

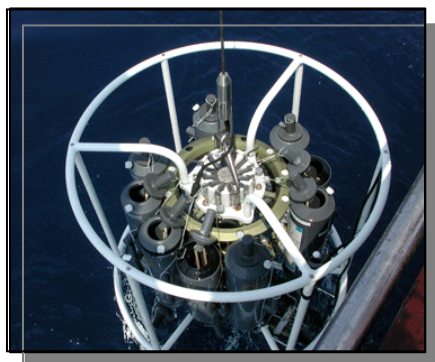
## Capitolo 6 – COLONNA D'ACQUA – ANALISI CHIMICHE, MICROBIOLOGICHE ED ECOTOSSICOLOGICHE

La seconda campagna di campionamento della fase di esercizio provvisorio (I anno di monitoraggio) per la matrice ambientale colonna d'acqua è stata effettuata nei giorni 20-22 luglio 2011.

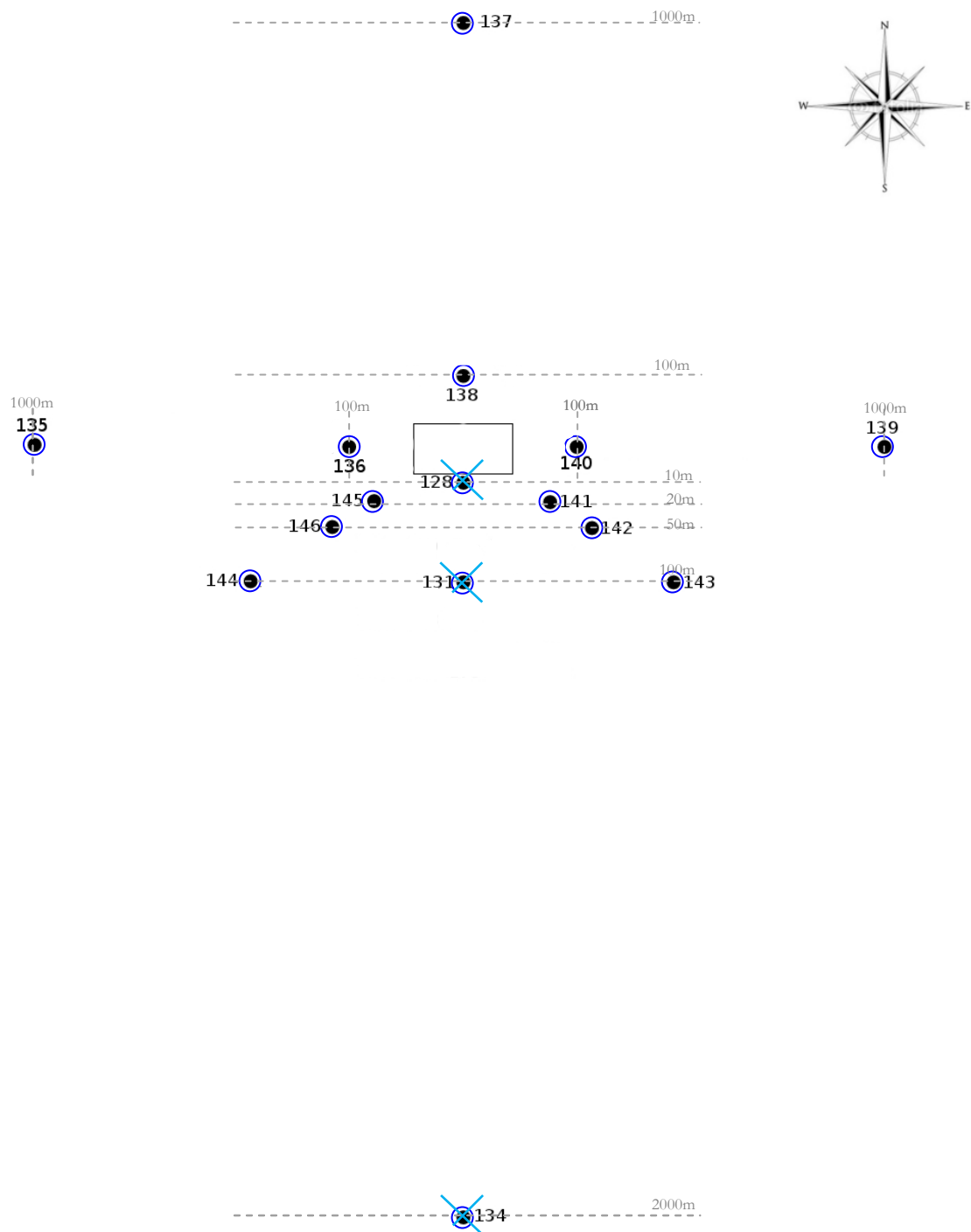
La posizione delle stazioni con il dettaglio delle coordinate geografiche è riportata nel Capitolo 3, paragrafo 3.1. Il prelievo dei campioni da sottoporre ad **analisi chimiche e microbiologiche** è stato effettuato su un numero totale di 15 stazioni (TE128, TE131, TE134, TE135, TE136, TE137, TE138, TE139, TE140, TE141, TE142, TE143, TE144, TE145, TE146) in corrispondenza del livello superficiale (circa 1m di profondità l.m.m.), del livello intermedio (circa 12m di profondità l.m.m.) e del livello profondo (circa 26m di profondità l.m.m.). Le analisi pertanto sono state eseguite su un numero complessivo di 45 campioni.

Il prelievo dei campioni per condurre le **indagini ecotossicologiche** è avvenuto contestualmente all'esecuzione della campagna di indagine sulla colonna d'acqua; i saggi biologici sono stati eseguiti su un'aliquota delle stazioni previste per le indagini chimiche, fisiche e microbiologiche sulla colonna d'acqua. I campioni sono stati prelevati in corrispondenza di 3 stazioni di campionamento disposte a sud della struttura lungo un transetto a distanza crescente (TE128 10m, TE131 100m, TE134 2000 m) dal rigassificatore. Il prelievo dei campioni da sottoporre a questa tipologia di analisi è stato effettuato in corrispondenza del livello superficiale (circa 1m di profondità l.l.m.) e di un livello intermedio (circa 12m di profondità l.m.m.), per un numero totale di 6 campioni.

Il prelievo delle acque è stato effettuato mediante bottiglie Niskin montate su una rosette (Figura 6.1). La rosette è stata calata dalla N/O Astrea dell'ISPRA in corrispondenza delle stazioni di campionamento.



**Figura 6.1:** Rosette equipaggiata con bottiglie Niskin per il prelievo di campioni d'acqua.



**Figura 6.2:** Posizione delle stazioni di campionamento dell'acqua nell'area del Terminale (evidenziate con la x le stazioni ove sono stati eseguiti anche i saggi biologici). Le linee tratteggiate riportano la distanza delle stazioni dal Terminale. Figura non in scala.

## **6.1 Analisi solidi sospesi, carbonio organico, azoto totale e clorofilla-a e feopigmenti**

### ***6.1.1 Materiali e metodi***

#### **Determinazione dei solidi sospesi (TSS)**

Per la determinazione dei TSS è stata filtrata una quantità di campione variabile su filtri Whatman GF/F (porosità nominale 0,7 micron) premuffolati per 4 ore a 450°C e poi pesati su bilancia analitica. Dopo la filtrazione del campione il filtro con il particellato è stato lavato 3 volte, con 15 ml di acqua MilliQ, ed è stato quindi congelato <a -20°C fino al momento dell'analisi.

Successivamente il filtro è stato essiccato in stufa termostatica a 105°C per 48 ore e lasciato raffreddare in essiccatore per 1 ora prima di effettuare la pesata dello stesso.

La differenza di peso del filtro tra prima della filtrazione e dopo la filtrazione determina la quantità (in mg) di solidi sospesi presenti nel campione; rapportando questa al volume di acqua filtrata (espressa in litri) si ottengono i mg L<sup>-1</sup> di solidi sospesi.

Il limite di quantificazione del metodo è di 0,15 mg L<sup>-1</sup>.

#### **Determinazione del carbonio organico (POC) e dell'azoto totale (TPN) nel particellato sospeso**

L'analisi del filtrato viene effettuata previa acidificazione dei filtri con 200 µl di HCl al 25% p/v (Nieuwenhuize et al., 1994), vengono lasciati ½ h a T ambiente, vengono essiccati in stufa a 65 °C per 2 h e infine vengono posti in capsule di stagno precedentemente lavate con tetracloruro di carbonio e acetone utilizzando reagenti di grado analitico e asciugate per una notte a 110 °C.

I campioni così preparati sono sottoposti ad analisi mediante lo strumento CHNS-O Analyzer Fisons mod. EA 1108: essi vengono introdotti in un tubo di quarzo a 1040 °C, riempito con ossido di cromo (III) e ossido di cobalto (II e III) + argento, all'interno del quale avviene la loro combustione e l'ossidazione quantitativa dei gas ottenuti. Tali gas vengono trasferiti in un secondo tubo di quarzo, impaccato con rame in granuli e ossido di rame (II) riscaldato a 650 °C, in cui avviene la riduzione degli ossidi di azoto e l'assorbimento degli eccessi di ossigeno. L'acqua che si forma nella combustione viene rimossa usando come filtro magnesio perclorato anidro granulare. La separazione gascromatografica dell'azoto e dell'anidride carbonica viene ottenuta con una colonna Porapak di 2 m a 60 °C e la rivelazione dei picchi viene effettuata tramite rivelatore a conducibilità termica (Pella & Colombo, 1973). Il gas di trasporto utilizzato dallo strumento è elio.

Giornalmente lo strumento viene calibrato mediante la combustione dello standard (acetanilide o atropina) e viene determinato il contributo dato dalle capsule di stagno ai segnali per l'azoto e il carbonio al fine di sottrarli dai campioni successivamente analizzati. Ogni 12 campioni si ripete l'analisi di una capsula vuota e di 2 standard per calcolare nuovamente i fattori di calibrazione (durante il procedere delle analisi cambiano le condizioni di flusso del gas di trasporto a causa dei residui che si accumulano in testa al tubo di ossidazione). Dai valori determinati nei campioni viene sottratto come "bianco" il contributo medio dovuto al filtro GF/F.

Giornalmente vengono anche effettuate determinazioni di controllo su un sedimento marino di riferimento (BCSS-1) certificato dal Canadian National Research Council.

Le concentrazioni di POC e TPN vengono espresse in termini di  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

I limiti di quantificazione della metodica sono di  $0,2 \mu\text{mole L}^{-1}$  per il POC e di  $0,5 \mu\text{mole L}^{-1}$  per il TPN.

### **Determinazione della clorofilla *a* (Chl *a*) e feopigmenti**

L'analisi della clorofilla *a* è stata effettuata con la **metodica spettrofluorimetrica**.

Il metodo utilizzato si basa sulla metodica riportata da Parsons et al. (1984).

Il filtro è stato sottoposto a estrazione per 16 ore al buio alla temperatura di  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in 20 ml di acetone al 90%. Successivamente l'estratto è stato centrifugato a 3000 rpm per 15 minuti. La lettura della fluorescenza dell'estratto acetone (Fo) è stata effettuata utilizzando celle in quarzo (1 cm di cammino ottico), scegliendo come lunghezza d'onda di eccitazione 430 nm e come lunghezza d'onda di emissione 665 nm. Il bianco strumentale è stato effettuato con una soluzione di acetone al 90%. Dopo una prima lettura (Fo) all'estratto si aggiungono alcune gocce di HCl (5% p/v) e si procede alla lettura spettrofluorimetrica (Fa).

La calibrazione dello strumento è stata effettuata mediante la lettura spettrofluorimetrica di soluzioni standard (range compreso tra  $0,01$  e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) in acetone al 90%, ottenute per diluizione di una soluzione standard madre di clorofilla *a* (Sigma- Aldrich), seguendo lo stesso procedimento utilizzato per i campioni: lettura prima dell'acidificazione (Fo) e dopo l'acidificazione (Fa).

Per il calcolo dei  $\mu\text{g L}^{-1}$  di Chl *a* ed i feopigmenti sono state utilizzate le seguenti formule:

$$\text{Chl-}a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \mathbf{R / (R-1) \times (F_o - F_a) \times C \times (v/V)}$$

$$\text{Feopigmenti (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \mathbf{R / (R-1) \times ((R \times F_a) - F_o) \times C \times (v/V)}$$

in cui:

**F<sub>o</sub>** fluorescenza prima dell'acidificazione del campione

**F<sub>a</sub>** fluorescenza dopo l'acidificazione del campione

**R** valore medio dei rapporti **F<sub>o</sub>/F<sub>a</sub>** calcolato per le soluzioni standard diluite di clorofilla *a*

**C** valore medio dei rapporti **C<sub>a</sub>/F<sub>o</sub>** calcolato per le soluzioni standard diluite di clorofilla *a*, dove **C<sub>a</sub>** è la concentrazione del singolo standard di calibrazione

**v** volume di acetone utilizzato per l'estrazione

**V** volume in litri di acqua di mare filtrata

Il limite di quantificazione della metodica è di 0,1 µg L<sup>-1</sup> per Chl *a* e feopigmenti

### 6.1.2 Risultati

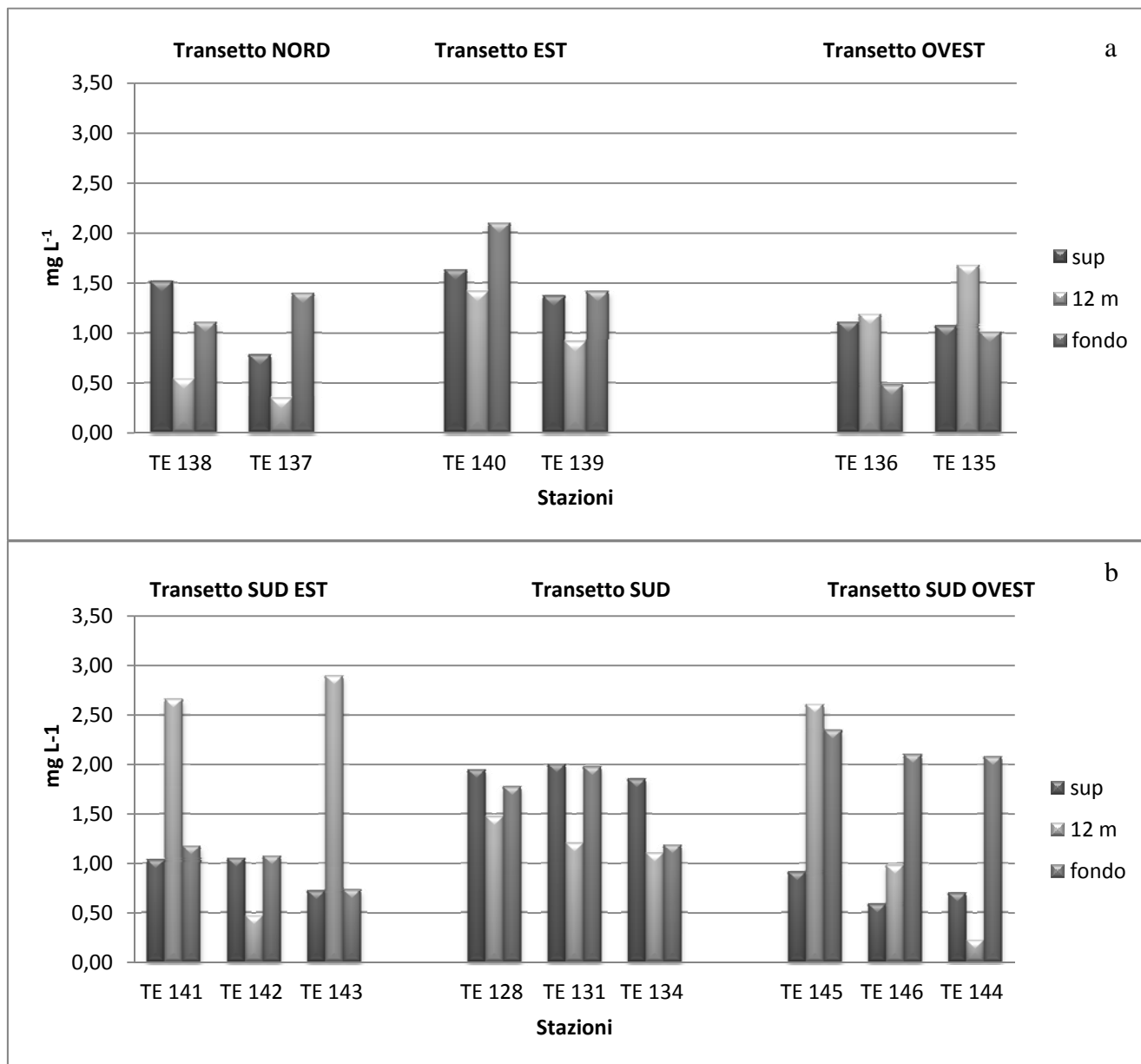
Nella Tabella 6.1.2.1 sono riportati i risultati delle analisi effettuate sui campioni di acqua prelevati a tre diverse quote (superficiale, intermedia e profonda) durante il monitoraggio della fase di esercizio.

**Tabella 6.1.2.1:** Concentrazioni dei solidi sospesi (TSS), dell'azoto totale (TPN), del carbonio organico particellato (POC), della clorofilla-*a* (Chl-*a*) e dei feopigmenti – fase di esercizio – Luglio 2011.

Stazione	Livello	TSS	POC	TPN	Clorofilla a	Feopigmenti
		mg L <sup>-1</sup>	micromoli L <sup>-1</sup>	micromoli L <sup>-1</sup>	microgrammi L <sup>-1</sup>	microgrammi L <sup>-1</sup>
TE 128	superficiale	1,95	29,9	3,7	0,6	<0,1
	intermedio	1,47	20,7	4,0	0,7	<0,1
	profondo	1,77	17,4	2,8	0,9	0,3
TE 131	superficiale	2,00	33,0	4,0	0,6	0,2
	intermedio	1,20	15,5	2,6	0,7	<0,1
	profondo	1,97	13,3	2,6	1,1	0,2
TE 134	superficiale	1,85	38,8	3,7	1,1	0,3
	intermedio	1,10	24,4	3,4	0,8	0,2
	profondo	1,19	20,5	5,1	0,7	0,5
TE 135	superficiale	1,07	37,7	4,2	0,3	<0,1
	intermedio	1,67	25,5	4,0	0,7	0,3
	profondo	1,00	20,5	4,0	0,6	0,3
TE 136	superficiale	1,10	32,7	3,4	0,5	0,1
	intermedio	1,18	16,6	2,8	0,5	<0,1
	profondo	0,47	14,4	2,3	1,0	0,2
TE 137	superficiale	0,78	27,4	2,8	0,1	0,6
	intermedio	0,34	20,5	2,8	0,5	<0,1
	profondo	1,39	18,2	3,1	0,9	0,7
TE 138	superficiale	1,51	36,3	4,0	0,1	0,6
	intermedio	0,54	13,3	1,7	0,2	<0,1
	profondo	1,10	18,5	2,3	0,7	<0,1
TE 139	superficiale	1,37	27,1	3,1	0,3	0,1
	intermedio	0,91	13,3	1,9	0,7	0,1
	profondo	1,41	17,7	3,1	0,8	0,3
TE 140	superficiale	1,62	33,2	3,4	0,9	0,2
	intermedio	1,41	15,5	2,6	0,4	0,1
	profondo	2,09	19,9	3,7	0,9	0,5
TE 141	superficiale	1,03	36,8	4,0	0,2	<0,1
	intermedio	2,66	29,1	4,0	0,7	0,1
	profondo	1,17	13,3	2,0	0,9	<0,1
TE142	superficiale	1,05	33,0	3,7	0,6	<0,1
	intermedio	0,46	17,7	2,8	0,4	0,4
	profondo	1,07	12,4	2,0	0,9	0,3
TE 143	superficiale	0,72	25,7	2,8	<0,1	0,3
	intermedio	2,90	13,5	2,3	0,9	<0,1
	profondo	0,73	16,3	2,6	0,8	0,1
TE144	superficiale	0,69	30,7	3,4	0,2	0,4
	intermedio	0,22	12,4	1,7	0,5	1,4
	profondo	2,08	17,1	2,8	0,7	<0,1
TE145	superficiale	0,91	36,8	5,3	0,1	0,1
	intermedio	2,61	21,3	2,6	0,5	<0,1
	profondo	2,35	17,4	3,1	0,4	1,4
TE146	superficiale	0,58	37,7	3,1	<0,1	0,5
	intermedio	0,97	20,7	2,3	0,7	<0,1
	profondo	2,10	24,1	3,1	0,4	<0,1

Per meglio studiare gli eventuali impatti del terminale, le stazioni sono state raggruppate in 6 transetti: Sud (stazioni TE128, TE131, TE134), Nord (stazioni TE137, TE138), Est (stazioni TE139, TE140), Ovest (stazioni TE135, TE136), Sud-Est (stazioni TE141, TE142, TE143) e Sud-Ovest (stazioni TE144, TE145, TE146). Nelle Figure 6.1.2.1-a, b, c, d sono riportate graficamente e rispettivamente le concentrazioni di TSS, POC, TPN, Chl *a* nelle tre quote di campionamento nelle stazioni suddivise a seconda dei sei differenti transetti.

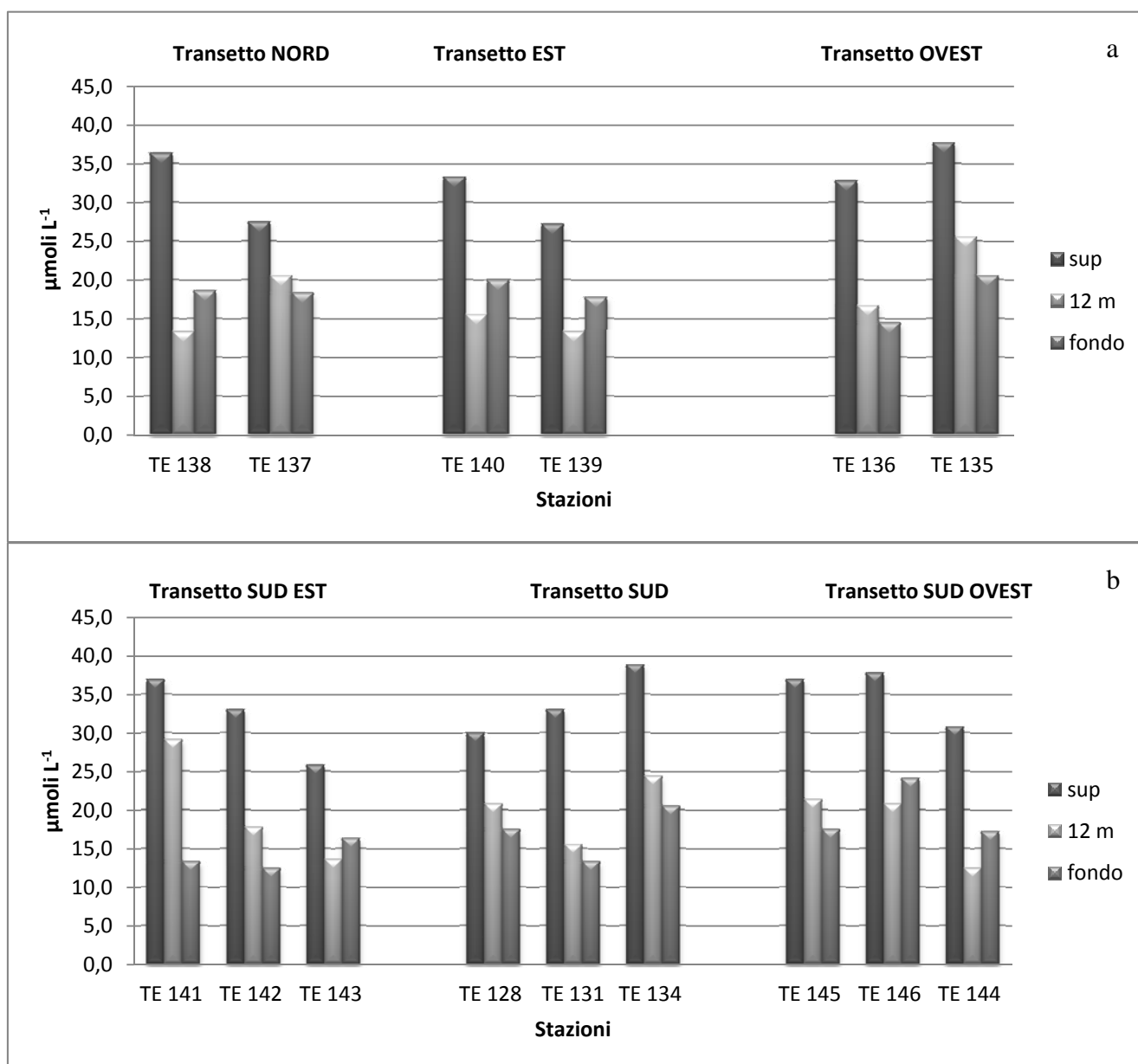
**TSS**



**Figura 6.1.2.1-a:** Concentrazioni dei **solidi sospesi totali (TSS)** nella quota superficiale, -12 m e fondo della colonna d'acqua delle stazioni suddivise a seconda dei sei differenti transetti (Nord, Est, Sud, Ovest, Sud-Est, Sud-Ovest).

Le concentrazioni medie di TSS (media  $\pm$  deviazione standard;  $1,33 \pm 0,64 \text{ mg L}^{-1}$  - figura 6.1.2.1-a) risultano basse ed abbastanza omogenee. I valori più elevati si evidenziano nella quota intermedia nel transetto Sud-Est, in particolare nelle stazioni TE141 e TE143, e nel transetto Sud-Ovest, in tutte le stazioni nella quota profonda.

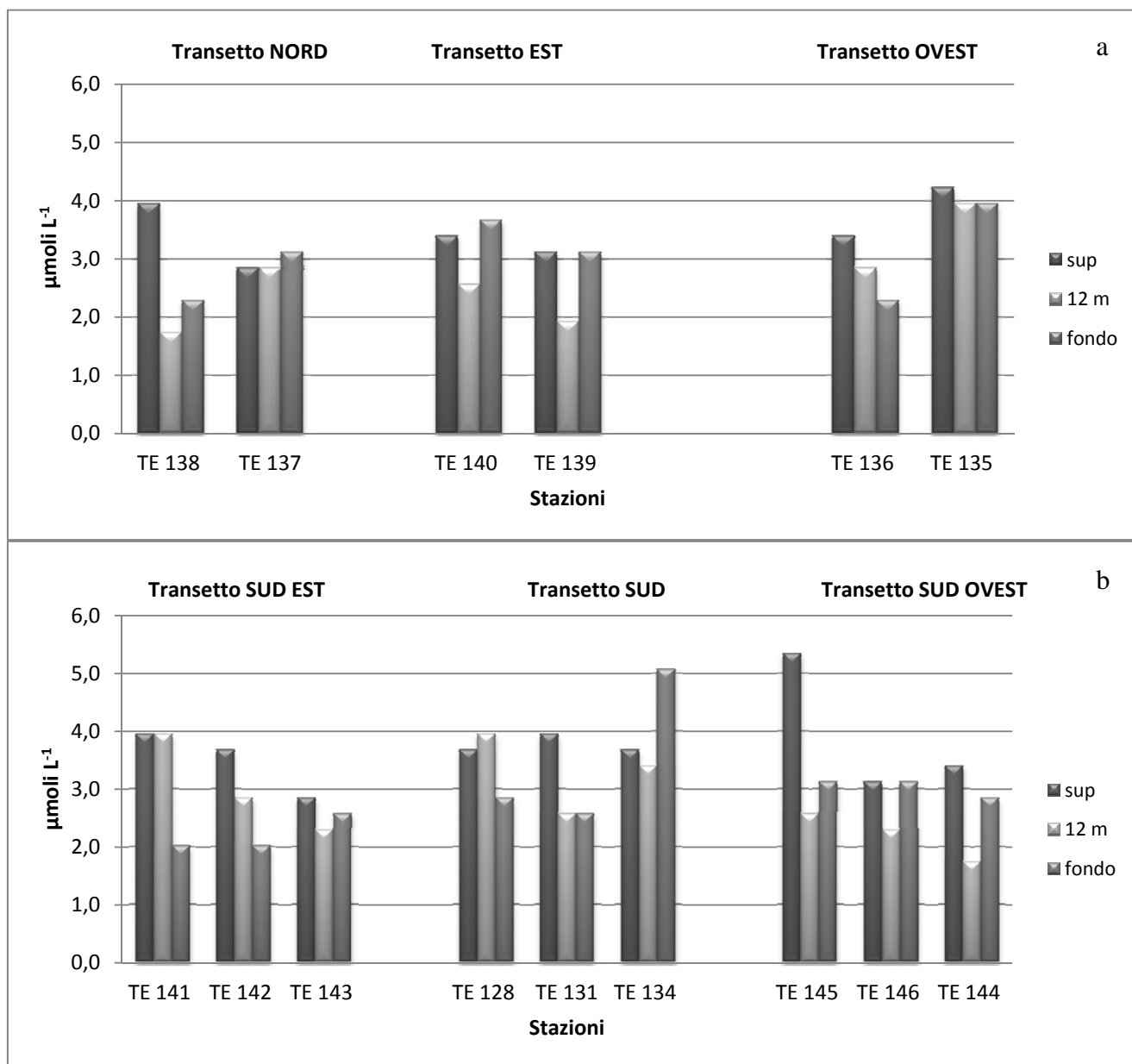
**POC**



**Figura 6.1.2.1-b:** Concentrazioni di **carbonio organico particellato (POC)** nella quota superficiale, -12 m e fondo della colonna d'acqua delle stazioni suddivise a seconda dei sei differenti transetti (Nord, Est, Sud, Ovest, Sud-Est, Sud-Ovest).

Le concentrazioni medie di POC (media  $\pm$  deviazione standard;  $23,1 \pm 8,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  - figura 6.1.2.1-b) risultano paragonabili a quelle riportate da Giani et al. (2005) per acque nord adriatiche con evidente input fluviale. I valori più elevati di POC si riscontrano nella quota superficiale in tutte le stazioni.

### TPN

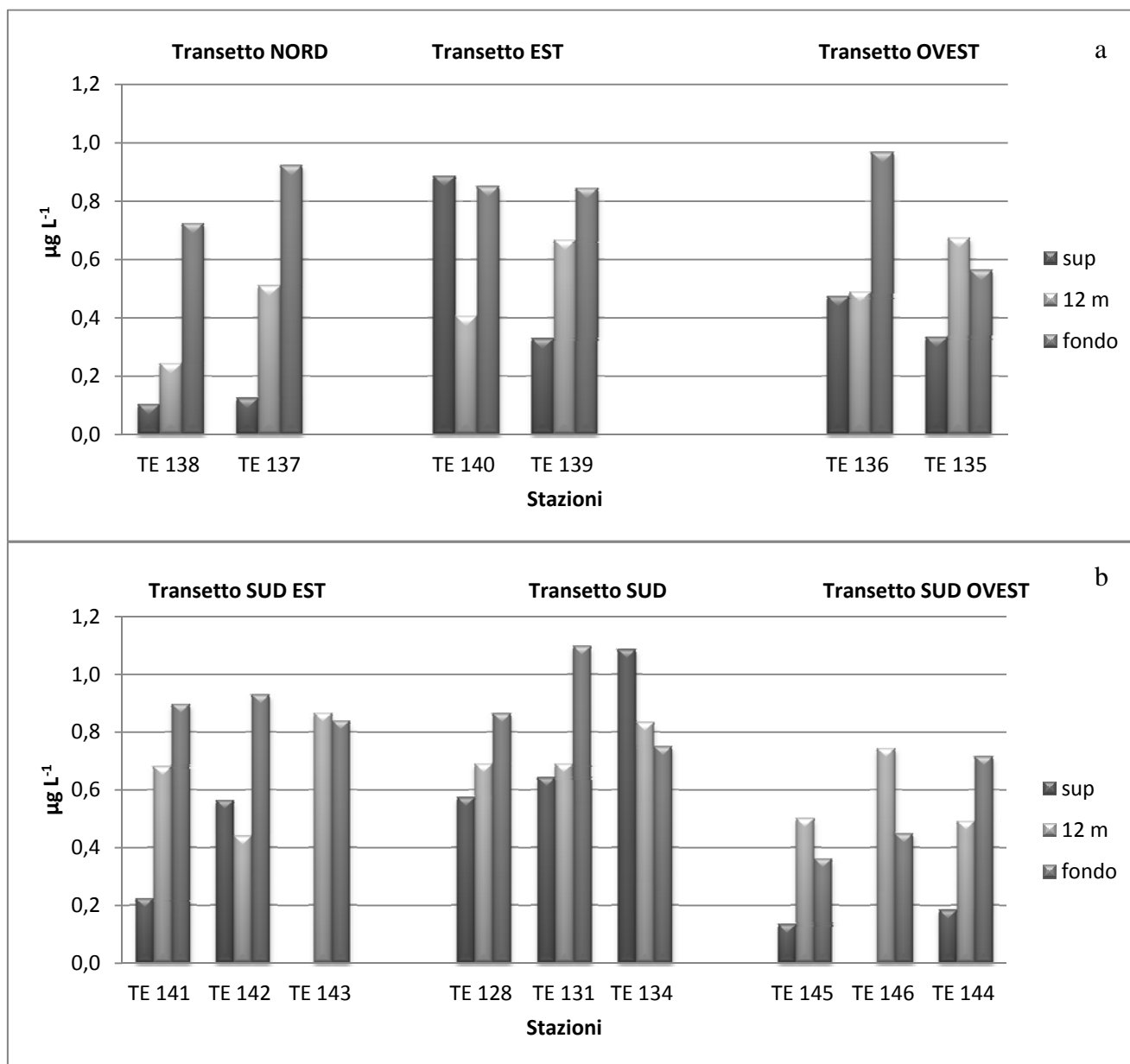


**Figura 6.1.2.1-c:** Concentrazioni dell'azoto totale particellato (TPN) nella quota superficiale, -12 m e fondo della colonna d'acqua delle stazioni suddivise a seconda dei sei differenti transetti (Nord, Est, Sud, Ovest, Sud-Est, Sud-Ovest).

La distribuzione per il TPN (media, dev. standard;  $3,1 \pm 0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  - figura 6.1.2.1-c) risulta abbastanza variabile, con concentrazioni generalmente più elevate nello strato superficiale in tutti i transetti, come già osservato per il POC. Tali concentrazioni risultano simili a quelle riportate da Giani et al. (2005) per

la fascia costiera nord Adriatica, con acque con evidente input fluviale. I valori più elevati si evidenziano nella stazione TE145 nello strato superficiale e nella stazione TE134 nello strato più profondo.

### Chl a



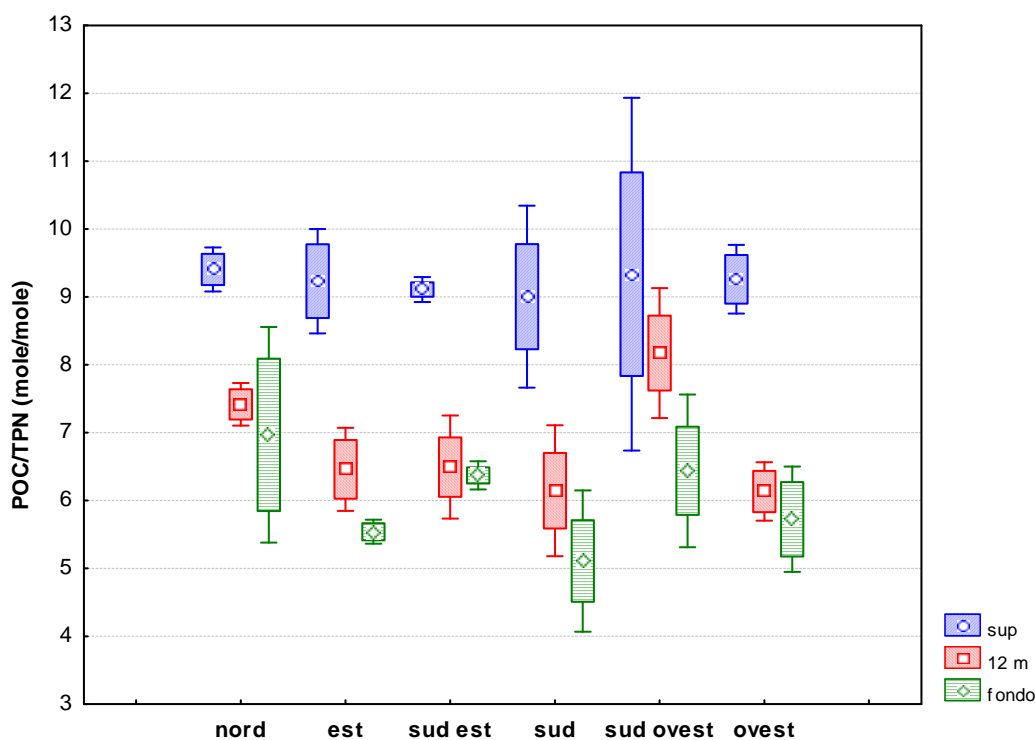
**Figura 6.1.2.1-d:** Concentrazioni di clorofilla a (Chl a) nella quota superficiale, -12 m e fondo della colonna d'acqua delle stazioni suddivise a seconda dei sei differenti transetti (Nord, Est, Sud, Ovest, Sud-Est, Sud-Ovest).

Le concentrazioni di Chl a (figura 6.1.2.1-d) risultano in media basse (media  $\pm$  deviazione standard;  $0,6 \pm 0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ), con valori mediamente più elevati nella quota intermedia (media  $\pm$  deviazione standard;  $0,6 \pm 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ed in quella prossima al fondo (media  $\pm$  deviazione standard;  $0,8 \pm 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) rispetto a quella superficiale (media  $\pm$  deviazione standard;  $0,4 \pm 0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ), che presenta le più basse

concentrazioni. Tali valori risultano simili a quelli riportati da Giani et al, (2005) per le acque costiere del nord Adriatico. I feopigmenti presentano valori molto bassi, e con concentrazioni inferiori al limite di quantificazione in molte stazioni.

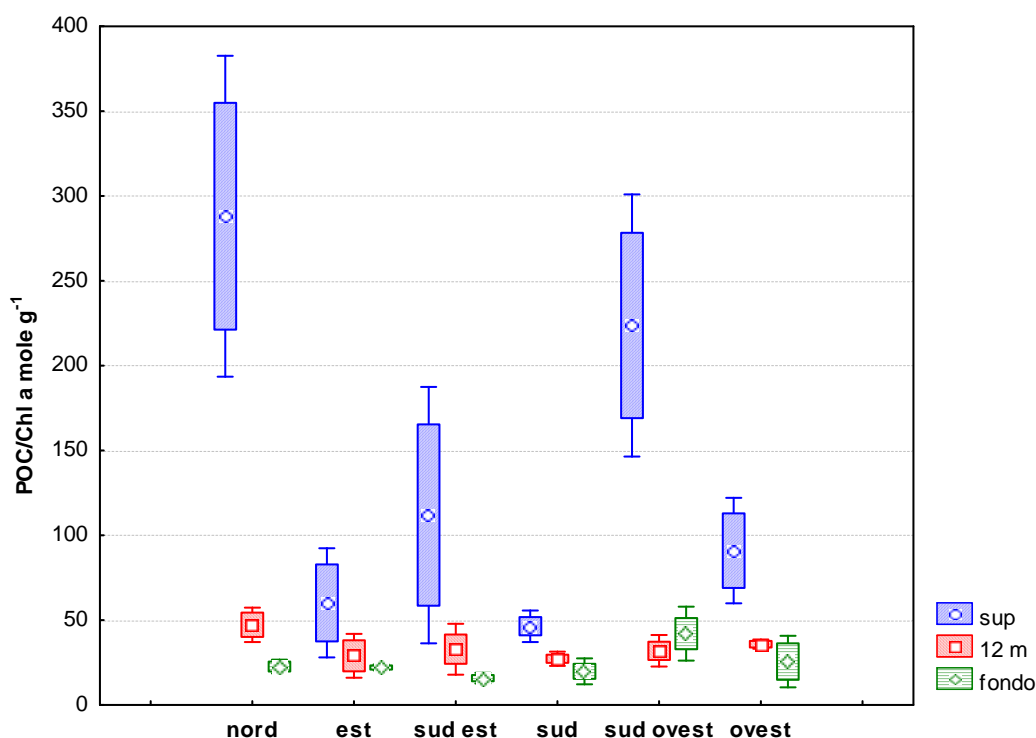
I rapporti Clorofilla *a*/feopigmenti maggiori di 1 in quasi tutte le stazioni indicano una ridotta degradazione della componente clorofilliana.

I valori elevati del rapporto molare POC/TPN in superficie (maggiori rispetto a quelli di Redfield (6,6) per il particellato fitoplanctonico, rispetto alle altre due quote (figura 6.1.2.2), indicano una maggior degradazione della componente azotata rispetto a quella carboniosa.



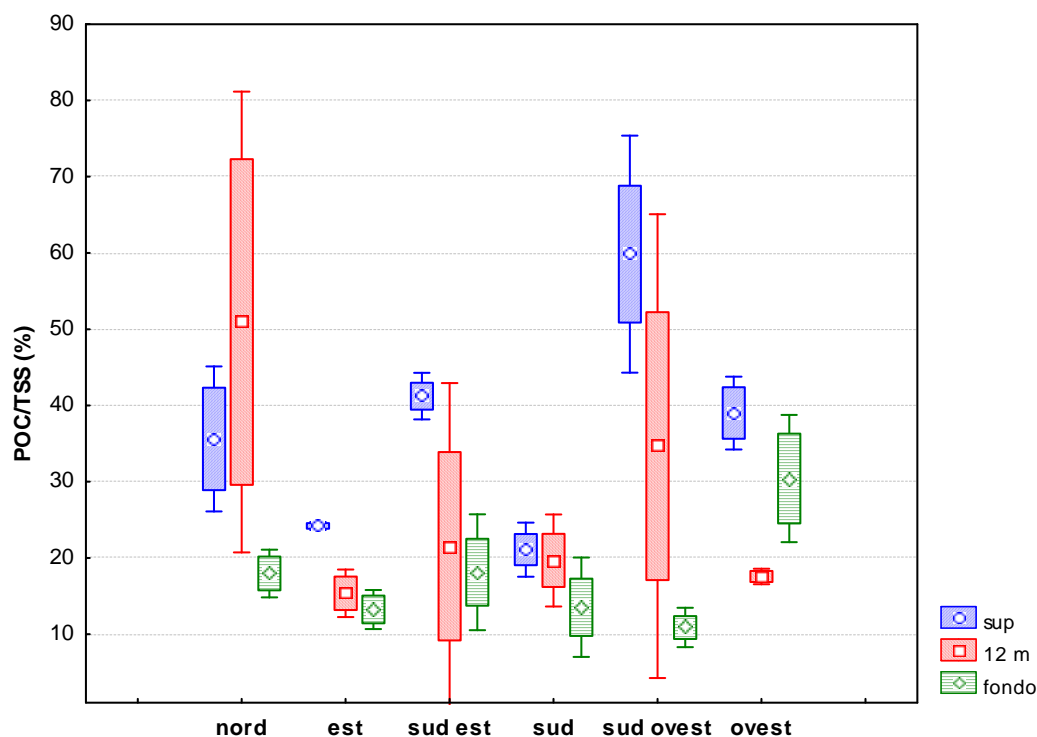
**Figura 6.1.2.2:** Valore medio, errore standard e deviazione standard del **rapporto POC/TPN** nei transetti nella quota superficiale, -12 m e fondo della colonna d'acqua delle stazioni suddivise a seconda dei sei differenti transetti (Nord, Est, Sud, Ovest, Sud-Est, Sud-Ovest).

Un maggior contributo di sostanza organica di natura sia detritica che eterotrofa nella frazione particellata nella quota superficiale, in particolare nel transetto nord, sud-est e sud-ovest rispetto al terminale, é confermato anche dagli alti rapporti POC/Chl *a*. Le quote intermedie e fondo, in tutti i transetti, presentano bassi rapporti di POC/Chl *a* tali da evidenziare un maggior contributo della componente fitoplanctonica alla frazione organica particellata (figura 6.1.2.3).



**Figura 6.1.2.3:** Valore medio, errore standard e deviazione standard del rapporto **POC/Chl a** nei transetti nella quota superficiale, -12 m e fondo della colonna d'acqua delle stazioni suddivise a seconda dei sei differenti transetti (Nord, Est, Sud, Ovest, Sud-Est, Sud-Ovest).

I bassi valori delle percentuali del rapporto POC/TSS (figura 6.1.2.4), nella quota prossima al fondo sia nel transetto sud (in tutte le quote) che sud est (quota intermedia e fondo) stanno ad evidenziare un maggior contributo della componente detritica rispetto a quella particellata organica. I valori di POC/TSS più elevati (> 30%), tali da indicare un maggiore contributo fitoplantonico alla frazione particellata, si osservano invece nei transetti nord, sud ovest ed ovest nelle quote superficiali ed intermedie.



**Figura 6.1.2.4:** Valore medio, errore standard e deviazione standard del **rapporto POC/TSS** nei transetti nella quota superficiale, -12 m e fondo della colonna d'acqua delle stazioni suddivise a seconda dei sei differenti transetti (Nord, Est, Sud, Ovest, Sud-Est, Sud-Ovest).

## Conclusioni

Le concentrazioni dei TSS incrementano in corrispondenza del fondo soprattutto in prossimità dei transetti posti a sud est e sud ovest rispetto al terminale, con invece un generale decremento dei valori superficiali di POC. Le concentrazioni di tutti i parametri nella colonna d'acqua risultano mediamente più elevate nelle stazioni nell'area a sud rispetto agli altri transetti. La componente detritica risulta rilevante, dati i bassi rapporti POC/TSS, in particolare per il transetto Sud.

Un maggior contributo di sostanza organica di natura sia detritica che eterotrofa nella frazione particellata si evidenzia nella quota superficiale, in particolare nel transetto Nord, Sud-Est e Sud-Ovest rispetto al terminale (alti rapporti POC/Chl *a*) mentre le quote intermedie e di fondo presentano rapporti di POC/Chl *a* tali da evidenziare un maggior contributo fitoplanctonico alla frazione organica particellata, anche se le concentrazioni di clorofilla *a* risultano basse.

## 6.2 Oli minerali

### 6.2.1 Materiali e metodi

La determinazione degli oli minerali totali nella matrice acquosa viene effettuata attraverso la tecnica della gas cromatografia e rivelazione a ionizzazione di fiamma previa estrazione con solvente apolare avente punto di ebollizione compreso tra i 36°C ed i 69°C.

La metodica utilizzata, ai fini dell'estrazione e determinazione degli oli totali nelle acque, è stata la ISO 9377-2:2000. Questa prevede una prima estrazione da 500 mL di acqua di mare acidificata tramite una soluzione di acido cloridrico, con n-esano addizionato con quantità note di n-decano e tetracontano. L'estratto organico viene purificato su colonna di fluorisil per abbattere il carico di sostanze polari. Dopo la purificazione la soluzione organica contenente gli oli da determinare, viene concentrata utilizzando il rotavapor secondo le seguenti modalità operative: pressione 335 mbar e temperatura 40°C.

L'analisi è stata realizzata utilizzando un gas cromatografo della Carlo Erba, modello MFC500, munito di autocampionatore e rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

L'autocampionatore impostato sul prelievo di una quantità di analita pari a 5 µL, inietta la dose prelevata nell'iniettore posto nella modalità splitless per 1 minuto. Poi il tutto è inviato in colonna cromatografica modello Thermo TR-1 rivestita internamente di un film di dimetilpolisilossano spessore 0,25 µm, lunghezza 30 metri, diametro interno 0,32 mm, in cui fluisce il gas di trasporto He stabilizzato ad un flusso pari a 1 mL/min. Altro gas utilizzato per mantenere i flussi costanti in colonna e per mantenere pulito il rivelatore è l'N<sub>2</sub>, fatto scorrere con un flusso pari a 30 mL/min.

L'analisi è stata condotta utilizzando i parametri strumentali indicati nella tabella sottostante (Tabella 6.2.1.1).

**Tabella 6.2.1.1:** Parametri strumentali gascromatografo.

Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Tempo (min)
70	/	4
/	15	/
340	/	14

La temperatura dell'iniettore e del rivelatore sono state poste rispettivamente a 320 °C e 360°C.

La quantificazione è stata effettuata utilizzando il metodo dello standard esterno, che prevede l'impiego di standard per effettuare la curva di calibrazione. A tal fine, partendo da soluzioni contenenti quantità

note di oli (Mineral Oil mixture Standard type A + Type B 10 mg/mL) e quantità note di due alcani lineari, rispettivamente n-decano e n-tetracontano, sono state preparate tre soluzioni standard a 0,1 mg/l, 0,2 mg/L e 0,3 mg/L. I due alcani utilizzati all'interno degli standard sono serviti per individuare gli estremi di integrazione nella quantificazione dell'area relativa alla costruzione della curva di calibrazione.

Il limite di quantificazione è di 0,14 mg/L.

## 6.2.2 Risultati

In Tabella 6.2.2.1 sono riportati i dati delle concentrazioni degli Oli Minerali totali rilevati nei campioni di acqua marina.

**Tabella 4.2.2.1:** Concentrazioni degli oli totali nei campioni di acqua – fase di esercizio – Luglio 2011.

Stazione	Livello	Oli minerali (mg/L)
TE128_s	superficiale	0,46
TE128_i	intermedio	0,25
TE128_p	profondo	0,36
TE131_s	superficiale	0,33
TE131_i	intermedio	0,35
TE131_p	profondo	0,33
TE134_s	superficiale	0,35
TE134_i	intermedio	0,34
TE134_p	profondo	0,33
TE135_s	superficiale	0,23
TE135_i	intermedio	0,32
TE135_p	profondo	0,33
TE136_s	superficiale	0,32
TE136_i	intermedio	0,30
TE136_p	profondo	0,34
TE137_s	superficiale	0,30
TE137_i	intermedio	0,30
TE137_p	profondo	0,28
TE138_s	superficiale	0,31
TE138_i	intermedio	0,29
TE138_p	profondo	0,30
TE139_s	superficiale	0,29
TE139_i	intermedio	0,29
TE139_p	profondo	0,33
TE140_s	superficiale	0,30
TE140_i	intermedio	0,29
TE140_p	profondo	0,30
TE141_s	superficiale	0,32
TE141_i	intermedio	0,31
TE141_p	profondo	0,30
TE142_s	superficiale	0,32
TE142_i	intermedio	0,33
TE142_p	profondo	0,33
TE143_s	superficiale	0,33
TE143_i	intermedio	0,32
TE143_p	profondo	0,32
TE144_s	superficiale	0,31
TE144_i	intermedio	0,33
TE144_p	profondo	0,32
TE145_s	superficiale	0,38
TE145_i	intermedio	0,33
TE145_p	profondo	0,32
TE146_s	superficiale	0,33
TE146_i	intermedio	0,32
TE146_p	profondo	0,31

Per le stazioni poste a Sud del terminale riscontriamo un andamento delle concentrazioni di oli pressoché costante di tutti i campioni analizzati tranne quello in corrispondenza del prelievo effettuato a 10 metri di distanza dal terminale allo strato superficiale (TE128\_s), dove è stato quantificato un valore leggermente superiore di 0,46 mg/L (Figura 6.2.2.1).

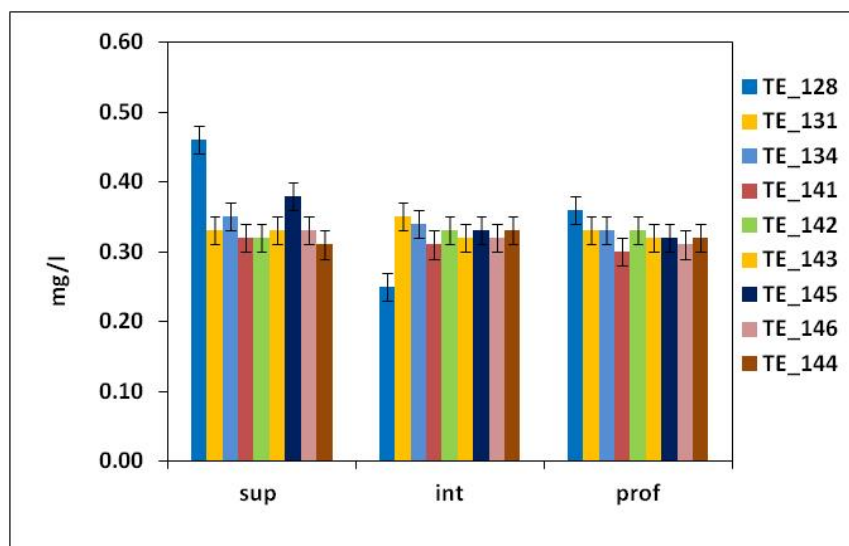


Figura 6.2.2.1: Determinazioni oli minerali totali nelle stazioni a Sud del terminale.

Per le stazioni situate ad Ovest del terminale i valori mostrano un andamento costante tra loro ed in linea con quelli del grafico precedente (Figura 6.2.2.2).

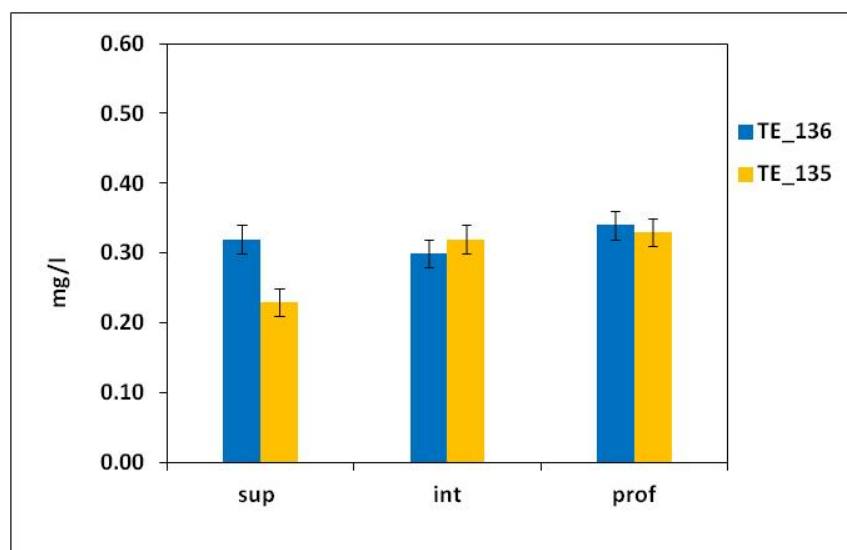


Figura 6.2.2.2: Determinazioni oli minerali totali nelle stazioni a Ovest del terminale.

Anche le concentrazioni degli oli minerali totali nei campioni prelevati lungo le stazioni poste a Nord del terminale presentano valori paragonabili sia a quelli relativi al transetto posto ad Ovest del terminale, che quelli del transetto a Sud (Figura 6.2.2.3).

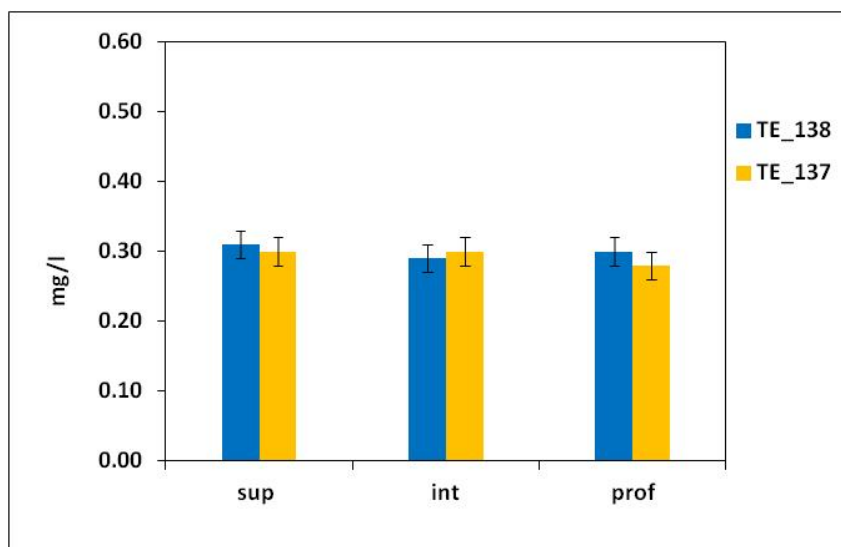


Figura 6.2.2.3: Determinazioni oli minerali totali nelle stazioni a Nord del terminale.

Infine, anche per le stazioni poste ad Est del terminale, si notano valori di concentrazione paragonabili ai campioni prelevati nei punti collocati a Nord, ad ovest e a Sud (Figura 6.2.2.4).

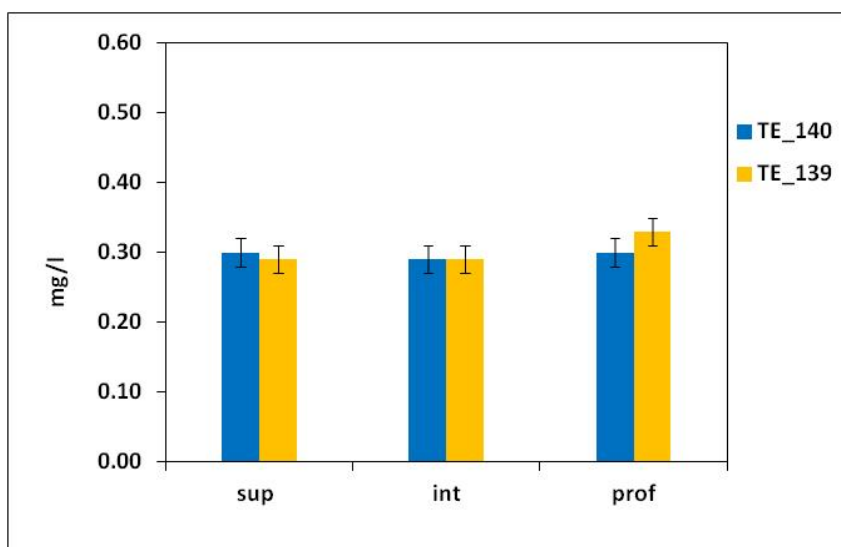


Figura 6.2.2.4: Determinazioni oli minerali totali nelle stazioni a Est del terminale.

Si è riscontrata una distribuzione di frequenza delle concentrazioni intorno a valori di 0,33 mg/L. Tali valori sono in linea con i valori riscontrati precedentemente nella campagna eseguita a Settembre 2010. Sembrerebbe non esistere un chiaro gradiente di concentrazione imputabile alla presenza del terminale.

### **6.3 Sottoprodotti della disinfezione**

I sottoprodotti della disinfezione sono composti organici derivanti dalla reazione del cloro, aggiunto all'acqua in qualità di agente disinfettante, con i composti organici naturalmente presenti nell'acqua di mare.

Di questa classe di composti fanno parte gli Alometani, gli Aloacetoni, gli Acidi Aloacetici e gli Alofenoli, sostanze tossiche ed alcune sospette cancerogene.

Gli Alometani sono composti derivati dal metano (formula  $\text{CH}_4$ ) in cui uno o più atomi di idrogeno sono sostituiti da uno o più atomi di cloro e/o di bromo; sono sostanze volatili sospettate anche di provocare danni epatici, ai reni e al sistema nervoso centrale. Gli acidi aloacetici sono sostanze a bassa volatilità che si formano preferenzialmente quando il pH dell'acqua è basso; sono derivati dell'acido acetico ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) in cui uno o più idrogeno metilico è sostituito da uno o più atomi di cloro e/o di bromo. Gli aloacetoni sono composti generalmente presenti in concentrazioni inferiori rispetto agli altri sottoprodotti, in quanto subito dopo la formazione tendono a decomporsi per meccanismi di idrolisi; il composto aceto nitrile (formula chimica  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) ha gli idrogeni sostituiti da uno o più atomi di cloro e/o di bromo. Gli alofenoli sono sostanze derivanti dal fenolo (formula chimica  $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ) in cui uno o più idrogeni dell'anello benzenico sono sostituiti da atomi di cloro e/o di bromo. Sono composti ad elevata tossicità, che si formano per clorurazione delle sostanze umiche presenti nell'acqua di mare.

#### ***6.3.1 Materiali e metodi***

##### **Alometani e Composti Organici Volatili (VOC)**

Sono stati analizzati in campioni di acqua marina i seguenti composti volatili organoalogenati: Cloroformio, Tetracloruro di Carbonio, Tricloroetilene, Bromodichlorometano, Tetracloroetene, Dibromoclorometano, Bromoformio, 1,2 dibromoetano, 1,1,1 tricloroetano, 1,1,2 tricloroetano.

I campioni di acqua sono stati campionati in vials di vetro ambrati da 40 ml del tipo "EPA Washed" con tappo a vite e setto in Silicone/Teflon a tenuta, riempiendoli completamente ed immediatamente tappati. I campioni sono stati conservati a +4 °C fino al momento delle analisi.

Il principio del metodo prevede lo strippaggio dei composti volatili insufflando Elio ad elevato grado di purezza per un determinato periodo di tempo. I composti vengono intrappolati su un adsorbente e successivamente desorbiti ad alta temperatura ed inviati allo stato gassoso al gas-cromatografo per la separazione e la determinazione quali-quantitativa.

Sono stati analizzati nei campioni di acqua marina i seguenti composti volatili organoalogenati:

Cloroformio, Tetracloruro di Carbonio, Tricloroetilene, Bromodiclorometano, Dibromoclorometano, Bromoformio, 1,2 Dibromoetano, 1,1,1 Tricloroetano e 1,1,2 Tricloroetano.

I campioni di acqua sono stati campionati in vials di vetro ambrati da 40 ml del tipo “EPA Washed” con tappo a vite e setto in Silicone/Teflon a tenuta, riempiendoli completamente ed immediatamente tappati. I campioni sono stati conservati a +4 °C fino al momento delle analisi.

Il principio del metodo prevede lo strippaggio dei composti volatili insufflando Elio ad elevato grado di purezza per un determinato periodo di tempo. I composti vengono intrappolati su un adsorbente e successivamente desorbiti ad alta temperatura ed inviati allo stato gassoso al gas-cromatografo per la separazione e la determinazione quali-quantitativa.

Lo strumento utilizzato per l'estrazione-concentrazione è un Purge and Trap “Eclipse” modello 4660 accoppiato ad un autocampionatore per acqua e sedimenti modello 4552 entrambi della “OI Analytical”.

Il gas-cromatografo è un Agilent Technologies 6890N accoppiato ad un rivelatore a Spettrometria di massa MSD 5973.

L'autocampionatore in modalità “*water*” preleva dal *vial* 5 ml di campione e li trasferisce in un tubo di vetro detto “*sparger*”, dove avviene lo strippaggio dei composti volatili in corrente di Elio (99,9995% puro) insufflando il gas per 11 minuti, mantenendo il campione alla temperatura di 40°C. I composti volatili strippati vengono concentrati a temperatura ambiente su una trappola “trifasica” (tenax/sigel/carbosieve) e quindi desorbiti portando la trappola a 190°C per 2 minuti. Successivamente, i composti da determinare vengono trasferiti al Gas Cromatografo.

Lo strumento e le condizioni gas-cromatografiche utilizzate sono state le seguenti:

Colonna DB624, lunghezza 30 m, D.I. 0,25 mm, *Film Thickness* 1,4 µm; gas di trasporto Elio flusso 0.9 ml/min a flusso costante. Iniettore *split/splitless* in modalità *split* alla temperatura di 200°C. Temperatura del forno: isoterma a 35°C per 4 min., quindi rampa di 15°C/min. fino ad arrivare alla temperatura finale di 150°C a cui resta per 3 minuti.

Il rivelatore è uno Spettrometro di Massa in modalità SIM.

L'identificazione dei composti è stata effettuata mediante confronto dei tempi di ritenzione dei picchi incogniti con quelli degli standard e mediante confronto delle abbondanze relative degli ioni.

La determinazione quantitativa è stata effettuata per interpolazione da una curva di calibrazione a 5 punti ottenuta da miscele standard a concentrazioni variabili, che hanno subito la stessa procedura dei campioni.

Il metodo analitico utilizzato e i limiti di quantificazione (LOQ) per ciascuna sostanza sono elencati nella Tabella 6.3.1.1.

**Tabella 6.3.1.1:** Metodo analitico e limiti di quantificazione degli alometani e VOC in acqua.

Parametro	Metodo analitico	Limite di quantificazione ( $\mu\text{g/l}$ )
<b>Cloroformio</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,010
<b>1,1,1 Tricloroetano</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,015
<b>Tetracloruro di carbonio</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,015
<b>Tricloroetilene</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,010
<b>Bromodiclorometano</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,010
<b>1,1,2 Tricloroetano</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,015
<b>Dibromoclorometano</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,010
<b>1,2 Dibromoetano</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,015
<b>Bromoformio</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,010

### **Alcetonitrili e altri sottoprodotti della clorazione**

Il campione d'acqua viene campionato in vial da 40 ml in vetro e addizionato di 4 mg di cloruro di ammonio. Dopo il prelievo, si aggiusta il pH del campione a 4.5-5 mediante aggiunta di HCl.

I campioni vengono quindi mantenuti a +4°C fino al momento delle analisi, che vengono effettuate non oltre i 14 giorni dal campionamento.

Per le analisi del campione si procede come segue: si preleva con pipetta graduata 35 ml di acqua di mare e si trasferiscono in vial di vetro da 60 ml, si aggiungono 50  $\mu\text{l}$  di soluzione contenente lo standard interno (4bromo-F-benzene) alla concentrazione finale di 25  $\mu\text{g/l}$ . Si addizionano 8 g di cloruro di sodio e si agita per 20 secondi. Si aggiungono 2 ml di Metil-ter-butiletere (MTBE) e si agita vigorosamente per 1 minuto. Si lascia decantare, si preleva l'MTBE surnatante e si inietta al gascromatografo con rivelatore a spettrometria di massa.

Il gas-cromatografo utilizzato è un Agilent Technologies 6890 con rivelatore a spettrometria di massa 5973. Le condizioni gas-cromatografiche utilizzate sono state le seguenti: colonna HP5, lunghezza 30 m, D.I. 0,25 mm, spessore della fase stazionaria 0,25  $\mu\text{m}$ ; gas di trasporto Elio 0.9 ml/min a flusso costante. Iniettore *split/splitless* in modalità *split* alla temperatura di 200°C. Temperatura del forno: isoterma a 35°C per 5 min., quindi rampa di 5°C/min. fino a 110°C, quindi rampa a 20°C/min. fino a 200°C a cui resta per 1 minuto. Il rivelatore è uno Spettrometro di Massa in modalità SIM.

L'identificazione dei composti è stata effettuata mediante confronto dei tempi di ritenzione dei picchi incogniti con quelli degli standard e mediante confronto delle abbondanze relative degli ioni.

La determinazione quantitativa è stata effettuata mediante la tecnica dello standard interno iniettando almeno 4 soluzioni standard di calibrazione, a diversa concentrazione, nel range atteso nei campioni da analizzare.

Le soluzioni standard sono preparate e subito estratte con lo stesso procedimento usato per i campioni. Prima della estrazione dei campioni si è proceduto a valutare il recupero del metodo, secondo quanto descritto nel metodo EPA 551. Si sono quindi analizzati sette campioni di acqua di mare sintetica fortificata con soluzione standard contenente i composti da analizzare ad una concentrazione pari a 1 µg/l. Il recupero medio percentuale e la relativa deviazione standard sono elencati nella Tabella 6.3.1.2.

**Tabella 6.3.1.2:** Percentuali di recupero del metodo e relative deviazioni standard.

Composto	R medio %	DS
Tricloroacetoneitrile	96	3
Dicloroacetoneitrile	91	6
1,1dicloro-2-propanone	97	17
Cloropicrina	98	3
1,1,1tricloropropano	89	5
Dibromoacetoneitrile	93	7

Per il controllo della qualità del dato si è inoltre proceduto all'analisi di bianchi di laboratorio per ogni serie di campioni analizzati e al controllo periodico del recupero di soluzioni di acqua di mare fortificata. Inoltre sono stati inseriti nella sequenza di analisi standard di controllo, ad intervalli regolari, per la verifica continua delle prestazioni strumentali.

Il metodo analitico utilizzato e i limiti di quantificazione per ciascun composto sono elencati nella Tabella 6.3.1.3.

**Tabella 6.3.1.3:** Metodo analitico e limiti di quantificazione degli aloacetoneitrili in acqua.

Parametro	Metodo analitico	Limite di quantificazione (µg/l)
<b>1,1 Dicloro2propanone</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,1
<b>Dicloroacetoneitrile</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,1
<b>Tricloroacetoneitrile</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,1
<b>1,1,1 Tricloro2propanone</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,2
<b>1,2,3 Tricloropropano</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,1
<b>1,2,3 Dibromo-3-cloropropano</b>	EPA 5030B e 8260B modificati	0,1

### **Acidi Aloacetici e Dalapon**

Il metodo prevede l'acidificazione del campione acquoso e l'estrazione degli acidi aloacetici con solvente organico, successiva derivatizzazione a caldo con metanolo acidificato, neutralizzazione e determinazione quantitativa, degli acidi metilati, per gas cromatografia capillare con rivelatore a cattura di elettroni.

Il campione acquoso è stato prelevato in bottiglia di vetro scuro, addizionato di cloruro di ammonio e conservato in frigo a +4°C fino al momento dell'analisi.

Si prelevano 40 ml di campione e si fortificano con il surrogato a concentrazione nota. Aggiustare il pH fino ad un valore uguale o inferiore a 0,5 addizionando acido solforico concentrato; controllare il pH con una cartina indicatrice. Aggiungere circa 18 g di sodio solfato anidro immediatamente dopo l'aggiunta dell'acido solforico e agitare fino a scioglierlo quasi completamente.

Addizionare 4 ml di MTBE (Metil-ter-butiletere) in cui è presente lo standard interno a concentrazione nota ed agitare vigorosamente per 3 minuti. Lasciare che le fase organica e la fase acquosa si separino per circa 5 minuti. Trasferire 3 ml dell'estratto organico in una provetta conica da 15 ml con tappo a vite in Teflon.

Per la derivatizzazione aggiungere 3 ml di metanolo acidificato al 10% con acido solforico concentrato e chiudere bene il tappo a vite. Porre il campione nel bagno termostato alla temperatura di  $50 \pm 2$  °C e lasciare a reagire per 2 ore ( $\pm 10$  minuti). La reazione di metilazione è la fase critica del metodo quindi controllare attentamente sia il tempo che la temperatura di reazione; se necessario utilizzare un termometro per verificare la temperatura del bagno. Rimuovere la provetta dal bagno e lasciarla raffreddare prima di aprirla.

Addizionare 7 ml di una soluzione di sodio solfato alla concentrazione di 150 g/l. Agitare il campione vigorosamente con l'aiuto di un agitatore meccanico per pochi minuti, quindi lasciar separare le due fasi. Utilizzando una pipetta Pasteur con punta lunga, rimuovere con cura la fase acquosa acida che si trova nella parte inferiore della provetta. Non lasciare più di 0,3 ml di soluzione acquosa e procedere alla neutralizzazione della fase organica.

Aggiungere 1 ml di una soluzione satura di bicarbonato di sodio e agitare vigorosamente per diversi secondi per almeno quattro volte. Svitare il tappo della provetta dopo la prima agitazione per permettere la fuoriuscita della CO<sub>2</sub> prodotta.

Trasferire 1 ml di estratto, contenente gli acidi aloacetici metilati, nel *vial* per autocampionatore GC e conservare a -10°C, o meno, fino al momento dell'analisi che deve essere eseguita il prima possibile e non oltre i 21 giorni dall'estrazione. Si può preparare un duplicato con l'estratto rimanente.

La determinazione quali-quantitativa è stata effettuata su un gas cromatografo Agilent Technologies 6890 con rivelatori a cattura di elettroni iniettando su due colonne a diversa polarità per la conferma della sostanza. Il metodo cromatografico utilizzato per l'analisi degli acidi aloacetici metilati è il seguente:

Colonna 1: DB-1701, lunghezza 30 m, d.i. 0.25 mm, film 0.25 µm.

Colonna 2: DB-5, lunghezza 30 m, d.i. 0.25 mm, film 0.25 µm.

Gas di trasporto: elio flusso di 1,0 ml/min.

Iniettore: *split/splitless* in modalità *splitless*, temperatura di 200°C.

Rampa di temperatura: isoterma a 35°C per 10 min., rampa fino a 75°C a 5°C/min. per 15 min., rampa fino a 100°C a 5°C/min. per 5 min., a seguire rampa fino a 135°C a 5°C/min. per 2 min.

Rivelatore: micro ECD temperatura 260°C. Gas di make-up: azoto 30.0 ml/min.

L'identificazione degli acidi aloacetici metilati viene condotta per confronto dei tempi di ritenzione ottenuti iniettando, nelle stesse condizioni, soluzioni standard degli stessi composti su entrambe le colonne. La determinazione quantitativa dei composti identificati e confermati dalla doppia colonna, è effettuata mediante la tecnica dello standard interno iniettando almeno 5 soluzioni standard di calibrazione, a diversa concentrazione, nel range atteso nei campioni da analizzare.

Le soluzioni standard degli acidi aloacetici, così come i bianchi di processo, sono preparate in acqua di mare sintetica (preparazione secondo metodo ISO-10253) e subiscono lo stesso procedimento analitico del campione reale per essere sottoposte alla metilazione.

Per il controllo del dato analitico si effettuano bianchi di processo per ogni serie di campioni analizzata giornalmente. Il bianco di processo, deve avere un livello di background accettabile per poter procedere alla quantificazione; nel caso in cui il picco di un interferente cada nella stessa finestra del tempo di ritenzione dei nostri analiti deve essere ricercata ed eliminata la causa della contaminazione prima di ripetere l'analisi. L'aggiunta del surrogato nel campione, prima dell'analisi, serve a valutare le prestazioni dell'intero metodo dall'estrazione alla determinazione gas cromatografica. Se il recupero del surrogato è inferiore al 70% o superiore al 130% si deve correggere il problema e ripetere l'analisi del campione. Inoltre sono stati inseriti nella sequenza di analisi standard di controllo, ad intervalli regolari, per la verifica continua delle prestazioni strumentali. Il metodo analitico utilizzato e i limiti di quantificazione per ciascun composto sono elencati nella Tabella 6.3.1.4.

**Tabella 6.3.1.4:** Metodo analitico e limiti di quantificazione degli acidi aloacetici in acqua.

Parametro		Metodo analitico	Limite di quantificazione (µg/l)
Sigla	Dicitura estesa		
<b>MCAA</b>	MonoCloroAcetic Acid	EPA 552.2 - 552.3 modificati	3
<b>MBAA</b>	MonoBromoAcetic Acid	EPA 552.2 - 552.3 modificati	1
<b>Dalapon</b>	Dalapon	EPA 552.2 - 552.3 modificati	1
<b>DCAA</b>	DiCloroAcetic Acid	EPA 552.2 - 552.3 modificati	1,5
<b>TCAA</b>	TriCloroAcetic Acid	EPA 552.2 - 552.3 modificati	0,5
<b>BCAA</b>	BromoCloroAcetic Acid	EPA 552.2 - 552.3 modificati	1
<b>BDCAA</b>	BromoDiCloroAcetic Acid	EPA 552.2 - 552.3 modificati	1
<b>DBAA</b>	DiBromoAcetic Acid	EPA 552.2 - 552.3 modificati	0,5
<b>CDBAA</b>	CloroDiBromoAcet Acid	EPA 552.2 - 552.3 modificati	2,5
<b>TBAA</b>	TriBromoAcetic Acid	EPA 552.2 - 552.3 modificati	5

## **Alofenoli**

Le analisi degli alofenoli in campioni acquosi sono state effettuate con la tecnica della pre-concentrazione estrattiva su fase solida (SPE) e successiva determinazione gas-cromatografica accoppiata a rivelatore a spettrometria di massa.

I campioni di acqua di mare per le analisi degli alofenoli sono stati prelevati in bottiglie di vetro scuro da 1 litro e immediatamente conservate in frigo alla temperatura di +4°C fino al momento delle analisi.

### **Preconcentrazione - estrazione su dischi C18**

1. Lavaggio dei dischi: viene effettuato con una miscela di diclorometano/acetone (80:20), facendo prima passare una piccola quantità di solvente attraverso il disco e lasciando imbibire per circa 1 minuto; si fa quindi passare tutto il solvente (20 ml) e si fa asciugare il disco. A seguire si fa passare 10 ml di acetone come al punto 1 e si lascia asciugare.

Si aggiungono 20 ml di acqua “*organic free*” acidificata a pH2 con acido cloridrico, si aziona la pompa da vuoto, avendo cura di non portare a secco.

2. Estrazione: il campione acquoso viene acidificato a pH2 con acido cloridrico e fatto passare attraverso il disco; si lascia asciugare il disco per 5 minuti attraverso l'azione della pompa da vuoto.

A questo punto, si inserisce nell'apparecchiatura SPE il *vial* di raccolta per l'eluato. Dopo il passaggio del campione, il disco viene eluito con 5 ml di acetone, facendo passare il solvente goccia a goccia avendo cura di non mandare a secco e a seguire 25 ml di una miscela diclorometano/acetone (80:20), lavando con la miscela le pareti del contenitore che conteneva il campione e poi eluendo.

L'eluato viene anidrificato mediante passaggio attraverso colonnina contenente sodio solfato anidro e quindi portato a piccolo volume mediante rotavapor (T del bagno 45°C e P pari a 550 mBar) e a completa secchezza manualmente. Si riprende con 1 ml esatto (micro-siringa o pipetta da 1 ml di classe “A”) di diclorometano e si trasferisce la soluzione in *vial* per auto-campionatore GC avendo cura di segnare l'eventuale variazione di volume dovuta alla elevata volatilità del diclorometano.

L'analisi gas cromatografia è stata effettuata su gascromatografo Agilent Technologies 6890 accoppiato a un rivelatore a spettrometria di massa 5973 in modalità SIM. La colonna utilizzata è una DB5-MS lunghezza 30 metri, diametro interno 0,25 mm, spessore della fase stazionaria 0,25 µm. Iniettore *split/splitless* in modalità *split*, temperatura di 280°C; temperatura forno: isoterma di 35°C per 5 minuti poi rampa di 20°C/min fino a 250 °C per 1 minuto. Gas di trasporto elio ad elevato gradi di purezza con flusso in colonna a 0,9 ml/min.

L'identificazione dei composti è stata effettuata mediante confronto dei tempi di ritenzione dei picchi incogniti con quelli degli standard e mediante confronto delle abbondanze relative degli ioni.

La determinazione quantitativa è stata effettuata mediante la tecnica dello standard interno iniettando almeno 4 soluzioni standard di calibrazione, a diversa concentrazione, nel range atteso nei campioni da analizzare.

Le soluzioni standard sono preparate aggiungendo gli standard a 500 ml di acqua di mare sintetica sottoponendole allo stesso procedimento analitico del campione reale.

Per ottimizzare la qualità del dato analitico sono state messe in pratica le seguenti procedure: esecuzione di bianchi di processo per ogni serie di campioni analizzata giornalmente; verifica della risposta strumentale mediante uso di standard di controllo; controllo periodico del recupero di campioni di acqua di mare sintetica fortificata.

Il metodo analitico utilizzato e i limiti di quantificazione per ciascun composto sono elencati nella Tabella 6.3.1.5.

**Tabella 6.3.1.5:** Metodo analitico e limiti di quantificazione degli alofenoli in acqua.

Parametro	Metodo analitico	Limite di quantificazione ( $\mu\text{g/l}$ )
2,4 Diclorofenolo	Metodo ISPRA 2009 modificato sito web <a href="http://www.isprambiente.it">www.isprambiente.it</a>	0,2
4-Cloro-3-Metilfenolo		0,2
2,4,6 Triclorofenolo		0,2
Pentaclorofenolo		0,2

### 6.3.2 Risultati

#### Alometani e Composti Organici Volatili (VOC)

I risultati delle determinazioni analitiche effettuate nei campioni di acqua di mare prelevati nell'area del Terminale sono mostrati in Tabella 6.3.2.1.

I valori ottenuti sono perlopiù inferiori al limite di quantificazione del metodo per ciascun composto ad eccezione del bromoformio del quale si evidenzia una presenza diffusa nei campioni analizzati e, in particolare, nella stazione TE128 livello superficiale dove è stato rilevato anche il Dibromoclorometano.

**Tabella 6.3.2.1:** Concentrazione di Alometani e VOC nei campioni di acqua – fase di esercizio – Luglio 2011.

Stazione	Livello	Cloroformio	1,1,1 Tricloro etano	Tetracloruro di carbonio	Tricloro etilene	Bromodichloro metano	1,1,2 Tricloroetano	Dibromocloro metano	1,2 Dibrometano	Bromoformio
		µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
TE 128	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	0,02	<0,015	1,26
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,01
TE 131	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,47
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE 134	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,02
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE 135	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,01
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,38
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE 136	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,04
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,01
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE 137	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,01
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE 138	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,01
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,02
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01

Stazione	Livello	Cloroformio	1,1,1 Tricloro etano	Tetracloruro di carbonio	Tricloro etilene	Bromodichloro metano	1,1,2 Tricloroetano	Dibromocloro metano	1,2 Dibrometano	Bromoformio
		µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
TE 139	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,03
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE 140	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,02
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,13
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE 141	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,11
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,03
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,02
TE142	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,09
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,09
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,01
TE 143	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,03
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,04
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE144	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,08
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,02
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE145	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,07
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,01
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
TE146	superficiale	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	0,07
	intermedio	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01
	profondo	<0,01	<0,015	<0,015	<0,01	<0,01	<0,015	<0,01	<0,015	<0,01

### Aloacetonitrili e altri sottoprodotti della clorazione

I risultati delle determinazioni analitiche effettuate nei campioni di acqua di mare prelevati lungo il Terminale sono mostrati in Tabella 6.3.2.2. I valori ottenuti sono sempre inferiori al limite di quantificazione del metodo per ciascun composto.

**Tabella 6.3.2.2:** Concentrazione di Aloacetonitrili nei campioni di acqua – fase di esercizio - Luglio 2011.

Stazione	Livello	1,1 Dicloro2 propanone	Dicloro acetoneitrile	Tricloro acetoneitrile	1,1,1 Tricloro2 propanone	1,2,3 Tricloro propano	1,2,3 Dibromo-3 - cloropropano
		µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
TE 128	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 131	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 134	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 135	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 136	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 137	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 138	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 139	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 140	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 141	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1

Stazione	Livello	1,1 Dicloro2 propanone	Dicloro acetoneitrile	Tricloro acetoneitrile	1,1,1 Tricloro2 propanone	1,2,3 Tricloro propano	1,2,3 Dibromo-3 - cloropropano
		µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
TE142	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE 143	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE144	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE145	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
TE146	superficiale	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	intermedio	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1
	profondo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	<0,1

### Acidi Aloacetici e Dalapon

I risultati delle determinazioni analitiche effettuate nei campioni di acqua di mare prelevati lungo il Terminale sono mostrati in Tabella 6.3.2.3. I risultati acquisiti mostrano valori quasi sempre inferiori al limite di quantificazione del metodo per ciascuna sostanza, con le uniche due eccezioni della stazione TE136 dove, nel livello più profondo, troviamo valori superiori al LOQ per gli acidi Monocloroacetico (MCAA), Monobromoacetico (MBAA), Dibromoacetico (DBAA) e per il Dalapon e, della stazione TE128, livello superficiale, dove troviamo tracce di acido Dibromoacetico.

**Tabella 6.3.2.3:** Concentrazione di Acidi Aloacetici nei campioni di acqua – fase di esercizio - Luglio 2011.

Stazione	Livello	MCAA	MBAA	DCAA	Dalapon	TCAA	BCAA	DBAA	BDCAA	CDBAA	TBAA
		µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
TE128	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	2,1	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE131	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE134	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE135	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5

Stazione	Livello	MCAA	MBAA	DCAA	Dalapon	TCAA	BCAA	DBAA	BDCAA	CDBAA	TBAA
		µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
TE136	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	8,6	4,1	<1,5	1,1	<0,5	<1	0,8	<1	<2,5	<5
TE137	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE138	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE139	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE140	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE141	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE142	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE143	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE144	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE145	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
TE146	superficiale	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	intermedio	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5
	profondo	<3	<1	<1,5	<1,0	<0,5	<1	<0,5	<1	<2,5	<5

### Alofenoli

I risultati delle determinazioni analitiche effettuate nei campioni di acqua di mare prelevati lungo il Terminale sono mostrati in Tabella 6.3.2.4.

I risultati ottenuti hanno mostrato valori sempre inferiori al limite di quantificazione del metodo per ciascun composto.

**Tabella 6.3.2.4:** Concentrazione di Alofenoli nei campioni di acqua – fase di esercizio – Luglio 2011.

Stazione	Livello	2,4 diclorofenolo	4-cloro-3-metilfenolo	2,4,6 triclorofenolo	pentaclorofenolo
		µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
TE 128	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 131	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 134	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 135	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 136	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 137	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 138	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 139	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 140	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 141	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE142	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE 143	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE144	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE145	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
TE146	superficiale	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	intermedio	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	profondo	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2

## 6.4 Microbiologia

### 6.4.1 Materiali e metodi

Per l'analisi microbiologica di Coliformi fecali, Coliformi totali e Streptococchi fecali sono stati utilizzati i metodi sotto riportati (Tabella 6.4.1.1).

**Tabella 6.4.1.1:** Metodi e Limiti di rilevabilità per le analisi microbiologiche.

Parametro	Metodo analitico	Limite di quantificazione (UFC/100ml)
Coliformi fecali	APAT CNR IRSA 7020B Man. 29 2003	50
Coliformi totali	APAT CNR IRSA 7010C Man. 29 2003	50
Streptococchi fecali ed enterococchi	APAT CNR IRSA 7040C Man. 29 2003	50

### 6.4.2 Risultati

Nella tabella 6.4.2.1 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sui campioni di acqua prelevati a Luglio 2011.

I valori riscontrati nei campioni prelevati presentano tutti valori inferiori al limite di rilevabilità, pari a 50 UFC/100 ml, ad eccezione delle stazioni TE136 (livello superficiale), TE140 (livello intermedio), TE141 (livello superficiale), TE145 (livello superficiale), TE146 (livello intermedio).

Tabella 6.4.2.1: Analisi microbiologiche dei campioni di acqua – fase di esercizio - Luglio 2011.

Stazione	Livello	Coliformi fecali	Coliformi totali	Streptococchi fecali ed enterococchi
		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml
TE 128	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE 131	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE 134	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE 135	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE 136	superficiale	<50	<50	70
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE 137	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE 138	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE 139	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE 140	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	80
	profondo	<50	<50	<50
TE 141	superficiale	<50	<50	100
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE142	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE 143	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE144	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE145	superficiale	<50	<50	130
	intermedio	<50	<50	<50
	profondo	<50	<50	<50
TE146	superficiale	<50	<50	<50
	intermedio	<50	<50	120
	profondo	<50	<50	<50

## 6.5 Saggi biologici

La batteria di saggi ecotossicologici utilizzata è costituita da 4 specie-test appartenenti a gruppi tassonomici diversi: il batterio marino *Vibrio fischeri* (Microtox<sup>®</sup>), l'alga unicellulare *Dunaliella tertiolecta*, il crostaceo copepode *Tigriopus fulvus* e il riccio di mare *Paracentrotus lividus*, rappresentanti rispettivamente i decompositori (*V. fischeri*), i produttori primari (*D. tertiolecta*) e i consumatori della rete trofica (*T. fulvus* e *P. lividus*).

Tutti gli organismi indicati rispondono ai principali requisiti che ne stabiliscono l'idoneità come specie target: ampia diffusione in natura, grande rilevanza ecologica, adattabilità alle condizioni di laboratorio, breve ciclo vitale, maneggevolezza e sensibilità ai contaminanti (Walsh *et al.*, 1988; Lambertson, 1992; USACE, 1994).

Per ciò che concerne il giudizio di tossicità, la classificazione del singolo test è stata effettuata sulla base dei criteri di cui alla tabella 2.4 del “Manuale per la movimentazione dei fondali marini” (APAT-ICRAM, 2007).

### 6.5.1 Materiali e metodi

Dall'area sottoposta a indagine sono stati selezionati e analizzati 6 campioni di acqua della colonna saggiati sul tal quale con tutti e quattro gli organismi scelti.

#### 6.5.1.1 *Vibrio fischeri* (sistema Microtox<sup>®</sup>)

*Vibrio fischeri* è un batterio marino Gram-negativo ed eterotrofo, appartenente alla famiglia delle *Vibrionaceae* (Figura. 6.5.1.1.1).

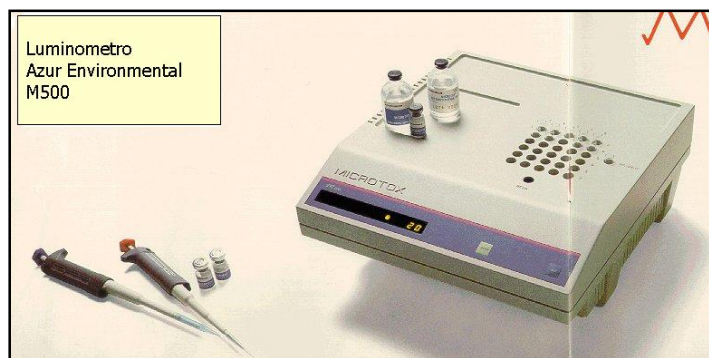


Figura 6.5.1.1.1: Luminometro M500 (sistema Microtox<sup>®</sup>).

L'organismo è cosmopolita, ma con maggior diffusione nelle fasce temperate e subtropicali.

Il sistema Microtox® è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di questa specie. Poiché in presenza di contaminanti l'emissione di luce diminuisce, la misura dell'eventuale inibizione della bioluminescenza, a seguito dell'esposizione del batterio a una sostanza nota o a un campione ambientale di acqua o sedimento, consente di valutare il grado di tossicità acuta della sostanza o della matrice testata.

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

### **Procedura adottata e lettura dei dati**

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

I campioni di acqua sono stati saggiati utilizzando il test per l'individuazione della curva dose-effetto (Basic test, Azur Environmental, 1995) organizzato con 3 repliche del controllo e 7 diluizioni del campione a partire dal 90%, effettuando le letture dopo esposizione di 5, 15 e 30 minuti. Tale procedura è riconducibile al protocollo ISO (2006a), specifico per batteri liofilizzati;

#### **6.5.1.2 *Dunaliella tertiolecta***

*Dunaliella tertiolecta* Butcher è un'alga monocellulare appartenente al gruppo delle Cloroficee (alghe verdi), ordine Volvocales (Figura 6.5.1.2.1). La specie è eurialina e cosmopolita.



**Figura 6.5.1.2.1:** *Dunaliella tertiolecta*.

Il principio del test consiste nell'esporre una coltura algale pura in fase di crescita esponenziale per diverse generazioni a concentrazioni note di campione, in condizioni fisico-chimiche standardizzate e con un definito e omogeneo apporto di nutrienti.

Al termine del periodo d'incubazione viene confrontata la crescita algale nel campione con quella del controllo.

I saggi biologici sono stati eseguiti seguendo i protocolli ISO (2006b) e ARPAT (1998; Draft, 2003), con alcune modifiche specifiche.

### **Terreno di coltura**

Ogni litro di acqua marina artificiale ( $32 \text{ PSU} \pm 1$ ) è stato arricchito con una quantità predefinita di nutrienti (ISO, 2006) e sterilizzato tramite filtrazione su membrana da  $0,45 \mu\text{m}$ . Il terreno così ottenuto è stato utilizzato nei saggi biologici come controllo e come diluente per la preparazione degli elutriati.

### **Preparazione dell'inoculo algale e lettura dei dati**

Un'aliquota di sospensione algale in fase di crescita esponenziale è stata conteggiata automaticamente tramite Coulter Counter (Beckman serie Z1) e diluita in acqua marina artificiale, fino a ottenere una densità di  $200 \times 10^3 \text{ cell/ml}$  (ARPAT, 1998).

Per questioni logistiche, dato l'elevato numero di campioni da processare contemporaneamente, è stato applicato il metodo miniaturizzato all'interno di piastre monouso sterili a 6 pozzetti (Environment Canada, 1992; Hall, 1998; ARPAT, 2003).

Le diluizioni dei campioni e i rispettivi controlli sono stati divisi in aliquote di 10 ml e in ciascuna di esse è stato inoculato un volume di 0,1 ml di sospensione algale, determinando così una densità iniziale di  $2.000 \text{ cell/ml}$ .

Infine, 2 ml di campione e di controllo sono stati distribuiti in triplice replica nelle piastre multipozzetto e poste a incubare per 72h in camera termostatica a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , con regime di illuminazione continua del tipo cool white e con una intensità compresa tra 7.000 e 8.000 lux.

Al termine del prefissato periodo è stata determinata la densità algale di ogni pozzetto.

Per quanto concerne l'analisi dei risultati sull'acqua della colonna è stata determinata la percentuale di inibizione o stimolazione dello sviluppo algale rispetto al controllo (ARPAT, 2003) ed espressa come media ( $\pm$  deviazione standard) di 3 repliche. La significatività della differenza tra campione e controllo è stata infine calcolata tramite applicazione del test-t di Student, preceduto dal test F per l'omogeneità della varianza (Fowler e Cohen, 1993).

Per esprimere il giudizio di tossicità sono stati seguiti i criteri di valutazione proposti nel "Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini" di APAT-ICRAM (2007):

- ✓ il campione è stato considerato tossico quando la differenza tra campione e controllo è risultata statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) e maggiore o uguale al 20%;
- ✓ il campione è stato considerato biostimolante quando l'incremento della crescita dell'elutriato al 100% rispetto al controllo è risultato statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e maggiore o uguale al 20%.

### **6.5.1.3 *Tigriopus fulvus***

*T. fulvus* Fischer è un copepode arpacticoido meiobentonico, ampiamente diffuso nell'area mediterranea e facilmente identificabile (Carli & Fiori, 1979; Carli *et al.*, 1988; Pane *et al.*, 1996).

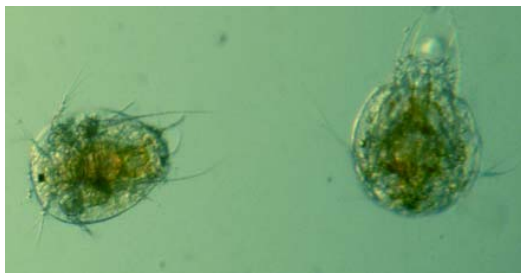
La specie è autoctona, eurialina ed euriterma e per le sue caratteristiche biologiche (durata del ciclo vitale, rapporto maschi/femmine, fecondità, produzione di uova), oltre alla facilità di manipolazione degli individui ed al mantenimento in laboratorio, viene ritenuta idonea all'impiego come specie target nei test e nei saggi ecotossicologici (ISO/FDIS, 1999; Faraponova *et al.*, 2003; 2005).

La coltura utilizzata, che origina dal Mar Tirreno (località Calafuria, Livorno), è stata mantenuta in acqua di mare sintetica Instant Ocean® (I.O.®), all'interno di fiasche per coltura in polistirene da 150cm<sup>2</sup> (0,5L) con tappo ventilato, munito di membrana da 0,22 µm alle seguenti condizioni (Faraponova *et al.*, 2003; 2005):

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

I saggi biologici sono stati applicati alla fase acquosa al 100%.

E' stata utilizzata una coltura sincronizzata di naupli con un'età di 24 – 36 ore, provenienti da una coltura isolata di femmine ovigere, alimentate con colture algali di *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* in rapporto 1:1 (Figura 6.5.1.3.1).



**Figura 6.5.1.3.1:** Naupli di *Tigriopus fulvus*.

I saggi biologici sono stati condotti in piastre per colture cellulari da 12 pozzetti, organizzando ogni campione in 4 repliche, contenenti ciascuna 10 individui in 3 mL di soluzione.

Il periodo di esposizione è stato di 96h, al termine del quale sono stati osservati gli organismi immobilizzati/morti (previa stimolazione meccanica) e, come end-point subletale, sono state conteggiate le mute rilasciate (Faraponova *et al.*, 2005).

La significatività dei dati ottenuti sui nauplii di *T. fulvus* è stata valutata sulla base della differenza tra campione e controllo, tramite test-t di Student per varianza disomogenea (Primer 5.0).

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

#### **6.5.1.4 Paracentrotus lividus**

È un organismo bentonico, echinoide, ampiamente diffuso nel bacino del Mediterraneo, che vive prevalentemente fra 0 e 80 metri di profondità, prediligendo i fondali rocciosi o sassosi, poco inclinati e ricchi di alghe; è caratterizzato da un periodo riproduttivo che va generalmente da ottobre a giugno, in funzione della temperatura dell'acqua che deve essere compresa tra 8°C e 24°C, per garantire la sopravvivenza delle larve e il completamento della metamorfosi. I ricci di mare hanno fecondazione esterna ed embrioni e larve privi di protezione (Arizzi *et al.*, 2001). Essi sono largamente impiegati in studi ecotossicologici (Pagano *et al.*, 1985; Pieroni *et al.*, 1992; Pagano *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 1995; Volpi *et al.*, 2001; Giuliani *et al.*, 2002) che utilizzano, quali *endpoints*, gli effetti sugli stadi più critici del ciclo vitale di questi organismi. Poiché il successo riproduttivo è in gran parte dipendente dalle condizioni ambientali in cui gameti ed embrioni si trovano, gli eventi legati alla riproduzione ed allo sviluppo larvale del riccio di mare sono da tempo considerati utili per l'applicabilità di questi organismi in campo ecotossicologico (Kobayashi, 1984; Pagano *et al.*, 1986; Dinnel *et al.*, 1987; Chapman, 1995).

## 6.5.2 Risultati

Il giudizio di tossicità del singolo saggio biologico è stato espresso secondo la scala riportata in Tabella 6.5.2.1 (APAT-ICRAM, 2007).

**Tabella 6.5.2.1:** Scale di tossicità adottate nella valutazione delle risultanze ecotossicologiche.

Matrice	Tossicità assente/trascurabile	Tossicità presente	Tossicità elevata	Tossicità molto elevata
Acqua	EC <sub>20</sub> ≥ 90% % Effetto ≤ 20%	EC <sub>20</sub> < 90% e EC <sub>50</sub> ≥ 90% 20 < % Effetto ≤ 50%	20% ≤ EC <sub>50</sub> < 90% Effetto > 50%	EC <sub>50</sub> < 20%

Tabelle 6.5.2.2-5 vengono riportati i risultati dei saggi biologici mediante *Vibrio fischeri*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tigriopus fulvus* e *Paracentrotus lividus*.

**Tabella 6.5.2.2:** Risultati del saggio Microtox® – fase di esercizio - Luglio 2011.

Stazione	Livello (m)	Distanza Terminale (m)	Incubaz.	EC20 (%)	Massimo effetto (%)	Media ± d.s. (%)	Tossicità
TE128_s	superficiale	10	5'	> 90	5,189	4,66±1,46	Assente/trascurabile
			15'	> 90	5,787		
			30'	> 90	3,008		
TE128_i	intermedio	10	5'	> 90	2,041	1,52±0,47	Assente/trascurabile
			15'	> 90	1,417		
			30'	> 90	1,116		
TE131_s	superficiale	100	5'	> 90	2,608	2,43±1,42	Assente/trascurabile
			15'	> 90	0,9337		
			30'	> 90	3,755		
TE131_i	intermedio	100	5'	> 90	3,585	2,28±1,28	Assente/trascurabile
			15'	> 90	2,217		
			30'	> 90	1,033		
TE133_s	superficiale	1000	5'	> 90	5,338	6,43±0,95	Assente/trascurabile
			15'	> 90	6,932		
			30'	> 90	7,028		
TE133_i	intermedio	1000	5'	> 90	5,850	7,20±2,03	Assente/trascurabile
			15'	> 90	6,211		
			30'	> 90	9,541		

**Tabella 6.5.2.3:** Risultati del saggio algale – fase di esercizio - Luglio 2011.

Stazione	Livello (m)	Distanza Terminale (m)	$\Delta \% \pm \text{d.st.}$	Test F	Test t	Tossicità
TE128_s	superficiale	10	$5,1 \pm 2,2$	0,30	0,10	Assente/ trascurabile
TE128_i	intermedio	10	$11,0 \pm 3,2$	0,41	0,08	Assente/ trascurabile
TE131_s	superficiale	100	$-8,8 \pm 3,6$	0,10	0,09	Assente/ trascurabile
TE131_i	intermedio	100	$-14,3 \pm 6,0$	0,08	0,07	Assente/ trascurabile
TE134_s	superficiale	2000	$8,4 \pm 3,7$	0,09	0,10	Assente/ trascurabile
TE134_i	intermedio	2000	$6,1 \pm 1,2$	0,32	0,09	Assente/ trascurabile

**Tabella 6.5.2.4:** Risultati della sopravvivenza e di rilascio mute (effetti sulla crescita) di *Tigriopus fulvus* – fase di esercizio - Luglio 2011.

Stazione	Livello (m)	Distanza Terminale (m)	Sopravvivenza			Crescita			
			Sopravvivenza (%)± d.s	p (t- test)	Tossicità	Media mute rilasciate	Δ (%) Campione vs. Controllo	p (test-t)	Tossicità
Controllo			100,00±0,00	n.c.	-	11,5 ± 5,0	-	1,00	-
TE 128_s	superficiale	10	100,00±0,00	n.c.	Assente/ trascurabile	9,5 ± 5,0	-17,39	0,003	Assente/ trascurabile
TE 128_i	intermedio	10	100,00±0,00	n.c.	Assente/ trascurabile	10,0 ± 7,1	-13,04	0,03	Assente/ trascurabile
TE 131_s	superficiale	100	100,00±0,00	n.c.	Assente/ trascurabile	11,0 ± 0,0	-4,35	0,18	Assente/ trascurabile
TE 131_i	intermedio	100	100,00±0,00	n.c.	Assente/ trascurabile	13,0 ± 7,1	13,04	0,03	Assente/ trascurabile
TE 134_s	superficiale	2000	100,00±0,00	n.c.	Assente/ trascurabile	9,0 ± 7,1	-21,74	0,003	Presente
TE 134_i	intermedio	2000	100,00±0,00	n.c.	Assente/ trascurabile	10,5 ± 5,0	-8,70	0,05	Assente/ trascurabile

n.c. non calcolabile.

Tabella 6.5.2.5: Risultati del saggio di embriotossicità con *Paracentrotus lividus* – fase di esercizio - Luglio 2011.

Stazione	Livello (m)	Distanza Terminale (m)	Conc.	%Plutei Normoformati			Media Normofor.	Media non Normof.	sd	Abbott	EC20/EC50	Tossicità
				I° replica	II° replica	III° replica						
Controllo			-	85	83	84	84	16	1,00	0		
TE128_s	sup.	10	100	0	3	1	1	99	1,53	98	EC20=56,95 EC50=67,98	Elevata
			50	80	79	78	79	21	1,00	6		
			25	81	80	78	80	20	1,53	5		
TE128_i	interm.	10	100	0	0	1	0	100	0,58	100	EC20=58,32 EC50=68,51	Elevata
			50	80	79	80	80	20	0,58	5		
			25	81	82	80	81	19	1,00	4		
TE131_s	sup.	100	100	0	0	0	0	100	0,00	100	EC20=54,29 EC50=64,15	Elevata
			50	75	74	73	74	26	1,00	12		
			25	80	81	81	81	19	0,58	4		
TE131_i	interm.	100	100	85	83	81	83	17	2,00	1	EC20>90	Assente/ trascurabile
			50	82	84	80	82	18	2,00	2		
			25	83	79	84	82	18	2,65	2		
TE134_s	sup.	2000	100	0	0	0	0	100	0,00	100	EC20=31,26 EC50=44,04	Elevata
			50	32	30	31	31	69	1,00	63		
			25	80	78	77	78	22	1,53	7		
TE134_i	interm.	2000	100	10	9	11	10	90	1,00	88	EC20=49,29 EC50=68,53	Elevata
			50	69	70	67	69	31	1,53	18		
			25	80	81	82	81	19	1,00	4		

Nella Tabella 6.5.2.6 viene riportato il quadro riepilogativo dei test effettuati con le quattro specie.

**Tabella 6.5.2.6:** Schema riepilogativo dei risultati ottenuti con la batteria dei saggi – fase di esercizio - Luglio 2011.

Stazione	Livello	Distanza Terminale (m)	<i>V. fischeri</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>Tigriopus fulvus</i>		<i>Paracentrotus lividus</i>
					Sopravv.	Ril. mute	Embriotossicità
TE 128_s	superficiale	10	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Elevata
TE 128_i	intermedio	10	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Elevata
TE 131_s	superficiale	100	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Elevata
TE 131_i	intermedio	100	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.
TE 134_s	superficiale	2000	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Presente	Elevata
TE 134_i	intermedio	2000	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Assente/trasc.	Elevata

Le risultanze ecotossicologiche ottenute non hanno evidenziato alcun effetto biologico per due dei quattro organismi. Nei confronti del crostaceo *T. fulvus* è stata rilevata una inibizione significativa della crescita in termini di rilascio delle mute nel campione TE 134\_s. Occorre, invece, evidenziare le importanti risposte biologiche rilevate nel saggio di embriotossicità con il riccio *Paracentrotus lividus* che tuttavia, essendo basato su un end-point notoriamente molto sensibile, rende opportuna una sua verifica in occasione delle successive campagne di indagine, attuando, ove necessario, ulteriori approfondimenti.