

Indice

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1. Descrizione del progetto di ricerca	6
1.1. Obiettivi della ricerca.....	6
1.2. Fasi del progetto.....	7
1.3. Stato dell'arte	8
1.3.1. Dati recenti sul grado di inquinamento del mare (con particolare attenzione all'ambiente costiero).....	9
1.3.2. Principali normative italiane ed europee per il contenimento dell'inquinamento delle acque.....	12
1.3.3. Tecnologie depurative in terra: gli impianti di depurazione.....	16
1.3.4. Tecnologie depurative in mare: le barriere biologiche.....	20
1.3.5. Principali organismi filtratori.....	22
1.3.5.1. Meccanismo di filtrazione delle Spugne.....	22
1.3.5.2. Meccanismo di filtrazione dei Policheti sedentari.....	22
1.3.5.3. Meccanismo di filtrazione dei Molluschi Bivalvi.....	23
1.3.6. Informazioni generali sulla biologia delle Ascidie (Tunicati).....	24
1.3.6.1. Le capacità filtratorie di <i>Ciona intestinalis</i>	28
1.3.6.2. Le capacità di accumulo di metalli pesanti in <i>Ciona</i> <i>intestinalis</i>	29
1.4. Pianificazione dell'attività sperimentale.....	32
1.4.1. Caratteristiche dei liquami utilizzati nelle prove sperimentali.....	32
1.4.1.1. Liquami civili naturali (provenienza e caratteristiche analitiche).....	33
1.4.1.2. Liquami artificiali di tipo domestico.....	40

1.4.1.3.	Liquami naturali depurati ed artificiali misti (componenti civili/industriali).....	41
1.4.2.	Acquisizione delle procedure analitiche necessarie per la caratterizzazione dei liquami (risultati di alcune prove preliminari).....	42
1.4.3.	Allevamento degli organismi-test in acquario.....	46
1.4.4.	Apparato sperimentale.....	48
1.4.5.	Procedura sperimentale.....	50
CAPITOLO 2. Risultati e discussione.....		53
2.1.	Esperimenti con liquami civili.....	54
2.1.1.	Esperimenti con liquame naturale pretrattato meccanicamente.....	54
2.1.2.	Esperimenti con liquame biologicamente depurato.....	60
2.1.3.	Esperimenti con liquame artificiale.....	66
2.2.	Esperimenti con liquami misti.....	70
2.2.1.	Esperimenti con liquami biologicamente depurati contenenti Cr(VI) in concentrazioni pari a circa 5 ppm.....	71
2.2.2.	Esperimenti con liquami biologicamente depurati contenenti Cr(VI) in concentrazioni pari a circa 10 ppm.....	77
2.2.3.	Esperimenti con liquami artificiali contenenti Cr(VI) in concentrazioni pari a circa 5 ppm.....	83
2.2.4.	Esperimenti con liquami artificiali contenenti Cr(VI) in concentrazioni pari a circa 10 ppm.....	88
2.3.	Sintesi e commento dei risultati.....	93

CAPITOLO 3. Impiego di Tunicati per il contenimento dell'inquinamento di acque marine costiere da by-products dei processi chimici di disinfezione dei liquami.....	97
CONCLUSIONI.....	103
Appendice A. Principali limiti di emissione per reflui civili, reflui industriali e sostanze pericolose.....	107
Appendice B. Risultati sperimentali relativi all'analisi granulometrica dei sedimenti contenuti nei liquami del Collettore Principale di Napoli e negli effluenti parzialmente (CHP) e completamente (CHS) depurati.....	116
Appendice C. Dati sperimentali relativi agli esperimenti condotti con liquami civili.....	117
Appendice D. Dati sperimentali relativi agli esperimenti condotti con liquami misti.....	124
Appendice E. Valori del peso secco delle colonie degli organismi-test impiegati negli esperimenti con liquami civili e misti.....	130
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	131

INTRODUZIONE

Gli impianti di depurazione realizzati in prossimità delle fonti di emissione degli inquinanti rappresentano la soluzione più utilizzata per prevenire o quanto meno contenere l'inquinamento dei bacini idrici recettori, tra i quali il mare; negli ultimi decenni, tuttavia, un settore in espansione è costituito dai sistemi di trattamento naturali, basati su processi di estrema semplicità innescati dalle comunità biologiche presenti nelle acque marine: le cosiddette “*barriere biologiche*”. Esse hanno il vantaggio di richiedere bassissimi costi di realizzazione, garantendo, al contempo, lo svolgersi dei medesimi processi che avvengono negli impianti di depurazione convenzionali: sedimentazione, filtrazione, adsorbimento, scambio ionico, precipitazione e degradazione biologica. Tali sistemi sono spesso realizzati sfruttando l'azione depurativa di organismi vegetali, in particolar modo di alcune macrofite acquatiche in grado di contribuire al disinquinamento delle aree da bonificare agendo sia su contaminanti organici (naturali e sintetici) che inorganici (composti azotati, fosforo e metalli pesanti). Altri sistemi naturali di depurazione sono invece basati sulla capacità di accumulo e/o di degradazione di alcune specie animali marine che, con opportuni mezzi di supporto, costituiscono dei veri e propri sistemi di depurazione immersi, in grado di migliorare la qualità di ambienti marini e di transizione.

Tra i sistemi biologici di quest'ultimo tipo finora sperimentati è da annoverare il *MUDS* (“*Marine Underwater Device System*”), impiegato per disinquinare aree contaminate da scarichi di condotte sottomarine (Cattaneo-Vietti et al., 2003). Tale sistema è costituito da una struttura in ferro, contenente mezzi di supporto idonei allo sviluppo di comunità microbiche e di organismi superiori, detritivori e filtratori. È stato dimostrato sperimentalmente che questo tipo di barriera biologica artificiale contribuisce notevolmente al disinquinamento di aree contaminate da scarichi; la validità dell'impiego di un sistema di questo tipo risulta ancor più rilevante se si considerano i suoi bassi costi di realizzazione.

Il settore della depurazione biologica basato sull'impiego di sistemi naturali presenta, allo stato attuale, una serie di limiti, dovuti fondamentalmente ai lunghi tempi di avviamento e alle basse velocità dei processi di disinquinamento. Le barriere biologiche, infatti, essendo utilizzate direttamente “in situ”, sono soggette a continue variazioni dei parametri chimici, fisici e biologici, tipiche negli ambienti naturali.

Pertanto, la capacità di controllo ed intervento su di esse risulta essere inevitabilmente scarsa. Ciò comporta una ridotta funzionalità di questi sistemi in alcuni periodi dell'anno (generalmente durante la stagione invernale), dovuta al fatto che microorganismi, organismi vegetali e animali marini si trovano in condizioni non idonee alla loro sopravvivenza o che, comunque, non permettono di espletare in maniera ottimale le funzioni vitali, e, di conseguenza, la capacità depurativa. In ogni caso, data la semplicità dei criteri di progettazione (seppur ancora empirici) richiesti, nonché la semplicità gestionale, le barriere biologiche potrebbero trovare una valida possibilità di impiego:

- in ambienti confinati, a basso idrodinamismo e con valori pressochè costanti dei parametri chimico-fisici dovuti allo scarso ricambio idrico (laghi, lagune salmastre, aree portuali);
- come mezzo per migliorare la qualità di siti contaminati da acque di scarico già parzialmente trattate (effluenti biologicamente depurati).

Nell'ottica dell'ottimizzazione delle rese depurative, è sentita l'esigenza di approfondire la conoscenza relativa agli organismi marini che possono contribuire al disinquinamento delle acque tramite bioaccumulo o biodegradazione. Per alcuni di essi sono già disponibili molte informazioni in letteratura: è ben nota, ad esempio, la capacità filtrante di molte specie di mitili; i poriferi, invece, sono stati a lungo studiati perché riescono a degradare alcune sostanze, come i tensioattivi, grazie anche all'aiuto delle comunità microbiche che vivono all'interno dei loro osculi.

CAPITOLO 1

Descrizione del progetto di ricerca

1.1. Obiettivi della ricerca

Il progetto di ricerca proposto consiste nel verificare eventuali capacità depurative e le risposte adattative di *Ciona intestinalis* (una delle specie più rappresentative della classe degli Ascidiacei) in acque contaminate da due diverse tipologie di inquinanti:

- liquami civili con diverse concentrazioni di contaminanti (liquami pretrattati meccanicamente, pretrattati ed ossidati per via biologica, preparati artificialmente);
- liquami misti (liquami ossidati biologicamente o preparati artificialmente contenenti sia componenti civili che industriali).

L'obiettivo principale è quello di verificare se ed in quali casi l'organismo-test è in grado di contribuire alla riduzione della concentrazione delle principali componenti inquinanti (disciolte e sospese) caratterizzanti i liquami, ed individuare, nel caso di reflui contenenti metalli pesanti, le dosi tollerabili dall'organismo stesso.

I liquami utilizzati per gli esperimenti provengono dall'Impianto di Depurazione di Cuma, progettato per il trattamento di scarichi civili di tipo urbano. Questi ultimi, ricchi di sostanza organica e di nutrienti inorganici, sono tra i principali responsabili dei fenomeni di eutrofizzazione, e, conseguentemente, di fenomeni anossici, particolarmente frequenti in acque poco profonde e con ridotto ricambio idrico.

La presenza di metalli, invece, è generalmente legata ad attività antropiche di tipo industriale, e può determinare la riduzione (in taluni casi la scomparsa) delle diverse componenti delle comunità acquatiche negli ambienti inquinati, che risulta tanto più evidente quanto maggiore è la concentrazione del/i contaminante/i.

Alcuni metalli non svolgono funzioni fisiologiche, per cui la loro concentrazione nell'organismo risulta proporzionale a quella presente in acqua, mentre altri, essendo biologicamente indispensabili, vengono "regolati" dagli organismi stessi, i quali ne assimilano le quantità ottimali per il loro funzionamento espellendone l'eccesso.

La scelta di *Ciona intestinalis* come organismo-test è legata sia ad esigenze pratiche, come la loro larga diffusione (anche in ambienti inquinati) e la facilità di raccolta (sono spesso presenti anche a pochi m di profondità), sia al fatto che le loro capacità

filtratorie rendono possibili i fenomeni di bioaccumulo, e, dunque, anche lo studio delle eventuali capacità disinquinanti. Gli esperimenti sono stati effettuati seguendo procedure standardizzate, eliminando in tal modo il rischio che i risultati ottenuti siano influenzati dalla variazione di alcuni parametri, come ad esempio la temperatura, e sono stati condotti solo su organismi adulti, per evitare che eventuali variazioni delle capacità filtranti e di accumulo siano dovute, oltre che alla concentrazione ed al tipo di inquinante, anche alla taglia degli organismi stessi.

L'originalità del progetto risiede, oltre che nello studiare la risposta degli organismi-test alla presenza nel loro habitat di liquami pretrattati e metalli pesanti, anche nell'individuare una possibilità di impiego di tali organismi in sistemi di trattamento naturali per il risanamento di siti contaminati da scarichi di impianti di depurazione.

1.2. Fasi del progetto

Il progetto di ricerca si articola in diverse parti, ognuna delle quali presenta specifici obiettivi:

Parte I
<i>Fasi del progetto:</i> <ol style="list-style-type: none">1. Analisi della letteratura scientifica2. Organizzazione dei dati raccolti3. Pianificazione degli esperimenti4. Messa a punto delle procedure di campionamento ed analisi5. Allestimento acquario per allevamento di ascidie
<i>Obiettivi:</i> <ol style="list-style-type: none">1. Approfondire la conoscenza sullo stato dell'arte relativo all'inquinamento del mare e alle biotecnologie depurative collegate ai programmi di risanamento e/o salvaguardia2. Focalizzare l'attenzione su una particolare idea e formulare una ipotesi3. Individuare le modalità, i materiali e la strumentazione4. Utilizzare procedure sufficientemente standardizzate5. Realizzare una appropriata riserva di organismi-test opportunamente adattati a condizioni ambientali standard.

Parte II

Fasi del progetto:

1. Conduzione degli esperimenti di laboratorio con gli organismi-test (Ascidie) in presenza di liquami civili di diverso tipo (pretrattati meccanicamente, artificiali, pretrattati ed ossidati per via biologica)
2. Conduzione degli esperimenti di laboratorio con gli organismi-test (Ascidie) in presenza di liquami misti (liquami artificiali od ossidati per via biologica contenenti cromo esavalente)

Obiettivi:

1. Valutare degli organismi-test:
 - a) le capacità filtratorie e depurative nei riguardi di liquami civili
 - b) le capacità filtratorie e depurative nei riguardi di liquami misti, nonché le capacità di accumulo e resistenza ai metalli pesanti

Parte III

Fasi del progetto:

1. Analisi dei risultati ottenuti dagli esperimenti di laboratorio
2. Proposta di sistemi di trattamento naturali basati sull'impiego degli organismi-test

Obiettivi:

1. Confrontare i risultati ottenuti con quelli attesi, con i dati pubblicati e con i convincimenti comuni
2. Studiare l'applicabilità della tecnologia proposta utilizzando informazioni provenienti dalle sperimentazioni di laboratorio.

1.3. Stato dell'arte

La conoscenza dello stato dell'arte relativo all'inquinamento del mare da metalli e da reflui urbani e alle biotecnologie depurative in fase di sperimentazione risulta un elemento fondamentale per programmare in maniera ottimale la fase sperimentale del progetto di ricerca.

L'indagine bibliografica svolta, corredata anche di ricerche in rete e colloqui con esperti, ha permesso di apprendere una serie di preziose informazioni riguardanti le barriere biologiche, la biologia, le capacità filtratorie e la tipologia degli alimenti delle ascidie, e la loro capacità di accumulo e resistenza ai metalli pesanti.

1.3.1. Dati recenti sul grado di inquinamento del mare (con particolare attenzione all'ambiente costiero)

La conoscenza delle cause e della modalità con cui si manifestano fenomeni di inquinamento marino–costiero risulta essere una premessa necessaria per questo progetto di ricerca, poiché le alterazioni generano frequentemente una risposta da parte di popolamenti e comunità, mettendo in evidenza la soglia di tolleranza delle singole specie, ed eventualmente, le loro capacità depurative.

L'inquinamento può manifestarsi secondo due diverse modalità:

■ *inquinamento acuto*: si svolge in spazi e tempi piuttosto ristretti, ed è provocato generalmente da incidenti, come sversamenti di petrolio o perdita di materiale radioattivo. Comporta effetti gravi, ma transitori, e spesso un intervento tempestivo può ripristinare rapidamente le condizioni naturali nell'ambiente contaminato;

■ *inquinamento cronico*: più ricorrente rispetto all'inquinamento acuto, è dovuto ad agenti costanti nel tempo che non determinano effetti immediati, ma che, a lungo andare, alterano il funzionamento dell'ecosistema. Per questo motivo risulta spesso difficile sia risalire alle reali cause della contaminazione, sia ripristinare la situazione originaria, perché quando gli effetti della contaminazione si manifestano, l'area è già seriamente compromessa.

La necessità di adottare adeguate politiche di controllo per la gestione delle aree marine, ed in particolare della fascia costiera, è legata alla sempre più crescente pressione antropica che spesso altera, talvolta in maniera irreversibile, i parametri chimici, fisici e biologici delle aree marine. L'inquinamento, infatti, è provocato raramente da fenomeni naturali (nel qual caso è dovuto a eruzioni vulcaniche, alluvioni o frane); generalmente, esso è dovuto all'*immissione* di numerosi scarichi di origine urbana o derivanti da attività produttive, o al *prelievo* di risorse, tramite attività come la pesca, e l'estrazione di minerali e di sabbie fluviali, che determinano, rispettivamente, alterazioni nei popolamenti marini e nei ritmi di sedimentazione (Della Croce et al., 2001).

La Tab. 1 riporta le concentrazioni medie, espresse in tonnellate, dei principali inquinanti immessi annualmente nel Mediterraneo:

Composti azotati	1 *10 ⁶	Zinco	25000
Idrocarburi	0,3–0,5*10 ⁶	Mercurio	130
Fosfati	0,3–0,4*10 ⁶	Piombo	3800
Pesticidi	90000	Cromo	2400
Detergenti	60000	Fenoli	12000
Sostanza organica	2,5 *10 ⁶	Rifiuti industriali	10*10 ⁶

Tab. 1. I principali inquinanti, espressi in tonnellate, mediamente versati ogni anno nelle acque mediterranee (Della Croce et al., 2001).

Gli scarichi prodotti dalle attività umane possono essere di tre diversi tipi: urbano, industriale ed agricolo (Tab. 2).

Tipologia dello scarico	Componenti
Urbano	residui alimentari e metabolici (urine e feci) residui di attività domestiche (sapone, detersivi, oli alimentari, pesticidi, frammenti cartacei ed alimentari, cere, terriccio) residui del dilavamento di strutture urbane (il dilavamento è determinato da eventi meteorici e da operazioni di pulizia delle strade ed irrigazione di parchi)
Industriale	Residui derivanti da: processi produttivi di merci lavaggio di prodotti e apparecchiature costituzione del corpo di alcune merci (es. cibi liquidi) raffreddamento (es. centrali elettriche) trasporto di merci
Agricolo	residui derivanti dalla produzione di vegetali (fertilizzanti, pesticidi, fitofarmaci) residui derivanti dall'attività zootecnica

Tab. 2. Schema riassuntivo delle componenti principali degli scarichi urbani, industriali ed agricoli.

Il degrado ambientale delle aree marine può provocare una serie di conseguenze di diverso tipo: effetti deossigenanti, effetti eutrofizzanti, variazioni di temperatura, variazioni della torbidità dovute ad alti contenuti di materiali in sospensione, danni alla salute degli organismi marini e dell'uomo stesso dovuti ad agenti patogeni o a sostanze tossiche. Tali effetti possono comportare – come già detto – delle modifiche alle comunità acquatiche, favorendo la sopravvivenza di specie che meglio si adattano alle condizioni di stress e la scomparsa di quelle che non riescono ad adattarsi a condizioni innaturali (Tab. 3).

Parametri	Ambienti oligotrofi	Ambienti eutrofi
Numero di specie di fito- e zooplancton	elevato	basso
Gruppi caratteristici	Diatomee, Cloroficee	Cloroficee, Cianobatteri
Produzione primaria	bassa	elevata
Frequenza di fioriture algali	rara	elevata
Distribuzione verticale della biomassa	ampia	ristretta alla superficie

Tab. 3. Modifiche subite dalla comunità in funzione del grado di trofia delle acque (Provini et al., 2003).

Lo scarico di reflui comporta spesso l'immissione in mare di sostanze chimiche inquinanti, le quali possono essere suddivise in due grandi categorie:

- *biodegradabili*: i loro effetti diminuiscono nel tempo e la tossicità è ridotta da fenomeni di diluizione;
- *persistenti e bioaccumulabili*: i loro effetti non diminuiscono né col tempo né con la diluizione.

Di queste ultime fanno parte anche i metalli pesanti (Tab. 4), che possono accumularsi in diverse forme nei sedimenti e nei tessuti di alcuni organismi marini.

I più esposti al rischio di contaminazione sono – oltre ai predatori – gli organismi filtratori (in particolar modo i filtratori non selettivi).

Metalli pesanti	Utilizzi	Fonti	Tossicità
Pb	Carburante (antidetonante), fabbricazione di accumulatori	Veicoli motorizzati, industria elettrica	Inibizione della crescita fitoplanctonica, anomalie nello sviluppo larvale dei pesci
Cd	Batterie, vernici, trattamento di superfici di acciaio, decorazione di porcellane, antisettici	Attività metallurgiche, incenerimento di rifiuti, gomme, smalti	Effetti sullo sviluppo larvale dei crostacei
Cu	Vernici antivegetative, trattamento del legno, prodotti fitosanitari, reti di distribuzione idrica	Zone portuali, agricoltura, industria elettrica e chimica	Azione sulla crescita del fitoplancton e sullo sviluppo embrionale dei bivalvi
Hg	Fabbricazione di prodotti clorurati, catalizzatori, pigmenti, fungicidi, pile	Inceneritori, combustione di carbone, industria chimica, agricoltura	Ritardo della crescita del plancton e dei bivalvi
Zn	Vernici antivegetative,	Erosione dei suoli,	Effetti sulla riproduzione delle

	prodotti farmaceutici e fitosanitari, pile, canali di evacuazione delle acque piovane	vegetazione e vulcanismo, metallurgia e chimica, zone portuali, agricoltura, combustione di legno e carbone, inceneritori	ostriche e sulla crescita dei bivalvi
Cr	Trattamento del legno, tecnologie di materiali refrattari	Industria chimica, metallurgia	Anomalie nello sviluppo larvale dei bivalvi
Ni	Combustibili fossili, produzione di metalli non ferrosi	Attività vulcanica, erosione eolica, metallurgia	Effetti sullo sviluppo embrionale degli invertebrati marini
As	Pesticidi, trattamento del legno, preparazioni fitosanitarie, industria del vetro	Suoli, combustione del carbone, agricoltura	Effetti sulla produzione primaria

Tab. 4. Esempi di diverse fonti ed effetti dei metalli pesanti.

Le capacità di concentrazione e accumulo dipendono da molti fattori, quali:

- tipo di metallo;
- tipo di organismo;
- condizioni fisiologiche dell'organismo;
- condizioni dell'ambiente circostante.

Tra gli organismi acquatici in grado di bioconcentrare i metalli pesanti bisogna annoverare ostriche e mitili, i quali possono incorporare livelli di cadmio e mercurio 100000 volte superiori alle concentrazioni di tali elementi nelle acque in cui vivono.

La contaminazione delle acque costiere, oltre a provocare seri danni alle popolazioni animali e vegetali e a far diminuire, nel corso del tempo, la resilienza delle comunità, comporta indirettamente una serie di danni all'uomo stesso, sia impedendo l'uso di queste aree a scopo ricreativo, sia aumentando i rischi di patologie e intossicazioni (basti pensare che alcuni degli organismi bioaccumulatori costituiscono per l'uomo una risorsa alimentare).

1.3.2. Principali normative italiane ed europee per il contenimento dell'inquinamento delle acque

Le sempre più frequenti situazioni di emergenza in campo ambientale hanno stimolato, nel corso degli anni, numerosi interventi legislativi sia a livello nazionale

che europeo, al fine di imporre dei limiti massimi di emissione per una serie di parametri rappresentativi del livello di contaminazione delle acque.

La normativa attualmente vigente in Italia è il *D.Lgs. 152/06* (“*Norme in materia ambientale*”), il cui aspetto innovativo consiste nell’introduzione di una caratterizzazione specifica dei corpi idrici superficiali, individuandone, per ciascuna tipologia, elementi biologici, idromorfologici ed inquinati specifici per classificarne lo stato di qualità ambientale (modifiche all’allegato 1 del *D.Lgs. 152/99*, sostituito dall’allegato 1 alla parte III del suddetto decreto). Tuttavia, in materia di acque, il decreto non presenta differenze sostanziali rispetto al precedente *Testo Unico sulle Acque* (*D.Lgs. 152/99*, integrato e sostituito dal più recente *D.Lgs. 258/00*). I limiti di emissione per reflui civili ed industriali ricadenti sia in acque superficiali che in pubblica fognatura restano inalterati. Il *D.Lgs. 152/99* recepisce due direttive comunitarie, una delle quali relativa al trattamento delle acque reflue urbane (*91/271/CEE*), l’altra concernente la protezione delle acque dall’inquinamento provocato da nitrati provenienti da fonti agricole (*91/676/CEE*). Rispetto alla legge precedentemente in vigore (la cosiddetta “*Legge Merli*”, *319/76*), il *D.Lgs. 152/99* ha il pregio di basarsi su *criteri di conformità* anziché su criteri assoluti, stabilendo, dunque, diversi limiti di emissione per gli scarichi in funzione delle caratteristiche del corpo idrico recettore e delle dimensioni dell’utenza. Esso inoltre ha introdotto una distinzione tra i parametri da considerare nel caso di acque reflue urbane e di acque provenienti da attività produttive, imponendo, per i reflui civili, limiti di emissione molto più restrittivi rispetto a quelli previsti dalla Legge Merli (Tab. 5).

	Limiti di emissione (mg/l)	
	Legge Merli	D. Lgs. 152/99; D. Lgs 152/06
BOD	40	25
COD	160	125
SST	80	35

Tab. 5. Confronto tra i limiti di emissione di BOD (biological oxygen demand), COD (chemical oxygen demand) e SST (solidi sospesi totali) imposti dalla Legge Merli e dai Decreti Legislativi 152/99 e 152/06.

Il Decreto 152/99 impone, quali parametri da monitorare per i reflui civili, BOD, COD e solidi sospesi totali; prevede inoltre, per i corpi idrici definiti “sensibili” (soggetti, cioè, al rischio di fenomeni di eutrofizzazione), il rispetto di limiti massimi di emissione anche per azoto e fosforo.

Per quanto riguarda il trattamento di acque provenienti da attività produttive, la normativa vigente ha apportato solo lievi modifiche alla Legge 319/76; per ogni parametro, sono previste concentrazioni massime diverse a seconda che le acque siano scaricate direttamente nel corpo idrico recettore o in pubblica fognatura.

In ambito europeo, particolare rilievo assume la *Decisione n° 2455/2001/CE* del Parlamento e del Consiglio, la quale modifica la precedente direttiva in materia di acque *2000/60/CE* ed istituisce un elenco di 33 sostanze pericolose prioritarie. Tale provvedimento legislativo ribadisce l’importanza di riportare la sostanze già presenti in natura a concentrazioni tipiche del fondo naturale, e le sostanze sintetiche antropogeniche a concentrazioni prossime allo zero.

Altro provvedimento di particolare rilevanza in materia di sostanze pericolose è il *D.M. 367/03*. Esso fissa, per la tutela delle acque interne superficiali e per quelle marino–costiere, degli standards di qualità, a cui le acque dovranno risultare conformi entro dicembre 2008, ed altri standards – più restrittivi – a cui le acque dovranno risultare conformi entro dicembre 2015. I limiti di emissione, più restrittivi per acque marine e lagunari che per acque dolci, sono stati fissati per una serie di sostanze considerate come pericolose, quali metalli, organo–metalli, idrocarburi policiclici aromatici, composti organici volatili, nitroaromatici, alofenoli, aniline e derivati, pesticidi, composti organici semivolatili e altri composti di diversa natura. Anche il D.Lgs. 152/06 prevede l’imposizione di limiti di emissione di sostanze pericolose presenti in corpi idrici superficiali; tuttavia, differentemente dal *D.M. 367/03*, non opera una distinzione tra acque dolci e salmastre, e stabilisce generalmente valori meno restrittivi della precedente legge (Tab. 6). I principali limiti di emissione per reflui civili, reflui industriali e sostanze pericolose sono indicati nell’Appendice A.

Elemento ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Limite temporale	367/03 Acque dolci	367/03 Lagune e acque marine	152/2006 Acque sup.
Arsenico	2008	5	1,6	10
	2015	2	1,4	
Cadmio	2008	1	0,2	1
	2015	0,1	0,03	
Cromo	2008	4	0,7	50
	2015	1,5	0,5	
Mercurio	2008	0,05	0,03	1
	2015	0,02	0,003	
Nichel	2008	3	1,5	20
	2015	1,3	0,6	
Piombo	2008	2	0,15	10
	2015	0,4	0,06	

Tab. 6. Confronto tra i limiti di emissione stabiliti per alcuni metalli pesanti dal D.M. 367/03 e dal D.Lgs. 152/06.

Il provvedimento più recente in ambito europeo – la *Direttiva 2006/7/CE* - riguarda la gestione della qualità delle acque di balneazione; essa può essere considerata un'integrazione della precedente direttiva 2000/60/CE, e stabilisce, nell'allegato 1, dei valori-guida per enterococchi intestinali ed *Escherichia coli* in acque interne, costiere e di transizione, al fine di classificare i corpi idrici in base al loro stato qualitativo.

La tabella successiva (Tab. 7) riassume il contenuto degli interventi legislativi citati precedentemente.

Denominazione	Data di emissione	Contenuti
<i>Direttiva 91/271/CEE del Consiglio</i>	21/05/1991	Trattamento delle acque reflue urbane
<i>Direttiva 91/676/CEE del Consiglio</i>	12/12/1991	Protezione delle acque dall'inquinamento provocato da nitrati provenienti da fonti agricole
<i>D.Lgs. 152/99</i>	11/05/1999	Tutela delle acque
<i>D.Lgs. 258/00</i>	18/08/2000	Tutela delle acque (aggiornamento del <i>D.Lgs. 152/99</i>)
<i>Direttiva 2000/60/CE del Parlamento e del Consiglio</i>	23/10/2000	Istituzione di un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque
<i>Decisione n° 2455/2001/CE del Parlamento e del Consiglio</i>	20/11/2001	Istituzione di un elenco di sostanze pericolose prioritarie (modifica della <i>Direttiva 2000/60/CE</i>)
<i>D.M. 367/03</i>	06/11/2003	Definizione di standards di qualità in ambiente acquatico per sostanze pericolose
<i>Direttiva 2007/7/CE</i>	15/02/2006	Gestione della qualità delle acque di balneazione
<i>D.Lgs. 152/06</i>	03/04/2006	Norme in materia ambientale Caratterizzazione specifica dei corpi idrici superficiali Conferma dei limiti di emissione per le acque stabiliti dal <i>D.Lgs. 152/99</i>

Tab. 7. Schema riassuntivo dei principali interventi legislativi in materia di tutela delle acque.

Nel corso degli anni, dunque, il susseguirsi dei provvedimenti normativi ha evidenziato la necessità di imporre misure di prevenzione più restrittive per combattere i sempre più frequenti casi di degrado ambientale. Ma essi testimoniano anche il crescere della consapevolezza che gli ambienti acquatici sono da considerare dei veri e propri beni e, come tali, nell'interesse della collettività, vanno costantemente tutelati.

1.3.3. Tecnologie depurative in terra: gli impianti di depurazione

Gli impianti di depurazione hanno come scopo il disinquinamento di acque di rifiuto attraverso l'azione di processi chimici o biologici. Per quanto riguarda i reflui civili, la depurazione per via chimica è effettuata tramite l'impiego di reagenti che favoriscono la sedimentazione del materiale in sospensione che costituisce il refluo, ed è generalmente sconsigliata per via degli elevati costi dei composti chimici da utilizzare e per l'elevata quantità di fanghi prodotti. La via biologica, adottata nella

stragrande maggioranza dei casi, sfrutta la capacità di una serie di microrganismi di degradare le sostanze organiche presenti nei liquami.

I processi biologici che si innescano negli impianti sono analoghi a quelli che si verificano in natura, con la differenza che:

- sono attuati in condizioni controllate;
- avvengono in volumi più contenuti rispetto ai vasti spazi tipici degli ambienti naturali;
- le concentrazioni di microrganismi adoperate nella fase biologica sono di norma più elevate rispetto a quelle che si ritrovano in natura.

Gli obiettivi primari degli impianti di depurazione (Fig. 1) consistono generalmente nella rimozione di una serie di sostanze di natura diversa: alcune forme di contaminanti definibili in termini di sostanza organica, solidi in forma sospesa e disciolta, azoto, fosforo, alcuni metalli, enterobatteri e virus (Vismara, 1982).

Prima di sottoporre i liquami ai processi depurativi veri e propri, sono previsti dei *pretrattamenti meccanici*, che hanno lo scopo di eliminare parti grossolane, oleose ed abrasive che potrebbero compromettere il corretto funzionamento delle fasi successive. I pretrattamenti che vengono generalmente effettuati sono i seguenti:

1) Grigliatura

Ha la funzione di eliminare corpi grossolani di ogni genere, che restano intrappolati in apposite griglie. Ogni griglia è costituita da un insieme di barre equispaziate; quando la distanza dell'interasse tra le barre è pari a 4–6 cm la griglia è detta grossolana, se lo spazio tra le barre non supera 1–2 cm, è definita fine. Spesso in un impianto si prevedono due griglie: una grossolana, che elimina i solidi più voluminosi, ed una fine, posta a valle della griglia grossolana, per eliminare corpi di diametro inferiore. Il prodotto di risulta, detto grigliato, contiene bassissime percentuali d'acqua, ed è pertanto smaltito alla stregua dei rifiuti solidi urbani.

2) Dissabbiaggio

Determina la rimozione di sabbie ed altre sostanze abrasive che potrebbero provocare danni a tubazioni e macchinari delle fasi successive, evitando fenomeni di erosione ed intasamento. I dispositivi utilizzati in questa fase sono detti dissabbiatori. Generalmente, si opera un dissabbiaggio aerato; in questo caso, l'aria immessa nel sistema determina moti della massa liquida che permettono la sedimentazione di solidi inerti, più pesanti, lasciando in sospensione il materiale organico che sarà poi

rimosso nella fase biologica. Inoltre un dissabbiatore aerato consente di effettuare anche operazioni di disoleatura, accorpendo dunque due processi in un'unica fase.

3) Disoleatura

E' finalizzata alla rimozione di sostanze grasse ed oleose. In genere si effettua raccogliendo tali sostanze, con l'aiuto di spatole superficiali, in una zona di calma di un dissabbiatore aerato. Oli e grassi sono poi smaltiti allo stesso modo dei rifiuti solidi, assieme al grigliato.

4) Sedimentazione primaria

E' una fase in cui i solidi sospesi sedimentabili si separano per gravità dall'acqua, depositandosi sul fondo e andando a costituire il fango. Affinché l'efficienza di rimozione di questi solidi sia elevata, è necessario:

- assicurare un tempo di detenzione sufficiente del liquame in vasca (generalmente 2–3 ore);
- che il carico idraulico superficiale (ossia il rapporto tra la portata di ricircolo del liquame e la superficie della vasca) non superi determinati valori–limite (per acque miste, non deve superare $2,50 \text{ m h}^{-1}$ se alla sedimentazione primaria sono ammessi fanghi leggeri, e 5 m h^{-1} in presenza esclusivamente di fanghi primari).

Le vasche di sedimentazione, di forma circolare o rettangolare, sono dotate di dispositivi di raschiamento meccanico del fondo, che convogliano il fango sedimentato in zone di raccolta dette tramogge.

La sedimentazione primaria, pur contribuendo poco all'abbattimento microbico e per nulla all'eliminazione di solidi sospesi e colloidali, fornisce un notevole contributo alla rimozione dei contaminanti, determinando:

- ◆ la riduzione di BOD e COD del 30% circa;
- ◆ la riduzione dei solidi sospesi sedimentabili del 90% circa;
- ◆ la riduzione dei solidi sospesi totali del 60% circa.

Dopo i pretrattamenti meccanici, è prevista una fase di **depurazione biologica**. Il sistema più efficace, e dunque più adoperato, è quello dei fanghi attivi, costituito da:

- una *vasca di aerazione* in cui si innescano i processi biologici;
- un *sedimentatore*.

Nel reattore biologico il liquame subisce una serie di processi degradativi dovuti all'azione microbica (soprattutto ad opera dei batteri) che vivono su solidi fioccosi

dalla consistenza di un fango molto liquido. In concomitanza ai processi di degradazione batterica, si verificano fenomeni di bioadsorbimento e bioflocculazione che comportano la rimozione anche di sostanze colloidali e disciolte.

Nella fase successiva, di sedimentazione, il liquame viene depurato dal fango attivo, che si deposita sul fondo. Esso viene in parte ricircolato nella vasca di aerazione (fango di ricircolo) per garantire il mantenimento di una consistente biomassa microbica nel reattore biologico, ed in parte allontanato dall'impianto (fango di supero), ed inviato allo smaltimento dopo aver subito un processo di digestione.

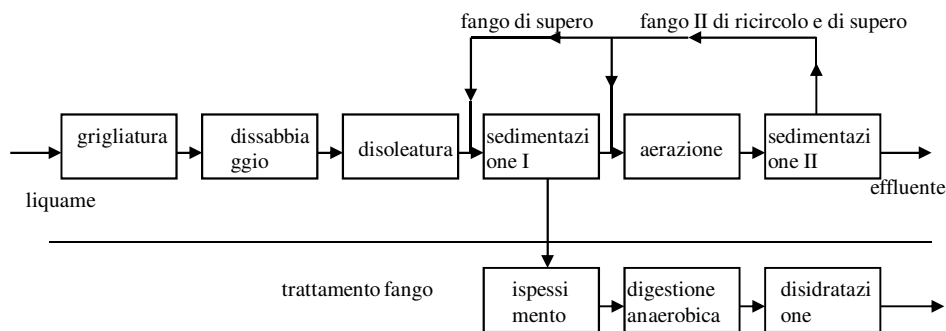


Fig. 1. Schema del processo depurativo a fanghi attivi.

I sistemi di aerazione impiegati negli impianti a fanghi attivi possono essere di due tipi:

- insufflazione di aria nel liquame a bolle fini ($d < 3$ mm), medie e grosse (fino a 25 mm di diametro);
- agitazione meccanica del liquame mediante turbine verticali o rotor orizzontali.

Le rese migliori per l'ossigenazione sono fornite da diffusori a bolle fini, poiché l'elevata superficie specifica, associata alle basse velocità ascensionali della massa

liquida, permette di ottimizzare gli scambi di ossigeno (Fiorillo, dispense del corso di “*Microbiologia delle acque reflue*”).

L’impianto di depurazione di Cuma, da cui provengono i liquami pretrattati che verranno utilizzati per gli esperimenti, è un tipico esempio di sistema a fanghi attivi.

La fase finale della depurazione di un refluo è costituita dalla **disinfezione**, un trattamento finalizzato all’eliminazione della carica microbica mediante l’impiego di opportuni reagenti chimici ad elevata azione battericida.

1.3.4. Tecnologie depurative in mare: le barriere biologiche

Con questo termine si indica ogni mezzo di depurazione naturale basato sull’impiego di organismi animali, vegetali e di comunità microbiche.

L’impiego di barriere biologiche in mare non è, attualmente, molto diffuso; esse costituiscono, infatti, dei sistemi ancora in fase di sperimentazione. Più diffuse risultano, invece, altri tipi di barriere, definite “artificiali”, sperimentate in Italia a partire dagli anni ’70 e aventi diverse finalità, tra cui le più comuni sono quelle di aumentare la produzione ittica ed impedire la pesca a strascico illegale. Generalmente, le barriere artificiali sono costituite da una serie di blocchi sovrapposti (da cui deriva anche la denominazione di “scogliere artificiali”), tra i quali i pesci, e, più in generale, i popolamenti acquatici, trovano protezione. Questo aspetto risulta molto vantaggioso soprattutto per l’aumentata sopravvivenza delle specie larvali e giovanili, che, naturalmente, comporta anche un aumento della biomassa dello stock ittico adulto (Della Croce et al., 2001). Alcune barriere artificiali hanno strutture particolari che risultano idonee anche per la molluschicoltura. Altre invece, denominate FAD (*Fish Aggregating Device*), vengono realizzate esclusivamente per incrementare la concentrazione di una determinata specie, in genere pelagica; per questo motivo non sono mai realizzate sottocosta.

Non è ancora chiaro se tali barriere favoriscano realmente l’aumento della biomassa nel luogo in cui sono poste, o se determinano soltanto la concentrazione in un determinato luogo di una biomassa già esistente. Restano comunque fuori discussione i vantaggi del loro impiego come aree protettive e come deterrente per la pesca a strascico sotto costa: anche il prelievo indiscriminato di risorse, infatti, può essere considerato una forma di inquinamento, e tali barriere potrebbero contribuire a contenere questo fenomeno.

Il principio su cui si basa una barriera biologica, invece, è quello di sfruttare la capacità di accumulo o di degradazione di contaminanti da parte di batteri o specie superiori, al fine di migliorare, con bassi costi di produzione e senza l'impiego di tecnologie specializzate, la qualità ambientale dei siti da bonificare. Mentre le barriere precedentemente menzionate possiedono il vantaggio di limitare il *prelievo* di risorse (specialmente stock ittici), le barriere biologiche hanno come scopo primario quello di migliorare la qualità delle acque in seguito all'*immissione* di inquinanti.

Come già detto in precedenza, uno dei sistemi più utili per il disinquinamento di aree contaminate è costituito dal MUDS (Cattaneo-Vietti et al., 2003), brevettato per la depurazione di zone soggette a scarichi inquinanti di condotte sottomarine (Fig.2). Oltre a protozoi e comunità microbentoniche, che vivono principalmente sui supporti sintetici in plastica di questa grande gabbia dallo scheletro di ferro, il MUDS ospita anche una ricca comunità di organismi detritivori e filtratori, tra cui anche alcune ascidie della specie *Phallusia mammillata*. Esso rappresenta, dunque, uno dei primi tentativi di utilizzare questi organismi come mezzo di depurazione.

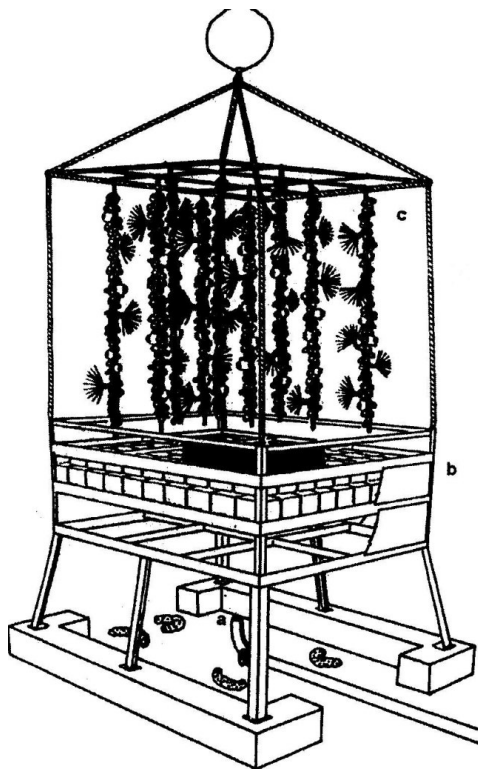


Fig. 2. Rappresentazione schematica del MUDS (Marine Underwater Device System): (a) condotta sottomarina; (b) filtro percolatore; (c) supporti per macro-comunità di filtratori marini.

Partendo da questi dati di letteratura, l'obiettivo che ci si propone consiste nel testare l'efficienza di questi animali sia verso reflui civili che verso altre forme di contaminazione, come quella da liquami misti contenenti metalli pesanti. In tal modo, sarebbe possibile effettuare previsioni sulla possibilità di utilizzare gli organismi-test in sistemi di trattamento naturali.

1.3.5. Principali organismi filtratori.

Oltre ai Tunicati, numerose altre specie si nutrono tramite filtrazione. La maggior parte di esse, analogamente alle ascidie, opera una filtrazione di tipo attivo, agevolando, tramite il movimento di cellule ciliate o flagellate, l'ingresso di un flusso d'acqua all'interno dell'organismo.

Qui di seguito sono descritti brevemente i meccanismi di alimentazione dei principali organismi filtratori.

1.3.5.1. Meccanismo di filtrazione delle Spugne.

Le Spugne sono animali sessili marini o d'acqua dolce, il cui corpo è interamente "attraversato" da un sistema di canali e camere che permette il passaggio del flusso d'acqua. Essa penetra attraverso i *pori*, aperture formate da cellule di forma anulare (*porociti*).

Le Spugne si nutrono principalmente di batteri e sostanze organiche sospese di minutissime dimensioni, che vengono separate dall'acqua grazie al movimento di alcune cellule flagellate (*coanociti*), dotate di un "collaretto" che circonda la base del flagello (Storer, 1982). L'ingestione delle particelle alimentari avviene sia lungo i canalicoli sia nei coanociti. L'acqua, depauperata delle fonti di cibo, fuoriesce attraverso l'*osculo*, un'apertura situata alla sommità del corpo dei Poriferi.

Grazie agli elevati tassi di filtrazione (circa 14 l h^{-1}) ed alla capacità di ritenzione di cellule batteriche (tra cui *Escherichia coli*), questi organismi potrebbero rivelarsi estremamente utili per la *bioremediation* di zone a rischio di contaminazione fecale (Milanese et al., 2003).

1.3.5.2. Meccanismo di filtrazione dei Policheti sedentari.

I Policheti sedentari costituiscono un gruppo di organismi dotati di scarsissima motilità. Molti di essi vivono all'interno di tubi protettivi, formati da materiale indurito secreto dall'animale stesso, o da materiale estraneo cementato (Dorit et al., 2001). I *Policheti Tubicoli* possiedono strutture cefaliche ciliate all'estremità superiore del tubo (*radioli*), che estroflettendosi, convogliano il particolato dalle

ciglia alla bocca dell'organismo. Alcuni Policheti (*Chaetopteridae*) sono in grado di intrappolare le particelle alimentari grazie ad un sacco mucoso, e di trasportarle attraverso un solco ciliato. Tale meccanismo presenta caratteristiche comuni alla filtrazione operata dai Tunicati (§ 1.3.6.1).

Oltre a piccoli invertebrati, fitoplancton e materiale detritale organico, che costituiscono fonti di nutrimento, i Policheti sono in grado di accumulare sostanze ed elementi pericolosi, tra i quali:

- contaminanti organici idrofobici (Ahrens et al., 2001);
- idrocarburi policiclici aromatici, tra cui benzo[α]pirene (Driscoll et al., 1996; Ferguson et al., 1998), fluoranthene e benzo[α]antracene (Ferguson et al., 1998).

1.3.5.3. Meccanismo di filtrazione dei Molluschi Bivalvi.

L'entrata della corrente d'acqua nei Bivalvi avviene attraverso una cavità del mantello, il *sifone inalante*, mentre le particelle alimentari sono trattenute sulle branchie (*ctenidi*), notevolmente più grandi che in altre classi di molluschi, e costituite da filamenti allungati ripiegati su se stessi per aumentare la superficie disponibile alla filtrazione (Storer, 1982). L'acqua viene espulsa attraverso una seconda cavità del mantello, il *sifone esalante* (in alcune specie possono esserci due sifoni esalanti).

Le principali fonti di nutrimento dei Bivalvi sono: fitoplancton, particelle organiche fini (che vengono convogliate alle ghiandole digestive dopo essere state separate da quelle più grossolane), e cellule batteriche. Anche in questi organismi, così come in alcuni Policheti e nelle Ascidie, le particelle alimentari sono trattenute in cordoni mucosi. Gli elevati tassi di filtrazione consentono ai mitili di bioaccumulare, in maniera più rapida di altri filtratori marini, numerosi contaminanti, tra i quali:

- metalli pesanti (Regoli e Orando, 1994; Wang e Fisher, 1996; Wang e Fisher, 1999);
- composti organostannici, organoclorurati, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili e pesticidi (Chase et al., 2001);
- cellule batteriche di origine fecale (De Donno et al., 2006).

In particolare, i mitili sono considerati ottimi bioindicatori per individuare fenomeni di contaminazione da metalli pesanti, organostannici, organoclorurati e IPA in ambiente costiero.

1.3.6. Informazioni generali sulla biologia delle Ascidie (Tunicati)

La specie *Ciona intestinalis* appartiene al phylum dei Cordati, ed in particolare al subphylum degli Urocordati (dal greco *urà* = coda), e fa parte della classe che comprende il maggior numero di specie: quella degli Ascidiacei, costituita esclusivamente da organismi marini sessili. Come in tutti gli Urocordati, in *Ciona* la notocorda (ossia la prima struttura di sostegno del corpo dei Cordati) è presente solo nella coda (parte basale) e durante gli stadi larvali (si parla, infatti, di *metamorfosi retrograda*: la corda dorsale, presente inizialmente nella larva, scompare nell'individuo adulto).

All'estremità superiore libera *Ciona* presenta un *sifone boccale* o *inalante*, che ha la duplice funzione di convogliare nel corpo dell'animale il cibo, per permettergli di alimentarsi, e l'ossigeno, per la respirazione. In posizione laterale si trova invece il *sifone esalante* o *cloacale*, che serve ad espellere i prodotti di rifiuto e le cellule sessuali.

Il corpo di *Ciona intestinalis* è avvolto da un rivestimento sacciforme detto *tunica*, costituita da cellulosa, sostanze azotate e vari composti inorganici; essa è considerata la caratteristica distintiva degli Urocordati (che, per questo motivo, sono anche noti come *Tunicati*).

Generalmente gli individui adulti hanno un'altezza di 6–8 cm, e in alcuni casi possono raggiungere i 12 cm; tuttavia, a causa del corpo estremamente contrattile, spesso risulta difficile determinare con precisione le dimensioni dell'animale.



Fig. 3. Gruppo di organismi della specie *Ciona intestinalis*.

Ciona è *ermafrodita*, e possiede ovari e testicoli separati. Ha un ciclo vitale annuale e si nutre essenzialmente di microalghe. Essa è probabilmente la specie più cosmopolita degli Ascidiacei, ed è in grado di tollerare ampi intervalli di salinità (*eurialina*). Individui di *Ciona* sono stati rinvenuti in acque a salinità variabile dal 12 al 41‰ (Dybern, 1967); l'intervallo di tolleranza può variare da popolazione a popolazione a seconda del livello di salinità dell'ambiente naturale in cui vivono (Tab. 8). Predilige substrati duri: si ritrova in abbondanza su rocce, gusci ed altre formazioni solide, ma può essere anche ritrovata su alghe ed in comunità del *fouling* (Cirino et al., 2002; www.mlb.edu/BiologicalBulletin/MMER/cirino/CirCon.html).

<i>Specie</i>	<i>Salinità (‰)</i>
<i>Clavelina lepadiformis</i>	14
<i>Ciona intestinalis</i>	12
<i>Corella parallelogramma</i>	18
<i>Ascidia callosa</i>	30
<i>Ascidia conchilega</i>	30
<i>Ascidia mentula</i>	20
<i>Ascidia virginea</i>	20
<i>Ascidiella aspersa</i>	18

<i>Specie</i>	<i>Salinità (‰)</i>
<i>Ascidia scabra</i>	18
<i>Dendrodoa grossularia</i>	20
<i>Styela rustica</i>	20
<i>Botrylloides leachi</i>	16
<i>Botryllus schlosseri</i>	23
<i>Boltenia echinada</i>	26
<i>Molgula citrina</i>	17
<i>Molgula manhattensis</i>	23

Tab. 8. Livelli minimi di salinità tollerabili dalle ascidie nelle piscine salmastre norvegesi (Dybern, 1969).

Questa specie possiede una serie di caratteristiche che la rendono un modello ideale per ricerche di tipo biologico: è abbastanza trasparente da permettere di osservare già ad occhio nudo numerosi particolari della sua anatomia interna, le modalità di alimentazione e la circolazione; ha inoltre un ciclo vitale piuttosto rapido ed un genoma piccolo e compatto, ideale per ricerche nel campo della biologia molecolare. Le ascidie si nutrono prevalentemente di particolato sospeso (fitoplancton, diatomee, radiolari, diverse specie batteriche) presente nelle correnti d'acqua convogliate nel corpo dell'organismo attraverso il sifone inalante. L'entrata di acqua e particolato è agevolata dal movimento di cellule ciliate presenti in posizione apicale e, molto probabilmente, da blande contrazioni muscolari (Millar, 1971). Il meccanismo di alimentazione si esplica attraverso i seguenti stadi:

- dal sifone inalante, la corrente d'acqua viene spinta verso la camera branchiale;
- le particelle sospese nella corrente d'acqua vengono intrappolate nell'endostilo, un solco ciliato posto lungo la parete medio-ventrale del sacco branchiale contenente cellule ciliate e cellule mucipare, deputate all'intrappolamento del particolato;
- racchiuso in un cordone mucoso prodotto dall'endostilo, il materiale particellare viene convogliato verso un corto esofago collegato allo stomaco, ed infine all'intestino, che termina con un ano situato alla base del sifone cloacale. Oltre che per l'azione delle ciglia, il cordone mucoso è in grado di muoversi anche grazie a movimenti muscolari: tale fenomeno è stato riscontrato anche nella regione dello sfintere, e permette l'espulsione di sostanze di rifiuto attraverso l'ano.

Non tutte le particelle presenti nella corrente d'acqua raggiungono la rete mucosa: quelle di maggiori dimensioni possono essere trattenute dalle ciglia presenti in prossimità del sifone boccale, altre, pur raggiungendo il sacco branchiale, possono non essere incorporate nella rete mucosa. In entrambi i casi, le particelle vengono espulse tramite il sifone inalante (MacGinitie, 1939). Sebbene esistano poche informazioni relative al meccanismo di "rigetto" di alcune cellule, sembra possibile che, nel passaggio dalla camera branchiale allo stomaco, esso avvenga in base alla *natura* delle particelle stesse. Mentre la filtrazione non selettiva permette sia il passaggio di materiale organico che di sostanze inorganiche, sembra che allo stomaco pervenga una concentrazione di materiale organico di gran lunga superiore a quella di sostanze inerti, e che tale selezione sia indipendente dalla taglia delle particelle (Millar, 1960).

Inoltre, per evitare danni agli organi di filtrazione dovuti alla presenza di elevate concentrazioni di materiale particellare nei filtri branchiali, le ascidie sono in grado di rallentare o interrompere la secrezione di muco operata dall'endostilo.

L'organo deputato alla respirazione è la *camera branchiale* (o *cestello branchiale*) costituita da un'ampia struttura reticolata, i cui vasi sanguigni circondano le fenditure branchiali costituendo il meccanismo respiratorio.

Il sistema circolatorio è costituito da un cuore tubulare privo di valvole posto in prossimità della base dell'animale, a cui si connettono due aorte che irrorano l'intero corpo dell'animale, mentre il sistema nervoso è formato da un unico ganglio cerebrale, posto tra i due sifoni, da cui si diparte una serie di nervi (Storer et al., 1982).

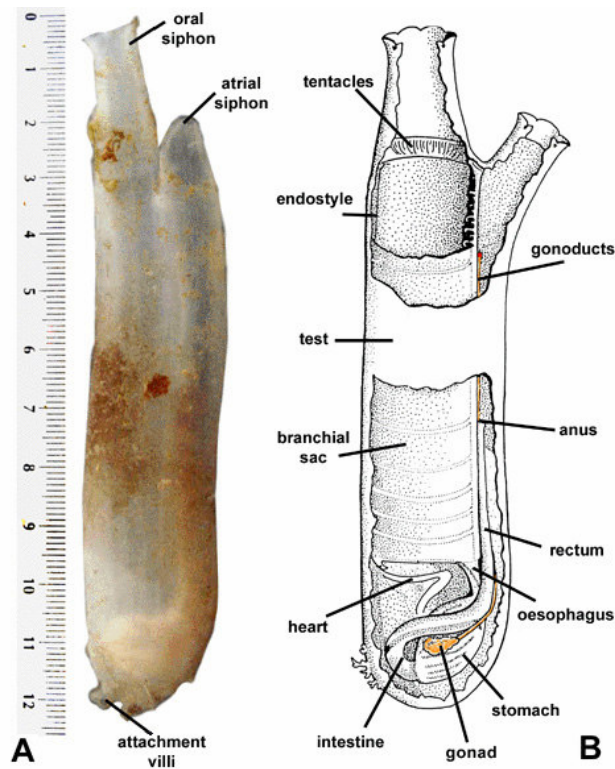


Fig. 4. *Ciona intestinalis*: rappresentazione dell'organismo (A) e di una sua sezione longitudinale (B).

1.3.6.1. Le capacità filtratorie di *Ciona intestinalis*

Ciona intestinalis è un filtratore non selettivo, incapace di discriminare il particolato organico da quello inorganico. Studi precedenti (Jørgensen e Goldberg, 1953) hanno dimostrato che *Ciona intestinalis* riesce a trattenere facilmente particelle con diametro di 1-2 μm , e mostra notevoli efficienze di ritenzione anche verso particelle di dimensioni leggermente maggiori (4-5 μm di diametro, Jørgensen, 1949). La presenza di eccessive concentrazioni di materiale particellato inorganico, che non costituisce fonte di cibo per l'animale, potrebbe far insorgere problemi di intasamento dei filtri branchiali e, conseguentemente, far diminuire il tasso di filtrazione, che rappresenta la velocità per unità di tempo con cui l'acqua di mare passa attraverso il corpo dell'animale, e viene contemporaneamente ripulita delle particelle in sospensione, trattenute nel filtro branchiale. Studi effettuati in passato, condotti mantenendo gli organismi-test alla temperatura di 15°C, hanno fornito i seguenti valori dei tassi di filtrazione: variazioni tra 0,802 e 1,104 l h^{-1} (valore medio = 0,953 l h^{-1}) secondo Fiala-Médioni (1978), e valori dell'ordine di 0,7 l h^{-1} secondo Robbins (1983). I valori trovati dai due autori sono piuttosto simili, e forniscono l'indicazione che *Ciona*, nelle condizioni sperimentali adottate, è in grado di filtrare poco meno di un litro per ora.

Alcuni esperimenti condotti in passato con cellule algali di *Rhodomonas* hanno dimostrato che il meccanismo filtratorio di alimentazione è condizionato sia dalla concentrazione delle particelle sia dalla temperatura (Robbins, 1983; Robbins, 1984; Petersen e Riisgård, 1992). E' stato osservato, infatti, che il tasso di filtrazione diminuisce all'aumentare della concentrazione del particolato presente in acqua (Tab. 9).

	concentrazione algale (cells/ml)	tasso max di filtrazione (ml/min*ind)
ascidie di piccola taglia	10000	5,65
	15000	5,13
	20000	4,77
ascidie di taglia maggiore	10000	34,06
	15000	31,35
	20000	28,19

Tab. 9. Capacità filtratorie di *Ciona intestinalis* a diverse concentrazioni algali (Petersen e Riisgård, 1992).

Tale fenomeno potrebbe essere interpretato come un meccanismo di difesa per l'apparato digerente, evitandone l'intasamento. Inoltre, il tasso di filtrazione varia linearmente con la temperatura tra i 4°C ed i 21°C, e subisce una drastica diminuzione a temperature superiori. La ragione di questo fenomeno non è chiara; alcuni studi effettuati in passato su molluschi (Jørgensen et al., 1990) e policheti (Riisgård e Ivarasson, 1990) hanno permesso di ipotizzare che l'effetto provocato dalla temperatura sulla variazione delle capacità filtratorie sia da attribuire principalmente alla variazione della viscosità dell'acqua di mare. Tuttavia, esso potrebbe essere anche correlato ad un incremento delle attività delle cellule ciliate dell'organismo, deputate a convogliare acqua e particolato nel corpo dell'animale attraverso il sifone inalante (Jørgensen et al., 1984).

Ovviamente anche le dimensioni degli organismi influenzano tale parametro (Tab. 7): i tassi di filtrazione e di ingestione risultano maggiori per gli animali più grandi, e minori per quelli più piccoli; esperimenti condotti da Petersen e Riisgård (1992) hanno provato che ascidie di piccola taglia, con capacità ridotte dello stomaco, riducevano il loro tasso di filtrazione in presenza di concentrazioni di microalghe pari a $15 \cdot 10^3$ cellule ml^{-1} , mentre ascidie di taglia maggiore mostravano una diminuzione della filtrazione solo quando tali concentrazioni raggiungevano valori di $2 \cdot 10^4$ cellule ml^{-1} . Per questo motivo, nel corso degli esperimenti sono stati scelti animali di taglie non troppo diverse per evitare che l'accumulo dei contaminanti sia influenzato dalla taglia degli organismi adoperati.

E' importante, inoltre, evitare qualsiasi tipo di disturbo meccanico agli organismi-test, che potrebbe provocare la chiusura dei sifoni e, dunque, interruzioni al meccanismo di filtraggio dell'acqua.

1.3.6.2. Le capacità di accumulo di metalli pesanti in *Ciona intestinalis*

La maggior parte degli studi effettuati in passato sull'accumulo di metalli in *Ciona intestinalis* è stata finalizzata ad individuare quali siano i siti di accumulo preferenziali nel corpo dell'organismo, e l'eventuale presenza di meccanismi di regolazione delle concentrazioni di tali contaminanti.

La parte preponderante delle informazioni reperite in letteratura è costituita da articoli riguardanti accumulo e distribuzione di vanadio, ferro e manganese. In particolare, il vanadio, che svolge nei Tunicati un ruolo biologico importante, influenzando alcune attività enzimatiche, e fungendo probabilmente da inibitore della pompa sodio-potassio (Fiorillo e Libonati, 1984), risulta essere l'elemento che *Ciona*

intestinalis riesce ad accumulare in concentrazioni maggiori (Danskin, 1978). I valori più alti di vanadio sono stati riscontrati nelle cellule del sangue dell'organismo-test, dove la concentrazione è risultata pari a $1577,1 \pm 338,2 \text{ ng mg}^{-1}$ di peso secco (Michibata, 1984).

E' stato inoltre provato che *Ciona intestinalis* ha la capacità di bioaccumulare altri metalli, come cromo, zinco e ferro, in concentrazioni variabili tra poche ppm e centinaia di ppm (Tab. 10, 11, 12; Papadopoulou e Kanias, 1977).

Campione	Se	Cr	Ag	Cs	Sc	Rb	Fe	Zn	Co	Sb
Corpo	1.2	5.5	0.021	0.071	0.15	2.6	880	100	0.52	0.16
Tunica	1.0	1.9	0.011	0.021	0.041	3.7	610	110	0.44	0.15
Resto del corpo	2.7	6.1	0.067	0.33	0.52	7.0	3000	180	1.4	0.40

Tab. 10. Concentrazioni di metalli (esprese in ppm/peso secco) riscontrati in alcuni campioni di *Ciona intestinalis* (Papadopoulou e Kanias, 1977).

Campione	Se	Cr	Ag	Cs	Sc	Rb	Fe	Zn	Co	Sb
Corpo	0.051	0.24	0.00090	0.0031	0.0065	0.11	39	4.4	0.022	0.0070
Tunica	0.040	0.075	0.00040	0.00080	0.0016	0.14	24	4.2	0.017	0.0050
Resto del corpo	0.11	0.25	0.0027	0.013	0.021	0.29	120	7.6	0.050	0.016

Tab. 11. Concentrazioni di metalli (esprese in ppm/peso umido) riscontrati in alcuni campioni di *Ciona intestinalis* (Papadopoulou e Kanias, 1977).

Se	Cr	Ag	Cs	Sc	Rb	Fe	Zn	Co	Sb
10	<10	<10	<10	-	<10	120	30	40	<10

Tab. 12. Fattori di concentrazione dei metalli riscontrati in *Ciona intestinalis* (Papadopoulou e Kanias, 1977).

Non si riscontrano in letteratura sufficienti dati relativi alla resistenza delle ascidie nei confronti di concentrazioni crescenti dei metalli pesanti.

Nella Tab. 13 sono riportati i punti salienti dell'indagine bibliografica condotta.

Argomento della ricerca	Breve descrizione
Interventi legislativi in materia di tutela delle acque	Direttiva 91/271/CE Direttiva 91/676/CE D.Lgs. 152/99 D.Lgs. 258/00 Direttiva 2000/60/CE Decisione n° 2455/2001/CE D.M. 367/03 Direttiva 2006/7/CE D.Lgs. 152/06
Tecnologie depurative in terra: gli impianti di depurazione	Hanno come finalità il disinquinamento delle acque di rifiuto tramite processi chimici (più rari) e biologici (più frequenti). Sono costituiti da una serie di fasi: grigliatura: eliminazione dei solidi grossolani dissabbiaggio: eliminazione dei solidi inerti disoleatura: eliminazione di oli e grassi sedimentazione primaria: rimozione per gravità di solidi sospesi sedimentabili. fase chimica o biologica; generalmente si realizza una fase biologica basata su processi a fanghi attivi, costituita da: <ul style="list-style-type: none"> ● una vasca di aerazione: processi di degradazione batterica ● un sedimentatore: sedimentazione secondaria dalla quale si produce un fango.
Tecnologie depurative in mare: le barriere biologiche	Le barriere biologiche sono sistemi di trattamento delle acque innovativi, attualmente ancora in fase di sperimentazione. Esse sfruttano la capacità posseduta da alcuni organismi vegetali o animali di accumulare o degradare contaminanti, ed hanno il vantaggio di richiedere esigui costi di realizzazione, pur garantendo lo svolgimento dei medesimi processi che si innescano nei sistemi di depurazione convenzionali.
Principali organismi filtratori	Oltre ai Tunicati, altri organismi marini, come Spugne, alcuni Policheti e Molluschi Bivalvi si alimentano per filtrazione. Essi sono in grado di contribuire anche alla riduzione della concentrazione di contaminanti in mare.
Informazioni generali sugli organismi-test	<i>Ciona intestinalis</i> è un organismo costituito da: <ul style="list-style-type: none"> un sifone inalante (alimentazione, ossigenazione); un sifone esalante (escrezione, espulsione di gameti); una camera branchiale a struttura reticolare; un cuore tubulare privo di valvole; un ganglio cerebrale; una tunica (caratteristica distintiva degli Urocordati o Tunicati). E' ermafrodita, eurialina, il suo ciclo vitale è annuale, e la lunghezza massima di un individuo adulto è di circa 12 cm.
Capacità filtratorie dell' organismo - test	A 15°C, i tassi di filtrazione sono compresi tra 0.7 e 0.9 l/h circa (Fiala-Médioni, 1978; Robbins, 1983). Il tasso di filtrazione inoltre dipende da: <ul style="list-style-type: none"> temperatura; concentrazione di particolato; taglia dell'organismo
Capacità di accumulo di metalli nell'organismo-test	<i>Ciona intestinalis</i> accumula in concentrazioni elevate vanadio, che ricopre un ampio ruolo biologico nei suoi processi vitali; esso tende ad accumularsi soprattutto nelle cellule del sangue raggiungendo concentrazioni di circa 1500 ng/mg peso secco (Michibata, 1984). L'ascidia bioaccumula anche altri metalli in concentrazioni inferiori (da poche ppm a centinaia di ppm), tra cui cromo, zinco e ferro.

Tab. 13. Schema riassuntivo dei principali risultati della ricerca bibliografica.

1.4. Pianificazione dell'attività sperimentale

L'obiettivo principale del progetto di ricerca è stato quello di testare le capacità di affinamento delle ascidie nei confronti di diverse tipologie di liquame.

La prima parte delle attività di ricerca ha avuto come obiettivi principali:

- 1) l'acquisizione teorica e pratica delle procedure analitiche necessarie per valutare i principali parametri chimico-fisici e microbiologici dei liquami testati: pH, COD totale e solubile, nitriti, nitrati, azoto ammoniacale, fosfati, tossicità, *Escherichia coli*, ossigeno disciolto, solidi sospesi totali, cromo esavalente;
- 2) l'allestimento dell'allevamento degli organismi-test, mantenuti a temperatura, salinità, pH, tenore di ossigeno standardizzati;
- 3) la pianificazione degli esperimenti.

1.4.1. Caratteristiche dei liquami utilizzati nelle prove sperimentali

Le capacità depurative delle ascidie sono state testate con diverse tipologie di liquami:

- liquame grezzo naturale prelevato a valle dei pretrattamenti meccanici dell'Impianto di depurazione di Cuma (comprensorio di Napoli-Ovest);
- liquame naturale depurato sottoposto, oltre che ai pretrattamenti meccanici, anche al trattamento di ossidazione biologica mediante fanghi attivi e prelevato nel canale effluente dell'Impianto di Cuma, a monte della fase di disinfezione con cloro;
- liquame artificiale o sintetico con inoculo di microorganismi;
- liquame biologicamente depurato contenente due diverse concentrazioni cromo esavalente (5, 10 ppm);
- liquame artificiale con inoculo di microorganismi contenente due diverse concentrazioni (5, 10 ppm) di cromo esavalente.

L'impiego di diverse tipologie di liquame ha avuto come scopo quello di comprendere se e quanto tali organismi sono in grado di contribuire al disinquinamento delle acque marine e quali contaminanti sono ridotti di concentrazione con maggiore facilità e, viceversa, quali componenti dei liquami possono risultare inibenti per il corretto funzionamento dell'apparato di filtrazione e degli altri organi vitali.

1.4.1.1. Liquami civili naturali (provenienza e caratteristiche analitiche)

▣ Caratteristiche generali

Il liquame domestico presenta, a differenza della maggior parte dei reflui industriali, una composizione pressoché costante di sostanza organica e nutrienti.

Circa il 70–80% dei solidi sospesi totali presenti nei liquami civili è di natura organica.

Le figure riportate qui di seguito (Fig. 5, 6) mostrano la tipologia delle particelle solide presenti nel liquame, classificate in base alla sedimentabilità e alla dimensione.

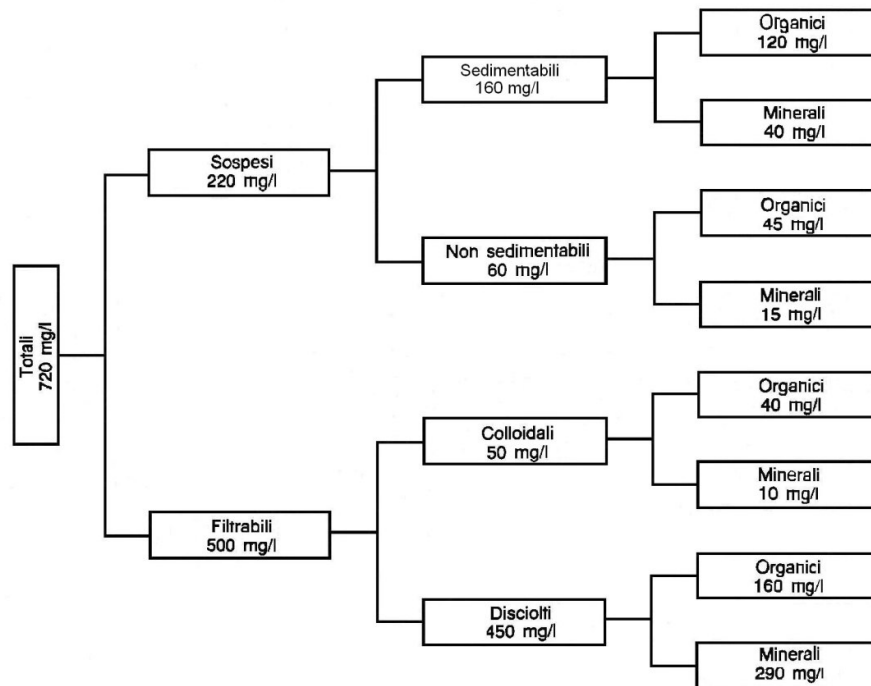


Fig. 5. Classificazione dei vari tipi di solidi presenti nei liquami civili (Masotti, 1987).

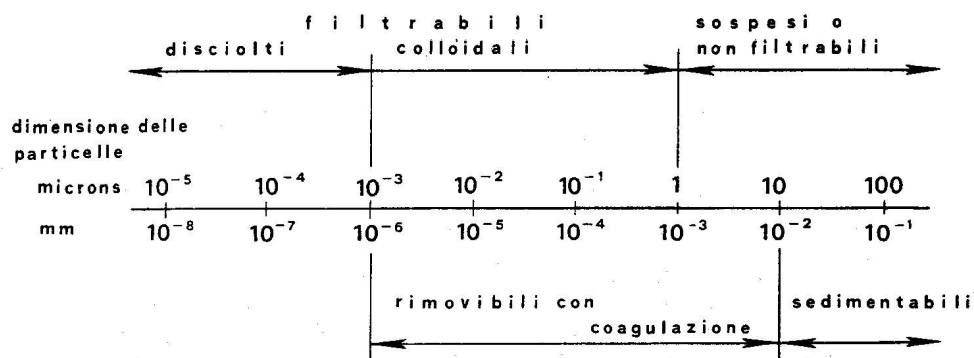


Fig. 6. Classificazione dei solidi presenti nei liquami, con riferimento al campo di variazione delle dimensioni delle particelle (Masotti, 1987).

I reflui urbani contengono anche un'elevata carica microbica ($UFC \cdot 10^9/100$ ml di coliformi totali; Vismara, 1982), dovuta alla presenza di numerosi batteri, funghi, alghe e protozoi. La concentrazione dei microrganismi patogeni, spesso causa delle malattie endemiche locali, viene ridotta notevolmente durante i processi depurativi.

Tra le varie classi di microbi, la componente predominante è costituita dai batteri, ed, in particolare, dai batteri di origine fecale (coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali). Per questo motivo la normativa impone, come indice di inquinamento microbiologico, il calcolo della concentrazione di *Escherichia coli* (D.lgs. 152/99; D.lgs. 125/06), specie che rappresenta il 90% circa dei coliformi fecali. Non a caso, l'indice colimetrico è stato utilizzato anche in questa sperimentazione, valutandone la percentuale di abbattimento dovuta alla depurazione effettuata dagli organismi-test.

■ Provenienza dei liquami grezzi

Il liquame naturale grezzo adoperato durante l'attività sperimentale proviene dall'Impianto di Cuma, e viene analizzato quotidianamente dall'unità operativa del laboratorio di analisi interno all'Impianto stesso; il programma di controllo prevede la caratterizzazione dei reflui mediante analisi chimico-fisiche e microbiologiche per valutare l'andamento della depurazione, l'abbattimento delle sostanze inquinanti e verificare che i valori dei parametri analitici selezionati non superino nell'effluente i limiti previsti dalla normativa vigente (Fiorillo e Bosone, 2002a).

Nella Fig. 7 è illustrata una sintesi schematica del programma di campionamenti eseguito dal personale del laboratorio di Cuma.

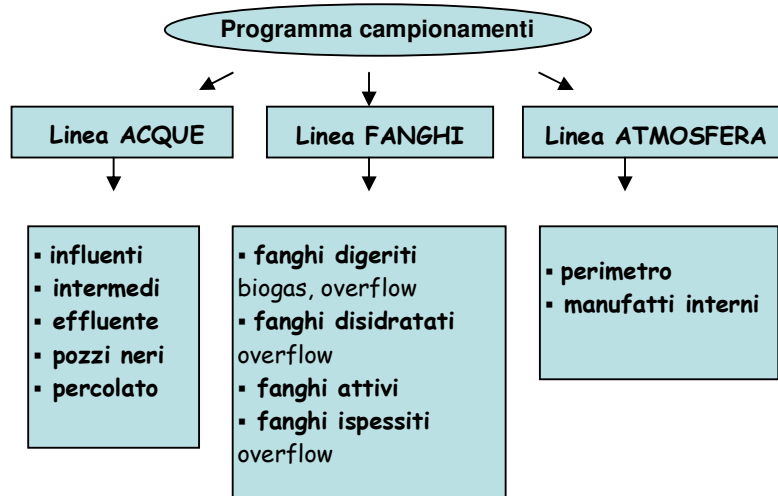


Fig. 7. Programma dei campionamenti quotidiano del laboratorio dell’Impianto di depurazione di Cuma (Fiorillo e Bosone, 2002a).

L’Impianto di depurazione di Cuma è una struttura che serve i 2/3 della città di Napoli (comprensorio di Napoli–Ovest), ed i comuni di Pozzuoli, Bacoli, Quarto e Monte di Procida, per un totale di 1.200.000 abitanti. Entrato in funzione nel 1983, è stato progettato e realizzato esclusivamente per il trattamento dei reflui civili, ma di fatto riceve da diversi anni un’aliquota di reflui industriali provenienti dalla zona industriale del comune di Giugliano che può costituire fino al 40% della portata influente.

Le acque reflue provenienti da Napoli giungono all’Impianto attraverso il cosiddetto *emissario di Cuma*; le portate luride di tale emissario raggiungono valori di $6 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in tempo asciutto e $12 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in caso di piogge.

Il dimensionamento dell’Impianto è stato effettuato proprio in base al numero di abitanti serviti e ai valori significativi delle portate, schematizzati nella seguente tabella (Tab. 14):

	DATI DI PROGETTO	DATI ATTUALI
Popolazione servita	1.200.000 abitanti	890.000 abitanti
Portata media in tempo asciutto	4,2 m ³ s ⁻¹	2,5 m ³ s ⁻¹
Portata di punta in tempo asciutto	5,7 m ³ s ⁻¹	3,1 m ³ s ⁻¹
Portata massima in tempo di pioggia	12,0 m ³ s ⁻¹	8,5 m ³ s ⁻¹

Tab. 14. Dati di progetto ed attuali dell’Impianto di depurazione di Cuma.

Il depuratore di Cuma ricopre una superficie di circa 32 ettari; riceve le acque dell’emissario di Cuma attraverso un canale in galleria lungo circa 3 km. Le acque vengono restituite, dopo il trattamento, all’emissario stesso tramite un canale costruito a cielo aperto lungo circa 4 km.



Fig. 8. Impianto di Depurazione di Cuma (Napoli-Ovest).

La *linea acque* è suddivisa nelle seguenti fasi di trattamento:

- grigliatura
- dissabbiamento/disoleatura
- pre-aerazione
- chiarificazione primaria
- aerazione
- sedimentazione secondaria
- disinfezione.

L’Impianto comprende una sezione adibita al *trattamento terziario* di un’aliquota delle acque già sottoposta al trattamento biologico; l’acqua sottoposta a questo ulteriore processo depurativo di tipo chimico-fisico è utilizzata per i servizi industriali del depuratore, per l’innaffiamento delle zone erbose e per il lavaggio delle strade.

La *linea fanghi*, finalizzata alla loro stabilizzazione ed essiccamento, è costituita dalle seguenti fasi:

- ispessimento primario
- digestione anaerobica a doppio stadio
- condizionamento con polielettroliti
- disidratazione meccanica mediante centrifughe o nastropressa.

Il fango prodotto viene inviato in discarica, ma potrebbe essere utilizzato in agricoltura come ammendante o come fertilizzante (in quest’ultimo caso si dovrebbe prevedere l’aggiunta di integratori chimici), mentre il biogas prodotto durante la digestione anaerobica è attualmente utilizzato solo in parte come fonte di energia.

Qui di seguito sono riportate le principali caratteristiche qualitative dei reflui grezzi trattati nell’Impianto di depurazione di Cuma; per ogni parametro sono riportati sia gli intervalli di variazione, sia i valori medi (Tab. 15):

	REFLUI CIVILI	POZZI NERI	REFLUI IND (fascia oraria diurna)	REFLUI IND. (fascia oraria notturna)	PERCOLATO
pH	6,8 – 7,3	6,5 – 7,8	6,8 – 7,4	5,9 – 7,1	6,4 – 8,5
	7,1	7,2	7	6,7	7,1
Colore (unità Pt – Co)	40 – 130	30 – 80	50 – 390	600 – 7000	****
	70	50	170	1550	****
BOD ₅ (mg/l O ₂)	80 – 270	800 – 7000	100 – 250	100 – 1200	1500 – 7800
	160	1200	150	400	3200
COD (mg/l O ₂)	150 – 650	650 – 1700	200 – 640	100 – 10500	6000 – 75000
	500	3000	400	3200	9300
SST (mg/l)	120 – 560	****	70 – 200	10 – 700	190 – 2500
	430	****	120	220	980
Ammoniaca (mg/l NH ⁴⁺)	15 – 50	70 – 220	5 – 30	10 – 40	550 – 1750
	35	170	16	25	850
Fosfati (mg/l P)	10 – 40	****	1 – 5	1 – 10	****
	20	****	3	4	****
MBAS (mg/l)	5 – 22	****	3 – 10	3 – 12	****
	10	****	6	6	****
<i>E. coli</i> (10 ⁶ UFC/100 ml)	5 - 28	****	****	****	****
	16.5	****	****	****	****

Tab. 15. Caratterizzazione chimica dei reflui trattati nell’Impianto di depurazione di Cuma (Fiorillo e Bosone, 2002a).

Attualmente i reflui derivanti dallo spurgo di pozzi neri non vengono ricevuti dall’Impianto; in passato il percolato fortemente concentrato era inviato direttamente ai digestori per alleggerire il carico inquinante sul settore biologico, ma talvolta fenomeni di riflusso (overflow) condizionavano inevitabilmente questa fase. Attualmente, questi reflui sono inviati alla linea acque in quantità tale da garantire una loro elevata diluizione in seguito al mescolamento con le portate di liquame domestico.

Qui di seguito (Tab. 16) sono riportati i valori medi della concentrazione dei solidi sospesi totali e sedimentabili relativi al liquame proveniente dal collettore principale (reflui in ingresso) e ai liquami parzialmente (CHP, chiarificatore primario) e completamente (CHS, chiarificatore secondario) depurati (reflui in uscita):

	Collettore principale	CHP	CHS
S. Sed. (ml l⁻¹)	13,2	15	2,3
SST (mg l⁻¹)	1072	489	91

Tab. 16. Valori medi della concentrazione dei solidi sospesi sedimentabili e totali riscontrati nel collettore principale e nei liquami parzialmente e completamente depurati durante la fase sperimentale.

Le elevate concentrazioni di materiale sospeso sedimentabile del liquame parzialmente depurato (CHP) sono dovute al fatto che i liquami influenti sono composti, oltre che di reflui del collettore principale, oggetto della sperimentazione, anche da componenti civili e industriali provenienti dalla zona ASI di Giugliano e da riciccoli della linea fanghi.

Nella tabella riportata qui di seguito (Tab. 17) si riporta la composizione percentuale delle classi dimensionali dei solidi sospesi presenti nei liquami precedentemente descritti. Le percentuali dei solidi sedimentabili sono state ricavate dai dati raccolti quotidianamente dall’unità analitica dell’Impianto di Cuma, mentre la percentuale della classe dimensionale più fine è stata calcolata effettuando una serie di filtrazioni dei liquami su membrane con porosità pari a 0,45µm e 1,2 µm (Appendice B).

diametro particelle (μm)	Composizione percentuale (%)		
	Coll. Principale	CHP	CHS
0,45<d<1,2	19	10	20
1,2<d<25	79,7	86,9	77,4
d>25	1,3	3,1	2,6

Tab. 17. Composizione percentuale delle classi dimensionali costituenti i solidi sospesi nel collettore principale e nei liquami parzialmente (CHP) e completamente (CHS) depurati.

■ Il liquame pretrattato meccanicamente

I pretrattamenti meccanici contribuiscono all'abbattimento di una frazione consistente dei solidi sospesi sedimentabili e totali e della sostanza organica; le percentuali medie di abbattimento di tali parametri relative all'Impianto di Cuma sono riportati nella seguente tabella (Tab. 18):

Solidi sedimentabili	72,6%
Solidi sospesi totali	65,8%
BOD	47,9%
COD	62,7%

Tab. 18. Percentuali medie di abbattimento dei principali parametri caratterizzanti i liquami a valle della sedimentazione primaria dell'Impianto di Cuma.

Prima di essere utilizzato negli esperimenti, il liquame pretrattato è stato sottoposto nuovamente al processo di sedimentazione in Coni Imhoff per un'ora per ridurre la concentrazione di solidi sospesi totali (pari a circa 1 g l^{-1}), per non incorrere in una completa inibizione degli organi di filtrazione degli organismi-test.

■ Il liquame depurato

Il liquame depurato ha subito un trattamento più spinto rispetto al liquame pretrattato precedentemente descritto. I reflui depurati, infatti, sono stati già sottoposti al trattamento di ossidazione biologica, per cui presentano concentrazioni di sostanza organica, solidi sospesi totali e carica batterica notevolmente inferiori.



Fig. 9. Vasche di ossidazione biologica dell’Impianto di Depurazione di Cuma.

I valori medi dei parametri caratterizzanti il liquame depurato non clorato dell’Impianto di Cuma ampiamente rientrante nei limiti di legge sono riportati nella seguente tabella (Tab. 19):

T (°C)	pH	Redox (mV)		Colore (U. Pt - Co)	Ammoniaca (µg/l)	Nitrati (µg/l N)	Nitriti (µg/l N)	Solfati (µg/l)	Fosfati (µg/l)	Cloruri (µg/l)	Cloriti (µg/l)	Clorati (µg/l)
16	7.7	+168	10	95	10.8	6.1	0.48	40	2	114	n.r.	n.r.

COD (mg/l)	BOD (mg/l)	SST (mg/l)	AOX (µg/l)	THM (µg/l)	TOC (mg/l)	Coliformi totali (UFC/100 ml)	Escherichia coli (UFC/100 ml)	Test di tossicità con Daphnia magna (% mortalità)	Test di tossicità Con batteri bioluminescenti (% mortalità)
50	15	25	38	n.r.	8	740000	180000	0	0

Tab. 19. Valori medi dei parametri caratterizzanti il liquame depurato non clorato proveniente dall’Impianto di Cuma (Fiorillo e Bosone, 2002b).

1.4.1.2. Liquami artificiali di tipo domestico

Il liquame artificiale di tipo domestico ha una composizione chimica molto simile, in termini di sostanza organica e nutrienti, a quella del liquame civile; si differenzia generalmente da esso per la totale assenza di materiale in sospensione e di carica microbica specifica.

La composizione chimica di un litro di liquame naturale è stata ricavata da studi precedenti effettuati su un impianto-pilota e opportunamente modificata per il

raggiungimento di un equilibrio ottimale tra componenti organiche ed inorganiche (Fiorillo, 2004).

La Tab. 20 illustra la composizione della ricetta originaria:

Elemento chimico	Concentrazione (g l⁻¹)
Estratto di carne	2.500
Tryptone	3.750
NH ₄ Cl	1.520
NaCl	0.150
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0.050
FeCl ₃ *6 H ₂ O	0.127
CaCl ₂ *2 H ₂ O	0.100
K ₂ HPO ₄	0.840
NaH CO ₃	0.500

Tab. 20. Composizione chimica del liquame artificiale.

Affinché, durante l'evolversi dell'esperimento, la quantità di alcune componenti, in particolare del contenuto proteico, fosse sempre rilevabile dalle apparecchiature utilizzate, sono state quadruplicate le concentrazioni di ciascuno dei suoi costituenti. Inoltre, poiché tra gli obiettivi della ricerca vi è la necessità di valutare la capacità delle ascidie di ridurre l'inquinamento di natura microbica, il liquame artificiale è stato arricchito con un inoculo proveniente dal refluo pretrattato meccanicamente (50 ml l⁻¹), ottenendo una concentrazione media di *Escherichia coli* pari a 2,5 UFC*10⁵/100 ml. Il liquame artificiale così modificato è stato poi miscelato con acqua di mare preparata artificialmente, avendo cura di rispettare il rapporto di diluizione standardizzato (1,6 l di liquame, 3,4 l di acqua di mare).

1.4.1.3. Liguami naturali ed artificiali misti (componenti civili /industriali)

I liguami di tipo misto sono stati preparati in laboratorio aggiungendo, a liguami ossidati per via biologica e a liguami sintetici, soluzioni 0,25 N di dicromato di potassio in quantità tale da raggiungere, nella miscela composta da acqua marina standard e liquame, concentrazioni di cromo esavalente pari a 5 e 10 ppm. L'impiego di questi liguami ha avuto l'obiettivo di testare le capacità di accumulo di cromo da

parte degli organismi test, e di valutare eventuali riduzioni dei tassi di ritenzione degli altri parametri monitorati.

La scelta del cromo come contaminante da aggiungere ai liquami civili è stata dettata dalla consapevolezza che questo metallo può compromettere il corretto funzionamento di un impianto di depurazione: concentrazioni maggiori o uguali a 6-7 ppm (paragonabili a quelle utilizzate negli esperimenti), infatti, sono in grado di alterare le caratteristiche dei fanghi, provocando:

- problemi di bioflocculazione, con conseguente aumento del materiale solido in sospensione;
- in casi estremi, la disfunzione dei rapporti relativi tra le popolazioni microbiche costituenti la microfauna, in seguito alla crescita abnorme di specie filamentose più resistenti e alla progressiva scomparsa di quelle più sensibili al fenomeno di contaminazione.

Il cromo esavalente esiste in soluzione come ione idrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) e bicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), la cui solubilità, pH dipendente, è molto variabile (Shupack, 1991). E' un agente irritante, corrosivo, ed è in grado di attraversare facilmente le membrane biologiche.

1.4.2. Acquisizione delle procedure analitiche necessarie per la caratterizzazione dei liquami (risultati di alcune prove preliminari)

Per conoscere le caratteristiche dei liquami che verranno utilizzati per la sperimentazione e per seguirne l'andamento durante le prove, è stato necessario apprendere una serie di procedure analitiche finalizzate a valutare alcuni parametri rappresentativi, come pH, COD (*chemical oxygen demand*) totale e solubile, contenuto proteico, nitriti, nitrati, azoto ammoniacale, fosfati, tossicità acuta, O.D. (ossigeno disciolto), *Escherichia coli* ed SST (*solidi sospesi totali*).

Le metodiche acquisite (Tab. 21) sono tratte dai volumi *IRSA – CNR*, eccetto quella dei nitrati, acquisita dagli “*Standard Methods for the examination of water and wastewater*” (1980).

Parametro da misurare	Metodica	Principio del metodo
COD (richiesta chimica di	Titolazione	Ossidazione di sostanze organiche ed inorganiche di un campione d'acqua

ossigeno) totale e solubile		mediante l'aggiunta di dicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento, usato come catalizzatore. L'eccesso di dicromato viene titolato con una soluzione di solfato di ferro-ammonio (sale di Mohr). La concentrazione di sostanza ossidabile è proporzionale alla quantità di dicromato di potassio consumato.
Azoto nitroso	Metodo colorimetrico di solfanilammide e naftilendiammina	A pH fortemente acido la solfanilammide viene diazotata dall'acido nitroso ed il diazocomposto che ne risulta viene copulato con la N-(1 naftil)-etilendiammina; si ottiene un azocomposto colorato la cui assorbanza viene misurata a 543 nm.
Azoto nitrico	Lettura diretta allo spettrofotometro UV-VIS.	Lettura dei campioni UV-VIS a due lunghezze d'onda: 220 nm (per i nitrati) e 265 nm (per la sostanza organica). Sottraendo il valore della concentrazione di sostanza organica da quello dei nitriti (interferenza da legami di risonanza) si ottiene la concentrazione effettiva di nitrati.
Azoto ammoniacale	Metodo potenziometrico con elettrodo a membrana a diffusione gassosa	Impiego dell'elettrodo specifico del tipo a diffusione gassosa per la determinazione dell'ammoniaca in campioni d'acqua previamente alcalinizzati. Una membrana permeabile al gas consente il passaggio dell'ammoniaca dalla soluzione in esame alla soluzione interna all'elettrodo; l'entità di tale passaggio dipende dalla concentrazione dell'ammoniaca nella soluzione in esame ed è quantitativamente misurata attraverso una variazione del pH dello strato di elettrolita a più stretto contatto della parete interna della membrana.
Fosforo	Metodo colorimetrico: dosaggio del fosforo	Trasformazione di tutti i composti organici ed inorganici del fosforo in ortofosfati mediante digestione acida con molibdato di ammonio. Dopo aver reso basica la soluzione, si aggiungono molibdato di ammonio e cloruro stannoso, che fa virare la soluzione verso un celeste tanto più intenso quanto maggiore è la concentrazione di fosfati (il viraggio è dovuto alla riduzione del

		molibdato di ammonio a blu di molibdeno).
Saggio di tossicità acuta	Calcolo della EC ₅₀ (concentrazione efficace mediana) che comporta l'inibizione della bioluminescenza (<i>MICROTOX</i>)	Valutazione della tossicità acuta utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza emessa dai un ceppo di batteri marini della specie <i>Vibrio fischeri</i>
SST (solidi sospesi totali)	Filtrazione su membrana	I solidi in sospensione presente in un campione d'acqua vengono raccolti per filtrazione su apposito filtro a membrana, e determinati per via gravimetrica dopo essiccamento del filtro ad una determinata temperatura fino a peso costante.
pH	Metodo potenziometrico	Impiego di un elettrodo a vetro combinato con un opportuno elettrodo di riferimento (a calomelano saturo). Il valore da determinare viene ottenuto dopo aver effettuato un'operazione di taratura con due soluzioni-tampone a pH noto portate alla stessa temperatura del campione.
O.D. (ossigeno disciolto)	Determinazione iodometrica o amperometrica	<p>Determinazione iodometrica: ossidazione dell'idrossido di manganese a stati di valenza superiori da parte dell'ossigeno disciolto. Per successiva acidificazione in presenza di ioduro, il manganese si riduce a Mn (II), liberando iodio in quantità equivalente all'ossigeno inizialmente presente nel campione. Lo iodio messo in libertà viene titolato con una soluzione a concentrazione nota di tiosolfato di sodio, in presenza di salda d'amido.</p> <p>Determinazione amperometrica: l'ossigeno disciolto in soluzione passa attraverso una membrana permeabile solo al passaggio delle molecole di O₂, e si riduce al catodo polarizzato di una cella elettrolitica o galvanica. L'intensità della corrente generata dalla diffusione dell'ossigeno attraverso la membrana è proporzionale all'attività dell'ossigeno presente in soluzione.</p>
Contenuto proteico	Metodo al biureto (secondo Blazka, 1966)	Determinazione del contenuto proteico tramite spettrofotometria UV-VIS: in presenza di ioni-rame le proteine producono un'intensa colorazione

		violacea quantizzabile per via spettrofotometrica
Cromo (VI)	Metodo colorimetrico (Determinazione della concentrazione di Cr(VI) tramite spettrofotometria UV-VIS)	Il cromo esavalente viene solubilizzato in ambiente acido e successivamente determinato sulla soluzione filtrata mediante reazione colorimetrica con difenilcarbazide alla lunghezza d'onda di 540 nm
<i>Escherichia coli</i>	Tecnica delle membrane filtranti	Membrane filtranti: filtrazione di campioni d'acqua su membrane Millipore (0,45 µm), e successiva incubazione su terreni mColiBlue 24 per 24 ore a 35± 0,5 °C. Questo metodo consente la rilevazione simultanea di Coliformi totali ed E. coli in acque potabili ed ambientali. Il terreno di coltura impiegato contiene degli speciali inibitori che impediscono la crescita dei batteri non coliformi senza inibire la crescita dei microrganismi stressati. E. coli dà origine a colonie blu, i coliformi totali a colonie rosse e blu.

Tab. 21. Descrizione sintetica delle metodiche di laboratorio acquisite per la caratterizzazione dei liquami.

La concentrazione di sostanza organica è stata espressa in termini di contenuto proteico (che rappresenta solo una frazione della sostanza organica totale presente nelle miscele di acqua di mare e liquame) poiché non è stato possibile impiegare l'analisi del COD (*chemical oxygen demand*) - un indice tra i più utilizzati per individuare non solo le sostanze organiche ossidabili biologicamente, ma anche le sostanze organiche non biodegradabili ossidabili solo chimicamente - a causa delle sensibili interferenze analitiche provocate dall'elevata concentrazione di cloruri nell'acqua di mare naturale o artificiale. Non è stato, inoltre, possibile impiegare il metodo modificato consigliato per scarichi ad elevata salinità (IRSA-CNR, quaderno 100, metodo n°5510), a causa della mancanza di un apparato sperimentale che consentisse il recupero e la misurazione del clorogas, estremamente tossico, sviluppatosi durante il procedimento di ossidazione alla base della metodica del COD.

Durante la fase di acquisizione delle procedure analitiche, sono state anche testate diverse procedure di mineralizzazione finalizzate a valutare il contenuto di metalli pesanti accumulato dagli organismi-test. Tuttavia, a causa dell'estrema laboriosità dei processi, e per evitare di intralciare il lavoro dell'unità analitica del laboratorio dell'Impianto di Cuma, presso il quale è stata svolta l'attività sperimentale, si è scelto di calcolare la concentrazione di metallo nella miscela di acqua di mare e liquame anziché valutare l'entità dell'accumulo di tali metalli negli animali.

1.4.3. Allevamento degli organismi-test in acquario

Gli organismi-test, provenienti da diverse zone della costa campana (Litorale Domizio, Torre Annunziata, Lago Fusaro) e pugliese (golfo di Taranto), sono stati forniti dalla *Sezione Allevamento* della *Stazione Zoologica "Anton Dohrn"* di Napoli. In laboratorio, sono stati posti in una vasca riempita con 50 litri di acqua di mare standard (Fig. 11), preparata sciogliendo in acqua sale marino "*Instant Ocean*", in quantità tale da raggiungere una salinità pari a 36‰. Nella vasca è stato collocato un supporto (Fig. 10, 11); le ascidie, infatti, necessitano di substrati duri, sui quali si attaccano tramite la parte basale. All'interno della vasca sono stati inoltre posti 1,25 kg di rocce vive al fine di ridurre il più possibile la presenza di nitrati in acqua, ed un ossigenatore a doppia uscita con pietre porose per mantenere un adeguato tenore di ossigeno disciolto. La vasca è stata costantemente mantenuta da un riscaldatore alla temperatura di 18-20°C.

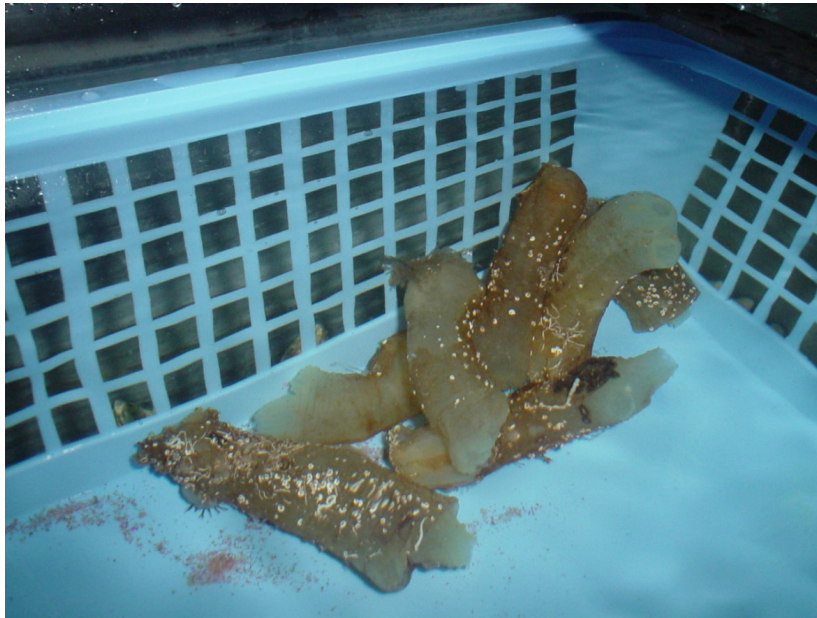


Fig. 10. Individui di *Ciona intestinalis* allevati in laboratorio.

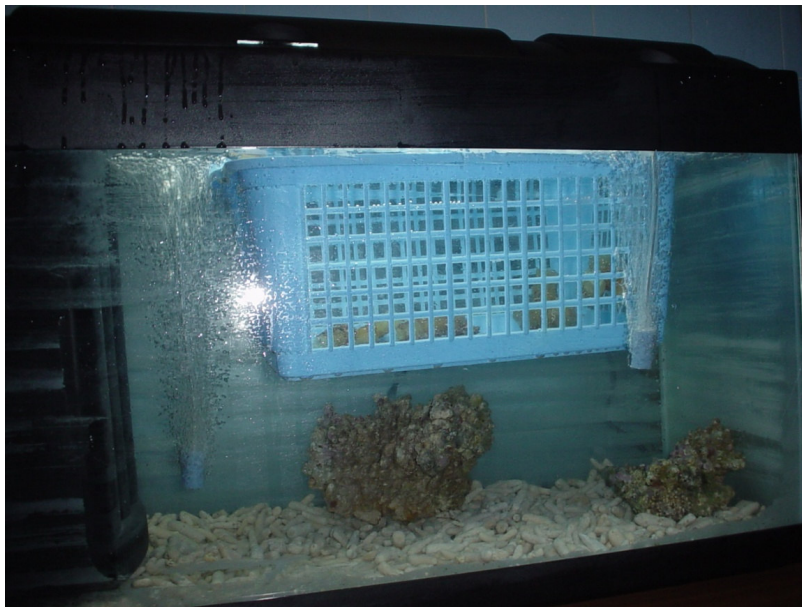


Fig. 11. La vasca di allevamento.

Gli organismi sono stati alimentati quotidianamente con mangimi idonei sia a pesci che a molti invertebrati marini contenenti pesci e sottoprodotti di pesci, cereali, lieviti, estratti di proteine vegetali, molluschi e crostacei, oli e grassi, alghe, zuccheri

e lecitina. Per permettere agli animali di assimilare questa fonte di nutrimento ed evitare danni all'apparato filtratorio, i prodotti acquistati in forma di scaglie sono stati polverizzati in mortaio, e poi mescolati in acqua di mare standard prima di essere somministrati agli organismi presenti in vasca. Gli animali, inoltre, sono stati esposti ad una luce poco intensa, che simula le condizioni di luminosità tipiche del loro ambiente naturale.

1.4.4. Apparato sperimentale

Prima di mettere a punto la procedura sperimentale, è stato necessario individuare un apparato opportunamente corredato di apparecchi e strumenti di controllo. Tra le varie tipologie sperimentate, sono state scelte due unità in parallelo con le seguenti caratteristiche:

- un' **unità di controllo**, costituita da un becker di vetro con capienza di 5 litri , contenente una miscela di liquame ed acqua di mare standard del volume di 2,5 litri, e finalizzata a studiare l'evoluzione del sistema di base in assenza dagli organismi-test.
- un' **unità campione** analoga alla precedente, ma destinata a contenere la colonia di organismi-test, allo scopo di verificare l'entità dell'effetto depuratore delle ascidie.

La necessità di utilizzare un'unità di controllo dipende dal fatto che, in un liquame aerato, l'ossigeno è utilizzato dalla massa microbica presente per lo sviluppo di processi di assimilazione e di degradazione della sostanza organica, con conseguente aumento del numero di microrganismi. In condizioni di carenza di sostanze organiche nutritive e in condizioni di competitività fra i vari microrganismi (come si verifica tipicamente in un sistema "batch"), subentra una fase di respirazione endogena in cui i batteri consumano il proprio protoplasma e la sostanza organica complessa, di cui sono costituiti, si trasforma in sostanze più semplici. Seguire l'evoluzione del sistema di base, dunque, impedisce di sovrastimare le capacità depurative degli organismi-test, e permette di quantificare il contributo fornito dai microrganismi alla depurazione della miscela.

Entrambe le unità sono state termostatate, ponendole in un bagnetto termico alla temperatura di 20°C ed in una camera del laboratorio termostatata alla medesima

temperatura, onde evitare variazioni della capacità filtrante dovute a fluttuazioni di questo parametro anche per cause accidentali (Fig. 12).

Per garantire una miscelazione completa e costante del liquido, in entrambi i becker, è stato previsto un sistema di agitazione continua, realizzato posizionando il bagnetto termico su due piastre magnetiche, situate in corrispondenza del fondo dei becker, all'interno dei quali è stato posto un magnetino. La velocità di agitazione, uguale in entrambi gli apparati, è stata regolata in modo da garantire una miscelazione sufficiente dell'intero volume d'acqua, ma non così vigorosa da provocare la chiusura dei sifoni degli organismi-test. Il disturbo meccanico è stato ulteriormente attenuato ponendo la colonia di ascidie in un piccolo recipiente di materiale inerte a pareti forate posto all'interno del becker (Fig. 13), che ha permesso agli animali di restare immersi nell'acqua e, allo stesso tempo, di non depositarsi sul fondo, dove l'agitazione tenderebbe a farli ruotare velocemente lungo il perimetro del contenitore principale. In entrambi gli apparati, inoltre, è stata garantita una costante ossigenazione introducendo degli aeratori a pietra porosa; in tal modo è stato evitato il rischio di fenomeni di anossia dovuti anche alla crescita microbica che si verifica nel corso degli esperimenti.

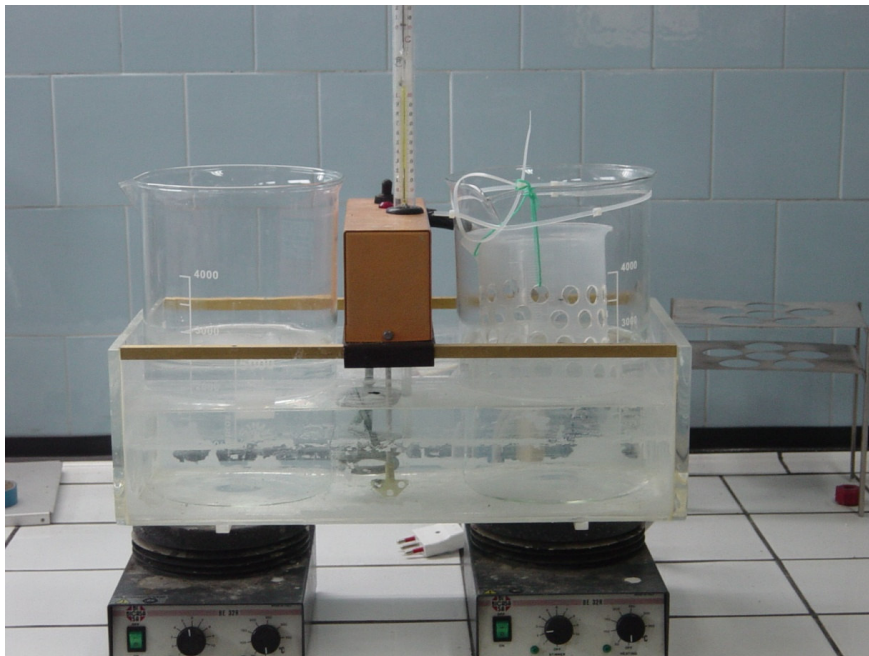


Fig. 12. Apparato sperimentale.

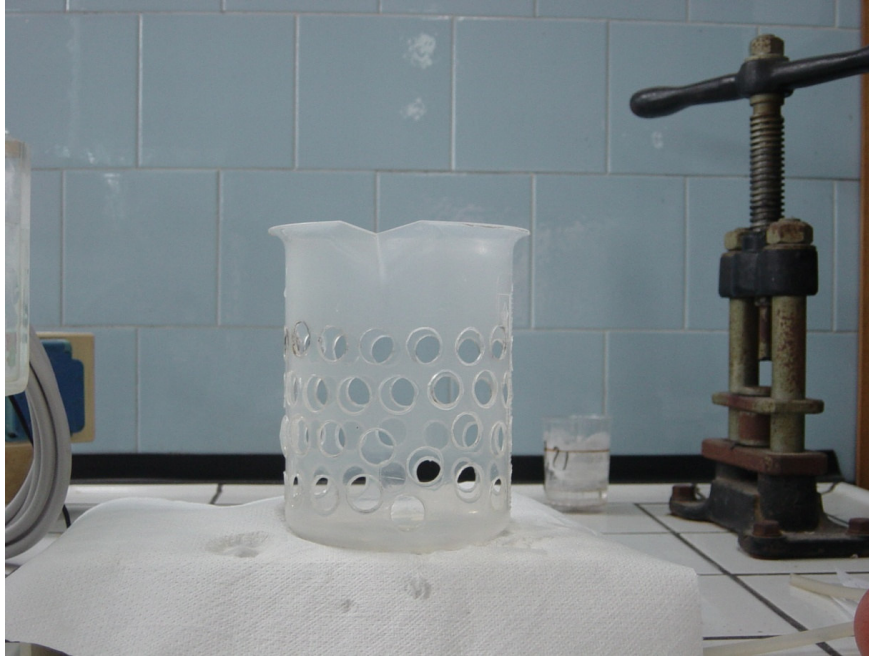


Fig. 13. Contenitore forato, inserito nell'unità campione per limitare il disturbo meccanico subito dalle ascidie.

1.4.5. Procedura sperimentale

Sono state testate diverse procedure sperimentali, che differivano tra loro per:

- a) rapporti di diluizione tra liquame ed acqua di mare
- b) parametri monitorati
- c) scelta degli istanti temporali in cui effettuare le analisi
- d) numero degli organismi-test
- e) test fisiologico preliminare.

Le prove effettuate hanno consentito di scegliere un rapporto di diluizione standard tra acqua di mare ($S \geq 40\text{‰}$) e liquame di 3:1. La scelta di tale rapporto è stata determinata da due ragioni fondamentali:

- 1) garantire una concentrazione di sostanze inquinanti piuttosto elevata, in modo da simulare condizioni tipiche di ambienti marini compromessi, quali ad esempio aree portuali con scarso ricambio idrico o zone contaminate da scarichi di condotte sottomarine;
- 2) ottenere nella miscela un valore della salinità non inibente per la vita dell'organismo. In questo caso, tale valore (pari a circa 30‰) rientra ampiamente nell'intervallo di tolleranza dell'animale, che, pur preferendo in

generale acque ad elevata salinità, può sopravvivere anche in acque con concentrazioni saline molto meno elevate (Millar, 1971). Non a caso alcuni studiosi hanno condotto in passato esperimenti sui tassi di filtrazione delle ascidie in acque con valori della salinità nettamente inferiori (15–18‰, Petersen e Riisgård, 1992) di quello impiegato in questo progetto di ricerca.

b) Tra i molti parametri monitorati, sono stati scelti quelli strettamente legati alle condizioni di vita degli organismi-test (pH, ossigeno disciolto, temperatura, salinità), ed altri più specifici per seguire nel tempo il grado di inquinamento dei liquami sottoposti alla sperimentazione (sostanza organica, carica microbica riferita ad *Escherichia coli*, solidi sospesi totali, cromo esavalente; Tab. 22).

<i>Parametro</i>	<i>Metodica e riferimenti bibliografici</i>
O.D.	Misura amperometrica (Metodo n° 4100B – Quaderno n° 100 IRSA – CNR)
pH	Metodo potenziometrico (Metodo n° 2080 – Quaderno n° 100 IRSA – CNR)
<i>E. coli</i>	Filtrazione su membrana (Metodo n° 7020 – Quaderno n° 100 IRSA – CNR)
Contenuto proteico (secondo Blazka)	Metodo al biureto (Quaderno n° 64, Vol I – IRSA – CNR)
Cr(VI)	Determinazione colorimetrica con difenilcarbazide (Quaderno n° 64, Vol I – IRSA – CNR)
SST	Filtrazione su membrana (Metodo n° 2050 – Quaderno n° 100 IRSA – CNR)
Salinità	Misura con densimetro e relazione empirica tra salinità e densità (Pickard e Emery, 2000)

Tab. 22. Parametri e metodi analitici adottati durante gli esperimenti.

c) Le analisi sono state ripetute dopo 1, 2 e 24 ore dall'inizio dell'esperimento, allo scopo di comprendere le capacità adattative degli organismi-test a breve e a medio termine in presenza dei vari tipi di liquami testati.

Esperimenti condotti in passato sulla filtrazione di particolato organico da parte di Tunicati hanno mostrato che questi organismi necessitano di un periodo di adattamento di circa 1 ora per adattarsi alle condizioni sperimentali (Petersen e Riisgård, 1992), durante il quale i valori dei tassi di filtrazione si mantengono più bassi rispetto a quelli raggiungibili dall'organismo in assenza di stress.

d) Per ogni esperimento è stata impiegata una colonia di ascidie costituita da 3 a 5 organismi; il numero di animali da inserire nell'apparato sperimentale è stato scelto di volta in volta in base alle loro dimensioni, garantendo, in ogni esperimento, un valore significativo del peso secco a cui rapportare i risultati ottenuti. Prove preliminari condotte con singoli organismi hanno dimostrato la scarsa affidabilità di questa procedura, a causa dell'elevata variabilità delle risposte del singolo individuo in presenza di alte concentrazioni di contaminanti. L'impiego della colonia, invece, consente di valutare l'effetto complessivo dei fenomeni di accumulo e rilascio di contaminanti, rendendo i risultati sperimentali più indipendenti dal comportamento dei singoli organismi, influenzato da una serie di variabili (taglia, intasamento dei filtri branchiali, etc.) che non possono essere controllate facilmente e rapidamente.

e) Prima di effettuare ogni prova sperimentale, le ascidie sono state sottoposte ad un test di screening per saggiarne le condizioni fisiologiche di partenza ed evitare di ottenere dei risultati falsati dall'impiego di organismi già stressati. E' stata, a tal fine, effettuata una prova respirometrica su alcune ascidie appartenenti alle colonie da testare, valutandone l'assorbimento (uptake) di ossigeno rispetto al tempo e al peso dell'animale.

Per rilevare i tassi di uptake di ossigeno, è stato posto ogni singolo animale in una bottiglia ermeticamente chiusa, riempita fino all'orlo con acqua di mare preparata artificialmente e satura di ossigeno disciolto. Il tasso specifico di consumo di ossigeno (OURs, *specific oxygen uptake rate*), misurato attraverso una sonda a tenuta, variava tra i 7,8 e i 13,0 mg O₂ g⁻¹ l⁻¹ in animali posti in stabulazione per meno di una settimana, diminuendo fino a 5,9 mg O₂ g⁻¹ l⁻¹ nelle ascidie prelevate dal luogo di origine da più di una settimana. Questo valore risulta superiore ai tassi medi di consumo di ossigeno di altri flerobranchiati (*Ascidia nigra*) riportati in letteratura (1,5 mg O₂ g⁻¹ l⁻¹; Goodbody, 1974).

CAPITOLO 2

Risultati e discussione

In questo capitolo sono riportati i risultati ottenuti durante gli esperimenti con liquami civili e misti, che sono stati rappresentati nei seguenti modi:

▣ rese depurative relative ai parametri che hanno subito significative variazioni temporali durante il corso degli esperimenti, espresse sia in mg/g di peso secco (contenuto proteico, solidi sospesi totali, cromo esavalente) o UFC/g (*Escherichia coli*), sia in termini percentuali.

Per effettuare il calcolo delle rese depurative del contenuto proteico, degli SST e del Cr(VI) sono state adoperate le seguenti formule:

$$1) \text{ Resa (mg/g peso secco)} = - ([C_0]_{\text{(mg/l)}} - [C]_{\text{(mg/l)}}) / \text{peso secco}_{\text{(g/l)}}$$

$$2) \text{ Resa (\%)} = (\text{Resa}_{\text{(mg/g peso secco)}} / [C_0]_{\text{(mg/g peso secco)}}) * 100$$

con:

- $[C_0]$ = concentrazione del parametro nell'unità-controllo
- $[C]$ = concentrazione del parametro nell'unità-campione.

Per il calcolo delle rese relative al parametro *Escherichia coli* sono state applicate formule analoghe, che si differenziano dalle precedenti solo per le unità di misura adoperate:

$$3) \text{ Resa (UFC/g peso secco)} = - ([C_0]_{\text{(UFC/100ml)}} - [C]_{\text{(UFC/100ml)}}) / \text{peso secco}_{\text{(g/100ml)}}$$

$$4) \text{ Resa (\%)} = (\text{Resa}_{\text{(UFC/g peso secco)}} / [C_0]_{\text{(UFC/g peso secco)}}) * 100$$

▣ rappresentazione dei valori dei medesimi parametri tramite grafici a dispersione (nuvole di punti). I punti rappresentati nei grafici sono costituiti da una coppia di valori (x y), dei quali l'ascissa (x) rappresenta il valore assunto dal parametro nell'unità di controllo, e l'ordinata (y) il valore che esso assume nel campione. La retta rappresentata in ciascun grafico ($y = x$) costituisce il luogo di punti in cui i valori del parametro sono uguali nel controllo e nel campione, per cui la posizione

dei punti rispetto a tale retta permette di individuare se si verificano più frequentemente effetti depurativi o fenomeni di inquinamento.

I dati sperimentali relativi alle concentrazioni dei parametri saggiati sono stati riportati, rispettivamente, nelle Appendici C e D, mentre i valori del peso secco delle colonie di organismi test sono stati riportati nell'Appendice E.

2.1. Esperimenti con liquami civili

2.1.1. Esperimenti con liquame naturale pretrattato meccanicamente

Questa fase sperimentale ha avuto come obiettivo quello di testare le capacità depurative di *Ciona intestinalis* verso liquami con elevate concentrazioni di:

- solidi sospesi totali
- batteri
- sostanza organica.

Il liquame impiegato in questa fase sperimentale è stato prelevato a valle del processo di sedimentazione e a monte del trattamento biologico a fanghi attivi. Non avendo subito un trattamento depurativo spinto, esso costituisce dunque la tipologia di liquame a più alto carico inquinante disciolto e sospeso tra quelle testate.

I parametri analizzati sono stati:

- salinità
- temperatura
- pH
- ossigeno disciolto
- contenuto proteico
- solidi sospesi totali
- *Escherichia coli*

Sono state effettuate 13 prove nelle medesime condizioni sperimentali generali; i risultati delle rese depurative nei confronti della sostanza organica, del materiale in sospensione e della carica microbica sono rappresentati nelle tabelle riportate qui di seguito. Il segno positivo dei risultati riportati in tabella indica un incremento della concentrazione del parametro rispetto all'unità di controllo (assenza di resa depurativa), mentre il segno negativo indica una riduzione della sua concentrazione; la sigla "nd" indica valori non determinabili della resa depurativa; essa è stata utilizzata quando il valore nel controllo è risultato nullo.

Dall'analisi dei risultati si evince che nell'unità-campione non sempre si manifesta una riduzione della concentrazione del **contenuto proteico** (Tab. 23). Alla prima ora, nel 54% delle prove, l'effetto depurativo è nullo, e, spesso, si verifica addirittura un rilascio della sostanza organica da parte delle ascidie rispetto all'apparato di controllo; le basse rese depurative ottenute in questo arco temporale variano tra il 6 e il 28%. Durante la seconda ora, sebbene nel 46% delle prove continui a verificarsi un incremento di sostanza organica nel campione, l'entità delle rese aumenta, con valori che variano tra l'11 e il 70%. Alla ventiquattresima ora, infine, si verifica un peggioramento della qualità delle acque, dovuto probabilmente allo stress subito dagli organismi in seguito al contatto con il liquame grezzo per periodi di tempo prolungati: le rese variano tra il 4 ed il 50%, ma nel 60% dei casi i valori del contenuto proteico aumentano in presenza degli organismi-test.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	0 (0%)	-7,5 (-13,64%)	+17 (+20%)
2	-2,5 (-6,07%)	0 (0%)	+10 (+66,67%)
3	-28,67 (-8,86%)	+16,38 (+4,35%)	-16,38 (-3,77%)
4	+3,57 (+66,60%)	+1,78 (+8,31%)	+48,21 (+42,18%)
5	+55,99 (+51,73%)	+37,32 (+33,33%)	+41,06 (+37,93%)
6	+21,20 (+15,79%)	+109,54 (+56,36%)	+24,73 (+4,96%)
7	+174,73 (+19,44%)	-37,38 (-12%)	0 (nd)
8	0 (nd)	-375 (-70,59%)	-93,75 (-27,27%)
9	-291,67 (-28%)	+333,33 (+36,36)	+541,67 (+216,67%)
10	-225 (-13,43%)	-3,75 (-18,75%)	-125 (-50%)
11	+950 (172,73%)	-100 (-11,11%)	+250 (+41,67%)

12	+192,02 (+56%)	+27,43 (+8,33%)	-41.15 (-18,75%)
13	-121,86 (-25%)	-295,94 (-47,22%)	+121,86 (+53,85%)

Tab. 23. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative al **contenuto proteico** negli esperimenti condotti con **liquame pretrattato meccanicamente**.

La bassa entità delle rese depurative alla prima e, spesso, alla seconda ora, è ben evidenziata in Fig. 14 dalla vicinanza di tutti i punti alla retta $y = x$; alla ventiquattresima ora la presenza della maggior parte dei punti nella regione al di sopra della diagonale indica un ulteriore aumento, sia di numero che di entità, di fenomeni di rilascio di sostanza organica.

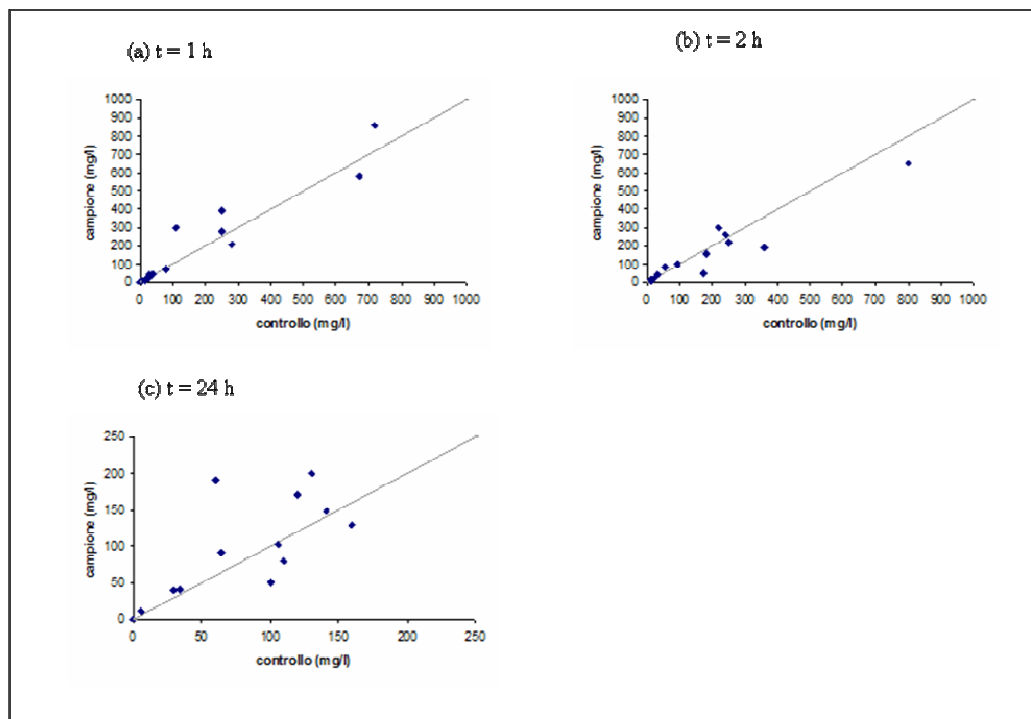


Fig. 14. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **contenuto proteico**, testato durante gli esperimenti con **liquame pretrattato meccanicamente**.

In riferimento al parametro **SST** (Tab. 24), si è osservato lo stesso andamento registrato per il contenuto proteico. Infatti, alla prima ora, nel 70% circa dei casi, nell'unità campione si verifica, a tutti gli istanti temporali, un incremento della concentrazione di solidi sospesi totali rispetto all'unità di controllo, con rese variabili dal 13 al 35%. Alla seconda ora, i casi in cui si verifica un abbattimento dei solidi sospesi aumentano: l'entità delle rese, estremamente variabile, è compresa tra il 2 ed il 69%, mentre alla ventiquattresima ora i casi di rilascio (60%) prevalgono nuovamente sulle efficienze depurative, che variano tra il 16 ed il 59%. È importante sottolineare che, oltre allo scarso accumulo di SST da parte degli organismi in presenza di elevate concentrazioni di materiale particellare, la concentrazione di solidi sospesi nel campione è influenzata anche dalla escrezione di sostanze mucillaginose associate ai *faecal pellets* degli animali.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	+195 (+162,50%)	+35 (+30,43%)	-20 (-16,67%)
2	-15 (-13,04%)	+230 (+219,05%)	+210 (+300%)
3	-49,16 (-22,22%)	0 (0%)	-57,35 (-31,82%)
4	+167,86 (+106,82%)	-7,14 (-2,20%)	+192,86 (+275,15%)
5	+395,64 (+176,66%)	-44,79 (-31,58%)	+507,61 (+377,77%)
6	+416,96 (+280,95%)	-28,27 (-12,5%)	-98,94 (-45,16%)
7	+194,37 (+325,03%)	+117,12 (+180,77%)	+189,38 (+292,30%)
8	+331,25 (+81,53%)	-200 (-50%)	+393,75 (+134,04%)
9	-166,67 (-35,09%)	-241,67 (-20,71%)	+491,67 (+118%)
10	+185 (+41,11%)	+230 (+56,79%)	+450 (+209,30%)
11	+180 (+28,57%)	+106,98 (+79,59%)	-178,31 (-36,31%)

12	+164,59 (+187,50%)	+106,98 (+79,59%)	-178,31 (-36,31%)
13	-55,71 (-15,84%)	-341,20 (-52,69%)	+184,53 (+155,88%)

Tab. 24. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative alla concentrazione di **solidi sospesi totali** negli esperimenti condotti con **liquame pretrattato meccanicamente**.

La netta prevalenza dei casi di rilascio di materiale particellare nel campione alla prima e alla ventiquattresima ora, nonché il leggero aumento dell'efficienza di filtrazione dei solidi sospesi totali alla seconda ora sono rappresentati graficamente in Fig. 15.

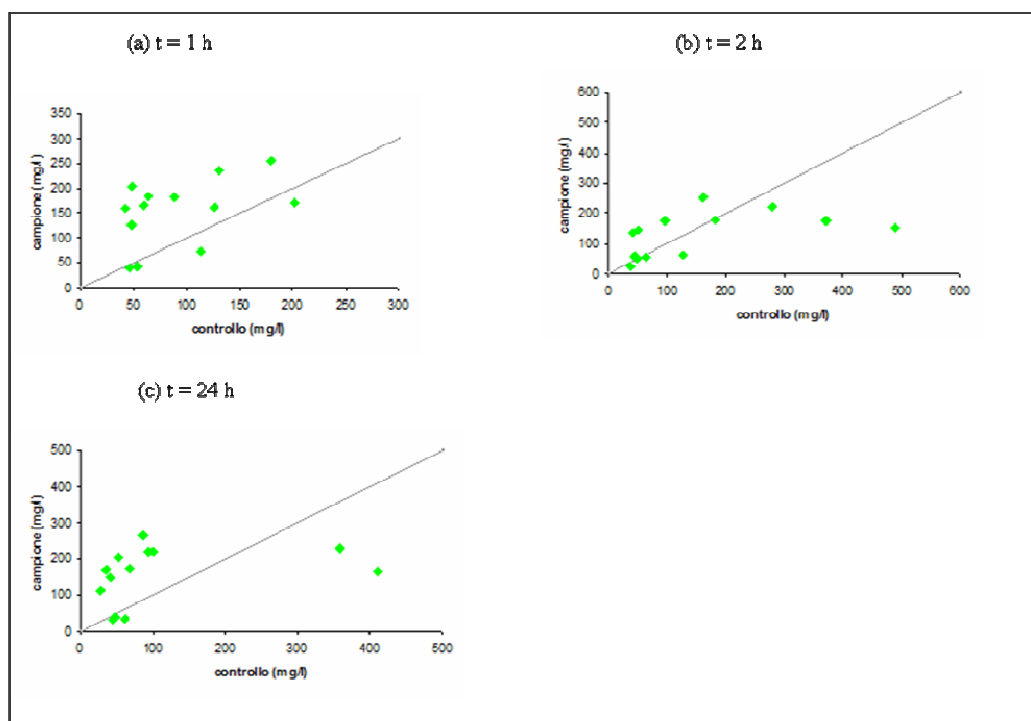


Fig. 15. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita alla concentrazione di **solidi sospesi totali**, testata durante gli esperimenti con **liquame pretrattato meccanicamente**.

I dati relativi al parametro microbiologico *Escherichia coli* (Tab. 25) mostrano una riduzione talvolta significativa della concentrazione alla seconda (25-71%) e alla ventiquattresima ora (8-80%). Durante la prima ora, invece, che può coincidere con

la fase di adattamento alle nuove condizioni sperimentali, si verifica quasi sempre un incremento della carica microbica nel campione; l'efficienza di filtrazione si manifesta positivamente in pochi casi (23%), e con valori discreti delle rese (14-39%), confrontabili con quelli ottenuti per i solidi sospesi totali.

nr prova	rese UFC*10 ⁵ /g (%)		
	t1	t2	t24
1	+25 (+8,33%)	-225 (-50%)	-150 (-40%)
2	+25 (+714%)	-100 (-28,57%)	-75 (-20%)
3	+83 (+20%)	-250 (-37,33%)	-250 (-40%)
4	-125 (-38,99%)	-71 (-25%)	+36 (+49,99%)
5	+185 (+100%)	-185 (-71,43%)	-222 (-75%)
6	-36 (-20%)	-36 (-25%)	-107 (-37,50%)
7	+25 (+16,67%)	+12 (+25%)	+25 (+18,18%)
8	+62 (+25%)	-125 (-50%)	+62 (+50%)
9	-42 (-14,29%)	-42 (-25%)	-417 (-7,69%)
10	+175 (+58,33%)	-125 (-50%)	+250 (+8,33%)
11	+100 (+11,76%)	-400 (-57,14%)	-24000 (-80%)
12	+55 (+40%)	-41 -57,14	+1207 (+733,31%)
13	+70 (+57,15%)	+52 (+20%)	+7840 (+300%)

Tab. 25. Rese depurative, espresse in UFC*10⁵/g di peso secco e in percentuale, relative al parametro *Escherichia coli* negli esperimenti condotti con **liquame pretrattato meccanicamente**.

I grafici riportati in Fig. 16 evidenziano che l'aumento della concentrazione batterica nel campione rispetto all'unità di controllo è ricorrente alla prima ora, mentre, negli

istanti temporali successivi, ed in particolare alla seconda ora, la capacità di ritenzione delle cellule di *Escherichia coli* da parte delle ascidie aumenta notevolmente.

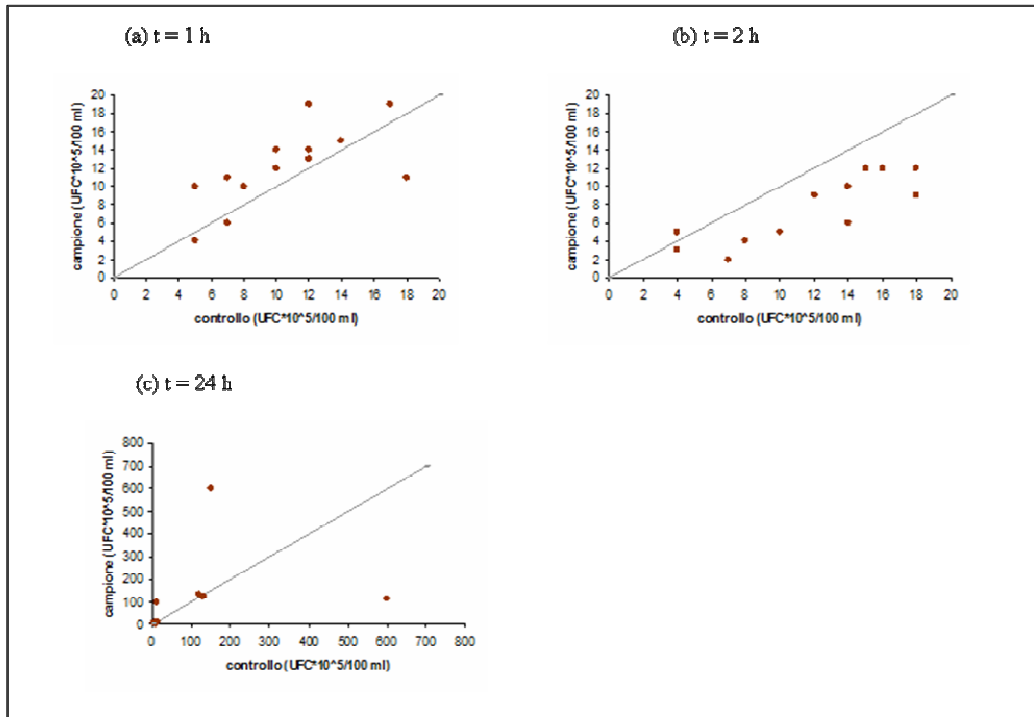


Fig. 16. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al parametro *Escherichia coli*, testato durante gli esperimenti con liquame pretrattato meccanicamente.

2.1.2. Esperimenti con liquame biologicamente depurato

Rispetto al liquame pretrattato meccanicamente, il liquame depurato mediante ossidazione a fanghi attivi proviene da un trattamento più spinto, e, pertanto, possiede una concentrazione inferiore di sostanza organica (COD = 50–100 mg/l; contenuto proteico = 10-20 mg/l). I parametri monitorati sono gli stessi di quelli utilizzati negli esperimenti con liquame pretrattato meccanicamente. Anche in questo caso sono state effettuate 13 prove analitiche, i cui risultati sono stati rappresentati nelle tabelle e nei grafici riportati qui di seguito.

Contrariamente a quanto accade negli esperimenti con liquami pretrattati, le rese depurative relative al **contenuto proteico** (Tab. 26) sono particolarmente elevate alla

prima ora: esse variano generalmente dal 45 al 100% (solo in un caso la resa presenta un valore inferiore, pari al 16%). Ciò lascia ipotizzare che, in presenza di liquami con carico inquinante meno elevato, le ascidie necessitino di periodi di adattamento meno lunghi, risultando efficienti dai primi istanti temporali. Anche alla seconda ed alla ventiquattresima ora è possibile osservare una significativa diminuzione del contenuto proteico nel campione; tuttavia, le percentuali di abbattimento risultano leggermente meno elevate di quelle riscontrate alla prima ora ed estremamente variabili (dal 4-5% al 100%).

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-432,15 (-94,74%)	0 (0%)	-360,13 (-90,91%)
2	-423,57 (-81,82%)	-593 (-75%)	-498,97 (-98,15%)
3	-220,65 (-80,95%)	-64,90 (-7,25%)	-571,10 (-5,18%)
4	+314,46 (nd)	-214,30 (-19,31%)	-72,57 (-17,65%)
5	-16,06 (-14,29%)	+32,11 (+9,09%)	0 (0%)
6	-507,18 (-100%)	-549,45 (-78,79%)	-126,70 (-66,67%)
7	+201,17 (+45,45%)	+101,06 (+60%)	-462,70 (-100%)
8	-469,14 (-100%)	-964,34 (-100%)	-417,01 (-23,88%)
9	-390,55 (-58,62%)	-68,92 (-100%)	-91,88 (-21,05%)
10	-2616,28 (-94,73%)	-775,19 (-44,44%)	-2180,23 (-68,18%)
11	-28,73 (-100%)	-28,73 (-100%)	-689,65 (-100%)
12	-486,90 (-91,67%)	-44,26 (-4%)	+708,21 (+133,33%)

13	-374,81 (-56,52%)	-317,15 (-42,31%)	+144,16 (+100%)
----	----------------------	----------------------	--------------------

Tab. 26. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative al **contenuto proteico** negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato**.

La netta prevalenza dei punti al di sotto della diagonale in ciascun grafico rappresentato in Fig. 17 conferma le osservazioni precedenti.

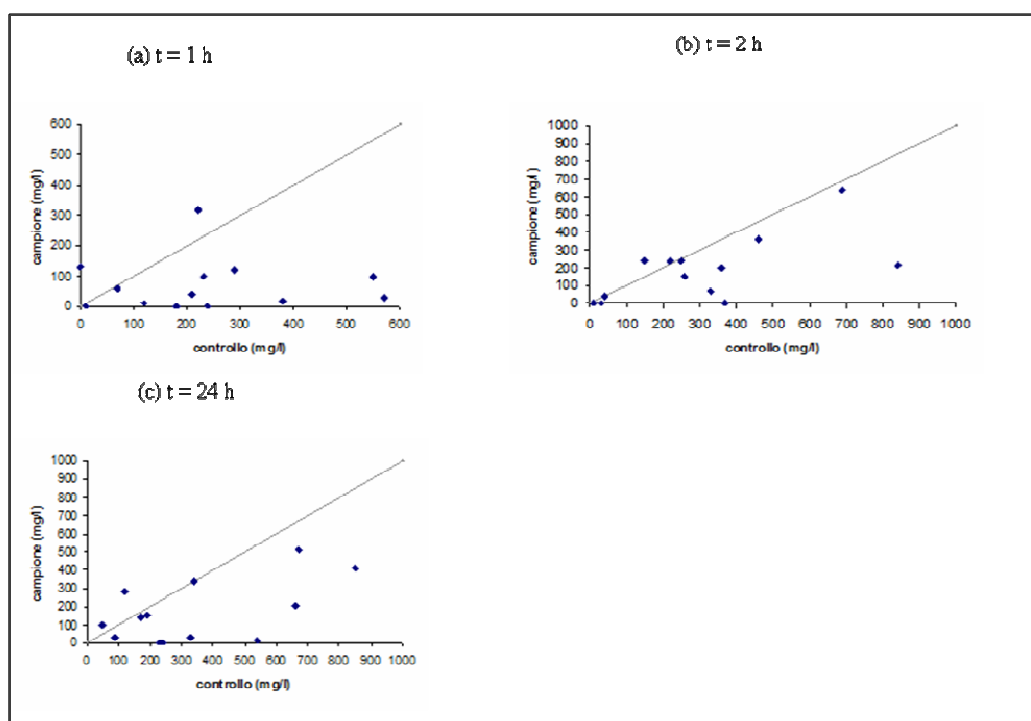


Fig. 17. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **contenuto proteico**, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato**.

Analogamente all'abbattimento degli **SST** nel liquame pretrattato, anche negli esperimenti con liquame depurato, spesso (nel 69% dei casi alla prima e alla seconda ora, nel 54% alla ventiquattresima ora), l'effetto depurativo è nullo; talvolta, si verifica anche un incremento del materiale particellare in sospensione nel campione (Tab. 27). A differenza di quanto riscontrato per il contenuto proteico, le percentuali di abbattimento minori si riscontrano alla prima ora (12-50%); esse aumentano

progressivamente alla seconda (28-53%) ed alla ventiquattresima ora (25-87%). L'aumento di particolato in sospensione nella maggior parte dei casi e a ciascun istante temporale è in contrapposizione con l'efficienza mostrata dagli organismi-test nella riduzione della sostanza organica disciolta e sospesa. Ciò lascia ipotizzare che, anche in questo caso, l'elevata concentrazione di SST rispetto all'unità di controllo sia condizionata dalla presenza di materiale escreto dagli organismi-test.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-2,40 (-12,49%)	-21,60 (-50%)	+153,65 (+711,01%)
2	-11,29 (-74,97%)	+20,71 (+157,13%)	0 (0%)
3	+10,38 (+57,13%)	+134,99 (+520%)	-7,79 (-25%)
4	0 (0%)	0 (0%)	-33,86 (-87,49%)
5	+128,45 (+363,67%)	0 (0%)	+131,66 (+341,71%)
6	0 (0%)	-25,36 (-40%)	-33,81 (-77,72%)
7	0 (0%)	-8,05 (-28,59%)	0 (0%)
8	0 (0%)	-52,13 (-52,63%)	-31,28 (-46,16%)
9	0 (0%)	0 (0%)	-68,92 (-71,43%)
10	-67,83 (-50%)	0 (0%)	+368,22 (+253,56%)
11	-11,49 (-16,67%)	+126,44 (+220,01%)	0 (0%)
12	+115,08 (+100%)	+79,67 (+56,25%)	+221,32 (+119,05%)
13	0 (0%)	+121,09 (+123,02%)	-57,66 (-55,55%)

Tab. 27. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative alla concentrazione di **solidi sospesi totali** negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato**.

I valori della concentrazione dei SST nel controllo e nel campione in ciascun istante temporale sono rappresentati graficamente in Fig. 18; la maggior parte dei punti è situata sulla diagonale o nella regione sovrastante ad essa.

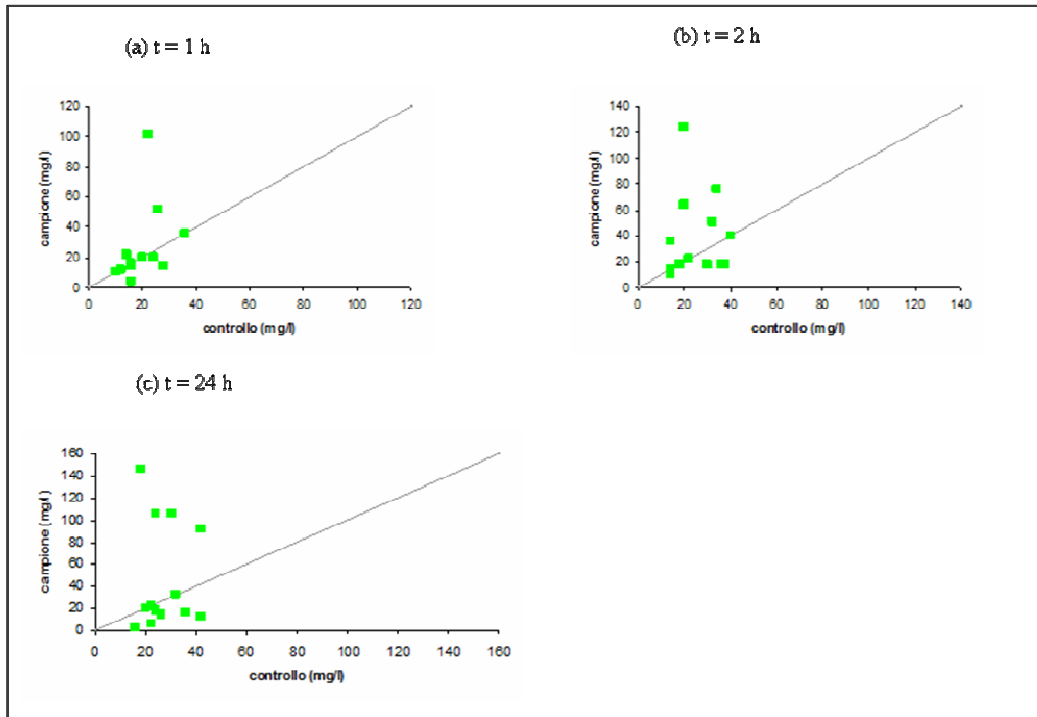


Fig. 18. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita alla concentrazione di **solidi sospesi totali**, testata durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato**.

A tutti gli istanti temporali, gli organismi-test mostrano buone capacità di ritenzione nei confronti di **cellule batteriche**, da essi utilizzate anche come fonte di nutrimento. Le percentuali di riduzione della concentrazione di *Escherichia coli* (Tab. 28), più elevate alla seconda (4-56%) che alla prima ora (2-38%), risultano estremamente variabili alla ventiquattresima ora (questa tendenza è stata riscontrata anche per i parametri descritti precedentemente): generalmente, infatti, esse assumono valori compresi tra il 3 e il 12%, ma, in due casi, l'efficienza di abbattimento risulta di gran lunga più elevata (40, 100%).

nr prova	rese UFC*10 ³ /g (%)		
	t1	t2	t24
1	-277 (-23,47%)	-373 (-30,69%)	-120 (-8,30%)
2	-122 (-22,81%)	0 (0%)	0 (0%)
3	+39 (+2,13%)	-260 (-13,33%)	-779 (-40%)
4	-484 (-11,90%)	-1017 (-24,70%)	-2663 (-100%)
5	-64 (-20%)	-209 (-56,52%)	+48 (+23,07%)
6	-275 (-24,28%)	-190 (-12,33%)	0 (0%)
7	-40 (-2,27%)	-201 (-10,75%)	-40 (-3,17%)
8	-737 (-36,36%)	+79 (+4,05%)	+26 (+1,69%)
9	-437 (-30,64%)	-138 (-11,54%)	-115 (-12,82%)
10	-388 (-12,70%)	+291 (+10%)	-97 (-4,17%)
11	-862 (-16,67%)	-1149 (-20%)	-575 (-8,33%)
12	-796 (-33,33%)	-310 (-17,50%)	-265 (-12%)
13	-461 (-38,09%)	+86,45 (+8,82%)	-115 (-3,47%)

Tab. 28. Rese depurative, espresse in UFC*10³/g di peso secco e in percentuale, relative al parametro *Escherichia coli* negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato**.

Le capacità di riduzione della carica microbica da parte degli organismi-test sono ben evidenziate dai grafici riportati qui di seguito (Fig. 18): quasi tutti i punti, infatti, si trovano al di sotto della diagonale.

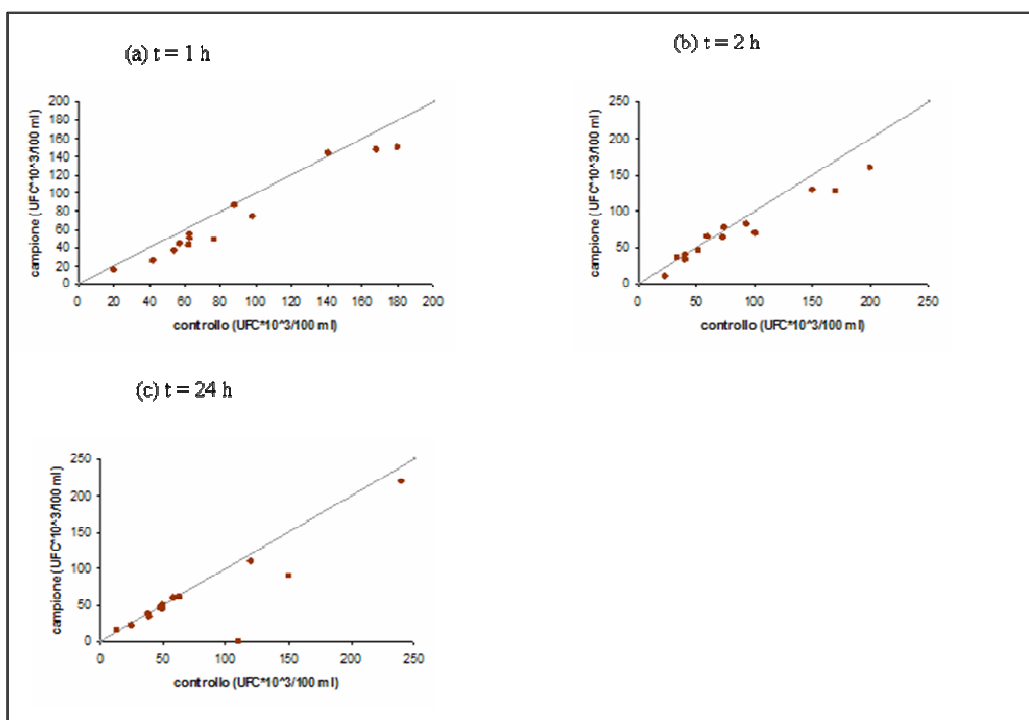


Fig. 19. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al parametro *Escherichia coli*, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato**.

2.1.3. Esperimenti con liquame artificiale

Questa fase sperimentale ha avuto come obiettivo principale quello di comprendere il comportamento di colonie di organismi appartenenti alla specie *Ciona intestinalis* nei confronti di una miscela di acqua di mare e liquame artificiale con inoculo di microrganismi e di valutare l'entità delle loro risposte adattative in acque fortemente contaminate da componenti prevalentemente solubili.

La miscela utilizzata aveva un COD di circa 600 mg/l ed un contenuto proteico pari a 380–400 mg/l.

I parametri monitorati in questa fase analitica sono stati:

- salinità
- temperatura
- ossigeno disciolto
- pH
- *Escherichia coli*
- contenuto proteico.

In presenza di liquami costituiti da scarse concentrazioni di materiale particellare, è stato possibile osservare che la capacità di riduzione della concentrazione di **sostanza organica** risulta piuttosto elevata a tutti gli istanti temporali. Le rese depurative variano dal 23 al 100% durante la prima ora, dal 2 al 98% durante la seconda, e dal 27 al 100% durante la ventiquattresima ora (Tab. 29). Questi risultati lasciano ipotizzare che in presenza di componenti inquinanti solubili le ascidie non necessitino di lunghi periodi di adattamento alle condizioni sperimentali, né subiscano alla ventiquattresima ora un peggioramento dello stato fisiologico, riscontrato al contrario sia visivamente che analiticamente durante gli esperimenti condotti con liquami naturali pretrattati meccanicamente.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-61,69 (-23,1%)	+20,65 (nd)	-227,18 (-68,75%)
2	+40,70 (+100%)	-122,11 (-60%)	-101,76 (-100%)
3	-265,19 (-46,64%)	-56,83 (-33,34%)	+549,32 (+69,07%)
4	-67,73 (-100%)	-16,93 (-2,13%)	-829,72 (-27,84%)
5	-904,38 (-100%)	-822,16 (-54,79%)	-739,95 (-48,65)
6	-825,37 (-79,66%)	+59,68 (+56,95)	-140,49 (-100%)
7	-58,62 (-100%)	0 (0%)	-175,87 (-71,43%)
8	-129,49 (-100%)	-284,88 (-91,67%)	+207,19 (+94,12%)
9	-129,32 (-46,15%)	-862,14 (-78,43%)	0 (0%)
10	-473,99 (-91,43%)	-59,25 (-8,89%)	-370,30 (-83,33%)
11	-1611,12 (-94,59%)	-460,32 (-38,46%)	-276,19 (-100%)

12	0 (0%)	-2099,66 (-97,83%)	-513,25 (-34,37%)
13	-396,34 (-65%)	-182,93 (-37,50%)	-426,83 (-53,85%)

Tab. 29. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative al **contenuto proteico** negli esperimenti condotti con **liquame artificiale**.

La presenza della maggior parte dei punti al di sotto della diagonale nei grafici riportati in Fig. 20 testimonia l'efficacia degli organismi-test nella rimozione della sostanza organica.

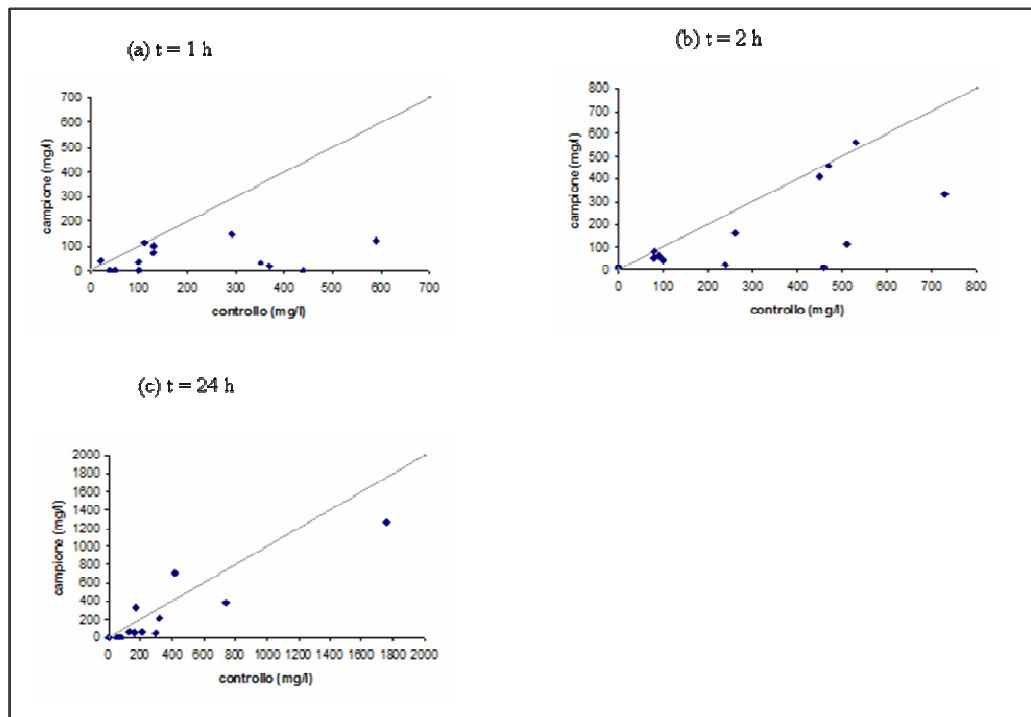


Fig. 20. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **contenuto proteico**, testato durante gli esperimenti con **liquame artificiale**.

Nei confronti della **carica microbica di origine fecale** le ascidie mostrano buone capacità filtratorie; la riduzione della concentrazione di *Escherichia coli* nel campione rispetto all'unità di controllo, infatti, si verifica nel 69% dei casi alla prima ora, nel 46% alla seconda, e nel 77% alla ventiquattresima ora. Le rese depurative,

anche in questo caso estremamente variabili, sono più elevate di quelle riscontrate negli esperimenti condotti con le altre tipologie di liquame civile nonostante il grado di inquinamento da sostanza organica nel liquame sintetico sia inizialmente più elevato (Tab. 30): esse variano dal 9 al 100% durante la prima ora, dal 40 al 100% durante la seconda (solo in un caso la resa risulta pari al 16%), e dal 2 all'83% alla ventiquattresima.

nr prova	rese UFC*10 ⁴ /g (%)		
	t1	t2	t24
1	+104 (+45,45%)	+21 (+8,33%)	0 (0%)
2	-20 (-10%)	-265 (-51,96%)	+8160 (nd)
3	-75 (-30,81%)	+75 (+40,01%)	-4906 (-31,67%)
4	-102 (-33,43%)	+34 (+13,33%)	0 (0%)
5	-61 (-75,41%)	+20 (+10%)	-4694 (-65,71%)
6	0 (0%)	+89 (+100%)	-1607 (-50%)
7	+23 (+25%)	-23 (-16,67%)	-4235 (-51,43%)
8	-13 (-9,08%)	0 (0%)	-1558 (-48%)
9	-109 (-50%)	-152 (-53,84%)	-7139 (-44,44%)
10	+15 (+33,32%)	-60 (-50%)	-895 (-75%)
11	-45 (-100%)	0 (0%)	-591 (-81,25%)
12	-48 (-100%)	-48 (-100%)	-238 (-83,33%)
13	-250 (-36,36%)	-375 (-40%)	-4937 (-43,89%)

Tab. 30. Rese depurative, espresse in UFC*10⁴/g di peso secco e in percentuale, relative al parametro *Escherichia coli* negli esperimenti condotti con **liquame artificiale**.

I grafici riportati in Fig. 21 confermano le osservazioni precedenti; l'apparente presenza di un minor numero di punti in alcuni grafici (come quello riferito alla ventiquattresima ora) è dovuta alla loro sovrapposizione, che si verifica quando, in più esperimenti, i valori nel controllo e nel campione risultano molto simili tra loro.

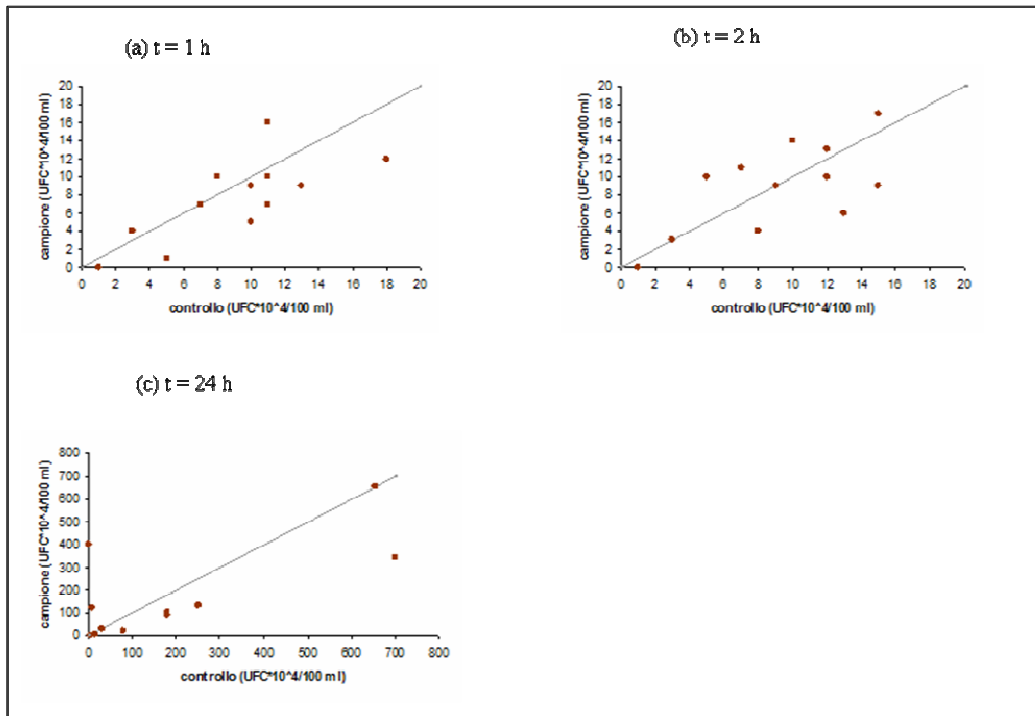


Fig. 21. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al parametro *Escherichia coli*, testato durante gli esperimenti con **liquame artificiale**.

2.2. Esperimenti con liquami misti

Come è stato già accennato precedentemente, questa fase sperimentale è finalizzata a comprendere se la presenza di cromo esavalente nella miscela di acqua di mare e liquame possa influenzare il comportamento degli organismi-test, diminuendo o inibendo l'efficienza depurativa nei confronti degli inquinanti presenti nei liquami, e se le ascidie possano contribuire alla rimozione di cromo tramite fenomeni di bioaccumulo. A tale scopo è stato utilizzato liquame misto (civile ed industriale) composto da liquame naturale biologicamente ossidato e dalla componente tossica rappresentata dal Cr(VI); inoltre, si è avuta cura di preparare un liquame artificiale il

cui carico inquinante fosse paragonabile a quello dei reflui biologicamente ossidati (COD = 50-100 mg/l, contenuto proteico = 10-20 mg/l), in modo da rendere confrontabili i risultati con quella tipologia di esperimenti in cui si è rivelato meno elevato l'effetto negativo dovuto alla presenza di materiale in sospensione.

I parametri analizzati sono stati:

- salinità
- temperatura
- pH
- ossigeno disciolto
- contenuto proteico
- solidi sospesi totali (solo negli esperimenti condotti con liquami biologicamente depurati)
- *Escherichia coli*
- cromo esavalente.

Per ogni tipologia di liquame misto sono stati effettuati 5 esperimenti, i cui risultati sono riportati nei paragrafi successivi.

2.2.1. Esperimenti con liquami biologicamente depurati contenenti Cr(VI) in concentrazioni pari a 5 ppm

I ranges di variazione delle percentuali di abbattimento della **sostanza organica** in termini di contenuto proteico negli esperimenti condotti con liquame biologicamente depurato contenente 5 ppm di cromo esavalente sono confrontabili con quelli riscontrati nel liquame depurato privo di cromo. I valori delle rese sono più bassi e molto variabili alla prima ora (4-100%), e più elevati alla seconda (22-100%) ed alla ventiquattresima ora (23-100%; Tab. 31). Questi risultati lasciano ipotizzare che la concentrazione di cromo testata non risulti fortemente inibitrice per l'accumulo e la degradazione della sostanza organica.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-73,06 (-9,68%)	-535,80 (-28,57%)	-316,61 (-52%)

2	-1147,60 (-83,33%)	-600,28 (-97,14%)	-176,55 (-27,03%)
3	-395,67 (-100%)	-461,62 (-77,78%)	-175,85 (-27,03%)
4	-31,55 (-3,85%)	-583,67 (-100%)	-189,30 (-23,08%)
5	-251,91 (-56%)	-269,90 (-22,06%)	-305,89 (-75,81)

Tab. 31. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative al **contenuto proteico** negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

Le nuvole di punti rappresentate in Fig. 22 mostrano che l'effetto depurativo nei confronti della sostanza organica si manifesta a tutti gli istanti temporali nel 100% dei casi.

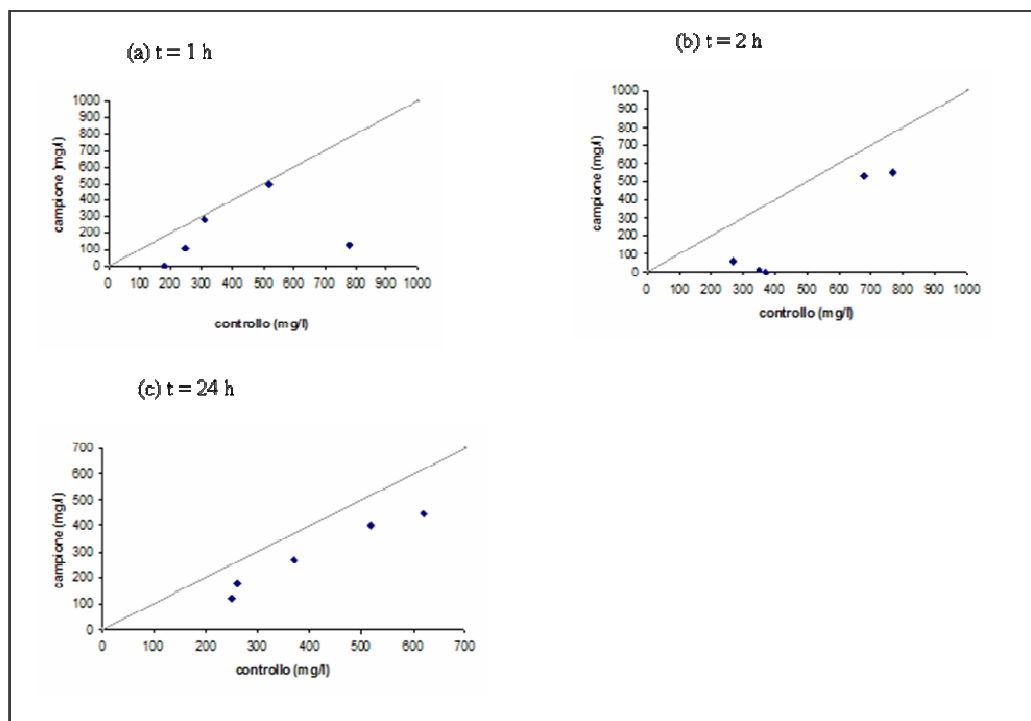


Fig. 22. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **contenuto proteico**, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato** contenente **cromo** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

Contrariamente alla sostanza organica, il parametro **SST** subisce nella maggior parte dei casi un incremento del suo valore nel campione (Tab. 32); il decremento di SST si verifica in un solo caso durante la seconda ora, quando le ascidie contribuiscono alla riduzione del 28% circa della concentrazione del materiale particellare rispetto all'unità di controllo.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	+77,93 (+5,33%)	+233,80 (+533,33%)	0 (0%)
2	+49,43 (+466,67%)	0 (0%)	0 (0%)
3	+8,79 (+33,33%)	0 (0%)	+26,38 (+8,50%)
4	0 (0%)	0 (0%)	+1,58 (+2,27%)
5	0 (0%)	-14,39 (-28,57%)	+3,60 (+8,39%)

Tab. 32. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative alla concentrazione di **solidi sospesi totali** negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

La presenza della maggior parte dei punti nella regione di spazio sovrastante la diagonale conferma le osservazioni precedenti (Fig. 23).

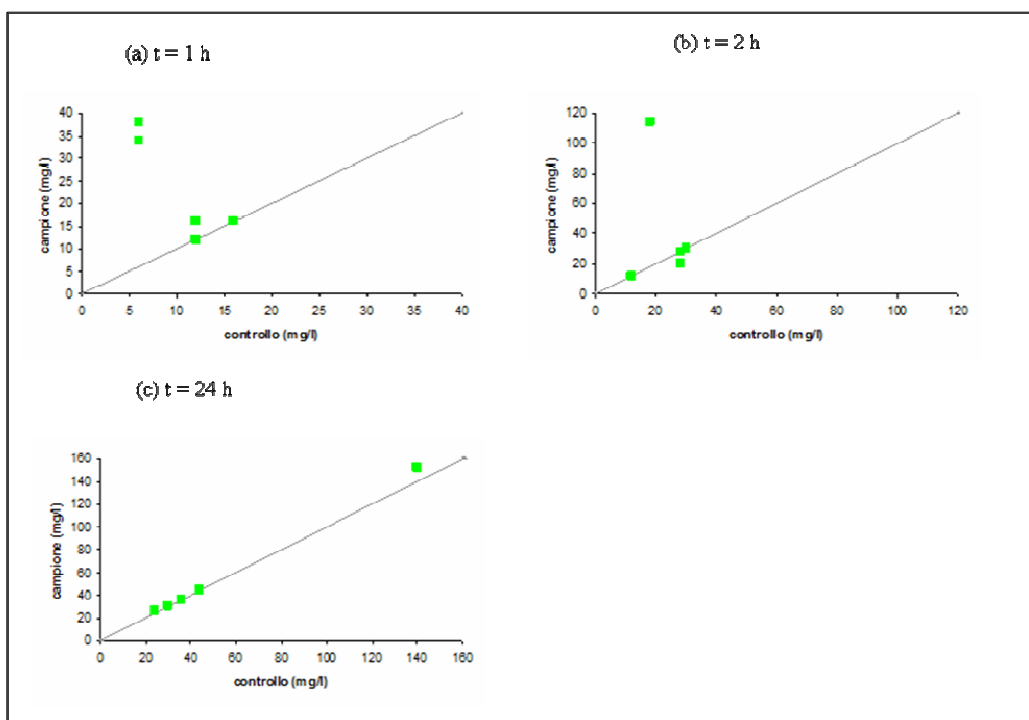


Fig. 23. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita alla concentrazione di **solidi sospesi totali**, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cromo** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

Le rese relative all'abbattimento della **carica microbica** (Tab. 33) sono più elevate alla prima ora (11-53%), e calano leggermente alla seconda (10-30%) e alla ventiquattresima ora (18-37%).

nr prova	rese UFC*10 ³ /g (%)		
	t1	t2	t24
1	-243 (-11,36%)	-803 (-30%)	+316 (+30,95%)
2	-35 (-18,18%)	-18 (-10%)	-35 (-18,18%)
3	-571 (-20,15%)	+44 (+2,15%)	0 (nd)
4	-1814 (-53,49%)	-757 (-28,91%)	-1009 (-37,43%)

5	+72 (+2,53%)	-665 (-15,61%)	-539 (-27,27%)
---	-----------------	-------------------	-------------------

Tab. 33. Rese depurative, espresse in UFC*10³/g di peso secco e in percentuale, relative al parametro *Escherichia coli* negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

I valori della concentrazione di *Escherichia coli* nel controllo e nel campione in ciascun istante temporale sono rappresentati in Fig. 24; l'efficienza depurativa delle ascidie nei confronti della carica microbica risulta evidente dal fatto che quasi tutti i punti hanno per ascissa un valore superiore a quello dell'ordinata.

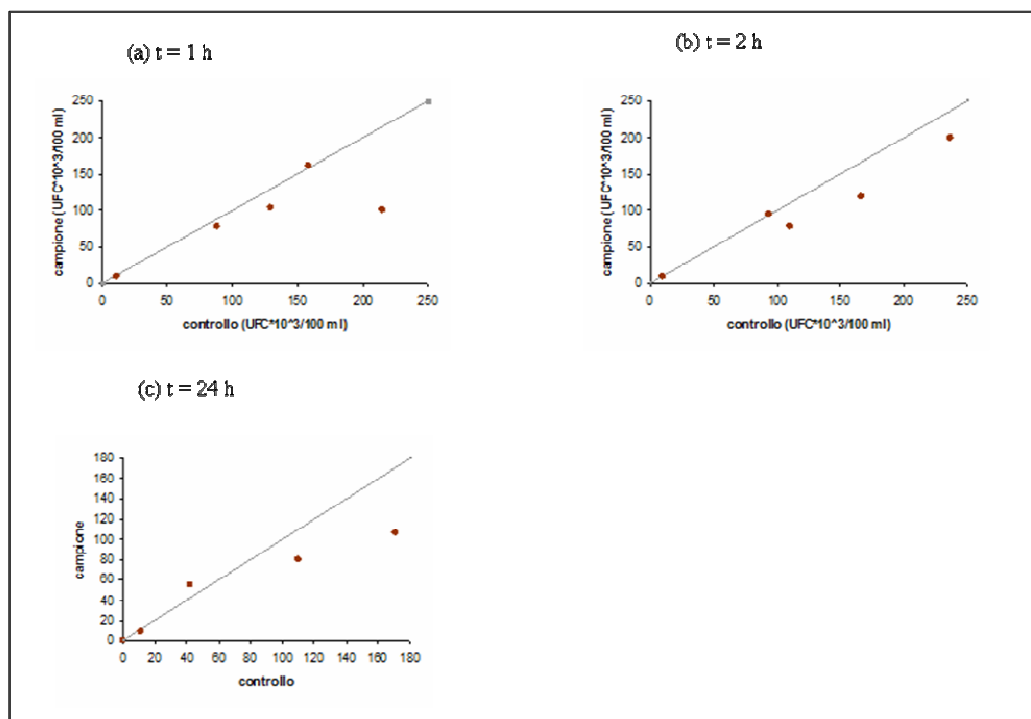


Fig. 24. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al parametro *Escherichia coli*, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cromo** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

Le percentuali di riduzione della concentrazione di **Cromo esavalente** (Tab. 34) sono comparabili a tutti gli istanti temporali (1-30% alla prima, 4-24% alla seconda e 4-29% alla ventiquattresima ora).

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-4,57 (-30,49%)	-2,51 (-24,09%)	-2,37 (-29,58%)
2	-1,99 (-17,92%)	-1,97 (-19,01%)	-1,10 (-9,65%)
3	+0,002 (+0,0002%)	-0,58 (-8,61%)	-1,03 (-17,81%)
4	-0,90 (-7,62%)	-2,45 (-21,16%)	-1,10 (-8,93%)
5	-0,16 (-1,48%)	-0,49 (-4,29%)	-0,55 (-4,54%)

Tab. 34. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative alla concentrazione di **Cromo esavalente** negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

I grafici relativi alla concentrazione di cromo esavalente mostrano che la concentrazione di tale parametro risulta costantemente più bassa nel campione a ciascun istante temporale (Fig. 25).

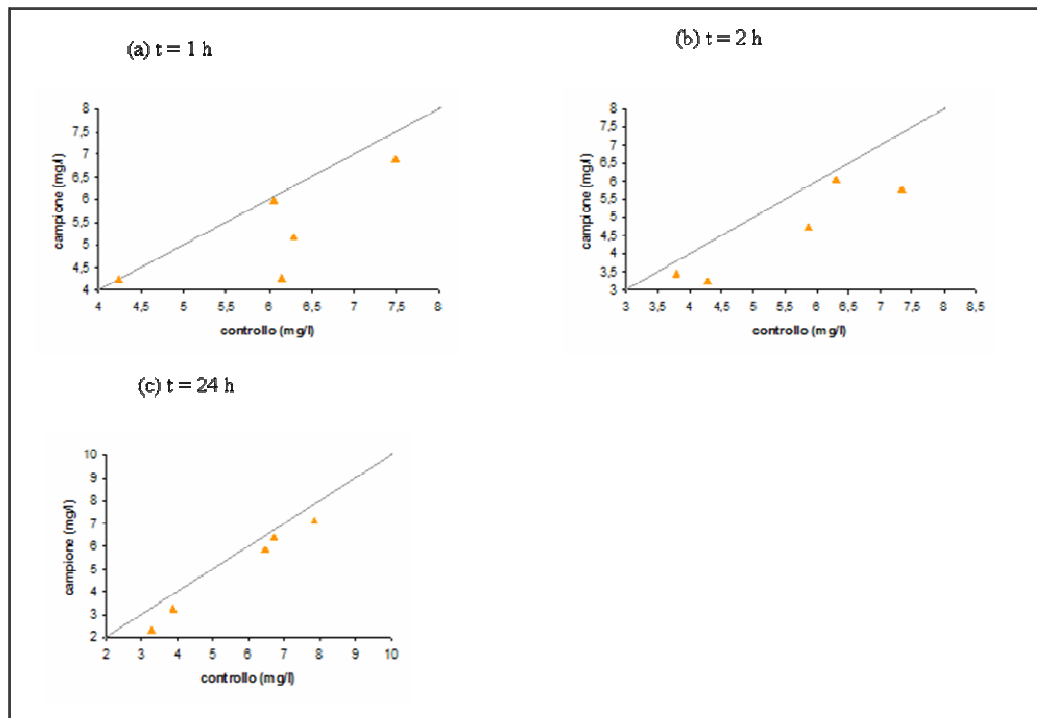


Fig. 25. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **cromo esavalente**, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato** contenente **cromo** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

2.2.2. Esperimenti con liquami biologicamente depurati contenenti Cr(VI) in concentrazioni pari a 10 ppm

Gli esperimenti sono stati condotti monitorando i medesimi parametri degli esperimenti precedenti, ma raddoppiando le concentrazioni di cromo esavalente nella miscela di acqua di mare e liquame.

Le percentuali di abbattimento relative al **contenuto proteico** (Tab. 35) risultano elevate alla prima (30-98%) ed alla seconda ora (50-100%), e subiscono una diminuzione alla ventiquattresima ora (5-71%); ciò lascia ipotizzare che concentrazioni pari a circa 10 ppm di Cr(VI) possano avere, al trascorrere del tempo, effetti inibitori sulle capacità di accumulo degli organismi-test.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-493,08 (-76%)	-1155,48 (-89,28%)	-23,11 (-5%)
2	0 (0%)	-304,49 (-100%)	+405,99 (+123,76%)
3	-1013,39 (-97,73%)	-329,94 (-50%)	-235,67 (-38,46%)
4	-123,66 (50%)	-164,88 (-66,67%)	-350,37 (-70,83%)
5	-562,32 (-30%)	+70,29 (+9,09%)	-140,58 (-31,58%)

Tab. 35. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative al **contenuto proteico** negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

I valori della concentrazione della sostanza organica nel controllo e nel campione in ciascun istante temporale sono rappresentati in Fig. 26; le basse concentrazioni della sostanza organica nel campione ai primi istanti temporali sono ben rappresentate dalla posizione di molti punti in prossimità dell'asse delle ascisse (valori bassi dell'ordinata); alla ventiquattresima ora, invece, la vicinanza della maggior parte dei punti alla diagonale è indice della diminuzione dell'entità delle rese depurative.

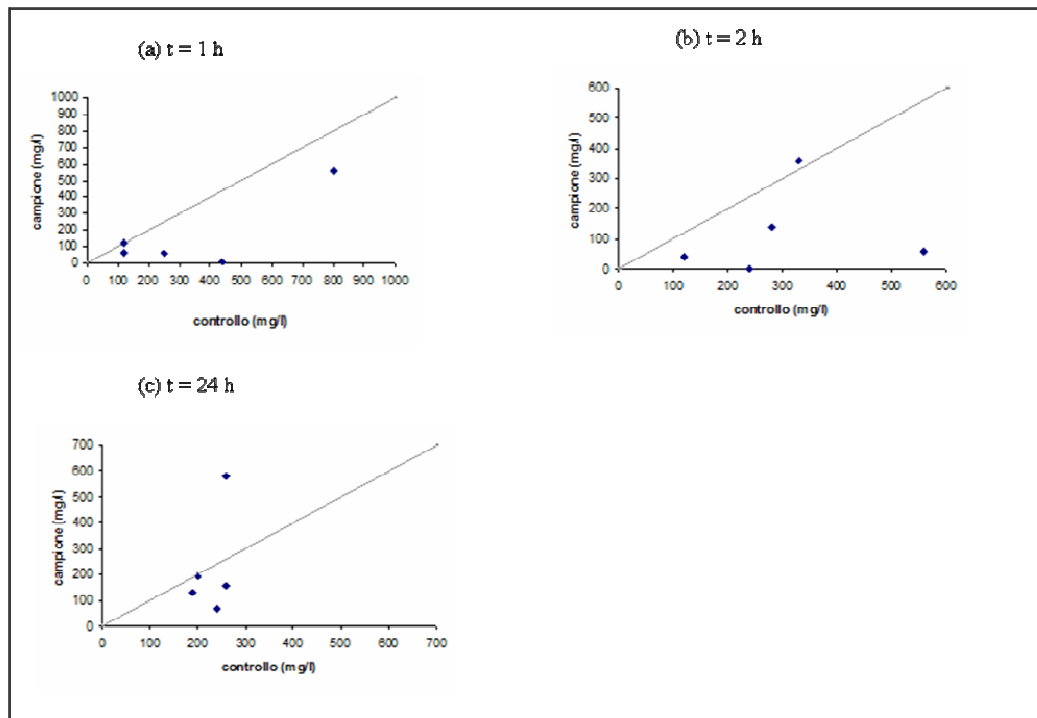


Fig. 26. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **contenuto proteico**, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato** contenente **romo** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

Riguardo all'andamento degli **SST**, è stato osservato un incremento significativo della concentrazione di tale parametro nell'unità-campione (Tab. 36), reso visibile anche dalla formazione di aggregati mucilluginosi simili a quelli riscontrati durante gli esperimenti condotti con liquami civili pretrattati meccanicamente (l'effetto depurativo si verifica solo in un caso alla ventiquattresima ora, con riduzione del 35% del materiale particolato).

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	0 (0%)	+138,66 (+230,77%)	+272,69 (+590%)
2	+119,25 (+361,54%)	+71,05 (+233,33%)	+43,14 (+35,42%)
3	0 (0%)	+94,27 (+66,67%)	-89,55 (-35,18%)
4	0 (0%)	0 (0%)	+239,08 (+414,28%)

5	0 (0%)	+0,015 (+4,68%)	+243,67 (+520%)
---	-----------	--------------------	--------------------

Tab. 36. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative alla concentrazione di **solidi sospesi totali** negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

L'incremento significativo degli SST nel campione rispetto all'unità di controllo è ben evidente nei grafici riportati in Fig. 27, nei quali quasi tutti i punti si trovano al di sopra della diagonale.

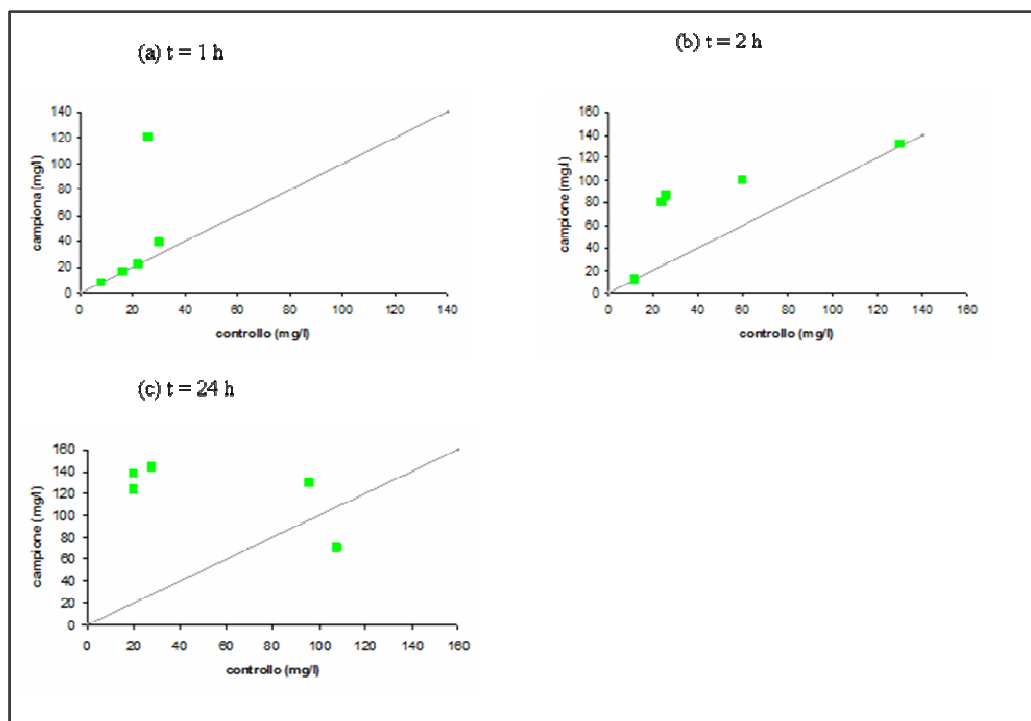


Fig. 27. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita alla concentrazione di **solidi sospesi totali**, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato** contenente **cromo** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

Analogamente a quanto si verifica durante gli esperimenti condotti con liquami depurati contenenti 5 ppm di cromo esavalente, l'entità delle rese relative all'abbattimento della **carica batterica** (Tab. 37) risulta più elevata alla prima ora (11-34%); le percentuali di abbattimento subiscono una lieve diminuzione alla seconda ora (2-13%); nei primi istanti temporali, inoltre, la concentrazione di

Escherichia coli nel campione non è mai superiore a quella riscontrata nel controllo, mentre alla ventiquattresima ora la riduzione della carica microbica di origine fecale (6-26%) si verifica in 3 casi su 5.

nr prova	rese UFC*10 ³ /g (%)		
	t1	t2	t24
1	-462 (-11,17%)	-600 (-12,26%)	+231 (+5%)
2	-254 (-26,07%)	139 (-13,09%)	-406 (-26,23%)
3	-259 (-10,89%)	0 (0%)	-401 (-16,50%)
4	-577 (-26,67%)	-41 (-2,30%)	-62 (-5,77%)
5	-468 (-33,90%)	-94 (-7,02%)	+234 (+33,33%)

Tab. 37. Rese depurative, espresse in UFC*10³/g di peso secco e in percentuale, relative al parametro *Escherichia coli* negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

I valori della concentrazione della carica microbica nel controllo e nel campione in ciascun istante temporale sono rappresentati in Fig. 28. La vicinanza alla diagonale della maggior parte dei punti è indice della bassa entità delle rese depurative.

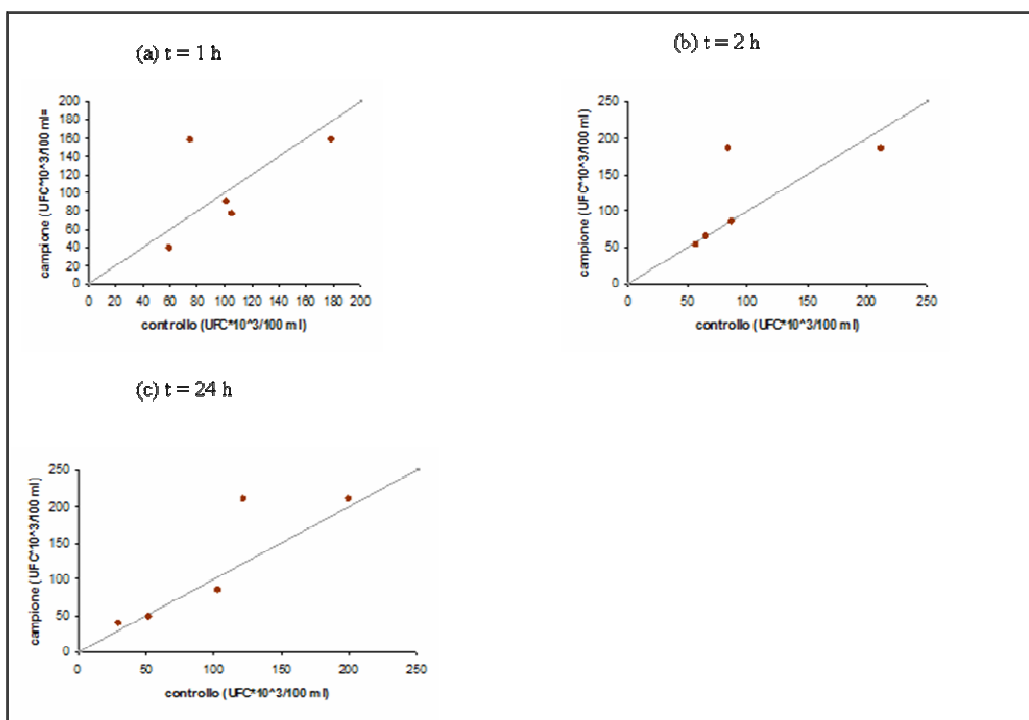


Fig. 28. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al parametro *Escherichia coli*, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato** contenente **chromo** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

Le rese depurative relative alla concentrazione di **chromo esavalente** (Tab. 38) – sempre inferiori al 15% - sono comparabili a tutti gli istanti temporali (4-10% alla prima ora, 3-13% alla seconda ora, 4-15% alla ventiquattresima ora). Questi valori risultano inferiori alle percentuali di abbattimento riscontrate con 5 ppm di chromo nella miscela.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-2,29 (-8,55%)	-1,43 (-5,36%)	-1,76 (-6,57%)
2	-0,68 (-4,57%)	-0,45 (-3%)	-1,68 (-12,54%)
3	1,89 (-6,40%)	-3,77 (-12,78%)	-1,04 (-4,29%)
4	-1,26 (-5,06%)	-0,73 (-3,16%)	-3,58 (-14,76%)

5	-2,98 (-9,93%)	-1,59 (-5,51%)	-2,56 (-8,84%)
---	-------------------	-------------------	-------------------

Tab. 38. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative alla concentrazione di **Cromo esavalente** negli esperimenti condotti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

Tuttavia, anche se i valori della resa superano raramente il 10%, la concentrazione del metallo nel campione è risultata sempre inferiore a quella riscontrata nell'unità di controllo (Fig. 29).

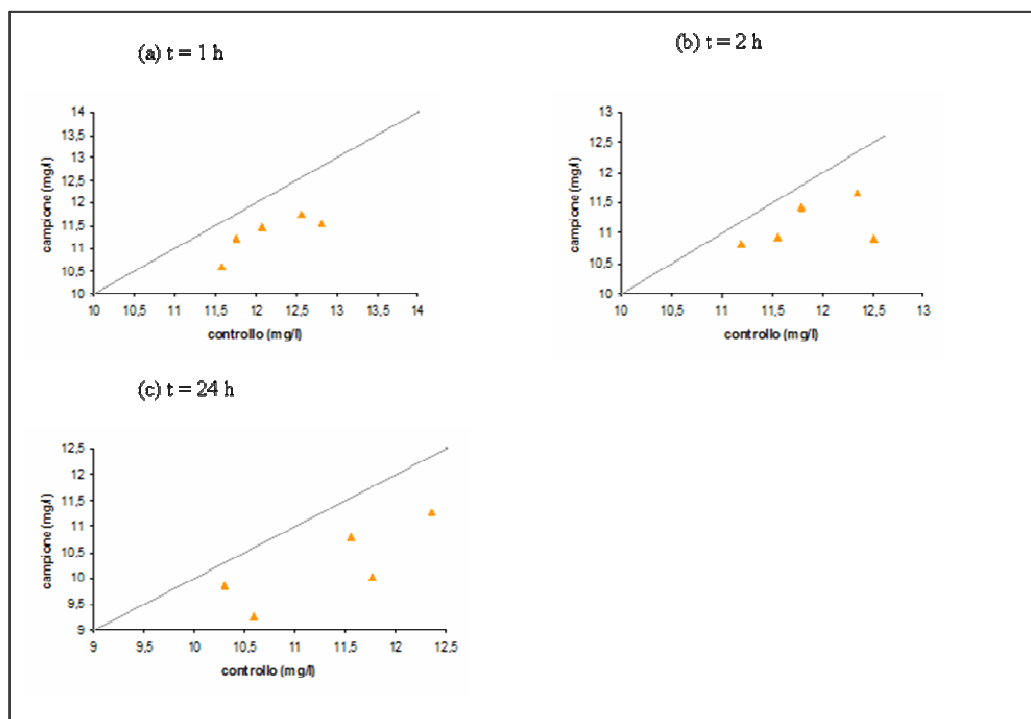


Fig. 29. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **Cromo esavalente**, testato durante gli esperimenti con **liquame biologicamente depurato** contenente **Cromo** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

2.2.3. Esperimenti con liquami artificiali contenenti Cr(VI) in concentrazioni pari a 5 ppm

Le percentuali di abbattimento relative alla concentrazione delle **proteine** negli esperimenti condotti con liquami artificiali contenenti circa 5 ppm di Cr(VI) (Tab.

39) risultano piuttosto elevate (33-100% alla prima ora, 50-100% alla seconda ora, 18-100% alla ventiquattresima ora).

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-49,54 (-33,33%)	-313,78 (-50%)	-82,57 (-17,86%)
2	-268,49 (-66,67%)	-287,66 (-83,33%)	-76,71 (-40%)
3	-158,87 (-100%)	-39,97 (-100%)	-139,89 (-50%)
4	-190,51 (-100%)	-105,84 (-71,43%)	-21,17 (-100%)
5	-18,66 (-100%)	-37,31 (-100%)	-37,31 (-100%)

Tab. 39. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative al **contenuto proteico** negli esperimenti condotti con **liquame artificiale** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

I valori della concentrazione delle proteine nel controllo e nel campione in ciascun istante temporale sono rappresentati in Fig. 30; la presenza di molti punti in prossimità o addirittura sull'asse delle ascisse (ordinata bassa o nulla) a ciascun istante temporale è indice della soddisfacente entità delle rese.

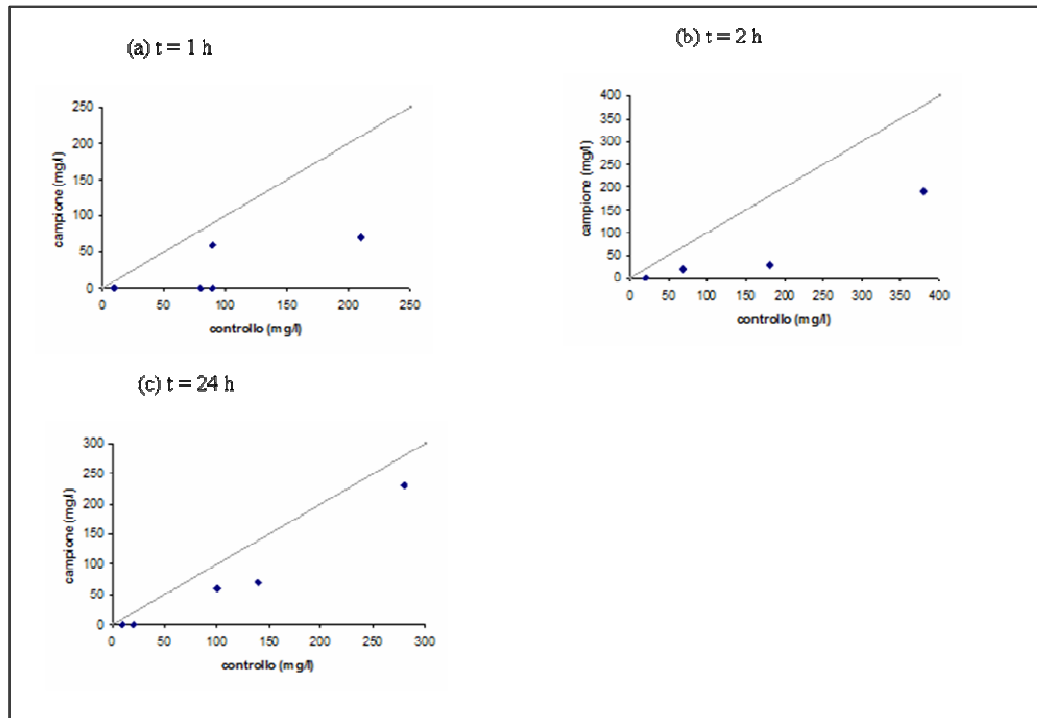


Fig. 30. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **contenuto proteico**, testato durante gli esperimenti con **liquame artificiale** contenente **chromo** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

Rispetto al liquame ossidato biologicamente contenente la medesima concentrazione di chromo esavalente, le percentuali di abbattimento nei confronti della **carica batterica** (Tab. 40) risultano più elevate a ciascun istante temporale. L'incremento della concentrazione di *Escherichia coli* si verifica in rarissimi casi (una volta alla prima ed una volta alla ventiquattresima ora), ma, in generale, le rese variano tra il 14 e il 72% alla prima ora, tra il 24 e il 76% alla seconda, e tra il 17 e l'82% alla ventiquattresima.

nr prova	rese UFC*10 ³ /g (%)		
	t1	t2	t24
1	-66 (-14,28%)	-165 (-24,39%)	-430 (-40,62%)
2	-2246 (-71,78%)	-1574 (-52,23%)	-4741 (-82,33%)
3	+240 (+42,86%)	-460 (-33,82%)	-800 (-38,46%)

4	-508 (-28,23%)	-635 (-32,97%)	+106 (+7,46%)
5	-1866 (-71,43%)	-2705 (-76,31%)	-373 (-16,67%)

Tab. 40. Rese depurative, espresse in $\text{UFC} \cdot 10^3/\text{g}$ di peso secco e in percentuale, relative al parametro *Escherichia coli* negli esperimenti condotti con **liquame artificiale** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

La presenza della maggior parte dei punti nella regione sottostante la diagonale (Fig. 31) indica che gli effetti depurativi sono quasi sempre verificati.

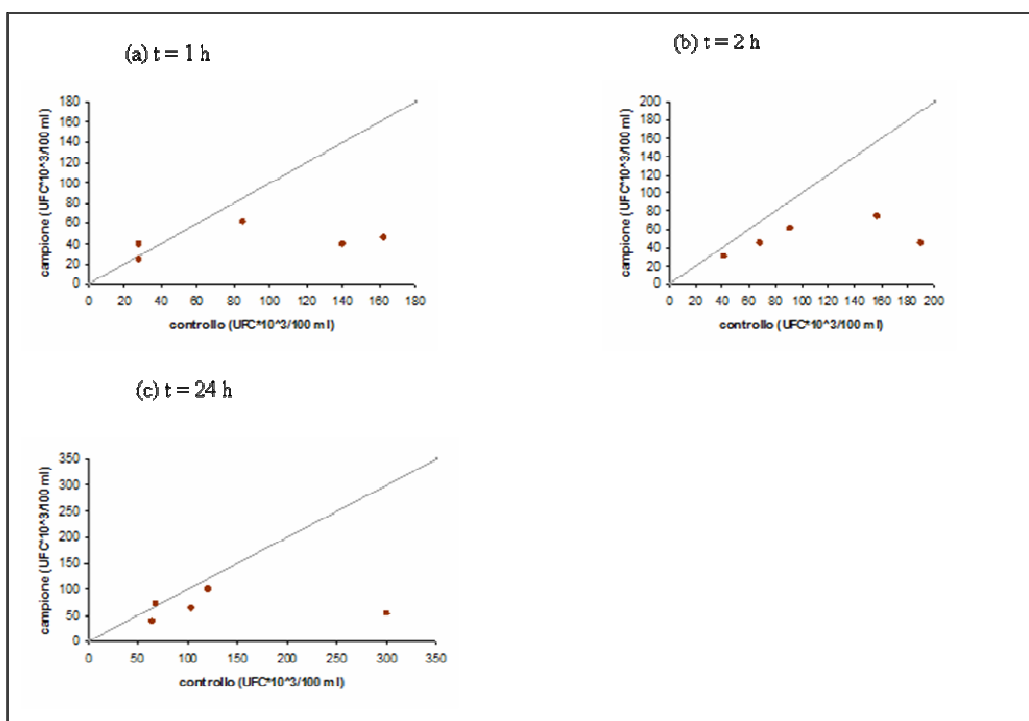


Fig. 31. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al parametro *Escherichia coli*, testato durante gli esperimenti con **liquame artificiale** contenente **Cromo** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

I risultati relativi all'abbattimento da parte delle ascidie della concentrazione di **Cromo esavalente** nella miscela di acqua di mare e liquame (Tab. 41) evidenziano che le rese ottenute sono confrontabili a tutti gli istanti temporali: 3-10% alla prima ora, 7-14% alla seconda ora (durante la quale si verifica un unico caso in cui essa è prossima allo zero), 8-23% alla ventiquattresima ora.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-1,11 (-9,98)	-0,10 (-0,01)	-0,94 (-10,93%)
2	-0,80 (-6,53%)	-1,83 (-14,29%)	-2,65 (-22,96%)
3	-0,36 (-2,98%)	-0,88 (-7,89%)	-3,00 (-30,67%)
4	-0,62 (-4,95%)	-1,00 (-7,94%)	-1,14 (-8,49%)
5	-1,20 (-9,28%)	-0,84 (-7,59%)	-2,64 (-21,91%)

Tab. 41. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative alla concentrazione di **Cromo esavalente** negli esperimenti condotti con **liquame artificiale** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

Anche in questo caso, analogamente a quanto accade negli esperimenti condotti con liquami naturali depurati per via biologica, la riduzione della concentrazione di cromo si verifica in tutte le prove analitiche e a ciascun istante temporale (Fig. 32).

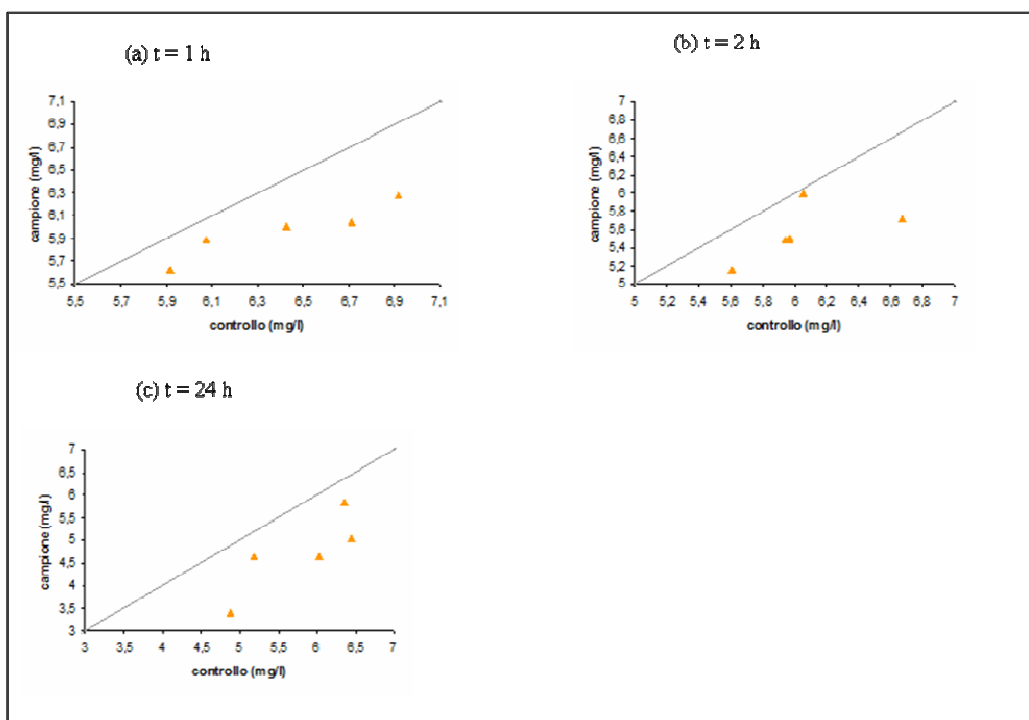


Fig. 32. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **Cromo esavalente**, testato durante gli esperimenti con **liquame artificiale** contenente **Cromo** in concentrazione pari a circa **5 ppm**.

2.2.4. Esperimenti con liquami artificiali contenenti Cr(VI) in concentrazioni pari a 10 ppm

Analogamente alle prove condotte con liquami biologicamente depurati di tipo misto, gli esperimenti sono stati ripetuti raddoppiando la concentrazione di Cr(VI) per individuare eventuali variazioni nell'efficienza di filtrazione degli organismi-test.

Le rese depurative relative alla concentrazione di **sostanza organica** negli esperimenti condotti con liquami artificiali contenenti circa 10 ppm di Cr(VI) (Tab. 42) sono estremamente variabili alla prima ora (17-100%), variano in un range più ristretto sia alla seconda ora (40-76%) che alla ventiquattresima ora (80-98%): esse sono generalmente più basse delle percentuali di abbattimento riscontrate negli esperimenti condotti con liquami sintetici contenenti concentrazioni di cromo pari a 5 ppm, mentre risultano più elevate rispetto a quelle registrate utilizzando liquame depurato contenente la stessa concentrazione di cromo esavalente. Si può dedurre il verificarsi di un'amplificazione degli effetti nel caso in cui si sommi la presenza del

cromo e quella dei solidi sospesi, anche se in concentrazione non eccessivamente elevata.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-122,67 (-100%)	-40,89 (-40%)	-490,68 (-80%)
2	-123,44 (-27,27%)	-164,58 (-44,44%)	-267,44 (-92,86%)
3	-331,65 (-100%)	+18,45 (+11,11%)	+184,50 (+125%)
4	-117,29 (-16,67%)	-1055,59 (-76,59%)	-1847,29 (-98,43%)
5	-440,98 (-32,50%)	-542,74 (-64%)	-1221,17 (-81,82%)

Tab. 42. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative al **contenuto proteico** negli esperimenti condotti con **liquame artificiale** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

I valori della concentrazione delle proteine nel controllo e nel campione sono rappresentati nei grafici riportati Fig. 33. La posizione della maggior parte dei punti al di sotto della retta $y = x$ indica che l'effetto depurativo è quasi sempre verificato.

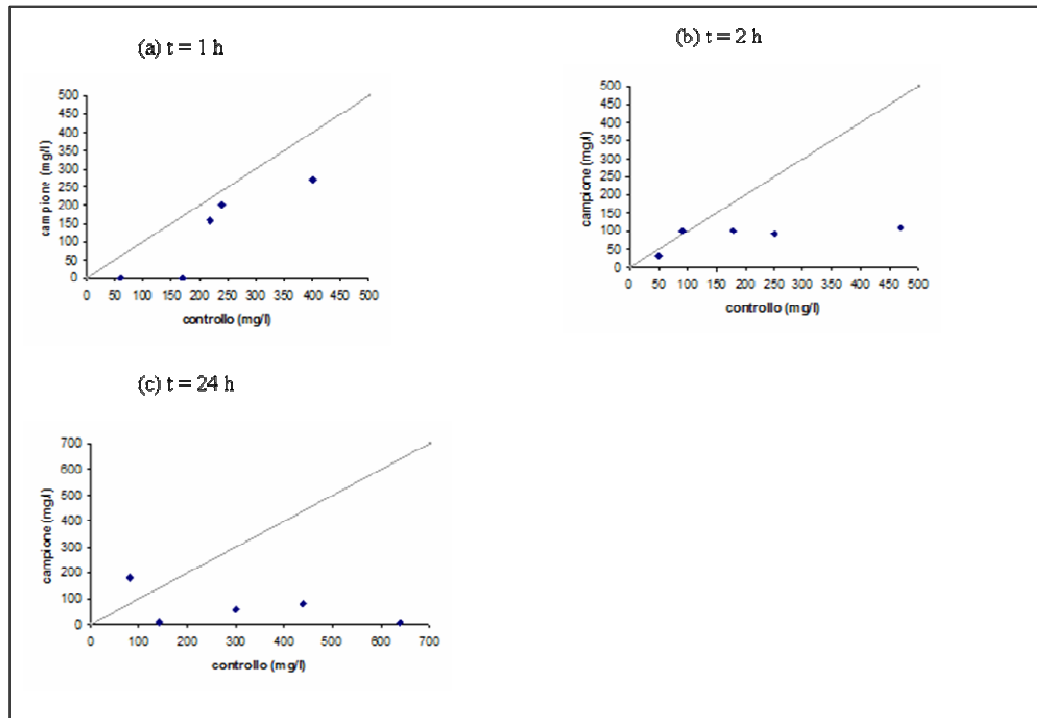


Fig. 33. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **contenuto proteico**, testato durante gli esperimenti con liquame artificiale contenente **romo** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

L'analisi dei risultati relativi al parametro microbiologico *Escherichia coli* ha evidenziato che le rese depurative aumentano in numero e in entità al trascorrere del tempo. Alla prima ora l'effetto depurativo si è manifestato solo in un caso (11%). Le rese variano dal 9 al 38% alla seconda ora e dal 20 al 60% alla ventiquattresima ora (Tab. 43). Pertanto, rispetto alle percentuali di abbattimento ottenute negli esperimenti con liquame depurato contenente circa 10 ppm di cromo esavalente, esse risultano confrontabili ai primi istanti temporali, e superiori alla ventiquattresima ora.

nr prova	rese UFC*10 ³ /g (%)		
	t1	t2	t24
1	0 (0%)	0 (0%)	-1226,99 (-20%)
2	0 (0%)	-432,10 (-18,92%)	-3703,70 (-60%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

4	-175,95 (-11,54%)	-703,81 (-38,09%)	-410,56 (-30,43%)
5	+33,90 (+2,94%)	-305,08 (-20%)	+169,49 (+18,52%)

Tab. 43. Rese depurative, espresse in UFC*10³/g di peso secco e in percentuale, relative al parametro *Escherichia coli* negli esperimenti condotti con **liquame artificiale** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

I risultati relativi all'abbattimento della carica microbica sono riportati in Fig. 30; i punti ricadenti sulla diagonale dei grafici, particolarmente numerosi alla prima ora, rappresentano i casi in cui la resa depurativa è pari a zero (Fig. 34).

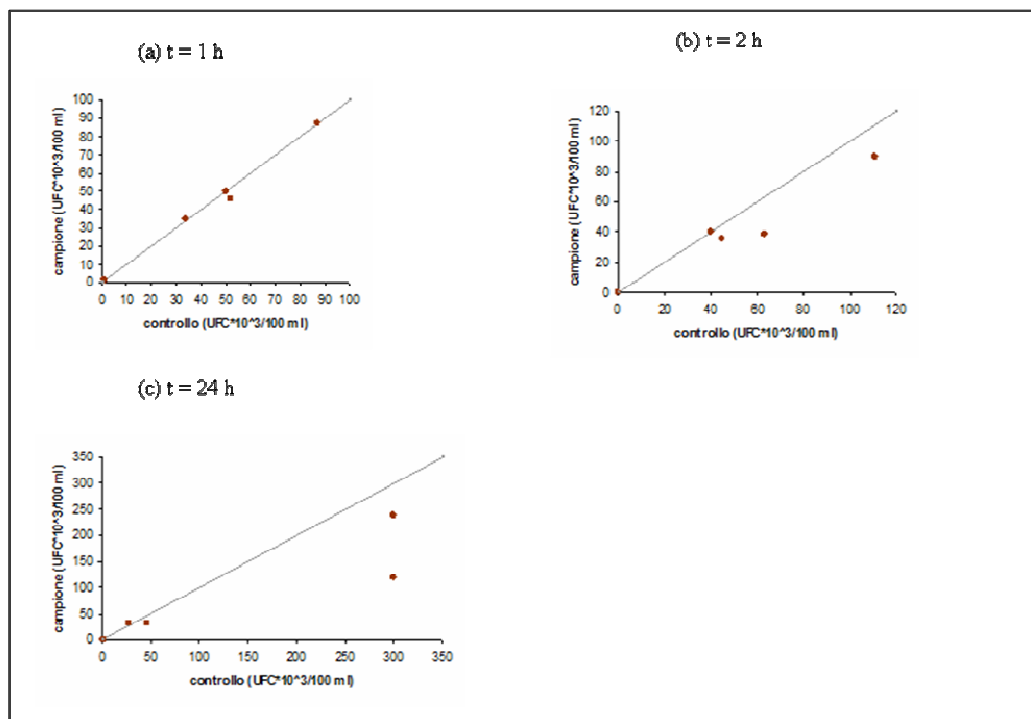


Fig. 34. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al parametro *Escherichia coli*, testato durante gli esperimenti con liquame artificiale contenente **chromo** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

Le percentuali di abbattimento relative al **chromo esavalente** (Tab. 44) sono confrontabili alla prima (2-18%) e alla seconda ora (3-13%), e risultano più elevate e variabili alla ventiquattresima ora (4-31%). I valori calcolati risultano molto simili a

quelli riscontrati negli esperimenti effettuati con liquami artificiali contenenti 5 ppm di cromo; ciò lascia supporre che, in presenza di liquami sintetici con componenti prevalentemente solubili, l'abbattimento di questo parametro da parte degli organismi-test sia poco dipendente dalla concentrazione saggiata.

nr prova	rese mg/g (%)		
	t1	t2	t24
1	-3,69 (-17,82%)	-2,70 (-13,06%)	-0,86 (-3,87%)
2	-2,64 (-10,12%)	-2,56 (-9,86%)	+0,08 (+0,0002%)
3	-1,13 (-5,66%)	-1,18 (-6,25%)	-5,98 (-31,24%)
4	-0,03 (-0,0009%)	-2,28 (-9,47%)	-2,76 (-11,14%)
5	-0,60 (-1,96%)	-1,01 (-3,39%)	-1,58 (-5,55%)

Tab. 44. Rese depurative, espresse in mg/g di peso secco e in percentuale, relative alla concentrazione di **cromo esavalente** negli esperimenti condotti con **liquame artificiale** contenente **Cr(VI)** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

I valori della concentrazione del metallo nel controllo e nel campione sono rappresentati dai grafici a dispersione riportati in Fig. 35. Tranne che in un caso, nell'unità-campione la concentrazione di cromo esavalente risulta costantemente più bassa rispetto a quella dell'unità di controllo.

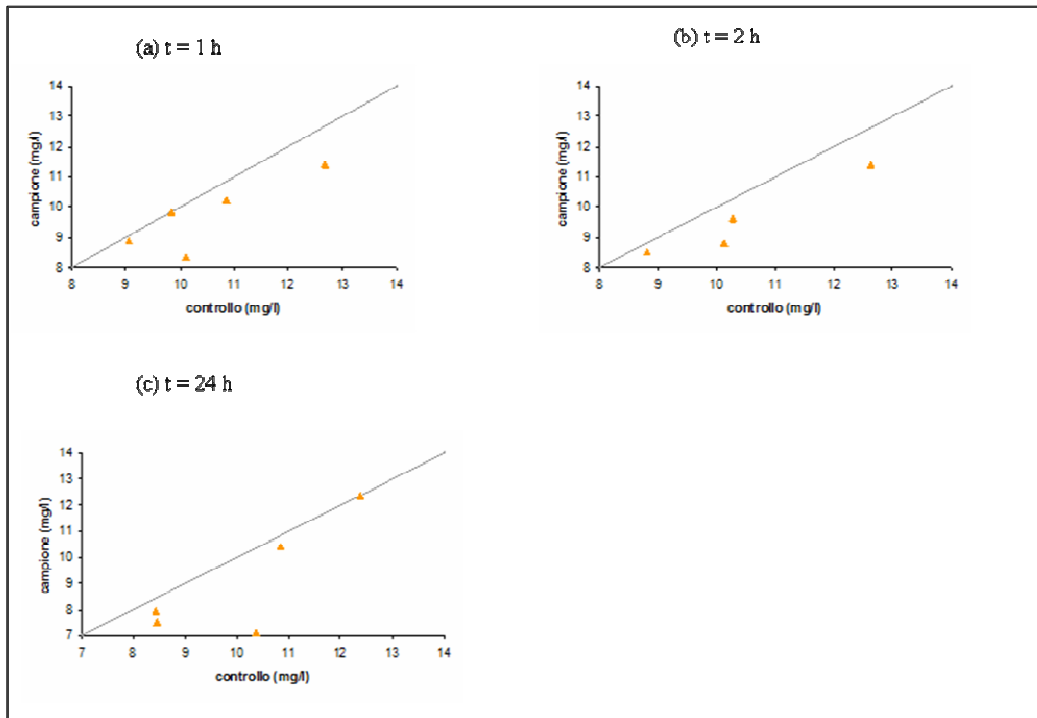


Fig. 35. Rappresentazione grafica a dispersione, riferita al **Cromo esavalente**, testato durante gli esperimenti con liquame artificiale contenente **Cromo** in concentrazione pari a circa **10 ppm**.

2.3. Sintesi e commento dei risultati

Nelle tabelle riportate qui di seguito (Tab. 45, 46) sono schematizzati i risultati finora discussi, relativi ai ranges di variazione delle rese depurative calcolate negli esperimenti condotti con liquami civili e con liquami misti.

I valori evidenziati in azzurro, rosso, verde e rosa rappresentano le rese depurative più elevate riscontrate rispettivamente per le proteine, i solidi sospesi totali, la carica batterica di origine fecale e il Cr(VI).

		Liquami civili – rese depurative (%)		
tempo	parametro	Liq. Nat. Pretrattati	Liq. Nat. Depurati	Liq. Artificiali
t1	proteine	6-28	16-100	23-100
	SST	13-35	12-50	N.D.
	<i>E. coli</i>	14-39	2-38	9-100
t2	proteine	11-70	4-100	2-98
	SST	2-69	28-53	N.D.
	<i>E. coli</i>	25-71	4-56	40-100
t24	proteine	4-50	5-100	27-100
	SST	16-59	25-87	N.D.
	<i>E. coli</i>	8-80	3-100	2-83

Tab. 45. Schema riassuntivo relativo alle rese depurative calcolate durante gli esperimenti condotti con liquami civili.

			Liquami misti – rese depurative (%)	
[Cr(VI)]	tempo	parametro	Liq. Nat. Biodepurati	Liq. Artificiali
5 ppm	t1	proteine	4-100	33-100
		SST	0	N.D.
		<i>E. coli</i>	11-53	14-72
		Cr(VI)	1-30	3-10
	t2	proteine	22-100	50-100
		SST	28	N.D.
		<i>E. coli</i>	10-30	24-76
		Cr(VI)	4-24	7-14
	t24	proteine	23-100	18-100
		SST	0	N.D.
		<i>E. coli</i>	18-37	17-82
		Cr(VI)	4-29	8-23
10 ppm	t1	proteine	30-98	17-100
		SST	0	N.D.
		<i>E. coli</i>	11-34	11
		Cr(VI)	4-10	2-18
	t2	proteine	50-100	40-76
		SST	0	N.D.
		<i>E. coli</i>	2-13	9-38
		Cr(VI)	3-13	3-13
	t24	proteine	5-71	80-98
		SST	35	N.D.
		<i>E. coli</i>	6-26	20-60

		Cr(VI)	4-15	4-31
--	--	--------	------	------

Tab. 46. Schema riassuntivo relativo alle rese depurative calcolate durante gli esperimenti condotti con liquami misti.

Per facilitare ulteriormente la lettura dei risultati sperimentali, il contributo alla depurazione di *Ciona intestinalis* è stato indicato mediante quattro “classi di giudizio” (Tab. 47) tenendo conto del seguente criterio:

- contributo nullo: resa depurativa = 0;
- contributo mediocre : resa depurativa < 40%;
- contributo buono: resa depurativa = 40-60%;
- contributo ottimo: resa depurativa > 60%.

Accanto a ciascun giudizio, è rappresentato, tra parentesi, l’istante temporale in cui si raggiungono i picchi delle rese depurative.

	Parametri			
	s. org. (proteine)	SST	E. coli	Cr(VI)
Liq. Nat. Pretrattato	buono (2 h)	mediocre (24 h)	buono (2 h)	N. D.
Liq. Nat. Biodepurato	buono (1 h)	buono (24 h)	buono (24 h)	N. D.
Liq. Artificiale	buono (24 h)	N. D.	ottimo (2 h)	N. D.
Liq. Nat. Biodepurato + Cr(VI) 5 ppm	ottimo (24 h)	mediocre (2 h)	mediocre (1 h)	mediocre (24 h)
Liq. Nat. Biodepurato + Cr(VI) 10 ppm	ottimo (2 h)	mediocre (24 h)	mediocre (24 h)	mediocre (24 h)
Liq. Artificiale + Cr(VI) 5 ppm	ottimo (24 h)	N. D.	buono (2 h)	mediocre (24 h)
Liq. Artificiale + Cr(VI) 10 ppm	ottimo (24 h)	N. D.	buono (24 h)	mediocre (24 h)

Tab. 47. “Classi di giudizio” relative al contributo depurativo di *Ciona intestinalis* negli esperimenti condotti con liquami civili e misti.

La suddivisione in classi di giudizio delle rese depurative conferma l’elevata efficienza di *Ciona intestinalis* nei confronti della sostanza organica, sia negli esperimenti condotti con liquami civili che con liquami misti, e la scarsa capacità di rimozione del particolato in sospensione. La capacità depurativa degli organismi-test nei confronti della carica microbica di origine fecale, particolarmente elevata nei

liquami sintetici civili, risulta buona anche negli esperimenti condotti con liquami civili naturali e con liquami misti preparati artificialmente. Al contrario, essa risulta mediocre negli esperimenti condotti con liquami biodepurati contenenti cromo, nei quali l'effetto sinergico della presenza sia di materiale particellare che di componenti tossiche provoca, probabilmente, un rallentamento della filtrazione degli organismi-test. Le rese relative alla riduzione del cromo non superano mai il 30% e aumentano all'aumentare del tempo di contatto tra gli organismi e la miscela (24 h).

CAPITOLO 3

Impiego di Tunicati per il contenimento dell'inquinamento marino costiero da by-products dei processi chimici di disinfezione dei liquami

Tra i risultati ottenuti nel corso della fase sperimentale, particolare attenzione è stata posta sulla capacità delle ascidie di abbattere un'aliquota della carica microbica di origine fecale presente nei reflui, normalmente ridotta entro i limiti di legge durante la fase di disinfezione chimica, posta a valle del trattamento depurativo di tipo biologico.

I disinfettanti più utilizzati per le acque reflue urbane sono reagenti a base di cloro: ipoclorito di sodio, utilizzato nella maggior parte dei casi, ed impiegato anche nell'Impianto di Cuma, e biossido di cloro. Da molti anni la disinfezione delle acque reflue è sotto accusa perché, pur risultando estremamente efficace per l'eliminazione di cellule batteriche, provoca la formazione di ingenti quantità di by-products tossici sia per gli organismi acquatici che per l'uomo. In particolare, le reazioni chimiche in ambiente marino tra cloro e sostanze organiche naturali (come acidi umici e fulvici) o di origine antropogenica possono provocare la formazione di trialometani (come ad esempio il cloroformio), clorofenoli, acidi cloroacetici ed acetonitrili, che possiedono proprietà mutagene e cancerogene (Lawrence et al., 1984).

		t = 20'		t = 30'	
Dose cloro attivo (mg/L)		Coliformi totali (UFC/100 ml)	Escherichia coli (UFC/100 ml)	Coliformi totali (UFC/100 ml)	Escherichia coli (UFC/100 ml)
ClO ₂ NaClO	0.50	800000	150000	65000	25000
		700000	40000	95000	15000
ClO ₂ NaClO	1.00	100000	35000	20000	10000
		50000	9000	10000	5500
ClO ₂ NaClO	1.50	65000	3000	10000	3000
		65000	3000	17000	2500
ClO ₂ NaClO	2.00	65000	2500	4000	1000
		72500	1000	5000	900

ClO₂	2.50	9000	650	2900	300
NaClO		4750	300	1000	20
ClO₂	3.00	10000	950	20	10
NaClO		6500	100	15	10

Tab. 48. Concentrazione dei **Coliformi totali** e di *Escherichia coli* in reflui biologicamente depurati trattati con diversi dosaggi di biossido di cloro (ClO₂) ed ipoclorito di sodio (NaClO) (Fiorillo e Bosone, 2002b).

La scoperta di questi composti tossici, che tra l'altro hanno velocità di formazione elevate (Fiorillo e Bosone, 2002b), ha spinto allo studio di altri disinfettanti, come l'ozono e l'acido peracetico, per minimizzare la formazione di by-products. Tuttavia, il primo può portare alla formazione di bromati, e di aldeidi e chetoni, la cui tossicità non è ancora ben nota, mentre del secondo non è stata ancora ben compresa la capacità di formazione di sottoprodotti, fatta eccezione per la formazione di bromati (Booth e Lester, 1995).

BIOCIDA	VANTAGGI	SVANTAGGI
Cloro gassoso	Attività a largo spettro. E' attivo a bassa concentrazione. Effetto residuo. Distrugge la matrice polimerica del biofilm.	Produce THM e altre molecole clorurate (cancerogeni), reagendo con la materia organica. Alcuni composti organo-clorurati difficilmente biodegradabili si accumulano nell'ecosistema e risalgono la catena alimentare. E' un gas tossico la cui manipolazione è sottoposta alle leggi sui gas tossici. E' difficile da maneggiare.
Ipoclorito di sodio	Simile al precedente, ma presenta meno rischi di corrosione. E' più facile da gestire (soluzione acquosa). L'acido ipocloroso, uno dei prodotti della dissociazione in soluzione acquosa, è in grado di diffondere attraverso la parete cellulare e la membrana, attaccare il citoplasma delle cellule e produrre legami stabili tra il cloro e l'azoto delle proteine cellulari; è,	Produce THM e altre molecole clorurate (cancerogeni), reagendo con la materia organica. Alcuni composti organo-clorurati difficilmente biodegradabili si accumulano nell'ecosistema e risalgono la catena alimentare.

	<p>inoltre, in grado di ridurre la respirazione cellulare.</p> <p>Distrugge la struttura esterna del biofilm.</p>	
Biossido di cloro	<p>E' efficace a basse concentrazioni.</p> <p>L'azione biocida viene esercitata sia a livello della membrana (alterazione della permeabilità), sia in alcune strutture interne, come il nucleo (alterazione della sintesi proteica) e i mitocondri (alterazione dell'attività respiratoria). E' in grado anche di agire su virus, spore ed alghe.</p> <p>La sua attività è indipendente dal pH.</p> <p>Non produce THM.</p> <p>Non produce bromati perché non è in grado di ossidare lo ione bromuro a bromo.</p>	<p>Deve essere generato in situ con opportune apparecchiature.</p> <p>Può produrre, per reazione con alcune matrici organiche, una seppur bassa concentrazione di AOX.</p>
Bromo	<p>Ossidante, irritante simile al cloro gassoso.</p>	<p>Presenta gli stessi svantaggi del cloro gassoso.</p> <p>Determina, inoltre, la formazione di bromati.</p> <p>Reagendo con l'azoto, può formare bromoammine, estremamente tossiche (cancerogene).</p>
Ozono	<p>Decompono in ossigeno.</p> <p>Non produce composti tossici secondari.</p> <p>L'attività biocida si manifesta a livello della membrana, tramite la formazione di vescicole che si spaccano, provocando la lisi cellulare.</p> <p>Distrugge la matrice del biofilm.</p>	<p>Ossida il bromo in soluzione acquosa (composti cancerogeni quali i bromati e gli organo-bromati) e può formare composti organici allo stato ossidato la cui tossicologia al momento non è ancora ben studiata (aldeidi e chetoni).</p> <p>Complessità dell'impianto di generazione.</p>
Acido per acetico	<p>Efficace a basse concentrazioni.</p> <p>Attività a largo spettro.</p> <p>Decompono in acido acetico e acqua.</p> <p>E' in grado di distruggere le membrane dei microrganismi del biofilm e le spore delle alghe.</p>	<p>E' corrosivo.</p> <p>Non sono ancora ben noti i prodotti di disinfezione dovuti alle reazioni con sostanza organica disciolta e sospesa.</p> <p>Forma bromati in acqua.</p>
Raggi UV	<p>Altera il DNA delle cellule microbiche.</p>	<p>Scarsa efficienza nei confronti dei microrganismi con una spessa membrana cellulare</p>

	La formazione di sottoprodotti tossici è limitata.	(protozoi). In caso di dosi insufficienti ad alterare il DNA cellulare, alcune specie possono attivare dei meccanismi di difesa (fotoriattivazione) che le rendono più resistenti ai raggi UV.
Ammonio quaternario	Efficace a basse concentrazioni. Relativamente poco tossico. Agisce a livello della membrana plasmatica e viene adsorbito sulle superfici, interferendo con l'attività enzimatica e provocando la lisi cellulare. Previene la crescita del biofilm, ed è in grado di staccarlo. Buona attività biocida nei confronti del microfilm algale e del macrofouling (impedisce l'insediamento delle larve dei molluschi).	Viene inattivato a bassi valori di pH. Basse concentrazioni provocano gravi danni fisiologici anche a grossi pesci. Per ottenere buoni risultati, sono necessarie concentrazioni elevate di ammonio quaternario; il biocida residuo richiede un efficace processo di abbattimento.
Esabutildistannoossano (TBTO)	Attivo ad ampio spettro e a basse concentrazioni su alghe, plancton e larve di crostacei (potente antifouling marino, che tende ad accumularsi nei tessuti lipidici).	Si accumula nei tessuti ed è estremamente tossico su tutti gli organismi marini. Persiste nell'ambiente per molti mesi. E' cancerogeno.

Tab. 49. Vantaggi e svantaggi dei principali biocidi.

Una delle possibili soluzioni per limitare la concentrazione batterica e lo sversamento in mare di sostanze tossiche, potrebbe essere l'uso di sistemi di trattamento naturali (barriere biologiche) come strumento aggiuntivo per la depurazione di acque marine contaminate da reflui, basati sull'impiego di Tunicati e/o di altri gruppi di organismi marini filtratori.

Tenendo presente i risultati ottenuti dalla sperimentazione, oggetto del presente dottorato, e calandoci nella realtà gestionale di un grande impianto di depurazione, quale è l'Impianto di Cuma, è possibile ipotizzare per larghe linee l'entità della riduzione di cloro-organici utilizzando una barriera biologica nel tratto marino-costiero prospiciente lo scarico.

La dose di cloro attivo immessa nella fase di disinfezione dell'Impianto di Cuma sottoforma di ipoclorito di sodio, e necessaria per raggiungere concentrazioni batteriche non superiori a quelle delle linee guida dei D. lgs. 152/99 e 152/06 (5000 UFC/100 ml), è pari a circa 1,5 mg/l, e comporta la formazione di circa 70 µg/l di alometani, molecole cancerogene e tossiche già a bassissime concentrazioni, facilmente accumulabili nelle catene alimentari (Tab. 50).

	Dose cloro attivo (mg/L)	AOX (µg/L); t =20'	<i>Escherichia coli</i> (UFC/100 ml)
ClO₂	0.50	30	150000
NaClO		40	40000
ClO₂	1.00	33	35000
NaClO		45	9000
ClO₂	1.50	47	3000
NaClO		71	3000
ClO₂	2.00	35	2500
NaClO		63	1000
ClO₂	2.50	52	650
NaClO		87	300
ClO₂	3.00	37	950
NaClO		79	100

Tab. 50. Concentrazione di AOX in presenza di diverse concentrazioni di cloro attivo in effluenti biologicamente depurati con concentrazioni di inquinanti rientranti nei limiti di legge (Fiorillo e Bosone, 2002b).

I risultati sperimentali ottenuti durante le fasi sperimentali del dottorato, se confermati da ulteriori evidenze sperimentali effettuate a scale maggiori e con flusso continuo di inquinanti (impianto-pilota) o, preferibilmente, in situ, condurrebbero al possibile utilizzo di barriere biologiche, popolate da ascidie e da altri organismi marini, di cui siano note le capacità di accumulo e/o degradazione di inquinanti, come ultimo stadio di processi di disinquinamento di aree marine. Le ascidie potrebbero, infatti, contribuire all'abbattimento della carica microbica di origine fecale, riducendo conseguentemente la quantità di biocidi utilizzati per la disinfezione. Consideriamo ad esempio il caso reale dell'Impianto di Cuma: una

diminuzione della quantità di cloro attivo addizionato nell'effluente del processo depurativo, da 1,5 a 1,0 ppm, consentirebbe di ridurre di circa un terzo la concentrazione di alometani sversata quotidianamente in mare, che attualmente è dell'ordine di 15 kg d⁻¹ riferita alla portata media giornaliera.

CONCLUSIONI

Questo studio rappresenta un'indagine preliminare che ha permesso di testare, mediante l'impiego di sistemi batch, le capacità depurative di *Ciona intestinalis* nei confronti di diverse tipologie di reflui civili e misti, caratterizzati da diverse concentrazioni di solidi sospesi totali, sostanza organica, carica batterica di origine fecale e – nel caso di liquami misti – cromo esavalente.

I risultati ottenuti evidenziano che il comportamento delle ascidie è notevolmente influenzato dalla *natura*, dalla *concentrazione* e dalle *dimensioni* del particolato in sospensione. Gli esperimenti condotti con liquami naturali hanno evidenziato che elevate concentrazioni di materiale particolare, di dimensioni variabili da 1,2 a 25 μm (Tab. 17), possono comportare una cospicua diminuzione del tasso di filtrazione degli organismi, dovuta a problemi di intasamento dell'apparato branchiale. È probabile che la diminuzione dell'efficienza di filtrazione sia dovuta principalmente alla presenza di particelle di natura inorganica, che riducono la capacità di assimilazione di sostanza organica e nutrienti, indispensabili per il metabolismo delle ascidie. Studi precedenti (Robbins et al., 1985), hanno dimostrato che, già a concentrazioni di particolato inorganico pari a 25 mg/l (valore paragonabile alla concentrazione dei solidi sospesi totali presenti nelle miscele composte da acqua di mare e liquami biologicamente depurati), si arresta la capacità di crescita di individui di *Ciona intestinalis*. La progressiva riduzione delle capacità filtratorie in presenza di materiale inorganico è già stata riscontrata in passato da Robbins (1983): esperimenti condotti su *Ciona* hanno mostrato che, in presenza di concentrazioni pari a circa 100 mg/l di caolino (40-50 μm), il tasso di filtrazione delle ascidie subiva un calo dell'80% (da circa 1 l/h a circa 0,2 l/h); i tassi di filtrazione, inoltre, aumentavano al diminuire della concentrazione e del diametro delle particelle. Durante gli esperimenti condotti con liquami naturali, specialmente con liquami pretrattati meccanicamente, è stato possibile osservare, nei primi istanti temporali, la chiusura intermittente dei sifoni degli organismi, che, non essendo dovuta al disturbo meccanico, costituiva probabilmente un meccanismo di difesa degli individui per limitare la portata di ingresso della corrente idrica contenente particolato.

La scarsa efficienza depurativa di tali organismi nei confronti degli SST è probabilmente imputabile a due fenomeni principali:

- in presenza di elevate concentrazioni di sostanze sospese, le particelle di maggiori dimensioni possono essere “bloccate” in prossimità del sifone inalante, attraverso il quale vengono espulse senza raggiungere l’apparato digerente (Millar, 1971);

- le particelle che non costituiscono fonte di nutrimento possono essere espulse in forma di *faecal pellets* insieme a sostanze di consistenza mucillaginosa secrete dall’ascidia soprattutto in condizioni di stress, che contribuiscono ad aumentare la concentrazione di materiale sospeso nell’unità-campione. Ciò spiega perché talvolta, nel controllo, le concentrazioni di materiale sospeso siano addirittura più basse rispetto a quelle del campione;

Dall’analisi dei risultati sperimentali è stato possibile anche notare che, al diminuire della concentrazione di SST, aumenta anche la capacità di accumulo nei confronti di altri tipi di contaminanti.

Le ascidie hanno dimostrato buone capacità di assimilazione della sostanza organica, la cui concentrazione, in generale, risulta minore nell’unità-campione a tutti gli istanti temporali. Le differenze tra le concentrazioni del contenuto proteico riscontrate nel controllo e nel campione sono particolarmente evidenti negli esperimenti condotti con liquame artificiale, che, pur avendo un carico inquinante superiore a quello del liquame pretrattato e del liquame ossidato biologicamente, risulta facilmente assimilabile poiché costituito soprattutto da componenti solubili (www.reefkeeping.com).

La capacità di ritenzione, da parte degli organismi-test, di cellule di *Escherichia coli*, è stata già dimostrata in passato da studi effettuati nel golfo di Napoli (Melluso et al., 1978), durante i quali le concentrazioni di tali microrganismi sono risultate da 10 a 100 volte superiori nelle ascidie rispetto a quelle riscontrate nella matrice acquatica.

Negli esperimenti condotti sia con reflui civili che misti è confermata la buona capacità di *Ciona intestinalis* di ridurre la carica microbica di origine fecale; la diminuzione di *Escherichia coli*, analogamente alla sostanza organica, aumenta al diminuire della concentrazione di particolato sospeso presente nella miscela composta da acqua di mare e liquame.

Lo studio del comportamento dei Tunicati in presenza di liquami contenenti metalli pesanti è stato effettuato tenendo conto delle problematiche di impianti di depurazione di reflui civili che ricevono impropriamente componenti industriali,

occasionalmente o in modo continuativo. L’Impianto di Cuma, ad esempio, riceve da molti anni una frazione consistente di reflui industriali, nonostante la struttura sia stata progettata solo ed esclusivamente per la depurazione di liquami civili.

L’accumulo dei metalli da parte degli organismi marini può verificarsi attraverso due vie principali:

- assimilazione di metalli associati a materiale organico particellato (POM, *particulate organic matter*) di cui si nutrono (Della Croce et al., 2001);
- ingestione (“*uptake*”) di metalli direttamente dalla fase disciolta. Questo meccanismo, noto come *bioconcentrazione*, è reso possibile, nei Tunicati, da alcune cellule del sangue (*refractile vacuolated cells*, RVCs; www.bio.mq.edu/MarBiol/poll.htm), che migrano verso la faringe dopo aver accumulato metalli tossici.

I risultati mostrano, già dai primi istanti temporali, una lieve diminuzione della concentrazione di Cr(VI) nell’unità-campione: la concentrazione di cromo in acqua decresce al trascorrere del tempo; ciò è indice che l’accumulo del metallo cresce all’aumentare del tempo di contatto con i Tunicati.

In conclusione, i dati a nostra disposizione evidenziano, già in sistemi batch, discrete capacità di abbattimento da parte della specie *Ciona intestinalis* dei maggiori inquinanti presenti nei reflui urbani. E’ importante evidenziare che l’apparato sperimentale adoperato costituisce, per gli organismi-test, un ambiente meno favorevole rispetto all’habitat naturale. Si ritiene, dunque, che in ambienti naturali le capacità depurative di *Ciona intestinalis* possano essere superiori a quelle riscontrate nel corso di questa attività sperimentale, e che questo organismo possa essere impiegato in sistemi di trattamento naturali per contribuire alla decontaminazione di acque costiere e di transizione prospicienti scarichi di tipo urbano. In particolare, la capacità di abbattimento della carica microbica di origine fecale da parte di *Ciona intestinalis* riscontrata in questo lavoro potrebbe fungere da stimolo per approfondire lo studio di tali efficienze depurative, e, conseguentemente, per ridurre la concentrazione dei sottoprodotti tossici provenienti da processi di disinfezione chimica.

I risultati ottenuti in questo lavoro, se confermati da altre evidenze sperimentali condotte su impianti-pilota (flusso continuo di inquinanti), o addirittura in situ (zone costiere), lasciano ipotizzare una possibilità di impiego dei Tunicati:

- in aree marine prospicienti reflui di impianti a regime (soprattutto per la riduzione della carica microbica);
- in aree marine contaminate da reflui di impianti non a regime, per disfunzioni temporanee o inadeguatezze strutturali;
- in aree marine che ricevono reflui arricchiti impropriamente da componenti industriali di difficile monitoraggio e controllo.

APPENDICE A

**PRINCIPALI LIMITI DI EMISSIONE PER REFLUI CIVILI,
REFLUI INDUSTRIALI E SOSTANZE PERICOLOSE**

PARAMETRI	Limiti di emissione (mg/l) (D.Lgs.152/99; D.Lgs. 152/06)
BOD5	≤25
COD	≤125
SST	≤35

Tab. A.1. Limiti di emissione per reflui civili.

PARAMETRI	Limiti di emissione (mg/l) D. Lgs. 152/99; D. Lgs. 152/06	
	Dimensioni utenza (nr abitanti equivalenti)	
	10000 - 100000	> 100000
FOSFORO TOTALE	≤2	≤ 1
AZOTO TOTALE	≤ 15	≤ 10

Tab. A.2. Limiti di emissione per i parametri azoto e fosforo stabiliti delle leggi 152/99 e 152/06 per corpi idrici ricadenti in aree sensibili.

	Unità di misura	D.Lgs. 152/99 e 152/06	
		Acque superficiali	Scarico in fogna
PH		5.5-9.5	5.5-9.5
TEMPERATURA	°C	¹	
COLORE		Non	Non

¹ Per i corsi d'acqua la variazione massima tra temperature medie di qualsiasi sezione del corso d'acqua a monte e a valle del punto di immissione non deve superare i 3°C. Su almeno metà di qualsiasi sezione a valle tale variazione non deve superare 1°C. Per i laghi la temperatura dello scarico non deve superare i 30°C e l'incremento di temperatura del corpo recipiente non deve in nessun caso superare i 3°C oltre 50 metri di distanza dal punto di immissione. Per i canali artificiali, il massimo valore medio della temperatura dell'acqua di qualsiasi sezione non deve superare i 35°C, la condizione suddetta è subordinata all'assenso del soggetto che gestisce il canale. Per il mare e per le zone di foce di corsi d'acqua non significativi, la temperatura dello scarico non deve superare i 35°C e l'incremento di temperatura del corpo recipiente non deve in nessun caso superare i 3°C oltre i 1000 metri di distanza dal punto di immissione. Deve inoltre essere assicurata la compatibilità ambientale dello scarico con il corpo recipiente ed evitata la formazione di barriere termiche alla foce dei fiumi.

		percettibile con diluizione 1:20	percettibil e con diluizione 1:40
<u>ODORE</u>		Non deve essere causa di molestie	Non deve essere causa di molestie
<u>MATERIALI GROSSOLANI</u>		assenti	assenti
<u>MATERIALI SEDIMENTABILI</u>	ml/l	assenti	assenti
<u>SOLIDI SOSPESI TOT</u>	mg/l	≤ 80	≤ 200
<u>BOD5</u>	mg/l	≤ 40	≤ 250
<u>COD</u>	mg/l	≤ 160	≤ 500
<u>METALLI TOSSICI</u>	mg/l	-	-
<u>ALLUMINIO</u>	mg/l	≤ 1	≤ 2.0
<u>ARSENICO</u>	mg/l	≤ 0.5	≤ 0.5
<u>BARIO</u>	mg/l	≤ 20	-
<u>BORO</u>	mg/l	≤ 2	≤ 4
<u>CADMIO</u>	mg/l	≤ 0.02	≤ 0.02
<u>CROMO TOT</u>	mg/l	≤ 2	≤ 4
<u>CROMO III</u>	mg/l		
<u>CROMO IV</u>	mg/l	≤ 0.2	≤ 0.20
<u>FERRO</u>	mg/l	≤ 2	≤ 4
<u>MANGANESE</u>	mg/l	≤ 2	≤ 4
<u>MERCURIO</u>	mg/l	≤ 0.005	≤ 0.005
<u>NICHEL</u>	mg/l	≤ 2	≤ 4
<u>PIOMBO</u>	mg/l	≤ 0.2	≤ 0.3
<u>RAME</u>	mg/l	≤ 0.1	≤ 0.4
<u>SELENIO</u>	mg/l	≤ 0.03	≤ 0.03
<u>STAGNO</u>	mg/l	≤ 10	
<u>ZINCO</u>	mg/l	≤ 0.5	≤ 1.0
<u>CIANURI TOT</u> (come CN)	mg/l	≤ 0.5	≤ 1.0
<u>CLORO ATTIVO LIBERO</u>	mg/l	≤ 0.2	≤ 0.3
<u>SOLFURI</u> (come H2S)	mg/l	≤ 1	≤ 2
<u>SOLFITI</u> (come SO3)	mg/l	≤ 1	≤ 2
<u>SOLFATI</u> (come SO4)	mg/l	≤ 1000	≤ 1000
<u>CLORURI</u>	mg/l	≤ 1200	≤ 1200
<u>FLORURI</u>	mg/l	≤ 6	≤ 12
<u>FOSFORO TOT</u>	mg/l	≤ 10	≤ 10
<u>AZOTO AMMONIACALE</u> (come NH4)	mg/l	≤ 15	≤ 30
<u>AZOTO NITROSO</u> (come N)	mg/l	≤ 0.6	≤ 0.6
<u>AZOTO NITRICO)</u> (come N)	mg/l	≤ 20	≤ 30
<u>GRASSI E OLII ANIMALI E VEGETALI</u>	mg/l	≤ 20	≤ 40

IDROCARBURI TOT	mg/l	≤ 5	≤ 10
FENOLI	mg/l	≤ 0.5	≤ 1
ALDEIDI	mg/l	≤ 1	≤ 2
SOLVENTI ORGANICI AROMATICI	mg/l	≤ 0.2	≤ 0.4
SOLVENTI ORGANICI AZOTATI	mg/l	≤ 0.1	≤ 0.2
TENSIOATTIVI TOT	mg/l	≤ 2	≤ 4
PESTICIDI FOSFORATI	mg/l	≤ 0.10	≤ 0.10
PESTICIDI CLOR.	mg/l	-	-
PESTICIDI TOT (esclusi fosforati)	mg/l	≤ 0.05	≤ 0.05
Tra cui:			
-aldrin	mg/l	≤ 0.01	≤ 0.01
-dieldrin	mg/l	0.01	≤ 0.01
-endrin	mg/l	≤ 0.002	≤ 0.002
-isodrin	mg/l	≤ 0.002	≤ 0.002
SOLVENTI CLORURATI	mg/l	≤ 1	≤ 2
ESCHERICHIA COLI	UFC/100 mg/l	2	
COLIFORMI TOT	MNP/100 ml ³	-	-
COLIFORMI FECALI	MNP/100 ml	-	-
SAGGIO DI TOSSICITA' ACUTA	-	Il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 50% del tot	Il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 80% del tot

Tab. A.3. Limiti di emissioni per impianti di acque di natura mista e industriali, recapitanti in acque superficiali e in pubblica fognatura.

2 All'atto dell'approvazione dell'impianto per il trattamento di acque reflue urbane, da parte dell'autorità competente, andrà fissato il limite più opportuno in relazione alla situazione ambientale e igienico-sanitaria del corpo idrico recettore e agli usi esistenti. Si consiglia un limite non superiore ai 5000 UFC/100 ml

3 MNP = numero più probabile (*most probable number*)

Elemento/Composto (µg/L)	Anno	Standards di qualità (D.M. 367/03)		
		Acque dolci	Lagune	Marine
Arsenico	2008	5	1,6	1,6
	2015	2	1,4	1,4
Cadmio	2008	1	0,2	0,2
	2015	0,1	0,03	0,03
Cromo	2008	4	0,7	0,7
	2015	1,5	0,5	0,5
Mercurio	2008	0,05	0,03	0,03
	2015	0,02	0,003	0,003
Nichel	2008	3	1,5	1,5
	2015	1,3	0,6	0,6
Piombo	2008	2	0,15	0,15
	2015	0,4	0,06	0,06
Dibutilstagno catione	2008	0,01	0,01	0,01
	2015	0,001	0,001	0,001
Tetrabutilstagno	2008	0,001	0,001	0,001
	2015	0,0001	0,0001	0,0001
Tributilstagno (composti)	2008	0,001	0,001	0,001
	2015	0,0001	0,0001	0,0001
Tributilstagno (catione)	2008	0,001	0,001	0,001
	2015	0,0001	0,0001	0,0001
Trifenilstagno	2008	0,005	0,005	0,005
	2015	0,0005	0,0005	0,0005
Dicloro di dibutilstagno	2008	0,01	0,01	0,01
	2015	0,001	0,001	0,001
IPA totali	2008	0,02	0,015	0,015
	2015	0,005	0,005	0,005
Benzo(a)pirene	2008	0,004	0,003	0,003
	2015	0,001	0,001	0,001
Benzo(b)fluorantene	2008	0,004	0,003	0,003
	2015	0,001	0,001	0,001
Benzo(k)fluorantene	2008	0,004	0,003	0,003
	2015	0,001	0,001	0,001
Benzo(g,h,i)perilene	2008	0,004	0,003	0,003
	2015	0,001	0,001	0,001
Indeno(1,2,3-cd)pirene	2008	0,004	0,003	0,003
	2015	0,001	0,001	0,001
Antracene	2008	0,1	0,01	0,01
	2015	0,01	0,006	0,006
Fluorantene	2008	0,1	0,1	0,1
	2015	0,01	0,01	0,01
Naftalene	2008	0,1	0,1	0,1
	2015	0,01	0,01	0,01
Benzene	2008	0,5	0,25	0,25
	2015	0,2	0,1	0,1
Etilbenzene	2008	5	0,5	0,5
	2015	1	0,1	0,1
Isopropilbenzene	2008	5	0,5	0,5
	2015	1	0,1	0,1
Toluene	2008	5	0,5	0,5
	2015	1	0,1	0,1
Xileni	2008	5	0,5	0,5

	2015	1	0.1	0.1
Clorobenzene	2008	3	0.3	0.3
	2015	1	0.1	0.1
1,2 Diclorobenzene	2008	5	0.5	0.5
	2015	1	0.1	0.1
1,3 Diclorobenzene	2008	5	0.5	0.5
	2015	1	0.1	0.1
1,4 Diclorobenzene	2008	5	0.5	0.5
	2015	1	0.1	0.1
Triclorobenzeni	2008	1	0.1	0.1
	2015	0.1	0.01	0.01
1,2,4 Triclorobenzene	2008	0.1	0.05	0.05
	2015	0.01	0.005	0.005
2-Clorotoluene	2008	1	0.1	0.1
	2015	0.1	0.01	0.01
3-Clorotoluene	2008	1	0.1	0.1
	2015	0.1	0.01	0.01
4-Clorotoluene	2008	1	0.1	0.1
	2015	0.1	0.01	0.01
3-Cloropropene (provvisori)	2008	10	1	1
	2015			
1,1 Dicloroetano (provvisori)	2008	10	1	1
	2015			
1,2 Dicloroetano	2008	3	0.4	0.4
	2015	0.3	0.1	0.1
1,1 Dicloroetene (provvisori)	2008	10	1	1
	2015			
1,2 Dicloroetene (provvisori)	2008	10	1	1
	2015			
1,2 Dicloropropano (provvisori)	2008	10	1	1
	2015			
1,2 Dibromoetano (provvisori)	2008	2	0.2	0.2
	2015			
1,3 Dicloropropene (provvisori)	2008	10	1	1
	2015			
2,3 Dicloropropene	2008	ND	ND	ND
	2015			
1,1,2,2 Tetracloroetano	2008	10	1	1
	2015			
Tetraclorometano	2008	7	0.7	0.7
	2015			
1,1,1 Tricloroetano	2008	10	0.1	0.1
	2015	1		
1,1,2 Tricloroetano (provvisori)	2008	10	1	1
	2015			
Cloroetene (provvisori per 367/03)	2008	0.5	0.05	0.05
	2015			
Diclorometano	2008	10	0.1	0.1
	2015	1	0.1	0.1
Esaclorobutadiene	2008	0.01	0.01	0.01
	2015	0.001	0.001	0.001
Triclorometano/Cloroformio	2008	10	0.1	0.1
	2015	1	0.01	0.01
Tricloroetilene	2008			
	2015	10	1	1
Tetracloroetilene	2008			
	2015	10	1	1
2-Cloroetanolo	2008	ND	ND	ND
	2015			

1,3-Dicloro-2-propanolo	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
Dicloro-di-isopropilene	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
Epicloridina	2008 2015	10 1	1 0.1	1 0.1
1-Cloro-2,4-dinitrobenzene	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
1-Cloro-2-dinitrobenzene (provvisorio)	2008 2015	1 1	0.1 0.1	0.1 0.1
1-Cloro-3-dinitrobenzene (provvisorio)	2008 2015	1 1	0.1 0.1	0.1 0.1
1-Cloro-4-dinitrobenzene (provvisorio)	2008 2015	1 1	0.1 0.1	0.1 0.1
4-Cloro-2-nitrotoluene (provvisorio)	2008 2015	1 1	0.1 0.1	0.1 0.1
Cloronitrotolueni (provvisorio)	2008 2015	1 1	0.1 0.1	0.1 0.1
Dicloronitrobenzeni (provvisorio)	2008 2015	1 1	0.1 0.1	0.1 0.1
2-Clorofenolo	2008 2015	10 1	1 0.1	1 0.1
3-Clorofenolo	2008 2015	5 1	0.5 0.1	0.5 0.1
4-Clorofenolo	2008 2015	4 1	0.4 0.1	0.4 0.1
2,4,5-Triclorofenolo	2008 2015	1 0.3	0.1 0.03	0.1 0.03
2,4,6-Triclorofenolo	2008 2015	1 0.3	0.1 0.03	0.1 0.03
2,4-Diclorofenolo	2008 2015	1 0.3	0.1 0.03	0.1 0.03
Pentaclorofenolo	2008 2015	0.1 0.01	0.1 0.01	0.1 0.01
2-Ammino-4-clorofenolo	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
4-Cloro-3-metilfenolo	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
2-Cloroanilina	2008 2015	1 0.1	0.1 0.01	0.1 0.01
3-Cloroanilina	2008 2015	2 0.2	0.2 0.02	0.2 0.02
4-Cloroanilina	2008 2015	1 0.1	0.1 0.01	0.1 0.01
3,4-Dicloroanilina	2008 2015	0.1 0.05	0.01 0.005	0.01 0.005
4-Cloro-nitroanilina	2008 2015	1 0.1	0.1 0.01	0.1 0.01
Acido cloroacetico	2008 2015	1 0.1	0.5 0.1	0.5 0.1
Acido 2,4-diclorofenossipropanoico	2008 2015	1 0.1	0.5 0.1	0.5 0.1
Acido 2,4,metilclorofenossipropanoico	2008 2015	1 0.1	0.5 0.1	0.5 0.1
Acido 2,4, metilclorofenossiacetico	2008 2015	1 0.1	0.5 0.1	0.5 0.1
Acido 2,4, diclorofenossiacetico	2008 2015	1 0.1	0.5 0.1	0.5 0.1
Acido 2,4,5, triclorofenossiacetico	2008	1	0.5	0.5

	2015	0.1	0.1	0.1
Prodotti fitosanitari e biocidi totali	2008 2015			
Isodrin	2008 2015	ND	ND	ND
Aldrin	2008 2015	0.0001 0.00005	0.0001 0.00005	0.0001 0.00005
Dieldrin	2008 2015	0.0001 0.00005	0.0001 0.00005	0.0001 0.00005
Endrin	2008 2015	0.0006 0.00006	0.0006 0.00006	0.0006 0.00006
Clordano	2008 2015	0.0006 0.00006	0.0006 0.00006	0.0006 0.00006
DDT	2008 2015	0.0002 0.00002	0.0002 0.00002	0.0002 0.00002
DDE	2008 2015	0.0002 0.00002	0.0002 0.00002	0.0002 0.00002
DDD	2008 2015	0.0003 0.00003	0.0003 0.00003	0.0003 0.00003
Eptacloro	2008 2015	0.0001 0.00001	0.0001 0.00001	0.0001 0.00001
Endosulfan	2008 2015	0.0001 0.00001	0.0001 0.00001	0.0001 0.00001
Alfa endosulfan	2008 2015	0.0001 0.00001	0.0001 0.00001	0.0001 0.00001
Lindano	2008 2015	0.01 0.001	0.005 0.0005	0.005 0.0005
Esaclorocicloesano	2008 2015			
Esaclorocicloesano alfa	2008 2015	0.002 0.0002	0.002 0.0002	0.002 0.0002
Esaclorocicloesano beta	2008 2015	0.002 0.0002	0.002 0.0002	0.002 0.0002
Esaclorobenzene	2008 2015	0.0003	0.0003	0.0003
Linuron	2008 2015	0.2 0.02	0.1 0.01	0.1 0.01
Monolinuron	2008 2015	0.2 0.02	0.1 0.01	0.1 0.01
Diuron	2008 2015	0.2 0.02	0.1 0.01	0.1 0.01
Isoproturon	2008 2015	0.2 0.02	0.1 0.01	0.1 0.01
Atrazina	2008 2015	0.05 0.01	0.05 0.01	0.05 0.01
Simazina	2008 2015	0.2 0.02	0.1 0.01	0.1 0.01
Demeton	2008 2015	0.1 0.01	0.1 0.01	0.1 0.01
Dimetoato	2008 2015	0.1 0.01	0.1 0.01	0.1 0.01
Disulfoton	2008 2015	0.1 0.01	0.1 0.01	0.1 0.01
Metamidofos	2008 2015	0.1 0.01	0.1 0.01	0.1 0.01
Mevinfos	2008 2015	0.01 0.001	0.01 0.001	0.01 0.001
Cumafos (provvisorio)	2008 2015	0.01	0.01	0.01

Clorfenvinfos	2008 2015	0.002 0.0002	0.002 0.0002	0.002 0.0002
Clorpyrifos	2008 2015			
Diclorvos	2008 2015	0.001 0.0001	0.001 0.0001	0.001 0.0001
Ometoato	2008 2015	0.01 0.001	0.01 0.001	0.01 0.001
Ossidemeton – metile	2008 2015	0.03	0.03	0.03
Foxim	2008 2015	0.1 0.01	0.1 0.01	0.1 0.01
Triazofos	2008 2015	0.03 0.005	0.03 0.005	0.03 0.005
Azinfos etile	2008 2015	0.01 0.001	0.01 0.001	0.01 0.001
Azinfos metile	2008 2015	0.01 0.001	0.01 0.001	0.01 0.001
Clorpirifos	2008 2015	0.001 0.0001	0.001 0.0001	0.001 0.0001
Malation	2008 2015	0.01 0.001	0.01 0.001	0.01 0.001
Paration etile	2008 2015	0.01 0.001	0.01 0.001	0.01 0.001
Paration metile	2008 2015	0.01 0.001	0.01 0.001	0.01 0.001
Fention	2008 2015	0.01 0.001	0.01 0.001	0.01 0.001
Fenitrotion	2008 2015	0.01 0.001	0.01 0.001	0.01 0.001
Triclorfon	2008 2015	ND	ND	ND
Alachor	2008 2015	0.1 0.03	0.03 0.01	0.03 0.01
Propanile	2008 2015	ND	ND	ND
Bifenile (provvisori)	2008 2015	1 0.1	1 0.1	1 0.1
Pirazone (provvisori)	2008 2015	1 0.1	1 0.1	1 0.1
Trifluralin	2008 2015	0.03 0.003	0.03 0.0006	0.03 0.0006
Pentaclorofenolo	2008 2015			
Bentazone	2008 2015	1 0.1	1 0.1	1 0.1
Benzidina (provvisori)	2008 2015	0.00008	0.00008	0.00008
Diclorobenzinide	2008 2015	ND	ND	ND
Cloronaftaleni	2008 2015	0.1 0.01	0.01 0.001	0.01 0.001
α -Clorotoluene	2008 2015	1 0.1	0.1 0.01	0.1 0.01
α,α -Diclorotoluene	2008 2015	ND	ND	ND
1,2,4,5-tetraclorobenzene	2008 2015	1 0.1	0.1 0.01	0.1 0.01
Pentaclorobenzene	2008	0.03	0.03	0.03

	2015	0.003	0.003	0.003
Esacloretano (provvisori)	2008 2015	1 1	0.1 0.1	0.1 0.1
Clorotoluidine	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
2-Cloro-para-toluidina	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
2-Cloro-4-amminotoluene	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
Cloroamminotolueni	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
2-Cloro-1,3-butadiene	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
1,1,2-Triclorotrifluoroetano (provvisori)	2008 2015	1 1	0.1 0.1	0.1 0.1
Cloroalcani C10 – C13 (provvisori)	2008 2015	0.5 0.5	0.1 0.1	0.1 0.1
Tributilfosfato	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
Pentabromo difenietere bromurato	2008 2015	0.001 0.0005	0.001 0.0005	0.001 0.0005
Difenietere bromurati totali	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
Dietilammina	2008 2015	10 5	1 0.5	1 0.5
Nonilfenolo	2008 2015	0.3 0.03	0.03 0.003	0.03 0.003
4(para)-nonilfenolo	2008 2015	0.01 0.001	0.006 0.0006	0.006 0.0006
Ottifenolo	2008 2015	0.1 0.01	0.005 0.001	0.005 0.001
Para-terz-ottifenolo	2008 2015	0.1 0.01	0.005 0.001	0.005 0.001
2,4,6-Tricloro 1,3,5 triazina	2008 2015	ND ND	ND ND	ND ND
Di(2etilesilftalato)	2008 2015	1 0.3	0.1 0.03	0.1 0.03
PCB totali	2008 2015	0.00006 0.00006	0.00006 0.00006	0.00006 0.00006

(ND = non determinato)

Tab. A.4. Standards di qualità per sostanze pericolose.

APPENDICE B

**RISULTATI SPERIMENTALI RELATIVI ALL'ANALISI
GRANULOMETRICA DEI SEDIMENTI CONTENUTI NEI
LIQUAMI DEL COLLETTORE PRINCIPALE DI NAPOLI E
NEGLI EFFLUENTI PARZIALMENTE (CHP) E
COMPLETAMENTE (CHS) DEPURATI**

	Collettore Principale			CHP			CHS		
	0,45µm (mg/l)	1,2µm (mg/l)	%	0,45µm (mg/l)	1,2µm (mg/l)	%	0,45µm (mg/l)	1,2µm (mg/l)	%
esperimenti	135	98	27	130	98	25	270	238	12
	175	138	12	425	405	5	265	210	26
	135	120	11	510	490	4	285	260	9
	125	100	20	400	360	10	710	610	14
	128	144	11	154	124	19	138	108	22
	106	78	26	235	215	8	115	95	17
	98	95	3	125	105	16	50	35	30
	128	120	6	179	170	5	85	73	14
	155	132	15	190	170	10	26	17	35
	160	142	11	280	260	7	35	24	31
	310	130	58	135	125	7	65	60	8
v. medio	138	118	19	251	229	10	195	157	20

Tab. B1. Valori della concentrazione, espressi in mg/l, delle frazioni di solidi sospesi nell'influyente principale, nel CHP e nel CHS con diametro superiore a 0,45 µm e a 1,2 µm, e composizione percentuale della frazione di solidi compresa tra 0,45 e 1,2 µm nelle tre tipologie di liquame.

APPENDICE C
RISULTATI SPERIMENTALI RELATIVI ALLE PROVE
CONDOTTE CON LIQUAMI CIVILI

LIQUAMI PRETRATTATI MECCANICAMENTE

	1		2		3		4		5	
t = 0	145		239		34		7		17	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	27	27	15	14	79	72	3	5	29	44
t = 2 h	22	19	10	10	92	96	12	13	30	40
t = 24 h	34	41	6	10	106	102	64	91	29	40
	6		7		8		9		10	
t = 0	12		30		40		415		95	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	38	44	720	860	0	0	250	280	670	580
t = 2 h	55	86	250	220	170	50	220	300	800	650
t = 24 h	141	148	0	0	110	80	60	190	100	50
	11		12		13					
t = 0	315		320		300					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	110	300	250	390	280	210				
t = 2 h	180	160	240	260	360	190				
t = 24 h	120	170	160	130	130	200				

Tab. C.1. Valori del **contenuto proteico**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame pretrattato meccanicamente.

	1		2		3		4		5	
t = 0	52		88		60		66		144	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	48	126	46	40	54	42	88	182	60	166
t = 2 h	46	60	42	134	50	50	182	178	38	26
t = 24 h	48	40	28	112	44	30	42	150	36	172
	6		7		8		9		10	
t = 0	52		66		126		178		168	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	42	160	48	204	130	234	114	74	180	254
t = 2 h	64	56	52	146	128	64	280	222	162	254
t = 24 h	62	34	52	204	94	220	100	218	86	266
	11		12		13					
t = 0	62		176		48					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	126	162	64	184	202	170				
t = 2 h	490	152	98	176	372	176				
t = 24 h	410	166	358	228	68	174				

Tab. C.2. Valori della concentrazione di **solidi sospesi totali**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame pretrattato meccanicamente.

	1		2		3		4		5	
t = 0	15		9		10		19		4	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	12	13	14	15	10	12	18	11	5	10
t = 2 h	18	9	14	10	18	12	16	12	7	2
t = 24 h	15	9	15	12	15	9	4	6	8	2
	6		7		8		9		10	
t = 0	6		9		13		5		13	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	5	4	12	14	8	10	7	6	12	19
t = 2 h	4	3	4	5	8	4	4	3	10	5
t = 24 h	8	5	11	13	4	6	130	120	120	130
	11		12		13					
t = 0	16		13		20					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	17	19	10	14	7	11				
t = 2 h	14	6	12	9	15	12				
t = 24 h	600	110	12	100	150	600				

Tab. C.3. Valori della concentrazione di *Escherichia coli*, espressi in UFC*10⁵/100 ml, negli esperimenti con liquame pretrattato meccanicamente.

	1		2		3		4		5	
t = 0	8,2		8,3		7,7		7,9		7,3	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,3	8,1	8,1	8,5	8	8	7,8	7,8	7,5	7,6
t = 2 h	8,4	8,3	8	8,1	7,6	7,6	7,3	7,4	7,6	7,6
t = 24 h	8,5	8,5	7,8	7,9	7,5	7,5	7	7	7	7
	6		7		8		9		10	
t = 0	7		7,5		7,2		7,5		7,6	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	7,78	7,81	7,9	7,8	7,6	0,6	7,6	7,6	7,6	7,6
t = 2 h	7,4	7,3	7,6	7,5	7,5	7,5	7,6	7,6	7,6	7,6
t = 24 h	7,2	7,2	7,3	7,3	7,2	7,2	7,6	7,1	7,6	7,6
	11		12		13					
t = 0	7,4		7,5		7,5					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	7,9	7,9	7,7	7,7	7,5	7,5				
t = 2 h	7,3	7,6	7,7	7,7	7,4	7,4				
t = 24 h	7,6	7,6	7,8	7,8	7,4	7,4				

Tab. C.4. Valori dell'ossigeno disciolto, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame pretrattato meccanicamente.

	1		2		3		4		5	
t = 0	7,34		7,24		7,04		7,07		7,71	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	7,31	7,37	7,19	7,25	7,02	7,03	6,98	7,01	7,17	7,27
t = 2 h	7,21	7,3	7,08	7,14	6,97	7	7,15	7,25	7,21	7,2
t = 24 h	7,52	7,54	7,39	7,43	7,35	7,41	7,36	7,38	7,46	7,51
	6		7		8		9		10	
t = 0	7,28		7,45		7,32		7,08		7,18	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	7,59	7,49	7,52	7,49	7,31	7,37	7,05	7,26	7,1	7,1
t = 2 h	7,54	7,45	7,61	7,51	7,23	7,29	7,27	7,28	7,42	7,48
t = 24 h	7,43	7,5	7,46	7,55	7,35	7,39	7,53	7,55	7,63	7,7
	11		12		13					
t = 0	7,6		7,15		7,62					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	7	7,14	7,07	7,07	7,53	7,56				
t = 2 h	7,49	7,46	7,58	7,64	7,76	7,76				
t = 24 h	7,7	7,61	7,58	7,62	7,61	7,73				

Tab. C.5. Valori del **pH** negli esperimenti con liquame pretrattato meccanicamente.

LIQUAMI BIOLOGICAMENTE DEPURATI

	1		2		3		4		5	
t = 0	20		10		10		10		40	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	380	20	550	100	210	40	0	130	70	60
t = 2 h	40	40	840	210	690	640	460	360	220	240
t = 24 h	330	30	540	10	850	410	170	140	340	340
	6		7		8		9		10	
t = 0	50		60		50		10		10	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	240	0	220	320	180	0	290	120	570	30
t = 2 h	330	70	150	240	370	0	30	0	360	200
t = 24 h	90	30	230	0	670	510	190	150	660	210
	11		12		13					
t = 0	10		10		50					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	10	0	120	10	230	100				
t = 2 h	10	0	250	240	260	150				
t = 24 h	240	0	120	280	50	100				

Tab. C.6. Valori del **contenuto proteico**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato.

	1		2		3		4		5	
t = 0	30		24		26		36		22	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	16	14	16	4	14	22	12	120	22	102
t = 2 h	36	18	14	36	20	124	22	22	14	108
t = 24 h	18	146	32	116	24	18	16	2	24	106
	6		7		8		9		10	
t = 0	37		14		24		20		28	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	10	116	16	130	20	118	36	140	28	14
t = 2 h	30	18	14	10	38	18	40	146	18	118
t = 24 h	22	6	22	98	26	14	42	12	30	106
	11		12		13					
t = 0	42		8		16					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	24	20	26	52	12	40				
t = 2 h	20	64	32	50	34	76				
t = 24 h	20	120	42	92	36	16				

Tab. C.7. Valori della concentrazione di **solidi sospesi totali**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato.

	1		2		3		4		5	
t = 0	180		47		161		167		25	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	98	75	57	44	141	144	168	148	20	16
t = 2 h	101	70	40	40	150	130	170	128	23	10
t = 24 h	120	110	50	50	150	90	110	0	13	16
	6		7		8		9		10	
t = 0	48		87		76		41		50	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	63	50	88	86	77	49	62	43	63	55
t = 2 h	73	64	93	83	74	77	52	46	60	66
t = 24 h	38	38	63	61	59	60	39	34	48	46
	11		12		13					
t = 0	170		66		38					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	180	150	54	36	42	26				
t = 2 h	200	160	40	33	34	37				
t = 24 h	240	220	50	44	25	21				

Tab. C.8. Valori della concentrazione di *Escherichia coli*, espressi in UFC*10³/100 ml, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato.

	1		2		3		4		5	
t = 0	8,1		8,6		7,7		8		7,1	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,3	8,3	8,9	8,9	8,5	8,6	7,9	7,8	8,3	8,2
t = 2 h	8,7	8,7	8,8	8,3	8,6	8,6	8,4	8,5	8,5	8,2
t = 24 h	9	8,8	8,8	8,6	8,9	8,9	8,9	8,7	8,3	8,4
	6		7		8		9		10	
t = 0	7,8		7,4		8		7,6		8,2	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,6	8,2	8,4	8,2	8	8	7,7	7,6	8,3	8,4
t = 2 h	8,2	7,9	8,2	8,2	7,9	7,9	7,9	7,9	8,2	8,2
t = 24 h	8,5	8,5	8,4	8,5	8,7	8,7	8	8,1	8,3	8,3
	8		9		10					
t = 0	8		7,6		8,2					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	8	8	7,7	7,6	8,3	8,4				
t = 2 h	7,9	7,9	7,9	7,9	8,2	8,2				
t = 24 h	8,7	8,7	8	8,1	8,3	8,3				

Tab. C.9. Valori dell'ossigeno disciolto, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato.

	1		2		3		4		5	
t = 0	7,65		7,66		7,14		7,9		7,6	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	7,83	7,81	7,73	7,77	7,93	7,87	7,91	7,91	7,87	7,88
t = 2 h	7,91	7,84	7,91	7,9	7,85	7,94	7,84	7,87	7,89	7,95
t = 24 h	8,06	8,05	7,97	7,91	8,02	8,11	7,94	7,99	7,79	7,85
	6		7		8		9		10	
t = 0	7,97		7,89		7,09		7,05		7,5	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	7,8	7,98	8,01	8,09	7,71	7,86	7,69	7,73	7,91	7,93
t = 2 h	7,93	7,95	7,95	8,08	7,77	7,83	7,99	7,99	7,86	7,9
t = 24 h	8	8,09	7,91	7,99	7,88	7,99	8,01	7,93	8,09	8,1
	11		12		13					
t = 0	7,53		7,51		7,32					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	7,67	7,69	7,86	8,01	7,88	7,9				
t = 2 h	7,85	7,81	7,96	7,99	7,95	8,09				
t = 24 h	7,99	8,1	7,96	8,02	8,22	8,3				

Tab. C.10. Valori del pH negli esperimenti con liquame biologicamente depurato.

LIQUAMI ARTIFICIALI

	1		2		3		4		5	
t = 0	180		50		170		510		480	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	130	100	20	40	290	150	40	0	440	0
t = 2 h	0	10	100	40	90	60	470	460	730	330
t = 24 h	160	50	50	0	420	710	1760	1270	740	380
	6		7		8		9		10	
t = 0	390		330		140		270		240	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	590	120	50	0	100	0	130	70	350	30
t = 2 h	530	560	80	80	240	20	510	110	450	410
t = 24 h	80	0	210	60	170	330	0	0	300	50
	11		12		13					
t = 0	50		60		110					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	370	20	110	110	100	35				
t = 2 h	260	160	460	10	80	50				
t = 24 h	60	0	320	210	130	60				

Tab. C.11. Valori del **contenuto proteico**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame artificiale.

	1		2		3		4		5	
t = 0	19		10		11		9		9	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	11	16	10	9	13	9	18	12	4	1
t = 2 h	12	13	25	12	10	14	15	17	10	11
t = 24 h	655	655	0	400	820	560	30	30	350	120
	6		7		8		9		10	
t = 0	9		8		9		4		6	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	7	7	8	10	11	10	10	5	3	4
t = 2 h	5	10	12	10	9	9	13	6	8	4
t = 24 h	180	90	700	340	250	130	180	100	80	20
	11		12		13					
t = 0	2		1		10					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	1	0	1	0	11	7				
t = 2 h	3	3	1	0	15	9				
t = 24 h	16	3	6	1	180	101				

Tab. C.12. Valori della concentrazione di *Escherichia coli*, espressi in UFC*10⁴/100 ml, negli esperimenti con liquame artificiale.

	1		2		3		4		5	
t = 0	9,9		10,9		9,5		10,4		8,2	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	9,5	9,5	9,2	9,2	9,2	9,2	9	9,4	8,2	8
t = 2 h	9,4	9,4	9,2	9,2	9,2	9,2	9	9,3	8,3	8,3
t = 24 h	8,9	8,9	8,8	8,7	8,9	8,9	9	9	7,3	7,6
	6		7		8		9		10	
t = 0	9,8		8,2		9,5		7,9		9,1	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,3	8	8,2	8,2	8,5	8,5	8,7	8,7	8,1	8,1
t = 2 h	8,2	8	8,2	8,2	8,3	8,5	7,7	7,7	8,1	8,1
t = 24 h	7,6	7,6	7,3	7,3	7,3	7,3	8	8,1	8,3	8,1
	11		12		13					
t = 0	8		8,7		8,4					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	7,8	7,7	7,4	7,4	8,3	8,3				
t = 2 h	7,2	7,2	7,8	8,1	8,3	8,2				
t = 24 h	7,7	7,8	7,9	8	8,2	8,2				

Tab. C.13. Valori dell'ossigeno disciolto, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame artificiale.

	1		2		3		4		5	
t = 0	7,13		7,4		6,67		6,72		6,65	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	7,46	7,51	7,9	7,94	7,44	7,64	7,53	7,78	7,43	7,54
t = 2 h	7,74	7,76	8,23	8,28	7,58	7,65	7,62	7,68	7,55	7,74
t = 24 h	7,74	7,87	7,29	7,89	7,79	7,96	7,95	8,05	7,93	7,94
	6		7		8		9		10	
t = 0	6,47		7,44		7,49		7,15		7,48	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	7,41	7,4	7,45	7,64	7,59	7,73	7,67	7,78	7,22	7,49
t = 2 h	7,43	7,61	7,65	7,76	7,3	7,78	7,71	7,78	7,52	7,6
t = 24 h	7,95	7,89	7,79	7,52	7,71	7,96	7,66	7,76	7,78	7,95
	11		12		13					
t = 0	8		8,7		7,51					
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione				
t = 1 h	7,76	7,74	7,63	7,68	7,64	7,68				
t = 2 h	7,64	7,73	7,6	7,76	7,66	7,68				
t = 24 h	7,71	7,85	7,91	7,92	7,71	7,74				

Tab. C.14. Valori del pH negli esperimenti con liquame artificiale.

APPENDICE D
RISULTATI SPERIMENTALI RELATIVI ALLE PROVE
CONDOTTE CON LIQUAMI MISTI

LIQUAMI BIOLOGICAMENTE DEPURATI CONTENENTI CIRCA 5 PPM
DI Cr(VI)

	1		2		3		4		5	
t = 0	10		10		30		10		20	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	310	217	780	130	180	0	520	500	250	110
t = 2 h	770	550	350	10	270	60	370	0	680	530
t = 24 h	250	120	370	270	260	180	520	400	620	450

Tab. D.1. Valori del **contenuto proteico**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 5 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	20		26		12		26		28	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	6	38	6	34	12	16	12	12	16	16
t = 2 h	18	114	28	28	12	12	30	30	28	20
t = 24 h	30	30	36	36	140	152	44	45	24	26

Tab. D.2. Valori della concentrazione di **solidi sospesi totali**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 5 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	79		10		127		175		185	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	88	78	11	9	129	103	215	100	158	162
t = 2 h	110	77	10	9	93	95	166	119	237	200
t = 24 h	42	55	11	9	0	0	171	107	110	80

Tab. D.3. Valori della concentrazione di *Escherichia coli*, espressi in UFC*10³/100 ml, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 5 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	6,153		7,349		5,21		7,556		6,062	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	6,15	4,275	6,301	5,172	4,242	4,243	7,482	6,912	6,06	5,97
t = 2 h	4,28	3,249	5,866	4,751	3,798	3,471	7,334	5,782	6,311	6,04
t = 24 h	3,286	2,314	6,468	5,844	3,87	3,285	7,836	7,136	6,714	6,409

Tab. D.4. Valori della concentrazione di **Cromo esavalente**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 5 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	8,61		8,66		8,6		8,62		8,6	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,68	8,66	8,65	8,64	8,67	8,63	8,65	8,64	8,62	8,61
t = 2 h	8,67	8,66	8,63	8,63	8,63	8,62	8,62	8,61	8,63	8,63
t = 24 h	8,66	8,65	8,61	8,61	8,61	8,61	8,61	8,61	8,61	8,61

Tab. D.5. Valori dell'**ossigeno disciolto**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 5 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	7,69		8,47		8,6		8,01		7,7	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,56	8,67	8,43	8,48	8,64	8,74	8,09	8,16	8,06	8,07
t = 2 h	8,43	8,63	8,53	8,56	8,59	8,6	8,01	8,08	8,04	8,04
t = 24 h	8,3	8,13	8,35	8,3	8,38	8,47	8,19	8,19	8,26	8,33

Tab. D.6. Valori del **pH** negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 5 ppm di Cr(VI).

LIQUAMI BIOLOGICAMENTE DEPURATI CONTENENTI CIRCA 10 PPM

DI Cr(VI)

	1		2		3		4		5	
t = 0	60		10		90		10		10	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	250	60	120	120	440	10	120	60	800	560
t = 2 h	560	60	240	0	280	140	120	40	330	360
t = 24 h	200	190	260	580	260	160	240	70	190	130

Tab. D.7. Valori del **contenuto proteico**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 10 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	20		28		116		18		20	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	16	16	26	120	30	39	8	8	22	22
t = 2 h	26	86	24	80	60	100	12	12	130	132
t = 24 h	20	138	96	130	108	70	28	144	20	124

Tab. D.8. Valori della concentrazione di **solidi sospesi totali**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 10 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	152		80		133		111		63	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	179	159	75	55	101	90	105	77	59	39
t = 2 h	212	186	84	73	65	65	87	85	57	53
t = 24 h	200	210	122	90	103	86	52	49	30	40

Tab. D.9. Valori della concentrazione di *Escherichia coli*, espressi in UFC*10³/100 ml, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 10 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	11,58		11,79		12,429		12,07		12,66	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	11,58	10,59	11,752	11,216	12,558	11,754	12,071	11,46	12,807	11,535
t = 2 h	11,56	10,94	11,786	11,432	12,516	10,916	11,184	10,83	12,35	11,67
t = 24 h	11,56	10,8	10,592	9,264	10,304	9,862	11,767	10,03	12,352	11,26

Tab. D.10. Valori della concentrazione di **romo esavalente**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 10 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	8,29		8,15		8,12		8,11		8,08	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,17	8,15	8,14	8,12	8,11	8,14	8,09	8,08	8,03	8,01
t = 2 h	8,17	8,16	8,13	8,11	8,11	8,19	8,11	8,09	8,08	8,07
t = 24 h	8,17	8,15	8,13	8,12	8,12	8,11	8,11	8,11	8,12	8,08

Tab. D.11. Valori dell'**ossigeno disciolto**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 10 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	7,58		7,99		8,06		7,83		7,95	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,01	8,11	7,87	7,92	8,11	8,14	7,95	8,15	8,03	8,01
t = 2 h	7,8	8,12	8,11	8,23	8,06	8,2	8,23	8,16	8,14	8,15
t = 24 h	8,14	8,09	8,23	8,19	8,23	8,29	8,05	8,23	8,09	8,37

Tab. D.12. Valori del **pH** negli esperimenti con liquame biologicamente depurato contenente 10 ppm di Cr(VI).

LIQUAMI ARTIFICIALI CONTENENTI CIRCA 5 PPM DI Cr(VI)

	1		2		3		4		5	
t = 0	20		20		250		30		10	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	90	60	210	70	80	0	90	0	10	0
t = 2 h	380	190	180	30	20	0	70	20	20	0
t = 24 h	280	230	100	60	140	70	10	0	20	0

Tab. D.13. Valori del **contenuto proteico**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame artificiale contenente 5 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	41		53		27		65		45	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	28	24	163	46	28	40	85	61	140	40
t = 2 h	41	31	157	75	68	45	91	61	190	45
t = 24 h	64	38	300	53	104	64	67	72	120	100

Tab. D.14. Valori della concentrazione di *Escherichia coli*, espressi in UFC*10³/100 ml, negli esperimenti con liquame artificiale contenente 5 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	6,732		6,002		6,079		5,818		6,098	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	6,712	6,042	6,428	6,008	6,072	5,891	5,915	5,622	6,919	6,277
t = 2 h	6,055	5,996	6,669	5,716	5,604	5,162	5,969	5,495	5,942	5,491
t = 24 h	5,193	4,625	6,023	4,64	4,89	3,39	6,362	5,822	6,453	5,039

Tab. D.15. Valori della concentrazione di **Cromo esavalente**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame artificiale contenente 5 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	8,89		8,88		8,87		8,87		8,88	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,87	8,87	8,88	8,87	8,86	8,85	8,87	8,85	8,87	8,85
t = 2 h	8,88	8,88	8,88	8,87	8,87	8,86	8,87	8,87	8,87	8,87
t = 24 h	8,85	8,85	8,87	8,7	8,83	8,83	8,84	8,83	8,86	8,85

Tab. D.16. Valori dell'**ossigeno disciolto**, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame artificiale contenente 5 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	8,76		8,86		8,09		8,44		8,16	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	9,07	9,09	8,67	8,84	8,58	8,6	8,61	8,65	8,01	8,03
t = 2 h	8,86	9,03	8,65	8,88	8,52	8,54	8,5	8,59	7,94	7,98
t = 24 h	8,8	8,85	8,1	8,11	7,95	8,03	8,51	8,52	7,84	7,8

Tab. D.17. Valori del pH negli esperimenti con liquame artificiale contenente 5 ppm di Cr(VI).

LIQUAMI BIOLOGICAMENTE DEPURATI CONTENENTI CIRCA 10 PPM DI Cr(VI)

	1		2		3		4		5	
t = 0	60		50		80		60		60	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	60	0	220	160	170	0	240	200	400	270
t = 2 h	50	30	180	100	90	100	470	110	250	90
t = 24 h	300	60	140	10	80	180	640	10	440	80

Tab. D.18. Valori del contenuto proteico, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame artificiale contenente 10 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	100		114		2		48		37	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	50	50	87	87	1	1	52	46	34	35
t = 2 h	40	40	111	90	0	0	63	39	45	36
t = 24 h	300	240	300	120	1	1	46	32	27	32

Tab. D.19. Valori della concentrazione di *Escherichia coli*, espressi in UFC*10³/100 ml, negli esperimenti con liquame artificiale contenente 10 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	10,227		12,285		10,603		9,845		9,042	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	10,118	8,315	12,671	11,388	10,85	10,236	9,84	9,831	9,061	8,883
t = 2 h	10,118	8,796	12,63	11,385	10,269	9,627	8,2239	7,445	8,809	8,51
t = 24 h	10,855	10,435	12,375	12,377	10,368	7,129	8,447	7,506	8,419	7,952

Tab. D.20. Valori della concentrazione di cromo esavalente, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame artificiale contenente 10 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	8,73		8,72		8,76		8,75		7,8	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	8,78	8,76	8,71	8,68	8,72	8,71	8,73	8,73	7,75	7,75
t = 2 h	8,71	8,78	8,75	8,71	8,75	8,72	8,73	8,71	7,8	7,79
t = 24 h	8,78	8,69	8,77	8,72	8,71	8,7	7,81	7,77	7,78	7,77

Tab. D.21. Valori dell'ossigeno disciolto, espressi in mg/l, negli esperimenti con liquame artificiale contenente 10 ppm di Cr(VI).

	1		2		3		4		5	
t = 0	7,13		7,15		7,6		7,79		7,6	
	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione	controllo	campione
t = 1 h	7,69	7,78	8,1	8,07	8,02	8,13	8,78	8,83	8,17	8,28
t = 2 h	7,67	7,95	7,92	8,08	7,98	8,11	8,33	8,43	8,21	8,27
t = 24 h	7,78	7,92	7,78	8,15	8,03	8,12	8,05	8,05	7,8	7,79

Tab. D.22. Valori del pH negli esperimenti con liquame artificiale contenente 10 ppm di Cr(VI).

APPENDICE E

VALORI DEL PESO SECCO DELLE COLONIE DI

ORGANISMI-TEST IMPIEGATI NEGLI ESPERIMENTI CON

LIQUAMI CIVILI E MISTI

peso secco (g) - LIQUAMI CIVILI -			
Nr. prova	artificiale	pretrattato meccanicamente	biologicamente depurato
1	1,2105	1,0000	2,0826
2	1,2284	1,0000	2,6560
3	1,3198	0,6103	1,9261
4	1,4764	1,4000	1,0335
5	1,2163	0,6698	1,5570
6	1,4236	0,7075	1,1830
7	2,1323	2,0065	1,2427
8	1,9306	0,8000	0,9592
9	1,1599	0,6000	1,0882
10	1,6878	1,0000	0,5160
11	0,5431	0,5000	0,8700
12	0,5358	1,8227	0,5648
13	0,41	1,4361	0,8671

Tab. E.1. Valori del peso secco della colonia di organismi-test negli esperimenti condotti con liquami civili.

peso secco (g) - LIQUAMI MISTI -			
[Cr(VI)]	Nr. prova	artificiale	biologicamente depurato
5 ppm	1	1,5138	1,0265
	2	1,3036	1,4160
	3	1,2510	1,1373
	4	1,1810	1,5848
	5	1,3400	1,3894
10 ppm	1	1,2228	1,0818
	2	1,2152	1,9705
	3	1,3505	1,0608
	4	0,8526	1,2130
	5	0,7370	1,0670

Tab. E.2. Valori del peso secco della colonia di organismi-test negli esperimenti condotti con liquami misti.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.

AHRENS, M. J., J. HERTZ, E. M. LAMOUREUX, G. R. LOPEZ, A. E. MCELROY, B.L. BROWNAWELL, 2001. The effect of body size on digestive chemistry absorption efficiencies of food and sediment-bound organic contaminants in *Nereis succinea* (Polychaeta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **263**, pp. 185-209.

BLAZKA, P., 1966. Bestimmung der Proteine in Material aus Binnengewässern. *Limnologica*, **4** (2), pp. 387-396.

BOOTH, R. A., N. J. LESTER, 1995. The potential formation of halogenated by-products during peracetic acid treatment of final sewage effluent. *Water Research*, **29** (7), pp. 1793-1801.

CATTANEO-VIETTI, R., U. BENATTI, C. CERRANO, M. GIOVINE, S. TAZZIOLI, G. BAVESTRELLO, 2003. A marine biological underwater depuration system (MUDS) to process waste waters. *Biomolecular Engineering*, **20**, pp. 291 – 298.

CHASE, M. E., S. H. JOES, P. HENNIGAR, J. SOWLES, G. C. H. HARDING, K. FREEMAN, P. G. WELLS, C. KRAHFORST, K. COOMBS, R. CRAWFORD, J. PEDERSON, D. TAYLOR, 2001. Gulfwatch: Monitoring Spatial and Temporal Patterns of Trace Metal and Organic Contaminants in the Gulf of Maine (1991-1997) with the blue Mussel, *Mytilus edulis* L. *Marine Pollution Bulletin*, **42**, pp 401-505.

CIRINO, P., A. TOSCANO, D. CARAMIELLO, A. MACINA, V. MIRAGLIA, A. MONTE, 2002. Laboratory culture of the Ascidian *Ciona Intestinalis* (L.): A Model System For Molecular Developmental Biology Research. *Marine Models Electronic Record (serial on line)*, **27**.

DANSKIN, G. P., 1978. Accumulation of heavy metals by some solitary tunicates. *Canadian Journal of Zoology*, **56**, pp. 547-551.

D.LGS. 152/99. 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. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n°124 del 29 maggio 1999.*

D.LGS. 152/06. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n°88 del 14 aprile 2006 – Supplemento Ordinario n°96.*

D.LGS. 258/00. Disposizioni correttive ed integrative del decreto legislativo 11 maggio 1999, n°152, in materia di tutela delle acque dall'inquinamento, a norma dell'articolo 1, comma 4, della legge 24 aprile 98, n° 128. *Gazzetta Ufficiale n°218 del 18 settembre 2000.*

D.M. 367/03. Regolamento concernente la fissazione di standards di qualità nell'ambiente acquatico per le sostanze pericolose, ai sensi dell'articolo 3, comma 4, del D.Lgs. 11 maggio 1999, n°152. *Gazzetta Ufficiale n°5 dell'8 gennaio 2004.*

DECISIONE n° 2455/2001/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 20 novembre 2001, relativa all'istituzione di un elenco di sostanze prioritarie in materia di acque che modifica la direttiva 2000/60/CE. *Gazzetta Ufficiale n° L 331 del 15 dicembre 2001.*

DE DONNO, A., A. CAMPA, D. LIACI, F. BAGORDO, M. C. ROLLO, 2006. Studio di captazione e ritenzione in vitro di *Escherichia coli* da parte di *Mytilus galloprovincialis*. *Biologi Italiani*, 5, pp. 32-38.

DELLA CROCE, N., R. CATTANEO VIETTI, R. DANOVARO, 2001. Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero. *Utet.*

DIRETTIVA 91/271/CEE del Consiglio, del 21 maggio 1991, concernente il trattamento delle acque reflue urbane. *Gazzetta Ufficiale n° L 135 del 30 maggio 1991.*

DIRETTIVA 97/676/CE del Consiglio, del 12 dicembre 1991, relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole. *Gazzetta Ufficiale n° L 375 del 31 dicembre 1991*.

DIRETTIVA 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale n° L 327 del 22 dicembre 2000*.

DIRETTIVA 2006/7/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 15 febbraio 2006, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e che abroga la Direttiva 76/160/CEE. *Gazzetta Ufficiale n° L 64/37 del 4 aprile 2006*.

DRISCOLL, S. K, A. E. MCELROY, 1996. Bioaccumulation and metabolism of benzo[α]pyrene in three species of polychaete worms. *Environmental Toxicology and chemistry*, **10**, 1401-1410.

DYBERN, B. I., 1967. The distribution and salinity tolerance of *Ciona intestinalis* (L.) *f. tipica* with special reference to the waters around southern Scandinavia. *Ophelia*, **4**, 207-226.

DYBERN, B. I., 1969. Distribution and ecology of ascidians in Kviturdvåkpollen and Vågsbopollen on the west coast of Norway. *Sarsia*, **37**, 21-40.

DORIT, R. L., W. F. WALKER, R. D. BARNES, 2001. Zoologia. *Zanichelli*.

FERGUSON, P. L., G. T. CHANDLER, 1998. A laboratory and Field Comparison of Sediment Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Bioaccumulation by the Cosmopolitan Estuarine Polychaete *Streblospio benedicti* (Webster). *Marine Environmental Research*, **45**, pp.387-401.

FIALA-MEDIONI, A., 1978. Filter – feeding ethology of benthic invertebrates (Ascidians). IV. Pumping rate, filtration rate, filtration efficiency. *Marine Biology*, **48**, pp. 243 – 249.

FIORILLO, S.. Dispense del corso di “Microbiologia delle acque reflue”.

FIORILLO, S., 2004. Tesi di dottorato in Ingegneria chimica, dei materiali e della produzione: Rimozione del Cr⁶⁺ da liquami sintetici mediante utilizzo di carboni attivi e biomasse (biological activating carbon) in sistema-pilota a fanghi attivi. *Università degli studi di Napoli “Federico II”*.

FIORILLO, S., F. BOSONE, 2002(a). Effetti di scarichi industriali sugli impianti di depurazione a fanghi attivi: il caso del Depuratore di Cuma. *Atti del III Convegno nazionale Air liquid sul trattamento delle acque: Pompei – Sorrento, 15–16 maggio*.

FIORILLO, S., F. BOSONE, 2002(b). Tecniche di disinfezione a confronto. *Acqua e Aria – Mensile di Scienze e Tecniche ambientali; pp. 30–42*.

FIORILLO, S., M. LIBONATI, 1984. Recenti aspetti sulla biochimica del vanadio. *Bollettino della Società dei Naturalisti in Napoli, 93, pp. 19–40*.

LAWRENCE, C. E., P. R. TAYLOR, B. J. TROCK, A. A. REILLY, 1984. Trihalometanes in drinking water and human colorectal cancer. *Journal of Natural Cancer Institute, 72, pp. 563-568*.

GOODBODY, I., 1974. The physiology of ascidians. *Advances in Marine Biology, 12, pp. 1–149*.

IRSA–CNR. Metodi analitici per le acque.

JØRGENSEN, C. B., T. KIØBOE, F. MØHLENBERG, H. U. RIISGÅRD, 1984. Ciliary and mucus net filter feeding, with special reference to fluid mechanical characteristics. *Marine Ecology Progress Series, 15, pp. 283–292*.

JØRGENSEN, C. B., E. D. GOLDBERG, 1953. Particle filtration in some ascidians and lamellibranchs. *Biological Bulletin Marine Biological Laboratory, Woods Hole, 105, pp. 477-489*.

JØRGENSEN, C. B., P. S. LARSEN, H. U. RIISGÅRD, 1990. Effects of temperature on the mussel pump. *Marine Ecology Progress Series*, **64**, pp. 89–92.

LEGGE 319/76. Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento. *Gazzetta Ufficiale* **141** del 29 maggio 1976.

MACGINITIE, G. E., 1939. The method of feeding of Tunicates. *Biological Bulletin Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, **77**, pp. 443-447.

MASOTTI, L., 1987. Depurazione delle acque – Tecniche ed Impianti per il trattamento delle acque di rifiuto. *Calderini*.

MELLUSO, G., S. DI FILIPPO, L. FERRO, 1978. Prime indagini microbiologiche sulla valutazione dell'inquinamento della Darsena Petroli. *Bollettino Società Italiana di Biologia Sperimentale*, **54**, pp. 2062-2068.

MILANESE, M., E. CHELOSSI, R. MANCONI, A. SARA', M. SIDRI, R. PRONZATO, 2003. The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in aquaculture. *Biomolecular Engineering*, **20**, pp. 363-368.

MILLAR, R. H., 1960. Ascidiacea. "Discovery" Report, **30**, 1-160.

MILLAR, R. H., 1971. The biology of ascidians. *Advances in Marine Biology*, **9**, pp. 1–100.

MICHIBATA M., 1984. Comparative study on amounts of trace elements in the solitary ascidians, *Ciona intestinalis* and *Ciona robusta*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **78 A**, pp. 285–288.

PAPADOPOULOU C., G. D. KANIAS, 1977. Tunicate species as marine pollution indicators. *Marine Pollution Bulletin*, **8**, pp. 229- 231.

PETERSEN, J., H. D. RIISGÅRD, 1992. Filtration capacity of the ascidian *Ciona Intestinalis* and its grazing impact in a shallow fjord. *Marine Ecology Progress Series*, **88**, pp. 9–27.

PICKARD, G. L., W. L. EMERY, 2000. Descriptive physical oceanography – an introduction - 5th (SI) England Edition. *BH*.

PROVINI, A., S. GALASSI, R. MARCHETTI, 2003. Ecologia applicata. *Città Studi Edizioni*.

REGOLI, F., E. ORLANDO, 1994. Accumulation and Subcellular Distribution of Metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean Mussel *Mytilus Galloprovincialis* During a Field Transplant Experiment. *Marine Pollution Bulletin*, **28**, pp. 592-600.

RIISGÅRD, H. U., N. M. IVARASSON, 1990. The crown–filament pump of the suspension–feeding polychaete *Sabella penicillus*: filtration, effects of temperature, and energy cost. *Marine Ecology Progress Series*, **62**, pp. 249–257.

ROBBINS, I. J., 1983. The effects of body size, temperature, and suspension density on the filtration and ingestion of inorganic particulate suspensions by ascidians. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology*, **70**, pp. 65–78.

ROBBINS, I. J., 1984. The regulation of ingestion rate, at high suspended particulate concentrations, by some Phlebobranchiate Ascidians. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology*, **82**, pp. 1-10.

SHUPAK, S. I., 1991. The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environmental Health Perspective*, **92**, pp. 7-11.

STANDARD METHODS for the examination of water and wastewater, 1980.

STORER, T. I., R. L. USINGER, R. C. STEBBINS, J. W. NYBEKKEN, 1982. Zoologia. *Zanichelli*.

VISMARA, R., 1982. Depurazione biologica. *Hoepfi*.

WANG, W. X., N. S. FISHER, 1996. Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of food composition. *Limnology and Oceanography*, **41**, pp. 197-227.

WANG, W. X., N. S. FISHER, 1999. *Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates*. *The Science of the Total Environment*, **238**, pp. 459-472.

www.bio.mq.edu/MarBiol/poll.htm

www.mlb.edu/BiologicalBulletin/MMER/cirino/CirCon.html

www.reefkeeping.com