

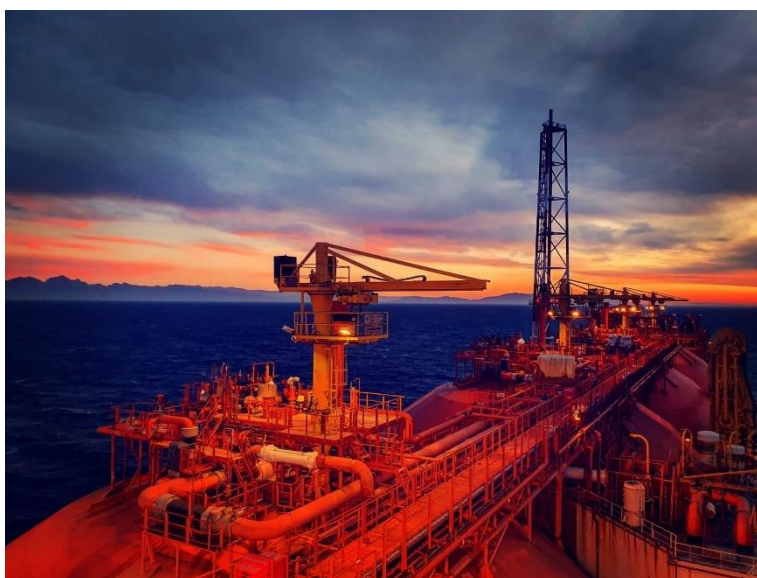


**OLT Offshore LNG Toscana S.p.A.**



**TERMINALE GALLEGGIANTE DI  
RIGASSIFICAZIONE  
FSRU - TOSCANA**

**Piano di monitoraggio dell'ambiente marino  
(colonna d'acqua, sedimenti, biota e indagini generali)  
Revisione 2**



Rev. 2.1	11/09/2023	Emissione	AMDB	GBP	CP
Rev.2	17/04/2023	Emissione	AMDB	GBP	CP
Rev.	Data	Descrizione della Revisione	Preparato da	Verificato da	Approvato da



## INDICE

<b>1</b>	<b>PREMESSA .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>IL PIANO DI MONITORAGGIO.....</b>	<b>3</b>
2.1	Piano generale dell'opera .....	3
2.2	Colonna d'acqua .....	10
2.2.1	<i>Misure idrologiche e prelievi di campioni di acqua .....</i>	<i>11</i>
2.2.1.1	Profili idrologici e misure di irradianza spettrale e PAR .....	11
2.2.1.2	Analisi fisico-chimiche e biologiche .....	11
2.2.2	<i>Indagini sul fitoplancton e zooplancton .....</i>	<i>12</i>
2.2.2.1	Fitoplancton .....	12
2.2.2.2	Zooplancton .....	13
2.2.2.2.1	Analisi dell'oloplancton .....	13
2.2.2.2.2	Analisi del meroplancton e ittioplancton.....	14
2.2.3	<i>Saggi ecotossicologici .....</i>	<i>14</i>
2.3	Sedimenti .....	15
2.3.1	<i>Caratteristiche fisiche e chimiche dei sedimenti.....</i>	<i>16</i>
2.3.2	<i>Saggi ecotossicologici .....</i>	<i>17</i>
2.3.2.1	<i>Elaborazione dai per la definizione della classe di qualità dei sedimenti</i>	<i>18</i>
2.4	Comunità bentoniche di fondo mobile .....	19
2.4.1	<i>Il Macrozoobenthos.....</i>	<i>19</i>
2.4.2	<i>Il Meiobenthos.....</i>	<i>21</i>
2.5	Biota - <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	22
2.5.1	<i>Bioaccumulo.....</i>	<i>23</i>
2.5.2	<i>Biomarkers .....</i>	<i>24</i>
2.6	Biota - Fauna ittica .....	26
2.6.1	<i>Fauna ittica bentonectonica.....</i>	<i>27</i>
2.7	Indagini geofisiche .....	28
2.8	Correntometria.....	29
2.9	Archiviazione Dati.....	29
<b>3</b>	<b>RESTITUZIONE DEI RISULTATI DEL PIANO DI MONITORAGGIO .....</b>	<b>30</b>

## ALLEGATI

ALLEGATO 1 – Elenco degli analiti, metodi di analisi e strumentazione utilizzata



## **1 PREMESSA**

Il presente documento costituisce il Piano di monitoraggio Marino (denominato di seguito Piano Rev.2) relativo a colonna d'acqua, Sedimenti, Biota e indagini generali.

La componente del biota (cetacei e Tartarughe marine) viene trattata in un documento separato.

## **2 IL PIANO DI MONITORAGGIO**

### **2.1 Piano generale dell'opera**

I dati ad oggi acquisiti, riguardano un arco temporale molto ampio e permettono di escludere che eventuali effetti legati alla presenza ed all'esercizio del Terminale possano dipendere dalla stagione, ossia che possano essere ridotti o amplificati a seconda del periodo stagionale. Si ribadisce quindi l'adeguatezza di un piano di monitoraggio su base annuale, come approvato dall'autorità attraverso la modifica della prescrizione 7 (Parere n. 126 del 2-3-2023 del MASE), utile per seguire i trend temporali della maggior parte delle matrici indagate. Le indagini saranno replicate anche un anno dopo la dismissione del Terminale. **Tuttavia, per alcune componenti ambientali biotiche marine a forte carattere stagionale, quali plancton (fitoplancton, zooplancton ossia olo-mero e ittioplancton), mitili (bioaccumulo e biomarkers), fauna ittica bentonectonica, si prevede di mantenere una frequenza di monitoraggio semestrale (inverno ed estate).**

Per quanto riguarda le singole attività si vedano le successive tabelle 2.1, 2.2 e 2.3.

Nel presente Piano Rev. 2, analogamente al Piano Rev. 1<sup>1</sup> rimasto sostanzialmente inalterato riguardo alle componenti indagate, sono stati presi in considerazione i seguenti comparti: colonna d'acqua, sedimenti e biota.

Il Piano Rev. 2 (analogamente al precedente Piano Rev.0 e Rev. 1) prevede anche di replicare l'indagine batimorfologica dopo 10 anni di esercizio e dopo un anno dal termine delle attività del Terminale.

---

<sup>1</sup> Si evidenzia che il Piano Rev. 1, allegato alla domanda di modifica della prescrizione n. 7 (modifica approvata con Parere n. 126 del 2-3-2023 del MASE) non è stato ancora attuato e si ritiene sostituito dal presente Piano Rev. 2.

Per quanto concerne metodologia e strumentazione si rimanda all'allegato 1.

**Tabella 2.1:** Elenco delle indagini suddivise per comparto ambientale ed indagini generali.

Colonna d'acqua	<b>Caratteristiche chimico-fisiche</b>
	<b>Profili idrologici</b>
	<b>Plancton (fitoplancton, zooplancton)</b>
	<b>Saggi ecotossicologici</b>
Sedimenti	<b>Caratteristiche chimico-fisiche</b>
	<b>Saggi ecotossicologici</b>
Biota	<b>Macrozoobenthos</b>
	<b>Meiozoobenthos</b>
	<b>Bioaccumulo (Mitili)</b>
	<b>Biomarkers (Mitili)</b>
	<b>Fauna ittica Bentonectonica</b>
	<b>Cetacei e tartarughe marine *</b>
Indagini generali	<b>Batimetria – Morfologia (cadenza decennale)</b>

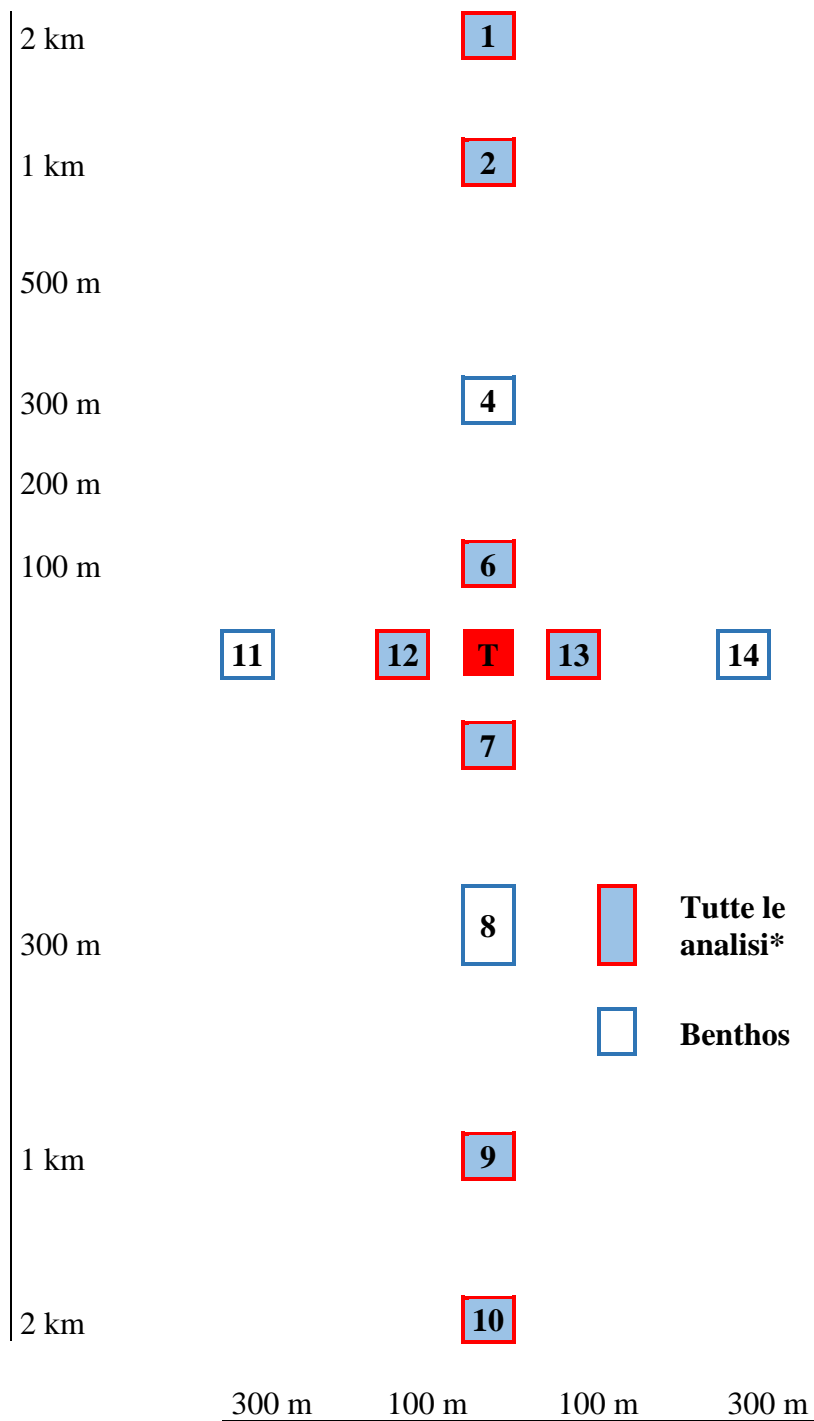
\*monitoraggio analizzato in un documento separato

**Tabella 2.2:** Dettaglio delle indagini relative alla colonna d'acqua ed ai sedimenti.

	Fasi di indagine	Piano Rev. 2 di Monitoraggio		
		Analisi	Esercizio	Post-esercizio (1 anno)
Colonna d'acqua	Caratteristiche chimico-fisiche	Microbiologia	<b>1 quota</b> (0,5 m) <b>1 Campagna l'anno</b> <b>4 stazioni + 4 controlli</b>	<b>1 quota</b> (0,5 m) <b>1 Campagna</b> <b>4 stazioni + 4 controlli</b>
		solidi sospesi sostanza organica disciolta cromoforica (CDOM), sostanza organica del particolato (POM), TOC (sul tal quale e sul filtrato) clorofilla <i>a</i> , nutrienti, d. pigmentaria <sup>(1)</sup>  idrocarburi totali, tensioattivi cloroderivati,	<b>4 quote</b> (0,5m, 12,5m, 50m, > 50m) <b>4stazioni + 4 controlli</b>  <b>1 Campagna l'anno</b>	<b>4 quote</b> (0,5m, 12,5m, 50m, > 50m)  <b>4 stazioni + 4 controlli</b>  <b>1 Campagna</b>
	Profili idrologici	temperatura, conducibilità, pH, fluorescenza della clorofilla <i>a</i> , torbidità, ossigeno disciolto, potenziale di ossidoriduzione	<b>tutte le stazioni (8 stazioni)</b>  <b>2 Campagne l'anno</b>	<b>tutte le stazioni (8 stazioni)</b>  <b>2 Campagne</b>
		irradianza, irradianza spettrale	<b>2 stazioni + 2 controlli</b>  <b>1 Campagna l'anno</b>	<b>2 stazioni + 2 controlli</b>  <b>1 Campagna</b>
	Fitoplancton	Analisi quali quantitative	<b>4 quote</b> (0,5m, 12,5m, 50m, >50m) campioni + <b>1 quota</b> prelievi con retino (da -50m alla superficie)  <b>4 stazioni + 4 controlli</b>  <b>2 Campagne l'anno</b>	<b>4 quote</b> (0,5m, 12,5m, 50m, >50m) campioni + <b>1 quota</b> prelievi con retino (da -50m alla superficie)  <b>4 stazioni + 4 controlli</b>  <b>2 Campagne</b>
	Oloplancton	Biomassa plancton, biodiversità popolamento a copepodi	<b>2 quote</b> prelievi con retino (da -50m alla superficie, dal fondo a -50m) <b>1 quota (-0,5m)</b> per campionamento orizzontale (15 minuti) <b>4 stazioni + 4 controlli</b>  <b>2 Campagne l'anno</b>	<b>2 quote</b> prelievi con retino (da -50m alla superficie, dal fondo a -50m) <b>1 quota (-0,5m)</b> per campionamento orizzontale (15 minuti) <b>4 stazioni + 4 controlli</b>  <b>2 Campagne</b>
	Meroplancton	Analisi quali-quantitativa del popolamento meroplanctonico	<b>2 quote</b> prelievi con retino e replica (da -50 m alla superficie, dal fondo a -50 m) <b>1 quota (-0,5m)</b> per campionamento orizzontale (15 minuti) e replica <b>4 stazioni + 4 controlli</b>  <b>2 Campagne l'anno</b>	<b>2 quote</b> prelievi con retino e replica (da -50 m alla superficie, dal fondo a -50 m) <b>1 quota (-0,5m)</b> per campionamento orizzontale (15 minuti) e replica <b>4 stazioni + 4 controlli</b>  <b>2 Campagne</b>
Ittioplancton	Analisi quali-quantitativa del popolamento ittioplanctonico	<b>2 quote</b> prelievi con retino e replica (da -50 m alla superficie, dal fondo a -50 m) <b>1 quota (-0,5m)</b> per campionamento orizzontale (15 minuti) e replica <b>4 stazioni + 4 controlli</b> (	<b>2 quote</b> prelievi con retino e replica (da -50 m alla superficie, dal fondo a -50 m) <b>1 quota (-0,5m)</b> per campionamento orizzontale (15 minuti) e replica <b>4 stazioni + 4 controlli</b>	

	Fasi di indagine	Piano Rev. 2 di Monitoraggio		
		Analisi	Esercizio	Post-esercizio (1 anno)
			<b>2 Campagne l'anno</b>	<b>2 Campagne</b>
	<b>Saggi ecotossicologici</b>	<i>V. fischeri</i> <i>P. tricornutum</i> <i>C. gigas</i> <i>A. tonsa</i>	<b>3 quote</b> <b>4 stazioni + 4 controlli</b>  <b>1 Campagna l'anno</b>	<b>3 quote</b> <b>4 stazioni + 4 controlli</b>  <b>1 Campagna</b>
<b>Sedimenti</b>	<b>Caratteristiche chimico-fisiche-microbiologiche</b>	Granulometria Metalli IPA P. cloroderivati C. organostannici TOC Idrocarburi totali (C>12)  Microbiologia <b>Pesticidi organoclorurati<sup>(1)</sup></b> <b>Policlorobifenili<sup>(1)</sup></b> <b>Composti organostannici<sup>(1)</sup></b> <b>Sostanza organica<sup>(1)</sup></b>	<b>4 stazioni</b> (a 100 m dal terminale) + <b>4 controlli</b>  <b>1 Campagna l'anno</b>	<b>4 stazioni</b> (a 100 m dal terminale) + <b>4 controlli</b>  <b>1 Campagna</b>
	<b>Saggi ecotossicologici</b>	<i>V. fischeri</i> (fase liquida) <i>C. orientale</i> (10 gg) <sup>(1)</sup> <i>C. gigas</i> (embriotossicità) <sup>(2)</sup>	<b>4 stazioni</b> (a 100 m dal terminale) + <b>4 controlli</b>  <b>1 Campagna l'anno</b>	<b>1 campagna</b> <b>4 stazioni</b> (a 100 m dal terminale) + <b>4 controlli</b>  <b>1 Campagna</b>

- (1) **Adeguamento analisi secondo DM 173-2016.**  
(2) **Potrà essere sostituito con test equivalente con *P. lividus***



**Figura 2.1:** Schema riassuntivo delle attività di campionamento da svolgersi nelle 12 stazioni (MG1, MG2, MG4, MG6, MG7, MG8, MG9, MG10, MG11, MG12, MG13, MG14).

T = Terminale; n = MGn (Stazioni di campionamento)

\*Quadretto blu bordato rosso: tutte le analisi tranne irradianza spettrale, prevista solo in MG6, MG7, MG1, MG10 (si veda tabella)



**OLT OFFSHORE LNG TOSCANA**  
PROJECT: Piano di monitoraggio dell'ambiente marino  
Revisione 2



Indagine		Stazioni di campionamento*	Note: differenze tra il Piano Rev. 0 e Rev. 2 del 2023	Frequenza
Colonna d'acqua	Caratteristiche fisico-chimiche	MG6, MG7, MG12, MG13, MG1, MG2, MG9, MG10	MG5 e MG3, sostituite da MG1, MG2	Annuale
	Irradianza spettrale	MG6, MG7, MG1, MG10	Ridotte (eliminate MG3, MG5, MG9, MG12, MG13)	Annuale
	Profili idrologici	MG6, MG7, MG12, MG13, MG1, MG2, MG9, MG10	Ridotte	Semestrale
	Plancton	MG6, MG7, MG12, MG13, MG1, MG2, MG9, MG10	Aggiunte MG9, MG1, MG2	Semestrale
	Saggi ecotossicologici	MG6, MG7, MG12, MG13, MG1, MG2, MG9, MG10	MG5 e MG3, sostituite da MG1, MG2	Annuale
Biota	Benthos	MG6, MG7, MG12, MG13, MG1, MG2, MG9, MG10; MG4, MG8, MG11, MG14	Nessuna variazione	Annuale
Sedimenti	Analisi fisiche e chimiche	MG6, MG7, MG12, MG13, MG1, MG2, MG9, MG10	Aggiunte MG1, MG2	Annuale
	Analisi ecotossicologiche	MG6, MG7, MG12, MG13, MG1, MG2, MG9, MG10	Aggiunte MG1, MG2	Annuale

\*le stazioni MG1, MG2, MG9 e MG10 rappresentano i controlli



**Tabella 2.3:** Dettaglio delle indagini relative al comparto biotico e delle indagini generali.

	Fasi di indagine	Piano Rev. 2 di Monitoraggio		
		Analisi	Esercizio	Post-esercizio (1 anno)
<b>Biota</b>	<b>Macrozoobenthos</b>	Analisi quali-quantitativa del popolamento analisi tassonomica, matrici di abbondanza, elaborazione dei dati	<b>12 stazioni di cui 4 controlli (4 repliche)</b>  <b>1 Campagna</b>	<b>12 stazioni di cui 4 controlli (4 repliche)</b>  <b>1 Campagna</b>
	<b>Meiozoobenthos</b>	Analisi quali-quantitativa del popolamento analisi tassonomica, matrici di abbondanza, elaborazione dei dati	<b>12 stazioni di cui 4 controlli (4 repliche)</b>  <b>1 Campagna l'anno</b>	<b>12 stazioni di cui 4 controlli (4 repliche)</b>  <b>1 Campagna</b>
	<b>Bioaccumulo</b>	Metalli ed elementi in tracce, Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), Parametri cloroderivati, Composti organostannici, Idrocarburi totali, Microbiologia	<b>4 stazioni + 1 controllo</b>  <b>2 Campagne l'anno</b>	-
	<b>Biomarkers</b>	Alterazione strutturale e funzionale della membrana lisosomale, Comet Test, Istologia delle branchie	<b>4 stazioni + 1 controllo</b>  <b>2 Campagne l'anno</b>	-
	<b>Fauna ittica bentonectonica – Reti da Posta</b>	Analisi quali-quantitativa del popolamento	<b>Reti da posta</b> 4 pescate in 1 area in prossimità del terminale, 1 pescata di controllo al limite interno della zona di interdizione alla pesca (4 miglia), da ripetersi in 2 giorni per un totale di 10 pescate  <b>2 Campagne l'anno</b>	<b>Reti da posta</b> 4 pescate in un'area in prossimità del terminale, 1 pescata di controllo al limite interno della zona di interdizione alla pesca (4 miglia), da ripetersi in 2 giorni per un totale di 10 pescate  <b>2 Campagne</b>
	<b>Fauna ittica bentonectonica – Reti a traino di fondo</b>	Analisi quali-quantitativa del popolamento	<b>Reti a traino di fondo</b> 4 pescate in 1 area in prossimità del Terminale, 2 pescate di controllo al limite interno della zona di interdizione alla pesca (4 miglia)  <b>2 Campagne l'anno</b>	<b>Reti a traino di fondo</b> 4 pescate in 1 area in prossimità del Terminale, 2 pescate di controllo al limite interno della zona di interdizione alla pesca (4 miglia)  <b>2 Campagne</b>
<b>Indagini generali</b>	<b>Batimetria- Morfologia</b>	Rilievi tramite side scan sonar a multibeam	<b>1 Rilievo da svolgersi dopo 10 anni di attività del terminale (2024)</b>	<b>1 Rilievo</b>
	<b>Correntometria</b>	Rilievi tramite Profilatore Acustico (ADCP) e sonda multiparametrica CTD	<b>Rilievo in continuo per periodi prolungati in modo da intercettare la stagione estiva ed invernale della durata di 2 anni</b>	-

## 2.2 Colonna d'acqua

Nonostante la colonna d'acqua sia un comparto poco conservativo, essa riveste una notevole importanza nei programmi di monitoraggio ambientali in quanto può veicolare i contaminanti, anche attraverso il particolato in sospensione. Risulta fondamentale investigare tale matrice, soprattutto in presenza di scarichi a mare, poiché i processi che subiscono gli effluenti sversati dipendono anche dalle caratteristiche fisiche e chimiche del corpo ricevente.

Nel monitoraggio in **Fase di esercizio** del rigassificatore, così come previsto dalle prescrizioni autorizzative, viene considerato l'effetto che avranno gli scarichi in mare, tra cui lo scarico delle acque prodotte nel processo di rigassificazione. Il piano di campionamento prevede di indagare stazioni vicine all'FSRU e stazioni posizionate ad una distanza dal Terminale tale da non essere influenzate dagli scarichi.

Lo schema riassuntivo delle indagini relative alla colonna d'acqua è riportato nella tabella 2.2 e nella Figura 2.1.

## 2.2.1 Misure idrologiche e prelievi di campioni di acqua

### 2.2.1.1 Profili idrologici e misure di irradianza spettrale e PAR

I profili idrologici saranno effettuati mediante l'utilizzo di una sonda multiparametrica che acquisisce dati in continuo lungo la colonna d'acqua, man mano che viene calata dalla superficie verso il fondo. In particolare, si prevede di misurare i seguenti parametri: *temperatura, conducibilità, pH, fluorescenza della clorofilla a, torbidità, ossigeno disciolto, potenziale di ossidoriduzione.*

Inoltre, tramite spettrometro, verrà misurata l'*irradianza spettrale* e contemporaneamente verranno effettuate misure di *irradianza PAR* (Photosynthetically Available Radiation).

I **profili CTD** verranno effettuati in corrispondenza di **8 stazioni**, coincidenti con quelle di prelievo dei campioni di acqua per le analisi fisico-chimiche e lo studio del popolamento planctonico.

Le misure di irradianza e PAR verranno effettuate in corrispondenza di **4 stazioni di cui 2 di controllo.**

### 2.2.1.2 Analisi fisico-chimiche e biologiche

Si prevede il prelievo di campioni di acqua, a quattro profondità (0,5 m, 12,5 m, 50 m, 70m), attraverso l'impiego di bottiglie Niskin, per le analisi di *solidi sospesi, sostanza organica particellata (POM), sostanza organica disciolta cromoforica (CDOM), TOC (sia sul totale sia sul filtrato) clorofilla a, nutrienti, diversità pigmentaria, idrocarburi totali, tensioattivi, composti Cloroderivati quali Alometani, Acidi Aloacetici, Aloacetoni e Alofenoli* (l'elenco degli analiti è riportato in Allegato 1).

*L'analisi microbiologia (coliformi totali e fecali e streptococchi fecali, sarà limitata al livello superficiale).*

Le indagini saranno eseguite su un totale di **8 stazioni**: 4 stazioni saranno ubicate a 100 m dal Terminale nelle quattro direzioni cardinali.

## 2.2.2 Indagini sul fitoplancton e zooplancton

La comunità planctonica può fornire risposte non immediate, ma graduali nel tempo, consentendo di valutare le conseguenze a lungo termine sui livelli superiori della rete trofica pelagica del bacino interessato.

Le acque prelevate dal Terminale per il processo di rigassificazione e per le attività connesse, sono sottoposte a clorazione e subiscono variazioni di temperatura e di pressione nel percorso all'interno dell'impianto con la conseguente eliminazione degli organismi che vi transitano.

Verranno, pertanto, valutati sia a breve sia a lungo termine gli eventuali effetti sulla comunità planctonica, in termini di diversità, funzionalità produttiva e riproduttiva connessi alla emissione di acqua in mare che, dopo il processo di vaporizzazione del gas, contiene cloro residuo seppure con una concentrazione sensibilmente inferiore ai limiti normativi.

Eventuali effetti potrebbero anche essere connessi con l'immissione in mare di acqua più fredda che in relazione alla profondità di scarico e alla circolazione locale prevalente, può influire sulle condizioni di mescolamento, con un eventuale scambio tra masse d'acqua diversamente ricche dal punto di vista trofico. Tale mescolamento potrebbe incidere sulla componente planctonica in termini di produttività, di biomassa disponibile e di biodiversità.

### 2.2.2.1 Fitoplancton

Per lo studio dei popolamenti nano- e microfitoplanctonici verranno effettuati:

- ✓ **prelievi**, tramite l'impiego di **bottiglie Niskin**, alle quote 0,5 m, 12,5 m, 50 m, 70 m per la raccolta dei campioni necessari alle analisi della comunità fitoplanctonica (densità cellulare, composizione tassonomica);
- ✓ **pescate** tramite **retini** da -50 m alla superficie per la valutazione della diversità delle comunità del micro fitoplancton.

Le misure e le analisi eseguite verranno utilizzate per valutare lo stato di abbondanza della biomassa fitoplanctonica e della diversità dei popolamenti (valutazione della ricchezza specifica e indici di diversità) e lo stato trofico.

I prelievi saranno condotti su un numero di **8 stazioni** (di cui 4 controlli). **4 stazioni** saranno ubicate a 100 m dal Terminale nelle quattro direzioni cardinali.

### 2.2.2.2 Zooplancton

In base al ciclo vitale, gli organismi zooplanctonici vengono divisi in due grandi categorie: l'oloplancton e il meroplancton.

Per oloplancton si intende l'insieme di organismi che trascorrono l'intero ciclo vitale nel comparto pelagico.

Gli organismi meroplanctonici, invece, vivono solo una parte della loro vita allo stadio planctonico, preceduto o sostituito in forma adulta da quello bentonico o nectonico.

#### 2.2.2.2.1 *Analisi dell'oloplancton*

L'oloplancton rappresenta la maggior parte dello zooplancton marino ed in particolare, è dominato dai copepodi, classe di crostacei, che possono costituire fino al 90% dell'intero popolamento zooplanctonico. La maggior parte dei copepodi sono erbivori filtratori che si nutrono di alghe unicellulari (fitoplancton). Essi costituiscono l'anello di congiunzione tra i produttori primari (fitoplancton) ed i carnivori poiché sono attivamente predati da larve di specie ittiche e da piccoli carnivori pelagici (per esempio le sardine). Pertanto, data l'importanza dei copepodi nel comparto trofico marino, è essenziale monitorare l'evoluzione della loro diversità durante la fase di esercizio del Terminale FSRU. Ferme restando le motivazioni riportate per il fitoplancton, altrettanto valide per lo zooplancton, va aggiunto che lo studio dell'impatto dell'impianto sul comparto animale del plancton può fornire indicazioni utili su eventuali variazioni della produttività ittica dell'area in oggetto.

Si prevede quindi lo studio della comunità a copepodi, il principale rappresentante dell'oloplancton in termini di diversità (numero ed abbondanza con livello di riconoscimento fino a ordine o famiglia o genere o specie).

Si prevedono

- **Campionamenti verticali**, mediante retino con maglia da 200  $\mu\text{m}$ , **dal fondo a -50 m e da -50 m alla superficie** (- 1 m).
- **Campionamenti orizzontali** (a - 0,5 m, durata traino 15 minuti) sull'area interessata, mediante retino da 200  $\mu\text{m}$ .

I campioni verranno fissati in Lugol ed analizzati allo stereo microscopio per l'analisi della diversità planctonica. Parte dei campioni verrà utilizzata per la stima della biomassa.

I prelievi saranno condotti su un numero totale di **8 stazioni (di cui 4 controlli)**, selezionate tra le stazioni di campionamento individuate per le analisi fisico-chimiche sulla colonna d'acqua. 4 stazioni saranno ubicate a 100 m dal terminale nelle quattro direzioni cardinali.

#### 2.2.2.2.2 *Analisi del meroplancton e ittioplancton*

In generale, negli ambienti marini costieri le interazioni tra il sistema pelagico e quello bentonico sono molto forti e costituiscono uno dei fattori che determinano la struttura e la produttività di questi ecosistemi. In particolare, le larve planctoniche di invertebrati bentonici in fase adulta e di teleostei (ittioplancton) rappresentano la risorsa principale per la dispersione del benthos e per lo sviluppo del necton. Inoltre le larve planctoniche possono indicare, grazie alla loro presenza quali-quantitativa, lo stato di salute delle comunità di provenienza delle quali, appunto, costituiscono la prima fase di sviluppo. Lo studio, quindi, della biologia e dell'ecologia larvale è di fondamentale importanza per comprendere come le comunità bentoniche ed ittiche persistano e/o si evolvano nel tempo e nello spazio.

Tenendo presente la bassa percentuale di meroplanctonti presenti nel plancton, la loro scarsa dispersione o dispersione a patches, nonché la loro attiva possibilità di spostamento (sia autonoma sia grazie a correnti), si prevede, di valutarne la diversità, tramite:

- **Campionamenti verticali**, mediante retino, **dal fondo a -50 m e da -50 m alla superficie** (- 1 m) e replica;
- **Campionamenti orizzontali** (a – 0,5 m, durata traino 15 minuti) sull'area interessata, mediante retino e replica.

I prelievi saranno condotti su un numero totale di **8 stazioni (di cui 4 controlli)**, selezionate tra le stazioni di campionamento individuate per le analisi fisico-chimiche sulla colonna d'acqua. 4 stazioni saranno ubicate a 100 m dal Terminale nelle quattro direzioni cardinali.

### 2.2.3 **Saggi ecotossicologici**

Il cloro immesso nell'acqua di mare può determinare la produzione di composti, cloroderivati, alogeno-derivati organici (essenzialmente bromurati), come i trialometani (principalmente bromoformio), acidi aloacetici, aloacetoni nitrili ed alofenoli. Si tratta di

composti che presentano una certa tossicità nei confronti degli organismi acquatici, soprattutto nei confronti del fito-zooplankton e dell'ittiofauna, in particolare sulle uova e le larve.

Si prevede di valutare la tossicità attraverso l'esecuzione di una batteria di saggi biologici su organismi appartenenti a differenti livelli della catena trofica:

- ✓ Batteri (*Vibrio fischeri*);
- ✓ Alghe unicellulari (*Phaeodactylum tricorutum*);
- ✓ Molluschi (*Crassostrea gigas*)
- ✓ Crostacei (*Acartia tonsa*)

Tali saggi permettono di fare una valutazione degli effetti causati dagli eventuali prodotti del cloro tenendo conto non solo dei singoli prodotti presenti, ma anche delle possibili interazioni con tutte le altre sostanze (organiche ed inorganiche) disciolte nell'acqua.

Si prevede il prelievo di campioni di acqua a **3 diverse profondità** (0,5m, 12,5m, 50m) in corrispondenza di **8 stazioni** (di cui 2 di controllo).

La valutazione ecotossicologica dei campioni di acqua verrà condotta secondo il seguente schema, utilizzando metodologie standardizzate ed approvate da enti ed agenzie nazionali (ISPRA) ed internazionali (EPA, ISO). Ove possibile, i dati verranno restituiti in termini di concentrazione effettiva al 20% o al 50% (EC20/EC50):

Specie	Endpoint
<i>Vibrio fischeri</i>	Inibizione bioluminescenza
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Inibizione crescita
<i>Crassostrea gigas</i> (o <i>P. lividus</i> )	Embriotossicità
<i>Acartia tonsa</i>	Mortalità

### 2.3 Sedimenti

I sedimenti costituiscono un comparto altamente rappresentativo dello stato di contaminazione dell'ambiente marino e sono in grado di svolgere un'importante azione come veicolo di trasporto diretto di inquinanti e come "link" transitorio e/o definitivo degli stessi. La contaminazione è spesso il risultato dell'affinità di alcuni inquinanti per il particolato e per la componente dei sedimenti a granulometria fine, come limo e argilla.

Quando il sedimento viene rimescolato, la sua componente fine ed il particolato vengono rimessi in sospensione nella colonna d'acqua, le sostanze inquinanti, in precedenza adsorbite, rientrano in "gioco" e possono così ridistribuirsi, a seconda delle condizioni chimiche e fisiche del mezzo. I livelli sedimentari più superficiali sono inoltre sede di un complesso sistema ecologico, quali le comunità bentoniche, fondamentali per caratterizzare le condizioni ambientali di aree costiere e di piattaforma.

Sul comparto sedimenti si prevede l'esecuzione di analisi fisico-chimiche, ed ecotossicologiche (saggi di tossicità).

Si veda la tabella 2.2 e Figura 2.1 per lo schema riassuntivo delle indagini proposte dal presente Piano Rev. 2 sul comparto dei sedimenti, la cui trattazione dettagliata si rimanda ai successivi paragrafi.

### 2.3.1 Caratteristiche fisiche e chimiche dei sedimenti

I parametri presi in considerazione per le analisi sono stati selezionati con riferimento alle normative nazionali (es. D.M. 173/2016) ed internazionali (es. 2000/60/CE, Decisione 2455/2001) per la tutela dell'ambiente acquatico ed in relazione alla possibile formazione di composti cloroderivati derivanti dalla immissione di ipoclorito di sodio nell'impianto.

La lista delle analisi chimico-fisiche e microbiologiche da eseguire sui sedimenti superficiali (livello 0-2 cm) è riportata nella tabella 2.4.

**Tabella 2.4:** Lista delle analisi chimico-fisiche-microbiologiche da eseguire sui sedimenti.

	<b>Parametri</b>	<b>Analiti</b>
<b>Sedimenti – Analisi fisico- chimiche- microbiologiche</b>	<b>Granulometria</b>	-
	<b>Metalli ed elementi in tracce</b>	<i>Alluminio, Arsenico, Bario, Cadmio, Cromo totale, Ferro, Manganese, Mercurio, Nichel, Piombo, Rame, Zinco</i>
	<b>Pesticidi organoclorurati</b>	<i>DM 173-2016</i>
	<b>Policlorobifenili</b>	<i>DM 173-2016</i>
	<b>Composti Organostannici</b>	<i>TBT (tributilstagno), DBT (dibutilstagno), MBT (monobutilstagno)</i>
	<b>Sostanza organica</b>	-
	<b>Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)</b>	<i>DM 173-2016</i>
	<b>Parametri Cloroderivati</b>	<i>Alofenoli, Alometani, Aloacetici, Aloacetoni-trili(*)</i>
	<b>Carbonio organico totale (TOC)</b>	-
	<b>Idrocarburi totali (C&gt;12)</b>	-
	<b>Microbiologia</b>	<i>Coliformi fecali, Coliformi totali, Streptococchi fecali</i>

(\*) L'elenco completo è riportato in allegato.



Si prevede un totale di **8 stazioni (di cui 4 controlli)**. 4 stazioni saranno disposte nelle quattro direzioni cardinali a 100 m dal terminale, le restanti saranno prese ad una distanza tale da non essere influenzate dalle attività di rigassificazione.

Il prelievo del sedimento sarà effettuato mediante benna Van Veen o box corer; in ogni stazione sarà prelevato il livello superficiale (0-2 cm).

I campioni dovranno essere prelevati con una spatola di acciaio, al fine di evitare un'eventuale contaminazione, omogenizzati in opportuni contenitori di porcellana, o acciaio, e conservati in contenitori di plastica a una temperatura di +4°C, per le analisi granulometriche, e in contenitori di polietilene decontaminati a una temperatura di -20°, per le analisi chimiche, secondo quanto riportato in *A.M. Cicero & I. Di Girolamo (eds), Metodologie Analitiche di Riferimento. Programma di Monitoraggio per il controllo dell'Ambiente marino costiero (Triennio 2001-2003)”. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, ICRAM©ICRAM, Roma 2001.*

### 2.3.2 Saggi ecotossicologici

L'utilizzo dei saggi biologici consente di individuare se le sostanze chimiche contenute nei sedimenti sono biodisponibili e se esse possono determinare effetti tossici sul biota.

Si prevede di valutare la tossicità attraverso l'esecuzione di saggi biologici su organismi appartenenti a differenti livelli della catena trofica.

In particolare i saggi biologici sono stati scelti in modo da ottenere una batteria idonea che fornisca dati elaborabili tramite il software SediQualSoft 109.0® utilizzato per la definizione della qualità (pericolo) dei sedimenti marino-salmastri, come meglio descritto nel paragrafo seguente. Il D.M 173 /2016 prevede l'utilizzo di una batteria di minima composta da almeno 3 organismi appartenenti a gruppi tassonomici ben distinti le cui combinazioni devono essere caratterizzate da almeno un saggio su fase solida, almeno un saggio su fase liquida e almeno un saggio che valuti gli effetti cronici e di comprovata sensibilità, sono stati scelti: *Corophium orientale* su fase solida a 10 giorni, *Vibrio fischeri* su fase liquida, *Cassostrea gigas* (embriotossicità).

- ✓ Batteri (*Vibrio fischeri*, fase liquida);
- ✓ Anfipodi (*Corophium orientale*, 10 gg);
- ✓ Molluschi (*Cassostrea gigas*, embriotossicità).

Verranno condotti i test di tossicità a 10 gg con anfipodi (*Corophium orientale*), l'inibizione della bioluminescenza con i microorganismi (*Vibrio fischeri*), e il test di embriotossicità con gli molluschi (*Crassostrea gigas*).

Il test con gli anfipodi di *C. orientale* a 10 giorni su sedimento tal quale è un metodo per la determinazione di tossicità acuta dei sedimenti marini o d'estuario contaminati, fanghi chimici, industriali o comunali, o altre sostanze solide che possono essere combinate con i sedimenti marini o d'estuario, sostanze chimiche o composti inclusi nei sedimenti puliti.

Il sistema Microtox® con il *Vibrio fischeri*, batterio marino Gram-negativo ed eterotrofo, è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di questa specie. Poiché alla presenza di contaminanti l'emissione di luce 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 acuta della sostanza o della matrice testata in rapporto al controllo.

Il test cronico di embriotossicità (inibizione dello sviluppo degli embrioni o uno sviluppo irregolare) verrà condotto con il Mollusco *Crassostra gigas*.

Si prevede un totale di **8 stazioni (di cui 4 controlli)**. 4 stazioni saranno disposte nelle quattro direzioni cardinali a 100 m dal terminale, le restanti saranno prese ad una distanza tale da non essere influenzate dalle attività di rigassificazione.

### **2.3.2.1 Elaborazione dati per la definizione della classe di qualità dei sedimenti**

I dati ottenuti dai test ecotossicologici e dalle analisi chimiche sui sedimenti saranno raccolti in due matrici (stazioni x contaminanti e stazioni x saggi ecotossicologici) e elaborati tramite il software SediQualSoft 109.0® per la definizione della qualità (pericolo) dei sedimenti marino-salmastri (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale).

Attraverso il Sediqualsoft viene valutata la qualità dei materiali applicando i criteri di integrazione ponderata dei dati chimici ed ecotossicologici: la classificazione chimica si basa sull'indice *Hazard Quotient\_chimico* (HQc) che considera la tipologia, il numero e l'entità dei parametri non conformi rispetto ai livelli chimici di riferimento (L1 e L2) riportati nella tab. 2.5 del D.M. 173/2016, mentre la classificazione ecotossicologica si basa su un giudizio

di pericolo ecotossicologico (*Hazard Quotient\_batteria*) che varia da Assente a Molto alto, elaborato dalla integrazione ponderata dei risultati dei saggi biologici impiegati.

La valutazione integrata della classe di qualità dei sedimenti prevede 5 classi di qualità che vanno dalla A alla E, dove la classe A corrisponde ai sedimenti di qualità ambientale più elevata mentre con la E si identifica la classe peggiore.

## **2.4 Comunità bentoniche di fondo mobile**

Il benthos rappresenta uno strumento idoneo per la valutazione di alterazioni ambientali essendo in grado di rispondere significativamente a cambiamenti di origine antropica. Tale capacità è connessa alle caratteristiche degli organismi che lo compongono; essi infatti hanno scarse capacità di movimento e per questo sono in grado di fornire risposte sito-specifiche e di riflettere le condizioni ambientali alle quali sono sottoposti.

Il monitoraggio delle comunità bentoniche nell'ambito del progetto assume un notevole rilievo in quanto lo scarico di acque clorate relativamente fredde o calde derivanti dal Terminale potrebbe determinare cambiamenti nella biomassa e composizione dei popolamenti zooplanctonici, con ripercussioni sulle caratteristiche compositive e strutturali delle comunità zoobentoniche prossime al Terminale. È noto, infatti, che molti organismi bentonici hanno cicli di sviluppo tramite larve planctoniche che solo dopo aver trascorso un periodo (variabile da specie a specie) nella colonna d'acqua si insediano sui sedimenti del fondo dando origine alla fase bentonica.

Lo schema riassuntivo delle indagini previste per lo studio delle comunità bentoniche è riportato in tabella 2.3, mentre per la trattazione dettagliata relativa al macrozoobenthos e al meiozoobenthos si rimanda ai successivi paragrafi.

### **2.4.1 Il Macrozoobenthos**

Per macrofauna si intendono gli organismi con dimensioni maggiori di 0,5 mm o comunque in grado di essere trattenuti da setacci di tali dimensioni. L'uso del macrozoobenthos negli studi di impatto ambientale offre il vantaggio che la letteratura annovera una buona quantità di informazioni sulle caratteristiche ecologiche delle specie che lo costituiscono e sulle loro risposte ai cambiamenti ambientali. Le specie macrozoobentoniche, inoltre, sono

generalmente dotate di una vita media relativamente lunga e pertanto rappresentano una sorta di memoria biologica delle variazioni che avvengono nell'ambiente circostante.

Per l'analisi della comunità macrozoobentonica si prevede il prelievo di campioni in **12 stazioni**. Il campionamento verrà effettuato lungo un transetto passante per il punto di rotazione del Terminale ed orientato secondo la direzione principale della corrente e lungo un transetto ad esso ortogonale. Le **12 stazioni** totali (di cui 4 controlli) saranno disposte, sui due transetti, a distanze progressive dal terminale. Almeno 4 stazioni delle 12 totali saranno ubicate entro una distanza massima dal terminale di 200 m.

In ogni stazione saranno prelevate 4 repliche tramite benna Van Veen (0,1m<sup>2</sup>) per un totale di 48 campioni.

Il sedimento sarà setacciato su maglia 0,5 mm, quindi fissato e conservato in attesa del sorting.

L'identificazione tassonomica verrà condotta al più basso livello possibile. Gli organismi verranno contati per effettuare stime di abbondanza. I dati così ottenuti saranno elaborati tramite analisi multivariata e univariata. Le caratteristiche strutturali del popolamento saranno definite tramite il calcolo dei seguenti parametri: numero di specie, numero di individui, diversità specifica, ricchezza specifica, equitabilità.

Inoltre verranno calcolati gli indici AMBI e M-AMBI (Multivariate Marine Biotic Index che tiene conto anche della diversità di Shannon-Wiener e del numero di specie) per classificare la qualità dell'ambiente tramite i popolamenti presenti.

L'Indice AMBI si basa sulla classificazione delle specie macrobentoniche suddivise in 5 gruppi ecologici (EG) che corrispondono a differenti livelli di sensibilità: dal gruppo I che comprende le specie più sensibili al gruppo V che comprende le specie tolleranti/opportuniste tipiche di ambienti fortemente inquinati. L'indice AMBI è calcolato come:

$$AMBI = [(0*\% EGI)+(1,5*\% EGII)+(3*\% EGIII)+(4,5*\% EGIV)+(6*\% EGV)]/100$$

Il valore ecologico (EG) dei taxa bentonici è riportato nella libreria di AMBI. Se ad alcune specie non viene assegnato un valore ecologico, in quanto la specie non è presente nella libreria di AMBI, la veridicità del risultato può essere compromessa. Tale situazione si presenta se: a) la percentuale di non assegnati >20%, b) i taxa non appartenenti ad alcun gruppo presentano un elevato numero di individui. Come riportato dagli autori, AMBI

sembra perdere efficacia quando il numero di taxa è ridotto (1-3), il numero di individui è esiguo, o in caso di naturale arricchimento organico, situazione tipica degli ambienti di transizione.

#### 2.4.2 Il Meiobenthos

Per meiofauna s'intende l'insieme degli invertebrati microscopici, non sedentari, che vivono sul fondo dei corpi d'acqua o che al fondo di questi sono legati da esigenze alimentari. Operativamente, fanno parte della meiofauna gli organismi bentonici, specie fitali incluse, che nel processo di setacciatura passano attraverso maglie di 1-0,5 mm e vengono invece trattenuti su maglie di 0,063-0,045 mm. Gli organismi che la compongono hanno cicli vitali molto brevi, e quindi le comunità hanno rapido ricambio con conseguenti elevati valori di produzione secondaria.

Studi recenti hanno messo in evidenza come la meiofauna occupi un posto di rilievo all'interno delle reti alimentari sia come risorsa alimentare per i predatori (stadi larvali e giovanili di pesci e specie macrofaunali) sia perché nutrendosi principalmente di microalghe e batteri, influenza i processi di redistribuzione e mineralizzazione della sostanza organica ai livelli trofici più bassi. I predatori meiobentonici, inoltre, nutrendosi anche di forme larvali e giovanili della macrofauna possono influenzare la composizione e la struttura della comunità macrobentonica adulta.

Inoltre, è stato appurato che le comunità animali del meiobenthos reagiscano molto rapidamente a diversi tipi di perturbazioni dell'ambiente tra cui, ad esempio, quelli derivanti dall'introduzione di agenti inquinanti, con conseguenti ripercussioni negative che si riflettono sullo stato dell'intero ecosistema.

È proprio partendo da queste due ultime considerazioni, ruolo nelle catene alimentari e risposta agli stress ambientali, che si è pensato negli ultimi anni all'utilizzo applicativo della meiofauna, particolarmente nel settore del monitoraggio ambientale, come indicatore biologico della qualità degli ambienti acquatici.

Per l'analisi della comunità meiozoobentonica si prevede il prelievo di campioni in **12 stazioni** (di cui 4 controlli), secondo il medesimo schema del macrozoobenthos; almeno 4 stazioni saranno ubicate entro una distanza massima dal Terminale di 200 m.

In ogni stazione saranno prelevate, con box-corer o con benna Van Veen, 4 repliche per un

totale di 48 campioni; da ciascuno dei 48 campioni saranno ottenute due carote inserendo manualmente nel sedimento un carotatore cilindrico di Plexiglas di 2,75 cm di diametro al fine di ottenere carote di sedimento di 3 cm di altezza e anche una parte (circa 1-2 cm) della colonna d'acqua sovrastante il sedimento stesso. Subito dopo il prelievo le carote di sedimento verranno trasferite in appositi barattoli, e la fauna sarà dapprima narcotizzata con una soluzione di Cloruro di Magnesio ( $MgCl_2$ ) al 7% e successivamente fissata e conservata in attesa delle successive analisi. In laboratorio a ciascun barattolo verrà aggiunto del Rosa Bengala, che consente una più rapida individuazione degli animali durante la successiva fase di conteggio e smistamento.

La separazione degli animali dal sedimento, o estrazione, sarà effettuata secondo il metodo della centrifugazione in gradiente di Ludox AM-30, preceduto dalla vagliatura di ciascun campione mediante due setacci con maglie rispettivamente di 0,5 mm e 0,063 mm. Dopo l'estrazione, gli organismi di ciascun campione saranno trasferiti in capsule dal fondo retinato, e successivamente, identificati per gruppo tassonomico di appartenenza (ordine-phylum) e contati.

I dati faunistici raccolti saranno utilizzati per creare una matrice totale delle abbondanze da utilizzarsi come base nelle successive analisi statistiche univariate e multivariate. Per le analisi univariate saranno calcolati i principali indici ecologici: numero di taxa rinvenuti (S), abbondanza (N), diversità di Shannon-Wiener ( $H'$ ), equitabilità di Pielou ( $J'$ ), mentre per le analisi multivariate, le matrici di similarità di Bray-Curtis, derivate dai dati di abbondanza, verranno sottoposte a Cluster Analysis e MultiDimensionalScaling (MDS).

## **2.5 Biota - *Mytilus galloprovincialis***

Si prevedono analisi di bioaccumulo e lo studio dei biomarkers su organismi traslocati presso il Terminale di rigassificazione.

Constatata l'assenza di mitili insediati naturalmente sulle strutture del Terminale, il monitoraggio è stato avviato, dal terzo anno di monitoraggio, con la modalità definita "attiva": i mitili vengono prelevati dall'impianto di acquicoltura presente nell'area marina antistante Isola di Palmaria (Golfo di La Spezia) poco o affatto influenzata da fonti di impatto. I mitili vengono quindi collocati in 4 stazioni di monitoraggio (A, B, C e D) scelti



lungo il Terminale e in una stazione di controllo situata presso l'Area Marina Protetta delle Secche della Meloria. Durante questa fase di esposizione i mitili vengono alloggiati in reticelle di nylon e collocati all'interno di una gabbia di acciaio inox alla profondità di 12 metri. Dopo circa 4 settimane i mitili vengono prelevati e sottoposti ad analisi. Inoltre, all'atto della traslocazione, un campione di mitili appena prelevato dall'impianto di acquicoltura (denominato Tempo 0) viene sottoposto alle medesime indagini.

Il biomonitoraggio, utilizzando specie indicatrici della qualità dell'ecosistema marino, consente di valutare il grado di contaminazione dell'area con una misura "integrata nel tempo" e non riferibile, quindi, al solo momento in cui è stato effettuato il prelievo; di evidenziare facilmente gradienti di inquinamento sia in senso spaziale sia temporale, nonché di effettuare confronti tra aree geograficamente distanti; infine, di stimare la "biodisponibilità" delle sostanze tossiche presenti nell'ambiente marino e valutare il rischio legato al trasferimento di questi elementi attraverso le catene alimentari.

L'impiego di *Mytilus galloprovincialis* come organismo bioindicatore per la valutazione della qualità degli ambienti costieri è, da decenni, praticato negli Stati Uniti ed in numerosi Paesi Europei, compresa l'Italia.

Si prevedono quindi **quattro siti di trapianto** dislocati lungo la murata in direzione prua-poppa (port side) e un **bianco spaziale (controllo)** posizionato prese le Secche della Meloria. I mitili trapiantati verranno utilizzati per analisi di bioaccumulo (paragrafo 4.5.1) e per lo studio dei biomarkers (paragrafo 4.5.2).

### 2.5.1 Bioaccumulo

Verranno ricercati i seguenti contaminanti (tabelle 4.5): metalli in tracce, idrocarburi totali, IPA, composti organostannici e composti cloroderivati (elenco completo in appendice). Sono inoltre previste analisi microbiologiche, al fine di monitorare anche eventuali alterazioni riconducibili allo scarico di reflui civili.

**Tabella 2.5:** Lista delle analisi chimiche e microbiologiche da eseguire sui campioni di *Mytilus galloprovincialis*.



	Parametri	Analiti
<b>Mytilus galloprovincialis – Analisi chimiche e microbiologiche</b>	<b>Metalli ed elementi in tracce</b>	<i>Arsenico, Bario, Cadmio, Cromo totale, Ferro, Manganese, Mercurio, Nichel, Piombo, Rame, Zinco</i>
	<b>Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)</b>	<i>Naftalene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benz(a)antracene, Crisene, Benz(b)fluorantene, Benz(k)fluorantene, Benz(a)pirene, Dibenzo(a,h)antracene, Benzo(g,h,i)perilene, Indeno(1,2,3,c,d)pirene</i>
	<b>Parametri cloroderivati</b>	<i>Alofenoli, Alometani, Aloacetici, Aloacetoni-trili (*)</i>
	<b>Composti Organostannici</b>	<i>TBT (tributilstagno), DBT (dibutilstagno), MBT (monobutilstagno)</i>
	<b>Idrocarburi totali</b>	-
	<b>Microbiologia</b>	<i>Coliformi fecali, Coliformi totali, Streptococchi fecali</i>

(\*) Elenco completo in allegato 1

Nello specifico per la stima del bioaccumulo in ciascun sito verrà trapiantato un numero di individui compresi tra 200 e 300, di taglia approssimativamente tra il 70 e il 90% delle dimensioni massime della popolazione da cui sono raccolti; il periodo di esposizione, che garantisce il raggiungimento delle condizioni di equilibrio, sarà di circa 3/4 settimane al termine del quale gli organismi verranno recuperati, immediatamente dissezionati (almeno 30 organismi, per tipologia di analisi, suddivisi in 3 pool ciascuno costituito dalle intere parti molli di 6-10 animali e conservati a una temperatura di -20° fino al momento dell'analisi.

### 2.5.2 Biomarkers

Un aspetto di fondamentale importanza nell'utilizzo degli organismi marini come indicatori della contaminazione chimica deriva dalla possibilità di integrare i risultati del bioaccumulo con la valutazione dei primi effetti biologici (biomarkers) che sostanze xenobiotiche inducono a livello molecolare e cellulare. L'utilità di questo approccio è ampiamente riconosciuta per stimare l'impatto causato da attività antropiche; infatti, la presenza contemporanea e l'interazione tra classi diverse di agenti chimici può aumentarne il potenziale tossicologico ed anche l'effetto di fattori ambientali o biologici e rendere difficoltoso riassumere i dati chimici in una stima complessiva del rischio biologico.

Nell'ambito del programma di monitoraggio, le analisi dei biomarkers verranno effettuate parallelamente alle indagini di bioaccumulo riportate nel paragrafo precedente (vedi par. 2.5.1).





Si prevede l'utilizzo di una batteria di biomarkers di effetto, in grado di valutare lo stato di salute dell'organismo sentinella, non finalizzati ad evidenziare la presenza di una specifica classe di sostanze ma sensibili all'instaurarsi di condizioni di stress ossidativo quale potrebbe derivare dalla presenza residua di sostanze fortemente ossidanti nell'ambiente circostante il terminale (in particolare l'ipoclorito di sodio) e/o da altre forme di disturbo associate all'attività complessiva dell'FSRU.

Si eseguiranno le seguenti indagini:

**Neutral Red Retention Time (NRRT)** - Il Neutral Red (NR) è un colorante capace di attraversare le membrane plasmatica e lisosomale. L'efficienza con cui il NR rimane intrappolato nei lisosomi dipende dalla funzionalità della pompa protonica, presente sulla membrana. Alterazioni della membrana lisosomiale viene valutata su emociti di *M. galloprovincialis* prelevati a fresco, mediante la misura del tempo di ritenzione del rosso neutro, effettuata in microscopia ottica per un tempo massimo di 180 minuti. La procedura segue quanto riportato nei protocolli ICES techniques in marine environmental sciences n°36 (2004).

Per ogni stazione verranno analizzate 7 repliche, ciascuna composta da un pool di 5 individui

**Comet assay** - Valutazione del danno genotossico mediante il Comet assay su cellule branchiali e/o emolinfatice. Sarà effettuata la versione alcalina, secondo le tecniche standard (Nigro et al., 2006; Frenzilli et al., 2008; Frenzilli et al., 2009). Per ogni stazione verranno analizzate 7 repliche, ciascuna composta da un pool di 5 individui.

**Analisi istologica dell'apparato branchiale** – Riguarda l'alterazione strutturale delle branchie. Valutazione istologica dell'integrità dell'apparato branchiale. Per ogni stazione verranno analizzati n.5 individui.

**Quantificazione dei Micronuclei (MN)** - I micronuclei sono frammenti di materiale nucleare che si presentano adiacenti al nucleo cellulare e che originano dal verificarsi di danneggiamenti al materiale genetico (rotture cromosomiche o disfunzioni a livello del fuso mitotico). La quantificazione della percentuale di micronuclei si basa sul protocollo riportato in UNEP/MED WG.509/43 Annex III Appendix 24 par. 2.2. In breve, per ogni individuo si allestisce un vetrino con uno striscio di emolinfa che, successivamente, verrà colorato con colorante GIEMSA e letto in microscopia ottica riportando il risultato come % MN.



**Test SOS** - Il test Stress on Stress (SOS) valuta la capacità di sopravvivenza di individui di *M. galloprovincialis* a seguito di stress indotto (esposizione all'aria). Tale capacità viene valutata come Lethal Time (LT), esponendo in incubatore umido 30-40 individui di *M. galloprovincialis* per stazione di campionamento, fino al momento in cui nessun individuo risulta in grado di serrare le valve. La procedura adottata segue il protocollo riportato in UNEP/MED WG.509/43 Annex III Appendix 24. Il risultato verrà espresso come LT50, ossia il tempo in cui si osserva il 50% della mortalità.

**Attività acetilcolinesterasica (AChE)** - L'acetilcolinesterasi è un enzima che idrolizza il neurotrasmettitore acetilcolina. La sua attività viene determinata secondo il metodo descritto Ellman et al. (1961). Il principio si basa sulla conversione dell'acetilcolina ioduro, substrato d'azione, in tiocolina. Questa reagisce con l'acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) portando alla formazione dell'acido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB). Tale reazione viene misurata in assorbanza per un tempo di 3 minuti. Questo saggio viene ritenuto rilevante per indagini ambientali in quanto evidenzia in modo specifico la presenza di composti organofosforici e carbammati, in grado di inibire l'attività dell'enzima. L'attività verrà valutata su branchie.

Nello specifico per lo studio dei biomarkers, in ciascun sito verrà trapiantato un numero di individui compreso tra 200 e 300, di taglia approssimativamente tra il 70% e il 90% delle dimensioni massime della popolazione da cui sono raccolti; il periodo di esposizione, che garantisce il raggiungimento delle condizioni di equilibrio, sarà di 3-4 settimane al termine del quale gli organismi verranno recuperati, trasportati in laboratorio avvolti in un panno umido e mantenuti a temperatura di 15 ° C.

## **2.6 Biota - Fauna ittica**

Le conoscenze sulla fauna ittica e quelle sull'attività di pesca presente nel sito di studio rappresentano aspetti importanti da tenere in considerazione nella caratterizzazione e nel monitoraggio dell'area interessata. Il Terminale può determinare cambiamenti nell'attività di pesca esercitata nella zona sia sottraendo areali usualmente sfruttati dalle marinerie locali, sia comportando variazioni nella consistenza e tipologia delle risorse ittiche.

L'attività di monitoraggio mira a valutare l'evoluzione di eventuali variazioni a carico delle risorse ittiche e dell'attività di pesca imputabili alla presenza del Terminale.

Lo studio prevede di analizzare fauna ittica bentonectonica tramite reti da posta e reti a traino di fondo.

Per lo schema riassuntivo delle indagini sulla fauna ittica si rimanda alla tabella 2.3 e per i dettagli ai paragrafi successivi.

### 2.6.1 Fauna ittica bentonectonica

La struttura dei popolamenti bentonectonici, sia in termini qualitativi che quantitativi, è strettamente legata alle caratteristiche del fondale, sia per quanto riguarda la composizione granulometrica, sia per quanto concerne la fauna macrobentonica presente, che costituisce un'importante fonte di risorse alimentari per molte specie ittiche. Pertanto, qualsiasi modifica che possa subire il substrato e la fauna associata, produrrà delle ripercussioni, dirette o indirette, anche sul popolamento ittico e sulle risorse sfruttabili dalla pesca. La presenza di strutture sommerse posate sul fondo come quelle previste nell'area del Terminale ha la caratteristica di attrarre e concentrare numerose specie ittiche che qui trovano condizioni trofiche favorevoli e protezione dai predatori.

La fauna ittica bentonectonica verrà indagata tramite campionamenti effettuati con:

- 1) **Reti da posta.** Saranno utilizzate reti da posta (reti a imbocco), usualmente impiegate dalle marinerie artigianali toscane. Le pescate (cale) saranno effettuate in **5 siti** all'interno della zona di interdizione alle attività di pesca (entro 4 miglia di distanza dal Terminale): 4 siti saranno localizzati il più vicino possibile al Terminale (impatto) e 1 sito sarà localizzato vicino al limite della zona di interdizione alla pesca (4 miglia di distanza dal Terminale, controllo). Le 5 pescate verranno ripetute in due giornate di campionamento, per un **totale di 10 pescate complessive**.
- 2) **Reti a traino di fondo.** Sarà effettuato un totale di **6 pescate** (cale, della durata di 30 minuti ciascuna) all'interno dell'area interdetta alla pesca (entro le 4 miglia dal Terminale). Di queste, 4 pescate saranno realizzate in siti più vicini possibile al Terminale (impatto) e 2 pescate saranno realizzate in siti localizzati vicino al limite delle 4 miglia di distanza dal Terminale (controllo).

Per ciascuna pescata (cala) sia con reti da posta che con reti a strascico di fondo, nel report annuale sarà identificata la posizione attraverso la cartografia e sarà caratterizzata la composizione specifica della fauna ittica, sia in termini di densità sia di abbondanza e saranno rilevati dati di taglia su tutte le specie catturate, nonché il peso individuale sulle principali specie commerciali.

## 2.7 Indagini geofisiche

Lo studio delle caratteristiche morfologiche e batimetriche del fondale consente di valutare le possibili variazioni riconducibili al sistema di ancoraggio del Terminale. Si prevede di eseguire le campagne di indagine tramite Side Scan Sonar e Multibeam **dopo 10 anni di esercizio del Terminale (2024)**. Una ulteriore campagna sarà condotta nella fase post-esercizio.

Le indagini geofisiche saranno condotte in un'area di forma quadrata di 1,3 miglia nautiche di lato orientata in direzione N-S, avente al centro il Terminale.

Per il **rilievo morfologico** mediante Side Scan Sonar si utilizzerà un range di acquisizione di 150 m ed un'interlinea di 100 m e un adeguato sistema di posizionamento. Inoltre dovrà essere eseguito un **rilievo batimetrico** mediante Multibeam, tale da garantire un elevato grado di precisione; lo strumento dovrà essere interfacciato con tutta la strumentazione necessaria (girobussola, compensatore di movimento, etc.) e sottoposto alle opportune calibrazioni.

Le indagini verranno condotte lungo rotte rettilinee e parallele tra loro, sufficientemente distanziate per ottenere una adeguata sovrapposizione dei dati rilevati, sia per il Side Scan Sonar che per il Multibeam.

Le restituzioni cartografiche, alla scala di 1:5.000, produrranno un fotomosaico, due carte batimetriche di dettaglio (con intervallo batimetrico di 0,25 m e 0,5 m) e una carta di sovrapposizione dei due rilievi.

## 2.8 Correntometria

Le misure di corrente fino ad oggi effettuate hanno evidenziato una assoluta omogeneità con la fenomenologia attesa, nonché un impatto nullo derivante dalla presenza del Terminale, quindi di fatto nessuna variabilità spaziale del campo di corrente.

Tuttavia, vista la Prescrizione ambientale n. 3 del Parere del MASE n. 335 del 14-11-2022 parte integrante del Decreto VIA n. 450 del 2022 sarà prevista la presenza di un Profilatore ADCP per l'acquisizione delle caratteristiche idrodinamiche dell'intera colonna d'acqua nelle vicinanze dello scarico in mare delle acque derivanti dal processo di rigassificazione.

Il profilatore sarà installato in prossimità del fondo in configurazione “face up” nel raggio massimo di 1 km dal punto di ancoraggio del Terminale posizionato nel miglior punto possibile al fine di intercettare il punto di emissione e comunque ad una distanza di sicurezza dall'area disegnata durante la naturale rotazione del Terminale stesso.

Il monitoraggio sarà effettuato in continuo e per periodi prolungati in modo da intercettare sia la stagione estiva che invernale; ciò permetterà di registrare periodi di attività/non-attività del Terminale, evidenziando eventuali potenziali effetti sul campo di corrente. Il periodo estivo permetterà di effettuare le misure durante un periodo di ridotto mescolamento indotto dalle mareggiate o dalle avverse condizioni meteomarine (rispetto al periodo invernale), per cui gli effetti dello scarico del Terminale, per quanto limitati, saranno più facilmente individuabili.

La cadenza di misura proposta per il profilatore ADCP sarà ripetuta per due anni consecutivi se i risultati confermeranno quanto registrato, seppur con modalità diverse, durante i primi 10 anni di monitoraggio del Terminale.

## 2.9 Archiviazione Dati

I dati ambientali raccolti durante le attività di monitoraggio dell'ambiente marino saranno archiviati annualmente in opportune matrici in formato Excel utili per qualsiasi utilizzo ed elaborazione.

### **3 RESTITUZIONE DEI RISULTATI DEL PIANO DI MONITORAGGIO**

I risultati ottenuti a seguito dell'esecuzione del Piano Rev. 2 saranno elaborati al fine di produrre relazioni tecnico-scientifiche annuali. In ogni relazione verranno riportati il disegno di campionamento, il dettaglio delle indagini eseguite, le metodiche analitiche utilizzate e i dati ambientali rilevati (in forma tabellare/grafica e commentati). In particolare, verrà messo in evidenza il confronto tra i risultati della fase di Bianco (condotta nell'estate 2012) e i risultati ottenuti durante le campagne della fase di esercizio.



***OLT OFFSHORE LNG TOSCANA***  
**PROJECT: Piano di monitoraggio dell'ambiente marino**  
**Revisione 2**



	<h2 style="margin: 0;">OLT Offshore LNG Toscana S.p.A.</h2>
	<h3 style="margin: 0;">TERMINALE GALLEGGIANTE DI RIGASSIFICAZIONE FSRU - TOSCANA</h3>
<p><b>Piano di monitoraggio dell'ambiente marino (colonna d'acqua, sedimenti, biota e indagini generali) Revisione 1</b></p> <p><b>Allegato 1 Elenco analiti, metodi di analisi e strumentazione utilizzata</b></p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div>	

Rev.1	13.09.2023	Emissione definitiva	AMDB	GBP/MO	CP
Rev. 0	26.04.2023	Emissione per commenti	AMDB	GBP/MO	CP
Rev.	Data	Descrizione della Revisione	Preparato da	Verificato da	Approvato da



## SOMMARIO

1	PREMESSA .....	3
2	MATERIALI E METODI .....	3
2.1	COLONNA D'ACQUA.....	3
	Profili idrologici .....	3
	Caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche .....	3
	Plancton .....	4
	Saggi ecotossicologici <i>Allivibrio fischeri</i> (prec. <i>Vibrio fischeri</i> , sistema Microtox®) - fase liquida .....	5
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	5
	<i>Acartia tonsa</i> .....	6
	<i>Cassotrea gigas</i> .....	6
2.2	SEDIMENTI .....	6
	Caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche .....	6
	Analisi granulometriche .....	6
	Analisi chimiche .....	6
	Analisi microbiologiche .....	8
	Saggi ecotossicologici .....	8
	<i>Cassostrea gigas</i> .....	8
	<i>Corophium orientale</i> .....	8
	<i>Allivibrio fischeri</i> (prec. <i>Vibrio fischeri</i> sistema Microtox®) - fase liquida .....	8
2.3	BIOTA .....	9
	Macrozoobenthos .....	9
	Meiobenthos .....	9
	Bioaccumulo .....	9
	Biomarkers .....	11
	Fauna ittica bentonectonica .....	12
3	STRUMENTAZIONE .....	13
3.1	SONDA IDROMARAMBIENTE MODELLO MAR-3.....	13
3.2	SONDA MULTIPARAMETRICA MISURAZIONE PAR.....	13
3.3	SPETTRORADIOMETRO SUBACQUEO .....	14
3.4	HPLC SHIMADZU CLASS VP (ANALISI CLOROFILLA A E DIVERSITÀ PIGMENTARIA) .....	15
3.5	AUTOANALYZER AA4 BRAN+LUEBBE (DETERMINAZIONE DEI NUTRIENTI) .....	16
3.6	ANALISI CHIMICHE .....	17
3.7	STRUMENTAZIONE PER BIOACUSTICA .....	17

## INDICE DELLE TABELLE

<b>Tabella 1</b> - Metodi relativi alle analisi effettuate sui campioni di acqua (caratteristiche fisiche e chimiche) .....	3
<b>Tabella 2</b> - Metodi relativi alla analisi chimiche effettuate sui campioni di sedimento .....	7
<b>Tabella 3</b> - Metodi relativi alla analisi chimiche su <i>M. galloprovincialis</i> .....	10

## 1 PREMESSA

La mole di dati acquisiti negli anni di monitoraggio richiederà di modificare nel tempo anche i metodi di elaborazione. Le *long-term series* infatti richiedono approcci statistici differenti avendo finalità diverse rispetto ai data-set ristretti. Si parla quindi di un'evoluzione dell'approccio utilizzato, che sarà puntualmente descritto nei report annuali di restituzione ed elaborazione dei dati ambientali. Analogamente, anche la strumentazione analitica utilizzata potrà essere rinnovata, e verrà indicato chiaramente nei rapporti annuali.

In questo documento vengono riportati i metodi di analisi dei campioni e la descrizione dei principali strumenti analitici ed apparecchiature utilizzate.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Colonna d'acqua

#### Profili idrologici

I **profili idrologici** verranno eseguiti tramite sonda Idromarambiente modello MAR-3 dotata di sensori specifici per la determinazione dei seguenti parametri: Temperatura, Conducibilità, Ossigeno, pH, Potenziale redox, Torbidità, Fluorescenza.

I profili sottomarini della **Photosynthetic Available Radiation (PAR)** quantica (400-700nm) saranno acquisiti tramite sonda CTD SeaBird Electronics 19V2Plus. Dai profili di PAR viene ricavata la profondità della zona eufotica (Zeu), indice sintetico della trasparenza delle acque, analizzata per i confronti tramite ANOVA (OriginPro 2017).

L'**irradianza spettrale** sottomarina sarà misurata con spettrometro TRIOS Ramses. Dall'irradianza spettrale viene calcolata la riflettanza, utilizzata tramite regressioni in funzione della biomassa fitoplanctonica (Clorofilla a) come indice di eventuale alterazione dello stato delle acque.

#### Caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche

I campioni per la caratterizzazione della colonna d'acqua saranno prelevati tramite bottiglie Niskin.

Per i metodi di analisi si rimanda alla tabella sottostante. I limiti di quantificazione sono da considerarsi indicativi. Potrebbero subire piccole variazioni in relazione a modifiche dei metodi.

Tabella 1 - Metodi relativi alle analisi di campioni di acqua (caratteristiche fisiche e chimiche). Il limite di rilevabilità per i composti organostannici è riferito al catione.			
Prova	Metodo	Unita Misura	Limite Rilevabilità
Nutrienti inorganici			
Nitriti	EPA 354.1	µM	0,03
Nitrati	EPA 354.1	µM	0,03
Silicati	APHA 4500 Si	µM	0,1
Fosfati	UNI ISO SW 15923-1	µM	0,03
Sostanza organica disciolta cromofora (CDOM)	Spettrofotometria	m <sup>-1</sup>	0,04
Sostanza organica del particolato (POM).	Strick-land and Parsons (1972), modificato da Van der Linde (1998)	mg/l	0,001
TOC (sul tal quale e filtrato)	UNI EN 1484:1999	mg/l	0,1
Solidi sospesi	Strick-land and Parsons (1972), modificato da Van der Linde (1998)	mg/l	0,001
Clorofilla a	HPLC	mg m <sup>-3</sup>	0,05
Diversità pigmentaria	HPLC	mg m <sup>-3</sup>	t(6, 0.99)S <sub>c</sub>
Idrocarburi totali	UNI EN ISO 9377-2:2002	µg/l	50
Tensioattivi anionici	MP 287 REV 0 2019	mg/l	0,05
Tensioattivi non ionici	UNI 10511-2:1996+A1:2000	mg/l	0,03
Acidi aloacetici			
Dalapon	EPA 552.3 2003	µg/l	1
Acido Dibromoacetico	EPA 552.3 2003	µg/l	1
Acido Tribromoacetico	EPA 552.3 2003	µg/l	2
Acido Monobromoacetico	EPA 552.3 2003	µg/l	2,5
Acido Bromodichloroacetico	EPA 552.3 2003	µg/l	1
Acido Bromocloroacetico	EPA 552.3 2003	µg/l	1

<b>Tabella 1 - Metodi relativi alle analisi di campioni di acqua (caratteristiche fisiche e chimiche). Il limite di rilevabilità per i composti organostannici è riferito al catione.</b>			
<b>Prova</b>	<b>Metodo</b>	<b>Unita Misura</b>	<b>Limite Rilevabilità</b>
Acido Dicloroacetico	EPA 552.3 2003	µg/l	4
Acido Tricloroacetico	EPA 552.3 2003	µg/l	1
Acido Monocloroacetico	EPA 552.3 2003	µg/l	2
Acido Clorodibromoacetico	EPA 552.3 2003	µg/l	2
<b>Aloacetoniitriili</b>			
Dibromoacetoniitrile	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	1
Dicloroacetoniitrile	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0.05
Tricloroacetoniitrile	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0.05
1,1,1-Tricloro-2-Propanone	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,2
1,1-Dicloro-2-Propanone	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,05
Cloropicrina	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	1
<b>Alometani e Composti Organici Volatili (VOC)</b>			
Cloroformio	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,01
Carbonio Tetracloruro	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,01
Tricloro Etilene	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,01
Dicloro Bromo Metano	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,01
Tetracloro Etilene	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,01
Dibromo Cloro Metano	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,01
Bromoformio	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,01
1,2-Dibromo Etano	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,01
1,1,1-Tricloro Etano	EPA 5030C 2003+EPA 8260D 2018	µg/l	0,01
1,1,2-Tricloro Etano			
<b>Alofenoli</b>			
2,4-Diclorofenolo	EPA 3510C 1996+EPA 8270E 2018	µg/l	0,2
4-Cloro-3-Metilfenolo	EPA 3510C 1996+EPA 8270E 2018	µg/l	0,2
2,4,6-Triclorofenolo	EPA 3510C 1996+EPA 8270E 2018	µg/l	0,2
Pentaclorofenolo	EPA 3510C 1996+EPA 8270E 2018	µg/l	0,2

### Analisi microbiologiche

Le **analisi microbiologiche** per la ricerca di coliformi fecali, coliformi totali, streptococchi fecali, su campioni di acqua verranno effettuate seguendo le seguenti metodologie.

Coliformi totali: APAT CNR IRSA 7010 C Man 29 2003

Coliformi fecali: APAT CNR IRSA 7020 B Man 29 2003

Streptococchi fecali (Enterococchi): APAT CNR IRSA 7040 C Man 29 2003

## Plancton

### 2.1.1.1 Fitoplancton

I campioni per lo studio del **fitoplancton** saranno prelevati tramite bottiglie tipo Niskin e fissati con formalina neutralizzata (concentrazione finale 0,74%).

Per l'analisi qualitativa della composizione del **microfitoplancton**, verrà effettuato un campionamento verticale da -70m alla superficie, con retino con maglia di porosità 10µm; il campione prelevato dal bicchiere di raccolta, dopo un risciacquo con acqua di mare, sarà fissato con formalina neutralizzata (concentrazione finale 3%). Si ottiene la ricchezza specifica (n.ro di taxa) microfitoplanctonica.

Saranno utilizzati microscopi inversi (Zeiss IM35, Zeiss IM, Zeiss Axio Vert.A1 KMAT, c.f.) per il conteggio e la determinazione tassonomica del fitoplancton.

I dati dei conteggi al microscopio dei campioni prelevati con bottiglia vengono raccolti in una matrice specie x stazioni da cui si ottengono le abbondanze totali e per gruppi tassonomici assolute e relative, la ricchezza specifica (n.ro di taxa), la diversità di Shannon-Wiener (H') e l'equitabilità (Pielou). Come analisi multivariata delle comunità fitoplanctoniche viene usato il test non parametrico ANOSIM (software PAST) in base alla similarità secondo l'indice di Bray-Curtis e la routine SIMPER (software PAST) per valutare il grado di similarità della composizione tassonomica tra le campagne.

Per ulteriori dettagli si rimanda a Zingone A., Totti C., Sarno D., Cabrini M., Caroppo C., Giacobbe M.G., Lugliè A., Nuccio C., Socal G., 2010. Fitoplancton: metodiche di analisi quali-quantitativa. In: Socal G., Buttino I., Cabrini M., Mangoni O., Penna A., Totti C. (eds.). Metodologie di campionamento e di studio del plancton marino. SIBM, ISPRA, Roma: 204-228.

Le concentrazioni di **clorofilla a** e dei pigmenti accessori di seguito specificati (**diversità pigmentaria**) verranno determinate in cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC SHIMADZU Class VP10). Saranno determinati: Clorofilla b + Divinilclorofilla b, Divinilclorofilla a, Zeaxantina, Peridina, Butanoiloxifucocantina, Fucoxantina, Hesanoiloxifucocantina, Prasinocantina, Alloxantina. La diversità pigmentaria viene ricavata come rapporto tra la concentrazione del singolo pigmento e la somma dei pigmenti accessori.

### 2.1.1.2 Zooplancton

Lo studio del mesozooplacton sarà effettuato tramite pescate orizzontali e pescate verticali condotte nella colonna d'acqua compresa tra 50 m e la superficie e tra 100 m e 50 m di profondità.

L'**oloplancton** a copepodi sarà campionato con retino standard WP-2, con vuoto di maglia di 200µm, dotato di flussimetro, specifico meccanismo di sgancio e collettore di raccolta. **Meroplancton e ittioplancton** saranno campionati con retino Bongo-net, con vuoto di maglia di 300 µm, anch'esso dotato di flussimetro e collettori di raccolta.

Le pescate orizzontali, come previsto dal metodo standard, saranno effettuate mantenendo una rotta rettilinea per 15 minuti alla velocità costante di 2 nodi per la restituzione quali-quantitativa degli organismi al metro cubo..

I campioni raccolti saranno conservati in soluzione di acqua di mare e formalina al 4%.

Per il solo campione oloplanctonico verranno effettuate stime di biomassa umida con il metodo volumetrico di misura per sedimentazione in cilindri graduati da 500 ml dopo 24 ore.

I confronti tra campioni/annualità verranno effettuate utilizzando i dati di similarità/dissimilarità ottenuti dall'indice di *Bray-Curtis coefficient* e la loro significatività sarà valutata attraverso il test statistico non parametrico ANOSIM (*software PRIMER v7*).

### Saggi ecotossicologici *Aliivibrio fischeri* (prec. *Vibrio fischeri*, sistema Microtox®) - fase liquida

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

Procedimento del test – Vengono adottate le procedure previste dal protocollo ISO 11348-3:2007/Amd 1:2018 e dal protocollo "Basic" (Azur Environmental, 1995), a partire da una concentrazione del 90% del campione di acqua, con la sostituzione dei diluenti standard (NaCl al 3,5%) con acqua marina artificiale filtrata. Tale modifica al protocollo originale è stata apportata poiché l'acqua di mare fornisce un ambiente osmotico e fisiologico più idoneo all'attività metabolica dei batteri rispetto al diluente standard e consente di ottenere, pertanto, risultati più verosimili nello studio di ambienti marino-salmastri. Nella fase iniziale del test viene eseguito uno screening alla massima concentrazione di ogni campione (90%), nel caso in cui venisse registrato un effetto di inibizione della bioluminescenza rispetto al controllo superiore al 20 %, si prosegue con un test completo su 4 diluizioni. La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, viene elaborata mediante un software dedicato (Microtox OmniTM v. 1.16), che consente di individuare l'EC50 (e/o l'EC20), cioè la concentrazione del campione cui corrisponde una riduzione della bioluminescenza pari al 50% (20%).

La sensibilità della coltura viene determinata tramite l'allestimento di un test, come precedentemente riportato, utilizzando 5 diverse concentrazioni di Zn<sup>2+</sup> (1,8; 3,6; 7,2; 14,4 e 28,8 mg/l).

### *Phaeodactylum tricornutum*

*Procedimento del test* – Il principio del test, di tipo cronico, consiste nell'espore una coltura algale pura in fase esponenziale per diverse generazioni a concentrazioni note di campione, in condizioni fisico-chimiche standardizzate e con un definito ed omogeneo apporto di nutrienti. Viene adottato il protocollo UNI EN ISO 10253:2017. Al termine del periodo d'incubazione viene confrontata la crescita algale nel campione con quella del controllo. Il test è stato condotto su campioni della colonna d'acqua. Come terreno di coltura, controllo e diluente è stata impiegata acqua di mare naturale, arricchita con lo stock di nutrienti indicato dal protocollo e sterilizzata tramite filtrazione su membrana da 0,45µm.

Un'aliquota di sospensione algale proveniente da una coltura pura in fase di crescita esponenziale viene conteggiata mediante misurazione spettrofotometrica e diluita in acqua marina, fino ad ottenere una densità di 1.000.000 cell/ml.

Il saggio biologico viene organizzato con 3 repliche di ogni campione, in n. 3 diluizioni scalari (1:2). La camera di test è rappresentata da una piastra sterile a 24 pozzetti, ogni pozzetto rappresenta una replica di campione. Le piastre sono caricate con 2 mL di controllo/campione/diluizione e ogni pozzetto viene inoculato con sospensione algale diluita in modo da ottenere una densità iniziale di cellule pari a 10.000 cellule/ml. Le piastre sono successivamente incubate per 72 h in camera termostatica a 20 ± 2 °C, con regime di illuminazione continua del tipo cool white (~ 4200 K) e con una intensità compresa tra 6.000 e 8.000 lux (ISO, 10253). La densità algale dei campioni viene determinata al termine delle 72h, mediante metodo spettrofotometrico. Le concentrazioni algali di controlli e campioni vengono utilizzate per calcolare il tasso di crescita medio (µ medio), la differenza percentuale tra µ medio di controlli e campioni restituisce la risposta del saggio, ossia l'inibizione percentuale del tasso di crescita (%).

La sensibilità della coltura viene determinata tramite l'allestimento di un test, come precedentemente riportato, utilizzando 5 diverse concentrazioni di K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (3,13; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/l).

**Acartia tonsa**

Il principio del saggio biologico acuto con *A. tonsa* consiste nell'esposizione di un numero stabilito di uova mature, per 48 ore, a diluizioni di matrice acquosa, con la finalità di stimare la percentuale di immobilizzazione dei naupli neonati.

Per la produzione di uova viene predisposto in laboratorio un numero idoneo di acquari, tale da garantire il mantenimento di adulti, suddivisi per classi di età. Alle colture con copepodi adulti viene addizionata 3 volte a settimana una sospensione algale di *Rhodomonas baltica*. Alle colture con naupli o copepoditi adulti viene addizionata 3 volte a settimana una sospensione algale di *Isochrysis galbana*.

I parametri di mantenimento degli acquari sono: temperatura:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ; salinità:  $30 \pm 2 \text{‰}$ ; illuminazione: 1000-3000 lux con fotoperiodo 14 ore luce:10 ore buio; aerazione continua.

**Procedimento del saggio** - Il saggio viene allestito secondo il protocollo UNICHIM 2365 (2012). Tre giorni prima dell'allestimento del saggio viene effettuata la raccolta delle uova. Tale raccolta avviene mediante sifonatura del fondo degli acquari di *A. tonsa* che abbiano un'età compresa tra 10 e 20 giorni. La maturità delle uova viene stabilita in microscopia ottica, valutando il colore delle stesse: uova di colore azzurro-grigio perla sono considerate mature, al contrario uova trasparenti, bianche o rosate sono scartate. Le uova mature vengono raccolte tramite una pipetta pasteur in vetro e inserite direttamente a contatto con la matrice da testare, 10 per replica. I campioni acquosi devono essere preparati precedentemente aliquotando (2 mL) sia il campione tal quale che le sue diluizioni in pozzetti di piastra multipozzetto, per un totale di 3 repliche per controlli e diluizioni di campione. Il controllo, così come il medium di diluizione, è rappresentato da acqua sintetica a salinità 30 (ASW), preparata secondo la ricetta riportata nel protocollo sopracitato.

Il numero di neonati mobili ed immobili viene conteggiato in ogni pozzetto sia a 24 che a 48 ore di esposizione. La sensibilità degli organismi (24 e 48 h EC50) viene determinata tramite l'allestimento del test, come precedentemente riportato, utilizzando 5 diverse concentrazioni di  $\text{Ni}^{2+}$  (0,1; 0,16; 0,25; 0,4 e 0,63 mg/L).

All'inizio del saggio biologico vengono misurati i seguenti parametri del controllo e dei campioni: pH, salinità e % di saturazione.

**Cassotrea gigas**

Il test viene allestito secondo ISO 17244:2015 Water quality-Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) and mussel (*Mytilus edulis* or *Mytilus galloprovincialis*)

L'emissione dei gameti *C.gigas* viene stimolata con il ciclo termico (femmine separate dai maschi) che consiste nell'alternanza di bagni a  $14^\circ\text{C}$  e  $28^\circ\text{C}$  nell'acqua marina naturale. Il ciclo termico (30min/30min) viene ripetuto fino al raggiungimento dell'emissione. L'emissione dei maschi viene interrotta; gli organismi vengono tolti dall'acqua e mantenuti a secco in un ambiente fresco a  $15-16^\circ\text{C}$  fino all'ottenimento dei gameti femminili. Le femmine vengono lasciate separatamente proseguire l'emissione per almeno 30 minuti. Durante l'emissione delle femmine viene controllata al microscopio ottico la qualità e l'omogeneità delle loro uova. Una volta scelte le femmine con l'emissione migliore, le uova vengono unite e filtrate attraverso un setaccio di maglia  $100\mu\text{m}$ . I maschi vengono reinseriti insieme nell'acqua di mare e lasciati riprendere l'emissione dello sperma. La soluzione dello sperma viene filtrata attraverso un setaccio di maglia  $32\mu\text{m}$ .

Alla sospensione di uova (500mL) vengono aggiunti ~10mL della sospensione dello sperma filtrato. Mentre si lascia avvenire la fecondazione, viene calcolato il volume della sospensione dei zigoti da inoculare in ogni camera test per raggiungere la concentrazione finale degli embrioni prevista. Le camere test vengono mantenute per 24 ore in cella termostatica al buio alla temperatura di  $24^\circ\text{C}$ . Il test viene bloccato con l'aggiunta di ~1ml di formalina in ogni camera test. La percentuale di larve normali (D-shape), ossia larve normalmente sviluppate, viene valutata al microscopio ottico osservando almeno 100 larve. La tossicità della matrice acquosa testata viene stimata sulla base dei valori di EC20 ed EC50, calcolati con il metodo Probit. Il test è allestito in tre repliche. Per ogni campione sono preparate 3 diluizioni (100%, 50% e 25). La sensibilità degli embrioni viene testata tramite l'esposizione alle concentrazioni crescenti del tossico di riferimento  $\text{Cu}^{2+}$  controllo positivo).

**2.2 Sedimenti****Caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche****Analisi granulometriche**

L'analisi granulometrica dovrà essere effettuata secondo il metodo ICRAM, Sedimenti Scheda 3, 2001. La classificazione della frazione  $>63\mu\text{m}$  (ghiaia e sabbia) deve essere eseguita mediante vagliatura con pile di setacci della serie ASTM da -1 a 4 phi con un intervallo di 0,5 phi.

La frazione fine ( $< 63\mu\text{m}$ ) viene classificata per densitometria secondo ASTM D7928-21.

**Analisi chimiche**

Per i metodi si rimanda alla tabella sottostante. I limiti di quantificazione sono da considerarsi indicativi. Potrebbero subire piccole variazioni in relazione a modifiche dei metodi.

I risultati delle analisi chimiche e fisiche saranno elaborati tramite metodi multivariati (es Principal Component Analysis) per individuare eventuali trend spaziali o temporali. I metodi di elaborazione dati potrebbero variare nel tempo in ragione del tipo di data set da analizzare. La descrizione dettagliata e le eventuali variazioni saranno inserite nei rapporti annuali.

**Tabella 2** - Metodi relativi alla analisi chimiche sui campioni di sedimento. Per gli analiti non espressamente indicati per esteso si fa riferimento al DM 173/16. Il limite di rilevabilità per i composti organostannici è riferito al catione.

	Metodo	Unita Misura	Limite Rilevabilità
<b>Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)</b>	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	mg/kg s.s.	0,001
<b>Pesticidi Organoclorurati</b>	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,1
<b>Policlorobifenili</b>	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,1
<b>Sostanza organica</b>	UNI EN 15935:2021	% s.s.	0,1
<b>Idrocarburi totali (C&gt;12)</b>	UNI EN ISO 16703:2011	mg/kg s.s.	5
<b>Total Organic Carbon (TOC)</b>	UNI EN 15936:2022	% s.s.	0,1
<b>Composti organostannici</b>	UNI EN ISO 23161:2019	mg/kg s.s.	0,001
<b>Alluminio (Al)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	% s.s.	0,03
<b>Bario (Ba)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Cromo totale (Cr tot)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Ferro (Fe)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	% s.s.	0,03
<b>Manganese (Mn)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	5,0
<b>Nichel (Ni)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Rame (Cu)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Zinco (Zn)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Arsenico (As)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Cadmio (Cd)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 7010 2007	mg/kg s.s.	0,01
<b>Vanadio (V)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Piombo (Pb)</b>	EPA 3051 A 2007 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Mercurio (Hg)</b>	EPA 7473 2007	mg/kg s.s.	0,005
<b>Acidi aloacetici</b>			
Acido Bromocloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	2
Acido Bromodichloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	2
Acido Clorodibromoacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	4
Acido Dibromoacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	2
Acido Dichloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	8
Acido Monobromoacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	5
Acido Monocloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	4
Acido Tribromoacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	4
Acido Tricloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	2
Dalapon	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg s.s.	2
<b>Aloacetoniatri</b>			
1,1,1-Tricloro-2-propanone	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	1
1,1-dicloro-2-propanone	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	0,5
Cloropicrina	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	2
Dibromoacetoniatrile	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	5
Dicloroacetoniatrile	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	0,1
Tricloroacetoniatrile	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	0,1
<b>Composti organici volatili (VOC)</b>			
1,1,1-Tricloroetano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
1,1,2-Tricloroetano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
1,2,3-Tricloropropano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
1,2-Dibromo-3-cloropropano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,2
1,2-Dibromoetano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Bromodichlorometano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Bromoformio	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Cloroformio	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Dibromoclorometano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Tetracloroetilene	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Tetracloruro di carbonio	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Tricloroetilene	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
<b>Alofenoli</b>			
2,4,6-Triclorofenolo	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,5
2,4-Diclorofenolo	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,5
4-Cloro-3-Metilfenolo	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,5
Pentaclorofenolo	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,5

**Analisi microbiologiche**

La ricerca di coliformi fecali, coliformi totali, streptococchi fecali su campioni di sedimento verrà effettuata seguendo le seguenti metodologie.

Coliformi totali: APAT CNR IRSA 7010 A Man 29 2003

Coliformi fecali: APAT CNR IRSA 7020 A Man 29 2003

Streptococchi fecali (Enterococchi): APAT CNR IRSA 7040 A Man 29 2003

**Saggi ecotossicologici*****Cassostrea gigas***

Il test viene allestito secondo ISO 17244:2015 Water quality-Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) and mussel (*Mytilus edulis* or *Mytilus galloprovincialis*)

L'emissione dei gameti *C. gigas* viene stimolata con il ciclo termico (femmine separate dai maschi) che consiste nell'alternanza di bagni a 14°C e 28°C nell'acqua marina naturale. Il ciclo termico (30min/30min) viene ripetuto fino al raggiungimento dell'emissione. L'emissione dei maschi viene interrotta; gli organismi vengono tolti dall'acqua e mantenuti a secco in un ambiente fresco a 15-16°C fino all'ottenimento dei gameti femminili. Le femmine vengono lasciate separatamente proseguire l'emissione per almeno 30 minuti. Durante l'emissione delle femmine viene controllata al microscopio ottico la qualità e l'omogeneità delle loro uova. Una volta scelte le femmine con l'emissione migliore, le uova vengono unite e filtrate attraverso un setaccio di maglia 100µm. I maschi vengono reinseriti insieme nell'acqua di mare e lasciati riprendere l'emissione dello sperma. La soluzione dello sperma viene filtrata attraverso un setaccio di maglia 32µm.

Alla sospensione di uova (500mL) vengono aggiunti ~10mL della sospensione dello sperma filtrato. Mentre si lascia avvenire la fecondazione, viene calcolato il volume della sospensione dei zigoti da inoculare in ogni camera test per raggiungere la concentrazione finale degli embrioni prevista. Le camere test vengono mantenute per 24 ore in cella termostatica al buio alla temperatura di 24°C. Il test viene bloccato con l'aggiunta di ~1ml di formalina in ogni camera test. La percentuale di larve normali (D-shape), ossia larve normalmente sviluppate, viene valutata al microscopio ottico osservando almeno 100 larve. La tossicità della matrice acquosa testata viene stimata sulla base dei valori di EC20 ed EC50, calcolati con il metodo Probit. Il test è allestito in tre repliche. Per ogni campione sono preparate 3 diluizioni (100%, 50% e 25). La sensibilità degli embrioni viene testata tramite l'esposizione alle concentrazioni crescenti del tossico di riferimento Cu<sup>2+</sup> controllo positivo).

***Corophium orientale***

Il principio del saggio biologico con *C. orientale* consiste nell'esposizione di un numero stabilito di organismi per 10 giorni al sedimento tal quale, con la finalità di stimare la percentuale di mortalità degli organismi stessi.

Gli anfipodi vengono campionati setacciando il sedimento (con setaccio a maglia di 0,5mm) per selezionare organismi giovani (~4mm) idonei per il test, scartando gli individui maturi e quelli di taglia minore (< 4mm). Gli anfipodi selezionati vengono acclimatati in laboratorio alle seguenti condizioni: Temperatura dell'acqua: 16 ± 2°C; Salinità: 36 ± 2 ‰; Illuminazione: continua; O<sub>2</sub> disciolto nell'acqua sovrastante il sedimento: > 60 %.

**Procedimento del saggio** - Il saggio viene allestito secondo il protocollo ISO 16712:2005. 200cc di sedimento da testare vengono introdotti all'interno di un contenitore da 1 L e vengono aggiunti circa 750cc di acqua di mare naturale filtrata. Per ogni campione sono allestite 4 repliche e in ciascun contenitore sono inseriti 25 individui. Come sedimento di controllo si utilizza quello nativo proveniente da un sito non contaminato. Dopo 10 giorni, il contenuto di ogni becker viene setacciato (500µm) e gli organismi vivi contati. La sensibilità degli organismi (96 h LC50) viene determinata tramite l'esposizione per 96 ore a concentrazioni crescenti di CdCl<sub>2</sub> (0,8 mg/l; 1,6 mg/l; 3,2 mg/l; e 6,4 mg/l).

All'inizio e alla fine del saggio biologico vengono misurati i seguenti parametri dell'acqua sovrastante il sedimento: pH, salinità, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e ossigeno disciolto.

***Allvibrio fischeri* (prec. *Vibrio fischeri* sistema Microtox®) - fase liquida**

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

Nel caso specifico dei sedimenti, il saggio viene eseguito su elutriati.

**Procedimento del test** – Vengono adottate le procedure previste dal protocollo ISO 11348-3:2007/Amd 1:2018 e dal protocollo "Basic" (Azur Environmental, 1995), a partire da una concentrazione del 90% del campione di acqua, con la sostituzione dei diluenti standard (NaCl al 3,5%) con acqua marina artificiale filtrata. Tale modifica al protocollo originale è stata apportata poiché l'acqua di mare fornisce un ambiente osmotico e fisiologico più idoneo all'attività metabolica dei batteri rispetto al diluente standard e consente di ottenere, pertanto, risultati più verosimili nello studio di ambienti marino-salmastri. Nella fase iniziale del test viene eseguito uno screening alla massima concentrazione di ogni campione (90%), nel caso in cui venisse registrato un effetto di inibizione della bioluminescenza rispetto al controllo superiore al 20 %, si prosegue con un test completo su 4 diluizioni. La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, viene elaborata mediante un software dedicato (Microtox

Omni™ v. 1.16), che consente di individuare l'EC50 (e/o l'EC20), cioè la concentrazione del campione cui corrisponde una riduzione della bioluminescenza pari al 50% (20%).

La sensibilità della coltura viene determinata tramite l'allestimento di un test, come precedentemente riportato, utilizzando 5 diverse concentrazioni di Zn<sup>2+</sup> (1,8; 3,6; 7,2; 14,4 e 28,8 mg/l).

## 2.3 Biota

### Macrozoobenthos

Il campionamento dei sedimenti per la caratterizzazione di popolamenti macrobentonici viene effettuato tramite benna Van Veen (con volume pari a 25 litri e superficie di campionamento di 0,1m<sup>2</sup>. Ciascun campione viene setacciato su maglia 0,5mm e fissato in alcol al 96%.

Il sorting viene effettuato con l'ausilio di uno stereomicroscopio da dissezione e la determinazione tassonomica fatta al più basso livello tassonomico possibile. La matrice di abbondanza (specie x stazioni) sarà elaborata tramite Cluster Analysis e non-metric Multidimensional Scaling (n-MDS).

L'analisi strutturale del popolamento sarà condotta attraverso il calcolo dei seguenti indici: numero totale di individui (N), numero di specie (S), ricchezza specifica di Margalef (D), diversità specifica di Shannon-Weaver (H') ed equitabilità di Pielou (J).

Il calcolo degli indici ecologici, la Cluster Analysis e l'n-MDS sono stati effettuati utilizzando il software PRIMER 6.0 (PRIMER-E Ltd, Plymouth, U. K.; Clarke & Warwick, 2001; Clarke & Gorley, 2006).

### Meiobenthos

Per lo studio della meiofauna verrà usato un carotatore cilindrico di Plexiglas di 2,75cm di diametro che verrà inserito manualmente nel sedimento prelevato tramite benna VanVeen.

La fauna verrà narcotizzata con una soluzione di Cloruro di Magnesio (MgCl<sub>2</sub>) al 7% e dopo 10 minuti fissata e conservata in alcol al 96%. La fase di estrazione, verrà fatta attraverso il metodo della centrifugazione in gradiente di Ludox AM-30, preceduto dalla vagliatura di ciascun campione mediante due setacci sovrapposti con maglie rispettivamente di 1mm e 63µm. Il setaccio a maglie più grandi consente di eliminare il detrito grossolano e il macrobenthos, quello a maglie inferiori invece permette l'eliminazione della frazione più fine del sedimento e della microfauna, trattenendo la frazione costituita da sabbia e meiofauna. Successivamente il materiale di quest'ultima frazione (sabbia + meiofauna) vien distribuito in diverse provette da 50ml, dosando al massimo 20ml di materiale per provetta, addizionato con Ludox, e sottoposto a centrifugazione (5 minuti a 2000rpm) per estrarre la meiofauna. La procedura viene ripetuta tre volte. In caso di scarso sedimento, l'estrazione avverrà attraverso il metodo della vorticazione e decantazioni multiple.

Successivamente all'estrazione, gli organismi vengono trasferiti in piastre Petri con fondo retinato, e, con l'ausilio di uno stereomicroscopio (Wild M8 o Nikon SMZ18), identificati per principale gruppo tassonomico di appartenenza (ordine-phyllum) e contati. L'identificazione di campioni problematici si avvarrà dell'ausilio di un microscopio composto motorizzato dotato di ottiche Nomarski Nikon Eclipse 90i (oppure Leitz Dialux 20).

I dati di abbondanza vengono raccolti in una matrice specie x stazioni da sottoporre ad analisi univariate e multivariate. Per le analisi univariate verranno calcolati i principali indici ecologici: numero di taxa rinvenuti (S), diversità di Shannon-Wiener (H'), equitabilità di Pielou (J'), la ricchezza di Margalef (d). Le analisi Statistiche multivariate (Cluster Analysis, MDS) saranno effettuate utilizzando il software PRIMER 6.0.

### Bioaccumulo

Le indagini di bioaccumulo vengono eseguite utilizzando il bioindicatore *Mytilus galloprovincialis*.

Il monitoraggio viene condotto con la modalità definita "attiva": i mitili vengono prelevati dall'impianto di acquicoltura presente nell'area marina antistante Isola di Palmaria (Golfo di La Spezia) poco o affatto influenzata da fonti di impatto. I mitili vengono collocati in 4 stazioni di monitoraggio lungo il Terminale e in una stazione di controllo lontano da fonti di inquinamento. I mitili vengono alloggiati in reticelle di nylon e collocati all'interno di gabbie di acciaio inox alla profondità di 12 metri. Dopo circa 4 settimane i mitili vengono prelevati e sottoposti alle analisi secondo le procedure sotto riportate. Inoltre, all'atto della traslocazione, un campione di mitili appena prelevato dall'impianto di acquicoltura (denominato Tempo 0) viene sottoposto alle medesime indagini. Gli stessi campioni vengono utilizzati per i Biomarkers.

### Analisi chimiche

Per i metodi analitici si rimanda alla seguente tabella. I limiti di quantificazione sono da considerarsi indicativi. Potrebbero subire piccole variazioni in relazione a modifiche dei metodi.



<b>Tabella 3 - Metodi relativi alla analisi chimiche su <i>M. galloprovincialis</i>. Il limite di rilevabilità per i composti organostannici è riferito al catione.</b>			
	<b>Metodo</b>	<b>Unita Misura</b>	<b>Limite Rilevabilità</b>
<b>Idrocarburi C&lt;10</b>	EPA 5021A 2014 + EPA 8015C 2007	mg/kg	0,5
<b>Idrocarburi C10-C40</b>	UNI EN ISO 16703:2011	mg/kg s.s.	5
<b>Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)</b>	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	mg/kg s.s.	0,001
<b>Composti organostannici</b>	UNI EN ISO 23161:2019	mg/kg s.s.	0,001
<b>Bario (Ba)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Cromo totale (Cr)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Ferro (Fe)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	30
<b>Manganese (Mn)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	5,0
<b>Nichel (Ni)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Rame (Cu)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Vanadio (V)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Zinco (Zn)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	1,0
<b>Arsenico (As)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	0,3
<b>Cadmio (Cd)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 7010 2007	mg/kg s.s.	0,01
<b>Piombo (Pb)</b>	EPA 3052 1996 + EPA 6010D 2018	mg/kg s.s.	0,3
<b>Mercurio (Hg)</b>	EPA 7473 2007	mg/kg s.s.	0,005
<b>Acidi aloacetici</b>			
Acido Bromocloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	2
Acido Bromodichloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	5
Acido Clorodibromoacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	5
Acido Dibromoacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	1
Acido Dichloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	3
Acido Monobromoacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	2
Acido Monocloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	3
Acido Tribromoacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	10
Acido Tricloroacetico	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	2
Dalapon	MI/10/C + EPA552.3 2003	µg/kg	2
<b>Aloacetoniatri</b>			
1,1,1-Tricloro-2-propanone	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	1
1,1-dicloro-2-propanone	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	0,5
Cloropicrina	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	2
Dibromoacetone	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	2
Dicloroacetone	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	0,1
Tricloroacetone	EPA 5035A 2002 + EPA8260D 2018	µg/kg	0,5
<b>Composti organici volatili (VOC)</b>			
1,1,1-Tricloroetano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
1,1,2-Tricloroetano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
1,2,3-Tricloropropano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
1,2-Dibromo-3-cloropropano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,2
1,2-Dibromoetano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Bromodichlorometano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Bromoformio	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Cloroformio	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Dibromoclorometano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Tetracloroetilene	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Tetracloruro di carbonio	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
Tricloroetilene	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
1,1,1-Tricloroetano	EPA 5035A:2002 + EPA8260D:2018	µg/kg	0,05
<b>Alofenoli</b>			
2,4,6-Triclorofenolo	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,5
2,4-Diclorofenolo	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,5
4-Cloro-3-Metilfenolo	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,5
Pentaclorofenolo	EPA3545A 2007 + EPA3630C 1996 + EPA8270E 2018	µg/kg s.s.	0,5

**Analisi microbiologiche**

Sulla matrice mitili verranno ricercati: Coliformi totali (ISO4832:2006), Streptococchi fecali (NF V08-060:2009), Coliformi fecali (APHA Compendium of methods for the microbiological examination of foods ed 4th 2001, Cap 9).

## Biomarkers

**Neutral Red Retention Time (NRRT).** Numerose indagini hanno dimostrato che le membrane lisosomiali sono altamente sensibili allo stress ossidativo che ne provoca l'alterazione strutturale e funzionale.

Il Neutral Red (NR) è un colorante lipofilo e come tale attraversa facilmente le membrane plasmatica e lisosomiale. Nei lisosomi, il pH acido impedisce al colorante di ritornare liberamente nel citoplasma. L'efficienza con cui il NR rimane intrappolato nei lisosomi dipende quindi dalla funzionalità della pompa protonica, presente sulla membrana, responsabile per il trasporto attivo di ioni H<sup>+</sup> all'interno dell'organulo. L'alterazione strutturale e funzionale della membrana lisosomiale viene valutata mediante la misura del tempo di ritenzione del rosso neutro all'interno dei lisosomi secondo il protocollo descritto nel *Manual on the Biomarkers Recommended for the Med-Pol Biomonitoring Programme* messo a punto nell'ambito dell'UNEP-MAP (*United Nations Environment Programme – Mediterranean Action Plan*). In breve, 40 µl di emolinfa (prelevata dal muscolo adduttore posteriore) diluita 1:1 con soluzione salina vengono posti su un vetrino e lasciati incubare in camera umida (16°C) per 30 minuti. Dopo rimozione del liquido in eccesso, alle cellule aderenti al vetrino sono aggiunti 40µl di NR in soluzione fisiologica e lasciati incubare in camera umida (16°C) per 15 minuti. Dopo aver rimosso il liquido in eccesso e proceduto con un lavaggio in soluzione fisiologica, il vetrino viene osservato al microscopio. Vengono effettuate letture successive dello stesso campione, ogni 15 minuti per la prima ora e ogni 30 minuti per le due ore successive al fine di valutare il tempo occorrente affinché il 50% degli emociti presenti colorazione rossa (e lisosomi ingranditi), indice della fuoriuscita del colorante attraverso la membrana lisosomiale. Un tempo breve di ritenzione indica una condizione di maggior danno, il contrario se il tempo di ritenzione del colorante risulta elevato.

**Comet assay** Oltre alle membrane cellulari, anche il DNA è esposto all'impatto dei ROS (*Reactive Oxygen Species*), oltre ad essere anche sensibile all'azione diretta di contaminanti specifici quali gli IPA. Il rilevamento di composti e/o miscele ad azione genotossica nell'ambiente marino ha una importanza notevole in relazione alla possibilità di trasferimento nelle catene alimentari e da queste all'uomo tramite il consumo di prodotti della pesca.

Il Comet assay permette di valutare il grado di integrità della doppia elica di DNA su cellule incluse in agarosio, lisate e sottoposte a corsa elettroforetica. Il grado di frammentazione del DNA viene valutato sulla base del pattern di migrazione elettroforetica mediante l'impiego di un sistema di analisi dell'immagine.

In breve, le cellule branchiali di mitilo vengono dissociate mediante un trattamento enzimatico e meccanico. Successivamente, le cellule isolate sono incluse in un gel di agarosio e poste su vetrini per microscopia ottica e sottoposte a lisi delle membrane per consentire al DNA di migrare durante la successiva corsa elettroforetica effettuata a pH fortemente basico (>13) applicando un campo elettrico di 0,86V/cm ed un'intensità di corrente pari a 300mA. Dopo l'elettroforesi, i vetrini vengono neutralizzati lavandoli con un tampone TRIS-HCl 0,4M, immersi in 100% metanolo freddo, asciugati all'aria e colorati con bromuro di etidio. Osservati con un microscopio a fluorescenza (400 x), le cellule danneggiate si presentano a forma di cometa con la testa e la coda; la lunghezza e l'intensità di fluorescenza della coda sono correlate al danno al DNA. Un sistema d'analisi dell'immagine (Comet Assay II, Perceptive Instruments, UK) permette di quantizzare il danno, che viene espresso come % di DNA migrato. Per ogni campione vengono preparati 2 vetrini, per ogni vetrino sono lette 50 cellule secondo un criterio casuale.

**Analisi istologica dell'apparato branchiale.** L'alterazione strutturale delle branchie di *M. galloprovincialis* è stata riportata in letteratura come conseguenza dell'esposizione a NaClO in un range di dosi compatibile con il rilascio da parte di impianti di produzione energetica (Lopez-Galindo *et al.*, 2009). Pertanto, oltre al danno genotossico a carico delle cellule branchiali vengono indagate anche le possibili alterazioni istologiche su campioni di tessuto (prelevati da N. 5 individui per stazione di campionamento) preparati secondo le tecniche istologiche convenzionali. In breve, frammenti di branchie vengono fissati in soluzione di Bouin, disidratati in una serie di alcool, inclusi in resina metacrilato (Historesin), sezionati ed osservati al microscopio ottico previa colorazione con Blu di Metilene e Blu di Toluidina. Per ogni replica vengono osservate almeno 100 lamelle branchiali ed è assegnato un punteggio in base al grado di integrità del tessuto per ciascun individuo. In particolare, il valore 1 è assegnato quando non si osserva alcun tipo di alterazione, mentre il punteggio di 5 è rappresentativo di una grave compromissione. **Quantificazione dei Micronuclei (MN)** - I micronuclei sono frammenti di materiale nucleare che si presentano adiacenti al nucleo cellulare e che originano dal verificarsi di danneggiamenti al materiale genetico (rotture cromosomiche o disfunzioni a livello del fuso mitotico). La quantificazione della percentuale di micronuclei si basa sul protocollo riportato in UNEP/MED WG.509/43 Annex III Appendix 24 par. 2.2. In breve, per ogni individuo si allestisce un vetrino con uno striscio di emolinfa che, successivamente, verrà colorato con colorante GEMSA e letto in microscopia ottica riportando il risultato come % MN.

**Test SOS** - Il test Stress on Stress (SOS) valuta la capacità di sopravvivenza di individui di *M. galloprovincialis* a seguito di stress indotto (esposizione all'aria). Tale capacità viene valutata come Lethal Time (LT), esponendo in incubatore umido 30-40 individui di *M. galloprovincialis* per stazione di campionamento, fino al momento in cui nessun individuo risulta in grado di serrare le valve. La procedura adottata segue il protocollo riportato in UNEP/MED WG.509/43 Annex III Appendix 24. Il risultato verrà espresso come LT50, ossia il tempo in cui si osserva il 50% della mortalità.

**Attività acetilcolinesterasica (AChE)** - L'acetilcolinesterasi è un enzima che idrolizza il neurotrasmettitore acetilcolina. La sua attività viene determinata secondo il metodo descritto Ellman *et al.* (1961). Il principio si basa sulla conversione dell'acetilcolina ioduro, substrato d'azione, in tiocolina. Questa reagisce con l'acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) portando alla formazione dell'acido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB). Tale reazione viene misurata in assorbanza per un tempo di 3 minuti. Questo saggio viene ritenuto rilevante per indagini ambientali in quanto evidenzia in modo specifico la presenza di composti organofosforici e carbammati, in grado di inibire l'attività dell'enzima. L'attività verrà valutata su branchie.

### Fauna ittica bentonectonica

I popolamenti della fauna ittica bentonectonica e gli eventuali effetti su di essi dovuti alla presenza del Terminale verranno analizzati, sia in termini qualitativi che quantitativi, raccogliendo campioni attraverso due metodi distinti: le reti da posta fisse e le reti a traino di fondo.

- 1) Reti da posta. Saranno utilizzate reti da posta (reti a imbrocco), usualmente impiegate dalle marinerie artigianali toscane. Le pescate (cale) saranno effettuate in 5 siti all'interno della zona di interdizione alle attività di pesca (entro 4 miglia di distanza dal terminale): 4 siti saranno localizzati il più vicino possibile al terminale (impatto) e 1 sito sarà localizzato vicino al limite della zona di interdizione alla pesca (4 miglia di distanza dal terminale, controllo). Le 5 pescate verranno ripetute in due giornate di campionamento, per un totale di 10 pescate complessive.
- 2) Reti a traino di fondo. Sarà effettuato un totale di 6 pescate (cale, della durata di 30 minuti ciascuna) all'interno dell'area interdetta alla pesca (entro le 4 miglia dal terminale). Di queste, 4 pescate saranno realizzate in siti più vicini possibile al terminale (impatto) e 2 pescate saranno realizzate in siti localizzati vicino al limite delle 4 miglia di distanza dal terminale (controllo).

Le indagini saranno effettuate due volte all'anno.

**Analisi dei dati.** Gli organismi catturati con i due metodi di campionamento saranno classificati fino al livello di specie. Ciò permetterà di compilare una lista faunistica per ogni tipologia di attrezzo utilizzato. Per ogni specie catturata sarà rilevato il peso totale in kg ed il numero di individui. Inoltre, per ogni individuo, sarà rilevata la taglia, espressa come Lunghezza Totale (LT) al mezzo centimetro inferiore, per gli Osteitti e Condroitti, mentre per i Molluschi Cefalopodi sarà rilevata la Lunghezza del Mantello (LM). Per i Crostacei Decapodi la taglia, misurata al mm inferiore, sarà espressa come Lunghezza del Carapace (LC). Le taglie così rilevate saranno utilizzate per costruire distribuzioni di taglia-frequenza delle specie più rappresentative delle catture delle reti da posta e dello strascico.

Per rendere i dati raccolti confrontabili tra di loro sarà necessario utilizzare dei metodi di standardizzazione. Per quanto riguarda i dati di cattura delle reti da posta, saranno elaborati indici in numero e peso standardizzati ai 1000 m di lunghezza delle reti e alle 24 ore (Num/1000m/24h e kg/1000m/24h).

standardizzati ai 1000 m di lunghezza delle reti e alle 24 ore (Num/1000m/24h e kg/1000m/24h).

I dati di cattura realizzati con la rete a strascico saranno standardizzati in indici di densità e biomassa (Num/km<sup>2</sup> e kg/km<sup>2</sup>) utilizzando il metodo dell'area strascicata utilizzando la formula:

$$\text{Area strascicata (km}^2\text{)} = (\text{AO} \cdot \text{V} \cdot 1,853 \cdot \text{D}) / (1000 \cdot 60)$$

dove:

AO = apertura orizzontale della rete, espressa in m;

V = velocità della barca in pesca, espressa in nodi (miglia nautiche/ora);

D = durata della cala in minuti.

Sarà studiata la variazione degli indici di biomassa e densità tra i siti vicini al Terminale e quelli controllo, sia dei principali gruppi tassonomici (Osteitti, Condroitti, Crostacei Decapodi e Molluschi Cefalopodi), sia delle specie più rappresentative delle catture.

### 3 STRUMENTAZIONE

#### 3.1 SONDA IDROMARAMBIENTE MODELLO MAR-3

Sonda multiparametrica di ultima generazione: elettronica e meccanica progettate per garantire: semplicità di impiego; modularità di configurazione; accuratezza; affidabilità.

Idonea per l'utilizzo in ogni ambiente acquatico: mare, acque interne, bacini salmastri.

Utilizzabile per l'esecuzione di profili a lettura diretta o con funzione autoregistrante.

Applicabilità su stazioni di monitoraggio autonome, anche collegata ad altri dispositivi di misura.

Sensoristica di alto livello, anche per oceanografia.

Disponibile con corpo sonda e sensori in titanio, immuni dagli effetti delle corrosioni, oppure con corpo in Delrin o acciaio inox AISI 316L

Memoria interna	4 MB
Interfaccia I/O	MCBH4M, RS232/RS485
Alimentazione	5÷30 Vdc; 60 mA (std)
Batteria interna	8Ah al litio
Meccanica (Titanio)	Altezza, escluso connettore: 500 mm Diametro massimo: 90 mm Peso: 3 kg in aria - 1.6 kg in acqua Massima profondità applicativa: 200 bar

PARAMETRO	CAMPO DI MISURA	ACCURATEZZA	RISOLUZIONE
Pressione	0÷100 dbar	0.1 dbar	0.002 dbar
Temperatura	-2÷38 °C	0.01 °C	0.0007 °C
Conducibilità	0÷70 mS/cm	0.02 mS/cm	0.0015 ms/cm
Ossigeno disciolto	0÷150 %sat	1.0 %sat	0.002 %sat
pH	2÷12	0.05	0.0002
Redox	-1÷1 V	1 mV	0.03 mV
Torbidità	0÷100 FTU	0.05 FTU	0.002 FTU
Clorofilla 'a'	0÷50 mg/m <sup>3</sup>	0.05 mg/m <sup>3</sup>	0.001 mg/m <sup>3</sup>

#### 3.2 SONDA MULTIPARAMETRICA MISURAZIONE PAR

CTD **Sea Beard Electronic 19plus V2** accoppiato con deck unit **Sea Bird Electronics 36** e **Power Data Interface Module (PIDM)** per l'alimentazione della sonda e la visione in tempo reale dei dati acquisiti utilizzando un singolo cavo conduttore.

Caratteristiche:

- Plastic housing per misure fino a 600 m
- **SBE 5M miniature pump** (flusso a velocità costante per risposta di conducibilità costante nel tempo.
- Condotto T-C, garanzia di misurazioni di temperatura e conducibilità sulla stessa parcella d'acqua.

Parametri misurati:

- **Photosynthetic Available Radiation (PAR)** in acqua e contemporanea superficiale con due sensori **Satlantic SAT-QR-9916**.
- La sonda fornisce anche i seguenti parametri: Pressione (**Strain-gauge sensor**, 600 m), Temperatura, Conducibilità, Fluorescenza della clorofilla a (**WET Labs Eco**), Retrodiffusione (bb (470nm), bb(532nm) e fluorescenza della CDOM (**WET Labs Eco Triplet**)

Specifiche tecniche:

	Temperature (°C)	Conductivity (S/m)	Pressure
<b>Measurement Range</b>	-5 to +35	0 to 9	0 to 600:
<b>Initial Accuracy</b>	± 0.005	± 0.0005	± 0.1% of full scale
<b>Typical Stability</b>	0.0002/month	0.0003/month	0.1% of full scale /year
<b>Resolution</b>	0.0001	• 0.00005 (most oceanic water; 0,4 ppm in salinity)	0.002% of full scale
<b>Sensor Calibration</b>	+1 to +32	0 to 9; physical calibration over range 2.6 to 6 S/m, plus zero conductivity (air)	Ambient pressure to full scale range in 5 steps

I dati ottenuti dalla sonda vengono elaborati mediante il software SeaSoft.

### 3.3 SPETTRORADIOMETRO SUBACQUEO

- Unità subacquea costituita da una gabbia in acciaio inox in cui alloggiato 2 radiometri **RAMSES TRIOS: ACC/VIS** per la misura della irradianza discendente ed ascendente, **ARC/VIS** per la misura della radianza ascendente, un sensore di profondità (max 100 m) ed uno di inclinazione rispetto alla verticale (2 assi) **TRIOS RAMSES SAMIP**.
- Radiometro di superficie **RAMSES TRIOS: ACC/VIS** per la misura contemporanea della irradianza discendente di superficie.
- Unità di alimentazione, gestione e acquisizione simultanea dati dai 4 radiometri **TRIOS RAMSES IPS 104-4 plus**.

Range spettrale (nm):	320-950
Detector:	array di foto diodi con 256 canali
Pixel dispersion (nm/pixel):	3.3
Accuratezza delle lunghezze d'onda (nm):	0.3
Canali disponibili:	190

### 3.4 HPLC SHIMADZU CLASS VP (ANALISI CLOROFILLA A E DIVERSITÀ PIGMENTARIA)

Lo strumento è composto da

- pompa LC-10AD VP
- valvola a bassa pressione FCV-10AL VP (modulazione solventi)
- rivelatore spettrofotometrico SPD-10AV VP ed uno fluorimetrico RF-551
- degassatore DGU-14°
- unità di controllo SCL-10A VP.

La valvola di iniezione campioni è una Rheodyne 7725i con un loop di 200  $\mu$ l.

Gestione del sistema (più acquisizione dati e integrazione picchi) via PC tramite software SHIMADZU Class VP 6.1.

Messa a punto e calibrazione metodo con standard cromatografici (DHI, Water and Environment, DK; SIGMA), verifica periodica del sistema di misura tramite mix certificati di pigmenti (DHI, Water and Environment, DK).

#### Specifiche metodologiche

La colonna di analisi è una **RP-C8** Shandon Hypersil MOS con dimensioni di 4,6 mm di diametro interno per 100 mm di lunghezza e dimensioni delle particelle di silice di 3  $\mu$ m. Il sistema è dotato inoltre di una precolonna, Hypersil ODS con diametro interno di 3,2 mm, lunghezza di 10 mm e dimensioni delle particelle di 5  $\mu$ m.

Ogni corsa cromatografica ha la durata di 30 minuti nei quali due eluenti vengono somministrati seguendo una sequenza temporale simile a quella di Vidussi et al. (1996) e Barlow et al. (1997). L'eluente A è composto da 70% metanolo, 30% ammonio acetato 1M in soluzione acquosa e antiossidante BHT (Butile Idrossi Toluene), l'eluente B da metanolo puro. Metanolo ed ammonio acetato sono reagenti con grado di purezza specifico per HPLC, così come l'acetone utilizzato per gli estratti.

Gli estratti sono preparati pochi minuti prima dell'iniezione, aggiungendo 1 ml di soluzione dell'estratto acetone con 1 ml di ammonio acetato 1M in soluzione acquosa e 0,1 ml di standard interno APO ( **$\beta$ 8 APO CAROTENAL**, cod. 10810) alla concentrazione di 2,803 mg/l ed iniettati (circa 500  $\mu$ l) con una siringa in vetro (Hamilton) da 1 ml facendo passare il campione attraverso filtri, collegati alla siringa. Millipore MILLEX-FG PTFE con diametro interno di 4 mm e porosità di 0,2  $\mu$ m.

### 3.5 AUTOANALYZER AA4 BRAN+LUEBBE (DETERMINAZIONE DEI NUTRIENTI)

Analizzatore a flusso continuo modulare per la determinazione dei nutrienti tramite analisi automatizzata di campioni di acqua composto da

- Campionatore Compact Sampler, con alloggi fino a 100 campioni.
- Pompe ad alta precisione per prelievo e avanzamento campioni
- 4 moduli analitici dedicati ciascuno ad una specifica analisi (nitriti, nitrati, ortofosfati, silicati).
- 4 colorimetri riferiti ad ogni modulo analitico
- PC + stampante (software AACE) per la gestione del sistema analitico

Intervalli di determinazione:

nitriti 0,03 – 2,5  $\mu\text{M}$

nitrati 0,03 – 50  $\mu\text{M}$

ortofosfati 0,03 – 5  $\mu\text{M}$

silicati 0,1 – 50  $\mu\text{M}$

#### Specifiche metodologiche

Il sistema si basa sul metodo analitico del flusso segmentato con un flusso continuo di liquido diviso da bolle d'aria in segmenti discreti su cui agiscono le reazioni chimiche appropriate, garantendo limitata diffusione del campione, assenza di contaminazione, simultaneità di analisi e velocità della stessa. Il flusso continuo viene successivamente inviato al colorimetro.

#### Riferimenti metodologie

Parametro	Metodologia	Unità di misura	Limite Rilevabilità
Nutrienti inorganici disciolti	Spettrofotometria Autoanalyzer	$\mu\text{M}$	0,03
Sostanza organica disciolta cromoforica	Spettrofotometria	$\text{m}^{-1}$	0,04
Solidi sospesi	Metodo gravimetrico	$\text{mg l}^{-1}$	0,001
Clorofilla a	HPLC	$\text{mg m}^{-3}$	0,05
Diversità pigmentaria	HPLC	$\text{mg m}^{-3}$	0,03

Per ulteriori dettagli relativi a paragrafi da 3.3 a 3.5 si rimanda ai seguenti riferimenti:

- Saggiomo V., Catalano G., Corato F., Ribera D'Alcalà M., 2010. Metodi automatici di analisi dei nutrienti. In: Socal G., Buttino I., Cabrini M., Mangoni O., Penna A., Totti C. (Eds.), Metodologie di campionamento e di studio del plancton marino: 55-79, SIBM-ISPRA Roma.
- Strickland J.D.H., Parson T.R., 1972. A practical handbook of sea-water analysis. Journal of the Fisheries Research. Board of Canada, 177–179.
- Mitchell B.G., Bricaud A., Carder K., Cleveland J., Ferrari G., Gould R., Kahru M., Kishino M., Maske H., Moisan T., Moore L., Nelson N., Phinney D., Reynold R., Sosik H., Stramski D., Tassan S., Trees C., Weidemann A., Wieland J., Vodacek A., 2000. Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved material and phytoplankton for discrete water samples. In: Fargion G., Mueller J.L. (eds.) Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 2, NASA/TM-2000-209966, Ch. 12: 125-153.
- Van der Linde D.W., 1998. Protocol for Determination of Total Suspended Matter in Oceans and Coastal Zones. CEC-JRC-Ispra. Technical note, I., 98, pp. 182.
- Vidussi F., Claustre H., Bustillos-Guzman J., Caillau C., Marty J.C., 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. J. Pl. Res., 18: 2377-2382.
- Barlow R.G., Cummings D.G., Gibb S.W., 1997. Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls a and b and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse phase C-8 HPLC. Mar. Ecol. Prog. Ser., 161: 303-307.

### 3.6 ANALISI CHIMICHE

#### Metalli

Digestione: Mineralizzatore a microonde (Ethos Easy – FKV) con rotore a 15 posizioni e programmatore di rampe di temperatura.

Analizzatore Diretto del Mercurio DMA-80 TRICELL – Milestone con autocampionatore a 40 posti ed unità di programmazione esterna.

Spettrometro di assorbimento atomico Agilent modello SpectrAA-240Z basato su tecnica effetto Zeeman per la correzione del background (con autocampionatore).

Spettrometro ICP ottico Agilent Modello 5110 VDV con autocampionatore.

#### TOC

Analizzatore elementare TOC Modello CUBE - Elementar con autocampionatore rotante per solidi.

#### Composti Organici VOLATILI

- Autocampionatore per spazio di testa (TRIPLUS RSH) + analisi gascromatografica con GC Trace 1300 Thermoscientific + Rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID)..
- Sistema Purge&Trap + analisi gascromatografica con GC 8890 Agilent + Spettrometro di Massa a Singolo Quadrupolo 5977C Agilent.

#### NON VOLATILI

##### Idrocarburi pesanti:

Estrazione con solvente ad alta pressione (ASE350 Thermoscientific) ~~eppure in bagno ad ultrasuoni~~ + analisi gascromatografica con GC Trace 1300 Thermoscientific + rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

##### Altri composti non volatili:

Estrazione con solvente ad alta pressione (ASE350 Thermoscientific) ~~eppure in bagno ad ultrasuoni~~ + analisi gascromatografica con GC Agilent Intuvo 9000 o GC Agilent 8890 + Spettrometro di Massa a Triplo Quadrupolo (7000D Agilent).

### 3.7 STRUMENTAZIONE PER BIOACUSTICA

Per l'ascolto e la eventuale registrazione durante i nuovi transetti di visual/ascolto/registrazione, è previsto l'uso dell'*idrofono analogico Colmar GP1280*: questo idrofono, che viene trainato, ha una banda 5 Hz – 90 kHz con una sensibilità di -163 dB re V/ $\mu$ Pa.

Sensibilità	dB re V/ $\mu$ Pa	-163
Range frequenza	Hz	5 -90.000
Direzionalità	sferica	omnidirezionale
Guadagno @5kHz	dB	30
Rumore di ingresso equivalente	dB re 1 $\mu$ Pa/ $\sqrt$ Hz	32
Consumo	mA	9
Profondità massima	m	1.000