



Istituto per l'Ambiente Marino Costiero

IAMC – CNR

U.O.S. DI CAPO GRANITOLA

Rapporto tecnico

***I test a terra su un impianto pilota per
il trattamento delle acque di zavorra***

Ballast Water Treatment System

Parte II

(Land Test)

Corresponding author:

Fabio D'Agostino, fabio.dagostino@iamc.cnr.it

Marianna Musco, marianna.musco@iamc.cnr.it

Authors:

*Fabio D'Agostino, Marianna Musco, Marianna Del Core, Mario Sprovieri, Angela Cuttitta,
Aldo Nicosia, Carlo Patti, Simone Cappello, Salvatore Mazzola.*

INDICE

1 Introduzione

Stato dell'arte

Obiettivi del Progetto

2 L'impianto pilota

3 Prove a terra - Land Test

3.1 Caratteristiche dell'acqua da trattare – *Influent Water (Rif. MEPC G8)*

3.2 Efficacia del trattamento - MEPC.174(58) G8

4 L'acqua da trattare

5 Coltivazione organismi viventi

5.1 Coltivazione *Artemia salina*

5.1.1 Procedura per l'allevamento dell'*Artemia salina* non decapsulata

5.2 Coltivazione *Brachionus plicatilis*

5.3 Coltivazione *Tetraselmis seucica*

5.4 Coltivazione *Alcanivorax borkumensis*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

5.5 Arricchimento DOC e POC

5.6 Cronoprogramma delle attività

6 Procedura per il trattamento delle acque di zavorra

6.1 Campionamento delle acque - MEPC.174(58) G8

6.1.1 Attrezzature usate per il campionamento

6.2 Punti di prelievo e modalità

7 Strumenti e metodi

7.1 Misure ambientali

7.2 Conta degli organismi viventi con dimensione > 50 μm

7.3 Conta degli organismi vivi con dimensione >10 e < 50 μm

7.4 Riconoscimento phyla/division

7.5 Conta dei batteri

7.6 Analisi DOC/POC

7.7 Analisi particolato solido sospeso

7.8 Analisi della torbidità (NTU)

8 Validità dei test a terra (land test)

9 Conclusioni

1 Introduzione

Stato dell'arte

Da più di un decennio gli organismi internazionali aderenti all'IMO - *International Maritime Organization*, stanno combattendo una importante questione per la salvaguardia degli ecosistemi oceanici, in seguito alla mobilitazione di ingenti spostamenti di acqua di mare e continentali da un paese ad un altro a mezzo di navi mercantili, navi petroliere, navi da crociera, che usano le acque portuali come zavorra per assicurare una corretta linea di galleggiamento e una più sicura navigazione. L'acqua di zavorra, *Ballast Water*, generalmente viene aspirata dal porto di partenza, immessa nei comparti stagni della carena, ed infine scaricata durante la navigazione o all'approdo in un altro paese. Questa azione di carico e scarico non tiene conto della contaminazione incontrollata dei mari di approdo, riversando sostanze chimiche, batteri, virus, specie fitoplanctoniche e zooplanctoniche aliene, che possano alterare l'equilibrio dell'ecosistema locale.

Al fine di limitare la contaminazione ambientale dovuta alle acque di zavorra, il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare ha emanato il D.M. 16 giugno 2010 che definisce le procedure nazionali per il riconoscimento dell'idoneità di impianti di trattamento di tali acque; le procedure del decreto sono conformi alle Linee Guida adottate dall'IMO con la risoluzione MEPC 174(58) dell'ottobre 2008 e 169(57) dell'aprile 2008.

Obiettivi del Progetto

Nell'ambito delle attività di supporto scientifico alle imprese, l'IAMC-CNR ha svolto una collaborazione tecnico scientifica con una società del nostro territorio atta a validare il sistema per il trattamento delle acque di zavorra, da questa azienda ideata, in conformità al D.M. 16 giugno 2010 s.m.i., Ballast Water Treatment System – BWTS, con il fine di ottenere la certificazione di prodotto di “tipo approvato”.

La tecnologia che la committenza ha inteso testare è quella che usa la produzione in situ di cloro attivo con una capacità di trattamento delle acque di zavorra compreso tra 200 e 1.000 mc/h.

Le procedure per l'ottenimento della certificazione di tipo approvato del BWTS prevedono la convalida del *Basic Approval*, ossia quel documento atto a dimostrare la idoneità della sostanza attiva utilizzata, ed una serie di test per la verifica dell'efficacia del trattamento.

I test da eseguire in conformità con le linee guida MEPC sono riportati nel *Final Approval* e prevedono una serie di test svolti sia a terra, denominati *Land Test*, sia a bordo nave, denominati *Shipboard Test*.

Così come disposto dal D.M. le prove da effettuare a terra possono essere svolte da un organo terzo e imparziale, mentre quelle a bordo nave, devono essere svolte in presenza dell'Organismo Notificato (O.N.) che ne convaliderà la tecnologia dopo che sono state eseguite con successo almeno tre prove consecutive.

Il presente lavoro rappresenta la Parte II, tecnico-sperimentale, del rapporto tecnico pubblicato da D'Agostino *et al.*, 2013, intitolato: "La clorazione in situ per il trattamento delle acque di zavorra - Ballast Water Treatment System - Parte I (Normativa e Basic Approval)". In questo rapporto tecnico si evidenziano le procedure e le metodologie necessarie sia per la coltivazione degli organismi viventi che per la validazione dei test, messi a punto per le prove a terra, *Land Test*, sull'impianto pilota.

2 L'impianto pilota

L'impianto pilota realizzato a terra è stato dimensionato con una capacità di trattamento (TRC – treatment rate capacity) delle acque di zavorra di 200 mc/h.

Questo TRC rientra nella riduzione in scala per l'ottenimento della certificazione di tipo approvato per impianti di zavorra che abbiano un sistema di pompaggio sino a 1.000 mc/h.

L'impianto pilota è costituito da: n. 2 vasche con capacità prossima a 250 mc; n. 2 pompe avente un portata complessiva pari a 200 mc/h; n. 2 celle elettrolitiche per la produzione dell'ipoclorito; un set di filtri con maglia di circa 150 μm ; un sistema di valvole e pompa da 8 mc/h per lo splittaggio dell'acqua verso le celle.

Le due vasche gemelle da 250 mc rappresentano rispettivamente: il sistema mare, ossia una vasca che contiene l'acqua da trattare (*influent water*), e la cassa di

zavorra dove immettere l'acqua trattata. Il sistema di filtri montati in linea nei canali di trasporto dell'acqua, aventi maglia di circa 150 µm, hanno lo scopo di eliminare sia gli organismi viventi sia il materiale particellare di dimensione maggiore di 150 µm, che possano compromettere il buon funzionamento delle pompe e di tutte le altre parti sensibili dell'impianto.

3 Prove a terra - *Land Test*

L'ottenimento della certificazione è subordinato all'esito positivo dei test svolti sull'impianto pilota realizzato a terra e a bordo nave.

Le procedure per l'esecuzione delle prove a terra descritte nella linea guida MEPC.174(58) G8, vengono riportate nei paragrafi successivi.

Questa linea guida descrive le procedure da seguire per il campionamento delle acque, i parametri da monitorare prima, durante e a termine del trattamento delle acque con la sostanza attiva, e i criteri di validità dei test in conformità alle caratteristiche dell'*influent water* e alla *regulation D2*.

3.1 Caratteristiche dell'acqua da trattare – *Influent Water (Rif. MEPC G8)*

Secondo la linea guida, i *land test* sono validi se svolti su due set di cicli di prova, ciascuno costituito da 5 prove ripetitive.

I due set di prove devono intendersi su acque (*influent water*) che abbiano le caratteristiche riportate in tabella 1 e in funzione della salinità.

Inoltre i due set di prova devono differire di almeno 10 PSU di salinità.

Tabella 1: range della salinità – *influent water* (Rif. MEPC G8 - 2.3.17)

Parametri	Salinità		
	>32PSU	3-32 PSU	<3 PSU
Carbonio organico disciolto (DOC)	>1 mg/l	>5 mg/l	>5 mg/l
Carbonio organico particolato (POC)	>1 mg/l	>5 mg/l	>5 mg/l
Particolato sospeso totale (PST)	>1 mg/l	>50 mg/l	>50 mg/l

Oltre queste caratteristiche, l'*influent water* deve contenere anche organismi viventi nelle concentrazioni e numero di specie di seguito riportati:

1. gli organismi di prova, la cui dimensione minima sia maggiore o uguale a 50 μm , devono essere presenti in una densità totale preferibilmente di 10^6 , ma non inferiore a 10^5 individui per metro cubo, e devono essere composti di almeno 5 specie di almeno 3 differenti phyla;
2. gli organismi di prova, la cui dimensione minima sia maggiore o uguale a 10 μm e minore di 50 μm , devono essere presenti in una densità totale preferibilmente di 10^4 ma non minore di 10^3 individui per ml, e devono essere composti di almeno 5 specie di almeno 3 differenti phyla;
3. batteri eterotrofici vivi devono essere presenti in una densità di almeno 10^4 batteri per ml;
4. la varietà di organismi viventi nell'acqua di prova dovrebbe essere documentata secondo le classi di dimensioni citate sopra indipendentemente se siano naturalmente presenti o aggiunti per soddisfare i requisiti di densità e di varietà degli organismi.

La quantità e il numero di specie degli organismi viventi che devono essere contenuti nell'acqua da trattare possono essere naturalmente presenti o essere aggiunti da specie coltivate.

I batteri di seguito elencati non devono essere aggiunti all'acqua in ingresso, ma devono essere semplicemente misurati all'ingresso e al momento della scarica:

1. coliformi;
2. gruppo enterococchi;
3. *Vibrio cholerae*;
4. batteri eterotrofici.

L'uso di organismi viventi coltivati deve rispettare le regole della quarantena del paese dove vengono svolte le prove sia durante la cultura sia durante la scarica.

3.2 Efficacia del trattamento - MEPC.174(58) G8

L'efficacia del sistema proposto, Ballast Water Treatment System, deve essere provata con una metodologia scientifica standard. In particolare l'efficacia del BWTS nei confronti degli organismi viventi dell'acqua di zavorra deve essere provata

confrontando l'acqua di zavorra trattata, “gruppi trattati”, con l'acqua di zavorra non trattata, “gruppi di controllo”. Questo confronto ha lo scopo di verificare la mortalità di questi organismi dovuta al trattamento con la sostanza attiva dalla mortalità naturale o per altre cause ambientali.

La linea guida specifica che devono essere prelevati campioni multipli, in un minimo di tre, di acqua di controllo e di quella trattata all'interno di un singolo ciclo di prova, al fine di ottenere una stima statistica delle condizioni dell'acqua durante la sperimentazione. Inoltre specifica anche che i campioni multipli prelevati durante il singolo ciclo di prova non devono essere trattati come misure indipendenti nella valutazione statistica dell'effetto del trattamento onde evitare “pseudo repliche”.

L'analisi statistica della funzionalità del BWTS dovrebbe comprendere dei t-test o test statistici simili, che confrontano l'acqua di controllo e quella trattata. Il confronto tra l'acqua di controllo e quella trattata fornirà una prova di mortalità inaspettata nell'acqua di controllo, indicando l'effetto di una sorgente incontrollata di mortalità nella apparecchiatura di prova. Pertanto qualora il valore medio della concentrazione degli organismi viventi nella acqua trattata a fine trattamento (*discharge water*) sia maggiore dei valori nella regola D-2, il ciclo di prova non sarà valido, come anche se la concentrazione degli organismi viventi nell'acqua trattata a fine trattamento sia inferiore od uguale a 10 volte i valori della acqua di controllo.

Regola D-2

La regola D-2 stabilisce che le navi che soddisfano i requisiti della Convenzione e che ottemperano agli standard di prestazione dell'acqua di zavorra, devono scaricare:

1. meno di 10 organismi vivi, con dimensione minima è maggiori od uguale a 50 μm , per metro cubo;
2. meno di 10 organismi vivi, la cui dimensione minima è inferiori a 50 μm e maggiore od uguale a 10 μm , per ml;
3. meno delle seguenti concentrazioni di microbi indicatori, come standard di salute per l'uomo:
 - a. *V. cholerae* tossigenico (serotipi O1 e O139), al di sotto di 1 unità formante colonia (cfu) per 100 ml o meno di 1 cfu per 1 grammo (peso netto) di campioni di zooplancton;

- b. *Escherichia coli* meno di 250 cfu per 100 ml;
- c. Enterococchi intestinale meno di 100 cfu per 100 ml.

4 L'acqua da trattare

L'impianto pilota è stato costruito in un sito prospiciente il mare e pertanto l'acqua da trattare è stata prelevata a pochi metri dalla riva ad una profondità di circa 2 metri, su un fondale di circa 3 metri. Quest'acqua è stata prelevata con una pompa a motore da 30 mc/h, trasportata con un'autobotte di circa 18 mc e infine versata dentro la prima vasca, detta *vasca presa mare*, con una seconda pompa. Per riempire la vasca con almeno 200 mc di acqua di mare di conseguenza sono stati necessari almeno 12 cicli di riempimento e svuotamento dell'autobotte.

I primi test, finalizzati alla caratterizzazione dell'*influent water* hanno evidenziato la non conformità con i parametri dettati dalla MEPC sia per quanto concerne la concentrazione di organismi vivi di tipo zooplanctonici, fitoplanctonici e batterici sia per quanto concerne la concentrazione di carbonio organico disciolto (DOC), carbonio organico particellare (POC).

Per questi motivi sono stati messi a punto, nei laboratori del IAMC-CNR UOS di Capo Granitola, metodiche per la coltivazione di specie zooplanctoniche, fitoplanctoniche e batteriche per raggiungere le concentrazioni dettate dalla linea guida MEPC nella vasca presa mare.

5 Coltivazione organismi viventi

La coltivazione di organismi zooplanctonici e fitoplanctonici per l'arricchimento dell'acqua di mare da usare come *influent water* prelevata dalle coste e riversata nella vasca di presa mare, è stata sviluppata tenendo presente i fattori di arricchimento necessari per raggiungere le concentrazioni dettate dalla MEPC in considerazione del volume di acqua da trattare (circa 200 mc).

Di seguito vengono elencati i criteri sui quali sono stati scelti questi organismi:

- Capacità di vivere nei due *range* di salinità scelti per i test (> 32 PSU e 3<PSU<32);

- Elevata velocità di riproduzione e crescita, finalizzate al raggiungimento della concentrazione massima in circa una settimana;
- Capacità di vivere in condizioni di deficit di ossigeno disciolto, a temperatura prossime a 15 °C e pH circa 8.
- Capacità di sopravvivere durante il trasporto dalla sede del IAMC-CNR di Capo Granitola al sito dell'impianto pilota.

Dalle ricerche bibliografiche è stato scelto di coltivare:

- *Artemia salina* (Linneau, 1758) e *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786), quali specie zooplanctoniche la cui dimensione minima è \geq di 50 μm ;
- *Tetraselmis seucica* (Kylin) Butcher, 1959, quale specie fitoplanctonica la cui dimensione minima è \geq di 10 μm ;
- *Alcanivorax borkumensis* Yakimov, Golyshin, Lang, Moore, Abraham, Lunsdorf & Timmis, 1998 e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier, Lafay, Christen, Fernandez, Acquaviva, Bonin & Bertrand, 1992 quali taxa batterici.

5.1 Coltivazione di *Artemia salina*

A. salina è una specie zooplanctonica che vive sia in acque marine che in acque salmastre. Le sue dimensioni sono comprese tra i 2 mm dello stadio di nauplio e 10-12 mm dell'adulto, raggiungendo la maturità sessuale dopo 5-7 gg.

Nelle figure seguenti sono riportate la fase di nauplio (Fig. 1), quella di adulto (Fig. 2) ed il ciclo vitale (Fig. 3) di *A. salina*.



Figura 1: Naupli di *Artemia salina*



Figura 2: *Artemia salina* adulta

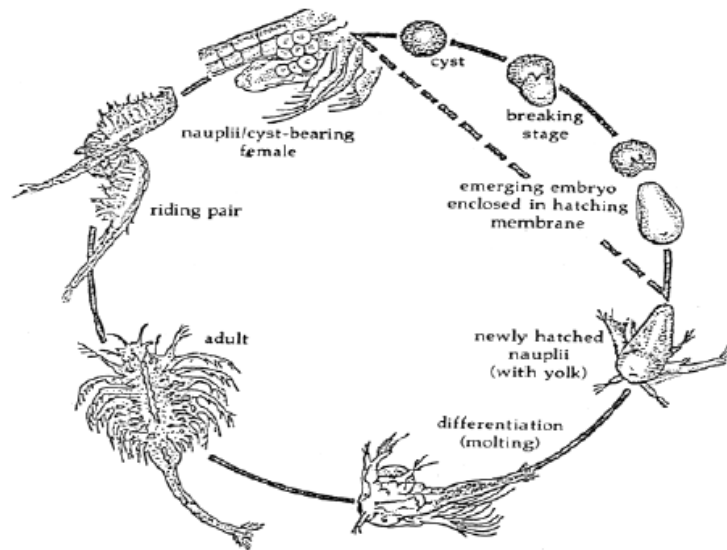


Figura 3: Ciclo di vita di *Artemia salina*

Per l'allevamento di questa specie zooplanctonica sono state acquistate le cisti non decapsulate, con una densità di schiusa di circa 250.000 individui per grammo di cisti. Al fine di raggiungere una densità maggiore di 10^5 individui per mc di acqua ed essendo la vasca di prova di 200 mc, è stato necessario produrre almeno 2×10^7 individui adulti per assicurare la conformità per ogni test.

A tale scopo è stato acquistato e messo appunto un impianto a riciclo d'acqua, riportato nella Figura 4, costituito da:

- due vasche da 450 litri con setto filtrante da $75 \mu\text{m}$, dotate di apposite termo resistenze per la regolazione della temperatura dell'acqua;
- una vasca per la purificazione dell'acqua costituita da:
 - un sistema di filtri per l'abbattimento del particolato solido sospeso;
 - uno schiumatoio per la eliminazione di proteine, oli e grassi disciolti nell'acqua prodotti durante gli stadi di schiusa e di vita di *A. salina*;
 - una lampada UV-C per l'abbattimento della carica batterica.



Figura 4: Impianto per la produzione e allevamento *Artemia salina*

5.1.1 Procedura per l'allevamento di *Artemia salina* non decapsulata

Per poter produrre, come già detto, almeno 2×10^7 individui di *A. salina* necessitano almeno 80 grammi di cisti, assumendo che la percentuale di schiusa sia prossima a 250.000 individui per grammo.

Pertanto sono stati utilizzati circa 100 grammi di cisti non decapsulate per le attività di allevamento.

L'allevamento di *A. salina* è stata svolta secondo i seguenti step:

- decapsulazione di 100 gr di cisti;
- schiusa;
- trasferimento nelle vasche di allevamento;
- crescita.

La decapsulazione e la schiusa delle cisti di *A. salina* è stata effettuata in acqua di mare usando un recipiente da 50 litri per uso alimentare, provvisto di rubinetto posto ad un paio di centimetri dal fondo, e secondo le seguenti modalità:

Preparazione

- riempimento del recipiente con acqua di mare filtrata;

- riscaldamento dell'acqua sino 29 °C;
- correzione del pH tra 7.5 e 8.2 ove necessario.

Decapsulazione

- aggiunta di 50 ml di HClO al 14%;
- aggiunta di 100 gr di cisti;
- aerazione a tubo aperto abbastanza sostenuto affinché le cisti restino in continuo movimento;
- neutralizzazione, dopo un'ora, con 50 ml di sodio metabisolfito in soluzione al 20%.

Schiusa

- accensione del corpo illuminante da almeno 2000 lux;
- aerazione a tubo aperto abbastanza sostenuto affinché le cisti restino in continuo movimento;
- dopo circa 24 ore è avvenuta la quasi totalità della schiusa delle cisti.

Prelievo dei naupli e trasferimento in vasca di allevamento

- spegnimento del corpo illuminante;
- spegnimento dell'aerazione in modo da far depositare le cisti schiuse (circa 20 min);
- oscuramento del recipiente e accensione di una lampada in prossimità del rubinetto lasciando passare uno spiraglio di luce così da attrarre i naupli verso il rubinetto;
- trasferimento dei naupli nelle vasche di allevamento, tramite apertura del rubinetto.

Vasche di allevamento

- pulizia e disinfezione delle vasche per ogni ciclo;
- mantenimento dell'acqua a circa 24 °C per i primi due giorni;
- 2 giorni di pausa con spegnimento del termostato per portare gradualmente la temperatura dell'acqua a quella ambientale;
- correzione, se necessario, del pH a circa 8.2, con bicarbonato di sodio NaHCO₃ precedentemente solubilizzato in acqua;

- durante i giorni di allevamento i naupli sono stati nutriti con alimentazione specifica;
- dopo l'accrescimento, gli adulti di *A. salina* sono stati nutriti con lievito e/o alghe provenienti dall'impianto di produzione della *T. seuica*;
- durante tutti i giorni di allevamento sono stati effettuati test per l'analisi quantitativa degli individui vivi/ml e monitorate le condizioni ambientali delle vasche (temperatura, pH, ossigeno disciolto).
- dopo il 5° giorno gli individui di *A. salina* sono già adulti e possono essere prelevati e trasportati all'impianto di pilota in due bidoni da 25 litri, provvisti di ossigenatori.

Il trasporto ha rappresentato una grossa criticità per la riuscita del processo, in quanto, vista la elevata densità degli individui, vi è un consumo di ossigeno disciolto molto veloce. Per tale motivo sono stati sostituiti gli ossigenatori ad aria con una piccola bombola di ossigeno. In tal modo infatti si è riusciti ad avere, sino al momento dello scarico in vasca, una soluzione con più del 90% di ossigeno disciolto e una scarsa mortalità degli individui.

5.2 Coltivazione *Brachionus plicatilis*

B. plicatilis appartiene al phylum Rotifera, ed è caratterizzato da *range* di salinità, temperatura, pH e ossigeno disciolto molto ampi. Il *B. plicatilis* (tipo L) è stato scelto per le sue dimensioni, che variano da 70 µm, per i giovani, a 350 µm, per gli adulti (Fig. 5).

L'allevamento di questa specie zooplanctonica è stato necessario sia per integrazione del numero di individui con dimensione minima \geq di 50 µm, sia come seconda specie planctonica per soddisfare il requisito della MEPC in riferimento al numero di *phyla division*.

In condizioni di allevamento, la riproduzione di *B. plicatilis* avviene per partenogenesi da femmine "amittiche" tramite uova non fecondate, anch'esse dette amittiche (diploidi 2n), che generano nuovamente femmine amittiche. La partenogenesi avviene ogni 4 ore circa, le uova si schiudono dopo altre 15 ore ed dopo

24 ore il rotifero è adulto. Il ciclo di vita di una singola femmina è di circa sette giorni, a 25 °C. Questo ciclo determina una velocità di riproduzione esponenziale nel tempo e tale da raggiungere 10^7 individui in pochi giorni partendo da qualche migliaio di individui.

L'alimentazione avviene per filtrazione dell'acqua ed include alghe, batteri, particelle in sospensione, eccetera.

L'allevamento dei rotiferi è avvenuto usando un recipiente di circa 150 litri alle seguenti condizioni:

- pH 7.5 - 9;
- temperatura 17 - 26 °C;
- ossigenazione lenta e senza pietra porosa. Questo accorgimento è di fondamentale importanza in quanto, così come anche per *A. salina*, la pietra porosa genera delle microbolle d'aria che aderiscono alle ciglia degli individui, compromettendone la naturale motilità e portandole alla morte;
- alimentazione tramite microalga *T. seucica* prodotta in loco ed addizionata all'acqua.

L'allevamento dei rotiferi, ha avuto inizio diluendo 50 ml di acqua marina contenente una colonia con circa 3×10^3 individui, acquistata da un rivenditore locale, in un recipiente da 1 litro riempito per metà con acqua di mare, precedentemente disinfettata con ipoclorito e dopo 1 ora neutralizzata con meta bisolfito di sodio, e per metà con una soluzione satura di *T. seucica* prodotta in loco. Dopo una settimana circa, è stato eseguito lo stesso procedimento riversando il contenuto in un recipiente da 100 litri con acqua di mare (50%) e la soluzione di *T. seucica* (50%).

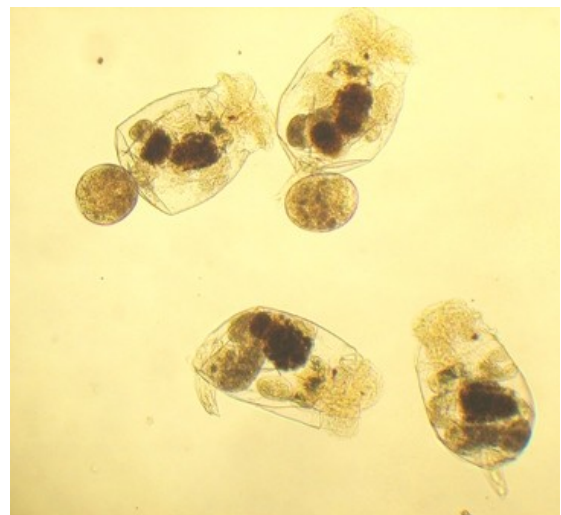


Figura 5: *Brachionus plicatilis* tipo L

Per ogni ciclo di test sono stati prelevati circa 50 litri della soluzione acquosa contenente rotiferi, e successivamente sono stati immessi nella cisterna 50 litri di soluzione satura di *T. seucica*. Così facendo è stato possibile assicurarsi per ogni test circa 10^7 individui di *B. plicatilis*.

Il trasporto dei rotiferi è risultato più semplice rispetto quello di *A. salina*, in quanto resistendo a concentrazioni di ossigeno disciolto minori di 2 ppm non vi è stata la necessita di un ossigenatore.

5.3 Coltivazione *Tetraselmis seucica*

Per rispondere alle richieste dettate dalla linea guida della MEPC in riferimento agli organismi viventi la cui dimensione sia compresa tra 10 e 50 μm con densità totale maggiore di 10^3 per ml, è stata coltivata la *T. seucica* (Fig. 6). Questa specie fitoplanctonica è un'alga verde unicellulare appartenente al phylum Chlorophyta, vive in ambienti marini, e le sue dimensioni variano da 10 a 15 μm .

La scelta di coltivare questa alga risiede nella sua elevata velocità di duplicazione e capacità di raggiungere una densità di popolazione maggiore di 2×10^6 individui per ml di acqua di coltura.

Nel caso in specie, essendo la vasca di zavorra di 200 mc, si ha la necessità di fornire almeno 2×10^{11} alghe, per cui si sono utilizzati di volta in volta due recipienti a sacco in plastica trasparente del volume di circa 180 litri; pertanto ogni due settimane sono stati prelevati 250 litri di acqua di coltura contenenti circa 5×10^{11} individui.



Figura 6: *Tetraselmis seucica*



Figura 7: Impianto di produzione microalghe

La coltivazione è avvenuta usando un impianto di produzione, riportato in figura 7, e consistente in:

- 10 postazioni per sacchi da 180 litri;
- 10 lampade tipo neon con due tubi da 36 watt ciascuno accesi 24/24h;
- 1 sistema di areazione con compressore capace di fornire aria, a tutte le postazioni, in modo turbolento.

Per gli scopi di questo progetto, al fine di raggiungere la corretta concentrazione di microalghe, ogni due settimane sono state impegnate quattro postazioni in modo da riporre nei due sacchi vuoti e per ogni ciclo circa 50 litri di microalghe, usati come starter per la nuova produzione e successivamente reintegrati con il terreno di coltura.

Il terreno di coltura usato è del tipo *Guillard F/2*. Questo è composto, per litro di acqua di mare filtrata e sterilizzata, da:

1 ml della seguente soluzione (1)

- | | |
|--|---------|
| • Na ₂ EDTA | 4,16 g |
| • FeCl ₃ ·6H ₂ O | 3,15 g |
| • CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,01 g |
| • ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,022 g |
| • CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,01 g |
| • MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0,18 g |

- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,006 g

1 ml della seguente soluzione Vitamin mix

- Cyanocobalamin (Vitamin B12) 0,0005 g
- Thiamine HCl (Vitamin B1) 0,1 g
- Biotin 0,0005 g

Medium per litro

- NaNO_3 0.075 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00565 g
- pH circa 8,0 usando HCl 1M e/o NaOH 1M

L'allevamento delle microalghe è avvenuto raddoppiando il terreno di coltura ogni qual volta è stata raggiunta quasi la densità massima; in questo modo ogni 12 giorni 360 litri di alghe sature erano pronte per essere raccolte, trasportate in bidoni da 25 litri, e riversate nella vasca presa mare dell'impianto BWTS.

Durante l'allevamento sono stati monitorati quasi giornalmente l'ossigeno disciolto, il pH e la densità di alghe per ml.

Particolare attenzione è stata posta al pH, in quanto un valore prossimo 9 sposta l'equilibrio dello ione ammonio (NH_4^+) verso la formazione dell'ammoniaca (NH_3), tossica per le microalghe.

5.4 Coltivazione *Alcanivorax borkumensis* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Per rispondere ai criteri della MEPC, in riferimento alla concentrazione di batteri eterotrofici vivi che devono essere presenti in una densità di almeno 10^4 individui per ml, è stata messa a punto la coltura di 2 specie di batteri marini non tossici, *A. borkumensis* e *M. hydrocarbonoclasticus*.

Data la densità di batteri richiesta e vista la capacità della vasca di zavorra è stato necessario produrre per ogni ciclo di prova almeno 2×10^{12} batteri.

Questi batteri hanno una *growth rate* molto rapida e raggiungono la densità massima (circa 10^9 individui per ml) dopo circa 5 giorni dall'inoculo, che si mantiene costante per circa una settimana (Fig. 8).

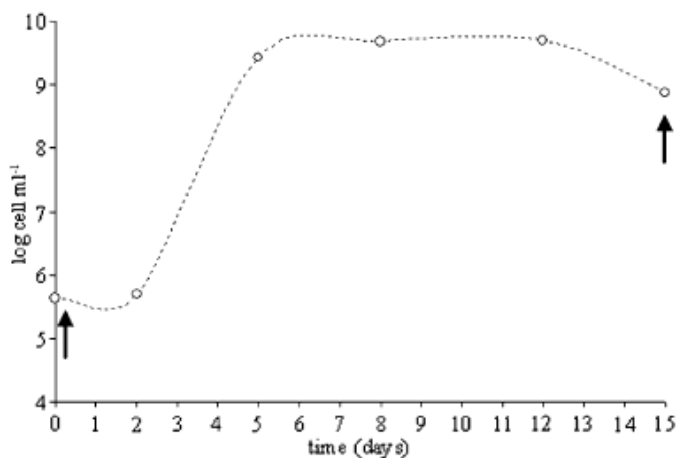


Figura 8: Crescita di *Alcanivorax borkumensis* [S. Cappello – IAMC-CNR (Me)]

Per i nostri scopi sono stati coltivati, per ogni ciclo di prove, 55 litri dei suddetti batteri di cui 50 litri impiegati per la sperimentazione in vasca e i restanti 5 litri, conservati in frigo, usati come starter per il ciclo successivo.

Il terreno di coltura, prodotto fresco di volta in volta a partire dai sali solidi, ha la seguente composizione per litro:

Solution 1:

- NaCl 22.79 g
- Na₂SO₄ 3.98 g
- KCl 0.72 g
- NH₄Cl 0.27 g
- TAPSO Buffer 1.30 g
- NaBr 83.00 mg
- NaHCO₃ 31.00 mg
- H₃BO₃ 27.00 mg
- NaF 2.60 mg
- Na₂HPO₄·7H₂O 89.00 mg
- Na(CH₃COO) 10.00 g
- pH finale pari a 7.6

Solution 2:

- MgCl₂·6H₂O 11.18 g

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.46 g
- $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 24.00 mg

Solution 3:

- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.00 mg

5.5 Arricchimento DOC e POC

La linea guida MEPC prescrive inoltre che, scelto il *range* di salinità dell'acqua di prova, questa debba contenere anche carbonio organico disciolto e particellare nella quantità indicata nella Tabella 1 di questo rapporto tecnico.

In particolare, per un'acqua con salinità maggiore di 32 PSU il DOC (carbonio organico disciolto) deve essere maggiore di 1 mg/l, il POC (carbonio organico particolato) maggiore di 1 mg/l e il PST (particolato sospeso totale) maggiore di 1 mg/l.

Dalle prime analisi che sono state effettuate è stato notato che l'acqua di mare prelevata nei pressi della locazione dell'impianto pilota non era conforme alle caratteristiche richieste e per tale motivo sono stati aggiunti zucchero per il DOC, e lievito di birra e farina per il POC.

Lo *zucchero* per uso alimentare è una molecola organica chiamata saccarosio, la cui formula di struttura è riportata sotto ed è ottenuta dalla condensazione di due molecole di glucosio (scheda n.1).

Il *lievito di birra* per uso alimentare è costituito da piccolissime particelle della dimensione di circa 5 μm , da una miscela di proteine, carboidrati, grassi e vitamine nelle percentuali riportate nella scheda n. 2.

La *farina* per uso alimentare proviene da una fine macinazione di grano tenero il cui diametro delle particelle è minore di 200 μm , e la composizione chimica media è riportata nella scheda n. 3.

Per gli scopi di questa attività, considerato il volume di 200 mc della vasca di zavorra, e che la concentrazione dell'acqua da trattare deve essere >32 PSU e compresa tra 3 e 32 PSU, si avrà:

per i test a salinità > 32 PSU

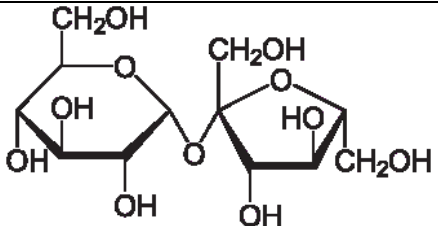
- DOC maggiore di 1 mg/l: bisogna aggiungere almeno 200 g di carbonio in forma solubile. Pertanto per ogni esperimento si è aggiunto 1 Kg di zucchero, equivalente a 420 gr di carbonio, precedentemente solubilizzato in 5 litri di acqua di mare;
- POC maggiore di 1 mg/l: bisogna aggiungere almeno 200 gr di carbonio in forma particellare. Pertanto per ogni esperimento si sono aggiunti 3 Kg di lievito, quantità abbondantemente maggiore del necessario, precedentemente sospesi in 5 litri di acqua di mare. Tale calcolo è stato effettuato tenendo presente la sola percentuale di carboidrati, e quindi in difetto rispetto tutti gli altri atomi di carbonio presenti nelle proteine, nei grassi e nelle fibre.

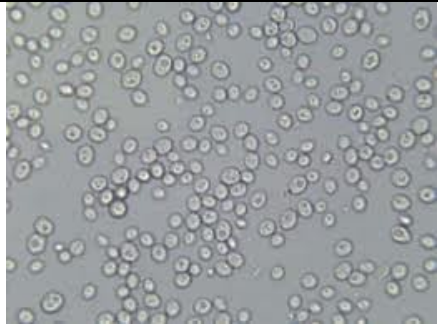
per i test a salinità compresa tra 3 e 32 PSU

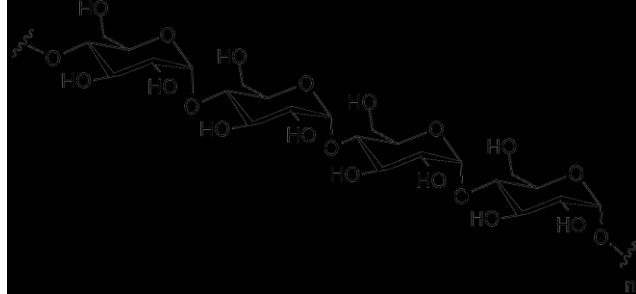
- DOC maggiore di 5 mg/l: bisogna aggiungere almeno 1000 g di carbonio in forma solubile. Pertanto per ogni esperimento si è aggiunto 3 Kg di zucchero, equivalente a 2100 gr di carbonio, precedentemente solubilizzato in 10 litri di acqua di mare;
- POC maggiore di 5 mg/l: bisogna aggiungere almeno 1000 gr di carbonio in forma particellare. Pertanto per ogni esperimento sono stati aggiunti 10 Kg di farina di mais, quantità abbondantemente maggiore del necessario, precedentemente sospesi in 10 litri di acqua di mare. Tale calcolo è stato effettuato tenendo presente la sola percentuale di carboidrati, e quindi in difetto rispetto tutti gli altri atomi di carbonio presenti nelle proteine, nei grassi, nelle fibre, e considerando che i carboidrati contengano il 30 % di atomi di carbonio.

L'eccesso di zucchero, lievito e farina utilizzati ha avuto il fine di garantire, oltre la conformità alla MEPC, l'alimentazione degli organismi viventi presenti in vasca per i successivi 5 giorni e prima dell'inizio dei test.

Scheda n. 1: saccarosio (zucchero)

	<p>Formula bruta: C₁₂H₂₂O₁₁</p> <p>Peso Molecolare: 342,30</p> <p>Percentuali in peso</p> <p>Carbonio: $12 \times 12,01 / 342,30 \times 100 = 42,11 \%$</p> <p>Idrogeno: $22 \times 1 / 342,30 \times 100 = 6,43 \%$</p> <p>Ossigeno: $11 \times 15,99 / 342,30 \times 100 = 51,38 \%$</p> <p>Solubilità: 211.5 g/100 ml</p>
<p>Figura 9: Saccarosio</p>	

Scheda n. 2: lievito di birra		
	Composizione media	
	Grassi	7,61 %
	Carboidrati	41,22 %
	Proteine	40,44 %
	Fibre	26,90 %
Altro		
<p>Figura 10: Particelle di lievito di birra</p>		

Scheda n. 3: farina di mais		
	Composizione media	
	Grassi	2,50 %
	Carboidrati	71,97 %
	Proteine	13,21 %
	Fibre	10,70 %
Formula bruta: (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n		
<p>Figura 11: Catena poliglucidica - carboidrati</p>		

5.6 Cronoprogramma delle attività

Le attività di produzione degli organismi viventi, dei batteri, dei campionamenti e delle letture dei campioni è stata progettata secondo le esigenze della committenza e compatibilmente con i tempi di crescita e sviluppo di tutti organismi sino alle concentrazioni desiderate.

Nella tabella seguente è stata riportato il cronoprogramma delle operazioni effettuate giorno per giorno.

6 Procedura per il trattamento delle acque di zavorra

La procedura per il trattamento delle acque di zavorra è stata sviluppata in conformità alla MEPC e precisamente seguendo la tempistica sotto riportata:

- T₀ - l'acqua prelevata deve essere stoccata per almeno 5 giorni nella vasca presa mare (Vasca1), durante i quali la vasca deve essere chiusa; gli organismi viventi e i batteri coltivati vengono riversati nella vasca durante le operazioni di riempimento insieme agli additivi per il DOC, POC, PST;
- T₁ - *dopo 5 gg. – Ballasting:* esecuzione del trattamento shock con ipoclorito contemporaneamente al trasferimento dell'acqua da trattare dalla vasca presa mare (Vasca1) alla vasca di zavorra (Vasca2);
- T₂ - *dopo 6 gg.* - il giorno successivo al trattamento shock l'acqua è stata fatta circolare a circuito chiuso durante il quale è stata monitorata la concentrazione di ipoclorito e riequilibrata sino a 2 ppm quando necessario;
- T₃ - *dopo 7 gg. – De-Ballasting:* trasferimento dalla vasca 2 alla vasca 1, per la simulazione delle operazioni di *discharge water* dell'acqua trattata.

Tabella 1: Cronoprogramma attività

Attività	1° Settimana							2° Settimana						
	Lunedì	Martedì	Merccoledì	Giovedì	Venerdì	Sabato	Domenica	Lunedì	Martedì	Merccoledì	Giovedì	Venerdì	Sabato	Domenica
Coltura Artemie	Disinfezione Vasche		Scitusa	Scitusa	Allev.	Allev.	Allev.	Allev.	Allev.	Raccolta Trasporto 50 litri con O2				
Coltura Rotiferi	Allev.	Allev.	Allev.	Allev.	Allev.	Allev.	Allev.	Allev.	Allev.	Trasporto 50 litri		Rabocco Terreno 50 litri		
Coltura Tetraselmis		Rabocco 120 litri			Rabocco 120 litri					Trasporto 200 litri			Prep. Terreni e rabocco 60 litri	
Coltura Batteri					Prep. Ter. Starter	Coltura	Coltura	Coltura	Coltura	Trasporto 50 litri				
Preparazione POC										Dispersione Lievito Farina in 10 litri				
Preparazione DOC										Soluzione Zucchero 10 litri				
Riempimento Vasca														
Campionamento Ballasting	InfWater, Control Tank, Treatment													
Campionamento DeBallasting			Control Tank, Treatment											
Analisi Organismi 10<dia<50 um	Prep. campioni Ballasting			Conta Organismi Ballasting	Prep. campioni DeBallasting									
Analisi Organismi > 50 um	Conta Organismi Vivi in loco		Conta Organismi Vivi in loco					Conta Organismi DeBallasting						

6.1 Campionamento delle acque - MEPC.174(58) G8

Per dimostrare l'efficacia del dispositivo di trattamento per le acque di zavorra - *Ballast Water Treatment System* – la linea guida MEPC impone la misurazione dei seguenti parametri e nelle seguenti modalità.

I parametri ambientali quali il pH, la temperatura, la salinità, l'ossigeno disciolto, TSS, DOC, POC e la torbidità (NTU) devono essere misurati nello stesso momento in cui i campioni vengono prelevati.

I campioni devono essere presi, durante le prove, nei seguenti momenti e posizioni: immediatamente prima e immediatamente dopo il dispositivo di trattamento, ed allo scarico.

I campioni di controllo devono essere presi nello stesso modo in cui sono presi quelli di prova del dispositivo ed in corrispondenza dell'ingresso e dello scarico.

I cicli di controllo e trattamento possono essere effettuati simultaneamente o in sequenza.

L'impianto e le attrezzature per il prelievo dei campioni devono essere tali da garantire che i campioni siano rappresentativi sia dell'acqua trattata sia di quella di controllo e devono essere presi arrecando minor danno possibile agli organismi viventi.

I campioni devono essere sempre presi in numero di tre repliche e devono essere presi separatamente per:

1. gli organismi viventi la cui dimensione minima è $\geq 50 \mu\text{m}$;
2. gli organismi viventi la cui dimensione minima è $\geq 10 \mu\text{m}$ e $< 50 \mu\text{m}$;
3. i coliformi, gruppo enterococco, *V. cholerae* e batteri eterotrofici;
4. le prove di tossicità dell'acqua trattata, prelevata durante le operazioni di scarica.

Per confrontare gli organismi viventi, con dimensione minima $\geq 50 \mu\text{m}$, con quelli della *regulation D-2* (sotto riportata) devono essere presi campionando tre volte: almeno 20 litri per l'acqua in ingresso (non trattata); 1000 litri per l'acqua trattata.

I campioni per il conteggio degli organismi viventi che hanno diametro minimo $\geq 50 \mu\text{m}$, possono essere concentrati usando un setaccio la cui dimensione della diagonale della maglia non sia maggiore di $50 \mu\text{m}$.

Per confrontare gli organismi viventi la cui dimensione minima è $\geq 10 \mu\text{m}$ e $< 50 \mu\text{m}$, devono essere campionati prelevando almeno un litro di acqua in ingresso (per l'acqua non trattata) ed almeno 10 litri per l'acqua trattata in scarica, entrambe in tre repliche.

I campioni per il conteggio degli organismi viventi, possono essere concentrati usando un setaccio di dimensione diagonale della maglia $\leq 10 \mu\text{m}$.

Per il conteggio dei batteri il campione deve essere preso in bottiglie sterili da almeno 500 ml sia per l'acqua in ingresso sia trattata.

I campioni devono essere analizzati subito dopo il campionamento, e analizzati vivi entro 6 ore o trattati in modo tale da garantire la correttezza dell'analisi.

6.1.1 Attrezzature usate per il campionamento

Al fine di concentrare gli organismi viventi, sia quelli con dimensione minima $\geq 50 \mu\text{m}$ che quelli compresi tra 10 e $50 \mu\text{m}$, sono stati costruiti 6 setacci, 3 con rete da $50 \mu\text{m}$ e 3 con rete da $10 \mu\text{m}$.



Figura 12: Setaccio da $50 \mu\text{m}$

Questi setacci sono costituiti da una raccordo a "T", in PVC, di uso comune in edilizia per raccordare tubazioni di scarico dell'acqua, del diametro di 12 cm in cui: un lato è stato reso cieco e sigillato con apposito tappo, un lato è stata posta la rete legata con una fascetta di acciaio, e l'altro lato lasciato libero per l'immissione dell'acqua (Fig. 12).

Con tale attrezzatura, di poco costo, è stato possibile raccogliere gli organismi non passanti il filtro nel lato cieco che funge da bicchiere di raccolta.

Dopo attenta pulizia del setaccio, con acqua di mare precedentemente filtrata, in controcorrente e senza dover rimuovere il filtro sono stati recuperati tutti gli organismi viventi e travasati in una bottiglia di plastica.

In ultimo, dopo aver misurato il volume d'acqua raccolto, è stata effettuata: la lettura in loco con uno stereo microscopio tradizionale per gli organismi viventi con dimensione minima \geq di 50 μm ; la fissazione con soluzione di *Lugol* per gli organismi viventi la cui dimensione è compresa tra 10 e 50 μm .

6.2 Punti di prelievo e modalità

I prelievi, in conformità con quanto dettato dalla MEPC, sono stati effettuati in tre siti differenti durante la fase di *Ballasting* dopo 5 giorni: lungo la linea di adduzione dell'acqua tra la vasca di prova (*influent water*) e la vasca di controllo; lungo la linea di trasporto dell'acqua tra la vasca presa mare e il trattamento; lungo la linea di trasporto dell'acqua dopo il trattamento.

In fase di *Ballasting* la quantità di acqua campionata è stata per:

Influent water dopo 5gg

- n.3 campioni in tre tempi diversi
 - batteri 3 x 2 litri
 - organismi viventi > 50 μm 3 x 30 litri
 - organismi viventi >10 e <50 μm 3 x 1 litro
 - DOC/POC 1 x 1 litro
 - PST 1 x 1l itro

PreTreat - pretrattamento

- n.3 campioni in tre tempi diversi in linea prima del trattamento
 - batteri 3 x 2 litri
 - organismi viventi > 50 μm 3 x 30 litri
 - organismi viventi >10 e <50 μm 3 x 1 litro
 - DOC/POC 1 x 1 litro
 - PST 1 x 1 litro

PostTreat – post trattamento

- n.3 campioni in tre tempi diversi in linea dopo il trattamento
 - batteri 3 x 2 litri
 - organismi viventi > 50 μm 3 x 1 mc
 - organismi viventi >10 e <50 μm 3 x 10 litri

- DOC/POC 1 x 1 litro
- PST 1 x 1 litro.

In fase di *De-Ballasting* dopo 7 giorni, ossia 2 giorni dopo il trattamento e dopo 7 giorni dal carico, lungo la linea di trasporto dell'acqua durante la scarica (*discharge water*):

Control Tank dopo 7gg;

- n.3 campioni in tre tempi diversi
- batteri 3 x 2 litri
- organismi viventi > 50 µm 3 x 30 litri
- organismi viventi >10 e <50 µm 3 x 1 litro
- DOC/POC 1 x 1 litro
- PST 1 x 1 litro

Discharge Water

- n.3 campioni in tre tempi diversi in linea durante la scarica
- batteri 3 x 2 litri
- organismi viventi > 50 µm 3 x 1 mc
- organismi viventi >10 e < 50 µm 3 x 10 litro
- DOC/POC 1 x 1 litro
- PST 1 x 1 litro

I campioni prelevati sono sempre stati trasportati nei laboratori con celle frigo portatili condizionate a temperatura < 4 °C.

I campioni per le analisi dei parametri DOC/POC arrivati presso i laboratori dell'IAMC-CNR sono stati immediatamente congelati ed analizzati appena possibile.

I campioni per le analisi batteriologiche sono state trasportate all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia entro 6 ore dalla presa del campione.

Ogni qual volta è stata effettuata questa attività di campionamento è stato redatto un apposito *verbale di campionamento* che precisa i volumi di acqua campionati per ogni tipologia di determinazione, il numero di campioni presi, la data e l'ora di inizio e fine dell'attività, la firma del responsabile e tutti gli intervenuti.

7 Strumenti e metodi

7.1 Misure ambientali

Per le misurazioni ambientali quali il pH, la temperatura dell'acqua, l'ossigeno disciolto e la salinità è stata utilizzata una sonda multiparametrica della *YSI tipo 556 MPS* (Fig. 13) in grado di leggere tutti i parametri contemporaneamente.

La calibrazione del pH-metro, dell'ossimetro e del salinometro è stata di volta in volta verificata con apposite soluzioni di taratura e controllo.



Figura 13: Sonda YSI 556 MPS per la lettura di pH, T, O₂ disciolto

Quando questa misurazione risultava fuori dal *range* di accettabilità sono stati ripuliti i sensori per la misura del pH e dell'Ossigeno disciolto e ricalibrati.

7.2 Conta degli organismi viventi con dimensione > 50 µm

La conta degli organismi viventi con dimensione > 50 µm è stata effettuata immediatamente dopo il campionamento usando uno stereomicroscopio ottico, tipo MZ16, e una camera di conteggio per zooplancton tipo *Bogorov* da 5 ml (Fig. 14).

L'uso dello stereomicroscopio insieme alla camera di conteggio ha permesso infatti di contare con buona precisione e distinguere i vivi dai morti osservando la naturale motilità degli organismi.

Questa procedura è stata effettuata per tre volte su ogni campione e dalla media delle tre letture si è elaborato il calcolo degli organismi viventi per 1 mc d'acqua tenendo conto delle opportune concentrazioni effettuate.

7.3 Conta degli organismi vivi con dimensione >10 e < 50 µm

La lettura degli organismi viventi con dimensione compresa tra 10 e 50 µm è stata effettuata usando un microscopio ottico Leica MS5, applicando il metodo *Utermohl*.

Questo metodo in sintesi è consistito nella:

- fissazione dei microorganismi, micro alghe, con soluzione di *Lugol* subito dopo il campionamento;
- sedimentazione del microplankton con l'ausilio di camere tubolari combinate (nel nostro caso del volume di 50 ml) per 48 ore (Fig. 15);
- eliminazione del volume d'acqua del cilindro facendolo scivolare sulla base verso il foro;
- raccolta del campione concentrato a 2,5 ml;
- osservazione e conta su cella di conteggio tipo *Sedgewick-Rafter* (Fig. 16) con microscopio ottico con obiettivo 20x a lunga distanza focale e oculari da 10x.



Figura 14: Cella Bogorov



Figura 15: Cella di sedimentazione Utermohl



Figura 16: Camera di conteggio tipo Sedgewick-Rafter

L'analisi quantitativa degli organismi vivi è stata effettuata esclusivamente contando le forme che non presentavano evidenti segni di frattura dell'esoscheletro, delle cellule o dell'individuo. La colorazione all'interno delle cellule (dovuta alla presenza della clorofilla ed altri pigmenti) è stata considerata un fattore di vitalità ed integrità cellulare per le forme phytoplantoniche, unitamente alla loro aggregazione in catene algali. Questo metodo, rispetto ad altri che usano un microscopio a fluorescenza, tende a sottostimare i morti considerando per vivi anche quelli morti da poco tempo e che pertanto sono ancora integri.

Dalla conta dei vivi, effettuata su almeno tre transetti, è stato rielaborato il dato della camera di conteggio in proporzione al volume d'acqua campionato, da cui si è ottenuto il conteggio totale, espresso come numero di organismi vivi per ml d'acqua.

7.4 Riconoscimento phyla/division

L'analisi morfologica degli organismi viventi con stereomicroscopio Leica MZ16, seppur fissati con la soluzione di Lugol, ha permesso il riconoscimento dei taxa planctonici comunemente presenti nei nostri mari (Fig 17).

Le forme zooplanctoniche, riconducibili ai Phyla Foraminifera, Mollusca, Arthropoda, Rotifera e Ciliophora, così come quelle fitoplanctoniche, riconducibili ai Phyla Ochrophyta, Myzozoa, Haptophyta e Chlorophyta sono state riconosciute sino a livello specifico: in presenza di morfotipi



Figura 17: Conta e riconoscimento microalghe

criptici, di forme giovanili o di forme parzialmente rovinate dal processo di filtrazione dei campioni, gli organismi sono stati classificati a livello generico.

La classificazione è stata effettuata utilizzando diversi ingrandimenti, da un valore minimo di 7,3X ad un massimo di 110X.

Ciascun phylum è stato classificato utilizzando le più moderne chiavi tassonomiche relative al proprio raggruppamento filogenetico (Costello *et al.*, 2001), disponibili in rete all'interno del sito di rilevanza scientifica WoRMS – World Register of Marine Species (<http://www.marinespecies.org/>). Gli organismi riconducibili al Phylum Foraminifera sono stati classificati secondo la rivisitazione di Gross, O. (2001) alla classificazione di Loeblick & Tappan (1964), con l'ausilio dei lavori di Jorissen (1988), Albani & Serandrei Barbero (1990), Cimerman & Langer (1991), e Sgarrella & Moncharmont-Zei (1993), relativi a particolari varietà e fenotipi regionali. Gli organismi riconducibili ai Phyla Mollusca ed Arthropoda sono stati classificati seguendo la rispettive recenti classificazioni di Gofas *et al.* (2001) e Boxshall (2001) e i criteri tassonomici proposti all'interno del Manuale ICRAM (2006), Guida al riconoscimento del plankton neritico dei mari Italiani. Il Phylum Rotifera ha seguito le più recenti rivisitazioni di Segers (2007) sulle classificazioni proposte da Harring

(1913) e Wiszniewski (1954), mentre il Phylum Ciliophora ha seguito la classificazione di Puytorac *et al.* (1993) e Lynn & Small (2002).

La sistematica dei taxa fitoplanctonici è stata effettuata secondo i criteri tassonomici proposti all'interno del Manuale ICRAM (2006) "Guida al riconoscimento del plankton neritico dei mari Italiani" ed i lavori di Round *et al.* (1990), Heimdal (1997) e Gomez (2005).

7.5 Conta dei batteri

La conta dei batteri è stata affidata all'Istituto Zooprofilattico della Sicilia, sede di Palermo, il quale ha usato seguenti metodi:

- Enterococchi: ISO 7899-2:2000
- *E. coli*: APAT IRSA-CNR 7030/2003
- *V. cholerae*: IRSA-CNR 7090/2003
- Carica Batterica Totale: APAT IRSA-CNR 7050/2003

7.6 Analisi DOC/POC

La determinazione della concentrazione del carbonio organico disciolto e particellare è stata effettuata usando i seguenti metodi:

- DOC APAT IRSA-CNR 5040/2003
- TOC EPA 9060/2004

Il TOC è il carbonio organico totale, ossia quello derivante dalla somma del carbonio organico disciolto ed il carbonio organico particellare da cui è stato determinato il POC.

$$\text{TOC} = \text{DOC} + \text{POC} \rightarrow \text{POC} = \text{TOC} - \text{DOC}.$$

7.7 Analisi particolato solido sospeso

La determinazione del particolato solido sospeso è stato condotto secondo il metodo IRSA-CNR (metodo 2090).

In sintesi questo metodo consiste in una doppia pesata del filtro in Nylon con diametro dei pori di 0.45 µm prima e dopo la filtrazione di una quantità nota di acqua e dopo l'essiccazione in stufa a 105 °C.

$$\text{TSS}_{(\text{mg/L})} = (M_1 - M_0) \cdot 1000 / V$$

dove

- M_1 è il peso del filtro dopo il passaggio del campione ed essiccazione a 105 °C;
- M_0 il peso del filtro prima della filtrazione;
- V il volume in ml esaminato.

7.8 Analisi della torbidità (NTU)

L'analisi della torbidità è stata effettuata secondo il metodo IRSA-CNR 2110/2003. Questo metodo, in sintesi, consiste nel confronto visivo tra il campione ed una serie di soluzioni a torbidità nota e riposte nella stessa tipologia di provette e nelle stesse condizioni di luce. Le soluzioni a torbidità nota sono state ottenute per diluizione da una soluzione madre a 400 NTU fatta sciogliendo 1 g di solfato di idrazina ($(\text{N}_2\text{H}_5)\text{HSO}_4$) in 100 ml di acqua distillata, precedentemente distillata e filtrata con setto avente porosità di 0.2 μm .

8 Validità dei test a terra (land test)

Affinché i test eseguiti a terra nell'impianto pilota possano essere considerati validi, secondo la linea guida della MEPC, per ogni ciclo di prova di trattamento deve essere verificato che:

- siano verificate tutte le condizioni dettate per *l'influent water* a seconda della salinità dell'acqua da trattare (Rif. 2.2.2.5 o 2.3.36);
- la concentrazione media degli organismi, il cui diametro minimo è maggiore od uguale a 50 μm , nei campioni prelevati in tre repliche sia inferiore a 10 organismi vivi per metro cubo;
- la concentrazione media degli organismi, il cui diametro minimo è inferiore a 50 μm ma superiore o uguale a 10 μm , sia inferiore a 10 organismi vivi per ml;
- la concentrazione media di *V. cholerae* (sierotipi 01 e 0139) sia inferiore a 1 cfu per 100 ml, o inferiore a 1 cfu per 1 grammo (peso netto) di campioni di zooplankton;
- la concentrazione media di *E. coli* nei campioni prelevati in triplo sia inferiore a 250 cfu per 100 ml;

- la concentrazione media di Enterococco intestinale nei campioni prelevati in triplo sia inferiore a 100 cfu per 100 ml.

Inoltre deve anche essere verificato che la media dei risultati, al tempo della scarica, dei campioni prelevati dalla vasca di controllo sia uguale o 10 volte maggiore rispetto la *regulation D-2*.

In ultimo, per i sistemi di trattamento delle acque di zavorra che fanno uso di sostanza attive, devono essere condotte le prove di tossicità dell'acqua trattata e scaricata (*discharge water*), secondo le modalità prevista ai paragrafi da 5.2.3 a 5.2.7 delle procedure MEPC, al fine di verificarne la non tossicità nei confronti dell'ecosistema marino dei metaboliti e dei sottoprodotti generati dall'effetto della sostanza attiva su tutti i composti presenti nella acqua prelevata.

9 Conclusioni

I risultati delle analisi eseguite sui campioni delle acque prelevate dalla vasca presa mare hanno dimostrato l'efficacia delle procedure messe a punto per la coltivazione dei batteri, del fitoplancton, delle specie zooplanctoniche e di tutto il *modus operandi*, essendo conformi ai dettami della linea guida MEPC.

Pertanto si conclude che, quanto svolto dal team di questo Istituto, è risultato efficace per ottenere la Certificazione di Tipo Approvato per l'impianto di trattamento delle acque di zavorra ideato e provato durante lo svolgimento delle prove a terra.

Bibliografia

Albani, A., Serandrei Barbero, R., (1990). I foraminiferi della Laguna e del Golfo di Venezia. Padova, Società Cooperativa Tipografica: pp. 331, tav: 5.

Benefits and safety aspects of hypochlorite formulated in domestic products – Technical Task Force Hypochlorite AISE (association internationale de la Savonnerie de la Détergence et des Produits d'Entretien – December 1997

Boxshall, G., (2001). Copepoda (excl. Harpacticoida), in: Costello, M.J. et al. (Ed.), 2001. European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Collection Patrimoines Naturels, 50: 252-268

Cimerman, F., Langer, M., (1991). Mediterranean Foraminifera. Razredza naravoslovne vede, classis IV: Historia Naturalis, Slovenska akademija, Ljubljana, 30, 118 pp.

Dahms H.U., Hagiwara A., Seang Lee J., (2010). Ecotoxicology, ecophysiology and mechanistic studies with rotifers – Aquatic toxicology 101, 11-12.

Gofas, S.; Le Renard, J.; Bouchet, P., (2001). Mollusca, in: Costello, M.J. et al. (Ed.), 2001. *European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Collection Patrimoines Naturels*, 50: 180-213

Gómez, F., (2005). A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. Acta Bot. Croat. 64 (1): 129-212.

Guidelines for approval of ballast water management systems (G8). Resolution MEPC.174(58), 10 October (2008).

Harring, H. K., (1913). Synopsis of the Rotatoria. Bulletin of the United States National Museum, 81: 1-226.

Heimdal, B.R., (1997). Modern coccolithophorids, in: Tomas, C.R. (Ed.), 1997. Identifying marine phytoplankton. : 731-833

Image analysis as a method for the study of particulate matter concentration zooplankton size and feeding in estuarine environment – A.L. Flachier Troya – International post graduate study in fundamental on applied marine ecology (1995)

Jorissen, F.J., (1988). Benthic foraminifera from the Adriatic Sea: principles of phenotypic variation. Utrecht Micropaleontological Bulletin, 37: 1-174

Loeblich, A.R. Jr., Tappan, H., (1964). Foraminiferal Classification and Evolution. Journal of the Geological Society of India, 5: 5-39.

Lopez Galindo C., Vargas Chacoff L., Nebot, E., Casanueva J.F., Rubio D., Solé M., Mancera J.M., (2009). Biomarker responses in solea senegalensis exposed to sodium hypochlorite used as antifouling -- Chemosphere 78, 885 - 893

Lynn, D. H., Small, E. B., (2002). Phylum Ciliophora. In: Lee, J. J., Lee- dale, G. F. & Bradbury, P. (ed.), An Illustrated Guide to the Protozoa. 2nd ed. Society of Protozoologists, Lawrence, KS. : 371–656.

Manuale ICRAM (2006), Guida al riconoscimento del plankton neritico dei mari Italiani.

MEPC 63/WP.7 Annex 1 – Updated methodology for information gathering and conduct work of the Gesamp BWWS – September (2011)

Metodologie di studio del plankton marino ISPRA – G. Socal, I. Buttino, M. Cabrini, O. Mangoni, A. Penna, C. Totti – Manuali e linee guida (2010)

Nielsen B.C. (2006). Control of ballast water organism with a seawater electrochlorination and filtration system -- University of Washington

Nikolaou, A.D., T.D. Lekkas, S.K. Golfinopoulos, M.N. Kostopoulou, (2001). Application of different analytical methods for determination of volatile chlorination by products in drinking water -- *Talanta* 56, 717-726

OECD guidelines 111 for the testing of chemicals – April (2004)

Procedure for approval of ballast water management systems that make use of active substances (G9). Resolution MEPC.169(57), 4 april (2008).

Puytorac, P. de, Batisse, A., Deroux, G., Fleury, A., Grain, J., Laval-Peuto, M., Tuffrau, M., (1993). Proposition d'une nouvelle classification du phylum des protozoaires Ciliophora Doflein, 1901. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 316: 716–720.

Result and lessons learned from the ETV pilot test at NRLKW – J.F. Grant, E.J. Lemieux
Centre for corrosion science & engineering naval research laboratory Key West FL

Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., (1990). *The diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press: London, UK. ISBN 0-521-363187, 747 pp.

Segers, H., (2007). Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. (*Zootaxa* 1564). 104 pp.,<http://www.mapress.com/zootaxa/2007f/zt01564p104.pdf>

Sgarrella, F., Moncharmont Zei, M., (1993). Benthic Forams of the Gulf of Naples (Italy): systematic and autoecology. *Bollettino della Società Paleontologica Italiana*, 32 (2): 145-264.

The effect of different drinking water treatment process on the rate of chloroform formation in the reaction of natural organic matter with hypochlorite – I. Ivancev, B. Dalmacija, Z. Tamas, E. Karlovic – *Wat. Res.* Vol. 33 3715, 3722 January (1999)

The endocrine disrupting activity of surface waters and wastewater treatment plant effluent in relation to chlorination – T. Schilirò, C. Pignata, R. Rovere, E. Fea, G. Gilli – *Chemosphere* 75 335, 340 January (2009)

Wiszniewski, J., (1954). Matériaux relatifs à la nomenclature et à la bibliographie des Rotifères. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 2: 7–249.