

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

in consorzio con

**SECONDA UNIVERSITÀ DI NAPOLI
UNIVERSITÀ “PARTHENOPE” NAPOLI**

in convenzione con

**ISTITUTO PER L’AMBIENTE MARINO COSTIERO – C.N.R.
STAZIONE ZOOLOGICA “ANTON DOHRN”**

Dottorato in Scienze ed Ingegneria del Mare

XVIII ciclo

Tesi di Dottorato

DISPERSIONE IN MARE

**DELLE ACQUE DI PRODUZIONE E VALUTAZIONE
ECOTOSSICOLOGICA DEGLI EFFETTI INDOTTI**

Candidata: Dott.ssa Loredana Manfra

Tutor: Prof. Enrico Zambianchi

Co-Tutor: Dott.ssa Chiara Maggi

Il Coordinatore del Dottorato: Prof. Bruno D’Argenio

ANNO 2006

Indice

Introduzione	pag. 1-3
Capitolo I	pag. 4-10
Composizione delle acque di produzione	
1.1 Introduzione	
1.2 Componenti inorganiche	
1.2.1 Sali	
1.2.2 Metalli	
1.3 Componenti organiche	
1.3.1 Idrocarburi alifatici	
1.3.2 Idrocarburi aromatici	
1.3.3 Derivati degli idrocarburi: alcoli e fenoli	
1.3.4 Acidi carbossilici	
1.4 Additivi	
1.4.1 Glicol dietilenico (DEG)	
1.4.2 Toluene idrossibutilato (BHT)	
Capitolo II	pag. 11-15
Destino ambientale delle acque di produzione	
2.1 Introduzione	
2.2 Diluizione e dispersione	
2.3 Volatilizzazione	
2.4 Reazioni chimiche	
2.5 Adsorbimento e sedimentazione	
2.6 Biodegradazione	
Capitolo III	pag. 16-26
Potenziati impatti delle acque di produzione sul biota	
3.1 Introduzione	
3.2 Effetti ecotossicologici subletali e/o letali indotti in organismi esposti allo scarico delle acque di produzione	
3.3 Bioconcentrazione e bioaccumulo dei contaminanti presenti nelle acque di produzione	
3.4 Variazioni nella struttura delle biocenosi bentoniche esposte allo scarico delle acque di produzione	
Capitolo IV	pag. 27-58
Studio della dispersione delle acque di produzione mediante l'individuazione di uno o più traccianti chimici	
4.1 Introduzione	
4.2 Piano di lavoro	
4.3 Area di indagine	

- 4.4 Campionamento
 - 4.4.1 Piano di campionamento
 - 4.4.2 Disegno di campionamento
 - 4.4.3 Attività di campionamento, trattamento e conservazione dei campioni
- 4.5 Caratterizzazione preliminare delle acque di produzione
- 4.6 Metodologia
 - 4.6.1 Analisi dei BTEX
 - 4.6.2 Analisi del DEG
 - 4.6.3 Analisi del BHT
- 4.7 Risultati e discussione
 - 4.7.1 A
 - 4.7.2 B
 - 4.7.3 C
 - 4.7.4 D
- 4.8 Dispersione delle acque di produzione sulla base dei risultati di BTEX, DEG e BHT
- 4.9 Confronto dei risultati sulla 'tracciabilità' con i risultati di uno studio di dispersione delle acque di produzione in mar Adriatico

Capitolo V **pag. 59-110**
Valutazione ecotossicologica delle acque di produzione e delle acque di mare riceventi lo scarico

- 5.1 Introduzione
- 5.2 I saggi ecotossicologici come strumento di monitoraggio ambientale
- 5.3 Piano di lavoro
- 5.4 Area di indagine
- 5.5 Piano di campionamento
 - 5.5.1 Piano di campionamento
 - 5.5.2 Disegno di campionamento
 - 5.5.3 Attività di campionamento e trattamento dei campioni
- 5.6 Metodologia
 - 5.6.1 Rotiferi
 - 5.6.2 Crostacei
 - 5.6.3 Echinodermi
- 5.7 Risultati e discussione
 - 5.7.1 A
 - 5.7.2 B
 - 5.7.3 C
 - 5.7.4 D
- 5.8 Confronto dei dati di tossicità

Conclusioni **pag. 111-115**

Bibliografia **pag. 116-127**

Appendice
Teoria del modello UM3 (three-dimensional Update Merge) **pag. 128-136**

Ringraziamenti

*Alla mia cara amica Maria
“in ricordo del tuo amore
per lo studio e per la conoscenza”*

Introduzione

In Italia esistono 1200 pozzi petroliferi produttivi, distribuiti su tutto il territorio nazionale, e 127 piattaforme a mare, prevalentemente lungo le coste dell'Adriatico, del Mar Ionio e del Canale di Sicilia (Paini, 2001).

Le piattaforme galleggianti per la produzione di gas sono composte da un *jack-up*, che è la parte sommersa, dotata di tre o più gambe dette piloni, appoggiate sul fondo marino, che vengono utilizzate per la perforazione in acque con profondità massima di 100-120 metri. La parte emersa è invece una sovrastruttura, sulla quale sono fissati i moduli contenenti le apparecchiature di produzione e perforazione, i servizi alloggi e mensa, le sale di controllo, le officine, gli uffici, i laboratori, ecc.

Le piattaforme ad olio sono invece petroliere dotate di un sistema di perforazione (*drilling vessel*), con un'apertura nella parte centrale in corrispondenza della torre di perforazione, che vengono mantenute in posizione tramite ormeggi o sistemi computerizzati di posizionamento dinamico e che vengono utilizzate a profondità anche superiori ai 1500 metri (www.eni.it).

Il ciclo operativo di una piattaforma si svolge attraverso quattro fasi principali che sono l'esplorazione, la perforazione, la produzione e la decommissione. L'esplorazione serve a valutare la possibilità e la probabilità di trovare in un'area accumuli di petrolio, le cosiddette "trappole".

Mediante indagini geofisiche si cerca di ricostruire l'assetto stratigrafico delle rocce che costituiscono il sottosuolo e di ottenere informazioni sulla loro struttura litologica e sulla natura dei fluidi in essa contenuti. Solo in una seconda fase, che consiste nella perforazione di "pozzi esplorativi" si può stabilire se le trappole contengono effettivamente accumuli di petrolio di valore commerciale. Attraverso le attività di produzione, gli idrocarburi sono estratti dal giacimento, trattati negli impianti e inviati al mercato tramite condotte o navi. Infine, una volta in disuso, la piattaforma può essere rimossa totalmente o parzialmente (solo la parte emersa) oppure riutilizzata, come *artificial reef*, sito di nursery e rifugio per molte specie ittiche (www.eni.it).

Durante la fase di produzione, insieme al gas o al greggio, viene estratta anche dell'acqua di origine naturale, presente nel pozzo e comunemente indicata con il nome di "acqua di formazione". Opportuni processi di degassazione, desoleazione e passaggio su filtri a carbone attivo consentono di separare gli idrocarburi

dall'acqua e favorirne il recupero. Durante la fase di produzione viene utilizzata dell'acqua aggiuntiva, comunemente indicata come acqua di processo, per aumentare la pressione del giacimento e favorire la risalita del petrolio in superficie; le acque che arrivano in superficie sono quindi costituite sia dall'acqua di formazione che da quella di processo, che nel loro insieme vengono definite acque di produzione (PFW).

L'acqua di produzione può essere reiniettata in pozzi non più produttivi, qualora ve ne siano di disponibili, invece può essere impiegata per il recupero assistito quando il pozzo è in via di esaurimento, oppure può essere scaricata in mare secondo la normativa vigente in ciascun paese.

In Italia lo scarico delle acque di produzione è regolamentato dal decreto ministeriale del 28 luglio del 1994 e dal decreto legislativo 152 del 1999 aggiornato al 2006. Il decreto ministeriale indica che lo scarico in mare delle acque di produzione è ammesso se la concentrazione di oli minerali totali risulta essere inferiore a 40 mg/l; il decreto legislativo 152 (articolo 30, comma 5) dichiara che lo *“scarico diretto in mare dell'acqua di produzione è autorizzato previa presentazione di un piano di monitoraggio volto a verificare l'assenza di pericoli per le acque e per gli ecosistemi acquatici”*.

Questo lavoro di dottorato è stato sviluppato e condotto nell'ambito delle attività di monitoraggio che l'Istituto per la ricerca scientifica e tecnologica applicata al mare (ICRAM) conduce su alcune piattaforme situate nel mar Adriatico.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di studiare e modellizzare la dispersione in mare delle acque di produzione e, nel contempo, effettuare una valutazione ecotossicologica delle stesse e delle acque di mare che ricevono lo scarico.

La linea di ricerca ha seguito un approccio di studio 'integrato' di tipo chimico e fisico per la dispersione in mare delle acque di produzione, ed ecotossicologico per verificare eventuali danni a organismi selezionati dopo la loro esposizione all'acqua di produzione e all'acqua di mare prelevata a diverse distanze dal punto di scarico.

In particolare:

- La caratterizzazione chimica delle acque di produzione, l'identificazione in esse di uno o più composti che possano essere rappresentativi dell'effluente e la successiva analisi di questi traccianti in mare ha permesso di *osservare realmente* il percorso delle acque di produzione

individuando fino a che distanza dal punto di scarico avviene la loro dispersione.

- L'introduzione di un approccio chimico allo studio della dispersione e l'applicazione di modelli numerici di dispersione per scarichi da diffusori sottomarini ad una o più porte, ha consentito di osservare come la stratificazione della colonna d'acqua possa influenzare la dispersione delle acque di produzione in mare e la formazione di zone di intrappolamento delle acque di produzione.
- L'impiego di saggi ecotossicologici sull'acqua di produzione e sull'acqua di mare, prelevata a diversa distanza dallo scarico, ha consentito, rispettivamente, di valutare la tossicità *in toto* delle acque di produzione e di osservare la variabilità spaziale della tossicità nell'ambiente che riceve lo scarico. Inoltre l'impiego di più organismi per eseguire i saggi ecotossicologici è stato utile a individuare, tra le specie saggiate, quali potrebbero essere potenziali indicatori specifici della tossicità delle acque di produzione e della presenza in ambiente di sostanze che provengono dallo scarico.

L'acqua di produzione, una volta immessa nel corpo idrico ricevente, si disperde rapidamente; nonostante ciò alcuni contaminanti in essa presenti, come metalli pesanti e microinquinanti organici, presentano caratteristiche di persistenza e capacità di bioaccumulo. Questi contaminanti, adsorbiti sul particolato nel sedimento e accumulati nel biota, nel tempo possono essere responsabili dell'insorgenza di effetti dannosi su organismi marini. Pertanto la valutazione di entrambi gli aspetti (dispersione e tossicità) è estremamente importante.

La ricerca è stata svolta presso l'ICRAM di Roma con la preziosa collaborazione del dipartimento di Scienze dell'ambiente dell'Università *Parthenope*, per quanto concerne lo studio fisico dei processi di dispersione delle acque di produzione; dell'Università degli Studi di Urbino - Centro di Studio per la Chimica dell'Ambiente e le Tecnologie Strumentali Avanzate, per quanto riguarda la determinazione di traccianti chimici delle acque di produzione.

Capitolo I

Composizione delle acque di produzione

1.1 Introduzione

I giacimenti petroliferi normalmente contengono, oltre allo strato di idrocarburi liquidi e/o gassosi una certa quantità d'acqua. Quest'acqua, stratificata al di sopra degli idrocarburi liquidi ed al di sotto di quelli gassosi, prende il nome di acqua di formazione o acqua di strato (*Veil et al.*, 2004). Dunque, quando un giacimento è in fase di produzione insieme all'olio e al gas arrivano in superficie le acque fossili presenti nelle formazioni geologiche associate agli idrocarburi; a quest'acqua può venire addizionata acqua iniettata durante la fase di produzione per mantenere in pressione il pozzo. Le acque di formazione e quelle di processo rappresentano un refluo che comunemente è indicato come "acqua di produzione" (PFW) (*Utvik*, 1999).

Opportuni processi di degassazione, desoleazione e passaggio su filtri a carbone attivo sono applicati per separare gli idrocarburi dall'acqua e favorire, ulteriormente, il recupero di questi ultimi.

L'acqua di produzione contiene una varietà di sali inorganici disciolti e di composti organici caratteristici della riserva e delle formazioni geologiche con le quali è stata a stretto contatto per milioni di anni; in quest'acqua, di origine naturale, sono presenti anche gocce di olio non solubili (olio disperso) non rimosse mediante il trattamento di desoleazione (*OGP*, 2005).

La composizione delle acque di produzione varia da pozzo a pozzo in funzione della riserva, dei meccanismi di produzione adottati e del grado di sfruttamento del pozzo. I volumi delle acque di produzione aumentano con lo sfruttamento del pozzo: man mano che il pozzo va in esaurimento aumenta, ovviamente, il rapporto tra la frazione acquosa e quella idrocarburica nel prodotto estratto; inoltre per esigenze di gestione degli impianti, che necessitano di mantenere in pressione il pozzo, vengono iniettate quantità sempre maggiori di acqua nel sottosuolo. L'acqua di produzione, con lo sfruttamento dei pozzi, può aumentare in modo consistente risultando anche diverse volte quantitativamente maggiore rispetto al volume di combustibile estratto (*Henderson et al.*, 1999).

L'acqua di produzione proveniente da installazioni a gas mostra un contenuto maggiore di idrocarburi aromatici a basso peso molecolare rispetto alle acque provenienti da strutture destinate alla produzione di olio; conseguenza di ciò è che

l'acqua di produzione derivante da piattaforme a gas risulta più tossica, anche di 10 volte, rispetto a quella delle installazioni ad olio (*Jacobs et al.* 1992); tuttavia i volumi scaricati dalle piattaforme a produzione di gas normalmente sono inferiori rispetto a quelli ad olio e questo è importante nella valutazione della mitigazione degli impatti.

1.2 Componenti inorganiche

1.2.1 Sali

La salinità dell'acqua di produzione può oscillare dai valori tipici di acque dolci ad i livelli prossimi alla saturazione, in funzione del contenuto di sali totali disciolti (bicarbonati, cloruri, solfati, solfiti, nitrati, fosfati). Gli ioni cloro, sodio e calcio possono a volte risultare in concentrazione doppia o tripla rispetto a quella normalmente presente nell'acqua di mare (*Patin*, 1999).

1.2.2 Metalli

I principali composti inorganici sono rappresentati dai metalli la cui variabilità, in specie ed in concentrazione, dipende sia dalle caratteristiche geologiche della riserva che dal tempo di vita del pozzo. Gli elementi maggiormente presenti sono il bario, il ferro, lo zinco, il piombo, il manganese e gli elementi naturali caratterizzati da bassa radioattività; altri metalli sono il cadmio, il rame, il mercurio ed il nickel. Le concentrazioni di metalli in acqua di produzione sono solitamente più alte, di uno due ordini di grandezza, di quelle presenti in acqua di mare.

1.3 Componenti organiche

La componente organica delle acque di produzione è costituita principalmente da idrocarburi. I composti organici presenti nelle acque di produzione derivanti da giacimenti a gas differiscono sostanzialmente da quelli ad olio: nel primo caso predominano gli idrocarburi volatili a basso peso molecolare, nel secondo caso gli scarichi sono contraddistinti da composti organici più pesanti (*Patin*, 1999). A

seconda delle loro caratteristiche fisiche e chimiche, gli idrocarburi possono presentarsi in forma di gocce disperse o disciolti in acqua.

1.3.1 Idrocarburi alifatici

Si tratta di composti costituiti da catene aperte, lineari o ramificate, e quanto più la catena idrocarburica è lunga più diminuisce la polarità e la solubilità in acqua; possono essere saturi (alcani) ed insaturi (alcheni ed alchini). I primi sono caratterizzati, dal punto di vista chimico, da scarsa reattività (paraffine = poco affine) e, dal punto di vista biologico, generalmente non vengono metabolizzati. Gli idrocarburi insaturi sono più reattivi, per la presenza rispettivamente del doppio e triplo legame tra atomi di carbonio.

1.3.2 Idrocarburi aromatici

Gli idrocarburi aromatici sono caratterizzati da strutture cicliche, con uno o più anelli a sei atomi di carbonio; i composti monoaromatici, come benzene, toluene, etilbenzene e xileni (orto, meta e para isomeri) (BTEX), altamente volatili, risultano tossici per la maggior parte degli organismi acquatici mentre i composti con tre o più anelli come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) tendono ad essere insolubili in acqua (*OGP*, 2005).

In particolare l'EPA (Unites States Environmental Protection Agency) ha identificato tra gli inquinanti prioritari sedici IPA, alcuni dei quali appartenenti alla classe di cancerogenicità.

1.3.3 Derivati degli idrocarburi: alcoli e fenoli

Altri composti organici possono derivare dagli idrocarburi per sostituzione di uno o più atomi di idrogeno con gruppi funzionali (raggruppamento di atomi in grado di impartire ai composti che lo possiedono un particolare comportamento chimico).

Gli alcoli presentano come gruppo funzionale l'ossidrile –OH. Gli alcoli a basso peso molecolare (metilico, etilico, ecc.) sono molto solubili in acqua; man mano che aumentano le dimensioni della catena carboniosa sempre più diminuisce la solubilità in acqua.

I fenoli sono composti benzenici che recano un gruppo ossidrile sull'anello aromatico; altre specie possono derivare per sostituzione di gruppi funzionali sull'ossidrile (fenoli alchilati, fenoli clorurati e nitrati). I fenoli sono caratterizzati da maggiore acidità rispetto agli alcoli e dalla tendenza ad ossidarsi facilmente; sono composti organici polari più solubili in acqua dei BTEX.

1.3.4 Acidi carbossilici

Sono composti caratterizzati dal gruppo funzionale carbossilico, -CO-OH. Sono composti di natura acida e, per la presenza del gruppo –OH, sono caratterizzati da solubilità in acqua, che decresce all'aumentare delle dimensioni della porzione idrocarburica.

1.4 Additivi

Sebbene l'acqua di produzione abbia origine naturale, essa può contenere anche agenti chimici, addizionati nelle operazioni di esplorazione e produzione per diversi scopi (*Brendehaug et al.*, 1992; *Cline*, 1998):

- biocidi per contenere il *fouling* batterico;
- antiossidanti per inibire la corrosione;
- disemulsionanti per impedire le emulsioni tra acqua e petrolio;
- coagulanti e flocculanti per rimuovere i solidi;
- solventi per ridurre i depositi di paraffine

Il comportamento di queste sostanze è sempre relativo alle loro proprietà fisiche e chimiche, alcune specie chimiche prediligono la fase disciolta mentre altre tendono ad essere insolubili in acqua. Alcuni di questi additivi possono essere tossici e contribuire alla tossicità delle acque di produzione; gli effetti ambientali dipendono da diversi fattori come la quantità di agente chimico rilasciato con lo scarico, il modo in cui esso viene impiegato, lo step del processo in cui viene utilizzato (*Vik et al.*, 1993). Studi condotti su alcune di queste sostanze hanno

mostrato che non sempre gli agenti chimici solubili in acqua aumentano la tossicità delle acque di produzione sebbene alcune sostanze possano favorire la solubilità dei componenti del petrolio nelle acque di produzione (*Henderson et al., 1999*).

Di seguito vengono riportate le caratteristiche relative a due additivi chimici, il glicol dietilenico (DEG) ed il toluene idrossibutilato (BHT), ritrovati nelle acque di produzione di alcune piattaforme del mar Adriatico e scelti in questo studio come traccianti di riferimento della *plume* in mare.

1.4.1 Glicol dietilenico (DEG)

I glicoli sono polialcooli usati per deidratare il gas; le tre specie maggiormente impiegate nei processi di deidratazione sono il glicol trietilenico, il glicol dietilenico e il glicol etilenico (*Sorensen et al., 2000*). La capacità di deidratazione di queste sostanze consente di ridurre la formazione di idrati e, di conseguenza, ridurre i fenomeni di corrosione che possono verificarsi nei processi di trasmissione del gas (*Katz and Lee, 1990*).

La presenza di vapore acqueo nel gas naturale può accelerare il processo di corrosione e ridurre l'efficienza di trasmissione del gas stesso, o formare dei solidi cristallini idrati combinandosi con il metano, l'etano, il propano o altri idrocarburi. Il processo di deidratazione prevede l'adsorbimento e la rimozione del vapore acqueo ad opera del glicol.

Il glicol dietilenico è altamente solubile in acqua e poco volatile, è biodegradabile in condizioni aerobiche e non genera prodotti tossici; questo composto, quando rilasciato in mare, non tende ad adsorbirsi su materiale particolato sospeso, ha bassa propensione alla bioconcentrazione in organismi acquatici, mostrando una tossicità ambientale piuttosto bassa (LC_{50} o $EC_{50} > 1000$ mg/l) (*Weyerhaeuser, 2005*).

1.4.2 Toluene idrossibutilato (BHT)

Il toluene idrossibutilato (3,5-di-t-butil-4-idrossitoluene) è un composto organico aromatico, fenolo alchilato, impiegato come conservante per alimenti e grassi, come agente antiossidante per i prodotti petroliferi, per le gomme, per le

plastiche, per gli alimenti e per i cosmetici; inoltre è usato come additivo antiscorticatura: funziona come donatore di atomi di idrogeno per bloccare le reazioni di ossidazione delle olefine (*Oros and David, 2002*).

Si tratta di un composto scarsamente solubile in acqua ma solubile in diversi solventi organici come il metanolo, l'etanolo, il toluene, l'acetone, il benzene ed altri (*Merck Index, 1989*). Il BHT ed i suoi prodotti di degradazione sono biodegradabili, poco persistenti nell'ambiente, poco tossici per gli organismi acquatici (*Mikami et al., 1979*). Questo additivo ha buona affinità per la componente lipidica ($\log K_{ow}=5.1$), sebbene molte ricerche indichino che il BHT non tende a bioaccumulare, vista la sua rapida degradazione (*Inui et al., 1979; IARC, 1986; Kagan et al., 1990*).

Capitolo II

Destino ambientale delle acque di produzione

2.2 Diluizione e dispersione

In prossimità del punto di scarico vi è una zona di mescolamento, generata dalla fuoriuscita dell'acqua di produzione dal diffusore e dalla interazione della *plume* con la corrente ambientale (turbolenza auto-indotta). Gli effetti principali sono dovuti alle differenze di parametri fisici quali la *buoyancy* (galleggiamento) e il momento; la prima deriva dalla differenza di densità tra l'effluente ed il corpo ricevente mentre la seconda è generata dalla velocità d'uscita dell'effluente dalla porta del diffusore. Tipicamente questo produce un rapido mescolamento dell'effluente con il fluido ambientale circostante, fino al momento in cui l'energia associata allo scarico viene dissipata. La regione in cui avviene tale mescolamento iniziale, è spesso chiamata *near field* (campo vicino) o “regione di mixing iniziale” o ancora “zona di diluizione iniziale”. Il margine della regione di mescolamento iniziale coincide con la zona in cui la *plume* raggiunge la stessa densità del fluido recettore; da quel punto in poi la miscela effluente/corpo recettore è stabilizzata e viene trasportata dalle correnti marine in una regione spesso chiamata *far field* (campo lontano), dove il mescolamento è causato solo dalla turbolenza ambientale e procede molto più lentamente del *near field* (Scotti, 2004; § appendice).

In tabella 2.2 sono indicati i principali processi che interessano gli scarichi assieme alle scale spaziali e temporali.

Tabella 2.2 - Principali processi e scale per gli scarichi (Roberts, 1990).

Phase	Phenomenon	Length	Time Scale
Initial mixing	Mixing caused by the buoyancy and momentum of the discharge	10 to 1000	1 to 10 minutes
Far field	Advection by ocean currents and diffusion by oceanic turbulence	100 to 10000	1 to 20 hours
Long-term flushing	Large-scale flushing; upwelling or downwelling; sedimentation	10000 to 100000	1 to 100 days

2.3 Volatilizzazione

Dopo che l'acqua di produzione è stata scaricata a mare, alcuni componenti in essa presenti possono andare incontro ad un processo di volatilizzazione. La volatilizzazione di un contaminante disciolto in un corpo idrico dipende dalla sua tensione di vapore, da alcune caratteristiche dello stesso (velocità di flusso, profondità, turbolenza ecc.) e da caratteristiche del mezzo aeriforme, come la velocità del vento. Queste proprietà concorrono tutte nel determinare la velocità alla quale il composto volatilizza (*Marchetti, 2000*). I composti a peso molecolare più basso sono quelli che vanno incontro più facilmente a volatilizzazione.

2.4 Reazioni chimiche

Le reazioni chimiche che possono intervenire a seguito dell'immissione dell'acqua di produzione in mare sono: la precipitazione, l'idrolisi, l'ossidazione e la complessazione. Le acque di strato all'interno del giacimento si trovano in condizioni anossiche e le specie chimiche in essa presenti sono allo stato ridotto; quando le acque di produzione vengono in superficie e poi successivamente a contatto con l'acqua di mare incorporano grandi quantità di ossigeno, determinando così l'ossidazione di molte sostanze e composti. Il ferro passa da Fe^{2+} a Fe^{3+} tendendo a formare idrossidi insolubili che precipitano; alcuni metalli seguono lo stesso destino, precipitano come idrossidi, come solfati insolubili o come carbonati (*OGP, 2005*).

2.5 Adsorbimento e sedimentazione

La maggior parte delle sostanze chimiche presenti nelle acque di produzione, in funzione delle sue caratteristiche fisiche e chimiche, tende ad adsorbirsi sul particolato in sospensione presente nella stessa acqua di produzione e/o nell'acqua di mare. Il particolato è il veicolo con cui le sostanze arrivano al sedimento e si adsorbono su di esso. Mentre l'adsorbimento dei metalli e delle molecole polari dipende dalla composizione della particella solida e dalle cariche superficiali, le molecole organiche poco polari vengono adsorbite principalmente in funzione del contenuto di carbonio organico del particolato sospeso o del

sedimento. Questa dipendenza è stata dimostrata per le particelle più fini (diametro < 60 μm) che rappresentano la frazione di particolato o di sedimento maggiormente coinvolta nei fenomeni di adsorbimento (Marchetti, 2000).

Il potenziale di adsorbimento di un composto sul materiale solido risulta tanto maggiore quanto minore è la sua solubilità; il grado di adsorbimento e di sedimentazione è rappresentato dal log K_{ow} e/o dal log K_{oc} : maggiore è il valore di questo parametro maggiore sarà il grado di adsorbimento sul particolato.

I composti poco solubili in acqua vengono adsorbiti dal particolato sospeso e, quando le particelle sospese si depositano, vengono sequestrati nei sedimenti; una volta adsorbiti i contaminanti possono entrare nelle reti trofiche attraverso gli organismi bentonici che sono in relazione con i sedimenti, come gli *scavenger*.

2.6 Biodegradazione

La tendenza di un composto a degradarsi dipende dalla sua struttura chimica e dalla sua persistenza: i composti a basso peso molecolare sono più facilmente degradabili mentre i composti aromatici a più anelli sono maggiormente stabili e restano nella *plume* per tempi più lunghi.

Un ruolo importante nella biodegradazione è giocato dalla disponibilità di nutrienti e dai batteri che hanno la capacità di degradare i contaminanti; elementi chiave nella biodegradazione di composti organici sono la persistenza delle sostanze da degradare e la presenza di batteri selettivi capaci di degradare i composti specifici presenti nell'acqua di produzione (OGP, 2005).

La biodegradazione in acqua è dominata da processi aerobi mentre nel sedimento può avvenire sia in modo aerobio (nello strato superficiale) che anaerobio. Un altro fattore che influenza il processo di biodegradazione è la competizione tra diversi substrati; i batteri tendono ad utilizzare in modo prioritario composti con strutture molecolari semplici, per la cui demolizione è necessaria una bassa energia di attivazione metabolica (Marchetti, 2000).

Capitolo III

Potenziali impatti delle acque di produzione sul biota

3.1 Introduzione

La complessità e la variabilità chimica delle acque di produzione rendono difficile distinguere e quantificare la tossicità o, più in generale, l'impatto biologico ed ecologico dovuto ad una tipologia di contaminante piuttosto che ad un'altra (*Higashi et al.*, 1992; *Middleditch*, 1984). Di conseguenza, gli effetti dello scarico possono essere studiati più facilmente in relazione all'acqua di produzione nella sua totalità, piuttosto che in funzione di singoli costituenti chimici o gruppi di composti in essa presenti (*OGP*, 2005; *Stephenson*, 1992).

Grazie ai processi di rapida diluizione e rimescolamento iniziale, i livelli di concentrazione di acqua di produzione che possono indurre effetti biologici, possono essere ritrovati solitamente entro le prime decine di metri dal diffusore (*Furuholt*, 1996; *Smith et al.*, 1996; *Flynn et al.*, 1996); il gradiente di concentrazione dell'effluente, come già accennato nel capitolo precedente, dipende dal processo di diluizione e dalle caratteristiche del sistema marino ricevente.

Gli effetti indotti lungo la colonna d'acqua entro i primi metri di distanza dallo scarico possono essere rilevanti visto che diversi organismi trascorrono in quella zona l'intero ciclo vitale; alcune specie rilasciano i gameti direttamente in acqua mentre altre hanno solo le forme larvali nella colonna d'acqua: spesso sono proprio questi gli stadi vitali più sensibili ai contaminanti presenti nello scarico (*Krause*, 1995).

Ci sono una serie di risposte biologiche che aiutano a valutare gli effetti indotti: risposte ecotossicologiche di tipo subletale e/o letale sugli organismi esposti ad acqua di produzione, bioconcentrazione o bioaccumulo di alcuni composti presenti nell'effluente, variazioni nella struttura delle biocenosi dell'area interessata dallo scarico o, più in generale, dall'istallazione delle piattaforme petrolifere.

Nel mare del Nord, ormai da dieci anni, vengono condotti studi relativi alla valutazione dei potenziali effetti indotti in ambiente marino dallo scarico di acque di produzione (*Neff*, 1987; *Payne et al.*, 1987; *Brendehaug*, 1992; *Mulino and Rayle*, 1992; *Neff et al.*, 1992; *Osenberg et al.*, 1992; *Rabalais et al.*, 1992; *Sauer*, 1992; *Schiff*, 1992; *Grant and Briggs*, 2002; *Holdway*, 2002). Tali studi hanno

permesso di valutare un impatto potenziale minimo, relativo allo scarico di acque di produzione provenienti da piattaforme ad olio, poiché il processo di diluizione è abbastanza rapido. In Italia, i primi studi ecotossicologici ed ecologici riguardanti gli eventuali impatti indotti nel mar Adriatico da piattaforme a gas e, nello specifico, provenienti dallo scarico delle acque di produzione risalgono a pochi anni fa (*Cicero et al.*, 2003; *Mariani et al.*, 2004; *Trabucco et al.*, 2006; *Virno et al.*, 2006).

3.2 Effetti ecotossicologici subletali e/o letali indotti in organismi esposti allo scarico delle acque di produzione

I saggi ecotossicologici impiegano i sistemi biologici sia come strumento di controllo, per valutare l'effetto di contaminanti o di miscele complesse sull'ambiente, sia come strumento predittivo, per prevedere l'impatto di una sostanza prima della sua emissione. Questi saggi permettono una misura diretta e quantificabile degli effetti dannosi sul biota, consentendo di considerare anche gli effetti additivi che possono manifestarsi in presenza di miscele di differenti contaminanti.

Non esiste una sola specie sensibile per eccellenza; è quindi necessario l'impiego di una batteria di organismi a differenti livelli trofici ed evolutivi: produttori (alghe), consumatori primari (crostacei o rotiferi), consumatori secondari (pesci) e decompositori (batteri).

Studi ecotossicologici condotti in laboratorio hanno suggerito che l'esposizione di organismi marini, a diverse concentrazioni dell'acqua di produzione per periodi brevi (tossicità acuta) e lunghi (tossicità cronica), può indurre in essi risposte sia di tipo subletale che letale; esperimenti condotti in campo, durante lo scarico attivo dell'acqua di produzione, hanno permesso di osservare, in condizioni meteo-marine reali, quali possono essere le variazioni spaziali della tossicità nell'ambiente marino ricevente l'effluente. La maggior parte delle ricerche, condotte in aree geograficamente differenti, hanno evidenziato che la tossicità dell'acqua di produzione sugli organismi acquatici è solitamente bassa, in conseguenza del processo di diluizione a mare e si manifesta limitatamente alla zona di diluizione o rimescolamento iniziale (*near field*).

La maggior parte degli studi sulle acque di produzione sono stati condotti come

saggi brevi o acuto-prolungati (<96h) poiché esperimenti con tempi di esposizione più lunghi se, da un lato, permettono di avere delle risposte croniche, tuttavia incorrono nella possibile perdita di alcuni costituenti attraverso i processi di volatilizzazione, assorbimento e degradazione che avvengono nel tempo (Capuzzo, 1987).

I dati ecotossicologici vengono espressi più comunemente come la concentrazione di un effluente(in %) o di una sostanza chimica (ad esempio in mg/l) che determina uno specifico effetto sul 50% della popolazione esposta (EC_{50}) e/o come la concentrazione che non determina nessun effetto (no observed effect concentration NOEC).

Molti studi ecotossicologici a breve termine sono stati condotti sulle acque di produzione, scaricate da piattaforme situate nel mare del Nord. Brendehaug et al. (1992) hanno condotto test con organismi appartenenti a livelli tassonomici e trofici differenti, quali: batteri (*Photobacterium phosphoreum* saggio a 15 minuti), alghe (*Skeletonema costatum* saggio a 24-48h) e crostacei (*Artemia salina* saggio a 24h); registrando una tossicità acuta bassa o media (dati di EC_{50} compresi tra 4,0 e 53,5 %), tale da indurre effetti solo nella zona di rimescolamento iniziale. Schiff et al. (1992) hanno osservato un risultato simile saggiando la sensibilità di batteri (*P. phosphoreum*), crostacei (*Mysidopsis bahia* saggio a 96h), policheti (*Neanthes arenaceodentata* saggio a 96h) e ricci di mare (*Strongylocentrotus purpuratus* saggio di fertilizzazione a 20 minuti); questi ultimi sono apparsi gli organismi più sensibili tra quelli saggiati (dati di EC_{50} compresi tra 0,70 e 1,2 %) mentre i policheti sono risultati quelli più tolleranti (dati di EC_{50} compresi tra 18,1 e 28,6 %). Stromgren et al. (1995) hanno esposto alghe (*S. costatum*) e bivalvi (*Mytilus edulis* saggio a 96-120h, *Abra alba* saggio a 96-120h, *Crassostrea gigas* saggio a 24h) ad acque di produzione e hanno individuato maggiori risposte con i bivalvi, probabilmente per l'alta capacità filtrante che permette loro di respirare ed assimilare sostanze nutritive ed, al contempo, accumulare i contaminanti. Somerville et al (1987) hanno studiato gli effetti delle acque di produzione su idroidi coloniali (*Campanularia flexuosa* saggio a 10g), su copepodi (*Calanus finmarchicus* saggio a 24h), su larve di ostriche (*C.gigas*), su crostacei (*Daphnia magna* Straus saggio a 48h) e su trote (*Salmo gairdneri* saggio a 24h) riscontrando una tossicità ambientale variabile spazialmente entro 10 m dal punto di scarico. Stagg et al. (1995) hanno osservato, sempre per le acque di produzione

scaricate nel mare del Nord, una tossicità acuta dell'effluente mediante saggi in laboratorio condotti con batteri (*P.phosphoreum*), alghe (*S.costantum*) e copepodi (*Acartia tonsa* e *Tisbe battagliai* saggi a 48h); queste ultime specie hanno mostrato gli effetti tossici maggiori, probabilmente perché particolarmente sensibili ai composti organici volatili caratterizzanti l'acqua di produzione.

Alcune valutazioni ecotossicologiche acute e croniche su acque di produzione scaricate dalle piattaforme metanifere, localizzate nel mar Adriatico e su campioni ambientali marini (colonna d'acqua e sedimento), prelevati intorno alla struttura sono state svolte impiegando una batteria di specie costituita da batteri (*P.phosphoreum*), alghe (*Dunaliella tertiolecta* saggio a 72h), rotiferi (*Brachionus plicatilis* saggio a 48h), crostacei (*Artemia Gold* *Argentemia* saggio a 24-96h) e pesci (*Dicentrarchus labrax* saggio a 96h); le acque di produzione sono risultate mediamente tossiche (dati di EC₅₀ compresi tra 6 e 45 %), ma nessun effetto è stato osservato nell'ambiente marino ricevente l'effluente, in conseguenza dei ridotti volumi scaricati di acque di produzione e del processo di diluizione iniziale che avviene in pochi metri dal diffusore (*Virno Lamberti et al.*, 2006). In particolare, gli esperimenti condotti in laboratorio con la spigola autoctona *D. labrax* hanno evidenziato che, sebbene nel periodo totale di esposizione (24h) le larve non avessero mostrato effetti differenti tra acqua di produzione filtrata e quella non filtrata, tuttavia si è osservato un andamento temporale della mortalità più veloce nelle prime ore di esposizione degli individui ad acqua di produzione non filtrata (*Mariani et al.*, 2004).

Una serie di studi ecotossicologici a lungo termine (esposizione *in situ* per alcune settimane e/o mesi), con diverse specie di invertebrati sono stati condotti al fine di valutare l'impatto spaziale, in ambiente marino dell'acqua di produzione scaricata da un'installazione a produzione di olio situata a Carpenteria (Santa Barbara, California). Raimondi and Schmitt (1992) hanno esposto larve di bivalvi (*Haliotis rufesens*) alla *plume* dell'acqua di produzione fino a 1000 m dal diffusore ed hanno osservato che la riduzione della capacità natatoria era inversamente correlata alla distanza dallo scarico. Osenberg et al. (1992) hanno, similmente, riscontrato lo stesso andamento nella diminuzione del tasso di crescita e di riproduzione in molluschi (*Mytilus californicus* e *M. edulis*) esposti, mediante gabbie, a distanze di 100-1000 m dal diffusore. Krause (1992; 1993) ha osservato, mediante esperimenti in laboratorio, che nei ricci di mare (*S.*

purpuratus) la capacità dello sperma di fertilizzare le uova ed il successo riproduttivo si riducono in seguito ad esposizione ad acqua di produzione. Lo stesso Krause (1994; 1995) esponendo in gabbie ancorate sul campo per otto settimane, ricci a diverse distanze dalla piattaforma, in presenza di scarico attivo dell'acqua di produzione, ha osservato che fino a circa 100 m dal diffusore gli animali presentavano gonadi più grandi ed una riduzione sia del successo di fecondazione delle uova sia del tasso di attacco degli spermatozoi. L'autore ha ipotizzato che i contaminanti presenti nell'acqua di produzione potrebbero aver provocato una minore motilità degli spermatozoi mentre le femmine adulte, in presenza di composti organici lipofili, adotterebbero come meccanismo passivo di detossificazione l'accumulo di questi contaminanti nelle uova, con conseguente riduzione degli effetti tossici sull'adulto, ma con ripercussioni sulla fecondazione. Lo stesso processo è stato osservato anche nei molluschi (*Fan et al.*, 1992), negli anfipodi (*Linden*, 1976), nei pesci (*Larsson et al.*, 1993; *Hogan et al.*, 1975; *Daniels and Means*, 1989), negli uccelli (*Ratcliffe*, 1967) e nei mammiferi (*Britt and Howard*, 1983).

Molti autori (*Baumann*, 1989; *Soto et al.*, 1991; *Jobling and Sumpter*, 1993; *Johnsen et al.*, 1994; *Frost et al.*, 1998) hanno considerato i composti organici, in particolar modo gli idrocarburi aromatici e i fenoli, quali maggiori responsabili della tossicità delle acque di produzione.

La tossicità dei BTEX per gli organismi acquatici è alta, ma generalmente lo è anche la velocità con cui questi composti si allontanano dalla fase acquosa. La tossicità si esplica non tanto in seguito ad interruzione dei processi biologici, quanto piuttosto in seguito ad effetti narcotici e di alterazione delle membrane cellulari permeabili, come le branchie (*Meyerhoff*, 1975; *Morrow et al.*, 1975). I mitili, ad esempio, non hanno dei sistemi di eliminazione attiva per il benzene, tuttavia quando questo si accumula nei tessuti possono abbassarne la concentrazione mediante sistemi di detossificazione passiva (metallotioneine, citocromo P).

Per gli invertebrati gli effetti subletali (moltiplicazione cellulare, comportamento natatorio e respiratorio, capacità foto-tattica) sono spesso reversibili quando gli animali sono riportati in condizioni di acqua pulita. I dati disponibili in letteratura sulla tossicità acuta e cronica dei BTEX per diversi organismi evidenziano valori medi di EC₅₀ tra 1250 e 8420 µg/l e di NOEC tra

3100 e 4900 µg/l (*Karman et al.*, 2002).

Gli NDP (naftalene, fenantrene e dibenzotiofene) sono meno tossici per gli organismi acquatici rispetto agli IPA a più alto peso molecolare, tuttavia le forme alchilate possono indurre effetti tossici.

Gli IPA hanno una diversa modalità di azione tossica a seconda del composto considerato (azione narcotica, fototossicità, disturbi della regolazione ormonale, effetti mutageni). Se l'effetto è di tipo narcotico, ci si aspetta che la tossicità aumenti sia con il peso molecolare che con l'idrofobicità del composto ($\log K_{ow}$). Effetti mutageni e ormonali possono avvenire in seguito ad esposizioni prolungate anche a basse concentrazioni di IPA. I dati di tossicità degli IPA, in letteratura, evidenziano valori medi di EC_{50} tra 1,2 e 520 µg/l e valori medi di NOEC da 0,18 a 11000 µg/l (*Karman et al.*, 2002).

I fenoli alchilati C_1 - C_3 sono altamente solubili in acqua e rapidamente degradabili in ambiente marino. Quindi i soli effetti tossici che tendono a provocare sono acuti e di tipo narcotico; gli omologhi più pesanti, quali i fenoli C_8 e C_9 possono generare effetti a più a lungo termine.

3.3 Bioconcentrazione e bioaccumulo dei contaminanti presenti nelle acque di produzione

Gli organismi hanno la tendenza a concentrare contaminanti nei tessuti; adottano quindi tutta una serie di strategie fisiologiche e biochimiche per neutralizzare o ridurre gli effetti tossici quando i livelli di concentrazione diventano troppo elevati. La capacità biologica di tollerare la presenza di contaminanti dipende dalla quantità e dalla forma chimica con cui queste sostanze sono presenti nell'ambiente, dalle caratteristiche degli organismi esposti e dalle vie di assunzione. Il principale fattore che influenza il processo di bioaccumulo è la biodisponibilità, ovvero la concentrazione di un composto che può essere assorbita da un organismo a seconda delle diverse vie di assunzione; fattori che determinano la biodisponibilità sono l'adsorbimento a particelle solide, sedimenti e macromolecole, la formazione di sospensioni colloidali, la chelazione, la complessazione e la ionizzazione.

I processi di diluizione e di dispersione della maggior parte delle acque di produzione scaricate in mare sono tali che, quasi sempre gli effetti biologici

avversi nell'ambiente acquatico ricevente sono ridotti e limitati alla zona di campo vicino (*Neff and Sauer, 1996; Neff, 2002*).

Già abbiamo visto nel paragrafo precedente che la maggior parte degli studi ecotossicologici relativi alle acque di produzione individuano come maggiori responsabili di effetti subletali e letali, osservati negli organismi esposti allo scarico, i composti organici; mentre altri studi relativi alla stima del bioaccumulo di contaminanti presenti in acque di produzione individuano la tendenza da parte del biota ad assorbire sia composti inorganici che organici.

Virno Lamberti et al. (2006) hanno studiato l'accumulo di metalli pesanti in mitili posti in vicinanza di una piattaforma a gas localizzata nell'Adriatico Centrale. Gli organismi trapiantati possiedono concentrazioni più elevate di cadmio e zinco rispetto agli organismi mantenuti nelle aree di controllo. Va tenuto presente che i metalli sono contaminanti e che non permangono a lungo nella colonna d'acqua, ma tendono ad essere accumulati nei sedimenti a tessitura più fine e/o bioaccumulati nei tessuti degli organismi marini; l'accumulo di questi due metalli, piuttosto che di altri, può essere spiegato considerando che sono costituenti degli anodi sacrificali della struttura offshore e quindi sono in maggior quantità in prossimità della piattaforma. Anche i livelli di As sono risultati più alti di quelli dei controlli nei tessuti di organismi sia trapiantati (*Virno Lamberti et al., 2006*) sia naturalmente adesi ai piloni della struttura (*Cicero et al., 2003*); tuttavia l'analisi di speciazione chimica ha dimostrato che questo elemento è principalmente presente sotto forma di arsenobetaina (>90%), composto organico non tossico e non imputabile a sorgenti di origine antropica, ma a fonti naturali e generalmente bioaccumulato dagli organismi marini (*Virno Lamberti et al., 2006*).

In generale i metalli essenziali (ferro, rame, zinco, cromo, manganese, nickel e cobalto) sono richiesti dagli organismi in minime quantità e sono coinvolti in numerose funzioni biologiche; se sono presenti in concentrazioni inferiori a quelle intracellulari ottimali l'organismo entra in sofferenza, mentre se sono in quantità eccessive generano effetti tossici. I metalli non essenziali (mercurio, cadmio e piombo) sono tollerati entro certe concentrazioni, al di sopra delle quali diventano tossici.

In molti organismi operano a livello cellulare meccanismi di detossificazione che si basano sulle proprietà chelanti da parte di molecole come le metallotioneine, o sul sequestro di cationi metallici liberi sotto forma di

concrezioni di sali insolubili; in altri organismi, come pesci e crostacei decapodi, sono attivi meccanismi di omeostasi che mantengono a livelli fisiologici le concentrazioni interne di molti metalli contro variazioni del livello del metallo nell'ambiente (Cognetti, 1992).

Rabalais et al. (1992) hanno studiato gli effetti dello scarico delle acque di produzione da piattaforme presenti nel Golfo del Messico, osservando un accumulo di contaminanti originari dell'effluente (idrocarburi totali ed IPA alchilati) in bivalvi (*C.gigas*) nell'area adiacente lo scarico e fino a 1000 m dal diffusore. I composti organici, in generale, sono difficilmente biodegradabili nell'ambiente marino e tendono ad essere accumulati nei tessuti di organismi animali a più elevato contenuto lipidico. Il benzene ed il toluene hanno scarso potenziale di bioaccumulo ($\log K_{ow}$, circa 2-3) mentre l'etilbenzene e gli xileni leggermente maggiore, ma generalmente i BTEX sono rimossi dalla colonna d'acqua per volatilizzazione e quindi non tendono ad essere accumulati (Neff, 2002). Qualora questi composti si trovassero nell'ecosistema acquatico in concentrazioni tali da essere bioaccumulati, il benzene verrebbe degradato mediante detossificazione ma difficilmente eliminato totalmente dall'organismo, mentre il toluene verrebbe ossidato per via enzimatica molto più facilmente e i prodotti di ossidazione rapidamente escreti dall'organismo. I naftaleni sono biodisponibili ma considerati meno tossici perché, qualora bioaccumulati, sono rilasciati rapidamente dai tessuti rispetto agli IPA a peso molecolare maggiore (Neff, 2002). Per quanto riguarda gli IPA, la potenzialità di questi composti ad essere bioaccumulati dipende dalla natura lipofila del composto che li rende disponibili agli organismi. Alcuni studi hanno evidenziato che questi composti organici si accumulano più facilmente in organismi appartenenti a livelli trofici più bassi in quanto gli organismi a livelli trofici superiori, come i pesci, che accumulano principalmente nel fegato e nella cistifellea, sono dotati di notevoli capacità metaboliche (Frost et al., 1998); i metaboliti prodotti dai vertebrati (pesci, uccelli e mammiferi) tuttavia sono spesso cancerogeni.

3.4 Variazioni nella struttura delle biocenosi bentoniche esposte allo scarico delle acque di produzione

Gli organismi bentonici, che vivono in stretto contatto con il fondo, in genere

sessili e sedentari o comunque dotati di limitate capacità di spostamento, sono particolarmente adatti come indicatori biologici di inquinamento (Kingston, 1992). Essi forniscono informazioni sito-specifiche delle condizioni dell'area marina studiata; inoltre, essendo dotati di vita media relativamente lunga e di un *turnover* molto più lento rispetto a quello dei popolamenti planctonici, rappresentano una sorta di memoria biologica che consente di effettuare valutazioni anche su scala temporale (Trabucco *et al.*, 2006). Gli effetti di una perturbazione su una comunità bentica marina si manifestano a 3 diversi livelli: comparsa di specie indicatrici di perturbazione, alterazione della struttura bentonica e sviluppo di *facies* edafiche (Bellan *et al.*, 1985). Le modificazioni della struttura biocenotica sono dovute non solo alla perdita delle specie caratteristiche della biocenosi originale, ma alla comparsa di specie meglio adattate alle nuove condizioni ambientali (Virno *et al.*, 2006). L'entità dell'impatto sulle comunità bentoniche che vivono nell'area interessata dalle strutture petrolifere dipende, oltre che dalla composizione chimica dell'acqua di produzione scaricata, da alcune condizioni ambientali, quali velocità della corrente e profondità del fondo. La presenza dell'istallazione e dello scarico dell'acqua di produzione sul fondo possono indurre varie modifiche nelle caratteristiche granulometriche e tessiturali del sedimento, inducendo di conseguenza, delle variazioni in termini di abbondanza e di diversità delle specie nel popolamento che abita il sedimento. La componente dello scarico, costituita da particelle in sospensione, può raggiungere velocemente il fondo producendo un duplice effetto sia di modificazione della granulometria del sedimento che di soffocamento degli animali che non riescono velocemente ad allontanarsi. In ambienti in continuo movimento, l'impatto è minore rispetto ad ambienti più tranquilli dove si ha, invece, una più facile deposizione di materiale proveniente dall'alto.

Rabalais *et al.* (1992) studiando gli effetti dello scarico dell'acqua di produzione da piattaforme presenti nel Golfo del Messico hanno osservato un impatto sulla comunità bentonica, in termini di riduzione del numero di specie e di individui, nell'area adiacente allo scarico e fino ad 800 m di distanza, dove l'accumulo di idrocarburi volatili ed IPA alchilati nel sedimento è risultato maggiore. Neff *et al.* (1992) hanno osservato potenziali impatti delle acque di produzione, scaricate da due piattaforme nelle acque costiere della Louisiana,

sulla comunità bentonica con dominanza di specie opportunistiche di policheti fino a circa 100 m dalla struttura; tale distribuzione della fauna può essere stata influenzata dall'effetto della piattaforma indipendentemente dalle acque di produzione e/o dallo scarico stesso dell'acqua di produzione. Osenberg et al. (1992) hanno osservato una variabilità della comunità bentonica con la distanza dallo scarico dell'acqua di produzione in Carpenteria (Santa Barbara, California), registrando la maggior presenza di nematodi nell'area più vicina al diffusore (< 100 m); si tratta di organismi che tollerano bene sedimenti ricchi di idrocarburi di origine petrolifera (*Sandulli and De Nicola, 1991*). Trabucco et al. (2006) hanno studiato il popolamento macrozoobentonico di fondo mobile intorno ad una piattaforma del mar Adriatico centrale, caratterizzata dallo scarico dell'acqua di produzione: nelle stazioni fino a 50 m hanno osservato la presenza di specie più tolleranti alle variazioni granulometriche del sedimento indotto dalle attività di perforazione, mentre nelle stazioni più vicine alla struttura hanno osservato valori di abbondanza totale e di ricchezza specifica mediamente più alti e la presenza di specie ecologicamente legate alla popolazione di *Mytilus galloprovincialis* che, staccandosi dai piloni della struttura, ha creato una vera e propria facies sul fondo.

Capitolo IV

Studio della dispersione delle acque di produzione mediante

l'individuazione di uno o più traccianti chimici

4.1 Introduzione

L'individuazione e la determinazione quantitativa di uno o più composti che possano essere rappresentativi delle acque di produzione e, per caratteristiche fisiche e chimiche, possano avere funzione di traccianti chimici dell'effluente, può essere un valido strumento di indagine al fine di osservare realmente il percorso delle acque di produzione in mare durante i processi di diluizione e dispersione a cui esse vanno incontro una volta scaricate. Sino ad oggi, non sono stati pubblicati studi relativi all'individuazione di traccianti chimici per le acque di produzione provenienti da piattaforme petrolifere situate nell'area mediterranea.

Un tracciante chimico è una qualunque sostanza che consenta di seguire il percorso di un processo dinamico naturale; alcuni traccianti sono composti naturalmente presenti nell'ambiente/fluido oggetto di studio (salinità, ioni, nutrienti, isotopi radioattivi), altri vengono introdotti sperimentalmente dal ricercatore. Un composto, per essere un tracciante chimico, deve possedere alcune caratteristiche quali: essere rappresentativo del fenomeno da osservare, essere conservativo, essere sufficientemente facile da analizzare e monitorare.

L'acqua di produzione è una miscela complessa contenente diverse sostanze in concentrazioni estremamente variabili; di conseguenza l'aggiunta di un marcatore (come ad esempio un agente colorante) a valle della linea di trattamento chimico e prima che l'acqua venga immessa in mare, sarebbe la soluzione più semplice per 'tracciare' il suo percorso nell'ambiente. Tuttavia, un'operazione del genere in questo caso non è possibile per le misure restrittive che regolano il processo di raccolta dell'acqua di produzione e non consentono l'aggiunta di alcuna sostanza, da parte di un ente che non sia la società proprietaria delle piattaforme, né a monte né a valle del sistema di trattamento.

Nello studio svolto sono state utilizzate quattro piattaforme gassifere per effettuare una caratterizzazione chimica delle acque di produzione. Inoltre, non potendo aggiungere traccianti chimici nell'effluente, si è pensato di identificare chimicamente, tra i composti già presenti nelle miscele i più significativi per la tracciabilità delle acque di produzione in mare.

La salinità (ioni cloro) e la temperatura, utili per determinare la densità delle acque di produzione rispetto alle condizioni di stratificazione dell'ambiente

marino ricevente, sono estremamente condizionate dalla tipologia e dal tempo di vita del giacimento.

I metalli, in generale, non sono facilmente determinabili in acqua di mare perché si trovano in concentrazioni molto basse.

I composti organici più volatili (VOC) sono assenti nei mari incontaminati e la loro presenza può essere imputata a sorgenti di immissione puntiformi; tuttavia, poiché tendono a degradarsi velocemente a contatto con l'atmosfera, in mare raggiungono concentrazioni spesso prossime o inferiori ai limiti di quantificazione. Quindi possono essere impiegati come traccianti soltanto quando i volumi di acque di produzione scaricati in mare sono talmente elevati da permetterne il 'rilevamento' nell'ambiente perché presenti in concentrazioni determinabili.

Le caratteristiche chimiche di questi composti organici e i bassi volumi di acque di produzione provenienti dalle piattaforme adriatiche, ci hanno impedito di utilizzare i VOC come traccianti.

Burns et al. (1999a) hanno utilizzato benzene e toluene per tracciare le acque di produzione nel mare del Nord, ma i volumi di effluente scaricato da queste piattaforme è maggiore di quello prodotto dalle piattaforme metanifere del mar Adriatico; pertanto le concentrazioni misurate nella colonna d'acqua sono più elevate e non confrontabili con altre fonti di immissione.

Gli idrocarburi più pesanti hanno un carattere più conservativo rispetto ai BTEX; grazie alle loro caratteristiche di persistenza sono diventati ormai contaminanti ubiquitari. Spesso sono presenti intorno alle piattaforme in concentrazioni paragonabili a quelle riscontrate in altre aree più o meno costiere e quindi è difficile discriminare in mare le quantità di questi composti, apportate dall'acqua di produzione, da quelle presenti come concentrazioni "di fondo" o apportate da altre fonti antropiche (es. transito delle navi in prossimità delle piattaforme stesse).

Alcuni additivi, aggiunti nella linea di produzione per migliorare il processo, sono discriminanti specifici di produzione; questi additivi si possono ritrovare nelle acque di produzione al momento dello sversamento in mare.

4.2 Piano di lavoro

La caratterizzazione chimica delle acque di produzione di quattro piattaforme petrolifere è stata effettuata per identificare i composti più significativi per la tracciabilità dell'effluente in mare. Successivamente si è proceduto a determinare, sia nelle acque di produzione che in campioni di acqua di mare, tre composti: i BTEX, il glicol dietilenico (DEG) e il toluene idrossibutilato (BHT) (§ capitolo 1, paragrafo 1.4).

I BTEX sono stati scelti in accordo agli unici studi già effettuati sull'impiego di traccianti chimici (benzene e toluene) per studiare la dispersione in mare delle acque di produzione (*Burns et al.*, 1999a; 1999b). Invece i due additivi, DEG e BHT, sono stati scelti per valutare se possono essere utilizzati come traccianti delle acque di produzione in quanto rappresentativi dell'effluente; infatti, la loro presenza in mare è esclusivamente riconducibile alle attività di produzione, dipende dallo scarico delle acque di produzione e la loro determinazione analitica è relativamente semplice.

Il DEG è un solvente solubile in acqua e poco tossico; può essere aggiunto a monte del sistema di trattamento dell'effluente anche in concentrazioni molto elevate, fino a 3500 mg/l; questo comporta che il DEG viene ritrovato in mare in concentrazioni facilmente determinabili anche a distanze crescenti dal punto di scarico.

Il BHT è un composto apolare non facilmente rilevabile in soluzione, tuttavia ha buona affinità con il particolato: per questo è possibile la sua determinazione nella frazione solida, ottenuta per filtrazione dei campioni di acque di produzione e di acque di mare.

4.3 Area di indagine

Il Mar Adriatico si estende all'incirca per 800 Km, ha una larghezza che varia da 90 a 200 Km, una superficie di 138000 Km², un volume di 35000 Km³ ed è collegato al Mediterraneo attraverso lo Stretto d'Otranto.

In base alle caratteristiche batimetriche può essere suddiviso in tre bacini, con una profondità che decresce da sud verso nord: il settore meridionale comprende la Fossa Sud-Adriatica che raggiunge 1200 m di profondità; l'Adriatico Centrale

comprende, invece, la Fossa di Pomo (profondità 270 m) ed è separato dal settore meridionale dalla Soglia di Pelagosa (profondità 100 m); l'Adriatico Settentrionale, infine, è molto meno profondo degli altri settori appena descritti, con fondali che risalgono dolcemente dai 70 m ai 18 m del Golfo di Trieste. La parte settentrionale dell'Adriatico presenta un'estesa piattaforma continentale dove si concentra la maggior parte delle piattaforme *offshore* che producono gas (Scotti, 2004).

Le quattro piattaforme prese in considerazione in questo studio sono situate nell'area centro-settentrionale. Alcune caratteristiche delle piattaforme monitorate sono riportate in tabella 4.3*.

Tabella 4.3 – Localizzazione delle piattaforme monitorate in mar Adriatico.

PIATTAFORMA	DISTANZA DALLA COSTA (Km)	TIPICO FLUSSO SCARICATO (mc/a)	PROFONDITA' COLONNA D'ACQUA (m)	PROFONDITA' PUNTO DI SCARICO (m)
<i>A</i>	6,5	3000	20	0
<i>B</i>	36	6000	116	3
<i>C</i>	15	3000	17,8	-9
<i>D</i>	21	3000	23	-12

*le piattaforme oggetto di questo studio vengono riportate in codice per motivi di privacy richiesti dalla Società di appartenenza.

4.4 Campionamento

4.4.1 Piano di campionamento

Il prelievo delle acque di produzione è avvenuto direttamente sulle piattaforme, da un rubinetto posto a valle del sistema di trattamento dell'effluente; il prelievo di campioni di acqua di mare è avvenuto intorno alla struttura offshore, prelevando campioni solo alla quota superficiale in stazioni poste a distanze crescenti dal diffusore, raggiunte in gommone; solo alla distanza di 25 m sono stati effettuati più campionamenti a diverse quote tra la superficie e il fondo, utilizzando bottiglie Niskin alloggiate su una *rosette* munita di sonda multiparametrica.

Le campagne sono state effettuate a bordo della nave oceanografica *Astrea* nel luglio 2004, nell'agosto 2005 e nel settembre 2006.

4.4.2 Disegno di campionamento

Nel 2004 il prelievo delle acque di produzione è avvenuto su due piattaforme pilota, *A* e *B* ed i campioni di acqua di mare sono stati prelevati sotto le strutture, lungo un unico transetto in direzione della corrente presente al momento dello scarico, in sei stazioni superficiali poste alle seguenti distanze dal diffusore: 0 m (quanto più possibile vicina al punto di scarico), 25 m, 50 m, 250 m, 500 m. Questo disegno preliminare è stato scelto tenendo conto delle indicazioni ricavate dalla letteratura relativa a studi di dispersione in caso di sorgenti puntiformi (*OSPARCOM*, 1999). I primi traccianti ad essere ricercati sui campioni di *A* e *B* sono stati i BTEX.

Nel 2005 il prelievo delle acque di produzione è stato condotto sulle stesse due piattaforme dell'anno precedente; i campioni di acqua di mare sono stati prelevati sotto la struttura, lungo un unico transetto in direzione della corrente presente al momento dello scarico, con sette stazioni superficiali poste alle seguenti distanze dal diffusore: 0 m (quanto più possibile vicina al punto di scarico), 5 m, 10 m, 15 m, 20 m, 25 m. Questo secondo disegno è stato scelto tenendo conto dei risultati preliminari relativi ad uno studio sulla dispersione delle acque di produzione provenienti da dieci piattaforme situate in mar Adriatico (*Scotti*, 2004); il modello Visual Plume - *UM3* (Three Dimensional Update Merge) della U.S Environmental Protection Agency (§ appendice) è stato utilizzato per simulare la dispersione in mare delle acque di produzione utilizzando le caratteristiche reali dei diffusori e i dati misurati *in situ*, relativi alla stratificazione della colonna d'acqua in prossimità delle piattaforme.

Le simulazioni hanno evidenziato che il comportamento delle acque di produzione, in termini di diluizione e mescolamento, dipende fortemente dalle condizioni di stratificazione e dall'intensità delle correnti al momento dello scarico; la *plume* dell'effluente si estende in un raggio di pochi metri (0,5-25 m) dal diffusore e solo in alcuni casi si disperde maggiormente, mai oltre i 43 m di distanza.

Considerando le informazioni fornite dall'applicazione del modello *UM3*, il prelievo delle acque di mare è stato successivamente eseguito entro i 25 m. Sui campioni provenienti dalle piattaforme *A* e *B*, oltre ai BTEX, sono stati analizzati anche il DEG e il BHT.

Nel 2006 sono state campionate altre due piattaforme e non è stato possibile continuare a monitorare *A* e *B*, poiché sulla prima lo scarico a mare è stato sostituito dalla reiniezione mentre la seconda, essendo in *work-over*, non è stata autorizzata al monitoraggio.

Il prelievo delle acque di produzione è stato condotto su *C* e *D* ed i campioni di acqua di mare sono stati prelevati sotto la struttura secondo lo stesso disegno seguito nel 2005, ma infittendo il campionamento superficiale con alcuni prelievi lungo la verticale in corrispondenza della distanza di 25 m dal diffusore, in numero variabile a seconda della profondità della colonna d'acqua. La scelta di aumentare il numero di campionamenti verticali è stata suggerita da ulteriori indicazioni fornite dal modello *UM3*, secondo cui l'effluente, dopo la fase di diluizione iniziale, raggiunge un livello intermedio di trappola localizzato tra la superficie ed il fondo (tra una quota minima di 7,2 m e una massima di 19 m) ad una distanza orizzontale dal diffusore osservata tra i 0,2 m ed i 25 m (*Cianelli et al.*, 2006 a, b). Sui campioni provenienti da *C* e *D* è stato analizzato il DEG.

Le piattaforme da campionare sono state scelte cercando di rappresentare realtà diverse relativamente ai volumi delle acque di produzione scaricate, alla profondità della colonna d'acqua e alla distanza dalla costa.

4.4.3 Attività di campionamento, trattamento e conservazione dei campioni

L'acqua di produzione è stata prelevata a bordo delle piattaforme direttamente dal rubinetto, a valle del sistema di trattamento, in bottiglie in vetro pirex oscurate, da un litro; l'acqua di mare invece è stata campionata sia direttamente in bottiglie scure di vetro pirex da un litro, sia con bottiglie Niskin e, poi trasferita in bottiglie di vetro pirex scure, da un litro.

Dopo il campionamento, sia per l'acqua di produzione che per l'acqua di mare, si è proceduto nel seguente modo:

- Per l'analisi dei BTEX: 5 ml del campione tal quale sono stati trasferiti dalle bottiglie di vetro pirex in vials da 10 ml della Supelco®, a chiusura ermetica, e conservati a 4°C fino al momento dell'analisi;
- Per l'analisi del DEG: 1 l di campione tal quale è stato saturato con

cloruro mercurico per inibire l'attività batterica e conservato a 4°C fino al momento dell'analisi;

- Per l'analisi del BHT: 0,5 l di acqua di produzione e 2 L di acqua di mare, rispettivamente, sono stati filtrati su membrane da 0,45 µm in acetato di cellulosa; i filtri sono stati riposti in capsule petri e conservati a 4°C fino al momento dell'analisi.

4.5 Caratterizzazione preliminare delle acque di produzione

La caratterizzazione chimica preliminare delle acque di produzione provenienti dalle quattro piattaforme *offshore* è stata effettuata per selezionare tra i composti presenti nelle acque di produzione quelli che, per caratteristiche fisiche e chimiche e quantità, potessero essere più idonei come traccianti chimici dell'effluente in mare. L'analisi chimica è stata focalizzata sulla determinazione dei gruppi di composti più significativi per la tracciabilità delle acque di produzione: BTEX, metalli ed alcuni additivi. Il contenuto di IPA non è stato determinato poiché, come già sottolineato, grazie alle loro caratteristiche di persistenza spesso sono presenti intorno alle piattaforme in concentrazioni paragonabili, se non superiori a quelle riscontrate in altre aree più o meno costiere e quindi è difficile discriminare in mare le quantità di questi composti apportate dall'acqua di produzione.

Si riportano in tabella 4.5 i risultati delle analisi chimiche per le acque di produzione.

Tabella 4.5 – Concentrazioni di alcuni composti (ug/l) nelle acque di produzione

Composti (ug/l)	A (2004)	B (2004)	A (2005)	B (2005)	C (2006)	D (2006)
Benzene	2	256	2	118	10,4	20,4
Toluene	3,9	50,6	0,2	1,7	14,1	12,1
Etilbenzene	0,2	115,2	0,3	22,4	7,7	13,8
Xileni	0,5	860,0	0,8	33,7	14,8	20,2
BTEX	6,6	1281,8	3,3	175,8	47,0	66,5
As	1	2	37	3	-	100
Ba	8199	6475	4492	10527	-	-
Cr	<10	<10	127	<10	-	-
Cu	26	22	28	19	-	-
Fe	61922	15201	16802	25483	-	-
Mn	422	396	245	421	350	50
Ni	39	<10	142	21	-	-
Pb	<10	<10	<10	<10	-	-
Zn	<10	<10	43	23	1470	600
Hg	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	-	-
Cd	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	-	-
DEG	-	-	1560	2040	9600	13000
BHT	-	-	1070	200	-	-

Come è stato già anticipato nell'introduzione, sono state fatte alcune considerazioni sui composti indicati in tabella 4.5 e sulle loro concentrazioni, prima di scegliere come traccianti chimici delle acque di produzione a mare delle specie chimiche piuttosto che altre.

I metalli analizzati nelle acque di produzione hanno concentrazioni piuttosto basse ad esclusione di Ba, Fe e Mn.

Il Ba è il principale costituente dei fanghi di perforazione, a base di barite impiegati durante le fasi di installazione e perforazione dei pozzi petroliferi; in conseguenza di ciò la concentrazione di Ba in mare non può essere attribuita esclusivamente allo scarico dell'acqua di produzione, ma può essere una conseguenza delle attività petrolifere in generale.

Il Fe ed il Mn hanno concentrazioni elevate nelle acque di produzione monitorate, tuttavia si tratta di metalli naturalmente presenti in acqua di mare; una volta che le acque di produzione sono scaricate in mare, il fenomeno di diluizione non consente di distinguere le concentrazioni di metalli provenienti dall'effluente dalle quantità già presenti nell'ambiente. Inoltre i metalli, proprio perché in

concentrazioni molto basse, non sono facilmente determinabili in acqua di mare.

I BTEX hanno mostrato concentrazioni estremamente variabili tra le acque di produzione studiate, registrando nell'anno 2004 un contenuto totale su *B* superiore di circa 200 volte a quello misurato su *A* e nell'anno 2005 una quantità più alta di circa 50 volte, sempre rispetto a *A*. Inoltre, per le stesse piattaforme si è osservato un abbattimento delle concentrazioni di BTEX dal 2004 al 2005, che può essere spiegata solo in base alla variabilità della composizione chimica dell'effluente. La composizione dell'acqua di produzione, infatti, cambia nel tempo e man mano che il pozzo va in esaurimento si verifica un incremento della fase acquosa, con conseguente diluizione dei soluti presenti e quindi la diminuzione della concentrazione dei singoli composti.

I BTEX potrebbero essere dei potenziali traccianti delle acque di produzione in mare, qualora queste fossero scaricate in quantità notevoli tali da introdurre in ambiente marino una quantità di BTEX determinabile, nonostante la velocità di questi composti a degradarsi.

Il DEG è stato ritrovato nelle acque di produzione in concentrazioni piuttosto elevate; come già detto in precedenza, si tratta di un composto esclusivamente riconducibile alle acque di produzione e che viene aggiunto in concentrazioni fino a 3500 mg/l; di conseguenza può essere ritrovato in mare in concentrazioni elevate fino a distanze elevate dallo scarico.

Il BHT è stato ritrovato in concentrazioni variabili nelle acque di produzione, direttamente correlato alla quantità di particelle sospese presenti nell'effluente: a maggiore presenza di particolato corrisponde un più alto livello di BHT. La presenza di questo composto in mare è riconducibile allo scarico di acque di produzione.

4.6 Metodologia

4.6.1 Analisi dei BTEX

Il metodo di analisi prevede, sia per l'acqua di produzione che per l'acqua di mare, tre passaggi: la preconcentrazione degli analiti, il loro desorbimento termico e l'analisi in gascromatografia con rivelatore a massa (GC-MS) (*Louch et al.*, 1992; *EPA*, 1996; *Eisert and Pawliszyn*, 1997; *Dewulf et al.*, 1999; *Alpendurada*, 2000).

La preconcentrazione degli analiti è stata effettuata con una fibra bipolare trifasica (divinilbenzene (DVB)-polidimetil silossano (PDMS), Carboxen-PDMS, DVB-Carboxen-PDMS); questa fibra immersa nel campione da estrarre consente di preconcentrare gli analiti, oltre che per ripartizione tra le fasi, anche sfruttando il processo di adsorbimento, tipico del Carboxen, un carbone poroso con siti attivi idrofobici che formano legami secondari con analiti apolari (anche i più volatili) i quali, per effetto di alte temperature, si rompono rilasciando le molecole adsorbite.

Poiché tali strumenti comportano l'iniezione di bassissimi volumi di campione (1-5 μ l) i BTEX sono stati estratti e preconcentrati sullo spazio di testa del campione mantenuto alla temperatura di 35°C, attuando un'energica agitazione e fissando un tempo di esposizione alla fibra di 12 minuti.

La determinazione analitica è stata condotta in gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS); questo accoppiamento combina le grandi capacità di separazione della gascromatografia con quella di identificazione e caratterizzazione della struttura e della massa molecolare degli analiti, tipica della spettrometria di massa, dalle quali si può risalire univocamente all'identità delle sostanze, anche quando sono coeluite. GC-MS consente di raggiungere sensibilità elevate con limiti di rivelabilità assoluti che oscillano attorno alla decina di picogrammi (*Eisert and Levsen, 1996*).

Il gas cromatografo impiegato è della Agilent Technologies® (Palo Alto, CA, USA), modello 6890 Plus, su cui è stata montata una colonna capillare VOCOL della Supelco® di 60 m di lunghezza, 0,25 mm di diametro interno e con uno spessore della fase stazionaria di 1,5 μ m. Le programmate di temperatura applicate nelle determinazione dei BTEX sono riportate in tabella 4.6.1.1; le corse cromatografiche avevano durata di 25 minuti.

Lo spettrometro di massa è un quadrupolo, modello 5973 Network, della stessa ditta del GC, operante in modalità SIM attraverso la selezione degli ioni specifici dei composti di interesse.

Tabella 4.6.1.1 - Programmate di temperatura della corsa cromatografica per la separazione di BTEX

	Temperatura iniziale (°C)	°C/min	Temperatura finale (°C)	Tempo Isoterma finale (min)
0	50	0	50	2
1	50	10	230	5

Nel caso dell'applicazione della modalità SIM, ovviamente, si sfrutta l'informazione della corrente ionica prodotta dagli ioni selezionati e la loro abbondanza relativa; con tale funzione, molto utile quando si ricerca una particolare sostanza o un particolare raggruppamento molecolare, si raggiungono sensibilità maggiori rispetto alla modalità della scansione totale delle masse (modalità SCAN).

I dati quantitativi sono stati ottenuti attraverso il calcolo dei fattori di risposta dello strumento calcolato per ogni singolo analita di interesse, utilizzando il metodo dello standard esterno.

I limiti di rivelabilità per i singoli composti sono di 1 µg/l per il benzene e di 0,1 µg/l per toluene, etilbenzene e xileni. I valori di concentrazione degli xileni sono dati come sommatoria dei tre isomeri (o-xilene, p-xilene, m-xilene).

4.6.2 Analisi di glicol dietilenico (DEG)

Il metodo di analisi prevede due fasi, sia per l'acqua di produzione che per l'acqua di mare: l'estrazione e preconcentrazione dell'analita dalla matrice e l'analisi dell'estratto (*Cappiello et al.*, submitted).

Prima dell'analisi strumentale, il campione è sottoposto ad una procedura di estrazione e pre-concentrazione del DEG mediante l'utilizzo della tecnica di estrazione in fase solida SPE (Solid Phase Extraction).

La SPE presenta diversi vantaggi rispetto ad altre tecniche estrattive:

- è una tecnica semplice, rapida e richiede l'uso di un quantitativo minimo di solvente;
- offre una elevata percentuale di recupero, grande selettività e precisione;
- è anche una tecnica di preconcentrazione;
- il processo può essere eseguito per più campioni in parallelo, anche sotto vuoto o addirittura con metodi automatizzati.

L'estrazione SPE permette non solo di evitare eventuali problemi legati alla concentrazione elevata di sale presente all'interno della matrice acquosa in questione, ma, essendo anche una tecnica di pre-concentrazione, consente di concentrare il campione in questo caso di circa 500 volte, da un volume iniziale di 100 ml ad un volume finale di 200 μ l .

La SPE prevede l'utilizzo di particolari cartucce (Isolute ENV+ da 3 ml), riempite con 200 milligrammi di fase stazionaria, in grado di trattenere l'analita in maniera selettiva. La resina adsorbente è costituita da polistirene-divinilbenzene idrossilato. La forma irregolare delle particelle ha una dimensione media di 90 μ m ed un'area superficiale elevata di 1000 m²/g; si tratta di una resina adatta all'estrazione di composti polari che non sono trattenuti efficacemente dalle colonne C18 a base silicea. Il campione viene fatto passare attraverso la cartuccia che trattiene l'analita per azione della fase adsorbente, successivamente l'analita viene riestratto in un volume ridotto con un solvente adatto.

La procedura di estrazione e preconcentrazione avviene attraverso le fasi di seguito indicate:

A- Fase di condizionamento della colonna:

1.A passaggio di 15 ml di acetone;

2.A passaggio di 10 ml di acqua distillata;

B- Fase di estrazione del campione:

1.B passaggio di 100 ml di campione mediante l'ausilio di un sistema da vuoto (flusso: 5ml/min);

2.B lavaggio del contenitore del campione e della trappola con acqua distillata;

3.B asciugatura della colonna sotto vuoto per almeno 45 minuti sotto flusso di azoto;

C- Fase di eluizione:

1.C eluizione con 8 ml di acetone;

2.C evaporazione del solvente in flusso di azoto fino a 200 μ l;

3.C aggiunta di 200 μ l di acqua distillata;

4.C evaporazione fino al volume finale di 200 μ l (completamente acquoso);

L'acqua distillata, essendo meno volatile dell'acetone, permette di evitare che l'estratto possa incidentalmente andare a secco con conseguente perdita di analita.

La determinazione analitica del glicol dietilenico è stata eseguita attraverso l'applicazione della nano-FIA-MS (nano- Flow Injection Analysis-Mass

Spectrometry) una tecnica che prevede l'introduzione diretta del campione con volume dell'ordine dei nl, veicolato dalla fase mobile acquosa nella sorgente dello spettrometro di massa. L'iniettore è a quattro porte con *loop* interno (volume di 60 nl) e permette l'inserimento del campione all'interno del flusso di fase mobile senza che vi sia l'interruzione di questo ultimo. L'analisi è stata condotta in modalità SIM (Selected Ion Monitoring) con la tecnica di ionizzazione elettronica (EI) monitorando gli ioni caratteristici del composto. I parametri operativi utilizzati in questo lavoro sono indicati in tabella 4.6.2.1.

Tabella 4.6.2.1 – Parametri operativi per l'analisi del DEG

Fase mobile	acqua per HPLC
Flusso	250 – 300 nl/min
Volume di iniezione	60 nl
Temperatura della sorgente	250°C
Temperatura del quadrupolo	150°C
Modalità di ionizzazione	impatto elettronico

La ripetibilità del metodo è stata valutata mediante undici iniezioni consecutive di una soluzione standard di glicol a 100 mg/l con una loop da 60 nl e un flusso di circa 300 nl/min. Il limite di rivelabilità strumentale (LOD - Limit Of Determination), determinato mediante iniezioni successive di una soluzione a 10 mg/l di DEG analizzata ad un flusso di 300 nl/min, è di 600 pg. Il limite di rivelabilità del metodo è stato stimato pari a 0,031 mg/l. La percentuale di recupero e l'RSD (Relative Standard Deviation) sono buoni ma esistono margini di miglioramento già in oggetto di studio (tabella 4.6.2.2).

Tabella 4.6.2.2 – Percentuale di recupero e RSD per l'analisi del DEG

Campione	Percentuale di recupero (%)	recupero medio 65% RSD 16,3%
1	61,9	
2	62,8	
3	52,3	
4	80,0	
5	68,3	

4.6.3 Analisi di toluene idrossibutilato (BHT)

L'analisi del BHT prevede due fasi: l'estrazione e preconcentrazione dell'analita e l'analisi in GC-MS.

Il protocollo messo a punto prevede l'impiego di cloruro di metile come solvente estrattore e l'ausilio di un sonicatore per ottenere una maggiore efficienza e riduzione dei tempi di estrazione (*Kolpin et al.*, 2002).

In una beuta da 250 ml, vengono aggiunti 40 ml del solvente insieme al filtro raccolto che viene sonicato per 20 minuti a temperatura ambiente.

Il solvente, dopo aver rimosso il filtro, viene sottoposto ad una riduzione del volume sotto flusso di azoto. Nel caso delle acque di produzione, dove la concentrazione di BHT è più elevata, è sufficiente ridurre il volume a 20 ml, con una preconcentrazione finale dell'analita di 250 volte il volume iniziale del campione (pari a 500 ml). Per i campioni di acqua di mare con livelli di concentrazione più bassi, si riduce il volume della soluzione estraente fino a 2 ml con una preconcentrazione finale pari a 1000 volte il volume iniziale di campione (21).

La separazione cromatografica viene realizzata con una colonna SP-B5 della Supelco® le cui caratteristiche, insieme alle condizioni gascromatografiche, sono di seguito riportate in tabella 4.6.3.1:

Tabella 4.6.3.1 – Caratteristiche della colonna cromatografica impiegata per l'analisi del BHT

Fase stazionaria	Polidimetil silossano
Lunghezza	30 m
Diametro interno	0,25 mm
Spessore fase	0,25 μ m
Fase mobile	elio
Diametro lyner	2 mm

Il protocollo prevede l'iniezione di 2 μ l di campione tramite un iniettore split/splitless impostato a 240°C di temperatura e funzionante in modalità *splitless*. La separazione cromatografica avviene in programmata di temperatura, con un flusso di elio (gas di trasporto) di 1 ml/min: la temperatura iniziale del forno del GC è settata a 50°C e mantenuta per 2 minuti; quindi, con una rampa di 10°C/min vengono raggiunti i 250°C mantenuti per 10 minuti fino al termine dell'analisi che ha durata totale di 32 minuti. All'uscita della colonna cromatografica l'analita viene inviato nella camera di ionizzazione dello spettrometro di massa attraverso un'interfaccia settata a 240°C. L'acquisizione del rivelatore è stata impostata in modalità SIM (*Selected Ion Monitoring*) con il quadrupolo settato per la rilevazione di due ioni caratteristici del BHT e che hanno un rapporto m/z di 205 e 220 (ione molecolare). Il protocollo seguito garantisce un recupero dell'analita pari al 90%, un limite di rivelabilità strumentale di 4 pg con un limite di rivelabilità del metodo di 2 ppb.

4.7 Risultati e discussione

4.7.1 A

La piattaforma A è stata installata nel mar Adriatico Centrale 25 anni fa ed ha scaricato le acque di produzione fino all'anno 2005 attraverso un diffusore posto appena sopra la superficie dell'acqua; negli ultimi due anni il flusso delle acque di produzione scaricate è stato abbastanza ridotto fino a circa 3000 mc/a.

Le concentrazioni di BTEX ritrovate nelle acque di produzione e nei campioni di acqua di mare, prelevati a distanze crescenti dal punto di immissione, sono riportate in tabella 4.7.1.1.

Tabella 4.7.1.1 – Concentrazioni di BTEX ($\mu\text{g/l}$) per A

	Anno	benzene $\mu\text{g/l}$	toluene $\mu\text{g/l}$	etilbenzene $\mu\text{g/l}$	xileni $\mu\text{g/l}$	BTEX $\mu\text{g/l}$
PFW A	2004	2,0	3,9	0,2	0,5	6,6
A 0m	2004	2,0	0,3	0,2	0,5	3
A 25m	2004	<1	0,2	<0,1	<0,1	0,2
A 50m	2004	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<1
A 250m	2004	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<1
A 500m	2004	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<1
PFW A	2005	2,0	0,5	0,6	0,8	3,3
A 0m	2005	0,3	0,2	0,3	0,4	1,7
A 5m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
A 10m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
A 15m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
A 20m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
A 25m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Il contenuto di BTEX nelle acque di produzione di A è stato piuttosto basso sia nel 2004 che nel 2005; questo è dovuto al fatto che la composizione dell'acqua di produzione cambia nel tempo e, man mano che il pozzo va in esaurimento, si verifica quantitativamente un aumento della fase acquosa, con una conseguente diluizione dei soluti presenti e quindi una diminuzione della concentrazione dei singoli composti.

Nell'acqua di mare i BTEX sono stati ritrovati solo sotto il punto di scarico (0 m), sia nel campionamento del 2004 sia in quello del 2005 (figure 4.7.1.1 e 4.7.1.2).

Le basse concentrazioni osservate sotto lo scarico e le quantità ancor più basse e per questo non rivelabili nelle altre stazioni sono dovute: al limitato volume di effluente scaricato, all'età del giacimento, al fenomeno di diluizione ed alla volatilità che caratterizza i BTEX.

In effetti, l'acqua di produzione scaricata in mare, in entrambi i campionamenti (2004 e 2005), consisteva in un sottile scolo a pelo d'acqua; essendo il giacimento quasi esaurito, i soluti sono in concentrazioni minori già nell'acqua di produzione e tendono a diminuire ancora di più una volta in mare. Al fenomeno di diluizione si unisce il fatto che questi composti sono altamente volatili e tendono ad allontanarsi dalla fase acquosa per disperdersi in atmosfera.

Se i volumi di acque di produzione scaricati fossero stati maggiori e le

concentrazioni di BTEX nell'effluente fossero state più alte, probabilmente anche le quantità misurate in acqua di mare sarebbero state sufficienti per descrivere il processo di dispersione dello scarico nell'ambiente ricevente.

Burns et al. (1999a, 199b), infatti, hanno studiato la dispersione delle acque di produzione nel mare del Nord proprio attraverso l'analisi di benzene e toluene nell'effluente ed nei campioni di acqua di mare; i volumi scaricati da queste installazioni erano tuttavia di gran lunga superiori a quelli normalmente scaricati dalle piattaforme a gas presenti nel mar Adriatico e inoltre, le concentrazioni di benzene e toluene misurate nelle acque di produzione erano superiori ad 1 mg/l; di conseguenza è stato possibile rilevare la presenza di questi composti in mare anche ad una distanza di 900 m dal diffusore.

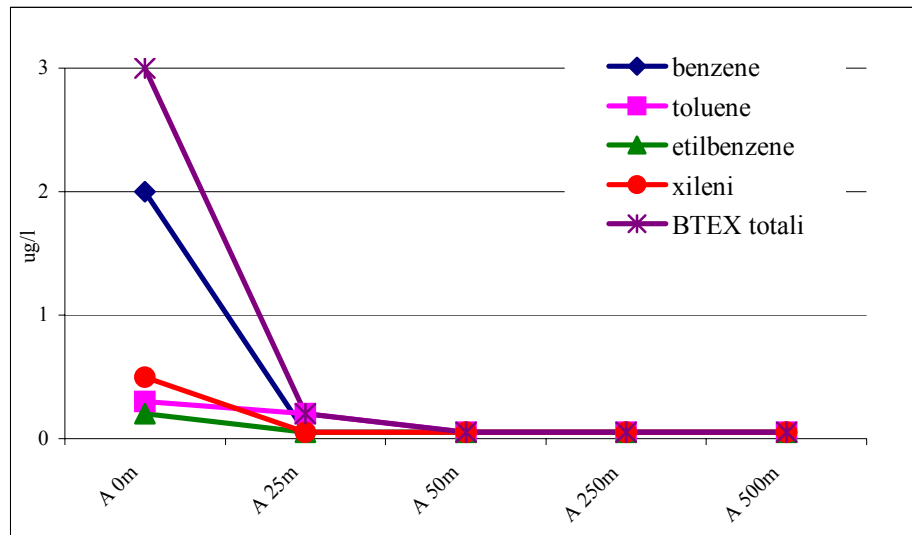


Figura 4.7.1.1 – Concentrazioni di BTEX (µg/l) per A (anno 2004)

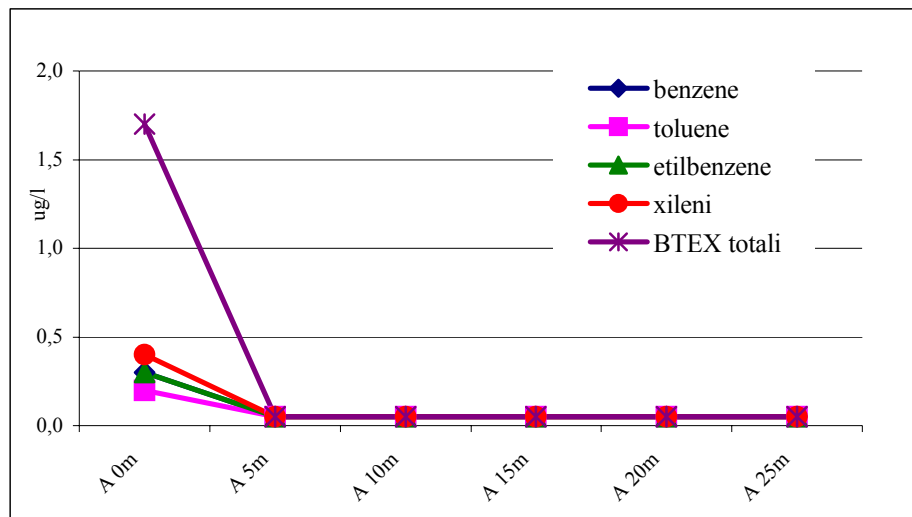


Figura 4.7.1.2 – Concentrazioni di BTEX ($\mu\text{g/l}$) per A (anno 2005)

Le concentrazioni di DEG misurate nei campioni provenienti dalla piattaforma A sono riportate in tabella 4.7.1.2.

Tabella 4.7.1.2 – Concentrazioni di DEG ($\mu\text{g/l}$) per A

	anno	DEG ($\mu\text{g/l}$)
PFW A	2005	1560
A 0m	2005	736
A 5m	2005	490
A 10m	2005	350
A 15m	2005	360
A 20m	2005	390
A 25m	2005	300

La concentrazione di DEG registrata nell'acqua di mare sotto lo scarico, diminuisce fino a circa la metà della quantità presente nell'acqua di produzione, per poi diminuire progressivamente con la distanza dal punto di scarico (figura 4.7.1.3).

Questo andamento è dovuto al fatto che il flusso uscente dal diffusore, essendo pressoché inconsistente, si disperde velocemente in superficie ed il DEG, solubile in acqua, tende anche esso a dissolversi pur restando ancora determinabile a 25 m di distanza dal punto di immissione.

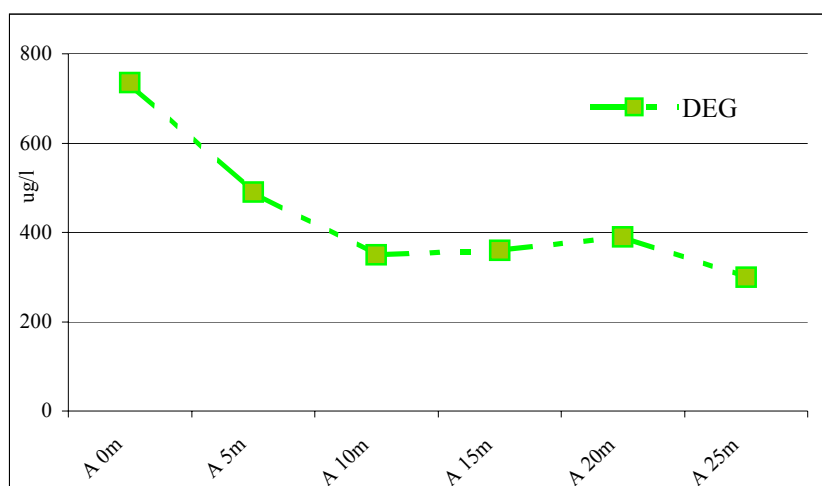


Figura 4.7.1.3 – Concentrazioni di DEG ($\mu\text{g/l}$) per A (anno 2005)

Le concentrazioni di BHT misurate nei campioni di particolato provenienti dalla piattaforma A sono riportate in tabella 4.7.1.3.

Tabella 4.7.1.3 – Concentrazioni di BHT ($\mu\text{g/l}$) per A

	anno	BHT ($\mu\text{g/l}$)
PFW A	2005	1070
A 0m	2005	500
A 5m	2005	200
A 10m	2005	100
A 15m	2005	<1
A 20m	2005	<1
A 25m	2005	<1

La concentrazione di DEG registrata nell'acqua di mare sotto lo scarico, diminuisce fino a circa la metà della quantità presente nell'acqua di produzione, per poi diminuire con la distanza dal punto di scarico, rimanendo determinabile fino a 10 m di distanza dallo scarico.

È stato già detto che il flusso che fuoriesce dalla piattaforma A è molto debole, per cui le particelle sospese nell'acqua di produzione, inizialmente, si muovono e si disperdono in superficie (come è stato osservato durante le attività di campionamento); man mano che ci si allontana il particolato tende a scendere sotto la superficie ed il BHT, essendo adsorbito sulle particelle, segue lo stesso destino registrando concentrazioni più basse a quota superficiale nelle stazioni più distanti.

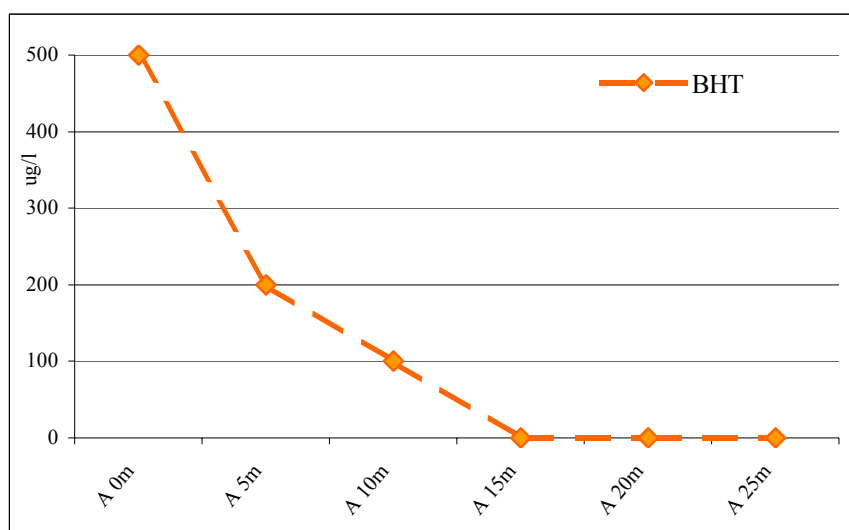


Figura 4.7.1.4 – Concentrazioni di BHT ($\mu\text{g/l}$) per A (anno 2005)

4.7.2 B

La piattaforma *B* è stata installata nel mar Adriatico Centrale 15 anni fa e scarica le acque di produzione in mare attraverso un diffusore posto a 3 m sopra la superficie del mare; appartiene alle installazioni che immettono in mare i volumi più elevati di acque di produzione (circa 6000 mc/a).

Le concentrazioni di BTEX ritrovate nelle acque di produzione e nei campioni di acqua di mare, prelevati a distanze crescenti dal punto di immissione, sono riportate in tabella 4.7.2.1. I BTEX totali sono risultati piuttosto alti nell'effluente nel 2004 mentre nel 2005 il contenuto è risultato essere minore rispetto all'anno precedente, con un abbattimento minimo (circa la metà) per il benzene e massimo (circa 30 volte) per il toluene; questo, come già detto nel paragrafo 4.4, è il risultato della variabilità della composizione chimica delle acque di produzione nel tempo.

Tabella 4.7.2.1 – Concentrazioni di BTEX ($\mu\text{g/l}$) per *B*

	anno	benzene $\mu\text{g/l}$	toluene $\mu\text{g/l}$	etilbenzene $\mu\text{g/l}$	xileni $\mu\text{g/l}$	BTEX $\mu\text{g/l}$
PFW <i>B</i>	2004	256,0	50,6	115,2	860,0	1281,8
B 0m	2004	3,0	4,0	9,0	8,3	24,3
B 25m	2004	<1	3,5	0,6	0,8	4,9
B 50m	2004	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<1
B 250m	2004	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<1
B 500m	2004	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<1
PFW <i>B</i>	2005	118,0	1,7	22,4	33,7	175,8
B 0m	2005	1,1	0,6	0,2	1,9	3,9
B 5m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B 10m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B 15m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B 20m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B 25m	2005	<1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Nell'anno 2004 la concentrazione di benzene nella stazione situata sotto lo scarico è risultata essere circa 100 volte inferiore alla quantità rilevata nell'acqua di produzione mentre, nelle stazioni poste a distanze maggiori dal diffusore, il benzene è risultato inferiore al limite di rilevabilità ($1 \mu\text{g/l}$) (figura 4.7.2.1).

Gli omologhi superiori del benzene, quali toluene ed etilbenzene, sono stati ritrovati fino a 25 m dal punto di scarico, allontanandosi probabilmente più lentamente dall'acqua rispetto al benzene; gli xileni hanno seguito lo stesso andamento, anche se l'abbattimento rispetto al contenuto presente nell'effluente è risultato più forte.

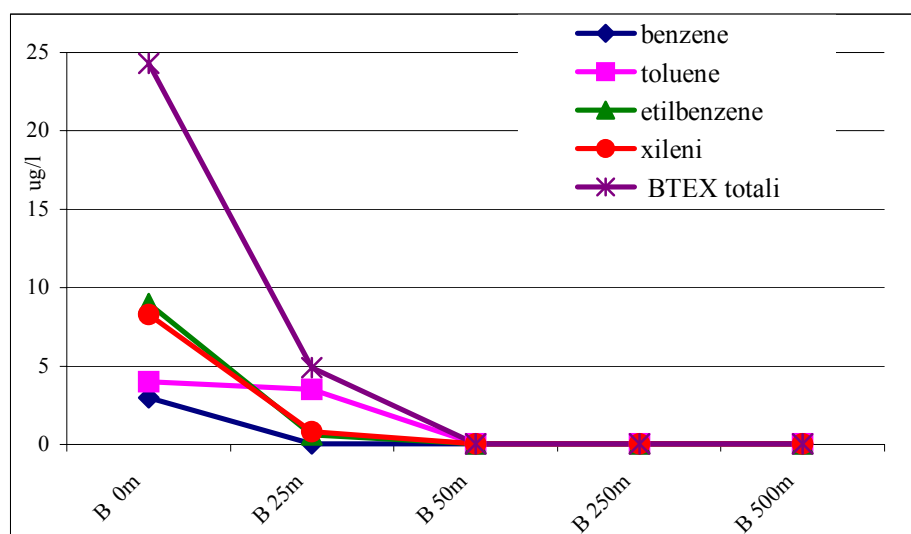


Figura 4.7.2.1 – Concentrazioni di BTEX (µg/l) per B (anno 2004)

Nel 2005 i BTEX a mare sono apparsi in quantità più basse rispetto all'anno precedente e tutti gli elementi sono stati ritrovati solo nella stazione situata immediatamente sotto il punto di scarico, risultando inferiori al limite di rilevabilità già a 5 m di distanza dalla piattaforma (figura 4.7.2.2). Nel 2004 le concentrazioni iniziali di questi elementi nell'effluente erano più elevate.

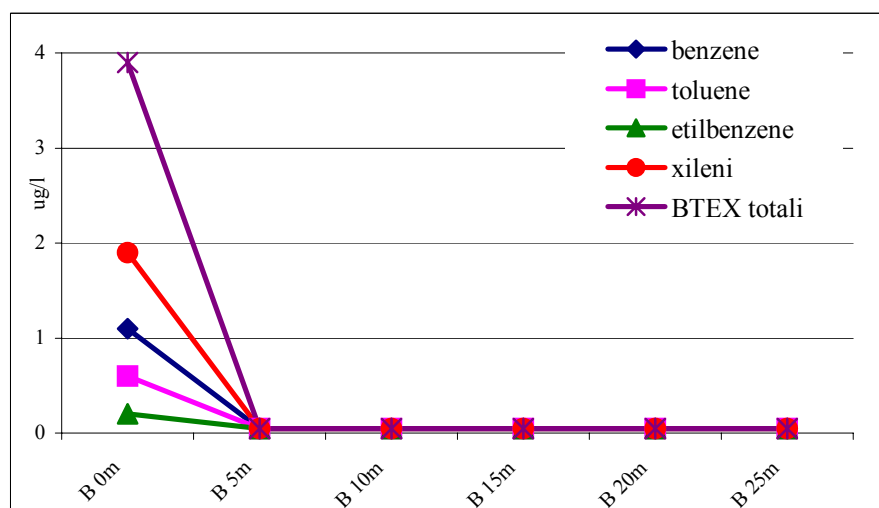


Figura 4.7.2.2 – Concentrazioni di BTEX ((µg/l) per B (anno 2005)

Le concentrazioni di DEG misurate nei campioni provenienti dalla piattaforma B sono riportate in tabella 4.7.2.2.

Tabella 4.7.2.2 – Concentrazioni di DEG ($\mu\text{g/l}$) per *B*

	anno	DEG ($\mu\text{g/l}$)
PFW <i>B</i>	2005	2040
B 0m	2005	640
B 5m	2005	270
B 10m	2005	390
B 15m	2005	620
B 20m	2005	600
B 25m	2005	590

L'effluente immesso in mare viene sottoposto al processo di diluizione da parte dell'ambiente marino ricevente e quindi la concentrazione di DEG sotto lo scarico risulta essere più bassa rispetto a quella di partenza. L'acqua di produzione della piattaforma *B* viene scaricata con un getto piuttosto forte da un diffusore posto in alto rispetto alla superficie del mare; questo fa sì che l'effluente venga spinto sotto la superficie e quindi l'analisi di DEG su campioni prelevati in superficie a 5 e 10 m ha misurato una quantità più bassa rispetto alla stazione più vicina e a quelle più lontane (figura 4.7.2.3).

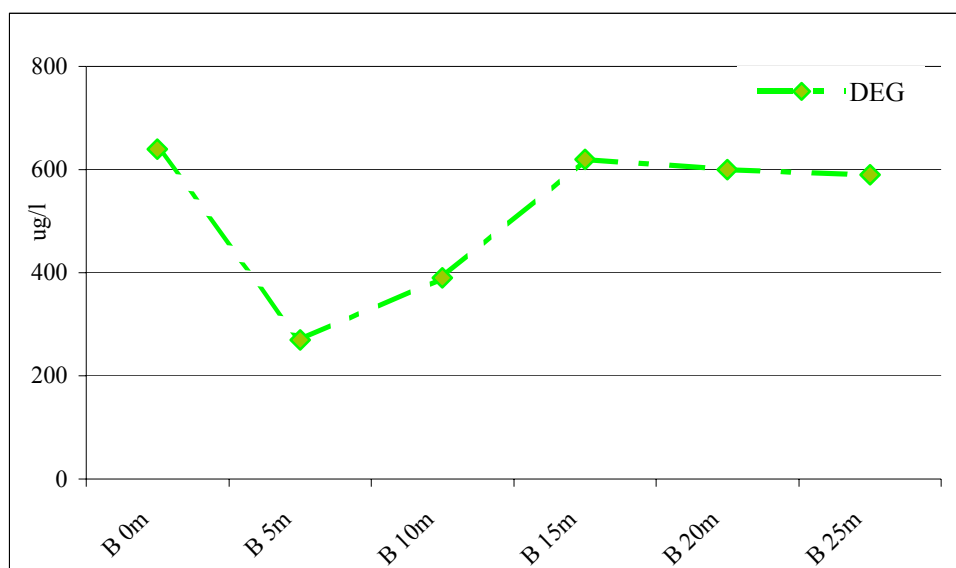


Figura 4.7.2.3 – Concentrazioni di DEG ($\mu\text{g/l}$) per *B* (anno 2005)

La salinità dell'acqua di produzione (35 ‰), più bassa di quella dell'ambiente marino ricevente allo scarico (38,8 ‰), porta l'effluente a risalire in superficie e questo spiega l'aumento della concentrazione osservato a 10 e 15 m, fino a raggiungere valori pressoché costanti tra 15 e 25 m.

I valori di BHT nell'acqua di produzione di *B* sono riportati in tabella 4.7.2.3.

Tabella 4.7.2.3 – Concentrazioni di BHT ($\mu\text{g/l}$) per *B*

	anno	BHT ($\mu\text{g/l}$)
PFW <i>B</i>	2005	200
B 0m	2005	100
B 5m	2005	<1
B 10m	2005	<1
B 15m	2005	<1
B 20m	2005	<1
B 25m	2005	<1

Sotto lo scarico il BHT è stato pari alla metà della concentrazione iniziale dell'effluente per poi non essere più determinabile a distanze maggiori.

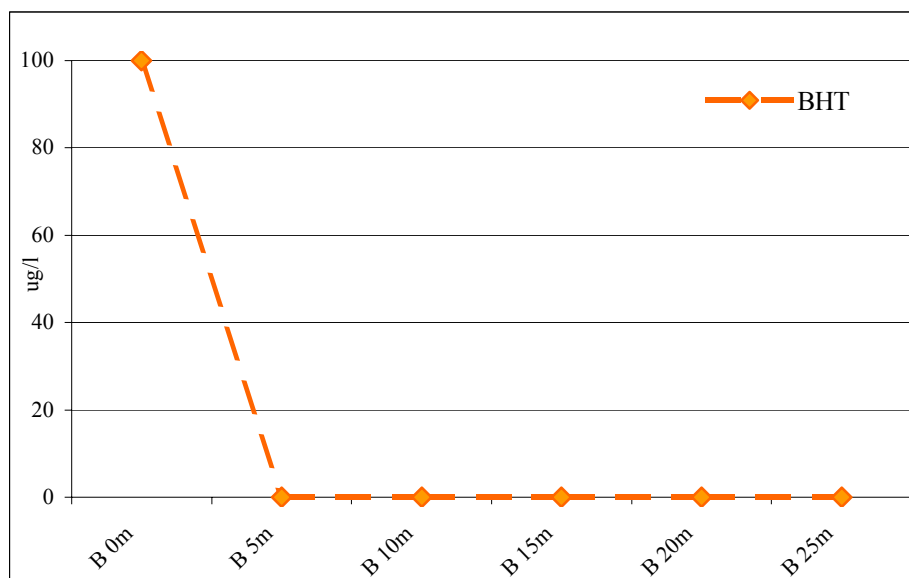


Figura 4.7.2.1 – Concentrazioni di BHT ($\mu\text{g/l}$) per *B*

Anche l'andamento di questo additivo trova la stessa spiegazione data per il DEG: la posizione del diffusore, in alto rispetto alla superficie e l'elevato volume di acque di produzione scaricato determinano una forte pressione che porta l'effluente al di sotto della superficie; il BHT misurato nei campioni superficiali è una minima parte del quantitativo presente in mare in quanto la maggior parte è scesa lungo la colonna d'acqua trasportata dalle particelle su cui è adsorbita.

4.7.3 C

La piattaforma C è stata installata nel mar Adriatico Centrale 19 anni fa ed il volume di acque di produzione scaricate in mare è mediamente intorno ai 3000 mc/a. Lo scarico avviene attraverso un diffusore posto a 9 m sotto la superficie del mare e, ovviamente, la dispersione di queste acque scaricate in profondità avviene in modo differente rispetto a quella di effluenti provenienti da diffusori posti in prossimità o al di sopra della superficie.

La concentrazione di DEG nelle acque di produzione è piuttosto elevata (tabella 4.7.3.1), mentre le concentrazioni ritrovate in mare nelle stazioni campionate in superficie, tra 0 e 25 m, sono risultate essere 4-5 volte inferiori e pressoché costanti. Una quantità più elevata si è registrata solo a 25 m, alla quota di -8 m (figura 4.7.3.1).

Tabella 4.7.3.1 – Concentrazioni di DEG ($\mu\text{g/l}$) per C

	anno	DEG ($\mu\text{g/l}$)
PFW C	2006	9600
C 0m sup	2006	1600
C 5m sup	2006	1640
C 10m sup	2006	1400
C 15m sup	2006	1820
C 20m sup	2006	1520
C 25m sup	2006	1570
C 25m -4m	2006	1380
C 25m -8m	2006	2460
C 25m -12m	2006	1070

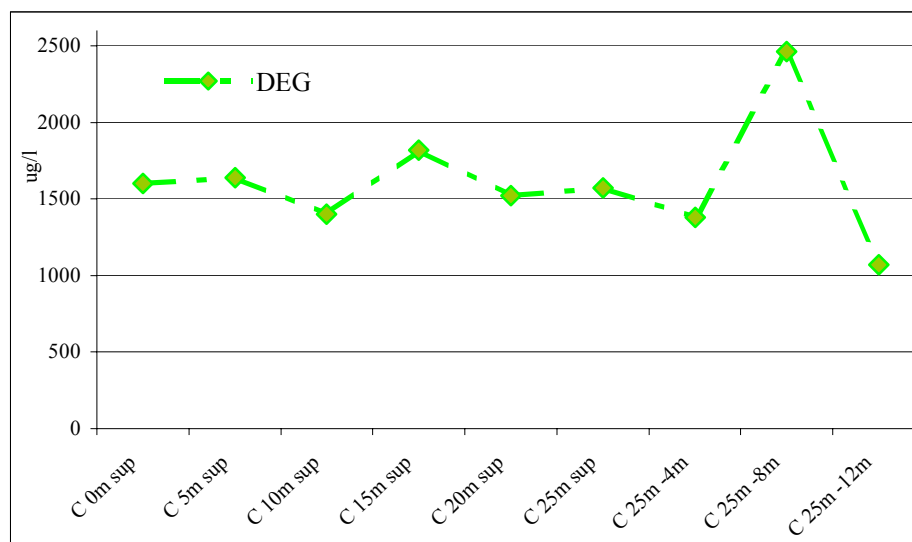


Figura 4.7.3.1 – Concentrazioni di DEG ($\mu\text{g/l}$) per C (anno 2006)

Probabilmente se i campioni tra 0 e 25 m si fossero potuti raccogliere alla stessa profondità dello scarico (circa 8-9 m di profondità), con la stessa precisione che in superficie, avremmo misurato concentrazioni sicuramente più elevate di quanto registrato in superficie.

D'altra parte, l'acqua di produzione di C, avendo salinità (37,1 ‰) prossima a quella dell'acqua di mare (37,3 ‰), non risale in superficie ma si disperde alla stessa quota dello scarico; i valori registrati in superficie sono pertanto da considerarsi valori di fondo intorno alla piattaforma.

4.7.4 D

La piattaforma D è stata installata 34 anni fa e scarica in mare un volume di acque di produzione mediamente intorno a 3000 mc/a; lo scarico avviene attraverso un diffusore posto a 12 m sotto la superficie del mare.

La concentrazione di DEG osservata nell'acqua di produzione è piuttosto elevata (tabella 4.7.4.1). Come per C, le concentrazioni ritrovate in mare nelle stazioni campionate in superficie, tra 0 e 25 m, sono risultate 8-10 volte più basse di quelle registrate nell'acqua di produzione e pressoché costanti.

Tabella 4.7.4.1 – Concentrazioni di DEG ($\mu\text{g/l}$) per *D*

	anno	DEG ($\mu\text{g/l}$)
PFW D	2006	13000
D 0m sup	2006	1330
D 5m sup	2006	2310
D 10m sup	2006	2160
D 15m sup	2006	1510
D 20m sup	2006	1260
D 25m SUP	2006	1720
D 25m -4m	2006	1910
D 25m -8m	2006	2810
D 25m -12m	2006	1820
D 25m -16m	2006	1290

Una quantità più elevata è stata registrata solo a 25 m, alla quota di -8 m (figura 4.7.4.1). Probabilmente, se i campioni tra 0 e 25 m si fossero potuti raccogliere alla stessa profondità dello scarico, con la stessa precisione che in superficie, avremmo misurato concentrazioni sicuramente più elevate di quanto registrato in superficie. D'altra parte, l'acqua di produzione di *D*, avendo salinità (36,6 ‰) prossima a quella dell'acqua di mare (37,5 ‰), non risale in superficie ma si disperde alla stessa quota dello scarico; i valori registrati in superficie sono pertanto da considerarsi valori di fondo intorno alla piattaforma.

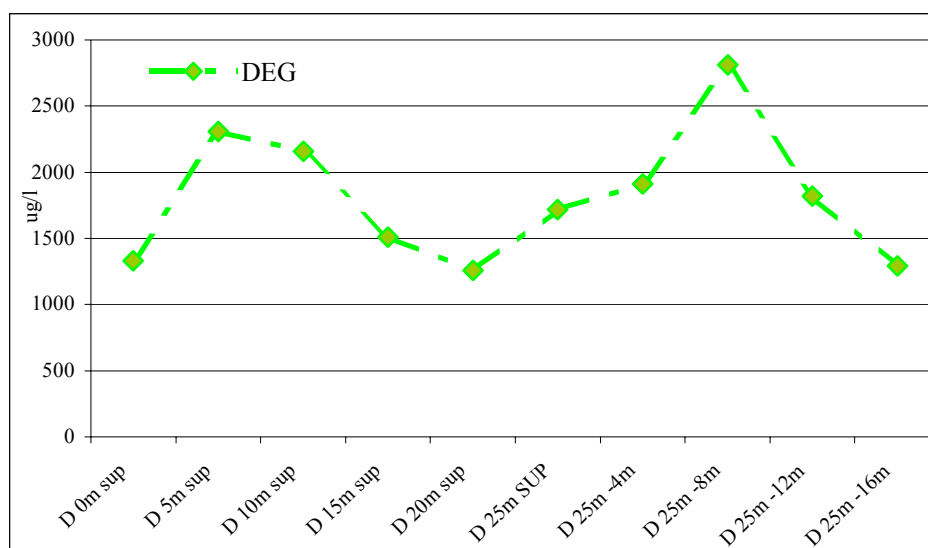


Figura 4.7.4.1 – Concentrazioni di DEG ($\mu\text{g/l}$) per *D* (anno 2006).

4.8 Dispersione delle acque di produzione sulla base dei risultati di BTEX, DEG e BHT

Le analisi chimiche di BTEX sui campioni di acqua di produzione e di acqua di mare di *A* e *B* nel 2004 e nel 2005 hanno evidenziato che:

- o questi composti sono stati ritrovati in mare principalmente in prossimità del punto di scarico e al massimo fino a 25 m di distanza dal diffusore (*B* 2004); in effetti il ritrovamento di BTEX in mare è avvenuto a distanze crescenti dal punto di immissione dell'effluente soltanto quando i volumi di acque di produzione scaricati sono stati molto elevati;
- o gli omologhi superiori del benzene, come toluene ed etilbenzene, hanno mostrato una maggiore rintracciabilità in mare rispetto al benzene stesso.

Alla luce di quanto detto i BTEX non sono risultati essere dei traccianti ideali delle acque di produzione in mare.

Su *A* e *B* sono state eseguite nel 2005 anche le analisi di DEG e BHT:

- o il DEG è stato sempre ritrovato in mare fino alla massima distanza campionata dal diffusore (25 m).
- o L'andamento della concentrazione di questo composto è stato variabile in funzione del volume di acqua di produzione scaricata, della quota a cui è posizionato il diffusore e della salinità dell'effluente rispetto a quella dell'ambiente marino ricevente.
- o la presenza di DEG non può che essere addebitata allo scarico dell'acqua di produzione.

Sulla base dei risultati dell'anno 2005 il DEG è risultato essere un potenziale tracciante delle acque di produzione in ambiente marino.

- o Il BHT è stato ritrovato in mare a distanze variabili da 5 m fino a 15 m di distanza dal diffusore.
- o La concentrazione risulta decrescente in superficie, a distanze crescenti dallo scarico; il BHT si ripartisce di preferenza nel particolato e pertanto tende a scendere sotto la superficie registrando concentrazioni più basse a quota superficiale.
- o la presenza di BHT non può che essere addebitata allo scarico dell'acqua

di produzione.

Per quanto detto la presenza in mare di BHT è condizionata dal quantitativo di particolato presente nell'effluente; infatti essendo l'analisi del BHT condotta sul particolato, in funzione della presenza di questo si rischia di ritrovare il BHT in concentrazioni prossime al limite di rilevabilità già a distanze vicine alla piattaforma.

Nel 2006 le analisi di DEG effettuate sui campioni di acque di produzione e di acqua di mare provenienti dalle piattaforme *C* e *D* hanno evidenziato che:

- o questo composto è stato ritrovato fino alla massima distanza campionata rispetto alla piattaforma.
- o Come già spiegato nel paragrafo precedente avendo campionato in superficie con uno scarico del diffusore posizionato in profondità, le concentrazioni di DEG osservate a livello superficiale sono state prossime ai valori di fondo intorno alla piattaforma mentre nell'unica stazione campionata alla stessa quota dello scarico (stazione posta a 25 m di distanza dal diffusore) le quantità osservate sono state più alte. Probabilmente se avessimo avuto la possibilità di campionare tra 0 e 25 m alla stessa profondità dello scarico, con la stessa precisione con cui si è campionato in superficie, avremmo misurato a questa quota concentrazioni significative per tracciare la dispersione del DEG partendo dalla stazione più vicina allo scarico fino ad arrivare a quelle più lontane.

Considerando tutte le analisi effettuate tra il 2004 e il 2006, si può affermare che il composto che risponde maggiormente alle caratteristiche richieste per la tracciabilità dello scarico in ambiente marino è il DEG.

4.9 Confronto dei risultati sulla 'tracciabilità' con i risultati di un modello di dispersione delle acque di produzione in mar Adriatico

I risultati di questa ricerca sulla tracciabilità delle acque di produzione sono stati confrontati con i risultati forniti dal modello teorico di dispersione Visual Plume-UM3 (Three Dimensional Update merge) dell'U.S Environmental

Protection Agency (§Appendice). Il modello è stato impiegato per simulare la fase di mescolamento iniziale delle acque di produzione provenienti da 10 piattaforme petrolifere, delle quali fanno parte anche le piattaforme monitorate per l'individuazione e la determinazione del tracciante chimico.

Il modello ha considerato come dati di input la densità e il flusso annuale dell'effluente e la concentrazione del tracciante (DEG) misurata nell'effluente; le condizioni di stabilità della colonna d'acqua sono state rappresentate sia utilizzando i dati di stratificazione misurati in situ relativi alla stagione estiva (Cianelli et al., 2006a) che impiegando i dati del database DADB (Dartmouth Adriatic Data Base) disponibili per tutte le stagioni (Cianelli et al., 2006b).

Tutte le simulazioni hanno mostrato che il comportamento delle acque di produzione, in termini di diluizione e di mescolamento, dipende fortemente dalla differenza di densità tra l'effluente scaricato e l'ambiente marino ricevente. L'effluente infatti, appena fuoriuscito dal diffusore, va incontro ad una rapida diluizione e raggiunge una profondità detta livello di intrappolamento in cui la sua densità è uguale a quella ambientale. In alcune condizioni si può verificare che la *plume* abbia ancora una certa quantità di moto e che, prima di stabilizzarsi, raggiunga un secondo livello di intrappolamento. Il modello *UM3* fornisce in uscita indicazioni sui livelli di intrappolamento e sulle condizioni di massima risalita o sprofondamento dell'effluente nella colonna d'acqua.

Nella maggior parte dei casi la massima distanza orizzontale, rispetto al punto di scarico, che la *plume* raggiunge una volta fuoriuscita dal diffusore, è di una decina di metri; in particolare, tra le piattaforme nelle quali è stato analizzato il DEG, la distanza minore della *plume* ($8,15 \cdot 10^{-8}$ m) è stata osservata per A e la più elevata per C (8,6 m).

Il livello di intrappolamento dell'acqua di produzione è raggiunto per tutte le piattaforme ad una profondità prossima a quella a cui è avvenuto lo scarico in mare, ovvero in superficie e a -9 m, con un intervallo di oscillazione di circa 1-2 m sopra o sotto il punto di immissione; questo giustifica il fatto che l'analisi chimica abbia registrato la concentrazione più alta di DEG in prossimità della profondità di scarico. Tuttavia l'evoluzione spaziale della *plume* simulata dal modello non fornisce i massimi valori assoluti di diluizione ma i massimi relativi alla sola fase di mescolamento iniziale; pertanto l'acqua di produzione può essere ritrovata in mare anche oltre i 10 m indicati dal modello, come è stato riscontrato

dall'analisi chimica che ha quantificato concentrazioni di DEG fino alla massima distanza campionata dal diffusore (25 m).

Il modello ha indicato il più basso fattore di diluizione (1% dell'effluente scaricato) per l'istallazione *A* che infatti, al momento del campionamento, scaricava un volume d'acqua inconsistente in prossimità della superficie; per *B* è stata registrata una diluizione del 50%, rispetto alla concentrazione iniziale, a circa 5 m dal diffusore; per *C* il fattore di diluizione è stato del 15% a meno di 1 m dal diffusore e per *D* del 60% a circa 9 m.

Considerando anche le simulazioni in cui è stata inserita la variabilità stagionale della stratificazione, è risultata, per tutte le piattaforme, una elevata diluizione degli effluenti durante il periodo autunnale ed invernale, per effetto del maggiore rimescolamento della colonna d'acqua, mentre la diluizione è stata più bassa in primavera ed in estate a causa della stabilità della colonna d'acqua. Va quindi osservato che una pianificazione dell'immissione in mare delle acque di produzione limitatamente alla stagione invernale ed autunnale, essendo favorita la dispersione, potrebbe ridurre gli eventuali effetti sull'ambiente.

Capitolo V

Valutazione ecotossicologica delle acque di produzione e delle acque di mare riceventi lo scarico

5.1 Introduzione

Storicamente le condizioni dell'ambiente sono state valutate tramite indagini di laboratorio che hanno fatto ricorso, in via pressoché esclusiva, a metodiche chimiche, fisiche ed ad analisi microbiologiche; tuttavia, nel tempo è sorta l'evidenza di come l'applicazione di dette metodiche, da sole, non riesca a fornire un quadro sufficientemente accettabile dello stato di qualità ecologica complessiva di un ambiente (*Damiani, 2002*).

Il monitoraggio biologico (biomonitoraggio) consente di esaminare e valutare un qualunque sistema acquatico mediante l'ausilio di organismi viventi; questi possono essere utilizzati in esperimenti di laboratorio oppure essere osservati nel loro ambiente naturale e rappresentare così dei potenziali indicatori delle condizioni ambientali (*bioassessment*) (*Nappi e Jacomini, 2004*).

Gli organismi utilizzati come strumenti di indagine possono presentare una specifica sensibilità o tolleranza verso determinati fattori di disturbo ambientale come, per esempio, nell'ambito di questa ricerca, può essere lo scarico in mare delle acque di produzione.

L'ecotossicologia studia relazioni causa-effetto che si generano tra organismi e contaminanti, e valuta la tossicità di sostanze pure, di miscele o di matrici ambientali in termini di risposta che gli organismi esposti possono manifestare.

Il tipo di effetto dipende dalla concentrazione della sostanza a cui gli organismi sono esposti e dal tipo di esposizione; questa può essere singola (quando l'organismo è esposto una sola volta alla sostanza potenzialmente tossica), ripetuta (più esposizioni in tempi successivi), o cronica (l'organismo è costantemente sottoposto alla sostanza); gli effetti tossici osservati vanno dagli effetti subletali alla mortalità.

5.2 I saggi ecotossicologici come strumento di monitoraggio ambientale

Un saggio di tossicità è una procedura che prevede l'esposizione di alcune specie indicatrici a sostanze tossiche, miscele di inquinanti e matrici ambientali allo scopo di verificare se si manifestano effetti tossici.

I saggi ecotossicologici impiegano sistemi biologici per valutare l'impatto reale o potenziale sull'ambiente naturale di sostanze derivanti dall'attività dell'uomo;

possono essere impiegati come strumento di controllo per valutare l'effetto di contaminanti o di miscele complesse sull'ambiente, o come strumento predittivo per prevedere l'impatto di una sostanza prima della sua emissione (*Sanci e Rosa, 1997*).

I saggi possono essere impiegati a diversi livelli di organizzazione biologica: saggi a livello inferiore dell'organismo (colture cellulari o risposte biochimiche), saggi a livello di singole specie, saggi multispecifici (saggio multispecie organizzate in comunità o in ecosistemi controllati), saggi *in situ*.

I saggi di tossicità permettono una misura diretta e quantificabile degli effetti potenzialmente dannosi per il biota; gli effetti possono essere espressi come numero di organismi morti, come percentuale di uova schiuse o fecondate, come percentuale di inibizione enzimatica, come numero di anomalie scheletriche ecc.

La tossicità ambientale di un composto nei confronti degli animali può esprimersi in termini acuti o cronici; gli effetti acuti hanno grande importanza nei casi di inquinamento grave conseguente ad un incidente (sversamento di uno scarico in un fiume, incidenti di petroliere o mezzi nautici di trasporto marino di composti chimici, ecc.) e richiedono di individuare una specie o più specie in grado di rappresentare con sufficiente significatività il maggior numero di gruppi tassonomici; la tossicità cronica è più difficile da determinare e richiede tempi più lunghi di esposizione degli organismi alla matrice da saggiare (*Perin, 2004*).

L'utilità delle analisi ecotossicologiche risiede anche nella possibilità di misurare la tossicità, non solo di singole specie chimiche, ma anche di miscele complesse consentendo, in questo secondo caso, di considerare le sinergie che possono manifestarsi tra differenti composti. I saggi, in associazione con le analisi chimiche, possono fornire una misura della biodisponibilità degli inquinanti (*Chapman and Long, 1983; Accornero et al., 2004*).

I saggi possono dare informazioni aggiuntive alle analisi chimiche poiché quando vengono osservati effetti sugli organismi in presenza di concentrazioni molto basse dei composti misurati, si può supporre che altri contaminanti, non monitorati con le analisi chimiche, possono essere responsabili delle risposte osservate.

I metodi di esecuzione dei saggi ecotossicologici sono generalmente veloci e poco dispendiosi, con la possibilità di affiancare alle prove condotte in laboratorio

anche esperimenti *in situ*, utili al fine di avere delle risposte biologiche che tengano conto delle condizioni ambientali reali.

Nella selezione degli organismi è importante seguire dei criteri di scelta quali (Volpi Ghirardini e Pellegrini, 2001):

- la sensibilità dell'organismo ad un vasto spettro di contaminanti;
- la diffusione e disponibilità della specie considerata;
- la presenza di una vasta letteratura sulla biologia ed ecologia della specie utilizzata;
- la scelta di specie indigene o rappresentative dell'ecosistema potenzialmente impattato;
- la scelta di specie rilevanti dal punto di vista ecologico;
- la scelta di specie che si prestino al mantenimento in laboratorio (coltura, allevamento), che si possano manipolare e che consentano saggi con rapidità e facilità di esecuzione.

Un singolo organismo raramente è capace di soddisfare tutti questi requisiti e non esiste la specie sensibile per eccellenza (Baudo, 2000), è dunque necessario condurre i saggi di tossicità su specie appartenenti a differenti gruppi tassonomici e, possibilmente, a diversi livelli trofici ed evolutivi: produttori (ad esempio le alghe), consumatori primari (ad esempio i crostacei o i rotiferi), consumatori secondari (ad esempio i pesci) e decompositori (ad esempio i batteri).

Gli invertebrati sono molto impiegati nei saggi ecotossicologici poiché svolgono un ruolo chiave nelle reti trofiche degli ecosistemi acquatici. Hanno diversa sensibilità rispetto alle sostanze tossiche e, nello scegliere un organismo, bisogna tener conto di tutti i fattori biotici ed abiotici (dieta, acclimatazione, condizioni ambientali) che possono influenzare la sua risposta in presenza di un contaminante; in tal senso, spesso, è utile scegliere uno stadio di sviluppo maggiormente sensibile all'azione dei tossici, come gli stadi embrionali, larvali e giovanili. I saggi in ambiente acquoso più significativi e diffusi utilizzano la sopravvivenza/riproduzione di crostacei come *Daphnia magna* Straus o *Hyalella azteca*, l'accrescimento e/o la mortalità di alghe unicellulari, la risposta fotoemittente di microorganismi particolari (Microtox), la fecondazione e/o l'embriotossicità di Echinodermi (es. *Paracentrotus lividus*) (ove si valuta la percentuale di uova fecondate e/o la vitalità degli embrioni in relazione al variare della concentrazione di tossico presente in soluzione), la variazione della

respirazione o dell'attività ADP/ATP in mitocondri o particelle submitocondriali, il comportamento di rotiferi (es. il *Brachionus plicatilis*) (Perin, 2004).

5.3 Piano di lavoro

Le acque di produzione, provenienti dalle stesse piattaforme campionate per l'individuazione del tracciante chimico (*A*, *B*, *C* e *D*), sono state saggiate mediante saggi ecotossicologici al fine di valutarne l'eventuale tossicità. I saggi sono stati condotti in laboratorio impiegando tre differenti organismi: il *Brachionus plicatilis* (Rotifera), l'*Artemia franciscana* (Crustacea) e il *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). Le prime due specie sono disponibili tutto l'anno in forma di cisti "dormienti" mentre i ricci di mare sono stati prelevati nel golfo di Napoli.

I primi saggi sono stati condotti con artemie e rotiferi sulle acque di produzione di *A* e *B*. Successivamente, vista la poca sensibilità di questi organismi agli effluenti saggiati, sono stati impiegati anche i ricci di mare per saggiare i campioni di *C* e *D*.

I saggi suddetti sono stati effettuati anche su campioni di acqua di mare, prelevati a diverse distanze dai diffusori, al fine di verificare se la tossicità delle acque di produzione può essere un parametro osservabile in mare.

5.4 Area di indagine

Le quattro piattaforme, prese in considerazione in questo studio, sono situate in un'area centro-settentrionale. Le caratteristiche delle piattaforme monitorate sono già state riportate.

5.5 Campionamento

5.5.1 Piano di campionamento

Il piano di campionamento è stato già riportato.

5.5.2 Disegno di campionamento

Nel 2004, il prelievo delle acque di produzione è avvenuto su due piattaforme, *A* e *B*; alcuni campioni di acqua di mare sono stati prelevati in una stazione sotto il punto di scarico (0 m) ed in quattro stazioni poste a 50 m dal diffusore, secondo

un disegno radiale, lungo due transetti ortogonali tra loro; è stata inoltre campionata dell'acqua di mare in una stazione situata a 2000 m dal diffusore e considerata come area non influenzata dalla presenza dell'installazione e dello scarico. Questo disegno preliminare è stato scelto tenendo conto delle indicazioni ricavate dalla letteratura relativa a studi di dispersione in caso di sorgenti puntiformi (OSPARCOM, 1999) e dal monitoraggio condotto dall'ICRAM sulle piattaforme adriatiche. Sui campioni prelevati sono stati eseguiti saggi ecotossicologici con *Brachionus plicatilis* ed *Artemia franciscana*.

Nel 2005, il prelievo delle acque di produzione è stato condotto sulle stesse due piattaforme dell'anno precedente; i campioni di acqua di mare sono stati prelevati, sotto la struttura lungo un unico transetto, in direzione della corrente presente al momento dello scarico, in una prima stazione posta quanto più possibile vicina al punto di scarico (0 m), in una seconda a 25 m ed in una terza a 2000 m. Il disegno di campionamento è stato modificato tenendo conto dei risultati di non tossicità osservati a 50 m nell'anno precedente. Sui campioni prelevati sono stati eseguiti i saggi con *Brachionus plicatilis* ed *Artemia franciscana*.

Nel 2006, sono state campionate altre due piattaforme *C* e *D* e non è stato possibile continuare a monitorare *A* e *B*, poiché sulla prima lo scarico a mare è stato sostituito dalla reiniezione mentre la seconda, essendo in *work-over*, non è stata autorizzata al monitoraggio. Il campionamento è avvenuto nel mese di settembre a differenza degli anni precedenti, in cui è stato condotto in luglio/agosto, al fine di poter eseguire saggi ecotossicologici con i ricci di mare (*P. lividus*) oltre che con le artemie ed i rotiferi. La scelta temporale è stata condizionata dalla disponibilità del materiale biologico (gameti); mentre, infatti, le cisti di artemie e rotiferi sono disponibili tutto l'anno, i gameti di *P. lividus* si trovano solo nel periodo riproduttivo dell'animale, da settembre/ottobre a maggio/giugno, in relazione a quanto varia la temperatura dell'acqua di mare. Nel 2006 i campioni di acqua di mare sono stati prelevati, sotto la struttura a 0 e 25 m di distanza dal diffusore, come per l'anno precedente, ed ad una distanza di 8000 m (area non disturbata da entrambe le installazioni). I campioni prelevati sono stati saggiati con *Brachionus plicatilis*, *Artemia franciscana* e *Paracentrotus lividus*.

5.5.3 Attività di campionamento e trattamento dei campioni

L'acqua di produzione è stata raccolta in piattaforma direttamente dal rubinetto, a valle del sistema di trattamento, mediante bottiglie in HDPE da due litri; l'acqua di mare è stata campionata mediante bottiglie Niskin e, successivamente, trasferita in bottiglie in HDPE.

Per l'acqua di produzione, è stata filtrata un'aliquota (circa 1 L) su membrane *Millipore* da 0,45 μm così da poter eseguire i saggi sia sul campione filtrato che tal quale.

Dopo il campionamento, sia l'acqua di produzione che l'acqua di mare sono state conservate a 4°C fino al momento di esecuzione dei saggi.

5.6 Metodologia

5.6.1 Rotiferi (*Brachionus plicatilis*)

Il *Brachionus plicatilis* è un rotifero, di dimensioni inferiori ad 1 mm, annoverato tra i metazoi più piccoli; caratterizzato da un corpo allungato e cilindrico, diviso in 3 parti, un capo, un collo ed un tronco, provvisto di un apparato rotatorio (corona anteriore ciliata), di appendici e di un piede (Figura 5.6.1).



Figura 5.6.1– a) Esemplare di rotifero *B.plicatilis*; b) individuo con le uova
Foto di F. Savorelli

Le ciglia permettono sia i movimenti dell'animale, sia l'alimentazione, perché convogliano le particelle di cibo nella bocca. Il nome di questo organismo deriva da una corona di 'ciglia in continua rotazione'.

Sono particolarmente numerosi in acque eutrofiche; si muovono nuotando e camminando velocemente per mezzo delle ciglia o anche per mezzo di salti. In condizioni ottimali la crescita da uovo ad adulto avviene in 2-5 giorni ma, in completa assenza di acqua, possono rimanere nello stadio di cisti dormienti prima di schiudersi; l'uso di cisti consente di avere sempre disponibilità di animali nella stessa fase di accrescimento. La riproduzione avviene tramite uova non fecondate che danno sempre femmine; il ciclo di vita di una singola femmina è di circa sette giorni, ad una temperatura di 25°C.

Il *Brachionus* è una specie di largo interesse negli studi ecotossicologici in quanto ubiquitaria, con rapido tasso di riproduzione ed esistono numerosi studi sulla sua distribuzione, sulla biologia e sul suo allevamento (*Snell and Persoone, 1989*). Inoltre i rotiferi hanno un importante ruolo ecologico poiché, essendo sia consumatori di fitoplancton che prede per lo zooplancton, rappresentano una specie chiave delle reti trofiche (*Francesse and Traldi, 2001*).

La tossicità acuta delle acque di produzione e dei campioni di acqua di mare è stata valutata osservando come risposta la percentuale di individui immobili rispetto al numero di rotiferi esposti.

I giovanili sono stati ottenuti dalla schiusa delle cisti, indotta in 27-29h di incubazione, a 25°C, sotto luce continua, in acqua di diluizione standard a salinità di 20 psu (*ASTM, 1998*).

Diverse procedure possono essere adottate per decidere a quali concentrazioni bisogna saggiare i campioni in esame, a seconda che sia noto (saggio definitivo) o non noto (saggio preliminare) l'ambito di concentrazioni entro cui ci si aspetta di rilevare l'effetto tossico. Quando la tossicità non è nota occorre procedere saggiando un ampio intervallo di concentrazioni, in modo da individuare l'ambito più ristretto entro cui scegliere le concentrazioni per il saggio definitivo. Di norma tale intervallo è compreso tra la concentrazione che causa la completa immobilizzazione delle larve e quella che non la inibisce affatto. Le concentrazioni per il saggio definitivo sono state scelte in scala logaritmica in modo da permettere una facile rettificazione della curva di tossicità; ogni campione è stato saggiato sia non diluito (concentrazione del 100%) che in successive concentrazioni ottenute mediante diluizione del campione di acqua di produzione in acqua di mare standard secondo un fattore di diluizione 2 (50,2%, 25,1%, 12,5%, 6,2%, 3,1%).

Le acque di produzione sono state saggiate sia tal quali sia dopo filtrazione su membrane *Millipore* da 0,45 µm mentre le acque di mare sono state saggiate non filtrate. Assieme ai campioni sono stati analizzati un controllo negativo, rappresentato da acqua di mare standard, ed un controllo positivo, rappresentato da una sostanza tossica ad effetto noto (K₂Cr₂O₇). Il primo controllo è stato considerato come dato di riferimento con cui confrontare i risultati del saggio; il controllo positivo è servito a valutare l' idoneità del materiale biologico in termini di sensibilità delle larve (EC₅₀^{24h} calcolata deve rientrare nei criteri di validazione del metodo ASTM E1440-91).

I naupli sono stati trasferiti in ciascun pozzetto delle piastre impiegate per il saggio precedentemente riempiti con un volume di soluzione-test; il trasferimento è avvenuto mediante l' utilizzo di una micropipetta prestando attenzione a non danneggiare gli individui. I naupli sono stati trasferiti prima, in numero arbitrario, in una piastra Petri contenente acqua di mare standard alla stessa salinità di quella dei campioni da saggiare al fine di favorire l' adattamento osmotico degli individui; ed in seguito solo gli individui che nuotavano in modo attivo sono stati prelevati e trasferiti, in numero di 5, nei pozzetti da 0,3 ml. Le condizioni sperimentali adottate durante il saggio di tossicità sono riportate in tabella 5.6.1.1.

Tabella 5.6.1.1 - Condizioni sperimentali adottate durante il saggio di tossicità con *Brachionus plicatilis*.

PARAMETRO	SAGGIO ACUTO
Organismi per saggio	Neonati 27-29h
Tipo di saggio	statico
Durata del saggio	48h
Intensità della luce	assente
Fotoperiodo (luce:buio)	48h buio
Acqua usata come diluente e come controllo negativo	acqua artificiale ASPM
Salinità (psu)	35 ± 1
Temperatura (°C)	25 ± 1
pH	6,5 – 8,5
Camera per saggio	piastre multipozzetto
Volume di incubazione	0,3 ml/pozzetto
Numero di organismi per replica	5
Numero di concentrazioni	6
Numero di repliche per concentrazione	6

Cambio delle soluzioni	assente
Alimentazione durante il saggio	assente
Pulizia	assente
End-point	immobilizzazione
Espressione end-point	$EC_{50}^{48h}/TU^{48h}/LOEC^{48h}/NOEC^{48h}$
Accettabilità	immobilizzazione nel controllo $\leq 10\%$

I risultati sono stati espressi come numero di individui immobili, in ogni replica, dopo 48h di esposizione, rispetto al numero di individui inizialmente esposti; ogni saggio è stato considerato valido soltanto se l'immobilizzazione nella soluzione controllo era minore o uguale al 10% .

Confrontando le risposte degli organismi alle singole concentrazioni saggiate con la risposta ottenuta nel controllo negativo sono stati calcolati i seguenti parametri:

-concentrazione che causa l'effetto sul 50% degli individui esposti (EC_{50}) (metodo Probit);

-unità tossiche che causano l'effetto sul 50% degli individui esposti (TU) ($100/EC_{50}$);

-concentrazione che causa l'effetto più basso (Lowest Observed Effect Concentration LOEC) (metodo Dunnett);

-concentrazione che non causa effetto (No Observed Effect Concentration NOEC) (metodo Dunnett).

Non essendoci un sistema di classificazione, universalmente accettato, del grado di tossicità delle matrici ambientali ed in particolare delle acqua di produzione, a titolo di esempio è stato riportato uno schema proposto dal Laboratory for Biological Research in Aquatic dell'Università di Ghent (*Persoone et al.*, 1993) per le acque di scarico ed integrato dall'ARPAL che lo utilizza con *Daphnia magna* (tabella 5.6.1.2); lo schema proposto si basa sulla risposta nel campione rispetto al controllo e/o sull' EC_{50} e/o sulle unità tossiche definite come $100/EC_{50}$, ed è stato preso in considerazione in questo lavoro per dare un giudizio sul grado di tossicità delle matrici esaminate.

Tabella 5.6.1.2 – Scala di tossicità

EC₅₀	UNITA' TOSSICHE (UT)	GIUDIZIO
-	0	Non tossico
>100	< 1	Debolmente tossico
100-10	1-10	Tossico
<10-1	11-100	Molto tossico
<1	≥ 100	Estremamente tossico

5.6.2 Crostacei (*Artemia franciscana*)

L'*Artemia* è un piccolo crostaceo Anostraco, di dimensioni variabili tra 0,5 e 3 cm, caratterizzato da un corpo allungato provvisto di appendici, privo di carapace, trasparente, di colore rosso o arancio per la presenza di emoglobina nell'emolinfa. Questa specie occupa in gran numero le saline del Mediterraneo, è eurialina ed è capace di adattarsi a particolari condizioni di stress ambientale variando le proporzioni del corpo a seconda del grado di salinità dell'ambiente. Le uova vengono deposte in solidi gusci tanto da poter resistere in ambiente soprassaturo e in completa assenza di acqua; a contatto con l'acqua, in condizioni di illuminazione e luce adatta, queste "uova dormienti" si schiudono in 24h e danno vita a delle larve natanti (stadio larvale I) che dopo successive 24h si trasformano sviluppando gli arti motori e l'addome (stadio larvale di sviluppo II-III) (figura 5.6.2.a, b); la trasformazione in forma adulta avviene in maniera rapida ed è caratterizzata dal graduale aumento del numero di appendici (figura 5.6.2.c, d). Lo stadio larvale di sviluppo II-III è quello utilizzato nei saggi di tossicità (Guzzella, 1996 e 1997).



Figura 5.6.2 – a) Esemplare di nauplio di artemia; b) metanauplii; c) femmina adulta; d) maschio adulto

Foto di F. Savorelli

La possibilità di ottenere le larve a partire da cisti durature, senza necessità di mantenere delle colture in laboratorio, rende il saggio praticabile come saggio di routine. L'adattabilità di questa specie a condizioni ambientali estremamente variabili permette di discriminare più facilmente le cause generatrici di effetti tossici qualora questi fossero osservati. L'*Artemia* ha però dimostrato di essere abbastanza resistente ad alcune sostanze tossiche per cui risulta importante affiancare ad essa altri organismi test, poiché potrebbe verificarsi che la tossicità rilevata con altre specie non sia osservata sull'*artemia* (Trieff, 1980).

La tossicità delle acque di produzione e dei campioni di acqua di mare è stata valutata sia mediante un saggio acuto (24h) che mediante un saggio acuto prolungato (96h), osservando come risposta la percentuale di individui immobili rispetto al numero di artemie esposte.

I naupli sono stati utilizzati allo stadio larvale II-III e sono stati ottenuti mediante attivazione delle cisti "dormienti" effettuata 48h prima dell'inizio del saggio; sono state utilizzate le Reference Cysts (RAC) di *Artemia franciscana* disponibili presso la Quality Assurance Research Division, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati OH 45268, U.S.A. oppure presso il Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution, University of Ghent, Belgium.

Una quantità di cisti pari a circa 100 mg è stata versata in una piastra Petri (5 cm di diametro) contenente 12 ml di acqua di mare a salinità di 35 psu (preparata aggiungendo 35 g di sale Instant Ocean® ad 1 l di acqua MilliQ); la piastra è stata esposta per almeno un'ora a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ed a 4000 ± 1000 lux di intensità luminosa e, successivamente, per 24h al buio ed alla stessa temperatura. Il giorno seguente la piastra è stata posta al binocolare ed una fonte luminosa è stata posizionata in un

angolo della piastra in modo che le larve natanti, grazie alla loro capacità fototattica, si radunassero; in questo modo si sono prelevati facilmente i naupli e si sono trasferiti in una nuova piastra Petri, riempita con 12 ml di soluzione salina fresca; la piastra è stata mantenuta per altre 24h alla temperatura di $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, al buio.

Il saggio è stato condotto secondo la metodologia indicata in Guzzella (1996, 1997) e riportata in APAT-IRSA-CNR (2003), apportando alcune modifiche; i campioni saggiati sono stati gli stessi analizzati per i rotiferi e le concentrazioni da saggiare sono state scelte con le stesse modalità (§ paragrafo 5.5.2). Assieme ai campioni sono stati analizzati un controllo negativo, rappresentato da acqua di mare standard, ed un controllo positivo rappresentato da una sostanza tossica ad effetto noto. Il primo controllo è stato considerato il dato di riferimento con cui confrontare i risultati del saggio; il controllo positivo è servito a valutare l' idoneità del materiale biologico in termini di sensibilità delle larve ($\text{EC}_{50}^{24\text{h}}$ calcolata deve rientrare nei criteri di validazione del metodo 8060 del Manuale APAT IRSA-CNR 29/2003).

Alcune modifiche delle condizioni sperimentali di esecuzione del saggio (ad esempio i volumi delle soluzioni; la presenza di alimento, il ciclo luce:buio, ecc.) hanno permesso di protrarre il saggio da 24h fino a 96h. Le condizioni sperimentali adottate sia durante il saggio acuto che durante quello acuto prolungato sono riportate in tabella 5.6.2.

I naupli, ottenuti dalla schiusa delle cisti, sono stati trasferiti, in numero di 10, in ciascuna camera per saggio, precedentemente riempita con un volume di soluzione. La distribuzione delle larve (10 individui per trattamento) dalle capsule di schiusa alle piastre multipozzetto (saggio a 24h) e alle camere da 50 ml (saggio a 96h) è stata preceduta dal trasferimento di circa 50 individui in capsule Petri contenenti aliquote delle soluzioni da saggiare (12 ml). I naupli sono stati prelevati con una pipetta in vetro, con estremità arrotondata alla fiamma, facendo attenzione a trasferire solo le larve natanti e non le cisti o le larve ancora parzialmente o totalmente incluse nella membrana. Le modalità con cui è stato effettuato il trasferimento delle larve, metodo diverso da quello indicato nella metodica APAT-IRSA-CNR (2003), sono risultate importanti per ridurre al minimo la diluizione delle soluzioni ed il potenziale rischio di stress o danno agli organismi.

Tabella 5.6.2 - Condizioni sperimentali adottate durante il saggio di tossicità con *Artemia franciscana*.

PARAMETRO	SAGGIO ACUTO	SAGGIO ACUTO PROLUNGATO
Organismi per saggio	Naupli II-III stadio	naupli II-III stadio
Tipo di saggio	statico	semi-statico
Durata del saggio	24h	96h
Intensità della luce	assente	3000-4000 lux
Fotoperiodo (luce:buio)	<i>24H BUIO</i>	<i>14H:10H</i>
Acqua usata come diluente e come controllo negativo	acqua marina artificiale Instant Ocean	acqua marina artificiale <i>Instant Ocean</i>
Salinità (PSU)	35 ± 1	35 ± 1
Temperatura (°C)	25 ± 2	25 ± 2
pH	6,5 – 8,5	6,5 – 8,5
Camera per saggio	piastre multipozzetto a 24 pozzetti da 3 ml	beaker da 50 ml
Volume di incubazione	2ml/pozzetto	40ml
N°organismi per replica	10	10
N° concentrazioni	6	6
N°repliche per concentrazione	3	3
Cambio delle soluzioni	assente	assente
Alimentazione durante saggio	assente	circa 1ml di coltura pura concentrata di <i>D. tertiolecta</i> ogni 24h
Pulizia	assente	giornaliera
End-point	immobilizzazione	immobilizzazione
Espressione end-point	EC ₅₀ ^{24h} /TU ^{24h}	EC ₅₀ ^{96h} /TU ^{96h} /LOEC ^{96h} /NOEC ^{96h}
Accettabilità	immobilizzazione nel controllo ≤ 10%	immobilizzazione nel controllo ≤ 10%

Dopo il periodo di esposizione delle larve gli organismi immobili sono stati contati al binocolare e rapportati al numero totale di organismi inizialmente esposti. Le larve sono state considerate immobili quando hanno mostrato totale mancanza di movimento all'osservazione e alla stimolazione meccanica per circa 10 secondi.

Ogni saggio è stato considerato valido soltanto quando l'immobilizzazione nel controllo era minore o uguale al 10%

I risultati sono stati espressi con le stesse modalità indicate per i rotiferi (§ paragrafo 5.6.1).

5.6.3 Echinodermi (*Paracentrotus lividus*)

I ricci di mare sono organismi bentonici, piccoli e scuri, appartenenti al *phylum* degli Echinodermi; hanno la superficie orale a contatto con il substrato e si muovono lentamente mediante gli aculei ed i pedicelli ambulacrali. Comprendono specie carnivore, erbivore e a dieta mista, molti ingeriscono il materiale che costituisce il substrato. Il *Paracentrotus lividus* LMK è una delle specie di Echinodermi maggiormente diffuse nel Mar Mediterraneo e nelle coste dell'Atlantico nord orientale (dall'Inghilterra alle Azzorre); vive prevalentemente fra 0 e 80 metri di profondità, prediligendo i fondali rocciosi o sassosi, poco inclinati e ricchi di alghe; essendo una specie molto tollerante a condizioni ambientali variabili, è comune anche nelle aree lagunari (caratterizzate da variazioni periodiche marcate di temperatura e salinità).

Il *P. lividus* appartiene alla classe degli Echinoidi regolari caratterizzati da una simmetria pentaraggiata, da un'apertura boccale centrale sul lato ventrale e da un'apertura anale sul lato dorsale. Assume colorazioni di vario tipo, da violetto a rosso, da nero a verde, a bruno e, in qualche raro caso, bianco. In genere si nutre di alghe, prediligendo quelle a tallo molle, ma non disdegna animali sessili o morti. Vive in media dai quattro agli otto anni, il suo ciclo riproduttivo va 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. Gli esemplari appartenenti a questa specie sono, come tutti i ricci di mare, a sessi separati e non presentano dimorfismo sessuale. La fecondazione è esterna, con liberazione dei gameti in acqua e successiva unione a formare lo zigote. I saggi di tossicità con Echinodermi

utilizzano, quali *endpoints*, gli effetti sugli stadi più critici del ciclo vitale di questi organismi; la conoscenza dei meccanismi che regolano la fecondazione e l'embriogenesi assume, quindi, un ruolo chiave nella comprensione degli effetti di sostanze tossiche su questi biosensori (Perin, 2004).

Possono essere utilizzati per varie tipologie di saggio di tossicità a diversi stadi di sviluppo quali i gameti (uova e spermatozoi), l'embrione ed infine l'adulto; in condizioni normali il loro sviluppo larvale segue, in circa 50 h, gli stadi rappresentati in figura 5.6.3.1:

Zigote: si forma in seguito a fecondazione della cellula uovo da parte dello spermatozoo;

Blastula: è un ammasso pluricellulare cavo formatosi per successive mitosi dello zigote;

Gastrula: si forma in seguito a differenziazione delle cellule embrionali; l'invaginazione di alcune di esse dà origine ad un *archenteron* da cui si formerà, successivamente, l'intestino; l'embrione in questo stadio è costituito da tre strati cellulari (ectoderma, mesoderma ed endoderma) da cui si svilupperanno gli organi e gli apparati;

Prisma: l'embrione assume una forma definita e si formano le spicole calcaree;

Pluteo: è una larva liberamente natante, a simmetria bilaterale.

La metamorfosi per arrivare alla formazione del pluteo si completa in circa 48h ed il pluteo rimane in questo stadio per circa un mese, nutrendosi di plancton; successivamente si porta lentamente verso il fondo del mare e qui si trasforma rapidamente (circa in un'ora) nell'individuo adulto.



Figura 5.6.3.1– Schema dei principali stadi di sviluppo nell'embriogenesi di *Paracentrotus lividus*.

L'utilizzo degli stadi vitali precoci degli Echinodermi nei saggi tossicologici per saggiare la qualità di ecosistemi marini ed estuarini è una procedura standardizzata e ormai comunemente applicata a livello internazionale (Kobayashi, 1972, 1977; Kobayashi, 1984; Pagano et al., 1986; Dinnel et al.,

1987; Pagano *et al.*, 1993; Chapman, 1995; Pinto *et al.*, 1995; Arizzi *et al.*, 2001, Volpi *et al.* 2001, Giuliani *et al.*, 2002). I saggi di spermiossicità e di embriossicità sono inclusi nella lista ICES (International Council for the Exploitation of the Sea) dei saggi biologici più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino e appartengono ai pochi "*short chronic tests*" per acque marine ed estuarine per i quali l'EPA abbia prodotto dei Protocolli standardizzati (Perin, 2004).

Per i nostri saggi sono stati utilizzati ricci di mare della specie *Paracentrotus lividus*, provenienti dal Golfo di Napoli e mantenuti in vasche di stabuzione, nelle condizioni riportate in tabella 5.6.3, fino al momento di esecuzione del saggio (presso il Settore 'Allevamento di organismi marini per la ricerca' della Stazione Zoologica A. Dohrn di Napoli).

I saggi condotti con questa specie sono stati di due tipologie: il saggio di spermiossicità ed il saggio di embriossicità (tabella 5.6.3). Al fine di indurre nei ricci l'emissione dei gameti (figura 5.6.3.2.a) gli animali sono stati sottoposti ad una iniezione, nella membrana periorale, di 1 ml di una soluzione di cloruro di potassio (1 M); una dolce agitazione manuale è stata applicata per favorire la diffusione della soluzione nella cavità celomatica; lo shock osmotico prodotto dalla soluzione salina ha indotto l'emissione dei gameti; le uova (figura 5.6.3.2.c) sono state sottoposte a due lavaggi in acqua di mare filtrata e sono state raccolte in acqua di mare filtrata mentre lo sperma (figura 5.6.3.2.b) è stato raccolto a secco. Normalmente sono stati selezionati sei lotti di uova in modo da eseguire i saggi in repliche da sei (in piastre da embriologia *Nunc* a sei pozzetti da 10 ml).

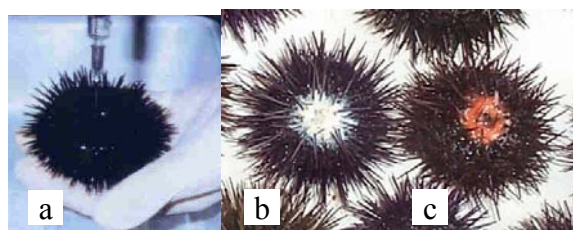


Figura 5.6.3.2 – a) induzione dell'emissione, b) emissione in un maschio, c) emissione in una femmina

Foto di L. Manfra

Tabella 5.6.3 – Condizioni sperimentali adottate durante la stabulazione di *P. lividus* e durante i saggi di spermiossicità ed embriossicità

PARAMETRO	SAGGIO DI SPERMIOSSICITA'	SAGGIO DI EMBRIOSICITA'
Stabulazione		
Organismi	ricci di mare <i>P. lividus</i>	
Vasca di stabulazione	Vasca in vetroresina da 500 L a circuito aperto non refrigerato	
Temperatura ambiente	20°C	
Acqua della vasca	Acqua di mare naturale	
Salinità dell'acqua	38,2 psu	
Temperatura dell'acqua	stagionale	
Alimentazione	<i>Ulva lactuca</i> e <i>Posidonia oceanica</i>	
Saggio		
Materiale biologico per saggio	Sperma contaminato e uova non trattate	Embrioni non trattati
Tipo di saggio	statico	statico
Durata del saggio	2h (tasso di fecondazione) 72h (eventuali danni alla progenie)	72h
Acqua usata come diluente e come controllo negativo	acqua di mare naturale filtrata	acqua di mare naturale filtrata
Salinità (PSU)	37-38 psu	37-38 psu
Temperatura (°C)	18°C	18°C
Camera per saggio	piastre multipozzetto a 6 pozzetti da 10 ml	piastre multipozzetto a 6 pozzetti da 10 ml
Volume di incubazione	10 ml/pozzetto	10 ml/pozzetto
Quantità di materiale biologico per replica	100 µl di sperma diluito contaminato e 1 ml di uova non trattate	1 ml di embrioni non trattati
N° concentrazioni	6	6
N°repliche per	6	6

concentrazione		
Cambio delle soluzioni	assente	assente
Alimentazione	assente	assente
Pulizia	assente	assente
End-point	% uova fecondate a 2h % di plutei anormali a 72h	% di plutei anormali a 72h e tipologie di anomalie
Espressione end-point	EC_{50}^{2h}/TU^{2h} EC_{50}^{72h}/TU^{72h}	$EC_{50}^{72h}/TU^{72h}/LOEC^{72h}/NOEC^{72h}$
Accettabilità	% di uova fecondate (plutei normali) nel controllo 70-90%	% di plutei normali nel controllo 70-90%

Il protocollo sperimentale è stato allestito, per entrambi i saggi, per saggiare gli stessi campioni analizzati con i rotiferi, ad eccezione delle acque di produzione tal quali (la metodica ed il tipo di organismo non prevedono l'esecuzione di saggi su acqua non filtrata o matrici solide), e scegliendo le concentrazioni dei campioni da saggiare con le stesse modalità (§ paragrafo 5.6.1). Assieme ai campioni, sono stati analizzati un controllo negativo, rappresentato da acqua di mare naturale, ed un controllo positivo, rappresentato da una sostanza tossica ad effetto noto ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Il primo controllo è stato il dato di riferimento con cui confrontare i risultati del saggio; il controllo positivo è servito a valutare l'idoneità del materiale biologico in termini di adeguatezza delle larve (il risultato misurato è stato confrontato con i dati presentati in *Pagano et al.*, 1986). E' stato assunto che la qualità dei controlli negativi doveva essere tale da avere una percentuale di uova fecondate (spermiotossicità) o di larve normali (embriotossicità) compresa tra 70% e 90% (*Pagano et al.*, 1986).

□ Saggio di spermiotossicità

Nel saggio di spermiotossicità è stata valutata la capacità dello sperma contaminato di fecondare le uova non trattate in termini di tasso di fecondazione, ovvero di percentuale di uova fecondate. L'influenza delle sostanze tossiche sulla fecondazione delle uova è legata all'effetto che esse hanno sulla motilità degli

spermatozoi; una volta che lo spermatozoo si è attaccato alla superficie dell'uovo, secerne degli enzimi (lisine) che favoriscono la sua penetrazione; dopo essere entrato, esso si fonde rapidamente con la membrana plasmatica dell'uovo, che si rialza a formare una membrana di fecondazione, in grado di impedire l'attacco di altri spermatozoi e di bloccare quindi la polispermia. Le uova fecondate si riconoscono dalla membrana di fecondazione e dalle successive fasi di segmentazione che interessano lo zigote (figura 5.6.3.3).

Inoltre, questo tipo di esperimento ha previsto la verifica dei danni che l'esposizione può causare sullo sviluppo larvale nella progenie dello sperma trattato; a questo scopo, è stata eseguita la lettura delle colture larvali, procedendo secondo la metodica indicata successivamente per l'embriotossicità.

Il saggio è iniziato con l'espore lo sperma, in quantità di 20 μ l a diverse concentrazioni di ogni campione da saggiare, per 2h ad una temperatura di 18 °C, secondo la metodica indicata in Pagano et al. (1982). Il tempo durante il quale lo sperma resta a contatto con la sospensione o soluzione da saggiare, prima di far avvenire la fecondazione, per essere ottimale deve essere sufficientemente lungo da permettere di evidenziare l'eventuale azione avversa della sostanza in esame, ma non troppo lungo da incidere eccessivamente sulla capacità fecondante dello sperma esposto; sulla base di numerosi dati bibliografici appare che il tempo ottimale cambia a seconda della specie e per *P. lividus* è di circa 2h.

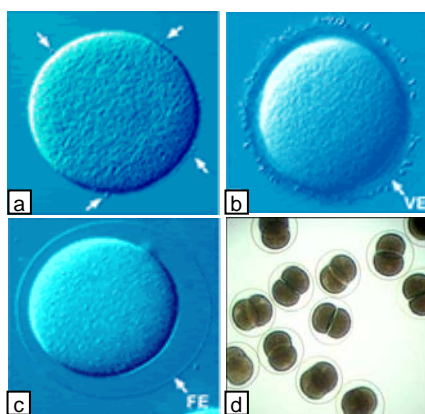


Figura 5.6.3.3 – a) uovo, b) uovo attaccato da spermatozoi, c) uovo con membrana di fecondazione, d) divisione cellulare

Foto di E. Di Nicola

In contemporanea, sono state preparate le piastre di coltura mettendo in ogni pozzetto 9 ml di acqua di mare filtrata ed 1 ml di uova non trattate; nel pozzetto relativo ad ogni concentrazione da saggiare sono stati inoculati 100 μ l di sospensione di sperma appartenente alla rispettiva concentrazione del campione. Dopo 2h si è proceduto alla conta delle uova fecondate al microscopio elettronico e dopo 72h alla valutazione dello sviluppo larvale. Il risultato dopo 2h è stato espresso come numero di uova fecondate su 100 uova contate in ogni replica mentre a 72h come numero di larve normali e/o anormali su 100 larve contate; inoltre, confrontando le risposte alle singole concentrazioni saggiate con la risposta ottenuta nel controllo negativo sono stati calcolati, come per i saggi con rotiferi e artemie, i seguenti parametri:

- concentrazione che causa l'effetto sul 50% degli individui esposti (EC_{50}) (metodo Probit);
- unità tossiche che causano l'effetto sul 50% degli individui esposti (TU) ($100/EC_{50}$);
- concentrazione che causa l'effetto più basso (Lowest Observed Effect Concentration LOEC) (metodo Dunnett);
- concentrazione che non causa effetto (No Observed Effect Concentration NOEC) (metodo Dunnett).

□ Embriotossicità

Il saggio di embriotossicità ha valutato l'effetto dei contaminanti sullo sviluppo degli embrioni considerando la percentuale di plutei normali presenti alla fine dell'esperimento rispetto alla percentuale di embrioni anormali; questi ultimi sono stati classificati nelle diverse categorie (figura 5.6.3.4)

N: larve normali, ovvero embrioni che raggiungono lo stadio di '*pluteus*', con forma triangolare, spicole ben evidenti e sviluppo del tutto completo;

R: larve ritardate, ovvero embrioni che hanno ugualmente raggiunto lo stadio di '*pluteus*' ma sono molto più piccoli in dimensioni, di circa la metà rispetto ai normali;

P1: larve patologiche, con malformazioni scheletriche, o intestinali, o nella pigmentazione;

P2: embrioni arrestati allo stadio pre-larvale di blastula o gastrula;

D1: larve morte allo stadio di pluteo;

D2: mortalità precoce, per es. arresto pre-schiusa.

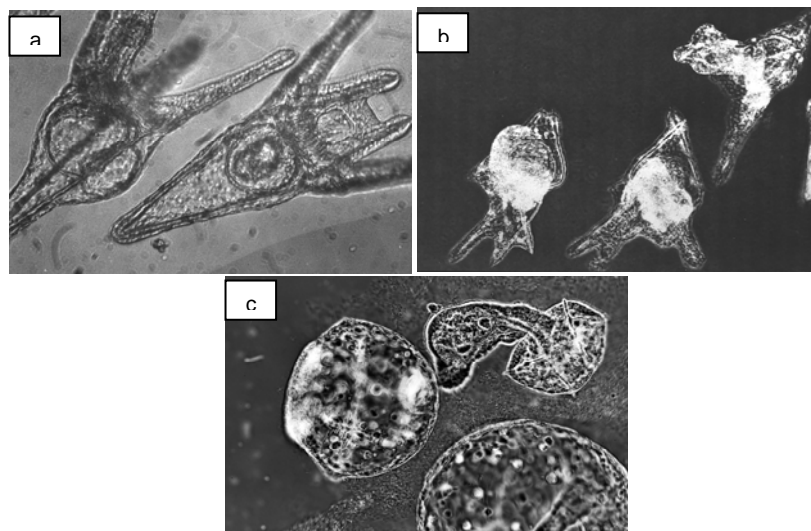


Figura 5.6.3.4 – a) Plutei normali (N), b) larve patologiche P1, c) embrioni P2
Foto di E. Di Nicola

Gli esperimenti di esposizione degli embrioni sono stati effettuati utilizzando sempre delle piastre a sei pozzetti, all'interno delle quali sono stati posti 9 ml delle concentrazioni da saggiare ed 1 ml di embrioni. Dopo 72 h di incubazione a 18 °C, le larve sono state sottoposte ad analisi embriologica e si sono osservati i

danni causati dall'esposizione sullo sviluppo larvale. Per la classificazione morfologica si sono esaminati 100 larve/embrioni, scelti casualmente, in ogni pozzetto di coltura; inoltre, confrontando il numero di plutei normali nelle singole concentrazioni saggate con la risposta ottenuta nel controllo negativo sono stati calcolati, come per i saggi con i rotiferi e le artemie, i seguenti parametri:

- concentrazione che causa l'effetto sul 50% degli individui esposti (EC_{50}) (metodo Probit);

- unità tossiche che causano l'effetto sul 50% degli individui esposti (TU) ($100/EC_{50}$);

- concentrazione che causa l'effetto più basso (Lowest Observed Effect Concentration LOEC) (metodo Dunnett);

- concentrazione che non causa effetto (No Observed Effect Concentration NOEC) (metodo Dunnett).

5.7 Risultati e discussione

5.7.1 A

I primi esperimenti condotti sull'acqua di produzione di A e sui campioni di acqua di mare prelevati intorno alla piattaforma sono stati il saggio di immobilizzazione a 48h con *Brachionus plicatilis* ed il saggio di immobilizzazione a 24h con *Artemia franciscana*.

L'idoneità del materiale biologico, in termini di sensibilità delle larve, è stata valutata esponendo entrambi gli organismi a diverse concentrazioni di composti a tossicità nota (controlli positivi), rispettivamente $K_2Cr_2O_7$ per i rotiferi e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ per le artemie (figure 5.7.1.1 e 5.7.1.2); un controllo negativo, costituito da acqua di mare standard, è stato saggiato durante ogni sperimentazione. Le EC_{50} calcolate (metodo Probit), rispettivamente 314,2 (277,1-356,2) mg/l e 5,7 (4,8-6,6) mg/l, rientrano nei criteri di validazione dei metodi impiegati.

Tabella 5.7.1.1 – Numero di larve immobili (24h) di *B.plicatilis* al $K_2Cr_2O_7$ (mg/l) (anno 2004)

$K_2Cr_2O_7$	Controllo negativo	75	150	300	600
		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1° replica	0	0	0	2	5
2° replica	0	0	0	3	5
3° replica	0	0	0	1	5
4° replica	0	0	0	3	5
5° replica	0	0	0	1	5
6° replica	0	0	0	3	5
SOMMA	0	0	0	13	30
MEDIA	0,0	0,0	0,0	2,2	5,0
DEVIAZIONE STANDARD	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
24hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%					
314,2 (277,1-356,2) mg/l					

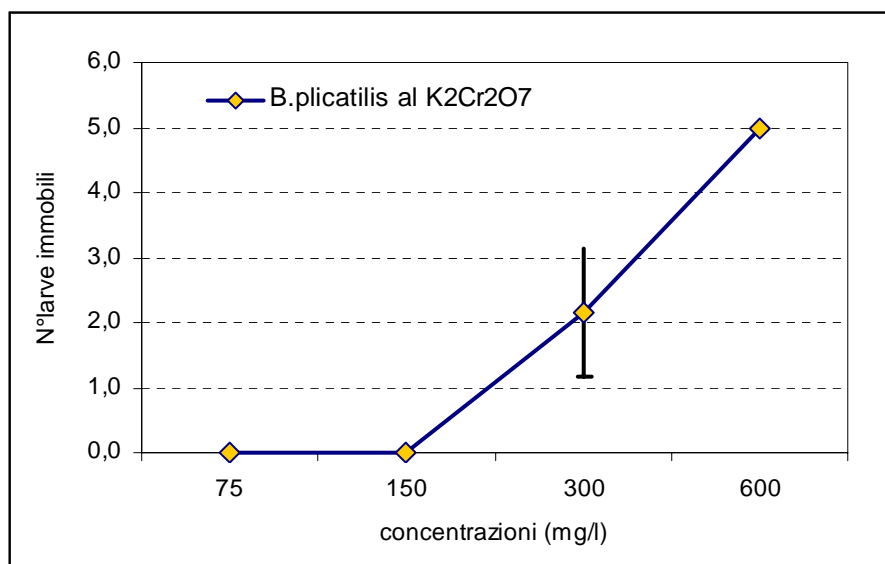


Figura 5.7.1.1 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (24h) di *B.plicatilis* al $K_2Cr_2O_7$ (mg/l) (anno 2004)

Tabella 5.7.1.2 – Numero di larve immobili (24h) di *A.franciscana* al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mg/l) (anno 2004)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Controllo negativo	3,5	5	7,1	10,1	14,4
		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1° replica	0	2	4	6	9	10
2° replica	0	2	5	6	8	10
3° replica	1	3	4	7	8	9
SOMMA	1	7	13	19	25	29
MEDIA	0,3	2,3	4,3	6,3	8,3	9,7
DEVIAZIONE STANDARD	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
24hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%						
5,7 (4, 8-6,6) mg/l						

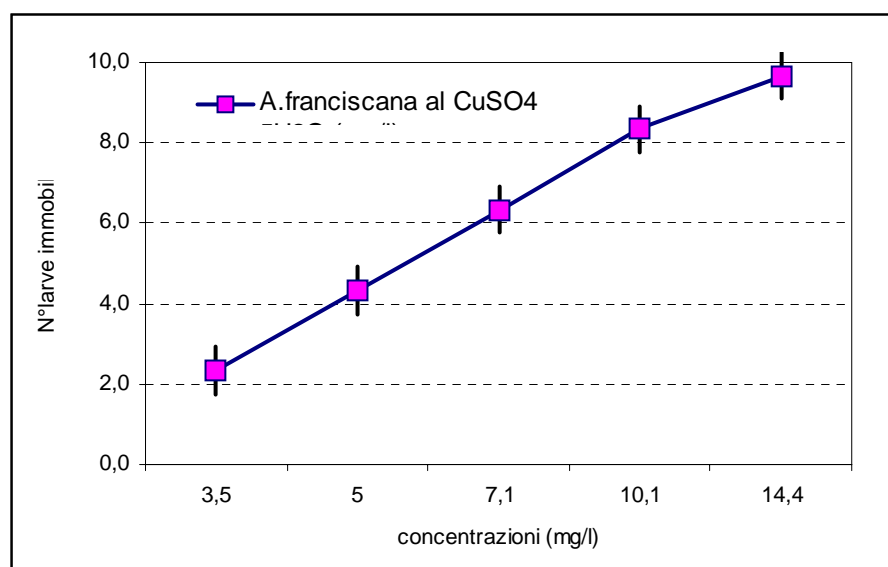


Figura 5.7.1.2 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (24h) di *A.franciscana* al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mg/l) (anno 2004)

Nell'anno 2004 l'esposizione delle larve alle acque di produzione di A (sia tal quali che filtrate) ed alle acque di mare non ha indotto immobilizzazione né dei rotiferi né delle artemie; la concentrazione più alta saggiata (100%) è quindi risultata essere la concentrazione alla quale non è stato osservato alcun effetto, ovvero la NOEC (No Observed Effect Concentration).

Tuttavia, un'ulteriore sperimentazione, condotta successivamente ai primi esperimenti con il *B. plicatilis* e l'*A. franciscana*, ha valutato la risposta ecotossicologica di altri organismi esposti alle acque di produzione di A e ha

riscontrato tossicità dell'effluente ed assenza di tossicità delle acque di mare; in particolare sono state osservate le seguenti risposte: riduzione della bioluminescenza batterica (*Vibrio fischeri*), con valori medi di (5-30min)EC₅₀ di 43,3% (campione tal quale) e 35,3% (campione filtrato); diminuzione della crescita algale (*Dunaliella tertiolecta*), con valore di (72h)EC₅₀ di 36,6%; mortalità delle larve di spigola (*Dicentrarchus labrax*) con valori medi di (96h)EC₅₀ di 9,22% (campione tal quale) e 7,45% (campione filtrato) (Virno *et al.*, 2006). Queste differenti risposte, osservate con altri organismi, ci portano a ritenere che i rotiferi e le artemie non sono sensibili all'acqua di produzione di A; tuttavia, nel caso dell'*Artemia*, anche il tempo di esposizione (24h) delle larve all'effluente potrebbe essere troppo breve per osservare delle risposte significative. Per quanto riguarda le acque di mare, esse sono risultate non tossiche per tutte le specie; questo probabilmente è da relazionare all'esiguo volume di acqua di produzione immesso in mare da A, talmente inconsistente da diluirsi immediatamente in superficie e non indurre effetti tossici in ambiente marino.

Nel 2005, i saggi con rotiferi e con artemie sono stati ripetuti per la piattaforma A, ma con *A. franciscana* è stato eseguito, oltre al saggio acuto a 24h, anche il saggio acuto prolungato a 96h.

L'idoneità del materiale biologico, in termini di sensibilità delle larve, è stata valutata come descritto in precedenza; i risultati dei controlli positivi sono riportati nelle tabelle 5.7.1.3 e 5.7.1.4 e nelle figure 5.7.1.3 e 5.7.1.4.

Tabella 5.7.1.3 – Numero di larve immobili (24h) di *B.plicatilis* al $K_2Cr_2O_7$ (mg/l) (anno 2005)

$K_2Cr_2O_7$	Controllo negativo	75	150	300	600
		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1° replica	1	0	0	2	5
2° replica	0	0	1	3	5
3° replica	1	0	1	2	5
4° replica	0	0	0	3	5
5° replica	0	0	0	2	5
6° replica	0	0	0	3	5
SOMMA	2	0	2	15	30
MEDIA	0,3	0,0	0,3	2,5	5,0
DEVIAZIONE STANDARD	0,5	0,0	0,5	0,5	0,0
24hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%					
286,4 (248,7-339,0) mg/l					

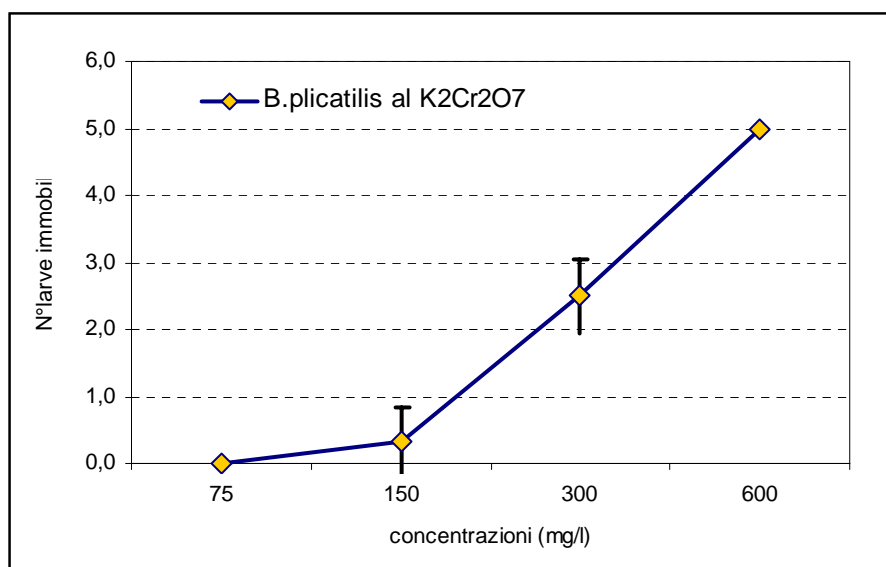


Figura 5.7.1.3 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (24h) di *B.plicatilis* al $K_2Cr_2O_7$ (mg/l) (anno 2005)

Tabella 5.7.1.4 – Numero di larve immobili (24h) di *A.franciscana* al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mg/l) (anno 2005)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Controllo negativo	3,5	5	7,1	10,1	14,4
		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1° replica	0	2	4	6	8	10
2° replica	0	2	4	5	8	9
3° replica	1	1	4	6	8	9
SOMMA	1	5	12	17	24	28
MEDIA	0,3	1,7	4,0	5,7	8,0	9,3
DEVIAZIONE STANDARD	0,6	0,6	0,0	0,6	0,0	0,6
24hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%						
6,4 (5,4-7,4) mg/l						

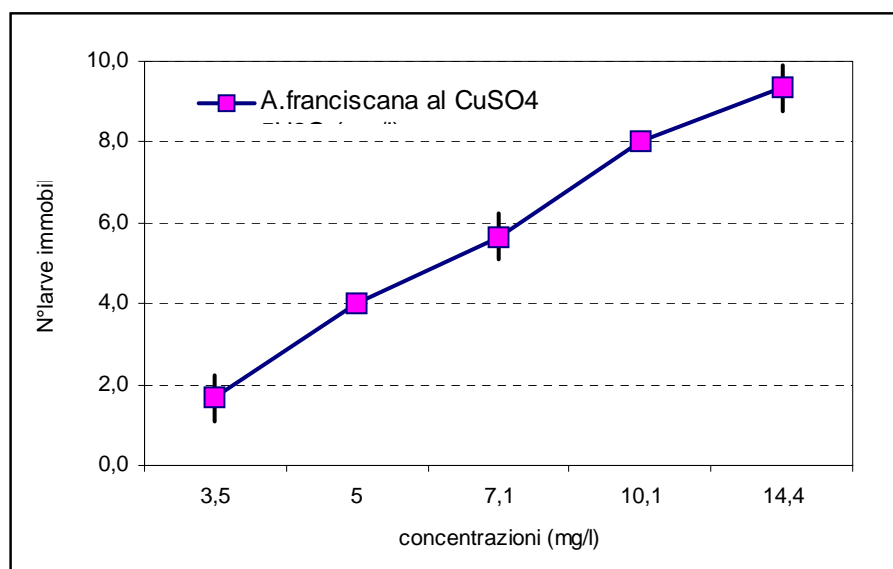


Figura 5.7.1.4 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (24h) di *A.franciscana* al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mg/l) (anno 2005)

Gli esperimenti sull'acqua di produzione e sulle acque di mare anche in questo caso hanno confermato l'assenza di tossicità sia con i rotiferi che con le artemie.

5.7.2 B

Gli esperimenti condotti sull'acqua di produzione di *B* e sui campioni di acqua di mare sono stati il saggio di immobilizzazione a 48h con *Brachionus plicatilis*, il saggio acuto di immobilizzazione (24h) ed acuto prolungato (96h) con *Artemia franciscana*.

Il materiale biologico (larve) è risultato idoneo all'utilizzo per la conduzione dei saggi come già descritto nel paragrafo 5.7.1.

Negli anni 2004 e 2005 l'esposizione alle acque di produzione di *B* ed alle acque di mare ha indotto nelle larve di rotiferi ed artemie una percentuale di risposta confrontabile al controllo negativo (acqua di mare standard), ovvero $\leq 10\%$ e quindi indice di non tossicità dei campioni; la concentrazione più alta saggiata (100%) è quindi risultata essere la concentrazione alla quale non è stato osservato alcun effetto, ovvero la NOEC (No Observed Effect Concentration). Un'ulteriore sperimentazione, condotta successivamente ai primi esperimenti con il *B. plicatilis* e l'*A. franciscana*, ha valutato la risposta ecotossicologica di altri organismi in seguito ad esposizione alle acque di produzione di *B* e ha riscontrato tossicità dell'effluente ed assenza di effetto tossico delle acque di mare; in particolare sono state osservate le seguenti risposte: riduzione della bioluminescenza dei batteri (*Vibrio fischeri*), con valori medi di (5-30 min) EC_{50} di 43,7% (campione tal quale) e 66,0% (campione filtrato); diminuzione della crescita delle alghe (*Dunaliella tertiolecta*), con valore di (72h) EC_{50} di 66,6%; mortalità delle larve di spigola (*Dicentrarchus labrax*) con valore medio di (96h) EC_{50} di 9,1% (campione tal quale) e 6,0% (campione filtrato) (Virno et al., 2006). Queste differenti risposte, osservate applicando altri saggi, ci portano a ritenere che i rotiferi e le artemie non sono sensibili all'acqua di produzione di *B*. Per *Artemia* la percentuale di immobilizzazione non è stata statisticamente differente dal controllo negativo, anche dopo un tempo di esposizione prolungato; tuttavia, dopo 96h si sono osservati effetti sullo sviluppo degli individui esposti che hanno mostrato perdita delle appendici. Studi pregressi condotti con *Artemia* su campioni di acque di produzione provenienti da piattaforme offshore situate nel mare del Nord hanno evidenziato lievi effetti dell'effluente su questo crostaceo, registrando una risposta di immobilizzazione prossima al 20% (Brendehaug et al., 1992).

Le acque di mare sono risultate non tossiche per tutte le specie; questo vuol dire che nonostante il volume di effluente scaricato in mare da *B* (circa 6000 mc/a) sia il doppio di quello immesso dalla piattaforma *A* (circa 3000 mc/a), e nonostante l'effluente, uscendo da un diffusore posto sopra la superficie del mare, arrivi in mare con maggiore spinta, il processo di diluizione è tale da non indurre effetti tossici in ambiente marino.

5.7.3 *C*

Gli esperimenti condotti nel 2006 sull'acqua di produzione di *C* e sui campioni di acqua di mare sono stati il saggio di immobilizzazione a 24h e 96h con *A. franciscana* ed i saggi di spermiotossicità ed embriotossicità con *P. lividus*; non è stato possibile utilizzare il *Brachionus plicatilis* non avendo ottenuto dalla schiusa un numero di larve sufficienti alla conduzione del saggio.

L'adeguatezza del materiale biologico (larve per le artemie e gameti per i ricci) è stata valutata mediante saggi su controlli positivi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); i risultati, che rientrano nei criteri di validazione dei metodi, sono riportati nelle tabelle 5.7.3.1, 5.7.3.2, 5.7.3.3 e gli andamenti dei valori medi sono rappresentati nelle figure 5.7.3.1, 5.7.3.2 e 5.7.3.3.

Tabella 5.7.3.8 – Numero di larve immobili (24h) di *A.franciscana* al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mg/l) (anno 2006)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Controllo negativo	3,5	5	7,1	10,1	14,4
		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1° replica	0	2	4	6	9	10
2° replica	0	3	5	5	8	10
3° replica	0	3	5	7	8	8
SOMMA	0	8	14	18	25	28
MEDIA	0,0	2,7	4,7	6,0	8,3	9,3
DEVIAZIONE STANDARD	0,0	0,6	0,6	1,0	0,6	1,2
24hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%						
5,4 (4,5-6,3) mg/l						

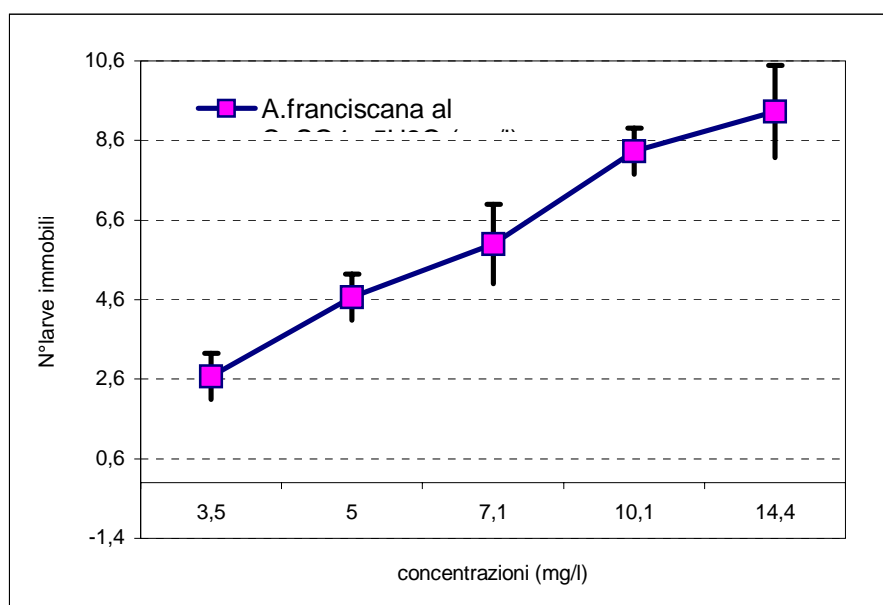


Figura 5.7.3.1 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (24h) di *A.franciscana* al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mg/l) (anno 2006)

Tabella 5.7.3.2 – Numero di uova non fecondate (2h) di *P.lividus* al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mg/l) (anno 2006)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Controllo negativo	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1° replica	3	53	81	90	100
2° replica	1	49	79	92	100
3° replica	0	41	83	92	100
4° replica	5	39	82	92	100
5° replica	4	43	81	90	100
6° replica	2	45	83	93	100
SOMMA	15	270	489	549	600
MEDIA	2,5	45,0	81,5	91,5	100,0
DEVIAZIONE STANDARD	1,9	5,2	1,5	1,2	0,0
2hEC₅₀					
0,001 (0-0,005) mg/l					

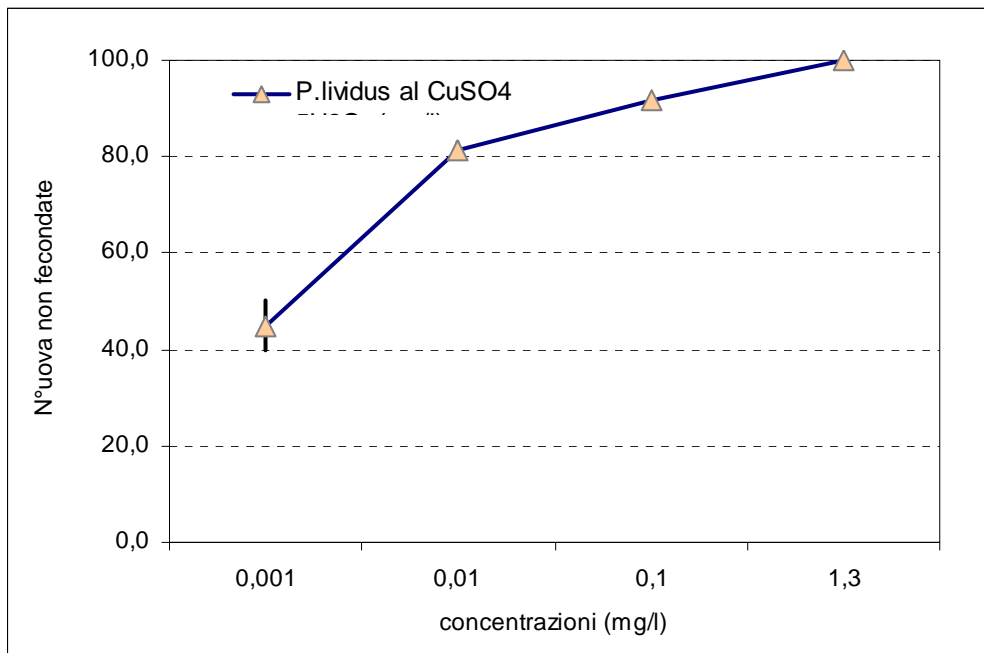


Figura 5.7.3.2 – Valore medio e deviazione standard di uova non fecondate (2h) di *P.lividus* al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mg/l) (anno 2006)

Tabella 5.7.3.3 – Numero di larve normali e numero e tipo di anomalie di sviluppo (72h) di *P.lividus* al CuSO₄ · 5H₂O (mg/l) (anno 2006)

CuSO ₄ · 5H ₂ O		controllo negativo	0,001	0,01	0,1	1,3
			mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1° replica	N	98	50	0	0	0
	R	2	0	0	0	0
	P1	1	48	0	0	0
	P2	0	2	100	0	0
	D1	0	0	0	0	0
	D2	0	0	0	0	100
2° replica	N	100	37	0	0	0
	R	0	3	0	0	0
	P1	0	29	0	0	0
	P2	0	30	100	0	0
	D1	0	0	0	0	0
	D2	0	2	0	0	100
3° replica	N	100	44	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
	P1	0	16	0	0	0
	P2	0	35	100	0	0
	D1	0	0	0	0	0
	D2	0	5	0	0	100
4° replica	N	97	37	0	0	0
	R	1	3	0	0	0
	P1	2	30	0	0	0
	P2	0	25	100	0	0
	D1	0	0	0	0	0
	D2	0	5	0	0	100
5° replica	N	99	40	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
	P1	1	40	0	0	0
	P2	0	15	100	0	0
	D1	0	0	0	0	0
	D2	0	5	0	0	100
6° replica	N	100	45	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
	P1	0	35	0	0	0
	P2	0	20	100	0	0
	D1	0	0	0	0	0

	D2	0	0	0	100	100
SOMMA						
	P1+P2	4	325	600	0	0
	D1+D2	0	17	0	600	600
MEDIA						
	P1+P2	0	27	50	0	0
	D1+D2	0	1	0	50	50
DEVIAZIONE STANDARD						
	P1+P2	1	12	52	0	0
	D1+D2	0	2	0	52	52
72hEC₅₀						
0,001 (0-0,005) mg/l						

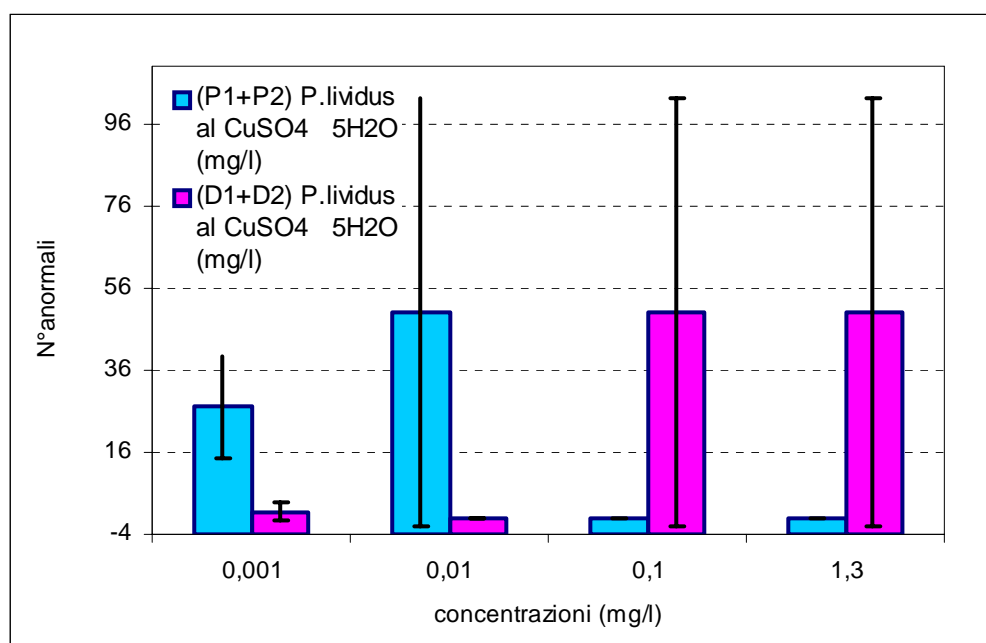


Figura 5.7.3.3 – Valore medio e deviazione standard di anormali (malformazioni e/o morte) (72h) di *P. lividus* al CuSO₄ 5H₂O (mg/l) (anno 2006)

Il saggio con artemia a 24h non ha evidenziato tossicità (% risposta ≤ 10%) per l'acqua di produzione filtrata e ha registrato bassa tossicità per l'acqua non filtrata (EC₅₀ > 100%); a 96h il campione tal quale ha mostrato una tossicità su *Artemia* significativamente più alta rispetto a quella del campione filtrato, che è risultato poco tossico (tabelle 5.7.3.4, 5.7.3.5 e 5.7.3.6; figure 5.7.3.4 e 5.7.3.5).

Le acque di mare prelevate in prossimità di questa piattaforma sono risultate essere non tossiche, come già riscontrato negli altri siti studiati.

Tabella 5.7.3.4 – Numero di larve immobili (24h) di *A.franciscana* all'acqua di produzione non filtrata (PFW_{nf}) di C (anno 2006)

C	Controllo negativo	3,1	6,2	12,5	25,1	50,2	100
		%	%	%	%	%	%
1° replica	0	0	0	0	1	3	3
2° replica	0	0	0	0	0	3	3
3° replica	0	0	0	0	0	3	3
SOMMA	0	0	0	0	1	9	9
MEDIA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	3,0	3,0
DEVIAZIONE STANDARD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0
24hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%							
137,1 (91,2-354,7) %							
TU							
0,7							

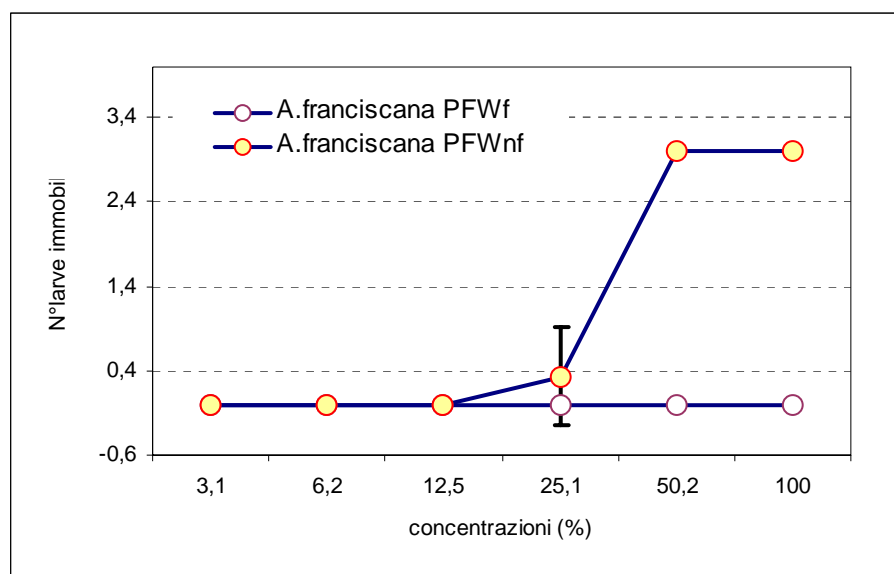


Figura 5.7.3.4 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (24h) di *A.franciscana* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) e non filtrata (PFW_{nf}) di C (anno 2006)

Tabella 5.7.3.5 – Numero di larve immobili (96h) di *A.franciscana* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) di C (anno 2006)

C	Controllo negativo	3,1	6,2	12,5	25,1	50,2	100
		%	%	%	%	%	%
1° replica	0	0	0	0	0	0	2
2° replica	1	0	0	0	0	0	2
3° replica	1	0	0	0	1	1	2
SOMMA	2	0	0	0	1	1	6
MEDIA	0,7	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	2,0
DEVIAZIONE STANDARD	0,6	0,0	0,0	0,0	0,6	0,6	0,0
96hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%							
266,5 (134.3-14512,7) %							
TU							
0,4							
LOEC							
100%							
NOEC							
50,2%							

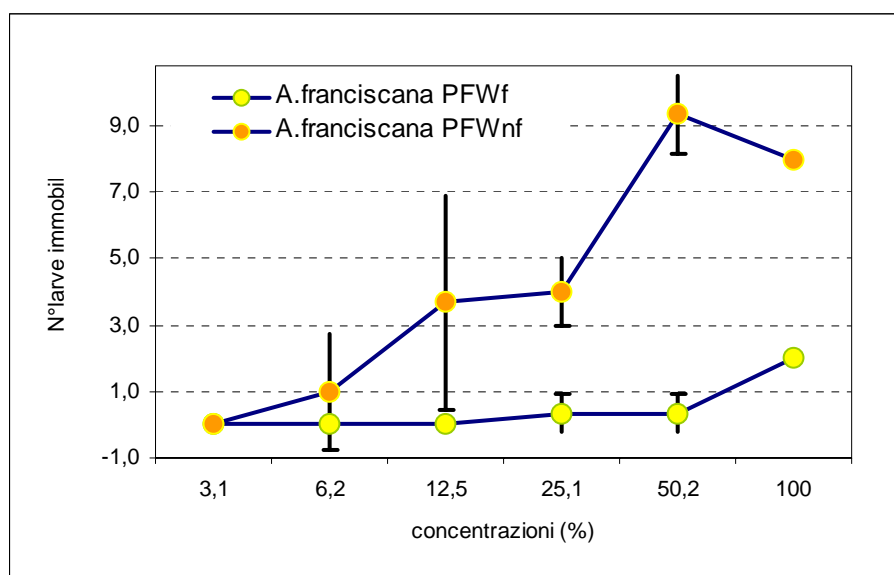


Figura 5.7.3.5 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (96h) di *A.franciscana* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) e non filtrata (PFW_{nf}) di C (anno 2006)

Tabella 5.7.3.6 – Numero di larve immobili (96h) di *A.franciscana* all’acqua di produzione non filtrata (PFW_{nf}) di *C* (anno 2006)

C	Controllo negativo	3,1	6,2	12,5	25,1	50,2	100
		%	%	%	%	%	%
1° replica	0	0	3	6	4	8	8
2° replica	1	0	0	0	5	10	8
3° replica	1	0	0	5	3	10	8
SOMMA	2	0	3	11	12	28	24
MEDIA	0,7	0,0	1,0	3,7	4,0	9,3	8,0
DEVIAZIONE STANDARD	0,6	0,0	1,7	3,2	1,0	1,2	0,0
96hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%							
26,0%							
TU							
3,8							
LOEC							
50,2%							
NOEC							
25,1%							

In altri studi è stato dimostrato come la presenza del particolato nell’acqua di produzione possa contribuire alla tossicità dell’effluente e far sì che l’effetto tossico si manifesti con una cinetica di azione più veloce. Il materiale in sospensione può, infatti, creare un effetto chimico legato alla capacità del materiale in sospensione di adsorbire le specie chimiche e diventare, in tal senso, un “veicolo” di tossicità per gli organismi che entrano in contatto con le particelle (Mariani *et al.*, 2004).

Il saggio di spermiossicità con i ricci ha evidenziato che l’acqua di produzione filtrata di *C* è tossica; i risultati di EC₅₀ e TU, riportati in tabella 5.7.3.6, sono dello stesso ordine di grandezza dei risultati ottenuti dal saggio a 96h con *Artemia*. Una diminuzione della capacità di fecondare le uova è stata riscontrata nello sperma di *P. lividus* dopo esposizione all’acqua di produzione; alle concentrazioni più basse di effluente la percentuale di uova non fecondate è stata minore per raggiungere una percentuale di fecondazione di circa il 18% alla massima concentrazione saggiata (figura 5.7.3.5).

Tabella 5.7.3.6 – Numero di uova non fecondate (2h) di *P.lividus* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) di C (anno 2006)

C PFW_f	Controllo negativo	3,1	6,2	12,5	25,1	50,2	100
		%	%	%	%	%	%
1° replica	22	22	23	22	43	67	85
2° replica	11	12	12	31	49	53	79
3° replica	3	4	19	42	61	58	87
4° replica	9	12	11	39	53	66	81
5° replica	0	0	16	41	52	61	80
6° replica	0	0	26	46	52	59	79
SOMMA	45	50	107	221	310	364	491
MEDIA	7,5	8,3	17,8	36,8	51,7	60,7	81,8
DEVIAZIONE STANDARD	8,5	8,6	6,0	8,8	5,9	5,2	3,4
2hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%							
30,3 (19,9-44,0)%							
TU							
3,3							

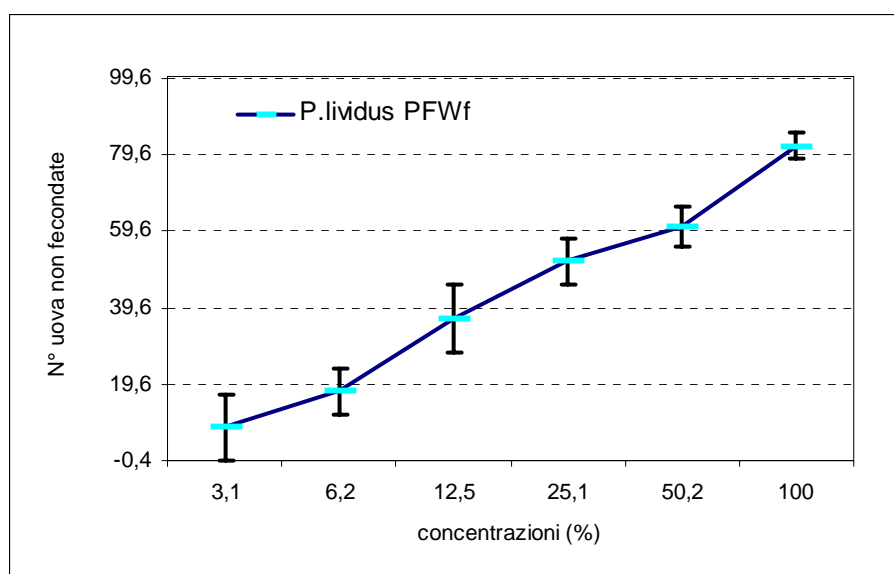


Figura 5.7.3.5 – Valore medio e deviazione standard di uova non fecondate (2h) di *P.lividus* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) di C (anno 2006)

I plutei sviluppati dalle uova fecondate da sperma contaminato non hanno mostrato malformazioni: l'acqua di produzione ha alterato la capacità fecondante dello sperma tuttavia, quando lo sperma è riuscito a fecondare le uova, nessun effetto tossico è stato trasmesso alle larve nascenti.

Il saggio di embriotossicità ha registrato la presenza di larve patologiche (P1) con malformazioni scheletriche o intestinali o nella pigmentazione già a basse concentrazioni dell'acqua di produzione (ad esempio 6,2%); a concentrazioni crescenti diminuiscono le larve patologiche, ma aumenta il numero di embrioni arrestati allo stadio pre-larvale di blastula o gastrula (P2); alla concentrazione più alta saggiata si osserva una mortalità precoce delle uova (D2). Questo saggio è risultato più sensibile rispetto al saggio di spermiossicità e anche rispetto al saggio con *Artemia*.

Tabella 5.7.3.7 – Numero di larve normali e numero e tipo di anomalie di sviluppo (72h) di *P.lividus* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) di C (anno 2006)

C PFW _f		controllo negativo	3,1	6,2	12,5	25,1	50,2	100
			%	%	%	%	%	%
1° replica	N	98	88	3	1	0	0	0
	R	2	0	2	2	0	0	0
	P1	1	12	95	43	0	0	0
	P2	0	0	0	54	100	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	0	0	0	0	100
2° replica	N	100	100	6	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0	0
	P1	0	0	90	38	0	0	0
	P2	0	0	4	62	100	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	0	0	0	0	100
3° replica	N	100	87	10	0	0	0	0
	R	0	3	0	0	0	0	0
	P1	0	10	90	20	0	0	0
	P2	0	0	0	71	100	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	0	9	0	0	100
4° replica	N	97	82	0	1	0	0	0
	R	1	2	0	0	0	0	0
	P1	2	13	100	19	0	0	0

	P2	0	3	0	79	100	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	0	1	0	0	100
5° replica	N	99	90	0	2	0	0	0
	R	0	5	0	0	0	0	0
	P1	1	5	100	43	0	0	0
	P2	0	0	0	53	100	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	0	2	0	0	100
6° replica	N	100	92	0	0	0	0	0
	R	0	3	0	0	0	0	0
	P1	0	5	100	20	0	0	0
	P2	0	0	0	77	100	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	0	3	0	0	100
SOMMA								
	P1+P2	4	48	579	579	600	600	0
	D1+D2	0	0	0	15	0	0	600
MEDIA								
	P1+P2	0,3	4,0	48,3	48,3	50,0	50,0	0,0
	D1+D2	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	50,0
DEVIAZIONE STANDARD								
	P1+P2	0,7	5,0	49,8	21,6	52,2	52,2	0,0
	D1+D2	0,0	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0	52,2
72hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%								
4,3 (4,2-4,4) %								
TU								
23,2								
LOEC								
3,1%								

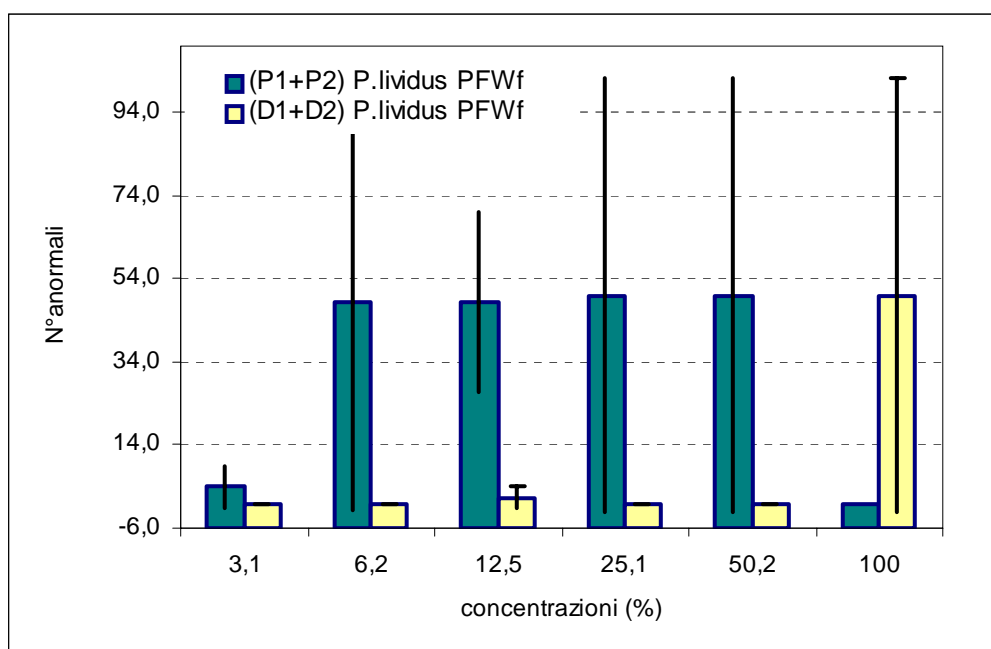


Figura 5.7.3.6 – Valore medio e deviazione standard di anormali (malformazioni e/o morte) (72h) di *P.lividus* all’acqua di produzione filtrata (PFW_f) di C (anno 2006)

L’esposizione dello sperma alle acque di mare prelevate in superficie non ha indotto una riduzione del tasso di fecondazione rispetto al controllo negativo pertanto le acque non sono risultate tossiche, merito probabilmente ancora una volta del processo di diluizione; tuttavia, poiché il campionamento dell’acqua di mare è avvenuto in superficie e non alla quota dello scarico non possiamo dire nulla in termini di tossicità, sull’acqua di mare campionata alla quota dello scarico.

5.7.4 D

Gli esperimenti condotti nel 2006 sull’acqua di produzione di D e sui campioni di acqua di mare sono stati il saggio di immobilizzazione a 24h e 96h con *A. franciscana*, il saggio di immobilizzazione con il *B. plicatilis*, i saggi di spermotossicità ed embriotossicità con *P. lividus*.

I risultati di adeguatezza del materiale biologico sono riportati nel paragrafo 5.7.3 sia per le artemie che per i ricci mentre per i rotiferi sono indicati in tabella 5.7.4.1 ed in figura 5.7.4.1.

Tabella 5.7.4.1 – Numero di larve immobili (24h) di *B.plicatilis* al $K_2Cr_2O_7$ (mg/l) (anno 2006)

$K_2Cr_2O_7$	Controllo negativo	75	150	300	600
		mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1° replica	0	0	0	3	5
2° replica	0	0	0	3	5
3° replica	0	0	0	2	5
4° replica	0	0	0	3	5
5° replica	0	0	0	2	5
6° replica	0	0	0	3	5
SOMMA	0	0	0	16	30
MEDIA	0,0	0,0	0,0	2,7	5,0
DEVIAZIONE STANDARD	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
24hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%					
293,1 (258,4-332,0) mg/l					

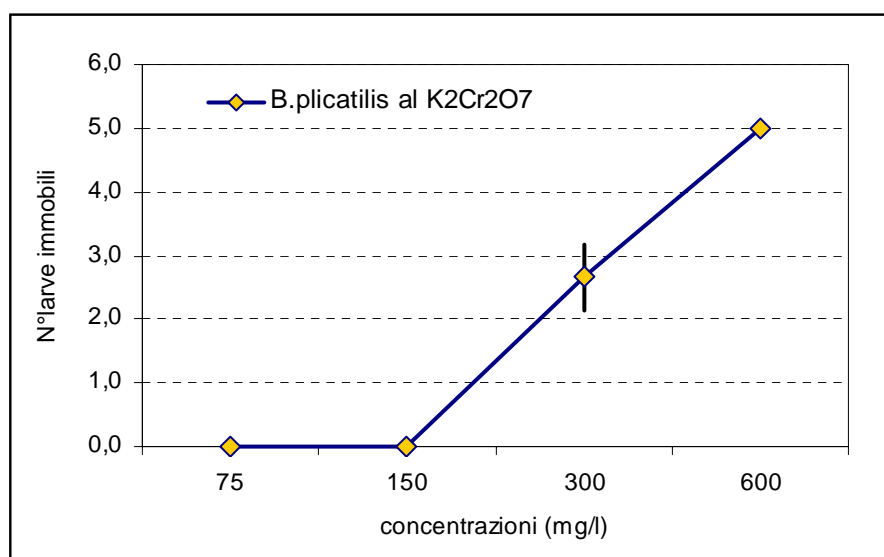


Figura 5.7.4.1 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (24h) di *B.plicatilis* al $K_2Cr_2O_7$ (mg/l) (anno 2006)

I risultati dei saggi con rotiferi ed artemie hanno evidenziato non tossicità dell'acqua di produzione filtrata; tuttavia l'esposizione al campione non filtrato ha prodotto tossicità sui rotiferi ed un debole effetto tossico ($EC_{50} > 100\%$) sulle artemie solo dopo esposizione prolungata (a 96h) (tabelle 5.7.4.2 e 5.7.4.3; figure 5.7.4.2 e 5.7.4.3).

Tabella 5.7.4.2 – Numero di larve immobili (48h) di *B.plicatilis* all'acqua di produzione non filtrata (PFWnf) di *D* (anno 2006)

D	Controllo negativo	3,1	6,2	12,5	25,1	50,2	100
PFW_{nf}		%	%	%	%	%	%
1° replica	0	0	0	1	2	4	5
2° replica	0	0	0	1	1	4	5
3° replica	0	0	0	1	1	4	5
4° replica	0	0	0	1	2	4	5
5° replica	0	0	0	1	1	4	5
6° replica	0	0	0	1	2	4	5
SOMMA	0	0	0	6	9	24	30
MEDIA	0,0	0,0	0,0	1,0	1,5	4,0	5,0
DEVIAZIONE STANDARD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0
48hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%							
28,3 (23,5-34,2)%							
TU							
3,5							
LOEC							
12,5%							
NOEC							
6,2%							

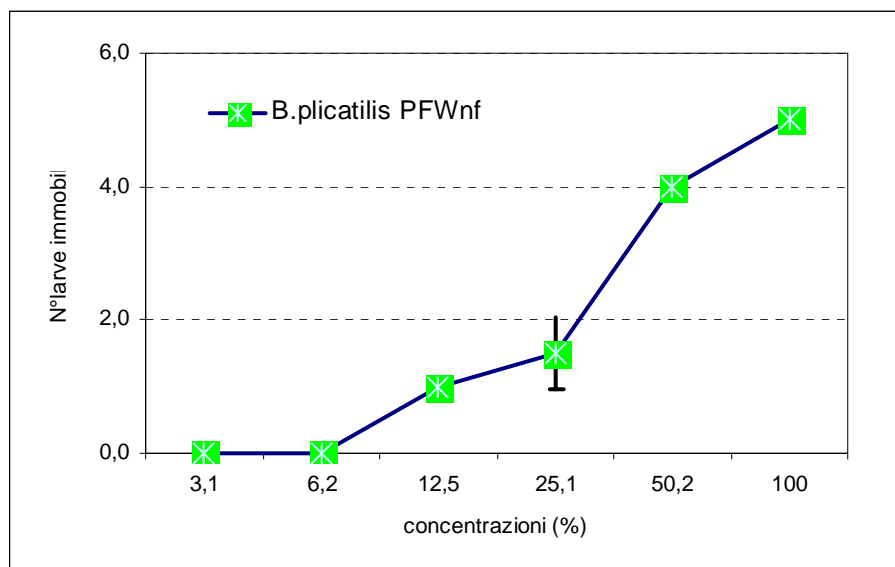


Figura 5.7.4.2 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (48h) di *B.plicatilis* all’acqua di produzione non filtrata (PFW_{nf}) di *D* (anno 2006)

Tabella 5.7.4.3 – Numero di larve immobili (96h) di *A.franciscana* all’acqua di produzione non filtrata (PFW_{nf}) di *D* (anno 2006)

D		3,1	6,2	12,5	25,1	50,2	100
	Controllo negativo						
	PFW_{nf}	%	%	%	%	%	%
	1° replica	0	0	0	1	4	5
	2° replica	0	0	0	1	3	3
	3° replica	0	0	0	1	3	3
	SOMMA	0	0	0	3	10	11
	MEDIA	0,0	0,0	0,0	1,0	3,3	3,7
	DEVIAZIONE STANDARD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	1,2
96hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%							
115,0 (79,0-240,5)%							
TU							
0,9							
LOEC							
50,2%							
NOEC							
25,1%							

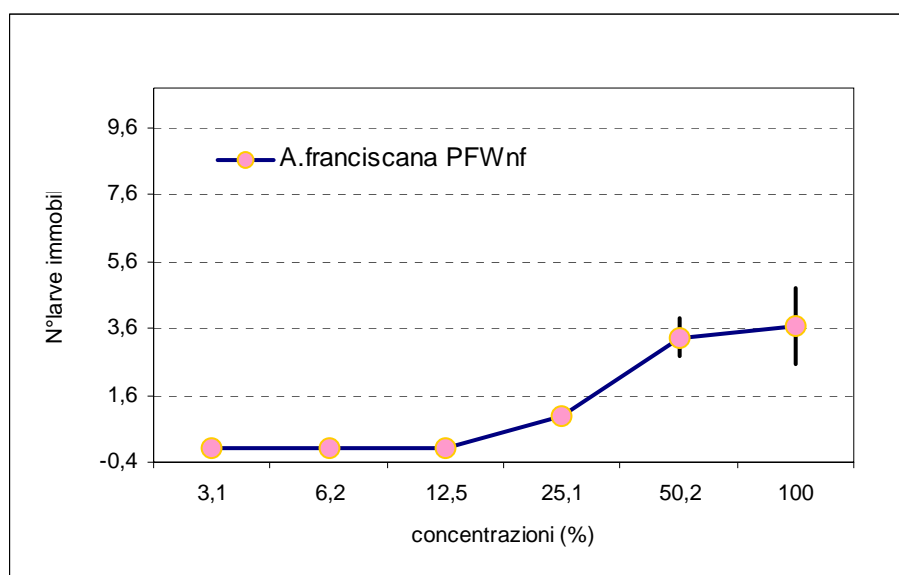


Figura 5.7.4.3 – Valore medio e deviazione standard delle larve immobili (96h) di *A. franciscana* all'acqua di produzione non filtrata (PFW_{nf}) di *D* (anno 2006)

Il saggio di spermiotossicità con *P. lividus* ha individuato un valore di EC₅₀ superiore al 100% indicativo di un'acqua debolmente tossica (tabella 5.7.4.4 e figura 5.7.4.4) in accordo al saggio prolungato con *Artemia*; i plutei sviluppati dalle uova fecondate da sperma contaminato non hanno mostrato malformazioni, pertanto l'acqua di produzione ha alterato, in misura minore rispetto ai casi studiati in precedenza, la capacità fecondate dello sperma e non ha indotto alcun effetto tossico nelle larve.

Tabella 5.7.4.4 – Numero di uova non fecondate (2h) di *P.lividus* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) di *D* (anno 2006)

<i>D</i> PFW _f	Controllo negativo	3,1	6,2	12,5	25,1	50,2	100
		%	%	%	%	%	%
1° replica	3	19	22	23	30	45	50
2° replica	1	3	21	29	32	39	50
3° replica	0	12	23	25	32	37	51
4° replica	5	10	22	23	37	40	47
5° replica	4	11	22	31	39	40	49
6° replica	2	12	22	27	39	40	50
SOMMA	15	67	132	158	209	241	297
MEDIA	2,5	11,2	22,0	26,3	34,8	40,2	49,5
DEVIAZIONE STANDARD	1,9	5,1	0,6	3,3	4,0	2,6	1,4
2hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%							
107,4 (86,0-140,5)%							
TU							
0,9%							

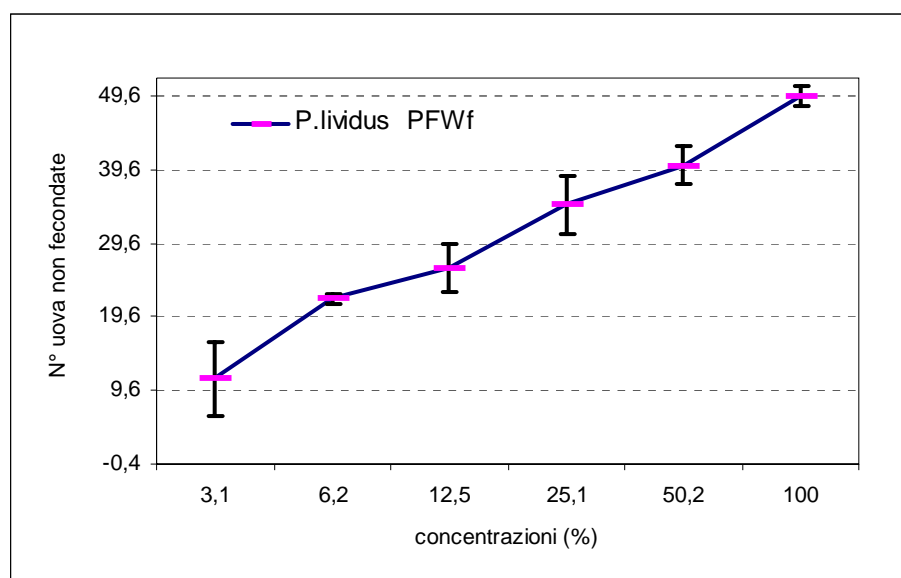


Figura 5.7.4.4 – Valore medio e deviazione standard di uova non fecondate (2h) di *P.lividus* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) di *C* (anno 2006)

Il saggio di embriotossicità ha registrato un risultato simile a quello descritto per *C*: larve patologiche (P1) già a basse concentrazioni dell'acqua di produzione, embrioni arrestati allo stadio pre-larvale a concentrazioni crescenti e mortalità

precoce delle uova alla concentrazione più alta saggiata (tabella 5.7.4.5 e figura 5.7.4.5). Anche in questo caso il saggio di embriotossicità con i ricci è apparso più sensibile di quello di spermiossicità sempre con *P. lividus* e anche del saggio con *Artemia*.

Tabella 5.7.4.5 – Numero di larve normali e numero e tipo di anomalie di sviluppo (72h) di *P.lividus* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) di D (anno 2006)

<i>D</i>		controllo negativo	3,1	6,2	12,5	25,1	50,2	100
PFW _f			%	%	%	%	%	%
1° replica	N	98	78	55	0	0	0	0
	R	2	2	1	0	0	0	0
	P1	1	18	43	100	46	0	0
	P2	0	1	1	0	52	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	1	0	0	2	0	100
2° replica	N	100	81	61	0	0	0	0
	R	0	0	1	0	1	0	0
	P1	0	19	33	100	50	0	0
	P2	0	0	4	0	48	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	1	0	1	0	100
3° replica	N	100	81	60	0	0	0	0
	R	0	2	0	0	0	0	0
	P1	0	15	39	100	38	0	0
	P2	0	2	1	0	62	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	0	0	0	0	100
4° replica	N	97	80	62	0	0	0	0
	R	1	0	3	0	0	0	0
	P1	2	20	33	100	40	0	0
	P2	0	0	2	0	51	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	1	0	9	0	100
5° replica	N	99	77	59	0	0	0	0
	R	0	3	1	0	0	0	0

	P1	1	19	40	100	54	0	0
	P2	0	1	0	0	45	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	0	0	1	0	100
6° replica	N	100	75	60	0	0	0	0
	R	0	1	3	0	0	0	0
	P1	0	24	35	100	47	0	0
	P2	0	0	1	0	53	100	0
	D1	0	0	0	0	0	0	0
	D2	0	0	1	0	0	0	100
SOMMA								
	P1+P2	4	119	232	600	586	600	0
	D1+D2	0	1	3	0	13	0	600
MEDIA								
	P1+P2	0,3	9,9	19,3	50,0	48,8	50,0	0,0
	D1+D2	0,0	0,1	0,3	0,0	1,1	0,0	50,0
DEVIAZIONE STANDARD								
	P1+P2	0,7	9,9	18,9	52,2	6,4	52,2	0,0
	D1+D2	0,0	0,3	0,5	0,0	2,6	0,0	52,2
72hEC₅₀ e limiti di confidenza 95%								
6,5 (6,2-6,9) %								
TU								
15,4								
LOEC								
3,1%								

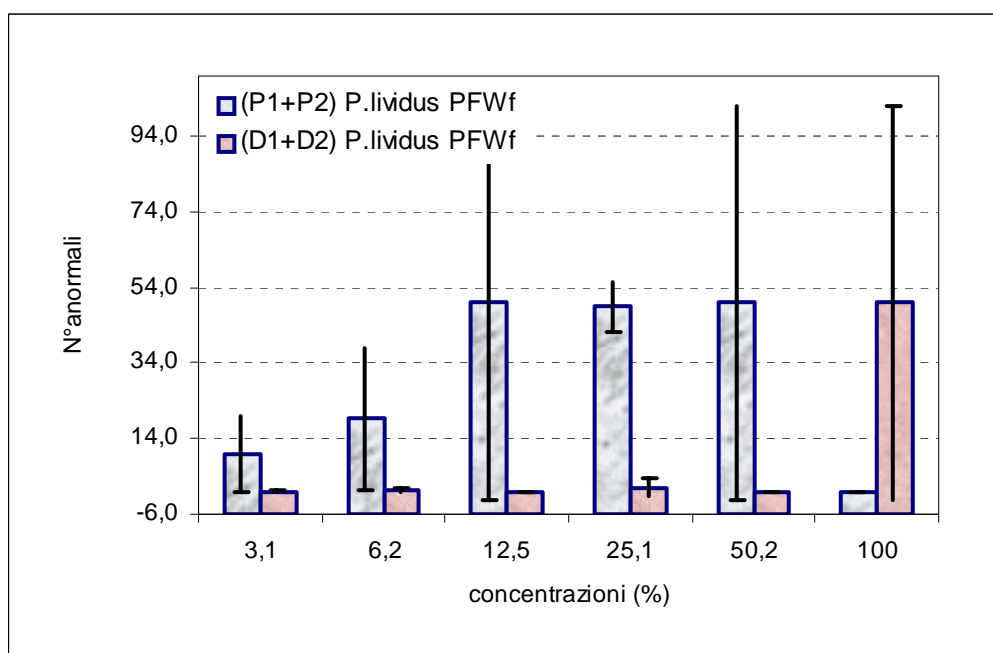


Figura 5.7.4.5 – Valore medio e deviazione standard di anormali (malformazioni e/o morte) (72h) di *P. lividus* all'acqua di produzione filtrata (PFW_f) di C (anno 2006)

5.8 Confronto dei dati di tossicità

Le indagini ecotossicologiche svolte sui campioni di acqua di produzione e su quelli di acqua di mare consentono di fare le seguenti considerazioni:

- le acque di produzione sono tossiche per alcuni organismi mentre altri, spesso, non evidenziano effetti dopo esposizione a questi reflui. Gli organismi che in generale non mostrano alcun effetto o comunque evidenziano risposte di scarsa rilevanza sono *Artemia* e *Rotifero* mentre *P. lividus* è più sensibile alle acque di produzione (figura 5.8.1). Questo risultato trova riscontro nella letteratura riguardante il riccio, secondo la quale questo organismo è un eccellente indicatore biologico grazie alle sue caratteristiche ecologiche, alle conoscenze che si ha della sua biologia e alla sua sensibilità a numerosi contaminanti (Pagano *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 1995; Trieff *et al.*, 1995; Arizzi *et al.*, 2001, Volpi *et al.* 2001, Giuliani *et al.*, 2002; Pagano *et al.*, 2002a,b).

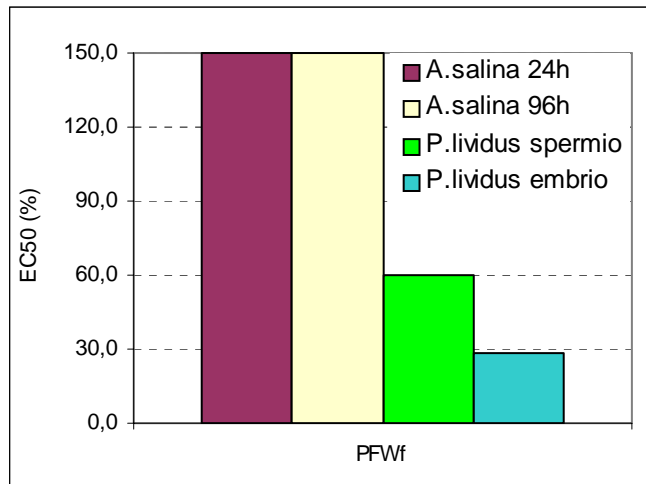


Figura 5.8.1 – Dati di EC₅₀ per l’acqua di produzione filtrata (PFW_f) di D (anno 2006)

- o La risposta di tossicità cambia non solo a seconda della specie impiegata ma, per la stessa specie, a seconda del tempo di esposizione: la risposta dell’*Artemia* è stata spesso maggiormente significativa a 96h rispetto a 24h di esposizione (figura 5.8.2) oppure, in alcuni casi, ha mostrato tossicità esclusivamente dopo un’esposizione prolungata.

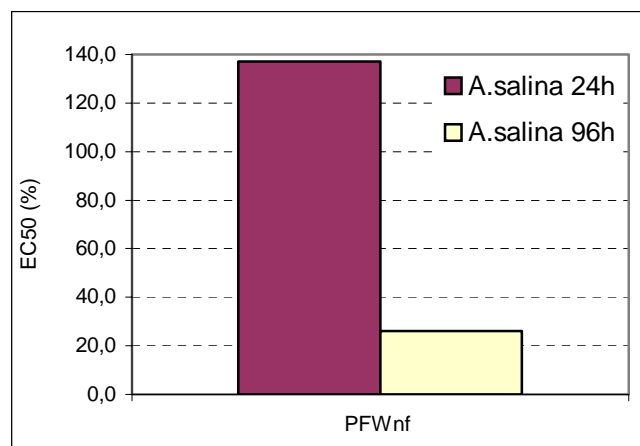


Figura 5.8.2 – Dati di EC₅₀ per l’acqua di produzione non filtrata (PFW_{nf}) di C (anno 2006)

- o La risposta di tossicità di una stessa specie è differente a seconda della tipologia di saggio impiegato e dell’*endpoint* osservato: per *P. lividus* il saggio di embriotossicità ha registrato un maggiore effetto, ovvero valori di EC₅₀ più bassi, rispetto al saggio di spermio-tossicità; questo è solitamente conseguenza dello stadio vitale impiegato. In particolare è

interessante osservare che quando è stato esposto solo lo sperma all'acqua di produzione, questo ha subito una riduzione della capacità di fecondare le uova ma non ha trasmesso alcun effetto tossico alle larve sviluppate dalle uova fecondate; quando, invece, gli embrioni sono stati esposti agli effluenti si è osservato, in tutti i casi, un effetto tossico non solo come presenza di malformazioni larvali ma anche come morte degli embrioni e/o delle larve.

- o Quando è stata saggiata sia l'acqua di produzione tal quale che il campione filtrato si è verificato che o l'effluente non era tossico o l'effetto tossico era rilevato solo per il campione non filtrato o pur se la tossicità appariva per entrambi i campioni quello non filtrato era maggiormente tossico. Questo risultato, come già ampiamente descritto, può essere attribuito alla presenza del particolato che funziona da "veicolo" di tossicità perché esso adsorbe i contaminanti.
- o Vista la complessa e variabile composizione chimica delle acque di produzione è difficile individuare quali contaminanti possono maggiormente determinare la tossicità dell'effluente; la letteratura (*Somerville, 1987; Frost et al., 1998; Smith, 1998*) indica i composti organici, in particolare IPA e fenoli, tuttavia la complessità di questa miscela fa pensare più probabilmente ad una sinergia tra diversi componenti inorganici ed organici.
- o I saggi ecotossicologici condotti in questa ricerca non evidenziano, in nessun caso, effetti tossici su organismi esposti alle acque di mare prelevate nell'area interessata dalle singole piattaforme, merito probabilmente del processo di diluizione a cui va incontro l'effluente una volta scaricato nell'ambiente marino. Il risultato di non tossicità delle acque di mare osservato con le artemie, i rotiferi ed i ricci è stato confermato, solo per le piattaforme *A* e *B*, anche con altri organismi quali i batteri, le alghe ed i pesci (*Virno et al., 2006*).

Conclusioni

L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare la dispersione in mare delle acque di produzione e, al contempo, cercare di effettuare una valutazione ecotossicologica delle stesse e delle acque di mare che ricevono lo scarico.

La linea di ricerca ha seguito un approccio di studio 'integrato' di tipo chimico e fisico per la dispersione in mare delle acque di produzione, ed ecotossicologico per verificare eventuali danni a organismi selezionati dopo la loro esposizione all'acqua di produzione e all'acqua di mare prelevata a diverse distanze dal punto di scarico.

L'acqua di produzione è una miscela complessa ed alcuni contaminanti in essa presenti presentano caratteristiche di persistenza e capacità di bioaccumulo e possono essere responsabili, nel tempo, dell'insorgenza di effetti dannosi su organismi marini; dunque la valutazione di entrambi gli aspetti (dispersione e tossicità) è estremamente importante.

L'analisi chimica è stata orientata a selezionare nell'acqua di produzione alcuni composti utili alla 'tracciabilità' dell'effluente in mare.

Sino ad oggi, non risultano studi relativi all'individuazione di traccianti chimici per le acque di produzione provenienti da piattaforme a gas situate nell'area mediterranea; pertanto è stato importante non solo eseguire le indagini analitiche sui campioni ma validare un criterio metodologico con il quale discriminare la scelta del tracciante chimico dell'acqua di produzione.

Si è proceduto all'individuazione, sia nelle acque di produzione che in campioni di acqua di mare, di alcuni composti, BTEX, toluene idrossibutilato (BHT) e glicol dietilenico (DEG) potenzialmente significativi. I BTEX sono stati scelti in accordo agli unici studi pregressi esistenti sull'impiego di traccianti chimici (benzene e toluene) per studiare la dispersione in mare delle acque di produzione nel mare del Nord (*Burns et al.*, 1999a; 1999b), mentre il DEG ed il BHT sono stati scelti in quanto additivi impiegati nella fase di produzione e quindi esclusivamente riconducibili ad attività di piattaforma.

I BTEX non sono risultati traccianti adatti alle acque di produzione provenienti dalle piattaforme a gas dell'Adriatico, poiché il loro ritrovamento in mare è avvenuto sempre in prossimità del punto di scarico e soltanto quando i volumi di acqua scaricati sono stati molto elevati, anche a distanze crescenti dal punto di

immissione; si tratta, infatti, di composti volatili che possono essere rintracciati solo quando le loro concentrazioni sono sufficientemente elevate.

Il BHT è principalmente adsorbito sulle particelle, pertanto la sua presenza in mare è fortemente condizionata dal quantitativo di particolato presente nell'acqua di produzione; per tali motivi si rischia di ritrovarlo in concentrazioni prossime al limite di rilevabilità anche a distanze vicine alla piattaforma.

Il DEG è risultato un buon tracciante delle acque di produzione, in particolare è stato sempre ritrovato in mare fino alla massima distanza campionata dal diffusore (25 m). Le concentrazioni di DEG determinate in acqua di mare sono state uno strumento per studiare il comportamento dell'acqua di produzione una volta scaricata in mare; è apparso, infatti, evidente che il destino dei soluti in essa contenuti è fortemente condizionato dalle proprietà chimiche e fisiche di ciascuno, dal volume scaricato, dalla quota a cui è posizionato il diffusore, dalla dinamica del fluido ambientale, dalle condizioni di stratificazione della colonna d'acqua nonché dalla differenza di densità tra l'effluente scaricato e l'ambiente marino ricevente. Quando l'acqua di produzione è scaricata in superficie, con un volume ridotto (ad esempio piattaforma *A*) le concentrazioni di tracciante misurate diminuiscono gradualmente con la distanza dallo scarico in superficie a conferma della presenza della plume sul pelo d'acqua (cosa che è apparsa visibile anche durante il campionamento). Nel caso in cui invece l'effluente sia immesso in mare da un diffusore posto al di sopra della superficie, con un volume notevole e con una salinità minore di quella marina (ad esempio piattaforma *B*) la concentrazione di DEG risulta costante in superficie, nei primi metri dal punto di immissione, e successivamente riaumenta, ad una certa distanza, in funzione della dinamica della plume che sprofonda al di sotto della superficie, si allontana dal punto d'ingresso e poi risale per effetto della sua minore densità rispetto a quella dell'acqua circostante.

Il confronto dei risultati delle analisi chimiche con quelli ottenuti dal modello di dispersione *Visual Plume-UM3* (Three Dimensional Update merge) dell'U.S Environmental Protection Agency (§ appendice) e l'inserimento nel modello anche dei dati relativi al DEG sono serviti per avere ulteriori informazioni sull'andamento della plume in mare, sui livelli di intrappolamento, sul fattore di diluizione e sui tempi di dispersione; si tratta di informazioni che un approccio puramente analitico, basato solo su misure puntuali, non avrebbe potuto fornire.

L'approccio chimico/fisico allo studio della dispersione ha evidenziato che il comportamento delle acque di produzione, in termini di diluizione e di mescolamento, dipende fortemente dalla differenza di densità tra l'effluente scaricato e l'ambiente marino ricevente. Nella maggior parte dei casi la massima distanza orizzontale dal diffusore che la plume raggiunge è di una decina di metri ed il livello di intrappolamento dell'acqua di produzione è sempre ad una profondità prossima a quella a cui è avvenuta l'immissione in mare; questo concorda con le concentrazioni più alte di DEG nei campioni prelevati alla quota di scarico. Tuttavia l'evoluzione spaziale della plume indicata dal modello non rappresenta i massimi valori assoluti di diluizione ma i massimi relativi alla fase iniziale della diluizione; pertanto l'acqua di produzione può essere ritrovata in mare anche oltre i 10 m indicati dal modello; in effetti le analisi chimiche registrano la presenza di DEG fino a 25 m di distanza corrispondente alla massima distanza campionata dal diffusore. Il modello indica inoltre che la diluizione dell'effluente, per le piattaforme monitorate, è tale da avere un abbattimento della concentrazione iniziale variabile tra 1% e 60% in un tempo di circa 1 minuto; in particolare la diluizione iniziale maggiore è registrata in autunno ed in inverno in presenza di rimescolamento della colonna d'acqua.

Ulteriore obiettivo di questa ricerca è stato valutare la tossicità *in toto* delle acque di produzione e osservare la variabilità spaziale della tossicità ambientale; a tal fine sono stati condotti saggi ecotossicologici rispettivamente sulle acque di produzione di quattro piattaforme e sulle acque di mare campionate nell'area interessata da ogni installazione. Le indagini sono state svolte mediante una batteria di saggi (*Brachionus plicatilis*, *Artemia franciscana* e *Paracentrotus lividus*) e questo ha consentito di avere una risposta integrata e di stabilire quale tra le specie saggate è la più sensibile a questa tipologia di scarichi. L'*Artemia* ed il *Rotifero* non mostrano alcun effetto o, comunque, evidenziano risposte di scarsa rilevanza mentre il *P.lividus* appare il più sensibile alle acque di produzione. La stessa letteratura nazionale ed internazionale riguardante i saggi ecotossicologici riporta che le caratteristiche ecologiche del riccio di mare, le relative conoscenze che si hanno della sua biologia e la sua sensibilità a numerosi contaminanti lo rendono eccellente indicatore degli effetti biologici derivanti da scarichi (Trieff *et al.*, 1995; Pagano *et al.*, 2002a,b).

La risposta di tossicità cambia non solo a seconda della specie impiegata ma, per la stessa specie, a seconda del tempo di esposizione all'acqua di produzione e dell'*endpoint* osservato: l'*Artemia*, nei casi in cui risponde, rileva o una percentuale di immobilizzazione più alta a 96 h rispetto a 24 h oppure mostra un effetto tossico soltanto dopo un'esposizione di 96 h. La risposta di tossicità di una stessa specie è differente a seconda della tipologia di saggio impiegato: per *P.lividus* il saggio di embriotossicità ha registrato un maggiore effetto rispetto al saggio di spermotossicità. Questo è solitamente conseguenza dello stadio vitale impiegato. In particolare è stato interessante osservare che quando è stato esposto solo lo sperma all'acqua di produzione, questo ha subito una riduzione della capacità di fecondare le uova ma non ha trasmesso alcun effetto tossico alle larve sviluppate dalle uova fecondate; quando, invece, gli embrioni sono stati esposti agli effluenti si è osservato, in tutti i casi, un effetto tossico non solo come presenza di malformazioni larvali ma anche come morte degli embrioni e/o delle larve.

Vista la complessa e variabile composizione chimica delle acque di produzione è difficile individuare quali contaminanti possono maggiormente determinare la tossicità dell'effluente; la letteratura (*Somerville, 1987; Frost et al., 1998; Smith, 1998*) indica i composti organici, in particolare gli IPA ed i fenoli, quali composti che maggiormente contribuiscono alla tossicità; tuttavia la complessità di questa miscela fa pensare all'esistenza di sinergie tra componenti inorganiche ed organiche.

I saggi ecotossicologici condotti non hanno evidenziato, in nessun caso, effetti tossici su organismi esposti alle acque di mare prelevate nell'area interessata dalle singole piattaforme, merito questo del processo di diluizione a cui va incontro l'effluente una volta scaricato nell'ambiente marino.

La batteria impiegata in questo studio rappresenta una prima valutazione ecotossicologica mediante la quale si è osservato che la risposta degli organismi varia con il tempo di esposizione e con l'*endpoint* valutato. L'assenza di tossicità delle acque di mare è probabilmente imputabile al fenomeno di diluizione che coinvolge le acque di produzione, tuttavia sarebbe interessante condurre ulteriori saggi, da affiancare a quelli già scelti, sia su altri effluenti che su matrici ambientali al fine di confermare e/o integrare i risultati di questa ricerca.

Bibliografia

- Accornero A., Manfra L., Salluzzo A., Modestia F., 2004. Trace metal pollution in surface marine waters: nearshore concentrations along Apulia and Albania. *Chemistry and Ecology* 20, 1, 195-203.
- Alpendurada M., 2000. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A* 889, 3-14.
- APAT-IRSA-CNR 2003 - Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida. 29/2003. Vol. Terzo. Metodo 8060.
- Arizzi Novelli A., Volpi Ghirardini A., Giuliani S., Falugi C., Pagano G., Iaccarino M., 2001. Evaluation of coastal water and sediment toxicity towards gametes and embryos from sea urchins using different test procedures. *Biologia Marina Mediterranea* 82, 41-59.
- ASTM, 1998. Standard Guide for Acute toxicity test with the rotifer *Brachionus*. Method E1440-91 reapproved 1998, 1-8.
- Baudo R., 2000. Principi generali: tossicologia ed ecotossicologia, obiettivi e definizioni, chimica e ambiente, dall'ambiente agli organismi, dose ed effetto, effetti su individui, popolazioni, comunità, ecosistemi. CNR-Ist.Ital. *Idrobiologia*. Unichim. Ottobre 2000.
- Baumgartner D.J., Frick W.E., Roberts P.J.W., 1994. Dilution models for effluent discharges (Third Edition). Environmental Protection Agency Report No. EPA/600/R-94/086, Washington DC.
- Baumann P.C., 1989. PAH, metabolites, and neoplasia in feral fish populations. In: Varanasi U. ed. *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 269-289.
- Baumgartner D.J., Frick W.E., Roberts P.J.W., 1994. Dilution models for effluent discharges (Third Edition). Environmental Protection Agency Report No. EPA/600/R-94/086, Washington DC.
- Bellan G., Bourcier , Picard J., Salen-Picard C., Stora G., 1985. Conséquences structurelles dues aux perturbations affectant les biocénoses

benthiques méditerranéennes de substrat meuble. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* 29, 215-221.

- Brendehaugh J., Johnsen S., Bryne K.H., Gjose A.L., Eide T.H., Aamot E., 1992. Toxicity testing and chemical characterization of produced water – A preliminary study. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 245-256.
- Britt J.O. and Howard E.B. 1983. Tissue residues of selected environmental contaminants in marine mammals. In: Howard E.B. ed. *Pathobiology of Marine Mammal Diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Burns K.A., Codi S., Furnas M., Heggie D., Holdway K.B. and McCallister F., 1999a. Dispersion and fate of produced formation water constituents in an Australian northwest shelf shallow water ecosystem. *Marine Pollution Bulletin* 38, 7, 593-603.
- Burns K.A. and Codi S., 1999b. Non-volatile hydrocarbon studies around an oil production platform on Australia's Northwest Shelf. *Estuarine and Coastal Shelf Science* 49, 853-876.
- Cappiello A., Famigliani G., Palma P., Pierini E., Trufelli H., Maggi C., Manfra L., Mannozi M. Application of nanofia-direct-ei-ms to determine diethylene glycol in produced formation water and seawater samples (Adriatic sea). *Water Research* submitted.
- Capuzzo J.M., 1987. Biological effects of petroleum hydrocarbons: assessment from experimental results. In: Boesch D.F. and Rabalais N.N. eds. *Long-term environmental effects of offshore oil and gas development*. Elsevier Applied Science, London, UK, 343-410.
- Chapman G.A., 1995. Sea urchin sperm cell test. In: Rand G.M. ed. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. Second edition. Taylor and Francis, Bristol, PA., 189-205.
- Chapman P.M. and Long, E.R., 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin* 14, 81–84.
- Cianelli D., Scotti T., Zambianchi E., Manfra L., Cicero A.M., 2006a. Dispersione di acque di produzione nel mare Adriatico. *Atti del XVII*

Congresso dell'Associazione Italiana di Oceanografia e Limnologia, submitted.

- Cianelli D., Zambianchi E., Manfra L., Maggi C., Cappiello A., Lattanzi L., Mannozi M., Cicero A.M., 2006b. Dispersione delle acque di produzione nel mare Adriatico: un approccio integrato numerico-chimico. *IV° Convegno Nazionale del Conisma*. Viareggio, Italia, 14-18 Novembre.
- Cicero A.M., Di Mento R., Gabellini M., Maggi C., Trabucco B., Astorri M., Ferraro M., 2003. *Annali di Chimica* 93, 701-705.
- Cline, J.T., 1998. Treatment and Discharge of Produced Water for Deep Offshore Disposal. *API Produced Water Management Technical Forum and Exhibition*. Lafayette, LA, 17-18 November.
- Cognetti G. e Cognetti G., 1992. *Inquinamento e protezione del mare*. Calderini, Bologna.
- Cognetti G., Sarà M., Magazzù G., 1999. *Biologia Marina*. Calderini, Bologna.
- Damiani, 2002. Ecotoxicology and ecosystems health. *Annali Istituto Superiore Sanità* 38, 2, 155-159.
- Daniels C.B. and Means J.C., 1989. Assessment of the genotoxicity of produced water discharges associated with oil and gas production using a fish embryo and larval test. *Marine Environmental Research* 28, 303-307.
- Decreto Legislativo n. 152 11 Maggio 1999. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole. G.U. n. 124 del 29 Maggio 1999.
- Decreto Ministeriale 28 Luglio 1994. Determinazione delle attività istruttorie per il rilascio dell'autorizzazione allo scarico in mare dei materiali derivanti da attività di prospezione, ricerca e coltivazione di giacimenti idrocarburi liquidi e gassosi. G.U. n. 190 del 16 Agosto 1994.
- Dewulf J., Van Langenhove H., Everaert P., 1999. Determination of Henry's law coefficients by combination of the equilibrium partitioning in closed systems and solid-phase microextraction techniques. *Journal of Chromatography A* 830, 353-363.

- Dinnel P.A., Link J.M., Stober Q.J., 1987. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 16, 23-32.
- Eisert R. and Levsen K., 1996. Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A* 733, 143-157.
- Eisert R. and Pawliszyn J., 1997. New Trends in Solid Phase Microextraction Critical Reviews. *Analytical Chemistry* 27, 103-135.
- EPA, 1996. Method 8260B, VOC by GC/MS Capillary column Technique, SW-846 Ch 4.3; 12/01/1996
- Fan T.W.M., Higashi R.M., Cherr G.N., Pillai M.C., 1992. Use of noninvasive NMR spectroscopy and imaging for mussel reproduction. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 403-414.
- Flynn S.A, Butler E.J, Vance I., 1996. Produced Water composition, toxicity, and fate: a review of recent BP North Sea Studies. In: Reed M. and Johnsen S. eds. *Produced water 2 Environmental issues and mitigation technologies*, Plenum Press, New York, 69-80.
- Francese M. e Traldi D., 2001. Impiego di *Brachionus plicatilis* per saggi ecotossicologici in ambiente marino. *Biologia Marina Mediterranea* 8, 103-109.
- Frick W.E., Roberts P.J.W., Davis L.R., Keyes J., Baumgartner D.J., George K.P., 2002. Dilution Models for Effluent Discharges, 4th Edition (Visual Plumes). Ecosystems Research Division, NERL, ORD U.S.EPA, Georgia. <http://www.epa.gov/ceampubl/swater/vplume>.
- Frick R., Davis K., Baumgartner G., 2003. Visual Plumes CD EPA's Center for Exposure Assessment Modeling, Ecosystems Research Division, Athens, GA, USA, frick.walter@epa.gov .
- Frost T.K., Johnsen S., Utvik T.I.R., 1998. Produced water discharges in the North Sea. Fate and effect in the water column. Summary report OLF 1998, pp. 24.
- Furuholt E., 1996. Environmental Effects of Discharge and Reinjection of Produced Water. In: Reed M. and Johnsen S. eds. *Produced water 2*

Environmental issues and mitigation technologies, Plenum Press, New York, 275-288.

- Giuliani S., Ennas C., Pellegrini D., Kozinkova L., 2002. The bioassay with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: different end-points to be applied to different environmental studies. *Fresenius Environ Bulletin* 11, 10a, 806-809.
- Glenn N., 1997. Guidance for Conducting Mixing Zone Analyses. <http://www.ecy.wa.gov/biblio/97e12.html>
- Grant A. and Briggs D., 2002. Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: are metals or hydrocarbons responsible for ecological impacts. *Marine Environmental Research* 53, 95-116.
- Guzzella L., 1996. Saggio di tossicità acuta con *Artemia sp.* *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA- CNR*, ISSN, 0392-1425, 1-6.
- Guzzella L., 1997. Metodo per la determinazione di effetti tossici acuti con *Artemia*. *Biologia Ambientale* 1, 4-9.
- Henderson B., Grigson S.J.W., Johnson P., Roddie B.D., 1999. Potential impact of production chemical on the toxicity of produced water discharges from North Sea oil platforms. *Marine Pollution Bulletin* 38, 12, 1141-1151.
- Higashi R.M., Cherr G.N., Bergens C.A., Fan T.W.M., 1992. An approach to toxicant isolation from a produced water source in the Santa Barbara Channel. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 223-233.
- Hogan J.W. and Brauhn J.L., 1975. Abnormal rainbow trout fry from eggs containing high residues of PCB (Aroclor 1242). *Progressive Fish Culturist* 37, 229-230.
- Holdway D.A., 2002. The acute and chronic effects of wastes associated with offshore oil and gas production on temperature and tropical marine ecological processes. *Marine Pollution Bulletin* 44, 185-203.
- IARC International Agency for Research on Cancer, 1986. Butylated hydroxytoluene. 40:161. <http://ntp-server.niehs.nih.gov/>
- Inui H., Akutsu S., Itoh K., Matsuo M., Miyamoto J., 1979. Studies on the biodegradation of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol BHT in the

environment. Part IV: the fate of ¹⁴C-phenyl-BHT in aquatic model ecosystems. *Chemosphere* 6, 393-404.

- Jacobs R.P.W.M., Grant R.O.H., Kwant J., Marqueine J.M., Mentzer E., 1992. The Composition of Produced Water from Shell Operated Oil and Gas Production in the North Sea. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 13-21.
- Jobling S. and Sumpter J.P., 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 27, 361-372.
- Johnsen S., Smith A.Th., Brendehaug J., Riksheim H., Gjose a.L., 1994. Identification of sources of acute toxicity in produced water. *Conference on health, safety and environment in oil and gas exploration and production*. Paper 27138. SPE Int., Jakarta.
- Kagan V.E., Serbinova E.A., Packer. L., 1990. Generation and recycling of radicals from phenolic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280, 33-39.
- Karman C.C., Holthaus K.I.E., Tamis J.E., Smit MG.D., 2002. Background document for the OSPAR Workshop Setting performance standards for aromatic hydrocarbons in produced water. TNO-report, TNO-MEP - R 2002/634, pp. 47.
- Katz D.L. and Lee R.L., 1990. Natural gas engineering-production and storage. McGraw-Hill Publishing Company, New York, 617-626.
- Kingston, P. F. 1992. Impact of offshore oil production installations on the benthos of the North Sea. *ICES Journal of Marine Science* 49, 45-53.
- Kobayashi N., 1972. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Inland Sea of Japan the Seto-Naikai. *Public Seto Marine Biology Laboratory* 19, 359-81.
- Kobayashi N., 1977. Bioassay data for marine pollution using sea urchin eggs. *Public Seto Marine Biology Laboratory* 23, 427-33.
- Kobayashi N., 1984. Marine ecotoxicological testing with echinoderms In: Persoone G., Jaspers E., Claus C. Eds. *Ecotoxicological testing for the marine environment*, State Univ. Ghent and Inst. Mar. scient. Res. Bredene, Belgium, 341-405.

- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202-1211.
- Krause P.R., Osenberg C.W., Schmitt R.J., 1992. Effects of produced water on early life stages of a sea urchin: stage-specific responses and delayed expression. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 431-444.
- Krause P.R., 1993. Effects of produced water on reproduction and early life stages of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*): field and laboratory tests. Ph.D. Dissertation. University of California, Santa Barbara, pp.140.
- Krause P.R., 1994. Effects of Produced Water on Gametogenesis and Gamete Performance in the Purple Sea Urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 7, 1153-1161.
- Krause P.R., 1995. Spatial and temporal variability in receiving water toxicity near an oil effluent discharge site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29, 4, 523-529.
- Larsson P., Okla L., Collvin L., 1993. Reproductive status and lipid content as factors in PCB, DDT, and HCH contamination of a population of pike (*Exos lucius* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 855-861.
- Lee J.H.W., Cheung V., Wang W., Cheung S.K.B., 2001. Lagrangian modelling and visualization of rosette outfall plumes. <http://www.aoe-water.hku.hk/visjet/vjetiowa.pdf> .
- Linden O., 1976. Effects of oil on the reproduction of the amphipod *Gammarus oceanicus*. *Ambio* 5, 36-37.
- Louch D., Motlagh S., Pawliszyn J., 1992. Dynamics of Organic compound extraction from water using liquid coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry* 64, 10, 1187-1199.
- MacIntyre S. and Washburn L., 1995. Spatial scale of produced water impacts as indicated by plume dynamics. U.S. Department of Interior Minerals Management Service, Pacific OCS Study, MMS 96-0001, pp. 39.

- Marchetti R., 2000. *Ecologia applicata*. Città Studi, Milano.
- Mariani L., Manfra L., Maggi C., Savorelli F., Di Mento R., Cicero A.M., 2004. Produced formation waters: a preliminary study on chemical characterization and acute toxicity by using fish larvae *Dicentrarchus labrax* L., 1758. *Fresenius Environmental Bulletin* 13, 12, 1427-1432.
- Merck Index, 1989. Butylated hydroxytoluene. Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, pp. 238.
- Meyerhoff R.D., 1975. Acute toxicity of benzene, a component of crude oil, to juvenile striped bass (*Morone saxatilis*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 32, 1864-1866.
- Middleditch B.S., 1984. Ecological effects of produced water discharges from offshore oil and gas production platforms. Final report on API Project No 248, American Petroleum Institute, Washington, D.C.
- Mikami N., Gomi H., Miyamoto J., 1979. Studies on the degradation of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol BHT in the environment. *Chemosphere* 5, 305-310.
- Morrow J.E., Gritz R.L., Kirton M.P., 1975. Effects of some components of crude oil on young coho salmon. *Copeia*, 320-331.
- Mulino M.M. and Rayle M.F., 1992. Produced water radionuclides fate and effects. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 281-292.
- Nappi e Jacomini, 2004. Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici. RTI CTN_TES 1/2004, pp.160.
- Neff J.M., 1987. Biological effects drilling fluids, drill cuttings and produced waters. In: Boesch D.F. and Rabalais N.N. eds. *Long-term environmental effects of offshore oil and gas development*. Elsevier Applied Science, London, UK, 469-538.
- Neff J.M., Sauer T.C., Maciolek N., 1992. Composition, fate and effects of produced water discharges to nearshore marine waters In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 371-385.

- Neff J.M. and Sauer T.C., 1996. Aromatic hydrocarbons in produced water: bioaccumulation and trophic transfer in marine food webs, exposure of cod larvae *Gadhus Morhua* to phenols. In: Reed M. and Johnsen S. eds. *Produced water 2 Environmental issues and mitigation technologies*, Plenum Press, New York, 163-175.
- Neff J.M., 2002. Accumulation in Marine Organisms: effect of contaminants from oil well Produced Water. Elsevier Science, Oxford UK, pp. 452.
- OGP, 2005. Fate and effects of naturally occurring substances in produced water on the marine environment. International Association of Oil & Gas Producers Publication No. 364 February 2005, pp. 35.
- Oros D.R. and David. N., 2002. Identification and Evaluation of Unidentified Organic Contaminants in the San Francisco Estuary. RMP Technical Report: SFEI Contribution 45. San Francisco Estuary Institute, Oakland, CA.
- Osenberg C.W., Schmitt R.J. , Holbrook S.J. , Canestro D., 1992. Spatial scale of ecological effects associated with an open coast discharge of produced water. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 387-402.
- OSPARCOM, 1999. Guidelines for Monitoring the Environmental Impact of Offshore Oil and Gas Activities adopted at ASMO 2001. www.ospar.org/
- Pagano G., Esposito A., Bove P., De Angelis M., Rota A., Vamvakinos E. Giordano G.G., 1982. Arsenic-induced developmental defects and mitotic abnormalities in sea-urchin development. *Mutation Research* 104, 351-354.
- Pagano G., Cipollaro M., Corsale G., Esposito A., Ragucci E., Giordano G.G., Trieff N.M., 1986. The sea urchin: bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants. In: Cairns J.R. ed. *Community Toxicity testing Association for Standard Testing and Materials ASTM STP 920*. Philadelphia, PA, 67-92.
- Pagano G., Anselmi B., Dinnel P.A., Esposito A., Guida M., Iaccarino M., 1993. Effects on sea urchin fertilization and embryogenesis of water and

sediment from two rivers in Campania, Italy. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 25, 20-26.

- Pagano G., Meriç S., De Biase M., Iaccarino M., Petruzzelli D., Tünay M. and Warnau M., 2002a. Toxicity of bauxite manufacturing by-products in sea urchin embryos. *Ecotoxicology Environmental Safety* 51, 28-34.
- Pagano G., De Biase A., Doronin Y.K., Iaccarino M., Meriç S., Petruzzelli D., Tünay O., Warnau M. and Trieff NM. (2002b) Bauxite manufacturing residues from Gardanne (France) and Portovesme (Italy) exert different patterns of pollution and toxicity to sea urchin embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1272-1278.
- Pains G., 2001. "Petrolio e gas in Italia: la proposta delle imprese". - "Convegno Annuale Settore Idrocarburi e Geotermia", Assomineraria, Ischia 2001.
- Patin S.A., 1999. Environmental Impact of the Offshore Oil and Gas Industry. Eco Monitor Publishing, East Northport, New York. ISBN 0-967 1836-0-X. <http://www.offshore-environment.com/discharges.html>
- Payne J.R., Philips C.R., Hom W., 1987. Transport and transformations: water column processes. In: Boesch D.F. and Rabalais N.N. eds. *Long-term environmental effects of offshore oil and gas development*. Elsevier Applied Science, London, UK.
- Perin G., 2004. Dispense di Ecotossicologia del 27/03/2004.
- Persoone G., Goyvaerts M., Janssen C., De Coen W., Vangheluwe M., 1993. Cost-effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste dumps with the aid of toxkits. Commission of the European Communities. Final Report, Contract: ACE 89/BE 2/D3.
- Pinto B., Pellegrini D., Gabellini M., Ausili A., 1995. Harbour and coastal sediments chemistry and toxicology: a preliminary study in dredging activities. *Journal Aquatic Ecosystem Health* 4, 249-255.
- Rabalais N.N., McKee B.A., Reed D.L., Means J.C., 1992. Fate and effects of produced of produced water discharges in coastal Louisiana, Gulf of Mexico, USA. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 355-369.

- Raimondi P.T. and Schmitt R.J., 1992. Effects of produced water on settlement of larvae: Field tests using red abalone. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 415-430.
- Ratcliffe D.A., 1967. Decrease in egg shell weight in certain birds of prey. *Nature* 215, 208-210.
- Roberts Philip J.W., 1990. *Outfall design considerations*. In: Le Mehaute B. and Daniel M.H. eds. *Ocean Engineering Science: the Sea, 9 Part A.*, 661-689.
- Sancì A. e Rosa S., 1997. Rassegna dei principali test di ecotossicologia acquatica. ENEA RT/AMB/97/18, pp. 98.
- Sandulli R. and De Nicola M., 1991. Responses of meiobenthic communities along a gradient of sewage pollution. *Marine Pollution Bulletin* 22, 9, 463-467.
- Sauer T.C., Ward T.J., Brown J.S., O'Neil S., Wade M.J., 1992. Identification of toxicity in low-TDS produced waters. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 209-222.
- Schiff K.C., Reish D.J., Anderson J.W., Bay S.M., 1992. A comparative evaluation of produced water toxicity. In: Ray J.P. and Engelhart F.R. eds. *Produced Water Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum Press, New York, 199-208.
- Scotti, 2004. Dispersione di acque di produzione nel mar Adriatico. Tesi di Laurea in Oceanografia Costiera. Corso di laurea in Scienze Ambientali diversità degli Studi di Napoli Parthenope. Anno accademico 2003/2004, pp. 150.
- Smith J.P., Tyler A.O., Sabeur Z.A., 1998. Ecotoxicological assessment of produced waters in Indonesia. *Environmental Toxicology Water Quality* 13, 323-326.
- Smith Murray R., Gore D., Flynn S.A., Vance I., Stagg R., 1996. Development and appraisal of a particle tracking model for the dispersion of produced water discharged from an oil production platform in the North Sea. In: Reed M. and Johnsen S. eds. *Produced water 2 Environmental issues and mitigation technologies*, Plenum Press, New York, 225-245.

- Snell T.W. and Persoone G., 1989. Acute toxicity bioassay using rotifers: a test for the marine environment with *Brachionus plicatilis*. *Aquatic Toxicology* 14, 65-80.
- Sommerville H.J., Bennett D., Davenport J.N., Holt M.S., Lynes A., Mahieau A., McCourt B., Parker J.G., Stephenson R.R., Watkinson R.J., Wilkinson T.G., 1987. Environmental effect of produced water from North Sea oil operations. *Marine Pollution Bulletin* 16, 10, 549-558.
- Sorensen J.A., Gallagher J.R., Hawthorne S.B., Aulich T.R., 2000. JV Task 3 – gas industry groundwater research program. Final Report 2000-EERC-10-04 October 2000. Energy & Environmental Research Center University of North Dakota PO Box 9018 Grand Forks, ND 58202-9081, pp. 80.
- Soto A.M., Justicia H., Wray J.W., Sonnenschein C., 1991. p-nonylphenol an estrogenic xenobiotic released from «modified» polystyrene. *Environmental Health Perspective* 92, 167-173.
- Stagg R., Gore D.J., Whale G.F., Kirby M.F., Blackburn M., Bifield S., McIntosh A.D., Vance I., Flynn S.A., Foster A., 1995. Field evaluation of toxic effects and dispersion of produced water discharges from North Sea oil platforms. In: Reed M. and Johnsen S. eds. *Produced water 2 Environmental issues and mitigation technologies*, Plenum Press, New York, 81-100.
- Stephenson M.T., 1992. A survey of produced water studies. In: Reed M. and Johnsen S. eds. *Produced water 2 Environmental issues and mitigation technologies*, Plenum Press, New York, 1-11.
- Stromgren T., Sorstrom S.E., Schou L., Kaarstad I., Aunaas T., Brakstad O.G., Johansen O., 1995. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. *Marine Environmental Research* 40, 2, 147-169.
- Trabucco B., Cicero A.M., Gabellini M., Virno Lamberti C., Di Mento R., Bacci T., Moltedo G., Tommassetti P., Panfili M., Marusso V., Cornello M., 2006. Study of the soft bottom macrozoobenthic community around an offshore platform central Adriatic sea. *Biologia Marina Mediterranea* 13, 1, 659-662.

- Trieff N.M., 1980. Toxicity of heavy metals, oils and other organics on *Artemia*. In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E. eds. *The brine shrimp Artemia I: Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology*, Universal press, Wetteren, Belgium, pp. 345.
- Trieff N.M., Romaña L.A., Esposito A., Oral R., Quiniou F., Iaccarino M., Alcock N., Ramanujam V.M.S., Pagano G., 1995. Effluent from bauxite factory induces developmental and reproductive damage in sea urchins. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* 28, 173-177.
- Utvik T.I.R., 1999. Chemical characterization of produced water from four offshore oil production platforms in the North Sea. *Chemosphere* 39, 15, 2593-2606.
- Veil J.A., Puder M.G., Elcock D., Redweik R.J., 2004. A White Paper Describing Produced Water from Production of Crude Oil Natural Gas and Coa Bed Methane. U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory Under Contract W-31-109-Eng-38, pp. 87.
- Vik E.A., Bakke S., Johnson D.R., Wright N.H., 1993. Methods for Ranking Offshore Production Chemicals in Environmental Hazard Assessments. *1st SETAC World Congress*, Lisbon, Portugal, 28-31 March.
- Virno Lamberti C., Maggi C., Amici M., Ausili A., Di Mento R., Manfra L., Mannozi M., Mariani L., Moltedo G., Nonnis O., Onorati F., Persia E., Romanelli G., Russo S., Tornambè A., Trabucco B., 2006. Monitoraggio sperimentale integrativo per lo studio degli effetti potenziali a seguito dello sversamento in mare delle acque di strato da piattaforme off-shore. Relazione ICRAM anno di attività 2004, pp. 316.
- Volpi Ghirardini A., Arizzi Novelli A., Lilar B., Poiana G., Ghetti P.F., Marcomini A., 2001. Sperm cell toxicity test using sea urchin *Paracentrotus lividus* Lamark Echinodermata, Echinoidea: sensitivity and discriminatory ability towards anionic and non-ionic surfactants. *Environmental Toxicology Chemistry* 20, 644-651.
- Weyerhaeuser, 2005. Material Safety Data Sheet MSDS WC 379-01 Rev. 8/26/2005, 1-7.
- www.eni.it

Appendice

Teoria del modello UM3 (three-dimensional Update Merge)

I modelli utilizzati per descrivere la dinamica iniziale di un effluente (*near field*) possono essere suddivisi in empirici e teorici (*MacIntyre et al*, 1995; *Glenn*, 1997).

I modelli empirici, come ad esempio il CORMIX e l'RSB (o NRFIELD) (*Baumgartner et al*, 1994; *Glenn*, 1997; *Frick et al*, 2002), sono basati su esperimenti di laboratorio condotti in diverse condizioni (range sperimentali) e sfruttano le leggi dello scaling per determinare dei parametri adimensionali che caratterizzano l'effluente (*Roberts*, 1990; *MacIntyre et al*, 1995).

I modelli teorici, invece, come l'UM3, il DKHW e lo JETLAG (*Baumgartner et al*, 1994; *Frick et al*, 2002, 2003; *Lee et al*, 2001), risolvono le equazioni del moto e del trasporto di massa per determinare le caratteristiche della *plume* usando uno schema d'integrazione che avanza con incrementi discreti (di tempo o distanza) lungo la traiettoria della *plume* (*Glenn*, 1997). Possono essere Euleriani (sfruttano la distanza come variabile indipendente) o Lagrangiani (usano il tempo come variabile indipendente).

Viene qui presentato il modello *UM3*, acronimo di three-dimensional Update Merge, un modello utilizzato dall'U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) per simulare, la fase di mescolamento iniziale di effluenti scaricati da diffusori sottomarini ad una o più porte. L'*UM3* è un modello teorico Lagrangiano sviluppato inizialmente nel 1976 da Winiarski e Frick solo per applicazioni in atmosfera ed in acque dolci. Nel tempo, sono state apportate alcune modifiche rendendolo oggi molto potente ed affidabile per diffusori sottomarini formati da porte singole o multiple.

L'*UM3* è uno dei diversi modelli contenuti nel WISP (Windows Interface for Simulating Plumes) utilizzato dall'U.S. EPA. La caratteristica principale su cui si basa l'*UM3* è l'ipotesi di entrainment dell'area proiettata (ipotesi PAE, acronimo di Projected Area Entrainment) la quale quantifica l'entrainment forzato ossia il tasso con cui la massa del fluido ambientale viene incorporata dalla *plume* in presenza di corrente. In aggiunta all'ipotesi PAE, viene usata anche l'ipotesi tradizionale dell'entrainment di Taylor ovvero l'entrainment per aspirazione.

La *plume* viene considerato in stato stazionario il che, nella formulazione Lagrangiana, implica che gli elementi successivi seguono la stessa traiettoria (*Baumgartner et al*, 1994); si assume inoltre che non agiscano fattori come la biodegradazione, l'evaporazione e la sedimentazione né si considerano eventuali variazioni di velocità delle correnti marine o l'effetto delle maree. L'analisi, perciò, ha un carattere "conservativo" nel senso che tende a sovrastimare la concentrazione dell'acqua di produzione (PFW) ed a porsi come worst-case ovvero come una delle possibili "peggiori" situazioni che possono capitare quando le PFW sono scaricate in mare.

- L'elemento di *plume*

Il modello Lagrangiano focalizza l'attenzione su di un "elemento di *plume*" il quale viene seguito attentamente lungo la sua traiettoria con le leggi della fisica utilizzate in ogni intervallo di tempo (time step). La traiettoria è rappresentata dal percorso compiuto dal centro di massa dell'elemento; l'entrainment forzato e l'entrainment di Taylor determinano la crescita dell'elemento e giocano un ruolo chiave nella dinamica della *plume*. Solitamente, per stabilire la distribuzione della massa intorno alla traiettoria, viene usata la particolare assunzione di un elemento di *plume* circolare. Il boundary esterno dell'elemento di *plume* inizialmente coincide con il diametro della porta del diffusore, le superfici esterne, invece, hanno le stesse proprietà del fluido ambientale circostante. Le facce dell'elemento di *plume* sono perpendicolari alla traiettoria la quale può essere curvata dalle correnti e dalla buoyancy. Nelle regioni di forte curvatura della traiettoria, l'elemento si deforma in un cuneo. In alcuni casi, quando la traiettoria della *plume* ha un raggio di curvatura più piccolo del raggio dello stesso *plume*, le due facce dell'elemento possono intersecarsi portando ad una situazione fisicamente impossibile chiamata overlap (Fig. 1).

L'overlap è una condizione associata, in genere, ai *plume* altamente "galleggianti" poiché questi formano una forte curvatura verso l'alto appena fuoriescono dalla porta del diffusore ma anche alla presenza di forti correnti ambientali in prossimità dello scarico. La curvatura che si forma è a volte chiamata curva a gomito.

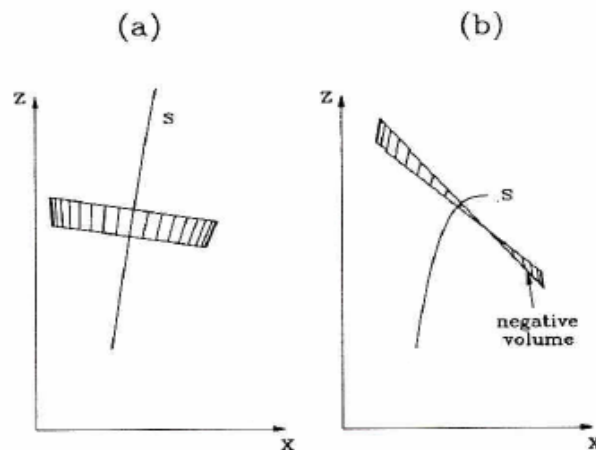


Fig. 1 a) L'elemento di plume in una regione di debole curvatura; b) forte curvatura che mostra l'overlap (Baumgartner et al, 1994).

- Il processo di Entrainment

L'entrainment è il processo per il quale la *plume* incorpora fluido ambientale in se stesso. Può essere concepito come un processo in cui il fluido ambientale entra nella parte interna della *plume* attraverso la superficie esterna oppure come un processo di accrescimento della stessa *plume*, seguito dalla redistribuzione del materiale. Nella diluizione iniziale sono considerati due tipi di meccanismi di entrainment: per aspirazione e forzato (Fig.2).

L'entrainment per aspirazione o di Taylor è causato dallo shear di velocità che si crea tra l'effluente ed il fluido ambientale ed è presente anche in assenza di correnti. Deriva dal fatto che regioni ad alta velocità sono regioni di relativa bassa pressione causando afflusso di materiale nella *plume*. La fuoriuscita dell'effluente, perciò, induce un campo di flusso nel fluido ambientale circostante.

L'entrainment forzato è invece determinato semplicemente dalla presenza di corrente che trasporta massa ambientale nella *plume*.

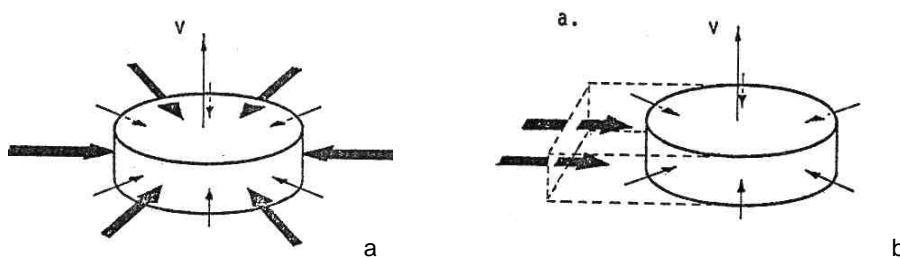


Fig.2 Esempio di: a) entrainment per aspirazione di un elemento cilindrico, b) entrainment forzato per un elemento cilindrico.

L'entrainment attraverso l'area proiettata della *plume* è descritto tramite tre termini:

1. Il termine cilindrico, proporzionale alla lunghezza ed al raggio dell'elemento.
2. Il termine di crescita del diametro della *plume*.
3. Il termine di curvatura della traiettoria della *plume*.

Questi contribuiscono all'entrainment forzato. Un quarto termine, comprendente l'intera area periferica dell'elemento, considera l'entrainment di aspirazione.

L'ipotesi di entrainment dell'area proiettata (PAE) stabilisce sostanzialmente che la parte "forzata" della massa aggiunta all'elemento di *plume*, in un certo intervallo di tempo, è uguale al flusso di massa totale attraverso la superficie dell'elemento. L'ipotesi dell'entrainment di Taylor, invece, considera solo il flusso di massa che penetra per aspirazione nell'elemento.

L'equazione completa dell'entrainment è data da (*Baumgartner et al.*, 1994):

$$\frac{dm}{dt} = -\rho_a A_p \cdot U + \rho_a A_T v_T \quad (I)$$

dove il primo termine a destra dell'equazione rappresenta l'entrainment forzato dell'ipotesi PAE mentre il secondo quello dell'entrainment di Taylor. I termini nell'equazione (I) rappresentano

- ρ_a la densità ambientale locale.
- dm la quantità di massa incrementale aggiunta per entrainment nell'incremento di tempo dt .
- A_p il vettore dell'area proiettata giacente nel piano verticale che contiene il vettore corrente e punta, in genere, controcorrente fuori dall'elemento.
- U il vettore velocità medio del flusso ambientale attraverso l'area proiettata A_p . A_p e U puntano in direzioni opposte di modo che il loro prodotto scalare è intrinsecamente negativo.
- A_T è l'area dell'elemento di *plume* in contatto con il fluido ambientale e avvolge completamente l'elemento.
- v_T è la velocità di aspirazione di Taylor ed è generalmente collegata alla velocità media della *plume*, $|V|$, attraverso un coefficiente di proporzionalità α il cui valore è scelto in genere pari a 0.1 (*Baumgartner et al.*, 1994).

Principi di conservazione utilizzati dall'UM3

L'UM3 include espressioni di conservazione della massa (continuità), del momento e dell'energia.

Il principio di conservazione della massa stabilisce che la massa iniziale dell'elemento e quella aggiunta nel tempo devono essere conservate. In altre parole, la massa dell'elemento, in un dato intervallo di tempo, viene incrementata di una quantità di materiale ambientale uguale a quella che fluisce al boundary esterno dell'elemento di *plume* (entrainment).

Il principio di conservazione del momento, invece, stabilisce che, per un elemento di *plume*, solo il momento orizzontale (il prodotto tra la massa dell'elemento e la velocità orizzontale) si conserva e viene incrementato, in ogni time step, dalla massa di fluido ambientale incorporata nella *plume* a causa dell'entrainment. Il momento verticale non si conserva perché viene modificato dalla buoyancy. L'equazione totale di conservazione del momento è data da:

$$\frac{dmV}{dt} = U \frac{dm}{dt} - m \frac{(\rho_a - \rho)}{\rho} \mathbf{g} \quad (\text{II})$$

dove $m = \rho \pi b^2 h$ è la massa dell'elemento di *plume*; ρ_a e ρ sono rispettivamente la densità ambientale e la densità media dell'elemento; \mathbf{g} è il vettore gravità.

L'equazione (II) stabilisce che la variazione della quantità di moto dell'elemento è determinata dalla quantità di moto introdotta a causa dell'aggiunta della massa dm per entrainment (primo termine a destra dell'equazione) e dalla variazione del momento verticale generato dalla spinta idrostatica (secondo termine a destra).

Per valutare il termine di buoyancy nell'equazione (II), si definisce anche l'equazione di conservazione dell'energia che, attraverso alcune semplificazioni (Baumgartner et al, 1994), viene considerata uguale a:

$$\frac{dmT}{dt} = T_a \frac{dm}{dt} \quad (\text{III})$$

in cui T è la temperatura media dell'elemento e T_a la temperatura ambientale.

L'equazione (III) fornisce il modo per stimare la temperatura media T dell'elemento che a sua volta viene usata nell'equazione di stato per ottenere la densità.

Come la temperatura, anche la salinità è assunta essere una proprietà conservativa ed è espressa da:

$$\frac{dmS}{dt} = S_a \frac{dm}{dt} \quad (IV)$$

dove S rappresenta la salinità media dell'elemento e S_a la salinità ambientale.

L'equazione del momento, infine, include il termine di gravità ridotta, $[g((\rho_a - \rho)/\rho)]$, il quale deve essere determinato. Le densità sono derivate da un'equazione di stato non lineare indipendente dalla pressione.

Infine, è presente un metodo in grado di variare il time step poiché le equazioni Lagrangiane della *plume* richiedono inizialmente intervalli piccoli che devono poi crescere in seguito.

La generale procedura di calcolo del modello è composta in questo modo:

1. Inizialmente il time step viene stabilito a partire dai dati d'ingresso.
2. Sono risolte le equazioni di entrainment per determinare la quantità di massa da aggiungere in questo time step.
3. Viene controllata la portata dell'entrainment e la curvatura della traiettoria per definire il nuovo time step.
4. Sono risolte le equazioni del moto e tutte le altre equazioni.
5. Si stabilisce il nuovo time step ed il ciclo si ripete.

In conclusione, in ogni time step vengono risolte le equazioni di conservazione della massa, momento ed energia mentre per determinare la crescita dell'elemento, l'*UM3* utilizza l'ipotesi PAE e l'entrainment per shear (o di Taylor).

- Proprietà della centerline

Alcuni modelli forniscono fattori di diluizione in termini della concentrazione della centerline, la diluizione minima della sezione trasversale della *plume* ad una data distanza dallo scarico. Man mano che il raggio della *plume* continua ad espandersi con l'aumentare della distanza, la diluizione minima progressivamente aumenta anch'essa. Altri modelli, invece, calcolano una diluizione media per la sezione trasversale della *plume* e naturalmente anch'essa aumenta a valle. La diluizione media però è sempre più grande della diluizione minima. Una diluizione media appropriata è definita "diluizione del flusso medio" ricavata

ponderando la distribuzione di concentrazione con la distribuzione della velocità lungo la sezione trasversale della *plume*.

Nell'*UM3* si assume una sezione trasversale uniforme ovvero una concentrazione media che è chiamata profilo a top hat (a cappello cilindrico). In tale situazione, si ragiona in termini di proprietà medie della *plume* e l'*UM3*, per ricavare lo stesso un valore approssimato della centerline dalla diluizione media, assume un profilo fittizio della sezione trasversale dell'elemento. Per determinare la concentrazione della centerline in funzione della concentrazione media (o diluizione) prevista dall'*UM3*, viene scelto un profilo molto simile ad una distribuzione Gaussiana ma d'estensione finita, detto profilo di potenza 3/2. Il valore della concentrazione media C_{med} ottenuto dall'*UM3* è dato da:

$$C_{med} = \frac{\int_A C v dA}{\int_A v dA} \quad (V)$$

in cui: C e v sono rispettivamente la concentrazione e la velocità istantanea; A è l'area della sezione trasversale dell'elemento; dA è l'area infinitesimale corrispondente.

Utilizzando la (V) ed il profilo di potenza 3/2, l'*UM3* determina la concentrazione della centerline in funzione della concentrazione media prevista (*Baumgartner et al*, 1994).

La concentrazione della centerline può essere importante per determinare il potenziale di tossicità acuta per gli organismi. In tutti gli altri casi è più appropriato utilizzare il valore medio.

- Dati di input del modello *near field*

Il modello tridimensionale *UM3* prevede come dati di ingresso una serie di parametri relativi sia al diffusore che all'ambiente.

I parametri del diffusore sono rappresentati dalla salinità, temperatura, la concentrazione e il flusso d'uscita dell'effluente. Inoltre bisogna specificare la posizione, la profondità e il diametro della porta del diffusore. L'inserimento nel modello della densità delle PFW sottoforma di temperatura e salinità seleziona un'equazione non lineare per il calcolo della variazione di densità causata dal mescolamento.

I parametri ambientali riguardano il campo di velocità (intensità e direzione delle correnti), la stratificazione della colonna d'acqua (temperatura e salinità) e la profondità del mare.

-Dati di output del modello *near field*

I principali parametri forniti dal modello UM3 sono:

- La sezione verticale della *plume* in funzione della distanza dalla porta del diffusore.
- L'evoluzione della centerline calcolata come funzione della concentrazione media dell'elemento di *plume* tramite il profilo di potenza $3/2$.
- La sezione della *plume* nel piano (rispetto alle coordinate N-S; E-W).
- La stratificazione della colonna d'acqua ricavata dai dati di input con l'indicazione della profondità a cui la *plume* è intrappolato.
- Il numero di Froude
- La variazione della diluizione media e della centerline in funzione della distanza dal punto di scarico.
- La concentrazione dell'effluente nel tempo e in funzione della distanza dal punto di scarico.
- Indicazione del livello di intrappolamento.

In molti modelli il processo di mescolamento iniziale della *plume* si considera terminato quando la *plume* incontra un boundary che può essere la superficie, il fondo marino oppure un livello di trappola. Tipicamente il primo *trap level* è utilizzato come un “punto di termine” per il processo di diluizione iniziale, questa interruzione è spesso applicata piuttosto arbitrariamente. I modelli come l'UM3 forniscono una buona stima della diluizione anche oltre questo punto. In molti casi, infatti, quando la *plume* raggiunge il primo livello di trappola possiede ancora una certa velocità verticale in grado di fargli oltrepassare tale livello. Se l'ambiente è stratificato la *plume* raggiungerà un secondo *trap level* tracciando un percorso ondoso come viene osservato qualche volta in natura. Il secondo livello di trappola varierà leggermente dal primo poiché l'entrainment continuerà a cambiare la densità media della *plume*.

Ringraziamenti

È doveroso ringraziare i ricercatori che mi hanno consentito di svolgere questo lavoro nell'ambito delle campagne oceanografiche e delle attività di ricerca dell'ICRAM.

Una parte della sperimentazione è stata possibile grazie alla collaborazione con istituti di ricerca quali le università degli studi di Urbino e di Napoli (*Parthenope*) e la Stazione Zoologica *A. Dohrn*; in particolare ringrazio il Prof. Maurizio Ribera d'Alcalà e la Prof.ssa Grazia Mazzocchi, per avermi dato la possibilità di svolgere parte delle analisi presso la Stazione Zoologica, il Dott. Alfonso Toscano ed il Dott. Davide Caramiello per la loro disponibilità presso il Settore "Allevamento organismi marini per la ricerca".

Ringrazio i miei *tutor* e coloro hanno gentilmente accettato di essere *referee*.

Ringrazio il Dott. Paul Krause per avermi fornito i suoi manoscritti e per la simpatia con cui ha voluto sempre rispondere alle mie e-mail in italiano.

Ringrazio la Dott.ssa Daniela Cianelli che ha lavorato al modello di dispersione delle acque di produzione; esprimo la gioia nell'aver lavorato con una persona di grande professionalità ma che soprattutto è per me una carissima amica.

Un pensiero di cuore va alla Dott.ssa Elena Di Nicola che ha lavorato con me, con entusiasmo, in una città ricca di energie positive come Napoli!

Un grazie sincero va alla Dott.ssa Chiara Maggi che in qualità di amica, oltre che di collega e *tutor*, mi è stata accanto sempre consigliandomi, capendomi ed aiutandomi a crescere umanamente e professionalmente.

Non posso dimenticare tutti gli amici che in questi tre anni mi hanno sostenuto nel lavoro o che, semplicemente, mi hanno saputo ascoltare: Tiziano, Benedetta, Ornella, Michela, Simone, Bianca, Andrea, Paolo, Cristian, Rita, Federica, Lisa, Marco e Lucrezia.

Grazie alla Prof.ssa ed amica Alessandra Accornero che mi ha indirizzato alla ricerca.

Un grazie speciale va alla mia famiglia per aver sempre sostenuto il mio impegno nella formazione e nel lavoro, anche nei momenti difficili in cui avrei voluto essere a loro più vicina.

Ringrazio con amore Fabio per la fiducia che ha sempre riposto in me, per il rispetto che ha sempre mostrato per le mie scelte e per il mio lavoro.

Un pensiero non può che andare anche a quella 'vocina' che è in me, che mi spinge sempre a guardare avanti conservando la volontà e la voglia di riuscire!