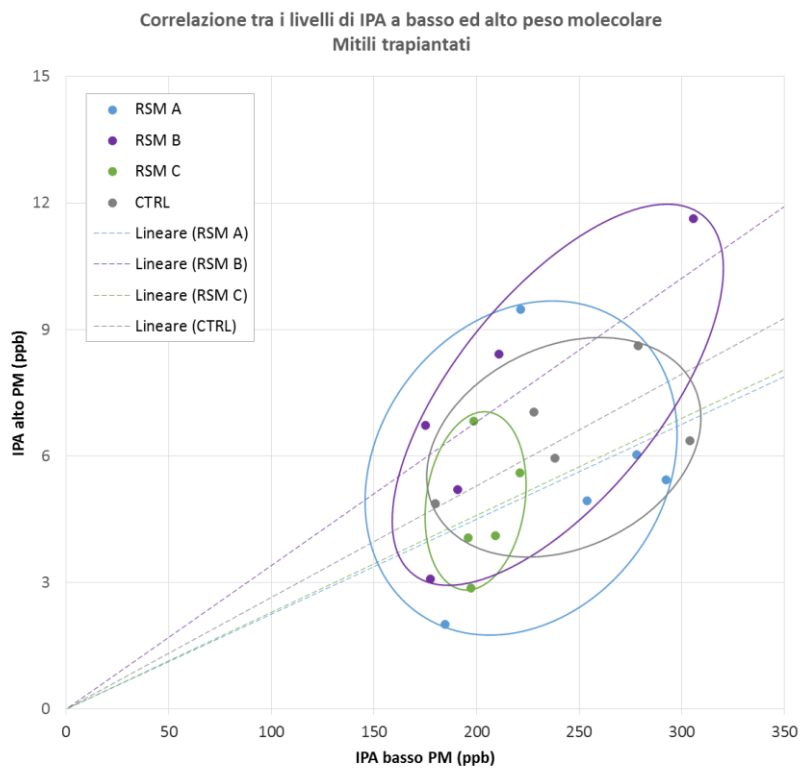
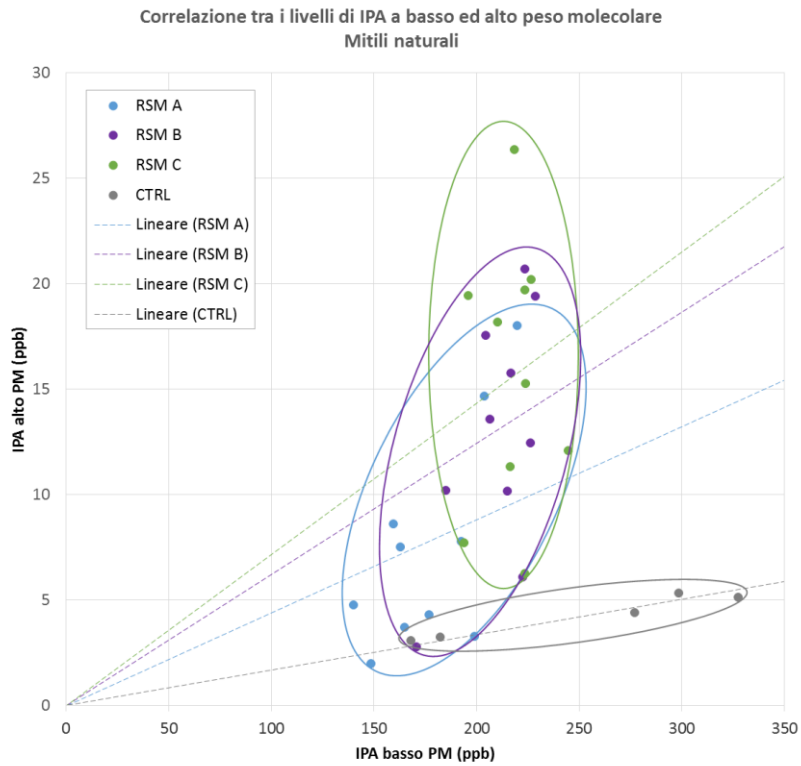


Figura 59. Correlazioni tra livelli di IPA a basso ed alto peso molecolare nei mitili naturali e trapiantati; regressioni lineari parziali per popolazioni di dati ottenuti da aree differenti (RSM-A, RSM-B, RSM-C e controlli) in mitili naturali e trapiantati.

## **Idrocarburi alifatici totali**

Le concentrazioni medie di idrocarburi alifatici totali (C10-C40), oscillano tra 250 e 520 µg/g, nelle intere parti molli dei mitili di riferimento e di quelli naturali ottenuti dalle piattaforme RSM-A, RSM-B e RSM-C; i valori osservati sono caratterizzati da una elevata variabilità e le differenze non risultano mai statisticamente significative. Fanno eccezione le concentrazioni ottenute nei mitili del punto RSM C-I, che risultano marcatamente maggiori (1200 µg/g).

Numerose attività antropiche contribuiscono a diffondere idrocarburi alifatici soprattutto in bacini chiusi come il Mediterraneo e più specificatamente l'Adriatico; tra le principali fonti di immissione nell'ambiente figurano anche i rifiuti municipali ed industriali non trattati, gli scarichi fognari e l'intenso traffico navale (Wetzel e Van Vleet, 2004). Per tali ragioni, livelli apprezzabili di questi composti sono normalmente osservati nei tessuti della maggior parte degli organismi marini, benché i livelli basali sono spesso molto variabili, perché queste sostanze possono avere anche una origine trofica (Jeng e Huh, 2008; Winters *et al.*, 1969; Blumer *et al.*, 1971). Secondo studi pregressi, le concentrazioni medie degli idrocarburi alifatici totali nei mitili oscillano nell'intervallo 170-220 µg/g in mitili provenienti dall'Adriatico centrale, tra 100-500 µg/g in organismi trapiantati in diverse aree del Mar Tirreno (Benedetti *et al.*, 2014; Regoli *et al.*, 2014), e fino a 1500 µg/g in mitili nella laguna di Venezia, soggetta ad un più elevato impatto urbano (Wetzel e Van Vleet, 2004). Tutte le concentrazioni misurate negli organismi di Campo Rospo rientrano pertanto all'interno dei range di variabilità conosciuti per questi organismi.

Alcune differenze, anche se non significative in virtù della elevata variabilità, sono state ottenute anche per i mitili trapiantati; in questo caso, valori medi di 250 µg/g sono stati misurati nei mitili di riferimento ed in quelli traslocati nella piattaforma RSM-B, mentre le concentrazioni raggiungono circa 750 µg/g nei mitili traslocati nelle piattaforme RSM-A e RSM-C. Questi dati sono parzialmente in linea con i livelli maggiori misurati nei mitili naturali di RSM C-I, ma non trovano riscontri con i mitili naturali e quelli trapiantati per la piattaforma RSM-A. Vista l'elevata variabilità dei valori ottenuti per i mitili trapianti in RSM-A e C, è plausibile ipotizzare che tali concentrazioni possano in parte riflettere un trasferimento trofico di idrocarburi di origine naturale, come già ipotizzato da alcuni autori in virtù del diverso apporto di fitoplancton e nutrienti disponibile nei siti di traslocazione (Jeng e Huh, 2008; Winters *et al.*, 1969; Blumer *et al.*, 1971).

Per meglio comprendere questo aspetto è utile analizzare la distribuzione dei singoli congeneri di idrocarburi nei mitili delle varie condizioni sperimentali, ed un loro confronto con quanto già evidenziato per i sedimenti (Figura 60). La distribuzione degli idrocarburi nei sedimenti è piuttosto uniforme in tutta l'area investigata (vedere anche la Figura 51), e mette in evidenza una componente predominante compresa tra C16 e C22 (circa 47-49% degli idrocarburi totali) ed una mancanza della componente C24-C30, suggerendo una origine biogenica naturale derivante dalla decomposizione di macrofite sommerse o galleggianti (Ficken *et al.*, 2000; Ekpo *et al.*, 2012); il contributo della



componente C36-C38 (circa il 27-30%) potrebbe essere legato ad una origine petrogenica che interesserebbe in maniera ubiquitaria i sedimenti dell'intera area investigata.

Se si osservano gli andamenti nei mitili naturali, traslocati e di riferimento, viene confermata una certa abbondanza di idrocarburi nell'intervallo C16-C22 ed evidenziata anche per quelli C32-C36, mentre vi è uno scarso contributo dei C22-C30 ed anche dei C36-C38. Questo profilo dimostrerebbe che la maggior parte degli idrocarburi accumulati dai mitili naturali e trapiantati può essere imputabile ad un trasferimento trofico dovuto alla decomposizione di macrofite sommerse o galleggianti (componente C16-C22), o come risultato di una produzione primaria del fitoplancton (componente C32-36) (Jeng e Huh, 2008; Winters *et al.*, 1969; Blumer *et al.*, 1971; Ficken *et al.*, 2000; Ekpo *et al.*, 2012): al contrario la componente di origine presumibilmente petrogenica (C36-C38), relativamente abbondante nei sedimenti, risulta invece scarsamente biodisponibile per i mitili. Il fatto che i mitili naturali e traslocati condividano lo stesso profilo di distribuzione degli idrocarburi con gli organismi di riferimento, è da considerarsi come una forte conferma dell'origine biogenica di queste sostanze.

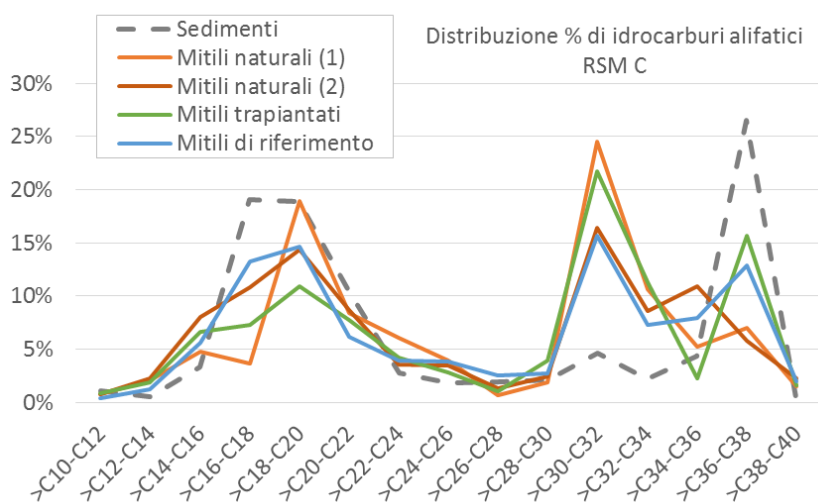
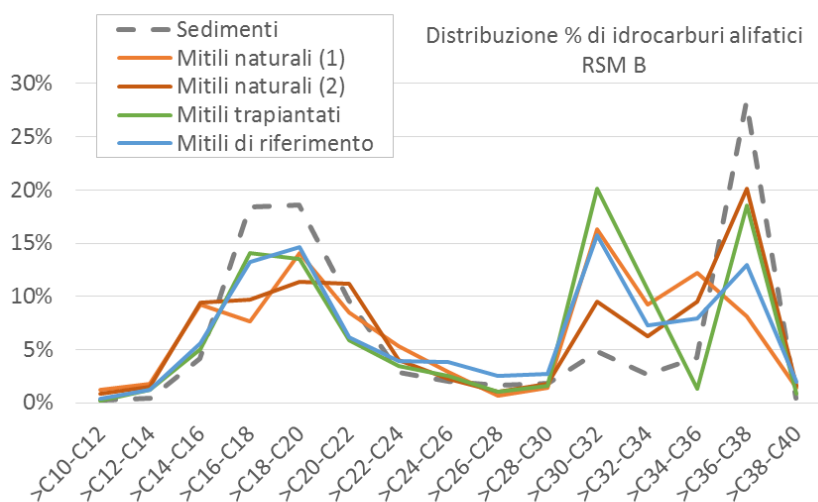
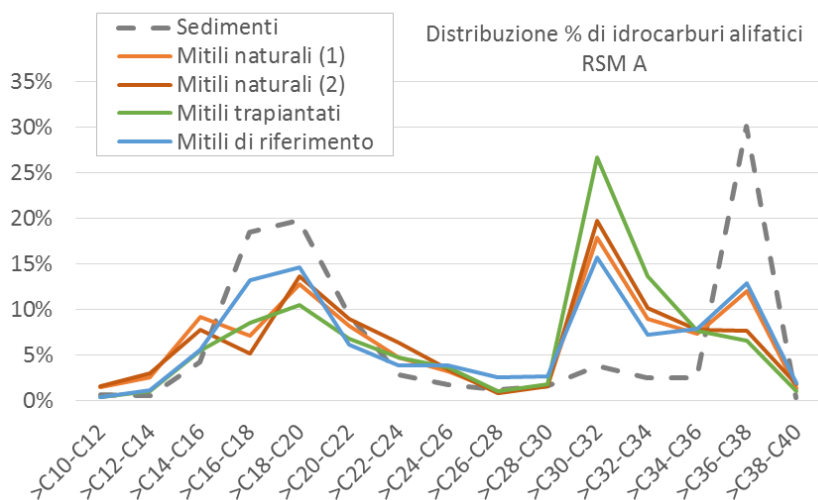


Figura 60. Distribuzioni percentuali (%) degli idrocarburi alifatici nei sedimenti (linea tratteggiata) e nei tessuti di mitili (linea continua) naturali, trapiantati e di riferimento a confronto.

## **5.5 BIOMARKER NEI MITILI NATURALI E TRAPIANTATI**

Così come raccomandato anche dall'OSPAR, l'integrazione dei dati chimici con le risposte biologiche (biomarker) in organismi sentinella, risulta essere un utile approccio nelle attività di monitoraggio degli impianti off-shore (OSPAR, 2004). Nel presente piano di monitoraggio, le prime risposte cellulari e biochimiche potenzialmente alterate dalla biodisponibilità dei contaminati rilasciati dalle attività di estrazione sono state valutate nei mitili sia naturali che trapiantati sulle piattaforme di Campo Rospo Mare. In particolare è stata selezionata un'ampia batteria di biomarker in grado di rilevare sia l'esposizione a specifiche classi di contaminanti che gli effetti causati a livello cellulare da questi composti (Viarengo *et al.*, 2007). Nonostante l'analisi dei biomarker sia considerata estremamente utile nel valutare fenomeni di tossicità in siti contaminati, la loro sensibilità anche in aree relativamente poco impattate li rende particolarmente utili nel valutare fenomeni precoci di disturbo ambientale (Gorbi *et al.*, 2008, 2012). In queste aree tuttavia, le risposte biologiche possono essere influenzate anche dalle condizioni fisico chimiche e ambientali, nonché da quelle fisiologiche e di adattamento degli organismi stessi, con interazioni reciproche, effetti agonisti o antagonisti difficili da interpretare (Regoli e Giuliani, 2014). Tali effetti possono però essere discriminati utilizzando diversi approcci di indagine tra cui l'utilizzo combinato di organismi naturali e trapianti.

Per quanto riguarda le risposte dei parametri immunitari, non si sono evidenziate alterazioni dello stato di salute degli organismi intorno alle diverse piattaforme. In particolare, l'analisi della stabilità delle membrane lisosomiali, sensibile marker generico di esposizione a contaminati e stress ambientali (Ringwood *et al.*, 1998), non ha mai mostrato alcun segno di alterazione negli emociti dei mitili sia naturali che trapiantati sui diversi piloni delle piattaforme del Campo Rospo Mare, con valori medi in linea con quelli tipici di organismi di controllo prelevati da altre aree dell'Adriatico (Bocchetti e Regoli, 2006).

Essendo i principali siti per il sequestro e la detossificazione intracellulare di prodotti chimici, i lisosomi sono considerati importanti organi bersaglio per valutare gli effetti biologici indotti dagli inquinanti sugli organismi marini (Marigómez *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2007), e per questo motivo hanno ricevuto notevole attenzione negli studi ecotossicologici. Particolare attenzione è stata data anche ad altri parametri immunitari, come il rapporto granulociti/ialinociti e il tasso di fagocitosi che, essendo risposte estremamente sensibili, rappresentano le funzioni immunitarie più importanti nelle cellule emocitarie di questi organismi (García-García *et al.*, 2008). Anche se la funzionalità delle diverse popolazioni di emociti è ancora in discussione, molti autori ritengono che i granulociti degli invertebrati sono estremamente importanti ed efficaci nei processi fagocitari (Carballal *et al.*, 1997; Giulianini *et al.*, 2003), mentre gli ialinociti, che presentano caratteristiche di cellule indifferenziate, sono più specializzati nei processi di coagulazione ed incapsulamento (García-García *et al.*, 2008). Per quanto riguarda i mitili naturali delle piattaforme, il rapporto tra granulociti e ialinociti è risultato più basso rispetto ai mitili di controllo, ma con valori paragonabili ai range basali osservati in popolazioni di organismi da aree non inquinate (Gorbi *et al.*, 2013; Mezzelani *et al.*, 2016; Nardi *et*

*al.*, 2017). I limitati effetti a carico delle diverse componenti del sistema immunitario dei mitili sono confermati dall'assenza di variazioni significative della capacità fagocitaria, i cui valori sono nuovamente tipici per organismi di controllo (Avio *et al.*, 2015; Mezzelani *et al.*, 2016). Anche per quanto riguarda i mitili trapiantati, le analisi immunitarie non hanno evidenziato situazioni di compromissione delle membrane lisosomiali; inoltre, nonostante sia stato misurato un maggiore rapporto tra granulociti e ialinociti nei mitili trapiantati nella piattaforma RSM-C, questo effetto non si traduce in una alterazione della competenza immunitaria degli emociti, con valori di fagocitosi paragonabili a quelli degli organismi di controllo e nei range naturali misurati nei mitili (Mezzelani *et al.*, 2016).

Nella presente indagine, i livelli delle metallotioneine (MT), l'attività delle acetilcolinesterasi e la proliferazione perossisomiale sono stati scelti come biomarker specifici nei confronti di specifiche classi di contaminati ambientali tra cui metalli in traccia, organofosfati, carbammati e idrocarburi policiclici aromatici (Engel e Roesijadi, 1987; Banni *et al.*, 2007; Viarengo *et al.*, 2007; Bocchetti *et al.*, 2008).

Nonostante la bassa biodisponibilità dei metalli in traccia, i risultati hanno mostrato livelli tendenzialmente più alti delle metallotioneine nei mitili naturali prelevati dai piloni delle piattaforme rispetto ai mitili di riferimento. Al contrario non sono state osservate variazioni per gli organismi trapiantati, con valori simili rispetto a quelli dei controlli; questi risultati confermano l'assenza di una maggior biodisponibilità di metalli in traccia, ed evidenziano un possibile fenomeno di adattamento degli organismi naturali alle condizioni ambientali tipiche dell'area di Campo Rospo. Infatti, la sintesi delle metallotioneine, non è legata solamente alla presenza di metalli in traccia, ma è influenzata anche da fenomeni legati alla stagionalità, alle oscillazioni fisiologiche di altri parametri cellulari, dal loro ruolo di rispondere come antiossidanti a numerose variazioni omeostatiche degli organismi (Viarengo *et al.*, 1997; Ivanković *et al.*, 2005; Bocchetti e Regoli, 2006).

L'acetilcolinesterasi ha un ruolo fondamentale nel sistema nervoso dei vertebrati e degli invertebrati e la sua inibizione è stata a lungo considerata un tipico effetto di pesticidi organofosfati e carbammati (Rickwood e Galloway, 2004). In realtà è stato dimostrato che altri fattori possono modulare questa attività enzimatica, tra cui i metalli in traccia (cadmio, rame, mercurio, zinco), variazioni di fattori naturali come temperatura, salinità, ossigeno disciolto (Pfeifer *et al.*, 2005; Maisano *et al.*, 2016;), la potenziale presenza di biotossine o cianobatteri nei tessuti dei mitili (Najimi *et al.*, 1997; Dellali *et al.*, 2001; Dailianis *et al.*, 2003). I livelli lievemente più alti solo nei mitili trapiantati sulla piattaforma RSM-B confermano ulteriormente l'assenza di impatti biologici specifici nell'area di Campo Rospo Mare.

L'esposizione a numerose classi di contaminanti, tra cui metalli e contaminanti organici può alterare lo stato ossidativo degli organismi marini, sia per l'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che inducono danno ossidativo alle macromolecole, sia indirettamente

attraverso la deplezione e l'alterazione delle difese antiossidanti (Regoli e Giuliani, 2014). Per questo motivo, lo studio delle singole difese antiossidanti è uno strumento prognostico utile nella comprensione degli effetti di alcune classi di contaminanti anche se spesso non è in grado di dare informazioni complessive sullo stato di salute degli organismi. Lo studio dei singoli antiossidanti viene spesso integrato con l'analisi della capacità antiossidante totale, che fornisce un'informazione complessiva della capacità di un tessuto di contrastare o subire gli effetti di una condizione di stress ossidativo (Regoli *et al.*, 2002). Le risposte antiossidanti hanno mostrato generalmente variazioni limitate nei mitili, tra cui un lieve aumento della catalasi negli organismi provenienti dalla piattaforma A (RSM A-I), mentre non sono state osservate variazioni per le altre difese: la catalasi è un biomarker molto sensibile e la sua analisi è estremamente utile come segnale precoce negli organismi marini (Regoli e Principato, 1995; Regoli *et al.*, 2004). Mentre le variazioni delle singole difese antiossidanti possono essere sensibili nel rivelare la presenza di pressioni proossidanti, il significato complessivo di tali risposte deve essere opportunamente integrato con l'analisi della capacità antiossidante totale (TOSC), che riflette la capacità del tessuto biologico di contrastare l'insorgenza di fenomeni di tossicità mediati dalle specie reattive dell'ossigeno (Regoli, 2000; Gorbi e Regoli, 2003). La capacità antiossidante totale risulta essere quindi un parametro meno sensibile, ma con un significato biologico maggiore (Regoli, 2000; Camus *et al.*, 2003). Uno stato ossidativo lievemente perturbato negli organismi naturali di RSM-A è stato evidenziato dalla leggera riduzione della capacità antiossidante totale nei confronti del radicale perossilico ( $\text{ROO}\cdot$ ) e dai cambiamenti nel contenuto di malondialdeide, principale prodotto di perossidazione lipidica delle membrane biologiche. Le fluttuazioni dei livelli di MDA hanno confermato un disturbo ossidativo lieve nei mitili naturali, ma non strettamente correlabile ad una condizione di disturbo ambientale. Una elevata variabilità dei livelli di MDA è infatti un fenomeno normale nei mitili naturali, associata ad esempio a fenomeni di spawning con conseguente degradazione dell'epitelio digestivo e aumento dei processi autofagici, intensità dell'alimentazione e tipologia del nutrimento disponibile (Bocchetti e Regoli, 2006). L'insieme di questi risultati ha confermato la sensibilità dei biomarker ossidativi, attraverso la risposta di una complessa rete di meccanismi di difesa che possono variare in modo sincrono e asincrono, presentando anche risposte bifasiche (Regoli e Giuliani, 2014). Le limitate variazioni di questi parametri indicano solamente una lieve pressione proossidante negli organismi naturali prelevati dalle piattaforme, confermando altresì l'influenza dei fattori biotici e abiotici, come disponibilità di nutrienti, temperatura o stato riproduttivo, nel modulare lo stato ossidativo di questi organismi (Petrović *et al.*, 2004; Bocchetti e Regoli, 2006).

Le risposte ossidative sono ancor più limitate nei mitili trapiantati presso le diverse piattaforme. Tali organismi hanno mostrato variazioni esclusivamente a carico dell'attività dell'enzima glutazione reduttasi, indotta negli organismi trapiantati nelle piattaforme RSM-A e RSM-B. Questo effetto non si riflette né in un'alterazione della capacità antiossidante totale nei confronti delle diverse forme di

radicali (TOSC ROO· e TOSC HO·), né in processi di accumulo di prodotti della perossidazione lipidica.

L'utilizzo dei biomarker di danno genotossico in organismi bioindicatori e in particolare nei mitili, è ampiamente raccomandato nei monitoraggi ambientali; gli approcci più comuni sono lo studio del grado di frammentazione del DNA (saggio della cometa), e l'analisi della frequenza dei micronuclei (Frenzilli *et al.*, 2001; Regoli *et al.*, 2004; Nigro *et al.*, 2006). I risultati ottenuti in questo studio hanno mostrato un moderato aumento della frammentazione del DNA e della frequenza dei micronuclei nei mitili naturali, campionati nei diversi siti di tutte le piattaforme, sottolineando nuovamente un moderato effetto della lieve pressione ossidativa osservata in questi organismi. Un aumento della frequenza dei micronuclei, piccoli frammenti di cromatina derivanti da rottura cromosomica, o aneuploidia durante la divisione cellulare, rappresenta un effetto irreversibile mentre la frammentazione del DNA può essere soggetta a meccanismi di riparo (Venier *et al.*, 1997; Nigro *et al.*, 2006). Tuttavia, nonostante l'aumento della frequenza di questa anomalia nucleare, tali frequenze sono simili a quelle considerate come frequenze di base per i mitili del Mediterraneo (Bolognesi *et al.*, 2004), e a quelle già osservate in mitili provenienti da siti di riferimento e piattaforme offshore del Mar Adriatico (Gomiero *et al.*, 2015). Anche questi risultati non sono strettamente correlabili alla presenza di un disturbo ambientale, ma piuttosto all'influenza di alcuni fattori naturali (Dixon *et al.*, 2002), come quelli associati agli eventi di riproduzione e all'aumento dei processi autofagici, evidenziati anche dalla diminuzione generale del contenuto di MDA in questi organismi.

A conferma delle deboli variazioni osservate sia in termini di concentrazioni che di risposte biologiche nei mitili delle diverse condizioni sperimentali, sono poche le correlazioni statisticamente significative osservate negli organismi naturali delle 3 piattaforme. Tali correlazioni appaiono inoltre piuttosto "frastagliate", senza cioè evidenziare composti che siano correlati con un elevato numero di parametri (come sarebbe ovvio nel caso di concentrazioni biologicamente rilevanti), o relazioni con più parametri tra loro meccanicamente legati (come sarebbe da attendersi nel caso di alterazioni a carico di specifiche vie metaboliche).

Ancora meno numerose sono le correlazioni ottenute nel caso dei mitili trapiantati che, come già precedentemente discusso, confermano l'assenza di criticità ambientali per gli organismi di Campo Rospo. Le differenze tra mitili naturali e trapiantati evidenziate anche dall'analisi delle componenti principali sono pertanto ascrivibili a condizioni fisiologiche degli organismi e del loro ciclo vitale, che non dipendono però dalla presenza di condizioni di stress ambientale di natura antropica nell'area marina intorno alle piattaforme di Campo Rospo.

## **5.6 ELABORAZIONI E VALUTAZIONI CONCLUSIVE**

### **5.6.1. Modello di analisi di rischio Weight of Evidence (WOE)**

È oggi universalmente riconosciuto che la caratterizzazione della qualità ambientale e la valutazione del rischio ecologico debbano essere affrontati con approcci multidisciplinari che integrino le tradizionali analisi chimiche nelle matrici abiotiche (acqua e sedimenti), con quelle indicative dell'insorgenza di effetti biologici causati dai contaminanti ai diversi livelli di organizzazione biologica, dai processi di bioaccumulo, alla comparsa di alterazioni molecolari fino alle popolazioni e comunità (Galloway *et al.*, 2004; Chapman, 2007; Viarengo *et al.*, 2007).

La combinazione di analisi chimiche e biologiche rappresenta un valore aggiunto per i protocolli di monitoraggio e gestione, ed è in linea con le recenti Direttive Europee che raccomandano l'uso di molteplici indicatori di qualità per valutare lo stato di qualità ambientale degli ecosistemi acquatici, (Galloway *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2006; Chapman, 2007; Hagger *et al.*, 2008; Chapman *et al.*, 2013; Marigómez *et al.*, 2013). Nonostante da un punto di vista concettuale gli approcci multidisciplinari siano universalmente accettati, esistono tuttavia alcuni aspetti critici che ancora limitano la loro applicazione pratica, anche per la mancanza di procedure standardizzate nella valutazione del rischio causato da miscele di inquinanti o impatti antropici complessi negli ambienti acquatici. L'interpretazione di ampi data-sets di risultati complessi spesso richiede valutazioni esperte, ed ancora più difficile è l'integrazione tra dati eterogenei. Questo processo di integrazione può prevedere lo sviluppo di scale e di indicatori quantitativi e qualitativi, con l'obiettivo di riassumere risultati scientifici complessi in indici sintetici di più semplice interpretazione per decisori politici o manager ambientali (Dagnino *et al.*, 2008; Linkov *et al.*, 2009; Semenzin *et al.*, 2009; Piva *et al.*, 2011; Benedetti *et al.*, 2012; Marigómez *et al.*, 2013).

In questo senso, uno degli aspetti innovativi di questo studio è stata l'applicazione di un modello di analisi di rischio Weight Of Evidence (WOE), in grado di elaborare tutti i dati attraverso opportuni algoritmi matematici e criteri di valutazione ponderata specifici per le diverse tipologie di indagine (o linee di evidenza, LOE). I dati raccolti nell'area marina di Campo Rospo Mare si riferiscono a 5 LOE principali: caratterizzazione chimica dei sedimenti in riferimento agli SQA del D. Lgs 172/2015 e ai valori L1 e L2 del DM 173/2016 (LOE-1), biodisponibilità dei metalli associati ai sedimenti per il polichete *H. diversicolor* (LOE2b), biodisponibilità di metalli, idrocarburi policiclici aromatici ed alifatici per i mitili naturali e trapiantati delle piattaforme (LOE2a), effetti subletali misurati tramite batterie di biomarker nei mitili naturali e trapiantati delle piattaforme (LOE-3), caratteristiche ecotossicologiche dei sedimenti valutate tramite una batteria di saggi biologici (LOE-4), analisi delle comunità bentoniche nei sedimenti raccolti intorno alle piattaforme (LOE-5). Come già ampiamente discusso nelle sezioni precedenti, per ciascuna tipologia di dati è stato inizialmente elaborato un indice di pericolo (HQ, Hazard Quotient) sia quantitativo che qualitativo ed i vari HQ sono stati poi

tra loro integrati per la caratterizzazione finale del rischio suddiviso in 5 classi di gravità, da assente a molto alto.

La caratteristica più rilevante del modello WOE è l'utilizzo dei criteri di valutazione ponderata che elaborano ciascuna tipologia di dati applicando procedure di calcolo codificate, basate su opportuni pesi, soglie e scale di pericolo che sono state sviluppate e validate considerando i fattori più importanti e specifici per l'interpretazione dei diversi risultati. I criteri di valutazione ponderata permettono di abbandonare la logica dell'approccio tabellare o del risultato peggiore, consentono una discriminazione molto più accurata della qualità (chimica e biologica) dei campioni ed una maggior gradualità nella definizione dei livelli di pericolo o rischio. Questi criteri sono stati in parte recepiti anche nella recente normativa per la caratterizzazione e classificazione della qualità dei sedimenti marini soggetti ad attività di dragaggio (DM 173, 16 luglio 2016), oltre ad essere stati validati in numerosi casi studio nazionali ed internazionali per la valutazione del rischio ambientale associato a sedimenti inquinanti, aree portuali, o impatti naturali ed antropici complessi sull'ambiente marino (Piva *et al.*, 2011; Benedetti *et al.*, 2012, 2014; Regoli *et al.*, 2014; Bebianno *et al.*, 2015; Frantzen *et al.*, 2016; Mestre *et al.*, 2017).

I dettagli delle elaborazioni sono già stati forniti nei capitoli precedenti, pertanto vengono adesso solo richiamati alcuni dei principi più generali. Per quanto riguarda la caratterizzazione chimica dei sedimenti, non è più il superamento di un riferimento normativo (anche se lieve e per un singolo parametro) a determinare la classe di qualità chimica, ma i risultati sono invece considerati nel loro complesso dando un peso al numero dei parametri che sfiorano un valore di riferimento, all'entità di tali sforamenti e alla pericolosità dei composti in questione. Nel presente studio, sono stati utilizzati i medesimi criteri di integrazione ponderata indicati nel recente DM 173/2016 per la caratterizzazione e la classificazione della qualità dei sedimenti marini soggetti a movimentazione, utilizzando come obiettivi di qualità quelli previsti dagli standard di qualità ambientale (SQA) del D. Lgs 172/2015, ed i valori L1 e L2 del DM 173/2016.

Anche per i saggi ecotossicologici sono stati utilizzati gli stessi criteri di elaborazione ponderata recepiti all'interno del DM 173/2016: la classificazione ecotossicologica non viene più determinata dal saggio che mostra il risultato peggiore ma il giudizio si basa sull'intera batteria, pesando la rilevanza tossicologica degli endpoint biologici misurati nei vari saggi, le soglie di sensibilità di risposta delle varie specie, la significatività statistica e l'entità delle variazioni misurate, le condizioni di esecuzione dei saggi.

L'utilizzo dei mitili come organismi bioindicatori è una strategia di indagine sensibile per evidenziare la presenza e l'impatto dei contaminanti nell'ambiente marino attraverso l'analisi sia del bioaccumulo che dell'insorgenza di variazioni a livello molecolare e cellulare (biomarker). Molte classi di inquinanti possono essere indagate in termini di bioaccumulo sia in organismi naturali che ricorrendo ad esperimenti di trapianto, ed anche i biomarker offrono un ampio spettro di risposte che includono



l'induzione di meccanismi di detossificazione o metabolizzazione di specifiche classi di inquinanti, l'attivazione di vie metaboliche o biochimiche, la comparsa di alterazioni o fenomeni di tossicità a livello molecolare, cellulare o genetico (McCarty *et al.*, 2002; Regoli, 2000; Galloway *et al.*, 2004; Viarengo *et al.*, 2007; Regoli *et al.*, 2011).

La valutazione del bioaccumulo è fondamentale in una analisi di rischio ambientale perché permette di valutare la reale biodisponibilità dei contaminanti associati alle matrici abiotiche. Per questa LOE, l'applicazione di criteri di valutazione ponderata è particolarmente importante poiché esistono pochi valori di SQA per il biota, e l'utilizzo di quei pochi disponibili appare un approccio troppo semplicistico e poco affidabile per stimare il reale pericolo in termini di biodisponibilità ambientale dei contaminanti. A titolo di esempio, il valore SQA per il mercurio pari a 20 µg/Kg p.f. (come riportato nel D.Lgs 172/2015 per i pesci) non considera differenze nella posizioni trofica delle specie o nei tessuti analizzati, ed appare comunque inadeguato per il biota Mediterraneo che, influenzato da anomalie geochimiche naturali nelle varie sottoregioni del bacino, presenta tipicamente livelli basali più elevati di questo elemento. Con i criteri di integrazione ponderata, le concentrazioni tissutali misurate per ciascun elemento chimico nei mitili dell'area di indagine sono state rapportate ai valori misurati in organismi di controllo, corrette in funzione della pericolosità del contaminante, dell'entità e della significatività statistica delle differenze.

I biomarker sono importanti componenti nelle valutazioni di qualità e rischio nell'ambiente marino grazie alla loro capacità di evidenziare la comparsa precoce di effetti avversi con valore sia prognostico che diagnostico sullo stato di salute di un organismo o sulla possibilità di ripercussioni negative ai livelli più alti di organizzazione biologica, come organismo, popolazioni, biodiversità (Moore *et al.*, 2006; Viarengo *et al.*, 2007; Hagger *et al.*, 2008). Nonostante la misura dei biomarker sia frequentemente associata al monitoraggio di ambienti inquinati, in realtà la loro sensibilità è di particolare rilevanza anche in aree con basso impatto antropico, dove le concentrazioni dei singoli contaminanti possono rimanere al di sotto delle rispettive soglie di effetto, ma il loro modo di azione essere influenzato da interazioni reciproche ed effetti additivi o sinergici con altri composti (Gorbi *et al.*, 2008, 2012; Regoli e Giuliani, 2014). In questo senso, le risposte molecolari e cellulari in organismi esposti a miscele ambientali di inquinanti (anche se in basse dosi) possono differire da quelle attese per singole classi di sostanze, ed i biomarker permettono di valutare in maniera sensibile gli effetti biologici integrati (Benedetti *et al.*, 2009; Regoli *et al.*, 2005, 2011). Anche i biomarker però, nonostante la loro importanza nell'identificare effetti e meccanismi di azione dei vari inquinanti, trovano ancora alcune reticenze nell'applicazione in procedure di valutazione di rischio ambientale proprio per la presunta difficoltà di riassumere dati scientificamente complessi che derivano dall'analisi di molteplici pathway cellulari, in indici semplici che riflettano la severità dell'effetto biologico complessivo e che possano essere facilmente comprensibili anche a chi non possiede approfondite conoscenze molecolari e cellulari. Proprio per superare questo limite, negli ultimi anni sono state elaborate numerose procedure in grado di combinare i risultati dei biomarker

in indici di salute, che mantengano informazioni scientificamente solide ma le riassumono in un formato di più semplice interpretazione (Beliaeff e Burgeot, 2002; Broeg e Lehtonen, 2006; Galloway *et al.*, 2004; Piva *et al.*, 2011; Benedetti *et al.*, 2012; Dagnino *et al.*, 2012). Nonostante ciascuna procedura sia basata su diverse elaborazioni ed assunzioni da giudizio esperto, una recente comparazione ha confermato che tutti questi indici integrati forniscono utili e simili valutazioni sugli effetti biologici dei contaminanti negli organismi marini (Marigómez *et al.*, 2013). I biomarker analizzati nei mitili naturali e trapiantati sulle 3 piattaforme del Campo Rospo Mare sono stati elaborati attraverso l'applicazione di criteri di integrazione ponderata che assegnano ad ogni biomarker un "peso" in funzione della rilevanza biologica della risposta analizzata, ed una "soglia" per variazioni ritenute biologicamente rilevanti e che dipende dalla sensibilità della risposta del biomarker, anche in funzione della specie, del tessuto e del possibile andamento bifasico (Piva *et al.*, 2011). L'indice che riassume gli effetti biologici complessivi considera quanti biomarker variano, la loro rilevanza tossicologica, la significatività statistica e l'entità delle variazioni misurate nei confronti di ciascuna soglia.

Per le comunità bentoniche, numerosi sono i descrittori di comunità, gli indici di diversità tassonomica e gli indicatori già riportati nella letteratura internazionale poichè il valore ecologico di queste analisi è indiscutibilmente riconosciuto da almeno tre decenni, così come la necessità di standardizzare procedure di valutazione condivise ed uniformi. In questo senso, nel presente studio non sono stati sviluppati nuovi criteri di elaborazione per le comunità, ma il modello utilizzato (SediquaSoft) ha previsto lo sviluppo di un tool informatico che, dalla lista delle specie identificate e dal numero di organismi, calcola in automatico tutti gli indici possibili da cui selezionare quello per l'integrazione finale WOE. Nello studio sui popolamenti di Campo Rospo si è scelto di utilizzare l'indice AMBI (Borja *et al.* 2000) che classifica le specie bentoniche di substrati molli come appartenenti ad uno di cinque gruppi ecologici con diversi livelli di sensibilità o tolleranza allo stress ambientale, consentendo una classificazione come richiesto dalla Direttiva 2000/60/EC.

Rispetto ad altre procedure di elaborazione, il modello WOE SediquaSoft ha permesso di elaborare indici sintetici di pericolo per un data-set di risultati scientifici molto ampio, considerando che nell'indagine effettuata sulle piattaforme dell'area di Campo Rospo Mare sono stati complessivamente ottenuti circa 10.000 dati suddivisi per le diverse tipologie di indagine. Al di là della ovvia utilità ed importanza degli indici sintetici che permettono di riassumere in una forma facilmente comprensibile il significato complessivo di ciascuna tipologia di analisi, l'elaborazione WOE ha consentito di integrare i risultati di LOE diverse ed eterogenee (Piva *et al.*, 2011; Benedetti *et al.*, 2012): questa integrazione ponderata rappresenta un indubbio miglioramento rispetto ad una discussione individuale di singoli data-sets analitici, valorizzando così l'approccio multidisciplinare con livelli di valutazione sempre più complessi, fino alla caratterizzazione del rischio ecologico.

### **5.6.2. Elaborazioni WOE: singole tipologie di dati, integrazione secondo DM 173/2015, integrazione complessiva**

Per quanto concerne le singole elaborazioni delle diverse tipologie di analisi, la caratterizzazione chimica dei sedimenti intorno alle 3 piattaforme è stata effettuata su campioni prelevati da 60 siti, caratterizzati per oltre 50 parametri con un totale di quasi 3.200 risultati da interpretare in funzione di almeno 3 riferimenti normativi o linee guida. È evidente come un approccio tabellare applicato ad un numero così massiccio di dati non avrebbe consentito nessuna forma di valutazione complessiva, di confronto tra aree o (eventualmente) periodi diversi. L'elaborazione ponderata di tutti questi risultati ha fornito una classe di pericolo generalmente da Assente a Trascurabile nei confronti degli SQA (D. Lgs 172/2015) e di L1 (DM 173/2016), ed Assente nei confronti di L2 (DM 173/2016). Solo tre campioni di sedimenti della piattaforma RSM-B hanno mostrato un indice di pericolo chimico Medio rispetto agli SQA (D. Lgs 172/2015), a causa di un contributo percentualmente compreso tra il 50 e il 75% per un metallo (Cd, Cr o Pb). Come già ampiamente discusso, i lievi sforamenti ottenuti rispetto agli SQA per alcuni elementi rientrano sempre nel range dei valori già misurati nei sedimenti dell'Adriatico, rispecchiano i valori basali dell'area e non sono pertanto da considerarsi come anomalie ambientali dovute alla presenza delle piattaforme.

Per i saggi ecotossicologici, condotti su 8 sedimenti per ciascuna delle tre piattaforme con una batteria di 4 specie diverse (*Vibrio fischeri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Paracentrotus lividus*, *Acartia tonsa*), sono state effettuate circa 400 analisi. In questo caso i risultati sono stati piuttosto uniformi tra campioni e specie: l'unico saggio ad aver mostrato qualche debole effetto di tossicità è stato quello sullo sviluppo embrionale del riccio (*P. lividus*), che avrebbe potuto condizionare la classificazione ecotossicologica di alcuni campioni di sedimento se si fosse seguito l'approccio del risultato peggiore. In realtà, l'elaborazione complessiva di tutta la batteria ha sempre indicato un livello complessivo di pericolo ecotossicologico Assente per tutti i campioni di sedimenti raccolti intorno alle 3 piattaforme RSM-A, B, C, evidenziando ancora una volta l'importanza dei criteri di valutazione ponderata nel riassumere dati scientificamente complessi in un indice sintetico di facile comprensione.

Le comunità bentoniche sono state analizzate in triplicato su 20 campioni di sedimento per ciascuna delle 3 piattaforme, per un totale di 180 risultati. L'elaborazione complessiva di questi dati, basata sui criteri di elaborazione dell'indice AMBI, ha fornito una classe di pericolo da Assente a Trascurabile in tutti i campioni di sedimento delle tre piattaforme.

Il bioaccumulo di oltre 30 analiti (tra metalli, idrocarburi policiclici aromatici e idrocarburi alifatici) è stato misurato nei tessuti dei mitili naturali e di quelli trapiantati, oltre che nei policheti *H. diversicolor* (relativamente ai metalli) esposti in condizioni di laboratorio ai sedimenti delle tre piattaforme. Nel complesso, queste diverse condizioni sperimentali hanno prodotto un totale di quasi 2.200 risultati analitici che sarebbe stato impossibile valutare in funzione degli eventuali superamenti degli SQA

indicati per il biota dal D. Lgs 172/2015 che contempla solo pochi parametri tra quelli analizzati, e con valori limite non sempre appropriati per gli organismi Mediterranei. Il confronto dei risultati ottenuti con quelli già disponibili in letteratura per queste specie è già stato commentato ed ha permesso di escludere situazioni anomale, al di fuori degli intervalli di variabilità noti per i diversi parametri chimici nelle specie analizzate. Tuttavia, anche in questo caso, tale confronto con un numero così elevato di risultati non avrebbe consentito una valutazione quantitativa delle diverse aree, utile a discriminare eventuali effetti delle piattaforme dalla normale variabilità naturale e stagionale. L'integrazione ponderata di tutti i dati di bioaccumulo ha permesso di riassumere un indice di pericolo biodisponibilità che è risultato sempre compreso tra Assente e Basso in funzione della specie o della condizione sperimentale.

Le analisi dei biomarker condotte sui mitili naturali e trapiantati delle 3 piattaforme hanno incluso 16 parametri indicativi di meccanismi di detossificazione, parametri immunitari, omeostasi cellulare, insorgenza di danni perossidativi e al DNA. Nel complesso sono state effettuate quasi 600 analisi di sistemi metabolici e pathways biochimiche complesse: al di là delle valutazioni sui meccanismi di risposta cellulare e sullo stato di salute degli organismi già discusse in precedenza, l'applicazione dei criteri di valutazione ponderata è stata nuovamente fondamentale per riassumere una grande mole di risultati scientifici complessi in una forma sintetica e di facile lettura: è evidente infatti che, indipendentemente dal significato delle variazioni osservate per ciascun parametro, è utile sapere che per i mitili naturali il pericolo elaborato per i biomarker è stato Medio per la piattaforma RSM-A ed uno dei piloni di RSM-C, Basso in tutti gli altri punti di campionamento, mentre è sempre risultato Basso per i mitili trapiantati in tutte e 3 le piattaforme.

Come è stato più volte sottolineato, oltre all'utilità di riuscire a riassumere in forma sintetica molte tipologie di dati scientificamente complessi, il grande vantaggio dell'approccio WOE è l'integrazione ponderata tra classi di risultati diversi che permette di ottenere livelli di valutazione sempre più complessi.


Un primo livello di elaborazione eseguito con i dati ottenuti in questo studio, si basa sul fatto che l'elaborazione dei risultati chimici ed ecotossicologici dei sedimenti è stata effettuata applicando gli stessi criteri di integrazione ponderata che sono stati recepiti dal DM 173/2016. Questo ha consentito di elaborare una "classe di qualità" per i sedimenti delle piattaforme di Campo Rospo, così come sarebbe stata loro assegnata da tale riferimento normativo che disciplina la caratterizzazione e le conseguenti opzioni gestionali nel caso di movimentazione di sedimenti marini.

Con la sola eccezione di 2 campioni, tutti i sedimenti sono classificabili con la migliore classe di qualità (A), che consentirebbe addirittura l'utilizzo per attività di ripascimento delle spiagge (in funzione della granulometria) o l'immersione deliberata in aree marine non costiere oltre le 3 MN.

Non è ovviamente questo il caso delle 3 piattaforme RSM-A, B e C, ma l'elaborazione è stata eseguita per avere un confronto con l'unica norma che indica le caratteristiche che i sedimenti devono avere per essere compatibili con la loro immersione in mare. I 2 campioni che fanno eccezione, hanno comunque una classe di qualità elevata (B) che indica caratteristiche chimiche ed ecotossicologiche compatibili con l'immersione deliberata in aree marine non costiere con monitoraggio ambientale, dimostrando la sostanziale assenza di criticità ambientali nei sedimenti delle tre piattaforme RSM-A, B e C.

L'indagine ambientale di Campo Rospo rappresenta il primo caso studio a livello nazionale in cui un approccio WOE quantitativo è stato applicato ad un numero così elevato di dati e di tipologie di analisi eterogenee. Anche se è già stata precedentemente riportata nel capitolo dei risultati, è utile mostrare ancora una volta la Tabella che riassume, per ciascuna delle 3 piattaforme, sia gli indici di pericolo elaborati per ciascuna LOE, che l'indice di rischio ottenuto dalla integrazione complessiva di tutti i risultati.

	<b>RSM A</b>	<b>RSM B</b>	<b>RSM C</b>
<b>LOE1</b> (Chimica dei sedimenti)	ASSENTE	BASSO	TRASCURABILE
<b>LOE2a</b> (Biodisponibilità nei mitili)	BASSO	BASSO	BASSO
<b>LOE2b</b> (Biodisponibilità in <i>H. diversicolor</i> )	BASSO	BASSO	BASSO
<b>LOE3</b> (Biomarker nei mitili)	BASSO	BASSO	BASSO
<b>LOE4</b> (Batteria di saggi ecotossicologici)	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
<b>LOE5</b> (Comunità bentoniche)	BASSO	BASSO	BASSO
<b>WOE (Weight of Evidence)</b>	BASSO	BASSO	BASSO



L'indice di rischio WOE è risultato Basso per tutte e 3 le piattaforme, consentendo di escludere situazioni compromesse sia a livello di singoli comparti ambientali che come caratteristiche complessive dell'area marina di campo Rospo.

È altrettanto evidente, come ormai più volte sottolineato, l'utilità pratica in termini di comunicazione e gestione del rischio della possibilità di riassumere dati complessi in un formato sintetico di facile lettura ma che deriva comunque da una elaborazione scientificamente robusta e validata dei risultati ottenuti.

### **5.6.3. Trend spaziali e temporali dei risultati ottenuti e raccomandazioni per monitoraggi futuri**

Le analisi statistiche condotte su tutte le diverse tipologie di dati e sulle loro elaborazioni, hanno sempre dimostrato la mancanza di differenze statisticamente significative tra i parametri chimici e biologici ottenuti per i campioni di sedimento o gli organismi, in funzione della distanza dalla piattaforma (considerando sia 2 semi-transetti sulla stessa direttiva, che i 4 semi-transetti separati), i piloni o le singole piattaforme.

I risultati delle campagne di studio del 2016 sono stati anche confrontati con quelli ottenuti in un precedente studio di monitoraggio delle piattaforme di Campo Rospo effettuato nel settembre 2015 dalla Società Greenlab.

I dati di questa precedente indagine sono stati molto più limitati sia come numero complessivo di campioni, che come tipologie di analisi effettuate. La caratterizzazione chimica dei sedimenti (metalli e idrocarburi policiclici aromatici) era stata effettuata selezionando 4 stazioni per piattaforma lungo 8 transetti ortogonali, per un totale di 12 campioni; contestualmente alle analisi chimiche, negli stessi siti era anche stata effettuata l'analisi delle comunità bentoniche.

Nella Tabella 31 sono riassunti i valori dei parametri chimici misurati nel 2015 nei sedimenti. Il confronto "qualitativo" evidenzia concentrazioni simili a quelle misurate nel presente studio del 2016, con le uniche eccezioni di cromo e nichel che erano risultati leggermente più alti anche nei confronti dei rispettivi valori di SQA indicati nel D.Lgs 172/2015. Per il cromo, nel 2015 era stato riportato un range di 53-79 µg/g per le diverse piattaforme, rispetto a 30-73 µg/g misurato nel 2016 e al valore SQA di 50 µg/g; per il nichel, il range del 2015 era 30-46 µg/g, rispetto a 15-30 µg/g del 2016 e al valore SQA di 30 µg/g. Da sottolineare, tuttavia, che anche nel 2015 le concentrazioni misurate nei sedimenti in prossimità delle piattaforme erano risultate assolutamente confrontabili con quelle della stazione di bianco (Tabella 31) e con i valori già precedentemente discussi come tipici per il bacino Adriatico.

Stazione	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (bianco)
Arsenico	< 1.2	< 1	< 1.2	< 0.83	< 1.1	< 1.1	< 1.2	< 1.4	< 1.2	< 1	< 0.93	< 0.99
Cadmio	< 0.12	< 0.1	< 0.12	0.22	< 0.12	< 0.11	0.29	< 0.14	< 0.12	0.25	0.24	0.2
Cromo	79	65	57	56	53	63	65	65	66	61	66	59
Rame	18	17	14	25	15	15	15	15	14	14	15	14
Mercurio	< 0.12	< 0.1	< 0.12	< 0.08	< 0.11	< 0.11	< 0.12	< 0.14	< 0.12	< 0.1	< 0.09	< 0.1
Nichel	46	39	37	34	33	33	33	35	34	34	33	30
Piombo	19	15	14	15	12	14	12	15	14	12	13	11
Zinco	71	61	56	52	51	62	60	62	70	62	60	53
Alluminio	27296	24265	28458	22184	17685	31779	26858	26873	32004	29980	31326	34405
Bario	122	120	118	107	114	170	162	162	149	143	153	151
Cromo esavalente	< 0.45	< 0.45	< 0.45	< 0.45	< 0.45	< 0.45	< 0.45	< 0.45	< 0.45	< 0.45	< 0.45	< 0.45
Benzo(a)pirene	0.014	0.014	0.015	0.024	0.017	0.013	0.014	0.019	0.017	0.017	0.017	0.012
Dibenzo(a,h)antracene	0.011	0.009	0.011	0.016	0.012	0.010	0.010	0.014	0.012	0.012	0.011	0.010
Benzo(a)antracene	0.004	0.005	0.005	0.008	0.006	0.005	0.006	0.007	0.006	0.007	0.006	0.004
Benzo(b)fluorantene	0.022	0.024	0.023	0.027	0.023	0.020	0.017	0.021	0.026	0.024	0.022	0.013
Benzo(e)pirene	0.021	0.020	0.021	0.033	0.023	0.019	0.019	0.027	0.024	0.024	0.022	0.017
Benzo(j)fluorantene	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Benzo(k)fluorantene	0.014	0.013	0.013	0.017	0.013	0.011	0.010	0.016	0.014	0.015	0.012	0.010
Crisene	0.008	0.010	0.010	0.014	0.009	0.008	0.009	0.011	0.009	0.009	0.009	0.007
Acenaftene	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.004	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Acenaftilene	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Antracene	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.003	< 0.001	< 0.001
Benzo(ghi)perilene	0.032	0.030	0.029	0.046	0.034	0.028	0.028	0.037	0.032	0.034	0.032	0.027
Dibenzo(a,e)pirene	0.004	0.004	0.006	0.011	0.007	0.008	0.008	0.010	0.008	0.008	0.007	0.007
Dibenzo(a,h)pirene	0.003	0.002	0.003	0.004	0.004	0.003	0.003	0.004	0.004	0.005	0.004	0.003
Dibenzo(a,i)pirene	0.002	0.002	0.003	0.003	0.004	0.002	0.003	0.003	0.005	0.004	0.003	0.004
Dibenzo(a,l)pirene	0.019	0.019	0.018	0.029	0.019	0.019	0.017	0.025	0.021	0.022	0.020	0.016
Fenantrene	0.134	0.115	0.035	0.108	0.111	0.203	0.158	0.064	0.158	0.153	0.051	0.148
Fluorantene	0.014	0.015	0.014	0.022	0.018	0.017	0.018	0.020	0.021	0.021	0.016	0.016
Fluorene	0.011	0.007	< 0.001	0.004	0.005	0.025	0.012	< 0.001	0.010	0.018	< 0.001	0.011
Indeno(1,2,3-cd)pirene	0.040	0.037	0.039	0.061	0.043	0.038	0.034	0.051	0.047	0.047	0.042	0.033
Naftalene	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.008	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Pirene	0.008	0.009	0.007	0.014	0.009	0.009	0.010	0.011	0.011	0.011	0.009	0.009
Sommatoria IPA Totali	0.317	0.391	0.208	0.365	0.304	0.402	0.328	0.276	0.367	0.380	0.233	0.304

Tabella 31. Concentrazioni di metalli e idrocarburi policiclici aromatici ( $\mu\text{g/g}$ ) misurate nel 2015 nei sedimenti intorno alle piattaforme di Campo Rospo Mare e nel sito di controllo (da relazione Greenlab).

L'assenza di un impatto antropico nell'area di Campo Rospo era stata confermata nel 2015 anche dai risultati delle comunità bentoniche, con un livello di disturbo trascurabile in tutte le stazioni intorno alle piattaforme e medio in quella di controllo.

Il confronto tra i dati del 2015 e quelli del 2016 è reso più comprensibile dalla elaborazione di tutti i dati mediante il modello WOE, ovviamente limitato ai soli risultati della caratterizzazione chimica dei sedimenti e delle comunità bentoniche, e per i soli campioni in comune alle due indagini. Tenendo come riferimento gli SQA del D. Lgs 172/2015, il livello di HQ chimico elaborato con i dati del 2015

è risultato Medio per i sedimenti delle piattaforme, lievemente più alto di quello ottenuto nel 2016 (da Assente a Medio); come già discusso, tale differenza rientra nella variabilità dei livelli basali ed è da imputarsi al contributo di cromo e nichel risultati tendenzialmente maggiori dei loro SQA che rappresentano i valori di riferimento più restrittivi ma che non sempre considerano specificità locali per i livelli basali dei metalli.

Simile per l'indagine del 2015 e del 2016 è risultata l'elaborazione dei dati delle comunità bentoniche (basata sull'indice AMBI), ma soprattutto l'integrazione complessiva WOE che ha fornito un giudizio sintetico di pericolo generalmente Basso nel 2015 (Medio per un unico campione), Assente o Basso nel 2016 (Tabella 32).



Sito	Stazione	Weight Of Evidence			
		2015		2016	
		LOE1 Medio	LOE5 Trascurabile	LOE1 Assente	LOE5 Trascurabile
RSM-A	RSM A17 7	WOE		WOE	
		BASSO		ASSENTE	
	RSM A18 8	WOE		WOE	
		BASSO		ASSENTE	
RSM A19 5	WOE		WOE		
	BASSO		ASSENTE		
RSM A20 6	WOE		WOE		
	BASSO		ASSENTE		
RSM-B	RSM B17 11	WOE		WOE	
		MEDIO		BASSO	
	RSM B18 9	WOE		WOE	
		BASSO		ASSENTE	
RSM B19 7	WOE		WOE		
	BASSO		BASSO		
RSM B20 10	WOE		WOE		
	BASSO		BASSO		
RSM-C	RSM C17 2	WOE		WOE	
		BASSO		BASSO	
	RSM C18 1	WOE		WOE	
		BASSO		BASSO	
RSM C19 4	WOE		WOE		
	BASSO		ASSENTE		
RSM C20 3	WOE		WOE		
	BASSO		ASSENTE		
BIANCO	RSM A20 12	WOE		WOE	
		BASSO		ASSENTE	

Tabella 32. Confronto delle elaborazioni della caratterizzazione chimica, delle comunità bentoniche e della loro integrazione WOE tra i dati del 2015 (da relazione Greenlab; stazioni indicate in rosso) e quelli del 2016.

Il confronto tra i risultati del 2015 e del 2016 è limitato a due sole linee di evidenza (caratterizzazione chimica dei sedimenti e comunità bentoniche) e ha dunque un minor valore ecologico rispetto a quello elaborato con tutti i dati del 2016, ma ancora una volta conferma l'importanza di questo approccio nel riassumere grandi quantità di dati complessi in indici sintetici di facile comprensione.

Considerando che non si sono mai evidenziate differenze statisticamente significative per nessuno dei parametri chimici o biologici analizzati, e che anche il confronto tra anni di campionamento diversi ha mostrato una sostanziale omogeneità tra tutti i campioni prelevati nell'area marina di Campo Rospo, si è matematicamente calcolata la ridondanza del numero di campioni analizzati. Per ogni piattaforma è stato determinato l'intervallo di confidenza al 95% ottenuto dai risultati elaborati dal modello per le diverse tipologie di indagine. Mediando la dimensione minima del numero dei campioni che per ciascuna delle tre piattaforme permette di stimare il valore di HQ con l'accuratezza richiesta, è stato calcolato che per le analisi chimiche e delle comunità bentoniche il numero minimo, ma comunque cautelativo di stazioni che potrebbe essere campionato nell'area di ogni piattaforma equivale a 8 (invece che gli attuali 20): la disposizione di queste stazioni dovrebbe essere random in quanto tutti i risultati non mostrano differenze nella distribuzione geografica dei campioni.

Per quanto riguarda le analisi del bioaccumulo di metalli in *H. diversicolor*, la seconda campagna invernale non aggiunge informazioni rilevanti rispetto a quella estiva (in cui sono presenti anche i risultati dei sedimenti) ed ha un rapporto costo-beneficio negativo ai fini della valutazione della qualità dell'ambiente marino e del potenziale impatto delle piattaforme di Campo Rospo Mare. Più in generale, le analisi di bioaccumulo dei metalli stimati in condizioni di laboratorio con il polichete *H. diversicolor* non appaiono di particolare utilità o rilevanza ambientale, soprattutto in aree in cui siano già state fatte ed abbiano dato esito negativo, e dove le attività di monitoraggio continuano ad essere effettuate in termini di caratterizzazione chimica, ecotossicologica e di comunità bentoniche nei sedimenti, e come bioaccumulo e biomarker in organismi naturali ed eventualmente trapiantati.

Le analisi di bioaccumulo e biomarker nei mitili naturali non evidenziano alcuna differenza in funzione del pilone e potrebbero pertanto essere limitate ad un campione (con relative repliche) rappresentativo per ciascuna delle 3 piattaforme.

È utile invece considerare un ampio spettro di biomarker analizzati per avere un quadro più completo ed affidabile dello stato di salute degli organismi. Al tempo stesso, risulta utile anche inserire il confronto tra mitili naturali e trapiantati che, nonostante logisticamente più complesso, fornisce elementi di fondamentale importanza nella valutazione complessiva dei risultati, delle differenze tra mitili delle piattaforme ed organismi di controllo, del potenziale impatto antropico delle piattaforme.

L'approccio multidisciplinare WOE è risultato fondamentale nella caratterizzazione della qualità ambientale in un contesto complesso come quello di Campo Rospo Mare. I modelli WOE permettono l'interpretazione di ampi data-set di dati scientificamente complessi ed eterogenei, non usano la logica del confronto tabellare ed aumentano così la capacità di discriminare variate condizioni ambientali. La possibilità di applicare una elaborazione scientificamente robusta per riassumere indici sintetici di facile comprensione, è un grande supporto nei processi di valutazione del rischio ambientale e per decisioni sito-orientate.

## 6. CONCLUSIONI

Le conclusioni principali di questo lavoro si possono brevemente schematizzare nei punti successivi:

- Tutte le analisi effettuate per i diversi parametri e sui diversi campioni (sedimenti ed organismi) non hanno mai evidenziato risultati al di fuori della normalità per quanto riguarda le caratteristiche chimiche, ecotossicologiche e di biodisponibilità di metalli associati ai sedimenti, l'accumulo e il possibile effetto di contaminanti ambientali in mitili naturali e trapiantati, lo stato di salute delle comunità bentoniche.
- L'elaborazione dei dati attraverso specifici criteri di valutazione ponderata, non basati sulla logica dell'approccio tabellare o del risultato peggiore, hanno aumentato la capacità di discriminare la qualità sia chimica che biologica dei campioni analizzati.
- L'applicazione di un modello Weight Of Evidence (WOE) ha consentito un'integrazione ponderata di tipologie di analisi eterogenee, sintetizzando una elevata mole di dati scientifici complessi in numerosi indici di pericolo specifici ed in un indice di rischio complessivo.
- Un approccio scientificamente rigoroso in grado di riassumere il livello di pericolo o rischio in un formato di facile comprensione è fondamentale per sviluppare strategie di indagine e di controllo nel lungo termine e sito-specifiche.
- L'elaborazione complessiva di tutti i risultati delle piattaforme di Campo Rospo Mare, integrati sia su scala spaziale che temporale, oltre a riassumere l'assenza di criticità ambientali in una forma chiara e di facile comprensione, ha permesso di suggerire possibili modifiche nei futuri piani di monitoraggio di queste installazioni.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Alam, M.A., Gomes, A., Sarkar, S.K., Shuvaeva, O.V., Vishnevetskaya, N.S., Gustaytis, M.A., Bhattacharya, B.D., Godhantaraman, N. 2010. Trace metal bioaccumulation by soft-bottom polychaetes (Annelida) of Sundarban mangrove wetland, India and their potential use as contamination indicator. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85 (5):492-496.
- APAT-ICRAM, 2007. Manuale per la movimentazione di sedimenti marini. Disponibile su [www.apat.gov.it](http://www.apat.gov.it), pp. 1-72
- ARPAT (1998) Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico: 191 pp.
- ASTM (1995). Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos- E 1563-95. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, pp. 1029-1046.
- Avio C.G., Gorbi S., Milan M., Benedetti M., Fattorini D., d'Errico G., Pauletto M., Bargelloni L., Regoli F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198: 211-222.
- Azur Environmental, 1995. Microtox acute toxicity basic test procedures, 63.
- Banni M., Dondero F., Jebali J., Guerbej H., Boussetta H., Viarengo A. 2007. Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers* 12(4): 369–383.
- Bebiano MJ., Pereira CG., Rey F., Cravo A., Duarte D., d'Errico, G., Regoli F. 2015. Integrated approach to assess ecosystem health in harbor areas. *Science of the Total Environment*, 514: 92-107,
- Beliaeff B., Burgeot T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6): 1316-1322.
- Benedetti M., Ciaprini F., Piva F., Onorati F., Fattorini D., Notti A., Ausili A., Regoli F. 2012. A multidisciplinary weight of evidence approach toward polluted sediments: integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environmental International* 38: 17-28.
- Benedetti M., Fattorini D., Martuccio G., Nigro M., Regoli F. 2009. Interactions between trace metals (Cu, Hg, Ni, Pb) and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the antarctic fish *Trematomus bernacchii*: Oxidative effects on biotransformation pathway. *Environmental toxicology and chemistry*, 28(4): 818-825.
- Benedetti, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d'Errico, G., Piva, F., Pacitti, D., Regoli, F. 2014. Environmental hazards from natural hydrocarbons seepage: Integrated classification of risk from sediment chemistry, bioavailability and biomarkers responses in sentinel species. *Environmental Pollution*, 185: 116-126.
- Blumer, M., Guillard, R.R.L., Chase, T. 1971. Hydrocarbons of marine phytoplankton. *Marine Biology*, 8: 183–189.

- Bocchetti, R., Fattorini, D., Gambi, M.C., Regoli, F. 2004. Trace Metal Concentrations and Susceptibility to Oxidative Stress in the Polychaete *Sabella spallanzanii* (Gmelin) (Sabellidae): Potential Role of Antioxidants in Revealing Stressful Environmental Conditions in the Mediterranean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46 (3): 353-361.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F. 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology*, 89 (4): 257-266.
- Bocchetti, R., Regoli, F. 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*. 65: 913-921.
- Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C., Perrone, E., Roggeri, P. 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552: 153-162.
- Borja A., Franco J., Perez V. 2000. A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin*, 40: 1100-1114.
- Broeg K., Lehtonen K.K. 2006. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 53(8): 508-522.
- Bryan G.W., Hummerstone L.G. 1971. Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of heavy metals. I. General observations and adaptation to copper. *J. Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51(04): 845-863.
- Camus L., Birkely S.R., Jones M.B., Børseth J.F., Grøsvik B.E., Gulliksen B., Lønne, O.J., Regoli F., Depledge M.H. 2003. Biomarker responses and PAH uptake in *Mya truncata* following exposure to oil-contaminated sediment in an Arctic fjord (Svalbard). *Science of the total environment*, 308(1): 221–234.
- Carballal M., López M., Azevedo C., Villalba A. 1997. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 127–135.
- Carr, R.S., Chapman, D.C. 1995. Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests – extraction, storage and handling techniques. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28, 69–77.
- Casado-Martinez, M.C., Smith, B.D., DeValls, T.A., Luoma, S.N., Rainbow, P.S. 2009. Biodynamic modelling and the prediction of accumulated trace metal concentrations in the polychaete *Arenicola marina*. *Environmental Pollution*, 157 (10): 2743-2750.

- Chapman P. M., Wang F., Caeiro S.S. 2013. Assessing and managing sediment contamination in transitional waters. *Environment international*, 55: 71-91.
- Chapman, P.M. 2007. Determining when contamination is pollution – weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environmental International*, 33: 492-501.
- Clementson L. A. and Wayte S. E. 1992. The effects of frozen storage of open-ocean seawater sample on the concentration of dissolved Phosphate and Nitrate. *Water Research*, 26 (9): 1171-1176.
- Crecelius, E.A., Bothner, M.H., Carpenter. R. 1975. Geochemistries of arsenic, antimony, mercury, and related elements in sediments of Puget Sound. *Environmental Science and Technology*, 9: 325-333.
- Dagnino A., Sforzini S., Dondero F., Fenoglio S., Bona E., Jensen J., Viarengo A. 2008. A “Weight-of-Evidence” approach for the integration of environmental “Triad” data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4: 314–26.
- Dailianis S., Domouhtsidou G.P., Raftopoulou E., Kaloyiann M., Dimitriadis V. K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56(4): 443–470.
- Dauvin J.C., Ruellet T. 2007. Polychaete/amphipod ratio revisited. *Marine Pollution Bulletin*, 55: 215-224.
- Decreto legislativo 13 ottobre 2015, n. 172 Attuazione della direttiva 2013/39/UE, che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque. *Gazzetta Ufficiale* del 27 ottobre 2015, n. 250.
- Dellali M., Barelli M. G., Romeo M., Aissa P. 2001. The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. Elsevier*, 130(2): 227–235.
- Dixon D.R., Pruski A.M., Dixon L.R.J., Jha A.N., 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis. Oxford Univ Press*, 17(6): 495–507.
- DM 173 del 15 luglio 2016. Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini. *GU Serie Generale* n.208 del 06-09-2016 - Suppl. Ordinario n. 40.
- DM 260/2010. Regolamento recante i Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo. *G.U.* 30 del 7 Febbraio 2011.
- Dolenec, T., Faganeli, J., Pirc, S. 1998. Major, minor and trace elements in surficial sediments from the open adriatic sea: a regional geochemical study. *Geologia Croatica*, 51 (1): 47-58.

- Ekpo, B.O., Fubara, E.P., Ekpa, O.D., Marynowski, H.L. 2012. Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and PAH distribution indices in sediments from coastal areas of Bonny River in Niger Delta, Nigeria. *ARPJ Journal of Earth Sciences*, 1-1: 9-20.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Engel D. W., Roesijadi G. 1987. Metallothioneins: a monitoring tool. *Pollution physiology of estuarine organisms*, 17: 421–438.
- English, M.D., Robertson, G.J., Mallory, M.L. 2015. Trace element and stable isotope analysis of fourteen species of marine invertebrates from the Bay of Fundy, Canada. *Marine Pollution Bulletin*, 101 (1): 466-472.
- Environment Canada (1992). Biological test method: fertilization assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars). *Environmental Protection Series*. EPS 1/RM/27, Ottawa, Canada.
- Etiopio, G., Panieri, G., Fattorini, D., Regoli, F., Vannoli, P., Italiano, F., Locritani, M., Carmisciano, C. 2014. A thermogenic hydrocarbon seep in shallow Adriatic Sea (Italy): Gas origin, sediment contamination and benthic foraminifera. *Marine and Petroleum Geology*, 57: 283-293.
- Fattorini D., Notti A., Di Mento R., Cicero AM., 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.
- Fattorini D., Notti A., Nigro M., Regoli F. 2010. Hyperaccumulation of vanadium in the Antarctic polychaete *Perkinsiana littoralis* as a natural chemical defense against predation. *Environmental Science and Pollution Research*, 17: 220-228.
- Fattorini, D., Notti, A., Halt, M.N., Gambi, M.C., Regoli, F. 2005. Levels and chemical speciation of arsenic in polychaetes: A review. *Marine Ecology*, 26 (3-4): 255-264.
- Fenaux L., 1968. Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *A. lixula*, *P. lividus* et *P. microtuberculatus* (Echinides) à Villfranche-Sur-Mer. *Vie Milieu* 19:1–52.
- Ferguson, P.L., Chandler, G.T. 1998. A laboratory and field comparison of sediment polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation by the cosmopolitan estuarine polychaete *Streblospio benedicti* (Webster). *Marine Environmental Research*, 45 (4-5): 387-401.
- Ficken K.J., Li B., Swain D.E., Eglinton G. 2000. An n-alkane proxy for sedimentary input of submerged/floating fresh water aquatic macrophytes. *Organic Geochemistry*, 31: 745-759.
- Frantzen, M., Regoli, F., Ambrose, W. G., Nahrgang, J., Geraudie, P., Benedetti, M., Camus, L. 2016. Biological effects of mechanically and chemically dispersed oil on the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127: 95-107.



- Frenzilli G., Nigro, M., Scarcelli V., Gorbi, S., Regoli F. 2001. 'DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* : a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon', *Aquatic Toxicology*, 53: 19–32.
- Galloway T. S., Brown R. J., Browne M. A., Dissanayake A., Lowe D., Jones M. B., Depledge M. H. 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science & Technology*, 38: 1723-1731.
- García-García E., Prado-Álvarez M., Novoa B., Figueras A., Rosales, C. 2008. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(6): 637–653.
- Geiszinger, A.E., Goessler, W., Francesconi, K.A. 2002. Biotransformation of arsenate to the tetramethylarsonium ion in the marine polychaetes *Nereis diversicolor* and *Nereis virens*. *Environmental Science and Technology*, 36 (13): 2905-2910.
- Giulianini P. G., Bertolo F., Battistella S., Amirante G.A. 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis. *Tissue and Cell*, 35(4): 243–251.
- Gomiero, A., Volpato, E., Nasci, C., Perra, G., Viarengo, A., Dagnino, A., Spagnolo, A., Fabi, G. 2015. Use of multiple cell and tissue-level biomarkers in mussels collected along two gas fields in the northern Adriatic Sea as a tool for long term environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 93: 228-244
- Gorbi S., Bocchetti R., Binelli A., Bacchiocchi S., Orletti R., Nanetti L., Raffaelli F., Vignini A., Accoroni S., Totti C., Regoli F. 2012. Biological effects of palytoxin-like compounds from *Ostreopsis cf. ovata*: A multibiomarkers approach with mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 89: 623-632
- Gorbi S., Regoli F. 2003. Total oxyradical scavenging capacity as an index of susceptibility to oxidative stress in marine organisms. *Comments on Toxicology*, 9: 3003-322.
- Gorbi S., Virno Lamberti C., 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. *Marine Environmental Research*, 65: 34-49.
- Gorbi, S., Avio, G.C., Benedetti, M., Totti, C., Accoroni, S., Pichierri, S., Bacchiocchi, S., Orletti, R., Graziosi, T., Regoli, F. 2013. Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 35: 941-950.
- Hagger J.A., Jones M.B., Lowe D., Leonard D.P., Owen R., Galloway T.S. 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. *Marine Pollution Bulletin*, 56(6): 1111-1118.
- Hans, J., Jöst, C., Zauke, G.-P. 2011. Significance and interspecific variability of accumulated trace metal concentrations in Antarctic benthic polychaetes. *Science of the Total Environment*, 409 (14): 2845-2851.

- ICES-International Council for the Exploration of the Sea, 2012. Techniques in Marine Environmental Sciences. *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects*. No. 315, 2012.
- ICES-International Council for the Exploration of the Sea, 2015. Techniques in Marine Environmental Sciences. Lysosomal membrane stability in mussels No. 56, 2015
- ISPRA, 2011. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e marine. *ISPRA Manuali e linee guida* - 67/2011, ISBN 978-88-448-0498-5, <http://www.isprambiente.gov.it/>
- ISO (2006). Water quality: determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – part 3: method using freeze-dried bacteria. *ISO/CD 11348-3*.
- ISO 9377-2:2000. Water quality — Determination of hydrocarbon oil index — *Part 2: Method using solvent extraction and gas chromatography*
- ISO International Organization for Standardization 1999. Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). *Draft International Standard ISO/DIS 14669*. ISO, Genève, Switzerland.
- ISO International Organization for Standardization 2006. Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Draft International Standard ISO/DIS 102531*. ISO, Genève, Switzerland.
- ISO International Organization for Standardization 2015. Water quality - Calanoid copepod early-life stage test with *Acartia tonsa*. Draft 16778. ISO, Genève, Switzerland.
- Ivanković D., Pavičić J., Erk M., Filipović-Marijić V., Raspor B. 2005. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: seasonal and spatial variability., *Marine Pollution Bulletin*, 50(11): 1303–1313.
- Jeng, W.L., Huh, C.A. 2008. A comparison of sedimentary aliphatic hydrocarbon distribution between East China Sea and southern Okinawa Trough. *Continental Shelf Research*, 28 (4-5): 582-592.
- Laflamme, R.E., Hites, R.A. 1978. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42: 289-303.
- Larsen, P.F., Gadbois, D.F., Johnson, A.C. 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Maine sediments: distribution and mode of transport. *Marine Environmental Research*, 18: 231-244.
- Lee, W. (1977). Some laboratory cultured crustaceans for marine pollution studies. *Marine Pollution Bulletin*, 8: 258-259.
- Linkov I., Loney D., Cormier S., Satterstrom F.K., Bridges T. 2009. Weight-of-evidence evaluation in environmental assessment: review of qualitative and quantitative approaches. *Science of the Total Environment*, 407: 5199–5205.

- Lipiatou, E., Saliot., A. 1991. Fluxes and transport of anthropogenic and natural polycyclic aromatic hydrocarbons in the western Mediterranean Sea. *Marine Chemistry* 32: 51-71.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 193(1): 265-75.
- Maisano M., Natalotto A., Cappello T., Giannetto A., Oliva S., Parrino V., Sanfilippo M., Mauceri A. 2016. Influences of Environmental Variables on Neurotransmission, Oxidative System, and Hypoxia Signaling on Two Clam Species from a Mediterranean Coastal Lagoon. *Journal of Shellfish Research*, 35 (1): 41-49.
- Margalef, R., 1969. Perspectives in Ecological Theory. The University of Chicago Press, Chicago.
- Marigómez I., Garmendia L., Soto M., Orbea A., Izagirre U., Cajaraville, M. P. 2013. Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill "Mussel Watch". *Ecotoxicology*, 22(3): 486-505.
- Marigómez, I., Izagirre, U. and Lekube, X. 2005. Lysosomal enlargement in digestive cells of mussels exposed to cadmium, benzo [a] pyrene and their combination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(2): 188–193.
- Mayer, L.M. 1988. Geochemistry of chromium in the oceans. Pages 173-187 In: J.O. Nriagu and E. Nieboer, Eds., Chromium in Natural and Human Environments. *John Wiley and Sons*, New York.
- McCarty L.S., Power M., Munkittrick K.R. 2002. Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8: 159-164.
- Mestre N.C., Rocha T.L., Canals M., Cardoso C., Danovaro R., Dell'Anno A., Gambi C., Regoli F., Sanchez-Vidal A., Bebianno M.J. 2017. Environmental hazard assessment of a marine mine tailings deposit site and potential implications for deep-sea mining. *Environmental Pollution*, 228: 169-178.
- Mezzelani M., Gorbi S., Da Ros Z., Fattorini D., d'Errico G., Milan M., Bargelloni L., Regoli F. 2016. Ecotoxicological potential of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in marine organisms: bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 121: 31-39.
- Minelli A., Ruffo S., La Posta S. (Eds.) (1995). Checklist delle specie della fauna italiana. Calderini, Bologna.
- Mistri M., Munari C. 2008. BITS: a SMART indicator for soft-bottom, non-tidal lagoons. *Marine Pollution Bulletin* 56: 587-599.
- Moore M.N., 1982. Lysosomes and environmental stress. *Marine Pollution Bulletin* 13: 42-43.
- Moore M.N. 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology and Progress Series* 46: 81-89.

- Moore, M. N., Viarengo, A., Donkin, P. and Hawkins, A. J. S. 2007. 'Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels', *Aquatic Toxicology*, 84(1): 80–91.
- Moore, M.N., Allen, J.I., and McVeigh, A. 2006. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research* 61: 278-304.
- Morrioni, L., Pinsino, A., Pellegrini, D., Regoli, F., Matranga, V. 2016. Development of a new integrative toxicity index based on an improvement of the sea urchin embryo toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 123: 2-7
- Muxika I., Borja A, Bald J, 2007. Using historical data, expert judgement and multivariate analysis in assessing reference conditions and benthic ecological status, according to the European Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin* 55: 16-29.
- Najimi S., Bouhaimi A., Daubeze M., Zekhnini A., Pellerin J., Narbonne J.F., Moukrim A. 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 58(6): 901–908.
- Nardi A., Mincarelli L.F., Benedetti M., Fattorini D., d'Errico G., Regoli F. 2017. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 169: 493-502.
- Neff, J.M. 1997. Metals and Organic Chemicals Associated with Oil and Gas Well Produced Water: Bioaccumulation, Fates, and Effects in the Marine Environment. Report for the Offshore Operators Committee, New Orleans, LA. Continental Shelf Associates, Inc., Jupiter, FL. 357 pp. and Appendices.
- Neff, J.M. 2002. Arsenic in the Ocean. In Neff, J.M., ed., Bioaccumulation in Marine Organisms. Effect of Contaminants from Oil Well–Produced Water. *Elsevier Science*, Oxford, UK, pp 57–78.
- Nigro M., Falleni A., Del Barga I., Scarcelli V., Lucchesi P., Regoli F., Frenzilli, G. 2006. 'Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels', *Aquatic Toxicology*. 77(4): 339–347.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Wagner, H. 2011. *Vegan: Community Ecology*. Package. R Package Version 2.0-2.
- OSPAR, 2004. The Background Document on Problems and Benefits Associated with the Development of Offshore Wind Farms identifies some of the potential advantages and disadvantages of offshore wind farms. Publication number: 214-2004.
- Paul, J., Meischner, D. 1976. Heavy metal analyses from sediments of the Adriatic Sea. *Senckenbergiana Maritima*, 8: 91-102.

- Pèrés, J.M., Picard J. (1964). Nouveau manuel de bionomie benthique de la Mer Méditerranée. *Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume*, 31 (47): 5-137.
- Petrović M., Gehringer P., Eschweiler H., Barceló D. 2004. LC-MS-(MS) determination of oxidative degradation products of nonylphenol ethoxylates, carboxylates and nonylphenols in water. *Water Science and Technology*, 50(5): 227-234.
- Pfeifer S., Schiedek D., Dippner J.W. 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 320 (1): 93-103.
- Picard, J. (1965). Recherches qualitatives sur les biocoenoses marines des substrats meubles dragables de la région marseillaise. *Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume* , 36 (52): 1-160.
- Pielou, E.C., 1969. An Introduction to Mathematical Ecology. *Wiley-Interscience*, New York.
- Piva F., Ciaprini F., Onorati F., Benedetti M., Fattorini D., Ausili A., Regoli F. 2011. Assessing sediment hazard through a Weight Of Evidence approach with bioindicator organisms: a practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere*, 83: 475-485.
- Ravindra, K., Sokhi, R., Van Grieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42: 2895-2921.
- Regoli F., 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Marine Ecology and Progress Series* 84: 63-69.
- Regoli F. 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 50: 351-361.
- Regoli F., Giuliani M. E. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine environmental research*, 93: 106-117.
- Regoli F., Giuliani M. E., Benedetti M., Arukwe A. 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic toxicology*, 105(3): 56-66.
- Regoli, F., Nigro M., Benedetti M., Gorbi S., Pretti C., Gervasi, P.G., Fattorini D., 2005. Interactions between metabolism of trace metals and xenobiotic agonists of the aryl hydrocarbon receptor in the antarctic fish *Trematomus bernacchii*: environmental perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(6): 1475-1482.
- Regoli F., Pellegrini D., Cicero A.M., Nigro N., Benedetti M., Gorbi S., Fattorini D., d'Errico G., Di Carlo M., Nardi A., Gaion A., Scuderi A., Giuliani S., Romanelli G., Berto D., Trabucco B., Guidi, Bernardeschi M., Scarcella V., Frenzilli G. 2014. A multidisciplinary weight of evidence approach for environmental

risk assessment at the Costa Concordia wreck: integrative indices from Mussel Watch. *Marine Environmental Research*, 96: 92-104.

- Regoli F., Pellegrini D., Winston G.W., Gorbi S., Giuliani S., Virno-Lamberti C., Bompadre S. 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: The relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*), *Marine Pollution Bulletin*, 44(9): 912–922.
- Regoli F., Principato G. 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31(2): 143–164.
- Regoli F., Winston G.W. 1999. Quantification of total oxidant scavenging capacity (TOSC) of antioxidants for peroxyxynitrite, peroxy radicals and hydroxyl radicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 156: 96-105.
- Regoli, F. 1998. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34 (1): 48-63.
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M. 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology*, 68 (2): 167-178.
- Regoli, F., Orlando, E. 1994a. Seasonal variation of trace metal concentrations in the digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: Comparison between a polluted and a non-polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27 (1): 36-43.
- Regoli, F., Orlando, E. 1994b. Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 28 (10): 592-600.
- Rickwood C.J., Galloway T.S. 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect: A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology*, 67(1): 45–56.
- Ridgway, I.M., Price. N.B. 1987. Geochemical associations and post-depositional mobility of heavy metals in coastal sediments: Loch Etive, Scotland. *Marine Chemistry*, 21: 229-248.
- Ringwood A.H., Connors D.E., Hogue J. 1998. Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal membrane destabilization in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 166: 163-171.
- Salomons, W., Förstner., U. 1984. Metals in the Hydrosphere. *Springer-Verlag*, Berlin. 349 pp.
- Schrock, M.E., Barrows, E.S., Rosman, L.B. 1997. Biota-to-sediment accumulation factors for TCDD and TCDF in worms from 28-day bioaccumulation tests. *Chemosphere*, 34 (5-7): 1333-1339.

- Schropp, S.J., Windom, H.L. 1988. A guide to the interpretation of metal concentration in estuarine environments. Florida Department of Environmental Regulation, Office of Coastal Management (FDER/OCM).
- Semenzin E., Critto A., Rutgers M., Marcomini A. 2009. DSS-ERAMANIA: decision support system for site-specific ecological risk assessment of contaminated sites. In Decision Support Systems for Risk-Based Management of Contaminated Sites. pp. 1-33.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
- Shaw, J.P., Large, A.T., Donkin, P., Evans, S.V., Staff, F.J., Livingstone, D.R., Chipman, J.K. 2004. Seasonal variation in cytochrome P450 in immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 67: 325-336.
- Simboura N., Zenetos A., 2002. Benthic indicators to use in Ecological Quality classification of Mediterranean soft bottom marine ecosystems, including a new Biotic Index. *Mediterranean Marine Science*, 3: 77–111.
- Thomann, R. V., Connolly, J.P., Parkerton., T.F. 1992. An equilibrium model of organic chemical accumulation in aquatic food webs with sediment interaction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 615-629.
- Tobiszewski, M., Namieśnik, J. 2012. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental Pollution*, 162: 110-119.
- Trefry, J.H. 1982. An overview of the marine biogeochemistry of barium. *Report to the American Petroleum Institute*, Washington, DC. 25 pp.
- U.S. Department of Energy. 1998. Biota Sediment Accumulation Factors for Invertebrates: Review and Recommendations for the Oak Ridge Reservation. BJC/OR-112, Draft number ES/ER/TM-214.
- US EPA (1991). Earl-Standard Operating Procedure Conducting the Sea Urchin *Arbacia punctulata* Fertilization Test. *Environmental Research Laboratory*, Narragansett, RI, pp 125-131.
- Venier P., Maron S., Canova S. 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo [a] pyrene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 390(1): 33–44.
- Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146: 281-300
- Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44: 69-84.

- Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. 1997. A simple Spectrophotometric Method of Metallothionein evaluation in Marine Organisms: an application to Mediterranean and Adriatic Molluscs. *Marine Environmental Research*, 44(1): 69–84.
- Vincent C., Heinrich H., Edwards A., Nygaard K., Haythornthwarite J. 2002. Guidance on typology, reference conditions and classification systems for transitional and coastal waters, CIS Working Group 2.4(Coast) Common Implementation Strategy of the Water Framework Directive, *European Commission*.
- Warren, L.J. 1981. Contamination of sediments by lead, zinc and cadmium: a review. *Environmental Pollution*, 2: 401-436.
- Wedepohl, K.H. 1987. Total mercury, cadmium, copper, zinc and arsenic contents in surface sediments from coastal region of the central Adriatic. *Acta Adriatica*, 1-2: 65-71.
- Wetzel, D.L., Van Vleet, E.S. 2004. Accumulation and distribution of petroleum hydrocarbons found in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 48 (9-10): 927-936.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Blanchard K.A., Fong J.H. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine* 24: 480–493.
- Winters, K., Parker, P.L., Van Baalen, C. 1969. Hydrocarbons of bluegreen algae: geochemical significance. *Science*, 158: 467–468.
- Word, J.Q., Albrecht, B.B., Anghera, M.L., Baudo, R., Bay, S.M., Di Toro, D.M., Hyland, J.L., Ingersoll, C.G., Landrum, P.F., Long, E.R., Meador, J.P., Moore, D.W., O'Connor, T.P., Shine, J.P. 2005. Predictive ability of sediment quality guidelines. Use of Sediment Quality Guidelines and Related Tools for the Assessment of Contaminated Sediments, pp. 121-161.
- Zakaria M.P., Takada H., Tsutsumi S., Ohno K., Yamada J., Kouno E., Kumata H. 2002. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Rivers and Estuaries in Malaysia: A Widespread Input of Petrogenic PAHs. *Environmental Science and Technology*, 36: 1907-1918.
- Zhang, J., Wu, C., Pellegrini, D., Romano, G., Esposito, F., Ianora, A., Buttino, I. 2013. Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apoptosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture*, 400-401: 65-72.
- Zhang, W., Zhang, S., Wan, C., Yue, D., Ye, Y., Wang, X. 2008. Source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban road runoff, dust, rain and canopy throughfall. *Environmental Pollution*, 153: 594-601.