

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

in consorzio con
SECONDA UNIVERSITÀ DI NAPOLI
UNIVERSITÀ “PARTHENOPE” NAPOLI
in convenzione con
ISTITUTO PER L’AMBIENTE MARINO COSTIERO – C.N.R.
STAZIONE ZOOLOGICA “ANTON DOHRN”

Dottorato in Scienze ed Ingegneria del Mare
XVIII ciclo

Tesi di Dottorato

Titolo

Biodegradazione del tensioattivo

1-(*p*-sulfofenil)nonano in presenza di *Styela plicata*.

“Uno studio per la biorimediazione delle aree costiere”

Candidato: Dott. Angelo Cestone

Tutor: Prof. Michele Di Natale

Co-Tutor: Prof. Salvatore De Rosa

Il Coordinatore del Dottorato: Prof. Bruno D’Argenio

ANNO 2006

Indice

| | |
|--|------------|
| Capitolo 1. Studi precedenti..... | 0 |
| 1.0 Introduzione | 1 |
| 1.1 Cenni sulla biorimediazione..... | 11 |
| 1.1.1 Biorimediazione degli impatti prodotti dagli allevamenti ittici intensivi | 14 |
| 1.1.2 Il MUDS, un sistema biologico subacqueo per depurare le acque di scarico | 16 |
| 1.2 Cenni sulla biologia dei tunicati e della <i>Styela plicata</i> | 17 |
| 1.2.1 Studi sperimentali per stimare l'accrescimento della biomassa di <i>Styela plicata</i> | 22 |
| 1.2.2 Studi tossicologici riguardanti l'ascidia <i>Styela plicata</i> | 23 |
| 1.2.3 Studi farmacologici riguardanti l'ascidia <i>Styela plicata</i> | 29 |
| 1.3 Cenni sui tensioattivi | 31 |
| 1.3.1 Influenza dei tensioattivi sulla biodegradazione di alcuni inquinanti..... | 35 |
| | |
| Capitolo 2. Descrizione dell'istallazione sperimentale e delle attività necessarie allo svolgimento della ricerca | 37 |
| 2.1 Allestimento del laboratorio per gli esperimenti in acquario..... | 38 |
| 2.2 Approvvigionamento delle specie da sottoporre alla sperimentazione..... | 38 |
| 2.3 Allevamento in cattività delle specie approvvigionate | 39 |
| 2.4 Sintesi dell'inquinante..... | 39 |
| | |
| Capitolo 3. Descrizione dell'indagine sperimentale..... | 43 |
| 3.1 Descrizione dei set sperimentali | 44 |
| 3.2 Analisi di laboratorio | 51 |
| 3.3 I cromatogrammi e le rette di taratura..... | 52 |
| | |
| Capitolo 4. Analisi e discussione dei risultati | 60 |
| 4.1 I parametri sperimentali determinati | 61 |
| 4.1.1 Tempi di biodegradazione dell'1-(<i>p</i> -sulfofenil)nonano | 61 |
| 4.1.2 Dose Massima Tollerata e Dose Letale di 1p9 LAS per la <i>Styela plicata</i> | 78 |
| 4.1.3 Salinità Minima Tollerata dalla <i>Styela plicata</i> | 84 |
| 4.1.4 Accumulo dell'1-(<i>p</i> -sulfofenil)nonano in <i>Styela plicata</i> | 87 |
| | |
| Conclusioni e prospettive..... | 93 |
| | |
| Bibliografia | 98 |
| | |
| Ringraziamenti | 102 |
| | |
| Appendice | 103 |

Capitolo 1.

Studi precedenti

1.0 Introduzione

La cronaca ci propone giornalmente esempi, in parte gravi, del fenomeno inquinamento, il quale si è ormai imposto all'attenzione generale, uscendo dall'ambito ristretto del mondo della scienza e della tecnica, ed interessando giornalisti, magistrati, politici e cittadini d'ogni ceto. Spesso, purtroppo, tutto questo interessamento non ha portato finora a soluzioni concrete ed efficaci. In effetti, il problema è molto complesso, tanto che è addirittura impossibile dare una definizione unica dell'inquinamento, valida in generale e soddisfacente sia dal punto di vista scientifico, sia agli effetti pratici, inclusi quelli legali. Si tratta sempre di un fenomeno che coinvolge acqua, aria e suolo e che deriva da situazioni spesso difficilmente precisabili nei loro vari aspetti, producendo conseguenze di entità e pericolosità diverse da caso a caso. In quest'ottica può essere considerato valido anche il significato che si dà comunemente al termine «inquinamento», volendo affermare che c'è qualcosa «fuori posto»: un insieme di processi che alterano le condizioni chimico-fisiche dell'ambiente, in cui si svolge la vita degli organismi, e che interessano una zona circoscritta, o l'intera biosfera.

Fra questi processi alcuni studiosi includono anche certi fenomeni naturali come l'attività vulcanica, la massiccia fioritura di fitoplancton, che produce le «acque rosse» (fenomeno citato persino dalla Bibbia, quale flagello classico degli Egiziani), l'eccessiva erosione del suolo ed il conseguente notevole trasporto di materiali solidi da parte dei fiumi (di cui però è spesso responsabile l'uomo). Secondo altri, invece, l'inquinamento consiste esclusivamente nell'insieme di sostanze che provengono da attività umane e producono effetti misurabili, generalmente dannosi per l'ambiente. Altri ancora, nel caso dell'acqua marina o continentale, affermano che è inquinata, quando non è più adatta all'uso per la quale è destinata: in quest'ottica quindi, non si dovrebbe considerare inquinata un'acqua ricca di composti azotati, usata per esempio in agricoltura, pur non essendo certamente possibile considerarla potabile.

Tra queste diverse posizioni, molti ritengono più corretta la seconda, che attribuisce all'uomo le cause principali dell'inquinamento, anche se non mancano gli esempi di fenomeni naturali preoccupanti. Nel caso dei rifiuti, infatti, e delle tante altre sostanze prodotte dall'uomo, l'ambiente può risultare incapace di accoglierli tutti e nei confronti di alcuni di essi non possiede addirittura alcun potere degradante; riguardo alla destinazione dell'ambiente, ed in particolare all'uso delle acque, bisogna anche notare però che nessuna utilizzazione può essere considerata immutabile, ma anzi deve essere considerata flessibile alle necessità che mutano col tempo. In tutti i casi, occorre tener conto della quantità di sostanze «estranee», o «inquinanti», che sono immesse nell'ambiente.

Trattando d'inquinamento marino, fra le tante definizioni che si possono dare del fenomeno, una delle più complete ed accettabili è quella formulata dalla «Commission Oceanographique Intergouvernementale» l'U.N.E.S.C.O., secondo la quale il fenomeno consiste nella «immissione da parte dell'uomo nel mezzo marino, direttamente o indirettamente, di sostanze o di energie che provocano effetti deleteri, quali danni alle risorse biologiche, pericoli per la salute dell'uomo, ostacoli alle attività marittime (compresa la pesca), diminuzione della qualità dell'acqua dal punto di vista della sua utilizzazione e riduzione delle possibilità offerte nel settore del tempo libero».

In base anche a questa definizione si usa suddividere l'inquinamento marino in 3 diversi tipi:

- **inquinamento sistematico**: causato dall'immissione continua nel tempo d'inquinanti (scarichi fognari, reflui industriali, dilavamento terreni, e così via);
- **inquinamento operativo**: causato dall'esercizio di unità di navigazione (lavaggio cisterne, scarico delle acque di zavorra e di sentina, ricaduta fumi, vernici antivegetative e così via);
- **inquinamento accidentale**: causato da incidenti (naufragi, operazioni ai terminali, rimozione di piattaforme petrolifere, rottura condotte).

Secondo autorevoli fonti (OMI) sembrerebbe che solo il 23% dell'inquinamento marino provenga dal mare stesso (e di questa percentuale il 12% sembrerebbe legata al trasporto marittimo), la rimanente parte è dovuta a cause di origine terrestre, all'attività estrattiva in mare aperto ed al trasporto aereo.

L'uomo ha sempre considerato il mare come uno «scarico naturale», ma per millenni ciò non ha comportato danni molto gravi: i casi di inquinamento nel passato sono stati abbastanza circoscritti. Fino ad un centinaio di anni fa, o poco più, i fiumi trasportavano — come sempre — i materiali rocciosi strappati ai relativi bacini e, assieme agli scarichi costieri artificiali, immettevano in mare anche le sostanze contenute nelle acque residuali urbane; tali sostanze, rappresentate in massima parte dai derivati della demolizione di sostanza organica e da batteri (perlopiù «fecali»), non erano però troppo abbondanti: giunti al mare, infatti, i derivati della demolizione venivano rapidamente riutilizzati come nutrienti ed i batteri non sopravvivevano a lungo a causa della salinità, della temperatura e della diluizione delle acque e del fatto che altri organismi se ne alimentavano. Le industrie erano ancora poco sviluppate ed i loro prodotti relativamente poco dannosi: consistevano quasi esclusivamente di residui della combustione di carbone, di cascami della lavorazione di fibre tessili naturali, di pochi elementi metallici (Fe, Cu, Pb). Lo scarso grado d'inquinamento era determinato dalla quantità e dalla qualità delle sostanze immesse nel mare, essendo in rapporto alle capacità «autodepurative» di quest'ultimo.

Oggi la situazione è profondamente cambiata: nell'ultimo secolo la popolazione mondiale è più che triplicata e si è andata concentrando nelle aree urbane, spesso localizzate in prossimità delle coste; quindi gli scarichi organici di produzione umana si sono notevolmente accresciuti. Le industrie si sono estese ed hanno ampliato notevolmente la gamma dei loro prodotti, sfornando, in quantità enormi, sostanze chimiche artificiali incorruttibili e difficilmente degradabili, come la plastica, il nylon ed una gran varietà di detersivi, insetticidi e pesticidi, tutti creati combinando insieme atomi per creare molecole mai costruite dalla natura; di conseguenza, le acque degli scarichi industriali inquinano le zone marine nelle quali riversano continuamente ed in elevate concentrazioni i residui di questi ed altri prodotti, che contengono anche elementi metallici un tempo inutilizzati e comunque molto tossici, come il mercurio, il cadmio, il nichel, lo zinco, il cromo. Le acque utilizzate in agricoltura si caricano di molte sostanze nocive in tutte le aree del mondo — e ormai sono tante — in cui alla fertilizzazione organica con letame è stata sostituita la fertilizzazione minerale con fosfati e nitrati, e soprattutto laddove vengono utilizzati massicciamente gli insetticidi e i pesticidi. Tutte queste sostanze contaminano oggi in misura crescente sia le acque continentali sia quelle marine, producendo effetti dannosissimi sulla flora e sulla fauna, con gravi pericoli anche per l'uomo; effetti che non rimangono sempre localizzati nelle zone di scarico, ma anzi si fanno sentire spesso a distanze notevoli.

Nel Mar Mediterraneo, ad esempio, la zona più inquinata è quella nord occidentale, sulla quale gravita un maggior numero di città densamente popolate e industrializzate. In particolare le aree considerate maggiormente a rischio sono quelle nei pressi di Barcellona, Marsiglia, Pireo e Napoli. Il Rodano e il Po sono i corsi d'acqua che scaricano più abbondanti sostanze inquinanti, seguiti immediatamente dagli agglomerati urbani e industriali situati lungo le coste. La contaminazione però si sta progressivamente estendendo a tutto il bacino, che accoglie scarichi di ogni genere: all'inizio degli anni '80 erano già più di 12 milioni di tonnellate di rifiuti urbani all'anno, oltre 1 milione di tonnellate di azoto, 360 mila di fosforo, 21 mila di zinco, e poi cromo, detersivi, insetticidi e pesticidi, mercurio ecc. Basta considerare, infatti, che degli individui che abitano le coste del Mar Mediterraneo, il 50% risiedono in grandi o medi centri urbani che dirigono al mare enormi quantità di acque fognarie, e che nei paesi in evoluzione il 95% delle fogne non è dotato di un impianto di depurazione e le acque che scaricano nei fiumi alle volte sono impiegate come acque potabili. Senza contare il petrolio, che sempre all'inizio degli anni '80 era valutabile in circa 2 milioni di tonnellate l'anno, è scaricato in mare dalle numerose petroliere che solcano l'intero bacino. Questo materiale, che in vari casi continua ad aumentare, viene in parte sospinto dalle correnti

marine verso il largo, in parte si concentra in zone ristrette, provocando danni assai gravi al plancton e alla fauna ittica e limitando anche lo sviluppo del turismo, che è una delle attività economiche più redditizie per molti paesi mediterranei, fra cui soprattutto l'Italia. La situazione attuale dell'inquinamento non può non preoccupare, specie se si tiene conto delle tendenze, non sempre positive, e del fatto che per il ricambio delle sole acque superficiali del Mediterraneo attraverso lo Stretto di Gibilterra occorre un'ottantina di anni (per le acque profonde il ricambio è molto più lento).

Capita sempre più spesso di vedere acque luride che si riversano in mare; acque contenenti fra l'altro detersivi non biodegradabili, che limitano le capacità autodepurative dell'ambiente marino e squilibrano la competizione naturale fra gli organismi presenti. Lo scarico incontrollato di queste acque residuali, provenienti dalle aree intensamente urbanizzate ed industrializzate, trasforma le acque costiere in un ambiente favorevole alla sopravvivenza in concentrazioni massicce dei batteri fecali e di numerosi germi patogeni che frequentemente li accompagnano; fra questi ultimi si trovano i bacilli del tifo, del paratifo, del colera e della tubercolosi, i virus dell'epatite virale e della poliomielite, e tanti altri: perciò si parla spesso d'**inquinamento organico e microbiologico**. La presenza di tali microrganismi tuttavia non comporta gravi rischi per la balneazione, salvo che nei casi di notevole inquinamento fecale, la contaminazione degli organismi marini utilizzati a fini alimentari può essere molto dannosa per la salute dell'uomo: i pericoli sono molto accentuati con i mitili e le ostriche, che si nutrono filtrando decine di litri d'acqua al giorno, trattenendo e metabolizzando il materiale in sospensione e comportandosi perciò come concentratori di germi, molti dei quali mantengono intatta la loro virulenza soprattutto quando questi Molluschi vengono consumati vivi o mal cotti. Si spiega così la frequenza della salmonellosi in molte regioni costiere; agli stessi motivi fu dovuta l'epidemia di colera scoppiata in Italia nel 1973: ne furono veicoli, appunto, i mitili che vengono chiamati comunemente «cozze» o «muscoli di mare».

Proprio per questa loro caratteristica di accumulare batteri, insetticidi, pesticidi ed idrocarburi i molluschi bivalve in genere, sono recentemente divenuti degli indicatori di fondamentale importanza per tracciare un quadro dell'inquinamento dei mari. Le analisi microbiologiche eseguite nella polpa e nel liquido intervalvare degli esemplari confermano e rafforzano i risultati delle analisi nelle acque, poiché i molluschi, per le loro caratteristiche biologiche, registrano anche eventuali inquinamenti pregressi, che invece sfuggono alle analisi effettuate su campioni di acqua. L'accumulo d'indicatori batterici quali coliformi e streptococchi, e l'eventuale presenza di patogeni sono oggi, infatti, considerati una spia di contaminazione

delle acque marine costiere, anche quando questa non è evidenziata dalle determinazioni eseguite sui campioni d'acqua, perché troppo diluiti o perché la causa che determina la contaminazione non è continua nel tempo.

Geograficamente più esteso e quindi più preoccupante è **l'inquinamento chimico** di mari ed oceani, suddiviso a sua volta in inquinamento causato da composti chimici organici e quello causato da composti chimici inorganici ed in particolare modo dai metalli pesanti. Le industrie metallurgiche, le raffinerie, le concerie, le industrie di prodotti chimici e le industrie per l'elaborazione degli alimenti sono le principali responsabili di questo tipo d'inquinamento. Numerosi insetticidi e pesticidi, tra cui il DDT ed i PCB risultano altamente pericolosi, vengono trasportati dalle acque fluviali o diffusi attraverso l'atmosfera per produrre effetti molto nocivi su Uccelli ed altri organismi marini, dagli Invertebrati ai Pesci. Tali sostanze, infatti, si accumulano nella catena alimentare fino ai consumatori secondari causando danni e malformazioni. In molte zone costiere (delta ed estuari), fra cui anche alcune considerate come riserve faunistiche naturali, sono avvenuti dei disastri ecologici, a volte completi, provocati da tali inquinanti.

Fra le sostanze tossiche molto dannose, o addirittura letali per l'uomo, prodotte dall'industria moderna e presenti nelle acque residuali, che spesso vengono immesse nel mare senza depurarle, vanno citati i metalli pesanti. E' tristemente noto ciò che è successo molti anni fa nella baia di Minamata in Giappone, a causa delle acque di scarico di una fabbrica di acetaldeide, contenenti dimetilmercurio: il primo caso di intossicazione per consumo di crostacei, molluschi e pesci provenienti da quella zona fu osservato nel 1956 ed il numero salì a 121 nel 1971. Il 40% delle persone ammalate, in maggioranza appartenenti a famiglie di pescatori del luogo, morì dopo pochi giorni per lesioni cerebrali ed alla fine del 1975 i deceduti contati erano 3.500. La sostanza inquinante aveva percorso tutta la catena alimentare marina: dal fitoplancton allo zooplancton per concentrarsi nei crostacei, nei molluschi e nei pesci; quindi era passata nell'uomo. In seguito ad ingestione di pesce contaminato da mercurio si ebbero anche 35 morti e 321 malati gravi in Iraq nel 1961, 4 morti in Pakistan nel 1963, 20 morti in Guatemala nel 1966 due morti anche in Italia nel 1977 per aver ingerito pesce importato dal Giappone. L'elenco potrebbe ancora continuare, ma basterà segnalare che fin dal 1970 sono state riscontrate quantità abnormi di mercurio nei tonni e pesci spada di varie zone del Pacifico; inoltre il Mar Baltico è tanto inquinato da mercurio, e da varie altre sostanze utilizzate in agricoltura, che si sta pensando di ridurvi drasticamente la pesca.

In tutto ciò non va dimenticato che una parte consistente dell'inquinamento marino complessivo transita attraverso l'atmosfera. Si stima, infatti, che le industrie che insistono sul

solo Mar Mediterraneo rilasciano ogni anno mediamente 47 tonnellate di idrocarburi aromatici, composti mutageni, 55 chilogrammi di diossine e furani e oltre 200.000 tonnellate di carbonio organico volatile. A questi quantitativi vanno purtroppo aggiunti gli inquinanti aeriformi prodotti da ogni sorta di veicoli. La pioggia acida è un fenomeno direttamente collegato alla dispersione di gas e particelle inquinanti nell'atmosfera, e queste non solo ricadono nelle aree urbane che generano l'inquinamento, ma ovviamente si spostano e si estendono a tutto il Globo seguendo i flussi delle masse d'aria. Non sempre però questo tipo d'inquinamento è dovuto all'uomo, basti considerare che fenomeni di piogge acide si sono avute in concomitanza con imponenti eruzioni vulcaniche. Gli effetti dell'eruzione del Pinatubo nel 1991 furono avvertiti a livello planetario. Essa iniettò un'enorme quantità di gas nella stratosfera, superiore ad ogni eruzione successiva a quella del Krakatoa del 1883. Gli aerosol formarono uno strato oscurante di acido solforico, nei mesi successivi. La temperatura globale diminuì di mezzo grado Celsius e il buco dell'ozono crebbe sostanzialmente.

Con il vasto ed intenso sfruttamento degli idrocarburi — utilizzati come combustibili, lubrificanti e materie prime per prodotti sintetici — la civiltà industriale ha introdotto un'altra forma d'inquinamento del mare, un tempo inesistente: **l'inquinamento da petrolio**, che è noto ormai da un secolo, ma si è accresciuto progressivamente, fino ad assumere proporzioni gigantesche. Petrolio ed altri idrocarburi sono versati frequentemente in mare dalle numerose raffinerie rivierasche, a causa di perdite incontenibili che sono molto piccole, se considerate singolarmente, ma diventano ingenti, quando si protraggono nel tempo. Ancora più grave è lo scarico delle acque di lavaggio delle petroliere, eseguito deliberatamente e spesso anche a poca distanza dalle coste; peraltro, queste navi subiscono talvolta incidenti che fanno riversare in zone ristrette quantitativi enormi di petrolio greggio.

Questi idrocarburi formano ampie macchie galleggianti che possono essere attaccate lentamente da organismi microbici rari e da processi fotochimici: entrambi tendono a demolire le molecole più leggere, mentre quelle più pesanti (asfalti) perdurano inalterate, sotto forma di grumi, per parecchi mesi (fino a 1-2 anni) e solo col tempo precipitano verso il fondo, dove vengono ancora aggredite dall'azione batterica, oppure subiscono l'attacco fisico-chimico da parte delle acque marine. Il primo effetto, in ogni modo, è una sottrazione d'ossigeno all'ambiente sia perchè il petrolio impedisce la penetrazione dell'ossigeno atmosferico nelle acque marine sottostanti, sia perchè i batteri per degradarlo utilizzano notevoli quantità di ossigeno. Il danno a tutti gli organismi che vivono negli strati più superficiali del mare è enorme: basti pensare che risulta impedita perfino la fotosintesi, indispensabile per lo sviluppo di fitoplancton. Fra le grandi vittime dell'inquinamento da

petrolio vi sono anche gli Uccelli marini, perchè assumono cibo contaminato e perchè subiscono danneggiamenti al piumaggio che ne rendono facile l'affondamento e ne impediscono il volo o il nuoto e la presa degli alimenti. Fin troppo ovvii sono gli effetti deleteri sulla pesca e sul turismo delle zone costiere dove i movimenti del mare sospingono le macchie di petrolio, tristemente note come «ondate nere».

Fino a qualche anno fa in tutti i testi e le pubblicazioni che si occupavano d'inquinamento del mare, era citato come gravissimo ed eccezionale l'incidente capitato alla «Torrey Canyon», una petroliera che proveniva dal Kuwait e che il 18 marzo 1967 naufragò nel canale de La Manica, riversando in mare almeno 50000 tonnellate di petrolio (secondo alcuni erano 117 000 tonnellate), con effetti disastrosi per la fauna e per la flora litorale della Bretagna (Francia) e della Cornovaglia (Inghilterra). In 42 giorni furono contaminati 260 chilometri di costa e per ripulirli si adoperarono 10.000 tonnellate di detergenti. In quell'occasione perirono ben 25000 uccelli. Purtroppo eventi di questo genere si sono ripetuti abbastanza frequentemente, e non sono mancati anche quelli più gravi. Una vera «catastrofe ecologica» è stata provocata dal naufragio della superpetroliera «Amoco Cadiz», avvenuto nel marzo del 1978 sugli scogli di Portsall, Finistere (Bretagna); in quell'occasione 223000 tonnellate di petrolio si sparsero sul mare, originando nell'Atlantico una chiazza nera ed oleosa estesa circa 1000 km², che uccise milioni di organismi diversi (batteri, alghe, molluschi, crostacei, pesci, uccelli) e andò ad inquinare un centinaio (o più) di chilometri di coste bretoni, lungo le quali il petrolio penetrò per 60 cm entro la sabbia bianchissima: finita la pesca e quasi distrutto il turismo per almeno una decina d'anni, profondamente alterato in breve tempo un equilibrio che la natura aveva impiegato secoli a raggiungere. Non mancano, purtroppo, esempi di eventi dello stesso genere in zone marine a noi ancor più vicine: uno dei casi recenti, che ha fatto molto scalpore, si è verificato nel Mediterraneo all'alba del 21 marzo del 1985, quando nello Stretto di Messina entrarono in collisione la petroliera greca «Patmos» e la superpetroliera spagnola «Castiglio de Monte Aragon»; circa 5000 tonnellate di greggio si riversarono in mare dalle falle apertesì sulla fiancata della Patmos ed un'enorme chiazza nera, con un fronte di più di 7 km, si diresse verso le coste siciliane e calabresi.

La nave Ger-Maersk ebbe un incidente nel 1965 alla foce dell'Elba: 8.000 tonnellate di petrolio disperse in mare, 500.000 uccelli marini morti. La petroliera Erika negli ultimi mesi del 2000 ha avuto un incidente, immettendo nuovamente nel Mare del Nord grandi quantità di petrolio lungo le coste dell'Inghilterra Nord - occidentale.

La petroliera Jessica nel gennaio 2001 urtò contro uno scoglio nei pressi delle Galapagos ed il petrolio che trasportava, una volta in mare, cominciò a dirigersi verso il paradiso

incontaminato. Fortunatamente le correnti gli fecero cambiare rotta e quindi molti animali delle Galapagos si riuscirono a salvare.

A parte questi «incidenti», si può ritenere che le numerose petroliere in viaggio per mari ed oceani versino circa l'uno per cento del loro carico di greggio durante le operazioni di pulitura dei serbatoi; ciò significa che la quantità complessiva d'idrocarburi scaricati in mare dovrebbe già essere valutata nell'ordine di una ventina di milioni di tonnellate all'anno e, con le tendenze attuali, rischia ovviamente di aumentare. Per quanto tali valutazioni siano molto approssimate, si tratta certamente di quantità che potrebbero essere considerati quasi insignificanti se fossero dispersi uniformemente in tutto l'insieme delle acque oceaniche (un volume di circa $1,37 \cdot 10^{18}$ m³ d'acqua), ma risultano invece altamente dannosi perchè sono spesso concentrati in zone limitate e per di più entro bacini periferici a scarsa comunicazione con l'oceano aperto, come il Mar Mediterraneo, il Mare del Nord, La Manica, il Mar del Giappone.

Accanto agli sversamenti accidentali e dolosi d'idrocarburi andrebbero tenuti in considerazione anche i rilasci naturali di giacimenti sottomarini. Sono fenomeni di difficile quantificazione ed alcuni studi effettuati in California li hanno quantificati in quella zona fino a 27 tonnellate ogni giorno.

Purtroppo l'inventario delle diverse forme d'inquinamento del mare non finisce neanche qui. Lo scarico di acque utilizzate nei sistemi di riscaldamento o di raffreddamento di impianti industriali produce un **inquinamento termico** che può causare sensibili alterazioni fisico-chimiche all'ambiente marino e gravi disturbi agli organismi acquatici, i quali sono generalmente «stenotermi», cioè poco adatti a sbalzi di temperatura; ne sono responsabili soprattutto le centrali termoelettriche e le centrali nucleari, che spesso sorgono proprio in zone costiere e riversano in continuazione — direttamente o tramite i fiumi — acque calde nel mare.

Bisogna aggiungere ancora **l'inquinamento da sostanze radioattive**, il quale è dovuto alle esplosioni atomiche (in mare, sulle terre emerse e nell'atmosfera), agli scarichi ed alle perdite incontrollate o incontrollabili (allo stato gassoso, liquido e solido) delle centrali elettronucleari, ai rifiuti e alle scorie degli impianti di utilizzazione e di ritrattamento dei materiali radioattivi, ai sommergibili e alle navi a propulsione nucleare, alle altre applicazioni pacifiche dei radioisotopi (ospedali, industrie ecc.). La prima di queste fonti ha destato vivissime preoccupazioni su scala mondiale soprattutto all'inizio degli anni sessanta (nel 1963 furono registrati alti gradi di contaminazione radioattiva specialmente nel Pacifico settentrionale), ma la parziale limitazione delle esplosioni nucleari ha poi ridotto

sensibilmente i pericoli. Attualmente è ben più preoccupante il problema del confinamento delle scorie radioattive, a causa del massiccio incremento dei programmi nucleari conseguenti alla crisi energetica. Secondo alcuni progetti, questi residui inutilizzabili, ma ancora altamente nocivi, dovrebbero essere sepolti in fosse oceaniche profonde; secondo altri progetti dovrebbero essere interrati in regioni geologicamente stabili e sicure: in entrambi i casi non vanno sottovalutati i notevoli rischi.

Merita un cenno anche **l'inquinamento acustico** dell'ambiente marino, prodotto dalla sempre più numerosa presenza dell'uomo: la navigazione, le attività estrattive petrolifere e minerarie che si svolgono in mare. Le industrie e gli insediamenti costieri stanno forse allontanando da molte zone gli organismi acusticamente più deboli, come i Mammiferi, e rischiano anche di far scomparire specie che difficilmente possono adattarsi alla ricerca, in tempi brevi, di località più tranquille¹.

Questa rapida rassegna delle diverse fonti e delle varie forme d'inquinamento dovrebbe far capire quanto possa essere pericolosa l'azione — diretta o indiretta — dell'uomo sul mare. Sono stati già visti alcuni esempi di danni molto consistenti arrecati ai bacini marini, ma bisogna anche aggiungere che l'inquinamento si può gradualmente estendere agli interi oceani; perciò il problema va affrontato soprattutto con una visione globale. Occorre quindi prestare estrema attenzione ai fenomeni che avvengono nel mare ed agli effetti indotti da certe attività umane, adoperandosi in ogni modo per controllare, o almeno limitare, quelle più dannose, se si vuole mantenere e sfruttare adeguatamente le immense risorse proprie dei nostri oceani.

Lo studio condotto nel corso di questo dottorato di ricerca va più precisamente inquadrato nell'ambito di una recente ed innovativa branca della scienza denominata biorimediazione. Essa si pone come obiettivo ultimo la depurazione dei suoli e delle acque attraverso l'ausilio di specifiche forme di vita e di composti chimici organici ed inorganici, mirando così ad una bonifica indiretta dell'ambiente e ad un disinquinamento privo d'impatto. L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di approfondire meglio il ruolo dei macro-organismi bentonici nella biodegradazione dei detersivi nell'ambiente marino. Le ascidie, e più in generale i tunicati, come altri macro-organismi filtratori, sono in grado di resistere a varie forme d'inquinamento. Gli studi sperimentali intrapresi in acquario con acqua di mare arricchita in un alchil-benzene-sulfonato lineare puro (LAS), vale a dire l'1-(*p*-sulfofenil)nonano, hanno indicato che la degradazione primaria avviene circa 2 volte più

¹ Il globo terrestre e la sua evoluzione - Zanichelli 1987

velocemente in presenza della *Styela plicata*, che in presenza dei soli batteri marini. Questo studio tende a confermare che i macro-organismi bentonici svolgono un ruolo importante nella trasformazione degli agenti inquinanti biodegradabili, come ad esempio i LAS.

Nel seguito del presente capitolo si accennerà agli studi condotti in parte di recente su tale materia e ad alcuni dei più importanti studi riguardanti l'ascidia *Styela plicata* e l'1-(*p*-sulfonil)nonano, che rappresentano rispettivamente il potenziale organismo biorimediante e l'inquinante disperso nell'ambiente marino. Sorprendentemente però lo stesso può fungere da coadiuvante per la biorimediazione, a patto di non intaccare la vitalità degli organismi stessi.

L'1-(*p*-sulfonil)nonano, è la molecola con proprietà tensioattive impiegata in questo studio sperimentale, in rappresentanza della vasta categoria dei detersivi. Si è ritenuto importante indagare se e quanto la loro biodegradazione a mare sia influenzata dalla presenza dell'ascidia *Styela plicata*, e più in generale da quella del benthos. Al tempo stesso si è inteso comprendere a quale concentrazione un detersivo produce effetti visibilmente negativi e letali su quest'organismo marino filtratore, che oltre a rappresentare la vita sottomarina bentonica delle aree ad elevato stress ambientale, possiede anche alcune caratteristiche fisiche tipiche dei vertebrati.

1.1 Cenni sulla biorimediazione

La *biodegradazione* è quell'insieme di processi naturali, in cui i batteri o altri microrganismi scompongono le molecole organiche in sostanze maggiormente biodisponibili tra cui acidi grassi ed anidride carbonica.

La *biorimediazione* consiste invece nell'introdurre microrganismi e particolari sostanze negli ambienti contaminati per indurre un'accelerazione del naturale processo di biodegradazione².

La *fertilizzazione* è quel metodo di biorimediazione che consiste nell'aggiungere nutrienti, come ad esempio molti composti dell'azoto e del fosforo, ad un sito contaminato per stimolare lo sviluppo di microrganismi autoctoni. Questo processo è altrimenti chiamato "arricchimento di nutrienti".

La *bioaugmentation* consiste invece nell'aggiungere microrganismi nel sito inquinato. Tali microrganismi devono essere innanzi tutto degli specialisti ovvero, laddove naturalmente presenti, devono possedere la capacità di degradare uno o più particolari inquinanti. Essi poi possono essere introdotti anche insieme a dei nutrienti. Le odierne tecniche di bioaugmentation prevedono l'impiego sia di microrganismi naturalmente esistenti, sia di quelli geneticamente modificati.

Un forte impulso al progresso della ricerca in tale area si è avuto, sfortunatamente, solo in seguito ad un incidente molto rilevante. Nel Marzo 1989 la petroliera "Exxon Valdez" disperse enormi quantità di greggio nel mare e sulle coste dell'Alaska. Da allora l'EPA

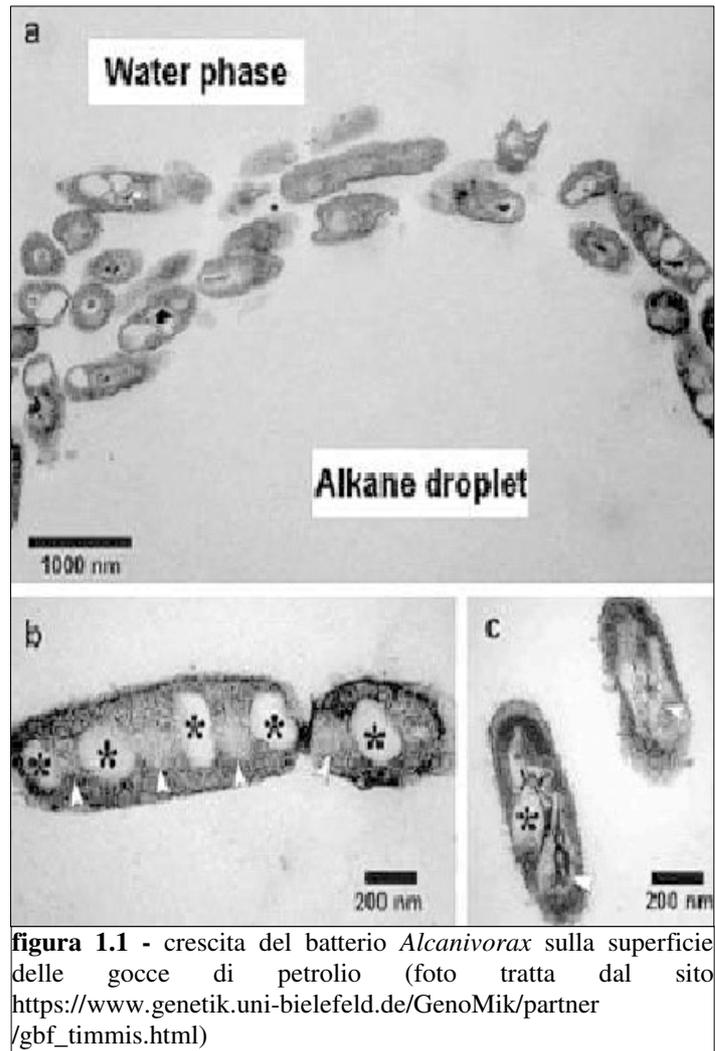


figura 1.1 - crescita del batterio *Alcanivorax* sulla superficie delle gocce di petrolio (foto tratta dal sito https://www.genetik.uni-bielefeld.de/GenoMik/partner/gbf_timmis.html)

² Congress of the United States OTA – Bioremediation for Marine Oil Spill, 1991

(Environmental Protection Agency) e l'Exxon intrapresero i primi esperimenti mirati al contenimento dell'impatto ambientale verificatosi.

Un altro aspetto fondamentale nella biorimediazione sono le variabili ambientali. Esse possono influenzare sostanzialmente la velocità e l'estensione dei processi di degradazione.

Variabili come l'ossigeno e la disponibilità di nutrienti possono fare la differenza nella riuscita o meno di un



figura 1.2 – La sciagura della Exxon Valdez in Alaska (foto tratta dal sito <http://earthhopenetwork.net>)

trattamento di biorimediazione.

L'ossigeno è uno dei più importanti fattori che richiedono i microrganismi per i processi di degradazione. A tal fine, essi usano in gran parte enzimi che incorporano l'ossigeno. Le degradazioni anaerobiche avvengono, ma c'è da dire che normalmente questi processi esibiscono velocità molto più basse rispetto a quelli aerobici. Ecco perché normalmente la scarsa disponibilità d'ossigeno limita la velocità dei processi di degradazione.

La presenza di nutrienti quali azoto, fosforo, ferro ed altre tracce di minerali gioca un ruolo più critico dell'ossigeno sia nei processi di degradazione in acqua, che in quelli che avvengono nei solidi. Negli inquinamenti causati dagli idrocarburi, infatti, la scarsa presenza in essi degli elementi menzionati, limita drasticamente la loro velocità di degradazione. In questi casi si rende necessario equilibrare i rapporti C:N e C:P portandoli rispettivamente al di sotto dei valori 20:1 e 50:1, attraverso l'uso di fertilizzanti.

La temperatura è un altro fattore ambientale rilevante ai fini della velocità di biodegradazione. In linea generale più alta è la temperatura, più veloci sono i processi degradativi.

La pressione, al contrario di quanto avviene per la temperatura, è inversamente proporzionale alla velocità di reazione. La biodegradazione del petrolio sul fondo degli oceani, infatti, è risultata essere molto lenta³.

Il pH di un substrato influenza sicuramente la popolazione microbica presente. La loro specificità aumenta in generale al discostarsi dai valori di neutralità, intorno ai quali, invece, espletano le loro funzioni vitali la gran parte dei microrganismi. Negli ambienti fortemente tamponati, ovvero in cui le variazioni di pH avvengono meno facilmente, come in mare ad esempio, l'influenza del pH come fattore ambientale limitante per i fenomeni degradativi, riveste un'importanza piuttosto marginale. Analogo discorso vale per la salinità.

Infine, per quanto concerne i terreni, la degradazione generica degli inquinanti in essi contenuti, avviene normalmente quando il suo contenuto d'acqua si attesta intorno al 35 – 55 % della sua massima capacità di contenerla⁴.

Le tecnologie di biorimediazione presentano nel loro impiego dei vantaggi e delle controindicazioni. Il vantaggio principale è che la biorimediazione ha sicuramente un blando impatto ambientale rispetto ad altre tecnologie disponibili. I mezzi di rimozione chimici, fisici o meccanici, comunemente producono impatti ambientali non trascurabili.

Le tecnologie di biorimediazione sembrano non avere effetti collaterali a breve termine se correttamente impiegate. Ricerche in tal senso sono in corso, anche se ben poche sono le evidenze che i potenziali problemi esaminati possano diventare significativi. Esse, in generale, accelerano i processi d'evaporazione dei tossici a più basso peso molecolare ed inoltre non prevedono lo spostamento degli inquinanti da una fase ad un'altra, come avviene nel caso dei getti di vapore sulle spiagge contaminate dagli idrocarburi. Questi ultimi inizialmente si riversano a mare e successivamente vengono raccolti con dei disoleatori. Tali tecniche infine, non necessitano in genere di ingombranti equipaggiamenti meccanici e per questo sono quasi sempre molto economiche, anche se andrebbero ben valutati i relativi costi di monitoraggio.

Esistono tuttavia anche alcuni svantaggi, per esempio la biorimediazione potrebbe non essere appropriata nelle fasi iniziali di un serio impatto ambientale: nel caso di uno sversamento di petrolio è infatti prioritario rimuoverlo dall'acqua o dal terreno quanto più rapidamente possibile e spesso si rende necessario bruciarlo prima che un'estensione della macchia contaminata le aree prospicienti. Inoltre l'approccio alla biorimediazione deve essere specifico

³ J.R. Swartz et al., 1974

⁴ Hupe et al. - cap.22 - Treatment of Contaminated Soil, 2001

rispetto al sito in cui è avvenuto l'impatto ambientale, in altre parole, come si è detto in precedenza, è necessario prendere conoscenza dei fattori ambientali per rendere efficaci i trattamenti.

Infine, le tecniche di biorimediazione sono poco conosciute al pubblico e per quanto le soluzioni naturali ai problemi ambientali siano generalmente ben accette, la scarsa conoscenza dei microrganismi e del loro ruolo nell'ambiente potrebbe sfavorirne l'uso. Prima che i trattamenti di biorimediazione divengano ampiamente diffusi, la loro efficacia e sicurezza devono essere convincentemente dimostrate e comunicate al pubblico.

1.1.1 Biorimediazione degli impatti prodotti dagli allevamenti ittici intensivi

Il sabellide filtratore *Sabella spallanzanii* Gmelin (Polychaeta, Sabellidae) è un filtratore tubicolo tipico d'ambienti eutrofici come le aree portuali, per il quale gli aspetti qualitativi e quantitativi del processo di filtrazione sono ancora quasi completamente sconosciuti. Esperimenti di laboratorio hanno rivelato però che le sue abitudini alimentari esercitano un'azione positiva sulla rimozione dei solidi dalla colonna d'acqua in combinazione con un'interessante attività microbiologica. Per questo è stato proposto come biofiltro nel trattamento dei reflui provenienti da allevamenti ittici intensivi⁵, anche se ad oggi le specie maggiormente utilizzate appartengono ai molluschi⁶.



figura 1.3 – *Sabella spallanzanii* (Gmelin 1791) (foto tratta dal sito <http://grup.bio.unipd.it/globin>)

⁵ A. Giangrande et al., 2004

⁶ Shpigel et al., 1993

Da un esperimento eseguito in una piccola impresa di piscicoltura, sono emersi, infatti, interessanti dati sul tasso di crescita e di stabilimento di una popolazione naturale di *S. spallanzanii*, insieme ad alcuni dati sull'attività di biorimediazione di una popolazione di adulti. I risultati sembrano incoraggiare la prosecuzione di successivi studi su questo verme per un suo futuro impiego come biorimediatore nelle imprese di piscicoltura con ricircolo d'acqua. I dati sullo stabilimento annuale naturale indicano, tuttavia, che la riproduzione artificiale di specie idonee allo scopo sarà il punto di partenza di nuove investigazioni. L'aumento di biomassa dei vermi, infatti, diventa utile agli scopi di bioremediation solo dopo il primo anno d'allevamento, e soltanto dopo il secondo anno di crescita con i reflui raggiungono una dimensione adatta ad un uso commerciale. Per il loro alto contenuto proteico⁷, infatti, potrebbero sia essere utilizzati come esche, sia come alimento fresco o secco per pesci.

Altri esperimenti effettuati su *S. spallanzanii* hanno inoltre evidenziato una notevole capacità d'accumulo delle varie categorie batteriche esaminate e che un loro quantitativo pari a circa 11 g di peso secco, riesce a rimuovere 4,938519 mg/l di solidi sospesi, in 25 l di acqua marina in tre ore. I dati concernenti i composti

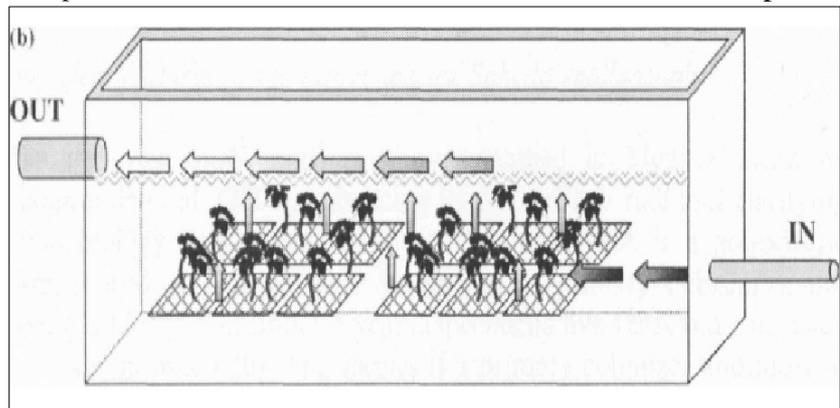


figura 1.4 – disegno schematico rappresentante il flusso di un impianto di bio-depurazione con i policheti *Sabella spallanzanii* in un allevamento ittico su costa (Aquaculture international, 2004 in stampa)

dell'azoto indicano invece un'azione positiva sui nitriti, contrastata però da un aumento di ammoniaca e nitrati. Questi ultimi dati lasciano propendere quindi verso un potenziale utilizzo di *S. spallanzanii* come biorimediatore della colonna d'acqua, per la sola componente della sostanza organica, ma in possibile accoppiamento con alghe nitrofile, che interverrebbero sull'abbattimento delle sostanze azotate⁸.

Le spugne marine sono anch'esse degli organismi bentonici filtratori su cui sono stati compiuti alcuni studi tesi ad un loro utilizzo per la biorimediazione. Tra questi ne figura uno in cui è stata esaminata la capacità di ritenere il batterio *Escherichia coli* da parte della specie

⁷ Cavallo, dati non ancora pubblicati

⁸ Cavallo et al., 2002

Condrilla nucula che, per quanto abbia dei bassi tassi di filtrazione (14 l/h per metro quadro) ha mostrato una forte tendenza a trattenere questi batteri (fino a 7×10^{10} cellule/h)⁹.

1.1.2 Il MUDS, un sistema biologico subacqueo per depurare le acque di scarico

Il MUDS¹⁰ (Marine Underwater Depuration System) è un dispositivo subacqueo, supposto in grado di favorire la capacità di auto-depurazione del mare. Consiste in un filtro percolatore posizionato sopra lo sbocco di una condotta fognaria sottomarina¹¹. Per differenza di densità, l'effluente attraversa il filtro percolatore, che rimescolando il particolato organico ed innescando una catena trofica. Sul MUDS si sviluppano comunità microbentoniche, sia all'interno del filtro, sia sulla struttura. Gli organismi che principalmente vi s'insediano, da alcune osservazioni sperimentali, sono ciliati, nematodi, copepodi e policheti, che si suppone consumino parzialmente la materia organica contenuta nel refluo. Per questo dispositivo subacqueo gli autori del brevetto ipotizzano un utilizzo per i centri urbani litorali di medie dimensioni e con sbalzi sostanziali in termini di carico organico durante l'anno, laddove in pratica la

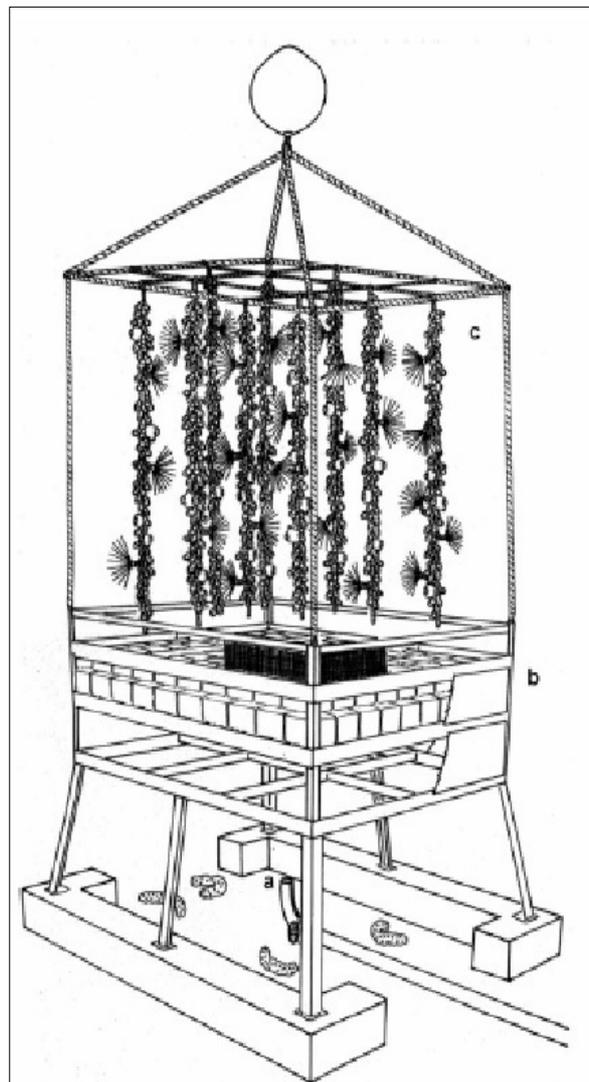


figura 1.5 – disegno schematico del MUDS (Biomol. Eng. 20: 291-298, 2003)

costruzione di depuratori progettati sul carico massimo risulterebbero sovradimensionati nei periodi in cui il carico è inferiore, oltre che impattanti visivamente e costosi.

Il MUDS può essere considerata una barriera artificiale sostenuta dall'immissione di particolato organico. Da dati raccolti durante i periodi d'interruzione del flusso in uscita dalla

⁹ Milanese et al., 2003

¹⁰ brevetto internazionale WO 02/ 055442, 2002

¹¹ Cattaneo – Vietti R. et al., 2003

condotta fognaria si è osservata una contrazione della comunità bentonica sul dispositivo, correlabile all'evidente mancata emissione di carbonio ed altri nutrienti provenienti dall'effluente urbano. Negli impianti di acquacoltura, è stata dimostrata una rimozione costante della materia organica dalla colonna d'acqua, usando strutture di polietilene poroso ad alta densità, disposte sotto la gabbia di allevamento, che sono state rapidamente colonizzate da comunità di organismi filtratori.

Il letto percolatore del MUDS favorirebbe lo sviluppo degli aggregati batterici, rappresentando un substrato per la fauna interstiziale, fornendo così un'opportunità d'alimentazione per molti animali filtratori e detritivori e iniziando una catena trofica. Il MUDS è composto di varie unità filtranti, a cui corrisponde una differente fauna interstiziale: le "bactoballs" sembrerebbero più adatte per lo sviluppo degli organismi sessili, i batteriofagi ciliati; le spugne di plastica intrappolano materia organica e quindi sono generalmente più ricche di organismi detritivori. In definitiva il MUDS è una struttura porosa che innesca una catena trofica, in quanto funge da substrato per i protozoi (principalmente ciliati) e per il microbenthos (ostracodi, arpacticoidi, policheti, bivalve), i quali a loro volta consumano materia organica e attraggono i predatori, tra cui organismi macro-bentonici e pesci pelagici. Esso renderebbe possibile inoltre selezionare gli organismi marini (batteri, funghi, protozoi) in grado di resistere anche a forti cambiamenti della salinità e della temperatura.

1.2 Cenni sulla biologia dei tunicati e della *Styela plicata*.

Il subphylum dei tunicati appartiene al grande phylum dei cordati (a cui appartengono anche i vertebrati). Di conseguenza i tunicati presentano le caratteristiche peculiari del phylum dei cordati: la notocorda (una struttura formata da tante cellule vacuolizzate, che nei vertebrati è la colonna vertebrale), il tubo neurale cavo, la faringe con fessure e pori laterali; la coda muscolare post - anale.

I tunicati sono animali sia sessili sia pelagici sia sospensivori. Essi filtrano l'acqua per nutrirsi di microrganismi. La notocorda è presente solo durante lo stadio larvale e la loro caratteristica peculiare è la presenza di un rivestimento esterno detto tunica (da cui deriva il nome tunicati). Essa è composta da un carboidrato di natura simile alla cellulosa e può essere più o meno spessa, liscia o rugosa. Tutti i tunicati sono ermafroditi e si dividono in tre classi: le ascidie, i taliacei e i larvacei.

Le ascidie sono caratterizzate dalla presenza di un sifone inalante (da cui entra l'acqua e i microrganismi) e di un sifone esalante (da cui escono l'acqua, i cataboliti e i gameti durante la

riproduzione). All'interno del lato ventrale è presente una struttura a doccia detta endostilo. Si tratta della faringe, che nei tunicati forma il cestello branchiale e ha la funzione di catturare le particelle alimentari filtrate. Tali particelle sono agglutinate nell'endostilo (tramite aperture detti stigmi) per poi essere convogliate verso l'intestino. Tutte le ascidie sono organismi sessili. La classe Ascidiacea comprende la maggior parte delle specie, circa 2000¹². Le ascidie erano conosciute sin dai tempi di Aristotele e la loro posizione filogenetica è stata chiarita abbastanza recentemente. Nel 1866

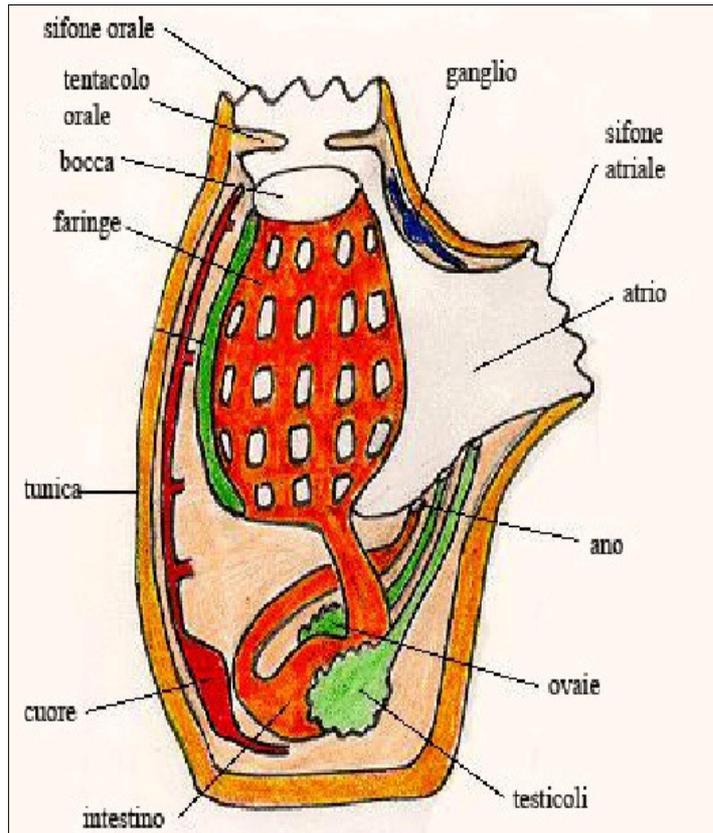


figura 1.6 – disegno schematico dei principali organi di un'ascidia

Kowalewsky dopo aver studiato approfonditamente l'embriogenesi, l'istologia larvale e la metamorfosi di questi metazoi, ha attribuito la collocazione sistematica che è tuttora accettata¹³. Gli urocordati occupano una posizione chiave per la filogenesi dei vertebrati. L'ipotesi dell'origine dei Vertebrati per pedomorfosi (postulata la prima volta da Garstang nel 1894 e ripresa poi da Garstang 1928, Berrill 1955, Tarlo 1960 e Barrington 1965)¹⁴ si basa sull'osservazione delle somiglianze fra la larva giriniforme dei tunicati e un ipotetico vertebrato ancestrale. In un libro recente che si occupa di filogenesi dei Cordati dal punto di vista paleontologico, "The Ancestry of the Vertebrates" di R.P.S. Jefferies (1986), i tunicati sono indicati come il "sister group" (cioè il più vicino parente vivente) dei Vertebrati.

I taliacei sono invece planctonici, con una forma a barilotto e un colore trasparente. Sono dotati di fasci circolari per la locomozione (muscoli). I sifoni sono collocati nelle due estremità e sono anch'essi dotati di endostilio.

I larvacei sono planctonici solitari ed hanno dimensioni di pochi millimetri. Sono dotati di un involucro gelatinoso e filtrano l'acqua attraverso le mucose. Sono animali neoteni, che

¹² Burighel & Cloney, 1997

¹³ Monniot *et al.*, 1991

¹⁴ Pough *et al.*, 1989

significa che anche allo stadio adulto presentano delle caratteristiche tipiche di quello larvale, come la notocorda nel caso dei larvacei¹⁵.

La *Styela plicata* (Lesueur, 1823) (Phylum Tunicata, Classe Ascidiacea, Ordine Stolidobranchia, Famiglia Styelidae, Genere *Styela*, Specie *plicata*) è la particolare ascidia oggetto di questo studio. E' dotata di un mantello bianco sporco o brunastro ed ha un aspetto bulboso o claviforme. E' presente in tutti i mari del Globo. La sua camera branchiale è costituita da 5-7 coste longitudinali. Le gonadi si trovano sul lato destro del corpo da 4-8 e 2 sul lato sinistro. E' molto diffuso e spesso si rinviene assieme a *Ciona intestinalis* a pochi metri di profondità. Predilige ambienti a basso idrodinamismo come porti e lagune. Necessita di temperature molto stabili ed il suo periodo di riproduzione nel Mar Mediterraneo va da febbraio ad aprile.

Fin dalle prime scoperte riguardanti la biologia dei tunicati, per approfondire la loro fisiologia e per meglio interpretare il ruolo da loro svolto negli equilibri degli ecosistemi marini in cui essi sono presenti, alcuni scienziati si sono impegnati per la determinazione d'importanti parametri fisici collegati con l'attività di filtrazione. Diversi esperimenti, infatti, sono stati condotti in acquario per valutare quantitativamente l'attività di filtrazione di alcune ascidie. Tra gli studi più moderni spicca quello in cui si è determinato, per la prima volta in modo non invasivo, la velocità di pompaggio, la velocità di filtrazione e l'efficienza di filtrazione di tre diverse specie di ascidie: *Ciona intestinalis*, *Phallusia mammillata* e *Styela plicata*.

Le specie furono prelevate a più riprese e a varie profondità nel porto di Port-Vendres in Francia. Con la *Styela plicata* furono condotti tre esperimenti ciascuno della durata totale di 12 ore, durante le quali si effettuavano con delle specifiche sonde due registrazioni di 20 minuti per ogni ora. I dati ed i risultati relativi a questi esperimenti sono riportati in tab. 1.1. Da questa emergono la velocità del flusso d'acqua, il tasso di pompaggio (o trasporto d'acqua) che rappresenta il volume d'acqua che passa attraverso l'animale per unità di tempo, il tasso di filtrazione che rappresenta il volume d'acqua che è stato ritenuto dai filtri branchiali nell'unità di tempo e l'efficienza di filtrazione che è il rapporto tra il tasso di filtrazione ed il tasso di pompaggio.

Come si può osservare la *Styela plicata* è l'ascidia, fra le tre, con la maggiore attività di filtrazione specifica, probabilmente per la maggiore complessità della struttura branchiale. Veramente elevate, infine, sono le velocità registrate durante l'emissione di gameti¹⁶.

¹⁵ <http://www.pescicostieri.it/biologia/animali/tunicati.htm>

¹⁶ Fiala e Mediani, 1978

| Parametro | Styela 1 | Styela 2 | Styela 3 | Styela media | Ciona media | Phallusia media |
|---|------------|------------|-----------|--------------|-------------|-----------------|
| Campionamento | 20 Ott, 3m | 31 Ott, 2m | 4 Nov, 5m | | | |
| Lunghezza/larghezza (cm) | 7,0/4,5 | 7,5/4,5 | 7,0/4,0 | | | |
| Peso secco – Test (g) | 1,299 | 0,957 | 0,892 | | | |
| Peso secco – Organi (g) | 0,589 | 0,412 | 0,399 | | | |
| Peso secco – Totale (g) | 1,888 | 1,369 | 1,291 | | | |
| Diametro dei sifoni (boccale/anale) (mm) | 15,0/6,0 | 14,0/6,5 | 12,0/7,0 | | | |
| Attività sessuale | ++ | ++ | ++ | | | |
| Intervallo di temperatura (°C) | 14,8-15,2 | 14,9-15,1 | 14,9-15,2 | | | |
| Salinità iniziale (‰) | 37,96 | 37,90 | 37,73 | | | |
| Salinità finale (‰) | 38,17 | 38,10 | 38,11 | | | |
| Ossigeno disciolto iniziale (ppm) | 5,27 | 5,26 | 5,33 | | | |
| Ossigeno disciolto finale (ppm) | nd | 5,19 | nd | | | |
| pH iniziale | 7,81 | 7,88 | 8,10 | | | |
| pH finale | nd | 8,10 | 7,85 | | | |
| Velocità minima (cm/sec) | <3 | <3 | <3 | | | |
| Velocità massima (cm/sec) | 26,6 | 20,0 | 18,2 | | | |
| Velocità media (cm/sec) | 8,7-13,4 | 5,3-10,2 | 5,4-10,7 | | | |
| Velocità espulsione gameti (cm/sec) | 140,6 | 92,5 | 127,6 | | | |
| Tasso di pompaggio (ml/12h) | 74340 | 51972 | 53172 | | | |
| Tasso di pompaggio (ml/h) | 6195 | 4331 | 4431 | 4986 | 1290 | 4076 |
| Tasso di pompaggio (ml/h*g) | 10508 | 10512 | 11105 | 10708 | 5906 | 6312 |
| Tasso di filtrazione (ml/12h) | 59952 | 44880 | 41760 | | | |
| Tasso di filtrazione (ml/h) | 4996 | 3740 | 3480 | 4072 | 953 | 3086 |
| Tasso di filtrazione (ml/h*g) | 8482 | 9078 | 8721 | 8760 | 4331 | 4779 |
| Efficienza di filtrazione (deviaz. %) | 75-88 | 72-88 | 73-90 | | | |
| Efficienza di filtrazione media (%) | 81 | 80 | 79 | 80 | 74 | 76 |

Tabella 1.1 – Dati sperimentali sull'attività di filtrazione di tre ascidie

Gli stadi di sviluppo della *Styela plicata* (Lesueur) sono profondamente influenzati dai cambiamenti stagionali e più in particolare dalle variazioni di temperatura e di salinità dell'acqua del mare. Uno studio recente sulla sensibilità relativa dei suoi differenti stadi di sviluppo (cioè, durata di sviluppo embrionale, di metamorfosi larvale e di sviluppo post-larvale) condotto alle temperature di 18, 22, 26 e 30

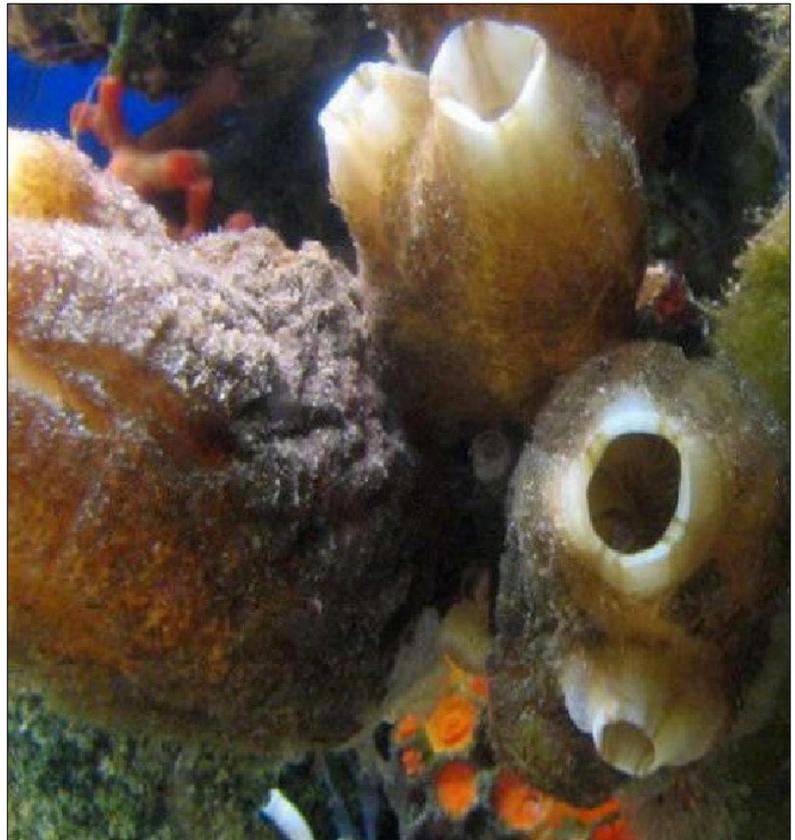


figura 1.7 – *Styela plicata* (foto di Silvio Barrile tratta dal sito <http://www.aiam.info>)

34‰, ha fatto emergere dati

molto interessanti. Le uova fertilizzate non si sviluppano alle salinità più basse (22 e 26‰) e alle più alte salinità (30 e 34‰), la durata di sviluppo embrionale aumenta con la diminuzione della temperatura (a 18°C: 11.5 F0. 3h; a 30°C: 8.5 F0. 3h). Più del 50% delle larve si attaccano e subiscono metamorfosi spontaneamente a tutti i livelli di temperatura e di salinità considerati. Alle più alte temperature (22, 26 e 30°C) e salinità (30 e 34‰), il sifone funzionale si sviluppa in circa 72 h dopo la covata, mentre alle basse temperature (18°C), il sifone funzionale si sviluppa soltanto in meno del 30% degli individui, in circa 90h. Tuttavia, le larve metamorfosate non si sviluppano a bassa salinità (22‰) a qualsiasi temperatura. Tali osservazioni coincidono con quelle compite in natura, per le quali la riproduzione della *S. plicata* a Hong Kong è ridotta durante i mesi caldi dell'estate (Giugno-Agosto), periodo in cui la temperatura è elevata, ma la salinità è notevolmente ridotta. Osservazioni simili sono state fatte lungo il litorale orientale dell'America del Nord ed in acque giapponesi. E' stato dimostrato che la *S. plicata* tollera un'ampia variazione di salinità e di temperatura ed al contempo si osserva che le ascidie potrebbero essere uno degli animali più euritermici riguardo alla riproduzione.

Quando vengono forzate al nuoto (ovvero quando vengono ritardate nell'attaccamento), le larve perdono circa il 22% dell'energia conservata dopo 48h. Un tal calo nelle riserve d'energia, tuttavia, non è abbastanza elevato da causare un impatto significativo sulla crescita post-larvale. Prove recenti suggeriscono che ci possono essere costi subletali connessi con l'aumentare della durata della fase larvale nuotante, particolarmente per le specie con larve aplanctontrofiche. Per quanto le larve della *S. plicata* sono aplanctontrofiche, non avviene quanto emerso da altri studi sulle larve del granchio, dei briozoi, delle spugne, dell'alotide e di altre ascidie coloniali, in cui l'attaccamento ritardato ha diminuito sia la sopravvivenza sia la velocità di crescita durante lo sviluppo post-larvale. Sembra quindi che gli embrioni e gli stadi giovanili sono le fasi più critiche del loro ciclo di vita.

Il modello di crescita embrionale e post-larvale della *S. plicata* è molto simile a quello di parecchie altre specie di ascidie. Altri studi ancora indicano che *S. plicata* può produrre i gameti durante i mesi caldi dell'estate (circa 28°C).

Accanto ai fattori ambientali, altri ancora, come ad esempio il periodo della riproduzione sessuale, il rifornimento larvale, il comportamento larvale durante lo stabilimento, il post-stabilimento della mortalità e dello sviluppo e la distribuzione dei predatori, possono interessare l'andamento dell'accrescimento delle colonie¹⁷.

1.2.1 Studi sperimentali per stimare l'accrescimento della biomassa di

Styela plicata

Nell'ambito del Programma "Campo sperimentale in mare intervento 72" della Regione Veneto, realizzato dall'Osservatorio Alto Adriatico di ARPAV nel novembre 2003, sono state disposte, a circa due miglia dalla foce del fiume Sile, due strutture di forma piramidale costituite da cubi in cemento di 2m di lato, di cui quattro cubi ne costituiscono la base ed un quinto è stato posto superiormente. In una delle piramidi del campo sono stati monitorati fotograficamente gli organismi in accrescimento su di essa, al fine di effettuare una stima della loro biomassa e sviluppare quindi una metodica di monitoraggio del benthos non invasiva. Sono state eseguite inoltre tre campagne di campionamento, di cui la prima effettuata all'inizio del mese di febbraio 2004, la seconda effettuata a fine luglio 2004, la terza nel mese d'ottobre 2004. Fino ad ora sono stati elaborati i dati relativi a due delle specie identificate sulle strutture, tra cui appunto l'ascidia *Styela plicata*.

¹⁷ Vengatesen Thiagarajan et al., 2003

L'acquisizione dei dati è avvenuta quindi attraverso l'analisi di alcuni campioni raccolti ed attraverso l'elaborazione grafica delle foto subacquee. In particolare, in ottobre sono stati fotografati 21 individui di *Styela plicata* presenti in una delle quattro pareti verticali e sono stati raccolti 10 individui dei 21 presenti, sui quali sono state eseguite misure di superficie di copertura, volume, peso umido, peso secco e peso secco meno ceneri.

In conclusione si è determinata una densità di 5,25 individui/m² ed è stata stimata una biomassa media di 12,09 g (peso umido)/m², ovvero 1,05 g (peso secco)/m², ovvero 472,5 mg (peso secco meno ceneri)/m², tenendo conto sia dei valori ricavati dagli individui raccolti e analizzati in laboratorio, sia di quelli calcolati con le equazioni delle rette di correlazione partendo dalle superfici ricavate dalle fotografie. Le equazioni ricavate tra peso umido, peso secco e peso secco meno ceneri sugli individui di *S. plicata* sono in buon accordo con quelle ricavate per esemplari della stessa specie raccolti in alcune Tegnùe nord adriatiche ed i valori di biomassa ricavati rappresentano probabilmente una fase di colonizzazione iniziale del substrato da parte di questa specie¹⁸.

1.2.2 Studi tossicologici riguardanti l'ascidia *Styela plicata*

Tra i vari inquinamenti causati dall'uomo all'ambiente marino vi è quello derivante dall'uso delle vernici antivegetative costituite da composti organici dello stagno. Per chiarire il meccanismo d'interazione fra i composti organici dello stagno e gli organismi, sono stati studiati gli effetti di questi composti sullo sviluppo della *Styela plicata*. I suoi embrioni sono stati ottenuti in laboratorio attraverso la fertilizzazione incrociata ed il loro sviluppo è stato seguito in vivo dopo l'incubazione con 0,1, 1 e 10 µM di composti organo-stannici con vari tempi d'esposizione. Inoltre, gli embrioni selezionati in fasi opportune dopo l'incubazione con 10 µM di tributilstagno (TBT) o trifenilstagno (TPT) per 1 ora, sono stati osservati al microscopio elettronico al fine di riconoscere le alterazioni delle cellule. I risultati indicano che i composti organo-stannici influenzano significativamente tutte le fasi dello sviluppo delle ascidie. Questi composti possono bloccare lo sviluppo, dando origine ad embrioni anomali con effetti irreversibili. L'ordine d'inibizione sembra essere fortemente dipendente dalla liposolubilità del composto: TBT > dibutilstagno (DBT) > monobutilstagno (MBT) e TPT > tricicloesilstagno (TCHT). Il blocco della mitosi dei blastomeri nelle fasi iniziali può essere collegato con un'inibizione della polimerizzazione del microtubulo. Le osservazioni con la luce ed i microscopi elettronici rivelano danni tossici con l'alterazione del citoscheletro.

¹⁸ Moli n et al., 2006 (in stampa)

In conclusione questo studio ha permesso di:

- identificare gli stadi embrionali più sensibili ai composti dello stagno;
- individuare come meccanismo fondamentale dell'azione tossica sullo sviluppo dell'embrione, il loro caratteristico accumulo nelle membrane dei mitocondri associato con l'inibizione della fosforilazione ossidativa;
- spiegare come, sia il blocco sia le malformazioni degli stadi embrionali conseguono dall'interazione dei composti dello stagno con le proteine del citoscheletro¹⁹.

Vi è un'altra ricerca che studia gli effetti di TBT e di altri metalli sull'attività della fenolossidasi della *Styela plicata*, nello sforzo di identificare un indicatore biochimico d'inquinamento da metalli. Emociti di *Styela plicata* esposti al tributilstagno, o rame, in acquario aumentano significativamente l'attività della fenolossidasi rispetto a quelli non esposti. Questo aumento dell'attività della fenolossidasi potrebbe essere spiegato da un aumento della frequenza delle cellule di morula, che contengono elevati livelli del proenzima della fenolossidasi, la profenolossidasi. A differenza dei tunicati esposti ai metalli in acquario, l'attività della fenolossidasi degli emociti incubati con il tributilstagno in vitro era ridotta significativamente rispetto a quella degli emociti allevati senza tributilstagno.

La capacità del tributilstagno di far diminuire l'attività della fenolossidasi nella coltura del tessuto, può riflettere gli ormai noti effetti inibitori sui sistemi di calcio-dipendenti, segnalando sistemi come quelli coinvolti nell'esocitosi della profenolossidasi dalle cellule di morula.

Questo studio ha dimostrato che il TBT ed il rame possono influenzare l'attività della fenolossidasi degli emociti della *S. plicata*. Essendo spesso la fenolossidasi implicata nella difesa immunitaria degli invertebrati, gli effetti del TBT e del rame potrebbero avere effetti diretti sulla resistenza alle malattie. La capacità di rilevare le alterazioni significative nell'attività di fenolossidasi fra i tunicati contaminati dal metallo, suggerisce inoltre che le analisi di fenolossidasi potrebbero fornire prove economiche e veloci dell'inquinamento ambientale²⁰.

Dalla consultazione del sito internet www.pesticideinfo.org del Pesticide Action Network (Nord America - S. Francisco, 2006), che ha attivato un database sui pesticidi, sono emersi infine altri dati relativi alla tossicità di alcuni composti per l'ascidia *Styela plicata*, tratti dallo studio di letteratura scientifica primaria su organismi acquatici.

¹⁹ F. Cima et al, 1996

²⁰ Niina Tujula et al., 2001

Nella tabella 1.2 sono stati riassunti questi dati ed in particolare nella colonna “Effetto” si riportano i diversi effetti osservati per l’azione tossica di un particolare inquinante sull’organismo, in quella “Misura” i parametri usati per determinare il limite degli effetti di un particolare inquinante, nelle colonne “Dose tossica” i valori di LC_{50} : quest’ultima è comunemente definita come la concentrazione letale per il 50% degli organismi presenti durante l’esperimento. Nella colonna “Tipo di concentrazione” si riporta se il prodotto testato era puro (P) o si trattava di un miscuglio commerciale (F). Nella colonna “Sigla chimica” si riporta l’acronimo con cui spesso s’identifica commercialmente quel composto, nella colonna “Tipo di esperimento”, invece, il metodo con cui è stato condotto l’esperimento (per “statico” s’intende l’esperimento in cui l’inquinante viene posto all’inizio senza ulteriori aggiunte durante il tempo di studio, per “flusso continuo” s’intende che l’inquinante viene mantenuto in concentrazioni elevate durante tutta la durata dell’esperimento), infine per “NR” s’intende “non riportato”²¹

²¹ Orme e Kegley, 2006

| Composto | Effetto | Misura | Stadio Vitale | Tempo di studio | Punto finale di tossicità | Dose tossica | | | Unità di concentraz | Tipo di concentraz. | Sigla chimica | Tipo di esperimento | Anno | Rivista |
|--|-----------|----------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------|--------------|------|-------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|------|--|
| | | | | | | Media | Min. | Max | | | | | | |
| Monobutil Stagno Tricloruro | Sviluppo | Variaz. sviluppo, generale | Embrione | 12 h | NR | - | - | - | µg/L | P | NR | Statico | 1996 | Fresenius Environ.Bull. 5(11/12):718-722 |
| | Mortalità | Mortalità | Dopo fertilizz. di 2-4 cellule | 10 min | NR | - | - | - | µg/L | P | MBTC | Statico | 1996 | Ecotoxicol. Environ. Saf. 35(2):174-182 |
| Cloruro di tri(cicloesil)stagno | Sviluppo | Variaz. sviluppo, generale | Embrione | 12 h | NR | - | - | - | µg/L | P | NR | Statico | 1996 | Fresenius Environ. Bull. 5(11/12):718-722 |
| Idrossido di tri(cicloesil)stagno | Mortalità | Mortalità | Dopo fertilizz. di 2-4 cellule | 10 min | NR | - | - | - | µg/L | P | TCHTC | Statico | 1996 | Ecotoxicol. Environ. Saf. 35(2):174-182 |
| DDT | Accumulo | Accumulo generale | NR | 10 gg | NR | - | 10.0 | 100.0 | µg/L | F | NR | Flusso continuo | 1964 | In: Pesticide-Wildlife Studies, 1963.U.S.D.I Fish and Wildl.Serv.Circular 199: 28 p. (Author Communication Used) |
| Dibutilstagno cloruro | Sviluppo | Variaz. sviluppo, generale | Embrione | 12 h | NR | - | 30.4 | 3,038 | µg/L | P | NR | Statico | 1996 | Fresenius Environ.Bull. 5(11/12):718-722 |
| | Mortalità | Mortalità | Dopo fertilizz. di 2-4 cellule | 10 min | NR | - | 30.4 | 3,038 | µg/L | P | DBTC | Statico | 1996 | Ecotoxicol.Environ.Saf. 35(2):174-182 |

Tabella 1.2 – Studi tossicologici sulla *Styela plicata* tratti dal sito www.pesticideinfo.org

| Composto | Effetto | Misura | Stadio Vitale | Tempo di studio | Punto finale di tossicità | Dose tossica | | | Unità di concentraz. | Tipo di concentraz. | Descrizione chimica | Tipo di esperimento | Anno | Rivista |
|------------------------------------|-----------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------|--------------|------|-------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------|---|
| | | | | | | Media | Min. | Max | | | | | | |
| Idrossido di trifenilstagno | Sviluppo | Variatione sviluppo, generale | Embrione | 12 h | NR | - | 36.7 | 3,670 | µg/L | P | NR | Statico | 1996 | Fresenius Environ. Bull. 5(11/12):718-722 |
| | Mortalità | Mortalità | Dopo fertilizz. di 2-4 cellule | 10 min | NR | - | 36.7 | 3,670 | µg/L | P | TPTH | Statico | 1996 | Ecotoxicol. Environ. Saf. 35(2):174-182 |
| Tributilstagno cloruro | Cellule | Cambiamenti cellulari | Primi stadi embrionali | 1 h | NR | 3,255 | - | - | µg/L | P | TBTC | Statico | 1996 | Ecotoxicol. Environ. Saf. 35(2):174-182 |
| | Sviluppo | Variatione sviluppo, generale | Embrione | 12 h | NR | - | 32.5 | 3,255 | µg/L | P | NR | Statico | 1996 | Fresenius Environ. Bull. 5(11/12):718-722 |
| | Mortalità | Mortalità | Dopo fertilizz. di 2-4 cellule | 10 min | NR | - | 32.5 | 3,255 | µg/L | P | TBTC | Statico | 1996 | Ecotoxicol. Environ. Saf. 35(2):174-182 |
| Trifenilstagno acetato | Sviluppo | Variatione sviluppo, generale | Embrione | 12 h | NR | - | 40.9 | 4,091 | µg/L | P | NR | Statico | 1996 | Fresenius Environ. Bull. 5(11/12):718-722 |
| | Mortalità | Mortalità | Dopo fertilizz. di 2-4 cellule | 10 min | NR | - | 40.9 | 4,091 | µg/L | P | TPTA | Statico | 1996 | Ecotoxicol. Environ. Saf. 35(2):174-182 |

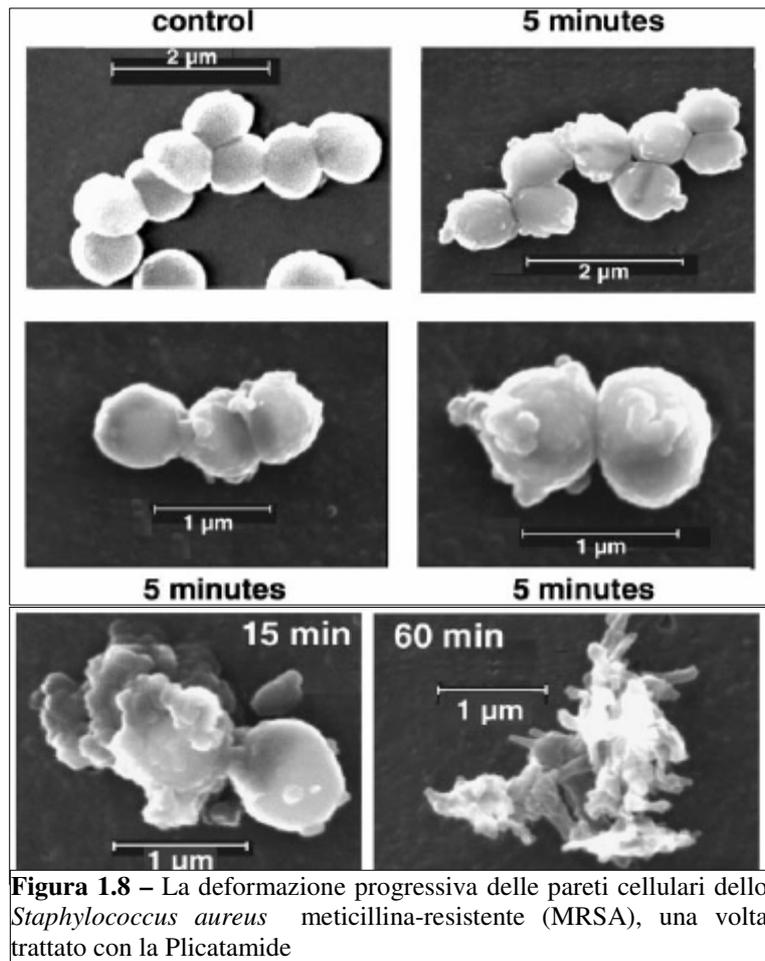
Tabella 1.2 (continua) – Studi tossicologici sulla *Styela plicata* tratti dal sito www.pesticideinfo.org

| Composto | Effetto | Misura | Stadio Vitale | Tempo di studio | Punto finale di tossicità | Dose tossica | | | Unità di concentraz. | Tipo di concentraz. | Descrizione chimica | Tipo di esperimento | Anno | Rivista |
|------------------------|-----------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------|--------------|------|-------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------|--|
| | | | | | | Media | Min. | Max | | | | | | |
| Trifenilstagno cloruro | Cellule | Cambiamenti cellulari | Primi stadi embrionali | 1 h | NR | 3,855 | - | - | µg/L | P | TPTC | Statico | 1996 | Ecotoxicol.Environ.Saf. 35(2):174-182 |
| | Sviluppo | Variatione sviluppo, generale | Embrione | 12 h | NR | - | 38.5 | 3,855 | µg/L | P | NR | Statico | 1996 | Fresenius Environ.Bull. 5(11/12):718-722 |
| | Mortalità | Mortalità | Dopo fertilizz. di 2-4 cellule | 10 min | NR | - | 38,5 | 3,855 | µg/L | P | TPTC | Statico | 1996 | Ecotoxicol.Environ.Saf. 35(2):174-182 |

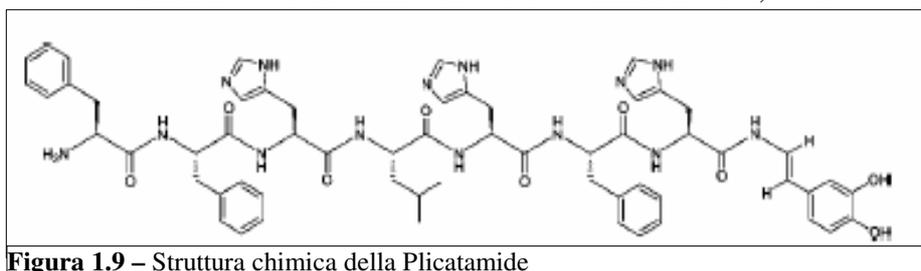
Tabella 1.2 (continua) – Studi tossicologici sulla *Styela plicata* tratti dal sito www.pesticideinfo.org

1.2.3 Studi farmacologici riguardanti l'ascidia *Styela plicata*

La Plicatamide è un potente antimicrobico octapeptidico estratto dalle cellule del sangue del tunicato *Styela plicata*. Lo *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente (MRSA) ha risposto all'esposizione di Plicatamide con una massiccia perdita di potassio e di citoplasma intracellulare cominciato nel giro di pochi minuti. Ben presto i batteri trattati hanno in gran parte cessato di consumare ossigeno e la maggior parte di essi sono diventati non vitali. Gli *Staphylococcus aureus*



meticillina resistenti trattati con la Plicatamide per 5 minuti contenevano mesosomi prominenti, come pure numerose piccole protrusioni superficiali a cupola, che hanno lasciato ipotizzare la partecipazione di forze osmotiche nei relativi effetti antimicrobici. Per accertare il contributo del residuo C-terminale del DOPA all'attività antimicrobica, sono stati sintetizzati parecchi analoghi della Plicatamide che ne difettavano. Uno di questi peptidi, il PL-



101 (Phe-Phe-His-Leu-His-Phe-His-Tyr-ammide), è estremamente simile alla Plicatamide nativa nella sua attività antimicrobica e nella relativa capacità di indurre l'efflusso di potassio. Plicatamide è un potente emolitico per i globuli rossi umani, ma non agisce sugli eritrociti ovini. Le ridotte dimensioni, l'azione veloce e la potente attività anti-stafilococcica della

Plicatamide e di PL-101 li rendono particolarmente interessanti per la progettazione futura di peptidi antimicrobici²².

L'eparina è un prodotto intracellulare dei vertebrati attualmente usato come anticoagulante esogeno. A differenza delle potenti attività farmacologiche dell'eparina esogena, le relative funzioni fisiologiche non sono state ancora chiaramente comprese. Un'eparina con struttura chimica simile e proprietà anticoagulanti 10 volte superiori²³ per le controparti mammifere è stata ritrovata nelle cellule che circondano l'uovo dell'invertebrato *Styela plicata*. Così come avviene per le cellule dei mammiferi, anche l'eparina delle cellule di ascidia è stata rimossa dai granuli intracellulari dopo un incubazione con il composto 48/80. In seguito alla fertilizzazione, le cellule campione che circondano la larva in fase di sviluppo, trattengono l'eparina. Nell'invertebrato adulto, l'eparina è presente in granuli intracellulari alla punta apicale delle cellule epiteliali che circondano sia l'intestino sia la faringe, organi in stretto contatto con l'ambiente esterno. Si tratta della prima descrizione della presenza d'eparina nei granuli citoplasmatici delle cellule epiteliali intorno ad organi esposti agli agenti esterni. Tale dislocamento lascia presupporre la partecipazione dell'eparina nei meccanismi di difesa di questo invertebrato²⁴.

Degni di nota sono anche i recentissimi studi che vedono un estratto di *Styela plicata*, mostrare una spiccata efficacia antivirale nel trattamento dell'epatite cronica B. Per arrivare a tale conclusione sono stati compiuti degli esperimenti con dei ratti HBV-transgenici, i quali sono stati divisi in 3 gruppi: uno alimentato per settimane con una dieta normale, uno con lamivudine (un nucleoside che agisce da potente inibitore della trascrittasi inversa, usato sia nel trattamento dell'epatite B cronica, che in quello dell'HIV) e l'ultimo con l'estratto efficace di *Styela plicata*. Il siero dell'antigene di superficie dell'epatite B è stato rilevato col metodo di analisi ELISA ed il DNA del siero HBV è stato rilevato in tempo reale col metodo di analisi RT-PCR. Un altro gruppo di topi HBV-transgenici ha ricevuto una dieta a base dell'ingrediente efficace di *Styela plicata* per le settimane successive. L'istologia del tessuto del fegato dei ratti è stata quindi valutata prima e dopo il trattamento.

Dodici settimane dopo avere iniziato la terapia, il siero dell'antigene di superficie dell'epatite B si era notevolmente abbassato nei ratti trattati con *Styela plicata* ed in quelli trattati con lamivudine, rispetto a quelli trattati con la dieta normale. Il DNA del siero HBV si è anch'esso notevolmente abbassato nei ratti trattati con *Styela plicata* e lamivudine rispetto a

²² Tincu et al., 2003

²³ Pavao et al., 1998

²⁴ Cavalcante et al., 2000

quelli con la dieta normale. Tuttavia, esattamente come il lamivudine, anche l'ingrediente efficace di *Styela plicata* non ha potuto inibire completamente la replica dell'HBV²⁵.

1.3 Cenni sui tensioattivi

I saponi ed i detergenti sono costituiti da molecole che possiedono un gruppo idrocarburico, che rappresenta la parte idrofoba ed uno o più gruppi polari che rappresentano invece la parte idrofila. La parte non polare di queste molecole si scioglie nei grassi e negli oli, mentre la parte polare è solubile in acqua. Le proprietà detergenti dei saponi e dei detersivi sintetici dipendono dalla loro abilità a formare emulsioni con i materiali solubili nei grassi, emulsioni in cui le molecole di sapone o detersivo racchiudono lo “sporco” in un involucro solubile in acqua.

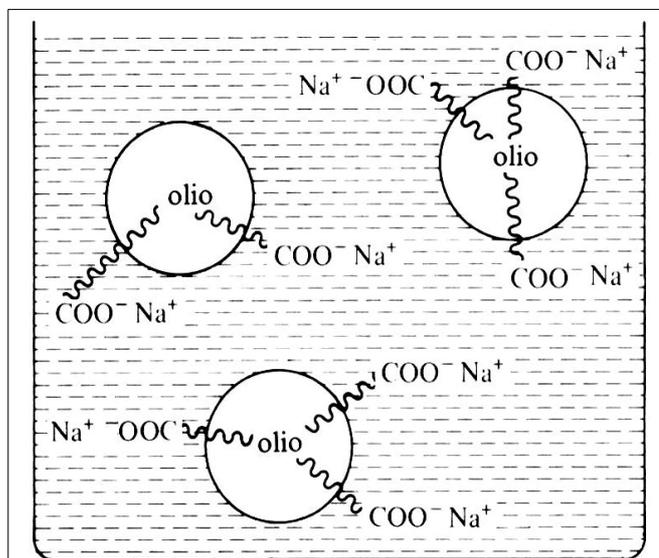


figura 1.8 – emulsione dell’olio nell’acqua per mezzo del sapone. Le catene non polari idrocarboniche si sciolgono nell’olio, mentre i gruppi ionici polari si sciolgono nell’acqua. Le micelle così formate, cariche negativamente si respingono tra di loro

I saponi sono prodotti per saponificazione dei grassi e degli oli (qualunque reazione di un estere con una base per rigenerare l'alcol e il sale è chiamata reazione di saponificazione). I saponi, che sono miscele dei sali sodici e potassici degli acidi grassi con catene di atomi di carbonio superiore a 12, non sono efficienti come agenti detergenti in acqua dura (acqua contenente elevate concentrazioni di sali di metalli come calcio e magnesio). I saponi, infatti, vengono precipitati nell'acqua dura, come sali insolubili di ferro, calcio e magnesio²⁶.

I detersivi sintetici sono sostanze presenti nelle polveri e liquidi detersivi commerciali, in percentuali variabili fra il 10 e il 30%; questi prodotti sono associati ai fosfati (presenti fino a qualche tempo fa in percentuali pari anche al 50%), che hanno la proprietà di coadiuvare l'azione dei detersivi, portando in sospensione la sporcizia e sequestrando la durezza dell'acqua. I fosfati di calcio e di magnesio, infatti, sono insolubili in acqua e la loro precipitazione minimizza quella del tensioattivo.

²⁵ Rui Wang et al., 2006

²⁶ Allinger et al. - Chimica Organica II ed. – Zanichelli, 1981

Con il termine “detersivi” s’intende tutto il complesso di sostanze che costituiscono i prodotti commerciali, e con il termine di “tensioattivi” solo i componenti di effettivo potere detergente. Tali componenti sono chiamati tensioattivi, in quanto abbassano la tensione superficiale del solvente acqua.

I più noti sono gli anionici, che traggono la loro denominazione dal fatto che in acqua subiscono dissociazione ionica, scindendosi in cationi metallici, quali Na^+ o anche K^+ , ed in una parte anionica solfonata, che rappresenta il tensioattivo. I detersivi anionici sono i più frequentemente utilizzati a scopo domestico. Essi sono chiamati anche ABS (Alkyl Benzene Sulfonate), e possono essere di tipo ramificato (poco biodegradabile) e di tipo lineare (più facilmente biodegradabili), nel qual caso si definiscono LAS (Linear Alkylbenzene Sulfonate). Una discreta gamma di composti sintetici LAS, di cui l’1-(*p*-sulfofenil)nonano è uno dei rappresentanti maggiormente solubili in acqua di mare, ora è il costituente più abbondante nei detersivi domestici o industriali, e rappresenta circa il 30% degli agenti tensioattivi sintetici usati in tutto il mondo. Questi composti ampiamente usati si riversano così in gran quantità negli ambienti acquatici ed hanno effetti negativi sulla vita animale. Negli invertebrati, gli effetti sono generalmente rilevabili fin dalla fase larvale, a partire da livelli d’inquinante di circa 1 mg/l. La tossicità dei detersivi può essere ridotta seguendo la trasformazione della molecola originale²⁷. La biodegradazione primaria o funzionale, infatti, consiste in un’alterazione della struttura del composto da parte di microrganismi (quasi sempre batteri) che sono generalmente sufficienti per inibire le proprietà tossiche caratteristiche dei detersivi. La letteratura sulla biodegradabilità detersiva ed in particolare quella dei LAS, rivela un certo numero di punti deboli. Le circostanze sperimentali usate nelle prove di biodegradazione di questi composti sono raramente simili a quelle osservate nelle circostanze naturali. La maggior parte di questi studi si focalizzano sulle capacità metaboliche sia di batteri specifici, sia di batteri che si sono adattati a metabolizzare le sostanze inquinanti organiche. Escluso un esperimento²⁸ che ha misurato la gamma completa dei prodotti di biodegradazione dei LAS in acque di fiume, pochissimi altri sono i dati disponibili sulla degradazione dei LAS nell’ambiente marino²⁹.

Recentemente, grazie a degli studi sperimentali, finalizzati allo sviluppo delle tecniche analitiche per i LAS e per i suoi metaboliti di biodegradazione, si è acclarato che i processi

²⁷ Divo & Cardini, 1980

²⁸ Di Corcia ed altri. 1999

²⁹ Amano ed altri., 1992

responsabili della loro degradazione nell'ambiente marino avvengono solo dopo un intervallo di tempo ragionevolmente lungo³⁰

I detersivi cationici sono i più utilizzati in campo industriale, e sono noti per le loro proprietà battericide ed ammorbidenti dei tessuti; in acqua si dissociano in una parte cationica, che è quella attiva, e in una parte anionica (ad es. Br⁻, Cl⁻, SO₄⁻). Infine, si ricordano i detersivi non ionici, che non si dissociano in acqua.

I detergenti sintetici hanno soppiantato negli Stati Uniti i saponi in un rapporto pari a circa 7:1. In pratica, l'unico impiego del sapone si effettua per la produzione di saponette da toilette. La produzione di saponi e detergenti tocca annualmente negli Stati Uniti la quota di circa 3,2 milioni di tonnellate. Gli alchilbenzeni sono i composti di partenza utilizzati dall'industria per la produzione dei detergenti sintetici. Il dodecilbenzene è solfonato e neutralizzato per formare gli alchilsolfonati lineari (LAS).

Il solfato di laurile è anch'esso un composto importante, ma i solfati sono venduti in una quantità che è circa un quinto rispetto ai prodotti LAS.

I detersivi generano appariscenti fenomeni d'inquinamento delle acque, data la formazione di schiume che essi determinano; tuttavia, non sono particolarmente tossici e nocivi per l'uomo.

Essi sono all'origine di parecchi inconvenienti nei trattamenti di depurazione delle acque:

- hanno un'azione disperdente sulle sostanze colloidali, rendendone più difficile la coagulazione;
- emulsionano oli e grassi e ne rendono più difficile la rimozione;
- sono responsabili della diminuzione della capacità di ossigenazione dei dispositivi di aerazione negli impianti di depurazione;
- sono di norma responsabili della formazione di schiume negli impianti stessi.

Le schiume sono formate dai detersivi anche sulla superficie dei corsi d'acqua naturali, su cui producono per giunta una pellicola, che impedisce il regolare scambio d'ossigeno con l'atmosfera, che assume notevole importanza nei processi di autodepurazione.

E' interessante notare inoltre che molti detersivi di grand'efficacia non fanno schiuma in acqua e numerosi esperimenti hanno indicato che la formazione di schiuma ha ben poco a che vedere con l'effettiva capacità di detergere. I consumatori, tuttavia, continuano ad associare questi due concetti e per questo gli industriali continuano ad aggiungere ai detersivi prodotti schiumogeni.

³⁰ Perez et al., 2002

Le legislazioni di tutti gli Stati tendono sempre più ad imporre l'impiego di detersivi biodegradabili che possono essere eliminati negli impianti di depurazione biologica, e per autodepurazione nei corsi d'acqua naturali. Si tende inoltre ad imporre l'utilizzazione di detersivi poveri o privi di fosfati, per limitare i fenomeni di eutrofizzazione conseguenti all'immissione di fosforo negli ecosistemi. Insieme all'azoto, infatti, il fosforo induce una smisurata proliferazione delle alghe che, terminato il loro ciclo vitale, muoiono e si depositano sul fondo. Avviene, quindi, una sedimentazione di enormi masse di sostanza organica costituita dalle spoglie delle microalghe che, decomponendosi, sottraggono ossigeno alle acque di fondo.

Le sostanze organiche in grado di essere utilizzate e quindi trasformate normalmente dai microrganismi in sostanze più semplici sono dette biodegradabili. Non biodegradabili (o refrattarie) sono invece quelle sostanze organiche che non sono trasformate, in pratica dopo tempi di 30-60 giorni (in condizioni aerobiche). Certe sostanze che, secondo questa definizione convenzionale sarebbero (in condizioni aerobiche) “non biodegradabili” in realtà sono da considerare lentamente biodegradabili, cioè sono suscettibili pure esse di degradazione biologica, ma in tempi molto lunghi e non utili agli effetti dei tempi di permanenza adottati nei normali impianti di depurazione biologica: tipiche sono certe sostanze, quali il caprolattame, il clorobenzene che esigono tempi di degradazione da 3 mesi a 2 anni, con batteri specificatamente acclimatati. Lo stesso dicasi anche per certi detersivi cosiddetti “non biodegradabili”, che in realtà, permanendo a lungo nel terreno, subendo pure essi una lenta ma costante degradazione biologica. Vere e proprie sostanze organiche “refrattarie” sono considerate quelle con tempi di degradazione biologica superiori ai due anni³¹.

Degno di nota è lo studio in cui sono state determinate e confrontate le tossicità acute e croniche di tre tensioattivi sintetici e di tre tensioattivi prodotti microbiologicamente per l'invertebrato d'estuario *Mysidopsis bahia* e sul pesce d'estuario *Menidia beryllina*. Le tossicità ambientali relative degli agenti tensioattivi sintetici e biogenici usati nella biorimediazione degli sversamenti di olio non sono ancora ben comprese. Le tossicità dei tensioattivi sono state determinate in laboratori statici standard ed in laboratori con prove della durata di 4-7 giorni. I risultati sono specifici per i tensioattivi, i parametri di risposta e per le specie provate. I valori di LC₅₀ (concentrazioni nominali) per *Mysidopsis bahia* variano da 3.3 mg/l (Triton X-100) ad oltre 1000 mg/l (PES-61) e da 2.5 mg/l (Triton X-100) a 413.6

³¹ Masotti L. - Depurazione delle acque - ed. Calderoni, 1999

mg/l (PES-61) per *Menidia beryllina*. Le concentrazioni da primi effetti cronici, basate sulle riduzioni dello sviluppo e della fecondità, per i sei tensioattivi variano da 2.3 a 465.0 mg/l per *M. beryllina* e da 1.0 mg/l a più di 1000.0 mg/l per *M. bahia*. Purtroppo possono essere fatte poche generalizzazioni, essendo i risultati piuttosto variabili, ma il *M. bahia* era generalmente la specie più sensibile e le tossicità dei bio-tensioattivi erano intermedie rispetto a quelle dei tensioattivi sintetici³².

Degli studi molto recenti, infine, hanno dimostrato, per la prima volta, che le spugne sono dotate di una notevole capacità di degradare i tensioattivi. Lo studio sperimentale, condotto in acquario con acqua di mare arricchita con l'alchilbenzenesulfonato lineare (LAS) 1-(*p*-sulfofenil)nonano, ha dimostrato che, in presenza della *Spongia officinalis*, la trasformazione di questo composto nei principali metaboliti di degradazione, acido 3-(*p*-sulfofenilpropionico) ed acido para-sulfobenzoico, avviene 10 volte più velocemente piuttosto che in presenza dei soli batteri marini³⁰ (Perez et al., 2002).

1.3.1 Influenza dei tensioattivi sulla biodegradazione di alcuni inquinanti

Un'altra interessante proprietà esibita dai tensioattivi, di cui si è accennato alla fine del paragrafo 1.0, è quella di accelerare e coadiuvare la biodegradazione di molti inquinanti. Lo sfruttamento di tale proprietà è attualmente oggetto di discussione proprio nel campo della biorimediazione. Sono stati tuttavia documentati anche dei casi d'inibizione della degradazione di alcuni inquinanti ed in alcuni interventi tesi alla bonifica di terreni, o di acque contaminate dallo sversamento di greggio, l'utilizzo di tensioattivi sintetici, ampiamente diffuso nei prodotti per questi specifici interventi, ha suscitato non poche critiche.

E' senza dubbio un fenomeno naturale la produzione microbica di bio-tensioattivi, tra cui i fosfolipidi ed i glicolipidi, la cui qualità e quantità dipende, tra l'altro, dalla natura del substrato. Per esempio i bio-tensioattivi sono prodotti dai microrganismi su substrati scarsamente idrosolubili. L'aumento della biodegradazione degli Idrocarburi Organici Alogenati, per esempio, viene ascritta ad una solubilizzazione mediata dai tensioattivi, o ad un'emulsificazione degli inquinanti cristallizzati, o comunque presenti in fasi separate. Va ricordato, inoltre, che i tensioattivi non aumentano la concentrazione acquosa di un composto, ma formano la cosiddetta pseudo-fase micellare con la fase acquosa, che accumula gli inquinanti e ne facilita il trasporto, diminuendo la distanza dal microrganismo attivo. E' stato dimostrato che l'effetto generale dei tensioattivi sulla biodegradazione è spesso la netta

³² Katherine R. et al., 2003

influenza dell'aumento di solubilità nella pseudo-fase micellare e della contestuale riduzione della capacità di adsorbimento del substrato da parte delle micelle stesse. I batteri possono non avere un accesso diretto ai composti nelle micelle, da cui risulta un limitato trasferimento di massa degli Idrocarburi Organici Alogenati dalla fase micellare e quindi una limitata biodegradazione degli stessi.

I tensioattivi possono anche avere un effetto sul trasporto dei batteri e dei batteriofagi nei mezzi porosi e nei terreni sabbiosi, probabilmente interessando l'adsorbimento irreversibile delle cellule sulle superfici del substrato. Per esempio l'aggiunta di un ramnolipide, un bio-tensioattivo, in concentrazioni pari a 5-20 volte la sua concentrazione critica di micella (CMC), aumenta il trasporto idrofobico ed idrofilico delle cellule di *Pseudomonas aeruginosa* attraverso i terreni sabbiosi. A concentrazioni inferiori alla CMC quest'effetto è di poco conto⁴ (Mahro et al. - cap. 13, Wick et al. – cap. 15 - Treatment of Contaminated Soil, 2001).

Capitolo 2.

**Descrizione dell'istallazione
sperimentale e delle attività
necessarie allo svolgimento
della ricerca**

2.1 Allestimento del laboratorio per gli esperimenti in acquario

Per allevare e sottoporre gli organismi marini alle fasi sperimentali è stato allestito un laboratorio presso la Facoltà di Ingegneria della Seconda Università di Napoli ad Aversa (CE).

Nel suddetto laboratorio sono stati installati:

- due scaffali, ciascuno munito di due ripiani, delle dimensioni di: 300 x 45 x 80(h) cm e 120 x 70 x 150(h) cm;
- un depuratore ad osmosi inversa (mod. Ruwal Aqua Pro 80 shop da 275 litri al giorno con membrana da 75 galloni), per produrre acqua di mare artificiale;
- una vasca in vetro (sullo scaffale 300 x 45 x 80(h) cm) dal volume di circa 250 lt. per poter ospitare gli organismi bentonici da sottoporre alla sperimentazione;
- quattro vasche in vetro dal volume di oltre 30 lt. in cui condurre le sperimentazioni
- un set di becker del volume di 1, 3 e 5 lt. e matracci di precisione da 1 lt.;
- un climatizzatore corredato da una pompa della portata di 700 lt/h per il controllo della temperatura all'interno di una vasca (18 – 25) °C;
- una sonda multiparametrica YSI 85 della YSI Environmental per il controllo della temperatura, della salinità e dell'ossigeno disciolto;
- un aeratore ad 8 uscite

La vasca da 250 lt. è stata inoltre fornita di:

- un filtro sotto sabbia per garantire all'acquario un buon grado di autodepurazione;
- due neon da 36 watt di luce attinica per simulare le condizioni di luce tre metri al di sotto della superficie e del fondale. I neon sono serviti da un timer per garantire un equilibrato irraggiamento della vasca;
- una pompa della portata di 320 lt/h per garantire agitazione in acquario;
- due delle 8 uscite dell'aeratore per garantire un'adeguata concentrazione di ossigeno disciolto alle specie ospitate in acquario.

2.2 Approvvigionamento delle specie da sottoporre alla sperimentazione

Dopo aver atteso una stabilizzazione delle condizioni chimico fisiche dell'acquario e dopo opportuni sopralluoghi, sono state compiute delle immersioni e delle campagne di approvvigionamento per la specie *Styela plicata*, prelevata a 2 m di profondità nel porto turistico di piazza della Concordia a Salerno ed identificata come tale dalla dott. P. Cirino della sezione allevamento della Stazione Zoologica Anton Dorn di Napoli;

Le ascidie sono state introdotte in un contenitore isotermico e durante il trasporto alla facoltà di Ingegneria di Aversa (CE), è stato fornito loro ossigeno con un compressore alimentato da una tensione a 12 volt. Una volta arrivati a destinazione, gli organismi sono stati introdotti nella vasca predisposta.

2.3 Allevamento in cattività delle specie approvvigionate

Le ascidie sono state allevate ad una temperatura di $18,0 \pm 0,5$ °C, una salinità di $\sim 36,0 \div 37,0$ ppt ed una concentrazione d’ossigeno pari a $\sim 5,0 \pm 0,5$ mg/l.

Per la loro alimentazione si è provveduto con fiale di cibo liofilizzato per invertebrati marini conservate in atmosfera di azoto.

2.4 Sintesi dell’inquinante

Non essendo commercialmente disponibile, l’1-(*p*-sulfofenil)nonano (che di seguito verrà in alcuni casi abbreviato con la sigla 1C9-LAS) è stato sintetizzato mediante solfonazione dell’1-fenilnonano, secondo generiche linee procedurali³³

Segue la descrizione delle operazioni effettuate in occasione della prima sintesi del prodotto. Le successive sono state eseguite utilizzando le stesse condizioni e quantità proporzionali di reagenti e di solventi.

In un pallone da 50 ml sono stati introdotti 5 ml di fenilnonano, 9 ml di H₂SO₄ (98%) ed un agitatore magnetico. Il pallone è stato poi introdotto in un bagno termostato ad una temperatura di 85,7 °C. La reazione è durata complessivamente 3 ore e 20 minuti. Si è quindi introdotto dall’alto del refrigeratore a tubo, innestato sul collo del pallone di reazione, 20 ml di una soluzione composta di 20 ml di HCl (37%) e circa 100 ml d’acqua parzialmente ghiacciata. Si è quindi lasciato il tutto in agitazione per qualche minuto ancora.

Sulla miscela di reazione sono state compiute 3 estrazioni da 50 ml con etere dietilico. Alla frazione eterea sono state aggiunte due spatolate di sodio solfato anidro e poi si è filtrato su buckner di porcellana. Sono stati aggiunti quindi circa 25 ml di NaOH al 10% e si è assistito alla precipitazione di una sostanza oleosa semisolida.

Si è posto quindi la miscela in un imbuto separatore da 500 ml e vi si sono addizionati 75 ml di n-pentano, 75 ml di isopropanolo e 50 ml d’acqua distillata. Si è provveduto alla separazione della fase più densa, che constava di 50 ml di liquido quasi trasparente (giallo paglierino). La fase meno densa constava di circa 250 ml di un liquido opaco giallino, il quale

³³ Doe et al., 1977

è stato portato a secco in rotavapor con un pallone da 500 ml. Dopo aver ripreso il residuo con etere, si è trasferito il tutto in una vial da 25 ml. Si è lasciato quindi evaporare la vial in un bagno termostato a 50 °C e poi è stata introdotta nel forno a 50 °C per 12 ore. Il solido bianco così ottenuto pesava 5,7 g.

Considerando che la densità dell'1-fenilnonano è 0,858 g/ml a 25 °C, ed il suo PM= 204,35 (il bp=282), n'è stato calcolato il peso in grammi (4,29 g), e quindi le moli di reagente utilizzate (0,02099 mol). Considerando poi che il PM dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano di sodio è 306,33 Dalton, ne sono state calcolate le moli ottenute (0,01861 mol) e quindi la resa della reazione (88%).

Il composto così ottenuto, è un sale sodico dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano, di seguito abbreviato con Na⁺ 1C9-LAS⁻, ed è stato riconosciuto con esattezza dagli spettri ¹H NMR e ¹³C NMR riportati rispettivamente in figura 2.1 e 2.2.

Lo spettro ¹H NMR evidenzia nettamente il pattern arilico di para-sostituzione, escludendo quasi totalmente la presenza di composto orto-sostituito. Si nota, infatti, tra δ 7.72 e δ 7.23 un doppio doppietto, e non un multipletto, a conferma di un'equivalenza tra i protoni arilici vicino al gruppo solforico, e a quella tra i protoni arilici vicini al gruppo alchilico, e quindi di un'inequivocabile simmetria della molecola, possibile solo in caso di para-sostituzione.

Gli spettri sono stati eseguiti in metanolo deuterato con uno spettrometro Bruker DRX 400 (¹H NMR 400 MHz; ¹³C NMR 100 MHz).

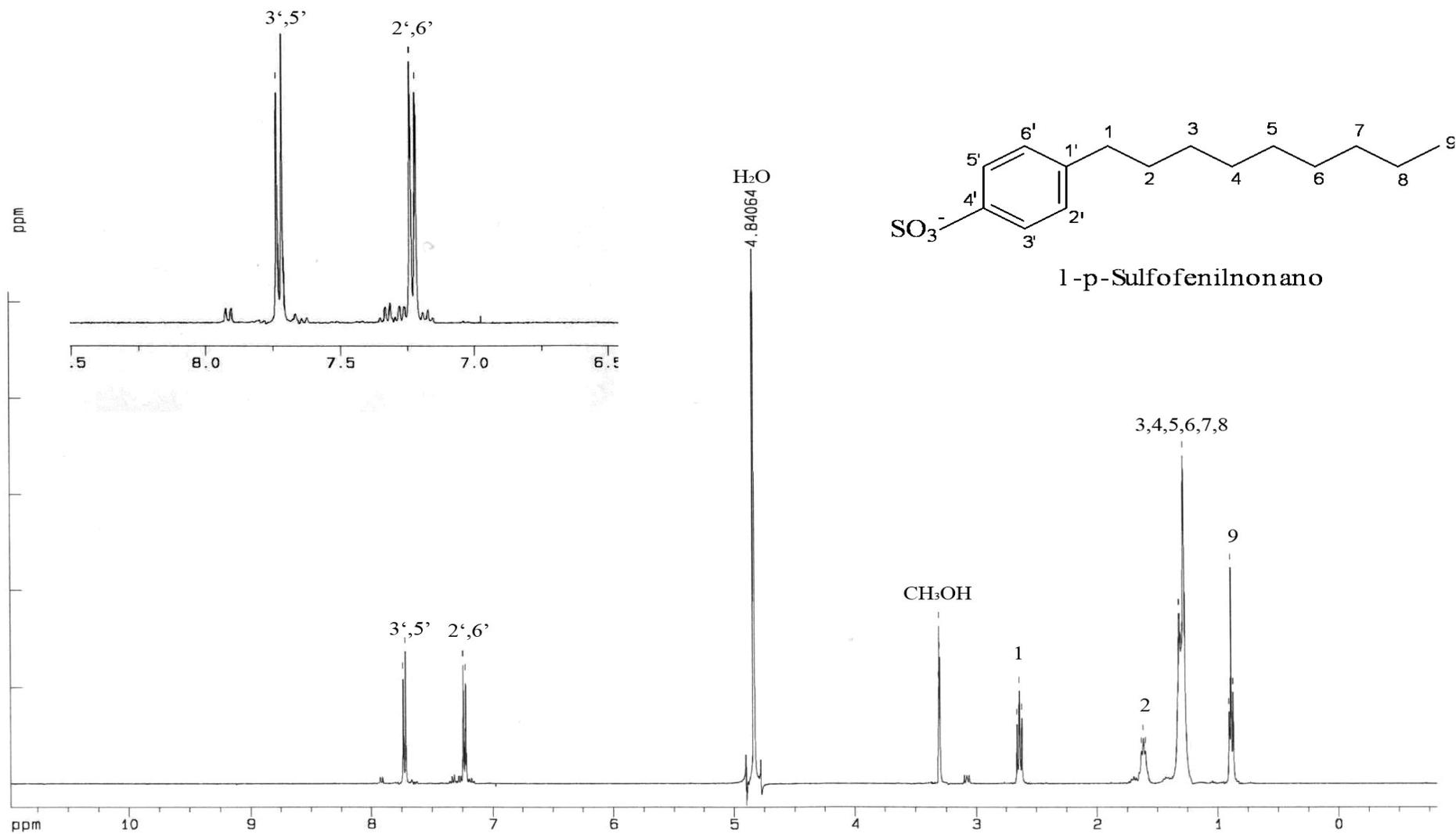


figura 2.1 – ^1H NMR 1-(*p*-sulfofenil)nonano in CD_3OD

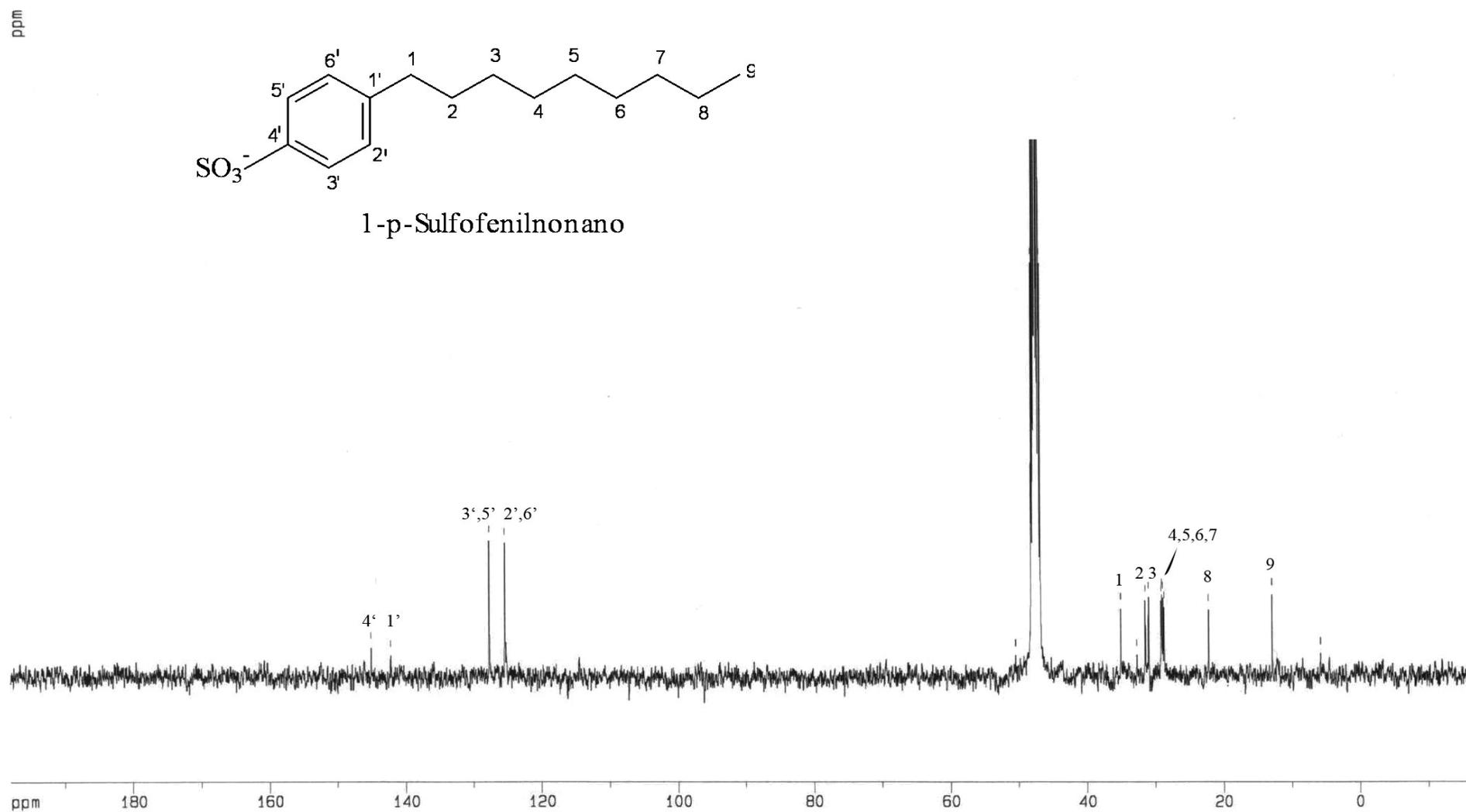


figura 2.2 – ¹³C NMR 1-(*p*-sulfofenil)nonano in CD₃OD

Capitolo 3.

Descrizione dell'indagine sperimentale

3.1 Descrizione dei set sperimentali

L'attrezzatura e la strumentazione necessaria alla sperimentazione in acquario sono già state elencate al par. 2.1. Tutti gli esperimenti sono stati quindi compiuti negli acquari da oltre 30 litri (foto 3.1), utilizzando dei riscaldatori nei periodi dell'anno più freddi, il refrigeratore in quelli più caldi, ed entrambi nei periodi in cui le variazioni di temperatura tra il giorno e la notte oscillavano intorno ai 18,0 °C.

Per determinare il tempo di biodegradazione dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano sono stati effettuati diversi esperimenti, sia con acqua di mare non filtrata, che con acqua di mare artificiale (Artificial Sea Water, ASW). A diversi istanti sono stati prelevati campioni d'acqua dagli acquari che andavano dai 10 ai 30 ml (secondo la concentrazione iniziale di 1-(*p*-sulfofenil)nonano) per l'analisi quantitativa del tensioattivo e campioni di 50 ml per l'analisi degli ortofosfati. Tali campioni sono stati conservati immediatamente ad una temperatura inferiore ai -18 °C. Con la sonda multiparametrica si è monitorato la salinità, l'ossigeno disciolto e la temperatura.

La Dose Massima Tollerata (DMT) e la Dose Letale (DL) dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano, sono state ricavate negli stessi acquari da oltre 30 lt. e somministrando, sempre agli stessi organismi, dosi crescenti di inquinante. Insieme all'osservazione delle condizioni degli organismi, attraverso l'utilizzo di una scala di valori creata "ad hoc" (vedi cap. 4, par. 4.1.2), sono state registrate le concentrazioni di fosfati, la salinità, l'ossigeno disciolto e la temperatura.

La Salinità Minima Tollerata (SMT) è stata ricavata diluendo progressivamente l'acqua contenuta nell'acquario, in cui vi erano sempre gli stessi organismi per ogni singola prova. Accanto al monitoraggio delle condizioni degli organismi, attraverso l'utilizzo della medesima scala di valori utilizzati per ricavare la DMT e la DL, si è proceduto al consueto monitoraggio delle concentrazioni di fosfati, di salinità, di ossigeno disciolto e di temperatura. Per tutta la durata dell'esperimento, gli organismi si sono nutriti filtrando l'acqua di mare reintrodotta nella vasca sperimentale ogni qualvolta che il valore degli ortofosfati si avvicinava a 0,5 mg/l (in accordo con il metodo standardizzato CNEXO³⁴) ed inoltre è stato utilizzato un integratore di cibo liofilizzato per invertebrati marini, conservato in fiale con atmosfera inerte di azoto.

I campioni d'acqua marina come quelli di *Styela plicata* utilizzati negli esperimenti di bioaccumulo, una volta prelevati, sono stati immediatamente posti ad una temperatura di -18

³⁴ Aminot et al., 1984

°C e solo alla fine di ogni prova, sono stati trasportati in un contenitore refrigerato (foto 3.4), ad una temperatura non superiore a 0 °C al laboratorio di chimica, dove sono stati quindi riportati ad una temperatura di -18 °C.

L'impiego dell'attrezzatura e della strumentazione utilizzata, secondo il dato sperimentale che s'intendeva acquisire, è avvenuto adottando diverse condizioni chimico – fisiche e modalità sperimentali, che sono state appunto schematizzate in tab. 3.1. In questa tabella, per completezza d'informazioni, sono state riportate anche le condizioni della vasca d'allevamento (foto 3.2), anche se al suo interno non è stato condotto alcun esperimento.

In particolare, riguardo alla temperatura, l'oscillazione di $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ intorno ai 18°C è dovuta al termostato del refrigeratore, piuttosto che alla precisione della sonda multiparametrica, che dal costruttore viene dichiarata da $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Riguardo alla salinità le variazioni di $\pm 0,1$ ppt sono dovute alla precisione della sonda multiparametrica dichiarata dal costruttore ed alle diverse condizioni dell'acqua marina prelevata. Per l'ossigeno disciolto, le variazioni di $\pm 0,3$ ppm sono dovute alla precisione della sonda multiparametrica dichiarata dal costruttore ed alla differente portata delle varie uscite dell'aeratore. Le concentrazioni iniziali dell'1-(*p*-sulfonil)nonano sono state scelte in funzione dei valori esistenti in bibliografia per lo stesso composto²⁴ (Perez et al) e del limite di rivelabilità della procedura analitica. Le variazioni di volume di $\pm 0,03$ litri, intorno al valore di 30 litri, dipendono dalla precisione dei matracci adottati e, nel caso dell'esperimento di Salinità Minima Tollerata, alle aggiunte d'acqua deionizzata man mano che si diminuiva la salinità. Per semplicità sulle vasche sperimentali non è stata adottata l'illuminazione artificiale e quella della vasca di allevamento, di per sé anch'essa già esposta alla luce naturale, è stata adeguata a quest'ultima con l'ausilio di un timer. Gli organismi marini sono stati sottoposti ad un regolare regime alimentare nella vasca di allevamento con del cibo liofilizzato per invertebrati e filtratori, ed altrettanto è avvenuto nel caso del lungo esperimento di Salinità Minima Tollerata. Nei casi in cui la durata degli esperimenti sugli stessi organismi era relativamente ridotta non è stato somministrato alcun integratore alimentare. Nella vasca di allevamento l'acqua è stata sostituita con regolarità sia nei tempi sia nei volumi, nell'esperimento di Salinità Minima Tollerata si è provveduto ad effettuare un totale ricambio d'acqua, ogni volta che gli ortofosfati raggiungevano un valore prossimo ai 0,5 ppm, avendo cura di riportare la salinità ai valori per cui si era temporaneamente interrotto l'esperimento. In tutti gli altri casi, l'acqua marina, sia essa naturale o artificiale, è stata cambiata prima della reintroduzione dell'inquinante nella vasca stessa.

| | Vasca allevamento | Tempo di Biodegradazione 1C9-LAS in acqua di mare artificiale | Tempo di Biodegradazione 1C9-LAS in acqua di mare non filtrata | Dose Massima Tollerata, Dose Letale 1C9-LAS | Accumulo 1C9-LAS | Salinità Minima Tollerata |
|--|----------------------------|--|---|--|-------------------------|----------------------------------|
| Temperatura | 18,0 ± 0,5°C | 18,0 ± 0,5°C | 18,0 ± 0,5°C | 18,0 ± 0,5°C | 18,0 ± 0,5°C | 18,0 ± 0,5°C |
| Salinità (ppt) | 36,2 ÷ 37,1 ± 0,1 | 38,0 ± 0,1 | 36,2 ÷ 38,1 ± 0,1 | 36,2 ÷ 38,1 ± 0,1 | 36,2 ÷ 38,1 ± 0,1 | 20,2 ÷ 37,8 ± 0,1 |
| Ossigeno disciolto (ppm) | 4,5 ÷ 5,8 ± 0,3 | 5,1 ÷ 7,2 ± 0,3 | 5,1 ÷ 7,2 ± 0,3 | 5,1 ÷ 7,2 ± 0,3 | 5,1 ÷ 7,2 ± 0,3 | 5,1 ÷ 7,2 ± 0,3 |
| Concentrazioni iniziali 1C9-LAS (µmol/l) | 0 | 52,80 | 52,80 17,60 10,56 | 52,8 17,6 10,56 5,28 1,06 0,53 | 52,80 | 0 |
| Volume acqua (litri) | ~ 250 | 30 ± 0,03 | 30 ± 0,03 | 30 ± 0,03 | 30 ± 0,03 | ~ 15 ÷ 25 |
| Illuminazione | 2 neon attinici da 36 watt | naturale | naturale | naturale | naturale | naturale |
| Alimentazione | cibo per invertebrati | no | no | no | no | cibo per invertebrati |
| Cambio d'acqua | si (10% ogni 15 gg.) | no | no | no | no | si |
| tabella 3.1 – correlazione tra le modalità e le condizioni sperimentali | | | | | | |



foto 3.1 – la vasca sperimentale



foto 3.2 – la vasca di allevamento



foto 3.3 – l'ascidia *Styela plicata* nella vasca di allevamento



foto 3.4 – il contenitore isotermico refrigerato per il trasporto dei campioni nel laboratorio di chimica

3.2 Analisi di laboratorio

Prima della loro estrazione i campioni d'acqua di mare sono stati accuratamente agitati per assicurarne l'omogeneizzazione. Per compiere l'estrazione sono state utilizzate delle mini colonne C-18 da 12 ml contenenti 2 grammi di fase stazionaria (SUPELCO - Discovery DSC-18). Prima dell'uso le mini colonne sono state condizionate, innanzi tutto con 5 ml di acetone e poi con 5 ml di acqua distillata. La concentrazione di NaCl dei campioni di acqua di mare è stata portata a 5 M ed il pH degli stessi è stato portato ad 1, aggiungendo ai campioni 90 ml di una soluzione NaCl 5,5 M e acido cloridrico.

I campioni così preparati sono stati passati attraverso le mini colonne C-18 ad un flusso di ~3 ml/min (foto 3.5). Quindi le mini colonne sono state lavate con 0,5 ml di acqua distillata per eliminare i sali inorganici e le impurezze, ed infine i composti organici intrappolati sono stati eluiti con 3 ml di metanolo e trasferiti in vials da 4 ml.

L'1-(*p*-sulfofenil)nonano è stato separato ed analizzato quantitativamente usando una colonna analitica per HPLC LiCrospher 100 RP-18 (5 µm) della lunghezza di 250 mm e dal diametro esterno di 4,6 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Germania).

Il cromatografo, Perkin Elmer mod. Series 200 (foto 3.6), è costituito da 4 pompe HPLC, una cella Peltier ed un rivelatore UV Diode Array.

Le analisi HPLC sono state eseguite a 21 °C e con il rivelatore UV impostato su una lunghezza d'onda di 215 nm. Si è impiegata quindi una fase mobile degasata, ad un flusso di 1,2 ml/min, costituita al 50% da acetonitrile ed al 50% da una soluzione tampone KH₂PO₄ 8 mM portata a pH 2,2 per aggiunta di H₃PO₄. I volumi di campione iniettati sono stati di 10 e/o 20 µL secondo le concentrazioni iniziali di 1-(*p*-sulfofenil)nonano introdotte nella vasca sperimentale.

In accordo con il metodo standardizzato CNEXO²⁴ (Aminot et al.,1984), secondo il quale le condizioni chimiche dell'acqua di mare si ritengono idonee alla sopravvivenza degli organismi in essa contenuti, fino ad una concentrazione massima di ortofosfati pari a 0,5 mg/l, sono stati analizzati anche questi ultimi secondo le metodiche dell'ICRAM³⁵, impiegando uno spettrofotometro UV-visibile Perkin Elmer Lambda EZ 150.

L'accumulo dell'inquinante è stato determinato estraendo quantità note di organismo essiccato (foto 3.7), con volumi noti di una miscela di solventi. L'1-(*p*-sulfofenil)nonano è una sostanza molto stabile a temperature superiori ai 100 °C e la fase di essiccamento degli organismi è stata effettuata ad una temperatura di 50 °C. L'estrazione è stata condotta con

³⁵ Nova Thalassia, vol. 11, 1990

l'ausilio di un bagno ad ultrasuoni. Dopo aver verificato l'influenza dei tempi di sonicazione sulla resa d'estrazione si è optato per l'adozione di una procedura estrattiva della durata di un'ora.

3.3 I cromatogrammi e le rette di taratura

Per determinare la concentrazione di 1-(*p*-sulfofenil)nonano presente ad un determinato istante nella soluzione d'acqua di mare non filtrata, contenente o no organismi marini, i volumi d'acqua marina campionati, sono stati sottoposti innanzi tutto ad una procedura estrattiva. La procedura utilizzata è detta d'estrazione su fase solida, in altre parole i campioni, una volta trattati come descritto al paragrafo 3.2, sono fatti passare su un supporto solido idrofobo, su cui le molecole di 1-(*p*-sulfofenil)nonano si adsorbono. In seguito, le molecole adsorbite vengono desorbite con 3 ml di metanolo.

10 o 20 μL di questa soluzione sono sottoposti, tre volte per ogni campione estratto (si vedano le tabelle in appendice), alla procedura cromatografica HPLC. Il risultato grafico di tale operazione (fig. 3.1) si definisce cromatogramma. In concreto, le diverse molecole presenti nella soluzione di metanolo, fissate le condizioni cromatografiche, si distingueranno nel cromatogramma con un picco, il cui massimo è caratterizzato sempre dallo stesso tempo di ritenzione (asse delle ascisse in fig. 3.1).

L'area sottesa al particolare picco cromatografico è, infatti, proporzionale alla quantità di composto iniettato e di conseguenza alla sua concentrazione nella soluzione di metanolo. Si rende quindi necessario moltiplicare l'area dei picchi per il fattore di concentrazione dovuto alla procedura d'estrazione, ottenendo così un'area equivalente direttamente confrontabile con le rette di taratura (fig. 3.2), ricavate iniettando in HPLC prima 10 e poi 20 μL di soluzioni (in acqua distillata) a concentrazione nota di 1-(*p*-sulfofenil)nonano.

Un altro problema di carattere pratico che è stato affrontato, è legato proprio allo svolgimento della procedura d'estrazione su fase solida dei campioni, prima della determinazione analitica vera e propria con l'HPLC. Si è ipotizzato, infatti, che la resa d'estrazione potesse variare, in funzione dell'impaccamento d'ogni singola colonnina.

I risultati riportati in fig. 3.3, vanno interpretati in un'ottica di comprensione del fenomeno sopra discusso.

L'impiego di una seconda aliquota da 3 ml di metanolo evidenzia un desorbimento pressoché completo dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano in entrambe le estrazioni di prova, a conferma del fatto

che l'impaccatura della colonnina, e non i volumi d'estrazione, determinano una resa che oscilla tra il 63,60% ed il 106,93% (in bibliografia si riportano valori del 70%³⁶).

| Iniezione HPLC n. | estrazione | conc. standard $\mu\text{mol/l}$ | volume estrazione | area picco hplc (μVs) | area equiv. retta di taratura (μVs) | recupero $\mu\text{mol/l}$ | resa estrazione % |
|-------------------|------------|----------------------------------|----------------------------|------------------------------------|--|----------------------------|-------------------|
| 1a iniezione | 1a | 52,8 | 3 ml | 383009,5 | | | |
| 2a iniezione | 1a | 52,8 | 3 ml | 350383,41 | | | |
| 3a iniezione | 1a | 52,8 | 3 ml | 349046,13 | | | |
| media | 1a | 52,8 | 3 ml | 360813,01 | 108243,90 | 48,89 | 92,60 |
| resa teorica | | | | 387843,27 | 116352,98 | | |
| 1a iniezione | 2a | 52,8 | 3 ml | 390114,67 | | | |
| 2a iniezione | 2a | 52,8 | 3 ml | 368176,46 | | | |
| 3a iniezione | 2a | 52,8 | 3 ml | 472546,72 | | | |
| media | 2a | 52,8 | 3 ml | 410279,28 | 123083,79 | 56,46 | 106,93 |
| resa teorica | | | | 387843,27 | 116352,98 | | |
| 1a iniezione | 3a | 17,6 | 3 ml | 123855,36 | | | |
| 2a iniezione | 3a | 17,6 | 3 ml | 147284,55 | | | |
| 3a iniezione | 3a | 17,6 | 3 ml | 144646,09 | | | |
| media | 3a | 17,6 | 3 ml | 138595,33 | 41578,60 | 16,59 | 96,46 |
| resa teorica | | | | 144215,17 | 43264,55 | | |
| 1a iniezione | 4a | 17,6 | 3 ml | 104207,77 | | | |
| 2a iniezione | 4a | 17,6 | 3 ml | 120340,92 | | | |
| 3a iniezione | 4a | 17,6 | 3 ml | 96860,72 | | | |
| media | 4a | 17,6 | 3 ml | 107136,47 | 32140,94 | 10,94 | 63,60 |
| resa teorica | | | | 144215,17 | 43264,55 | | |
| 1a estrazione | 1a | 52,8 | 6 ml (2a aliquota da 3 ml) | nd | | 0,00 | |
| 2a estrazione | 2a | 52,8 | 6 ml (2a aliquota da 3 ml) | nd | | 0,00 | |
| 3a estrazione | 3a | 17,6 | 6 ml (2a aliquota da 3 ml) | nd | | 0,00 | |
| 4a estrazione | 4a | 17,6 | 6 ml (2a aliquota da 3 ml) | nd | | 0,00 | |

tabella 3.2 – resa della procedura d'estrazione

³⁶ Sarrazin et al., 1999



foto 3.5 – la procedura d'estrazione su fase solida



foto 3.6 – HPLC Perkin Elmer mod. Series 200



foto 3.7 – determinazione del peso secco degli organismi

Flusso 1,2 ml/min
 50:50 = CH₃CN : buffer
 10 µl Campione 12

Chromatogram

Sample Name : C:\chromatogrammi\test\test\26set009.new Page 1 of 1
 Filename : C:\chromatogrammi\test\test\26set009.new
 Date : 9/28/05 12:18:13 PM
 Method : TeraSoft\1.mth
 Start Time : 0.00 min End Time : 7.99 min Time of Injection: 9/28/05 12:10:27 PM
 Plot Offset: -31.07 mAU Plot Scale: 58.0 mAU Low Point: -31.07 mAU High Point: 26.93 mAU
 Scale Factor: 1.0

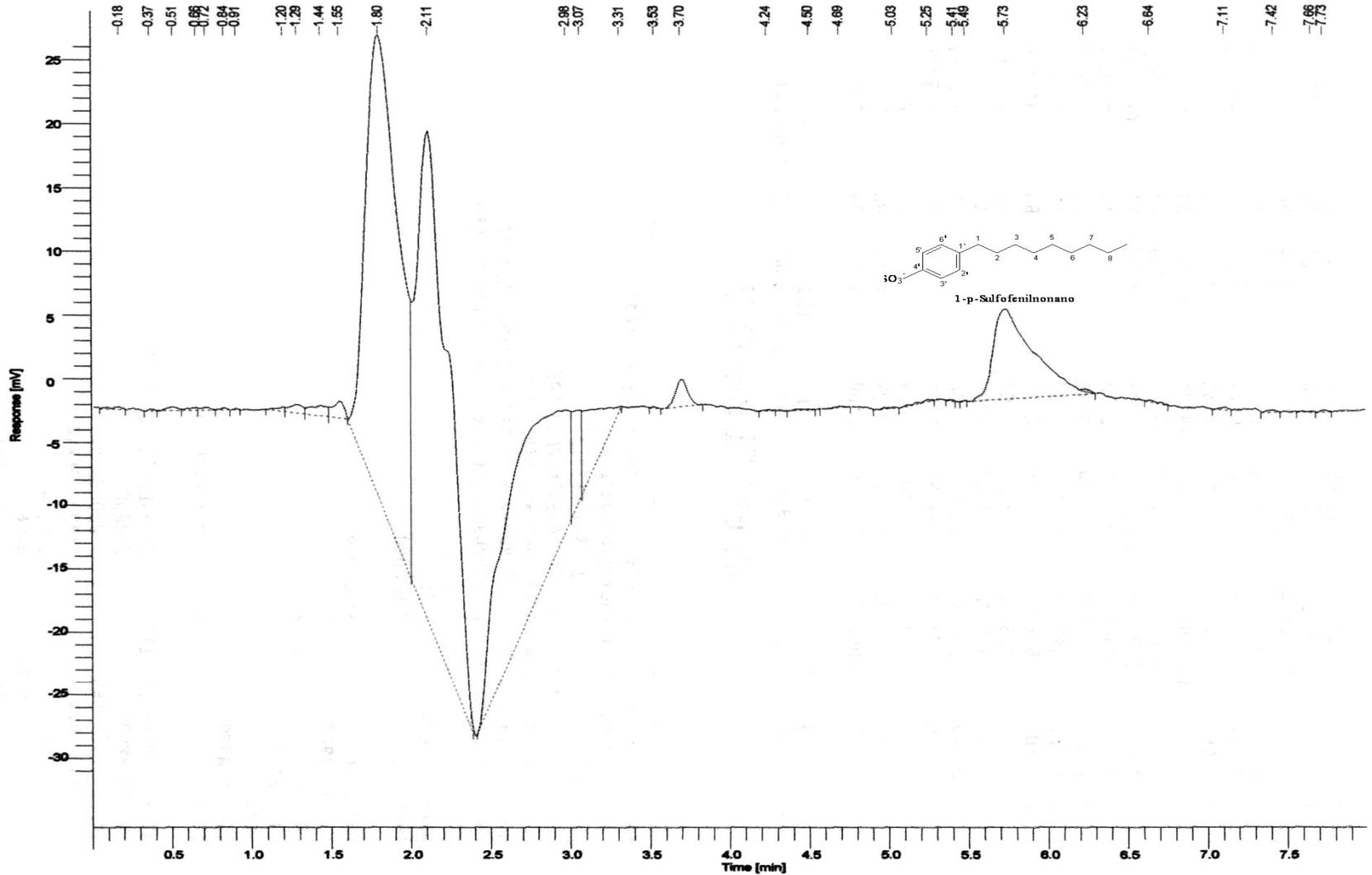


figura 3.1 – cromatogramma HPLC campione 12

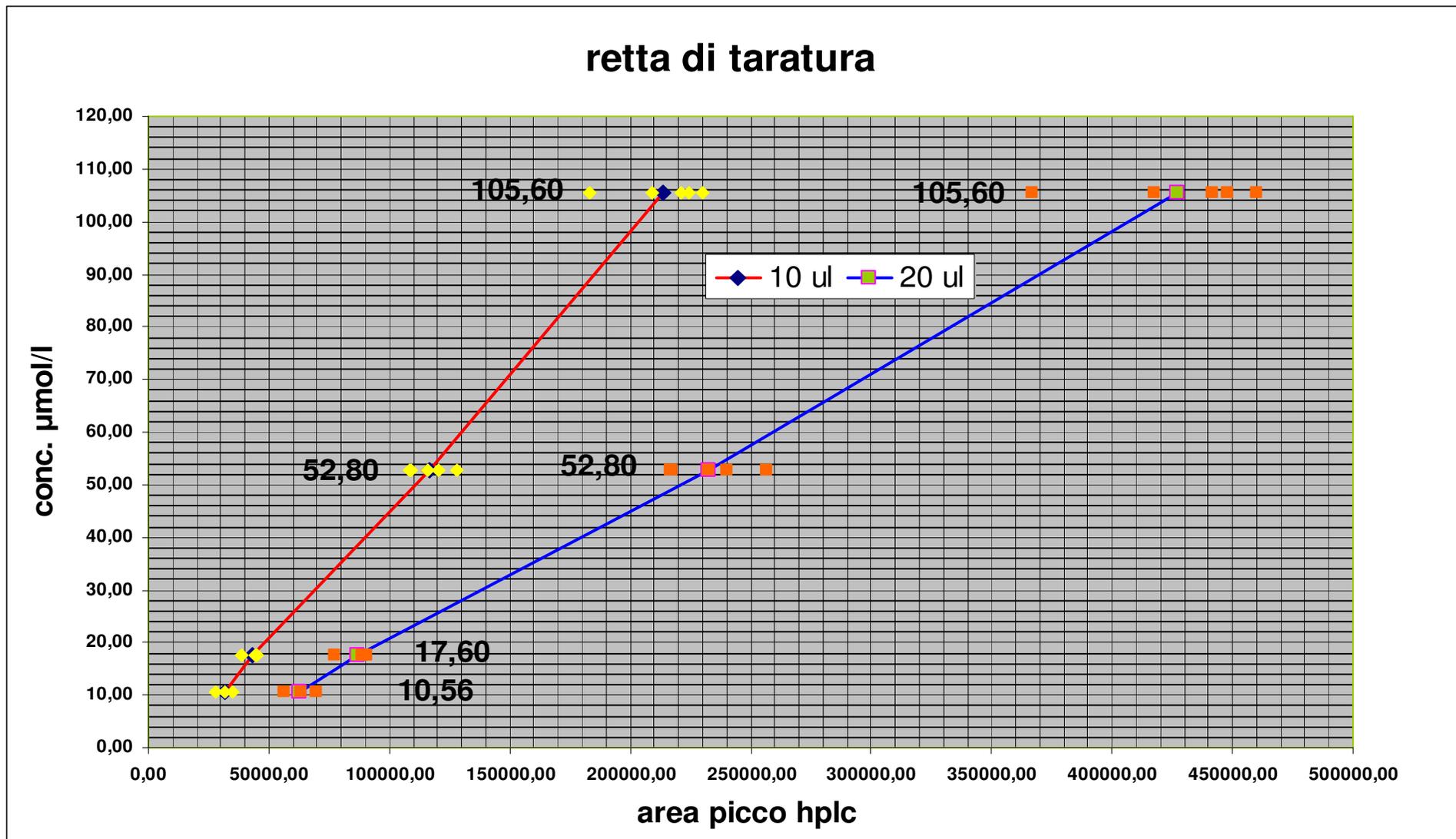


figura 3.2 – rette di taratura dello standard 1-(p-sulfofenil)nonano a 10 e 20 µl

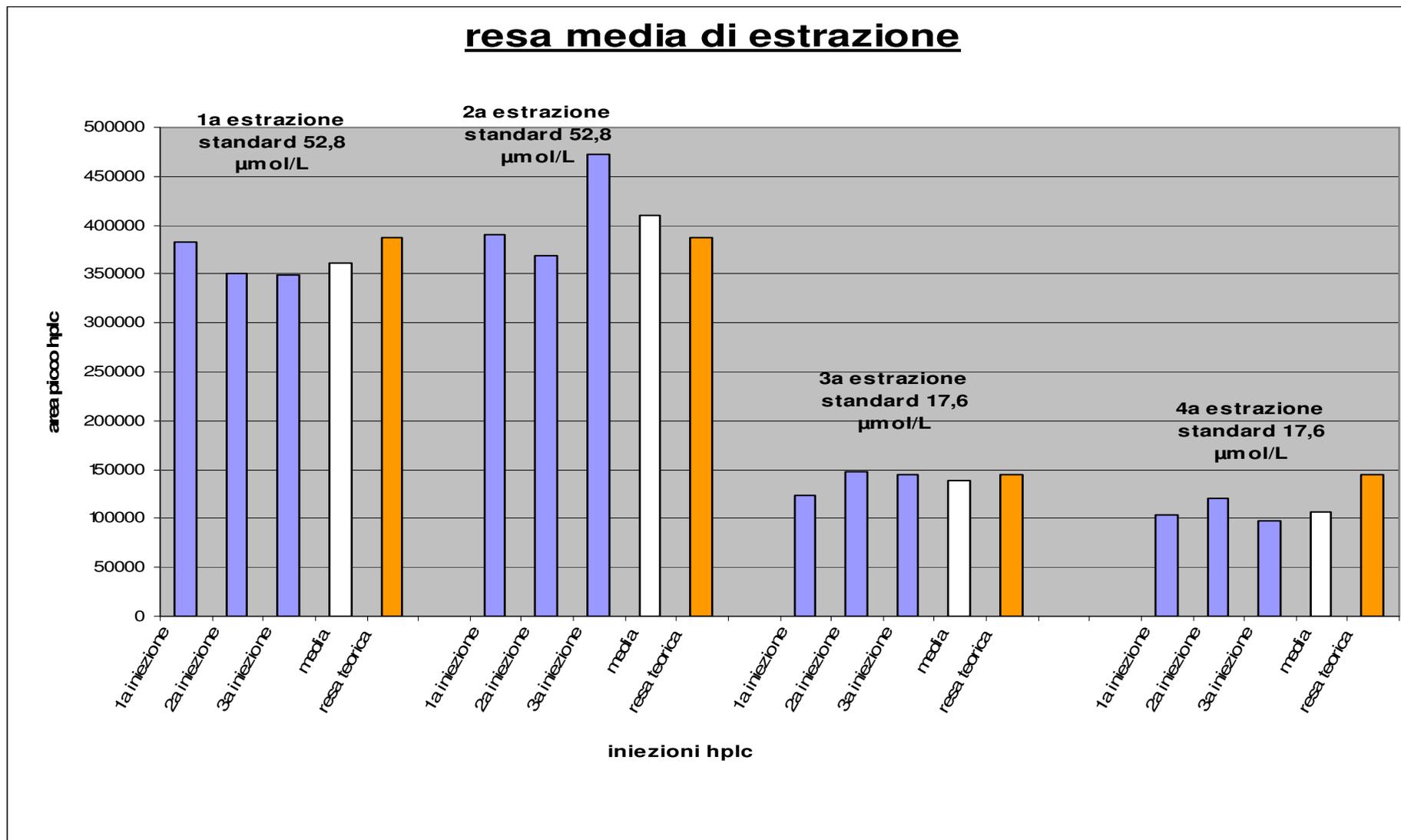


figura 3.3 – resa media della procedura d'estrazione su fase solida

Capitolo 4.

Analisi e discussione dei risultati

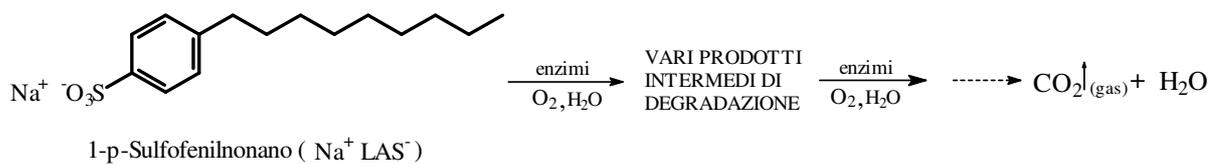
4.1 I parametri sperimentali determinati

Dalle analisi effettuate sui campioni prelevati durante i vari esperimenti in acquario, nelle condizioni chiarite al par. 3.1 si è pervenuti alla determinazione di cinque diversi parametri:

- Tempi di Biodegradazione dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano;
- Dose Massima Tollerata di 1-(*p*-sulfofenil)nonano dalla *Styela plicata*;
- Dose Letale di 1-(*p*-sulfofenil)nonano per la *Styela plicata*;
- Salinità Minima Tollerata dalla *Styela plicata*;
- Accumulo inquinante dell'1-parasulfofenilnonano in *Styela plicata*.

4.1.1 Tempi di biodegradazione dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano

Questo parametro caratterizza la degradazione del tensioattivo 1-(*p*-sulfofenil)nonano, intendendo per degradazione la graduale scomparsa della molecola introdotta, e non quella degli intermedi di degradazione biochimica, che procede fino alla loro totale trasformazione in acqua ed anidride carbonica.



Per seguire la degradazione dell'inquinante introdotto fino al suo ultimo stadio ossidativo, sarebbe necessario eseguire gli stessi esperimenti con una molecola marcata isotopicamente, e quindi estrarre e caratterizzare strutturalmente i metaboliti in cui è incorporato l'isotopo stesso. Uno studio siffatto, che esula dagli scopi del presente, sarebbe finalizzato alla determinazione delle vie di degradazione metabolica dell'inquinante e non ad una perdita delle sue peculiarità chimico – fisiche, o della sua tossicità sul benthos, come invece si è cercato di effettuare. Peraltro, i cataboliti dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano sono già parzialmente noti²⁴ (Perez et al., 2002) e la loro cinetica di apparizione e di scomparsa dal mezzo acquoso è di difficile interpretazione e non contribuisce alla valutazione della tossicità globale dell'inquinante sul benthos.

I valori ottenuti dagli esperimenti sono stati posti in dei grafici che esprimono la variazione di concentrazione nel tempo, riportando in ascissa gli istanti dei campionamenti ed in ordinata le relative concentrazioni registrate. Lungi dal descrivere la cinetica di

biodegradazione, questi grafici permettono di paragonare gli andamenti delle concentrazioni nelle varie situazioni sperimentali, che differiscono sostanzialmente per la concentrazione iniziale d'inquinante e per la presenza o meno di organismi. Si sono quindi ulteriormente sintetizzati i risultati ottenuti, definendo per ogni curva normalizzata il t_{90} , vale a dire il tempo necessario alla scomparsa del 90% dell'inquinante introdotto al tempo t_0 .

Una delle prime difficoltà sperimentali incontrate, risiede nei valori delle concentrazioni riscontrate analiticamente per il campione prelevato al tempo t_0 . Essi, infatti, non corrispondono in nessun caso alla concentrazione del tensioattivo realmente introdotto in quell'istante. Questa cosa può inizialmente apparire anormale, soprattutto se si considera che l'introduzione dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano nella vasca è avvenuta in tutti i casi prelevando una porzione del mezzo acquoso sperimentale e sciogliendo in modo completo il soluto ponendolo in un bagno ad ultrasuoni. I campioni dell'istante t_0 sono stati prelevati immediatamente dopo l'aggiunta della soluzione e di un adeguato rimescolamento, ma nonostante tutto il valore della concentrazione iniziale, ed anche quelli successivi (fino anche ad 8 ore dopo l'inizio dell'esperimento), sono risultati sempre più bassi rispetto ai valori aspettati dallo scioglimento di una quantità di sale accuratamente pesata. Il fenomeno occorso viene spiegato ipotizzando plausibilmente la formazione iniziale di aggregati di tipo micellare, i quali, interagendo polarmente tra loro e con le superfici presenti nell'acquario (vetro, silicone, plastica, gomma, etc.), creano una soluzione fortemente disomogenea. Le catene idrocarburiche del tensioattivo tendono, in altri termini, a disporsi in modo da minimizzare la loro repulsione per il mezzo ionico in cui sono disciolte (vedi fig. 4.1). Il fenomeno tra l'altro è accentuato dall'elevata forza ionica dell'acqua di mare, in cui è sciolto il soluto ed è rilevante notare che esso non si osserva, quando invece si scioglie il soluto in acqua deionizzata.

Entro una o poche ore dall'inizio degli esperimenti, con l'instaurarsi di equilibri tra i vari fenomeni e l'incedere della degradazione, la condizione di disomogeneità si risolve, e la concentrazione del tensioattivo prende a diminuire gradualmente. In virtù dell'esibizione di tale comportamento, i dati sperimentali relativi agli istanti in cui perdura la condizione di disomogeneità saranno trascurati e l'istante t_0 sarà associato al valore C_0 aspettato teoricamente.

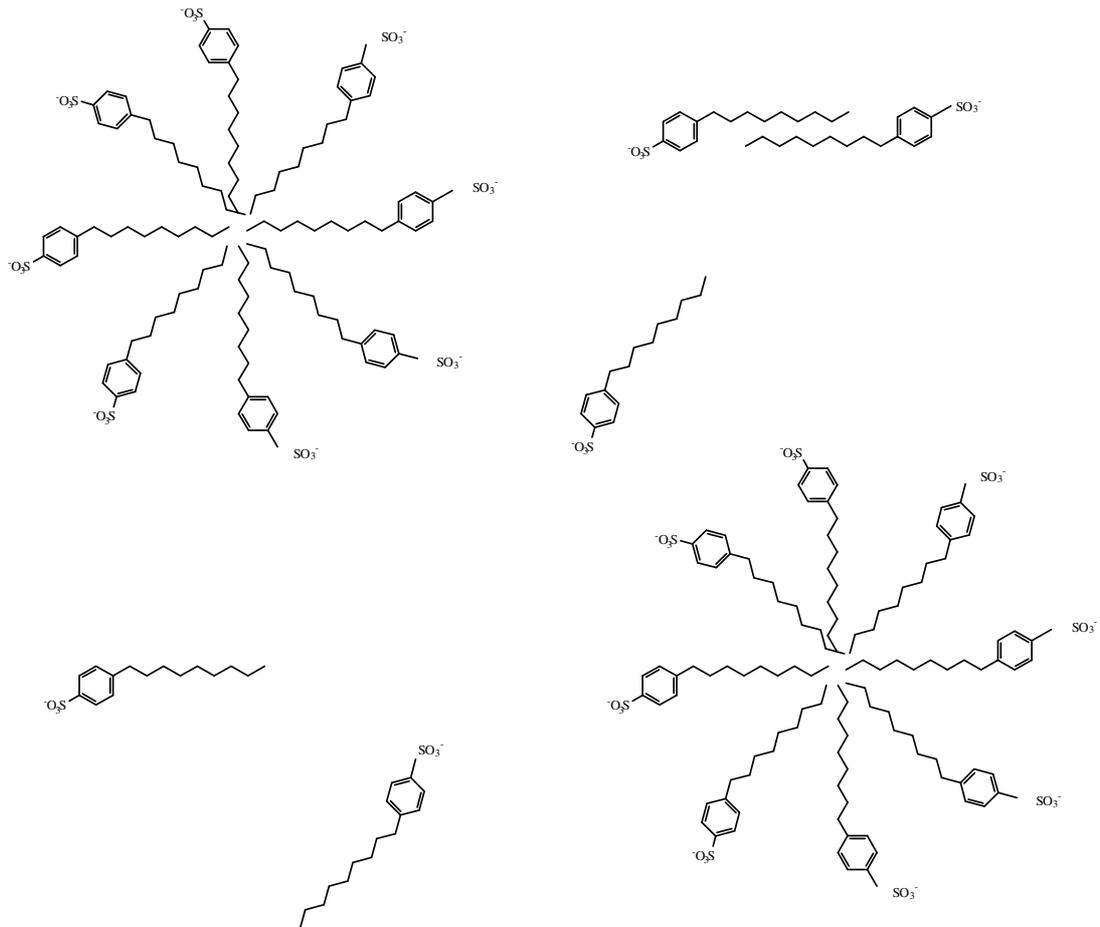


figura 4.1 – visualizzazione schematica bidimensionale del fenomeno di aggregazione micellare in soluzione acquosa

Nei grafici delle figure da 4.2 a 4.4 sono riportati i risultati di tre coppie dei diversi esperimenti effettuati per la $C_0 = 52,80 \mu\text{mol/l}$. Per coppia di esperimenti s'intende, infatti, l'esecuzione di un esperimento con gli organismi e di un esperimento senza (controllo), entrambi nelle stesse condizioni di temperatura, salinità, ossigeno disciolto, ed in acqua di mare non filtrata prelevata nel medesimo luogo e momento.

Prima di procedere all'introduzione dell'inquinante nell'acquario si sono osservate attentamente le condizioni vitali degli organismi, attendendo che tutti mostrassero chiari segnali di adattamento. Uno o più animali, qualora presentavano per più d'una o due ore, anche solo parzialmente, i sifoni chiusi, venivano rimpiazzati da altri organismi e si attendeva nuovamente un generale ambientamento degli esemplari in acquario. Alla fine delle prove sperimentali gli organismi sono stati posti in congelatore e dopo sono stati essiccati nella stufa per 48 h alla temperatura di $50 \text{ }^\circ\text{C}$. In tutte e tre le prove, il numero di ascidie poste in acquario era di 6, il peso secco totale è risultato di 10,65 g, 10,84 g e 10,58 g.

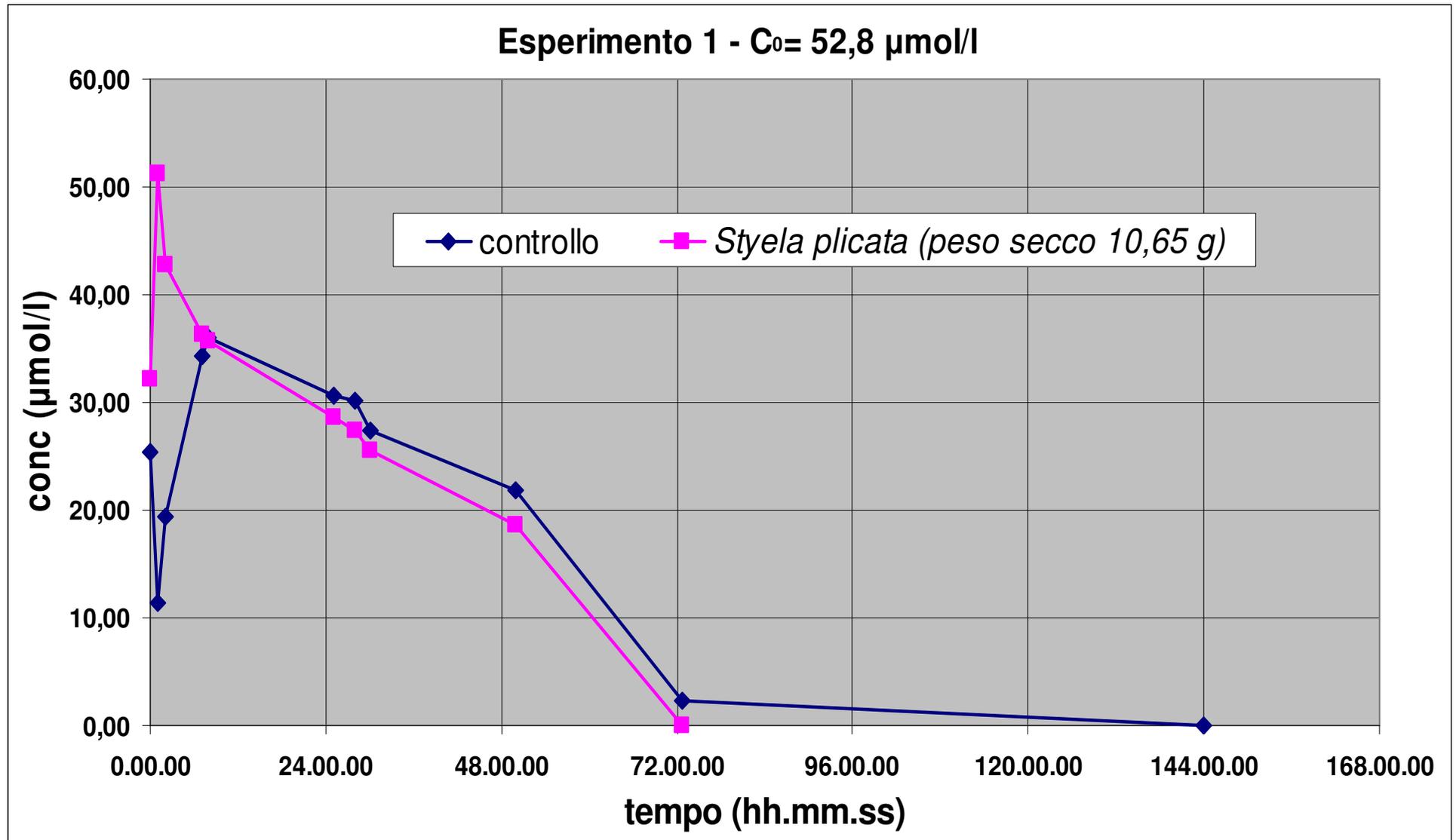


figura 4.2 – confronto dei valori tra una 1^a coppia di esperimenti

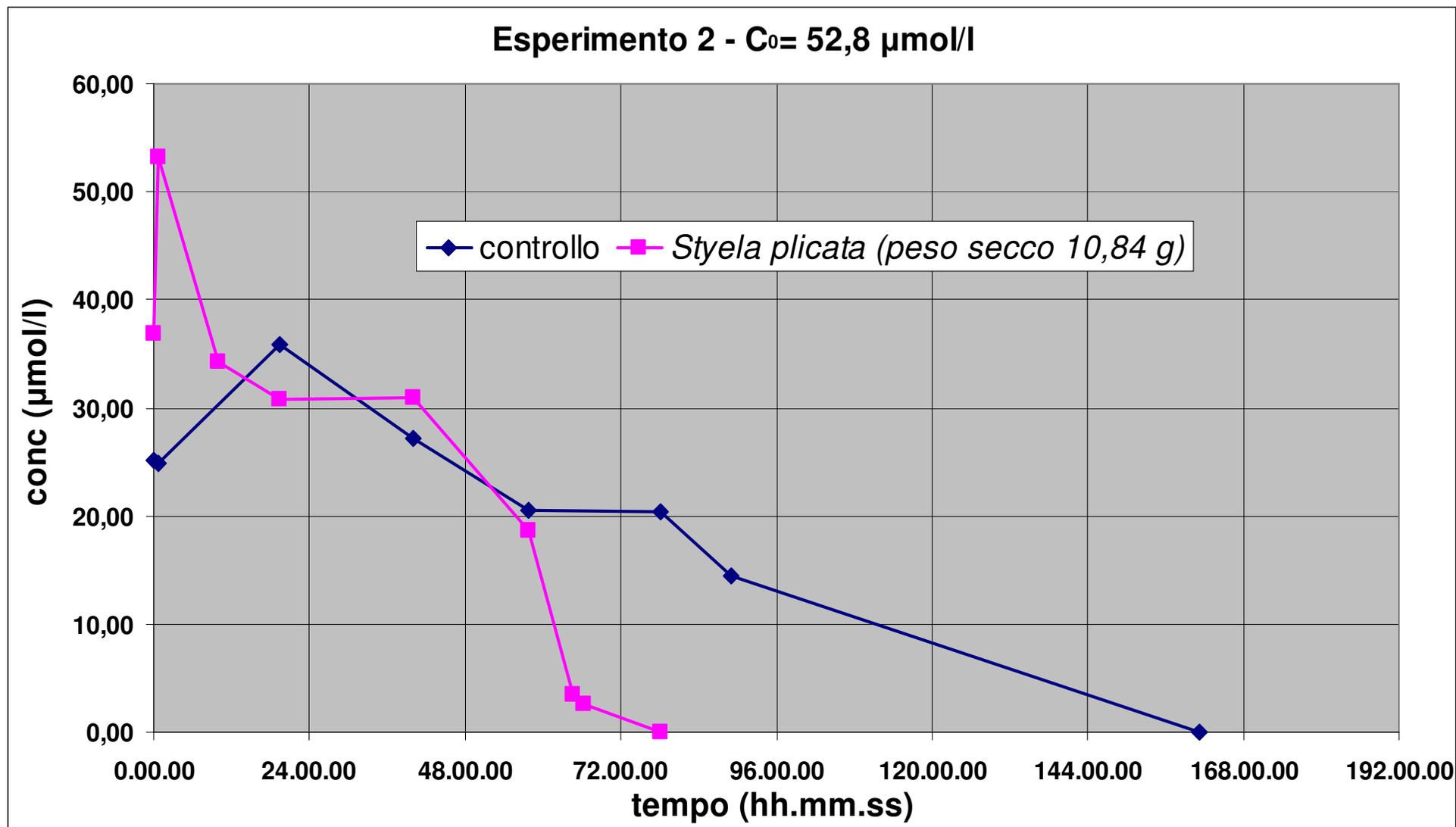


figura 4.3 – confronto dei valori tra una 2^a coppia di esperimenti

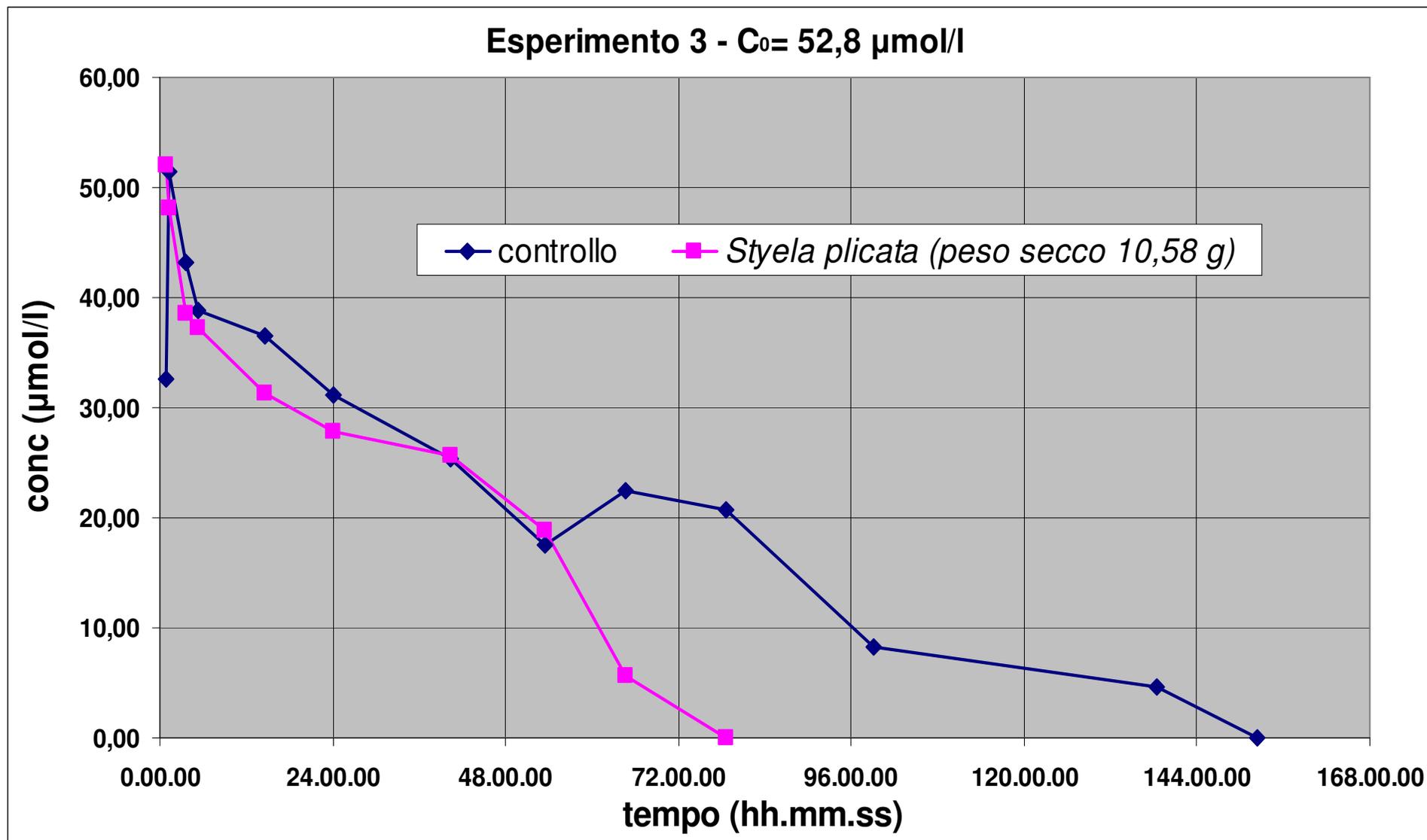


figura 4.4 – confronto dei valori tra una 3^a coppia di esperimenti

Dal confronto con precisi dati bibliografici²⁴ (Perez et al, 2002) ottenuti da un esperimento di controllo, per concentrazioni iniziali dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano identiche, e per uguali valori di salinità, i risultati sperimentali divergono in modo palese, come si evince dalla fig. 4.5. Ciò potrebbe essere parzialmente addebitato al tenore d'ossigeno (lievemente superiore nei dati in bibliografia) ed alla diversa composizione microbica dell'acqua di mare non filtrata.

Al fine di quantificare il contributo alla biodegradazione dovuta ai microrganismi eventualmente presenti nell'acqua di mare non filtrata, si è effettuato un analogo esperimento di controllo con acqua di mare artificiale (Artificial Sea Water – ASW). In particolare si è sciolto del sale marino per acquari (fino al raggiungimento di una salinità pari a 38,0 ppt) in acqua filtrata su una membrana ad osmosi inversa. I risultati ottenuti da quest'esperimento sono graficati in fig. 4.6. Il t_{90} risulta essere 185 ore, 16 min. e 52 sec.

Il risultato dell'esperimento di fig. 4.6 fa escludere che in soluzione vi può essere un significativo contributo alla degradazione del tensioattivo da parte dei microbi presenti nell'acqua di mare non filtrata, e lascia invece intuire che dei fenomeni d'adsorbimento dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano sulle pareti dell'acquario, o dovuti ad un impiego di materiali ed attrezzature sperimentali diverse, possano meglio interpretare la differenza tra gli andamenti delle curve di controllo nei grafici delle figg. 4.2 - 4.4 e quelle dei dati in bibliografia²⁴ (Perez et al., 2002). Va rimarcato tuttavia, che se pure i fenomeni d'adsorbimento rivestono un'importanza fondamentale nei tempi di scomparsa assoluti dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano, sia nell'acquario con le ascidie che in quello di controllo, i tempi relativi rimangono invece immutati per l'impiego di condizioni e materiali sperimentali nei due casi identici. In pratica tali fenomeni sono da considerare influenti in uguale misura sui sistemi a confronto, facendo salva l'informazione di base che in ogni caso ne deriva.

Il risultato di fig. 4.6 ci permette tra l'altro di considerare con buon'approssimazione che i risultati delle figg. 4.2 – 4.4 siano indipendenti dalla diversa concentrazione di microbi nell'acqua di mare non filtrata, in cui sono stati condotti gli esperimenti. E' possibile così pensare di interpolare linearmente i dati da essi provenienti. Nel fare questo, la prima difficoltà che si è incontrata è quella che gli istanti di campionamento di un esperimento, non coincidono quasi mai con quelli degli altri due. Questo perchè a causa della formazione di schiuma sulla superficie e di una conseguente deposizione di materiale sui vetri dell'acquario, leggermente sopra il battente d'acqua, non è stato possibile effettuare un campionamento automatico.

E' stato invece necessario risolubilizzare il materiale depositatosi, agitando e rimescolando manualmente l'acqua nell'acquario.

Per effettuare la media dei tre esperimenti di controllo, nonché quella dei tre in presenza delle ascidie, in corrispondenza di un istante di campionamento sono stati ricavati i valori per lo stesso istante sulle altre due curve, utilizzando per queste ultime le coppie di valore (concentrazione – tempo) immediatamente disponibili prima e dopo dell'istante richiesto. Nell'intervallo in cui il tensioattivo esibisce il fenomeno di aggregazione micellare, i valori di concentrazione sono stati trascurati, prendendo come unico dato valido la concentrazione teorica $C_0 = 52,80 \mu\text{mol/l}$.

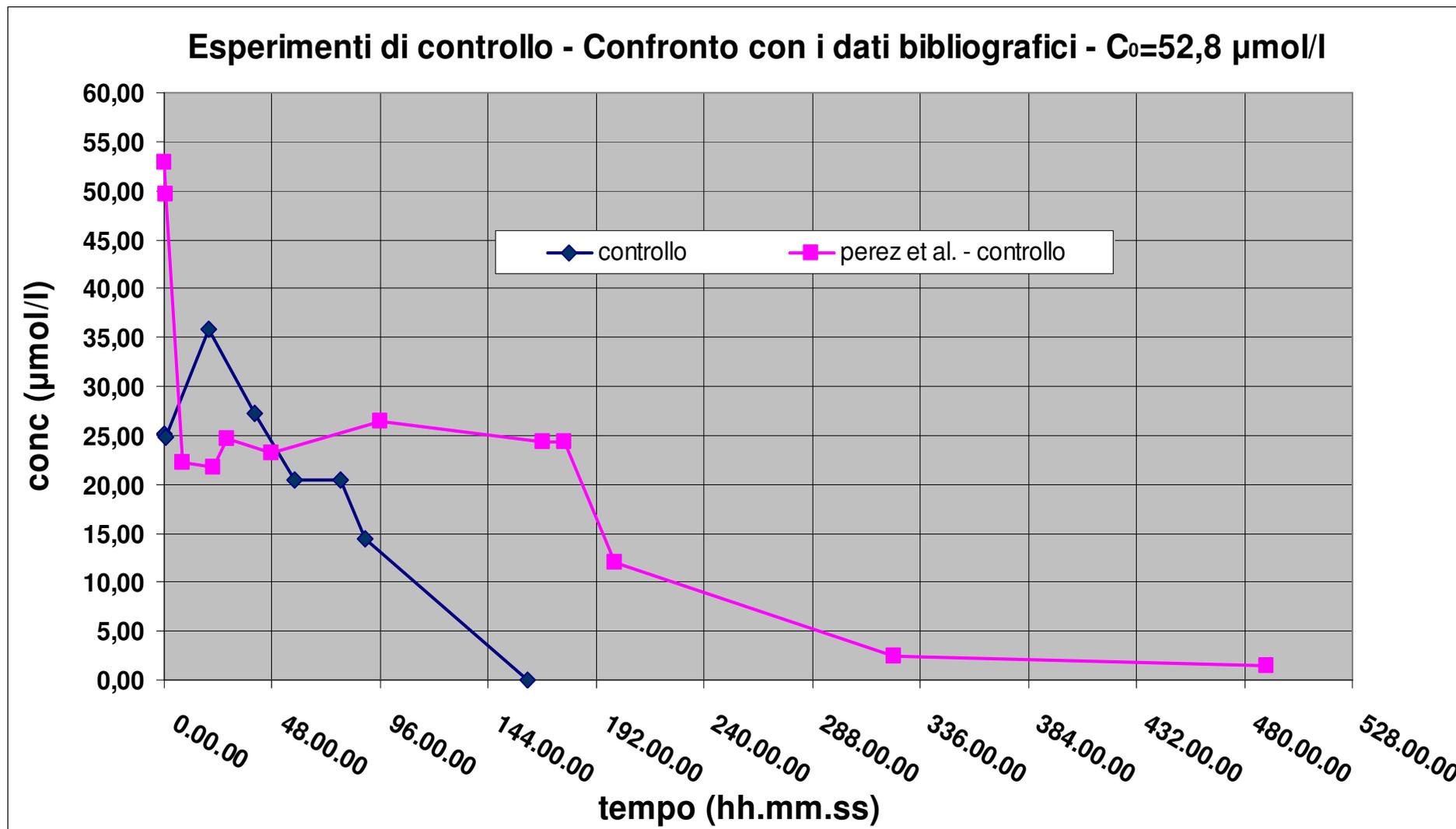


figura 4.5 – confronto con i dati bibliografici per la curva di controllo

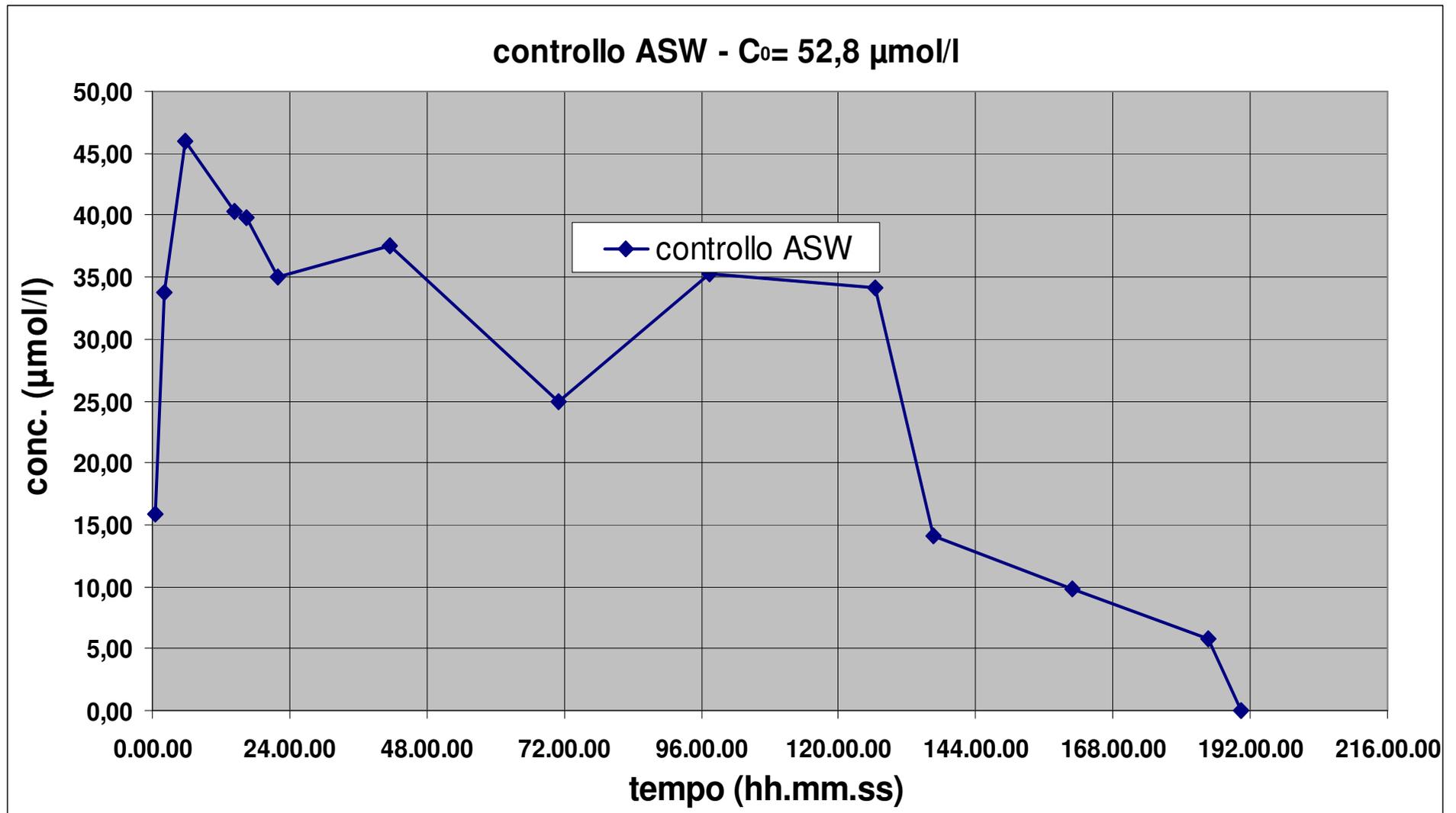


figura 4.6 – esperimenti di controllo in ASW

In fig. 4.7 si riportano le tre curve relative agli esperimenti di controllo delle figg. 4.2 – 4.4 e la media calcolata con il metodo sopra descritto, considerando che i risultati sperimentali delle prime due ore siano tutti affetti dall'errore causato dal fenomeno di aggregazione micellare.

Il t_{90} , calcolato sulla curva interpolata, assume il valore di 118 ore, 41 min. e 40 sec.

In fig. 4.8 sono invece riportati i risultati ottenuti dagli esperimenti effettuati con gli esemplari di ascidia *Styela plicata*, considerando che i risultati sperimentali delle prime ore siano tutti affetti dall'errore causato dal fenomeno di aggregazione micellare.

Il t_{90} riferito alla curva interpolata in presenza di *Styela plicata*, assume il valore di 64 ore, 33 min. e 11 sec.

Ponendo sullo stesso grafico (fig. 4.9) la curva interpolata di fig. 4.7 e quella di fig. 4.8 risulta evidente che la presenza dell'ascidia influenza in modo rilevante la scomparsa dell'inquinante introdotto nell'acquario, riducendo di circa il 100% i tempi di scomparsa dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano introdotto all'istante t_0 .

Dopo le prime 53 ore e 30 min., l'andamento della scomparsa dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano si equivale pressappoco nei due casi; nelle 11 ore successive le ascidie influiscono notevolmente sulla degradazione dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano, portando la sua concentrazione a 5,29 $\mu\text{mol/l}$, per poi andare a zero entro le 78 ore e 35 min., istante in cui sulla curva di controllo si registra ancora un valore di 14,33 $\mu\text{mol/l}$.

Quanto è stato analizzato fino ad ora, è riferito alla concentrazione particolare di 52,80 $\mu\text{mol/l}$. Come vedremo più avanti nell'affrontare il problema della Dose Massima Tollerata e della Dose Letale, questa concentrazione rappresenta proprio la Dose Letale per le specie di ascidie introdotte in acquario, per questo si è ritenuto opportuno valutare l'andamento nel tempo della concentrazione di 1-(*p*-sulfofenil)nonano, con riferimento a concentrazioni di inquinante più basse. Nelle figure che seguono (figg. 4.10 – 4.11) sono riportati due grafici analoghi a quelli delle figg. 4.2 – 4.4, riferiti però alle concentrazioni di 10,56 $\mu\text{mol/l}$ e 17,60 $\mu\text{mol/l}$. (vedi tab. 4.0)

Nella determinazione della Dose Massima Tollerata sono state introdotte concentrazioni ancora più basse rispetto a quelle appena indicate, ma l'approssimarsi di tali valori al limite di rivelabilità della sostanza, considerata la metodica analitica utilizzata, ha reso inopportuno il prosieguo dello studio in tal senso.

| | C₀=10,56 μmol/l | C₀=17,60 μmol/l |
|---|---|---|
| Controllo | t ₉₀ = 74h, 44 min. e 32 sec. calcolato sulla retta fra i due punti 44 ore e 00 min. e 83 ore e 21 min | t ₉₀ = 67 h, 15 min. e 25 sec. calcolato sulla retta fra i due punti 37 ore e 00 min. e 50 ore e 11 min. |
| <i>Styela plicata</i> | t ₉₀ = 41 h, 43 min. e 57 sec. calcolato sulla retta fra i due punti a 36 h e 33 min. e 44 h e 00 min | t ₉₀ = 46 h, 18 min. e 58 sec. calcolato sulla retta fra i due punti a 50 ore e 11 min. e 75 ore e 55 min. |
| tabella 4.0 – risultati degli esperimenti riportati nelle figure 4.10 - 4.11 | | |

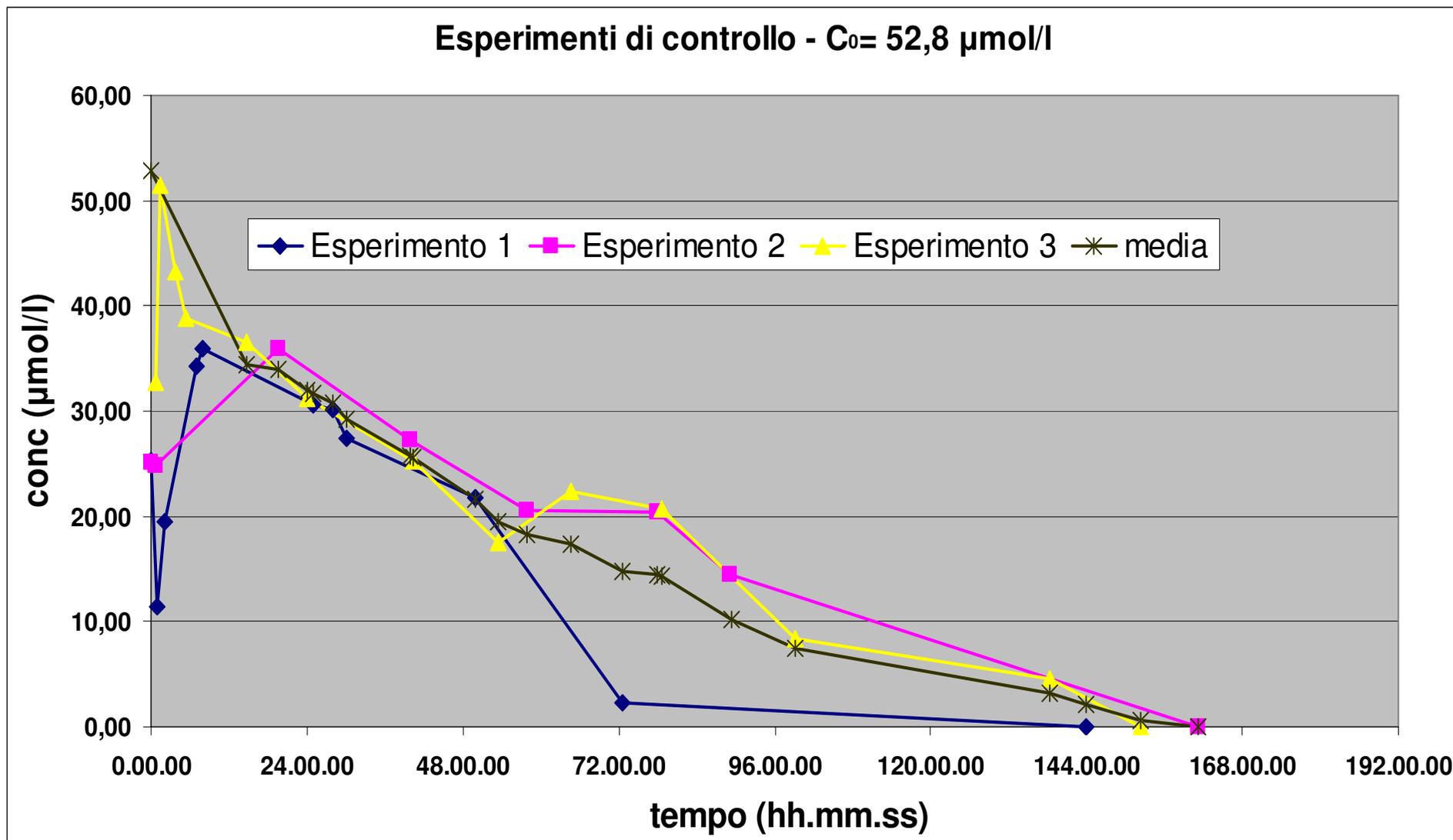


figura 4.7 – confronto dei tre esperimenti di controllo delle figg. 4.2 – 4.4

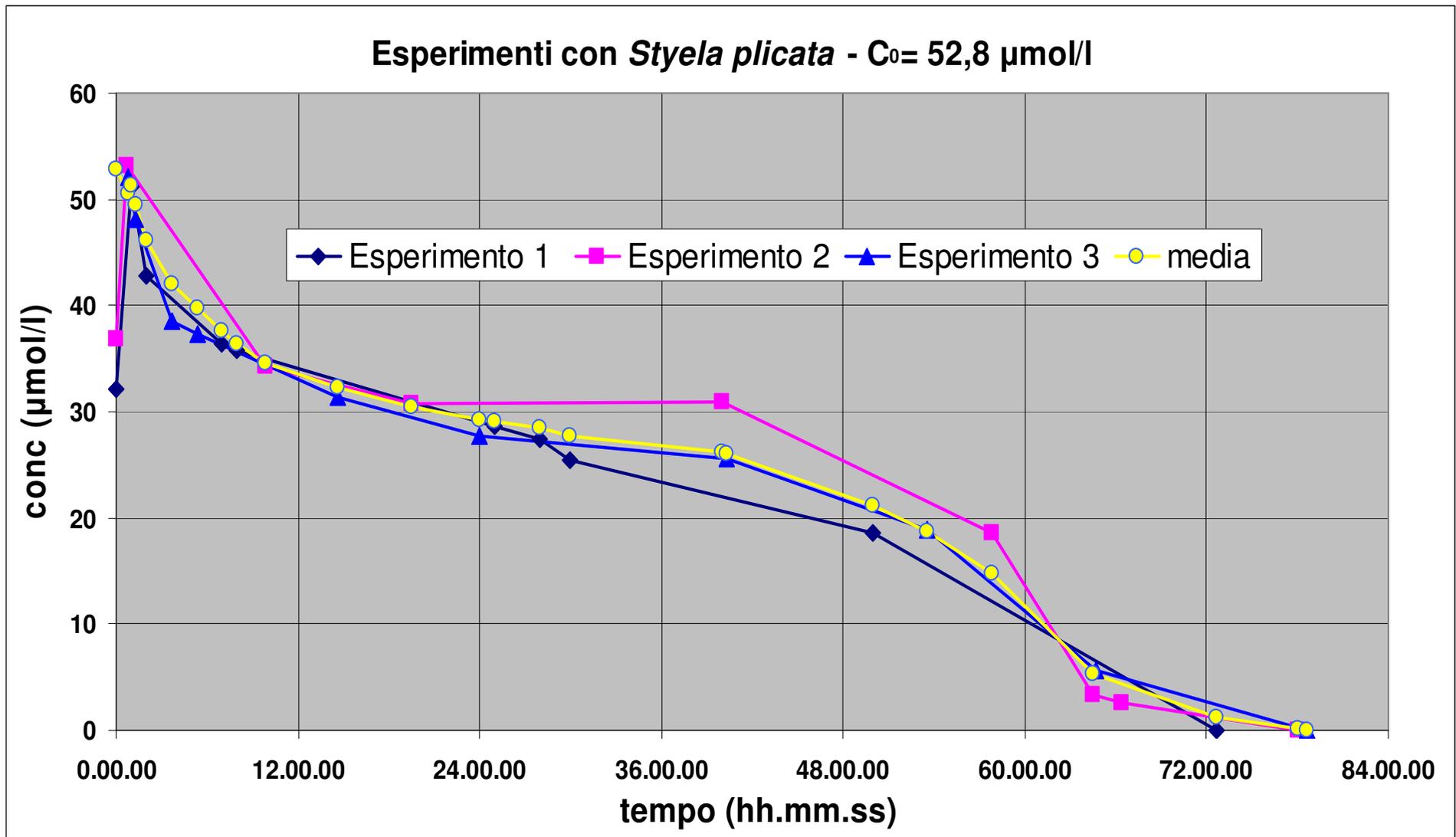


figura 4.8 – confronto dei tre esperimenti con le ascidie delle figure 4.2 – 4.4

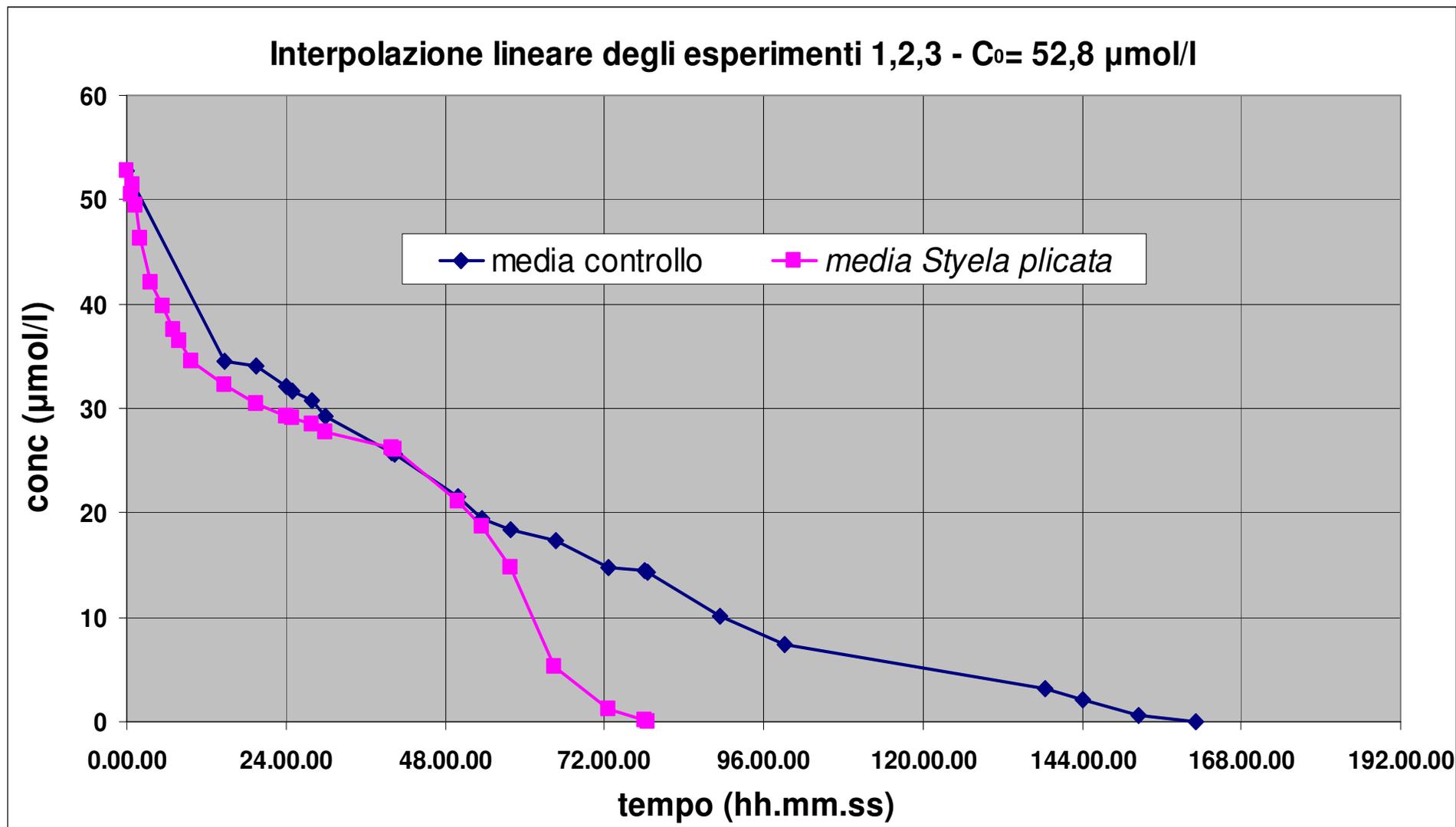


figura 4.9 – interpolazione dei tre esperimenti delle figure 4.2 – 4.4

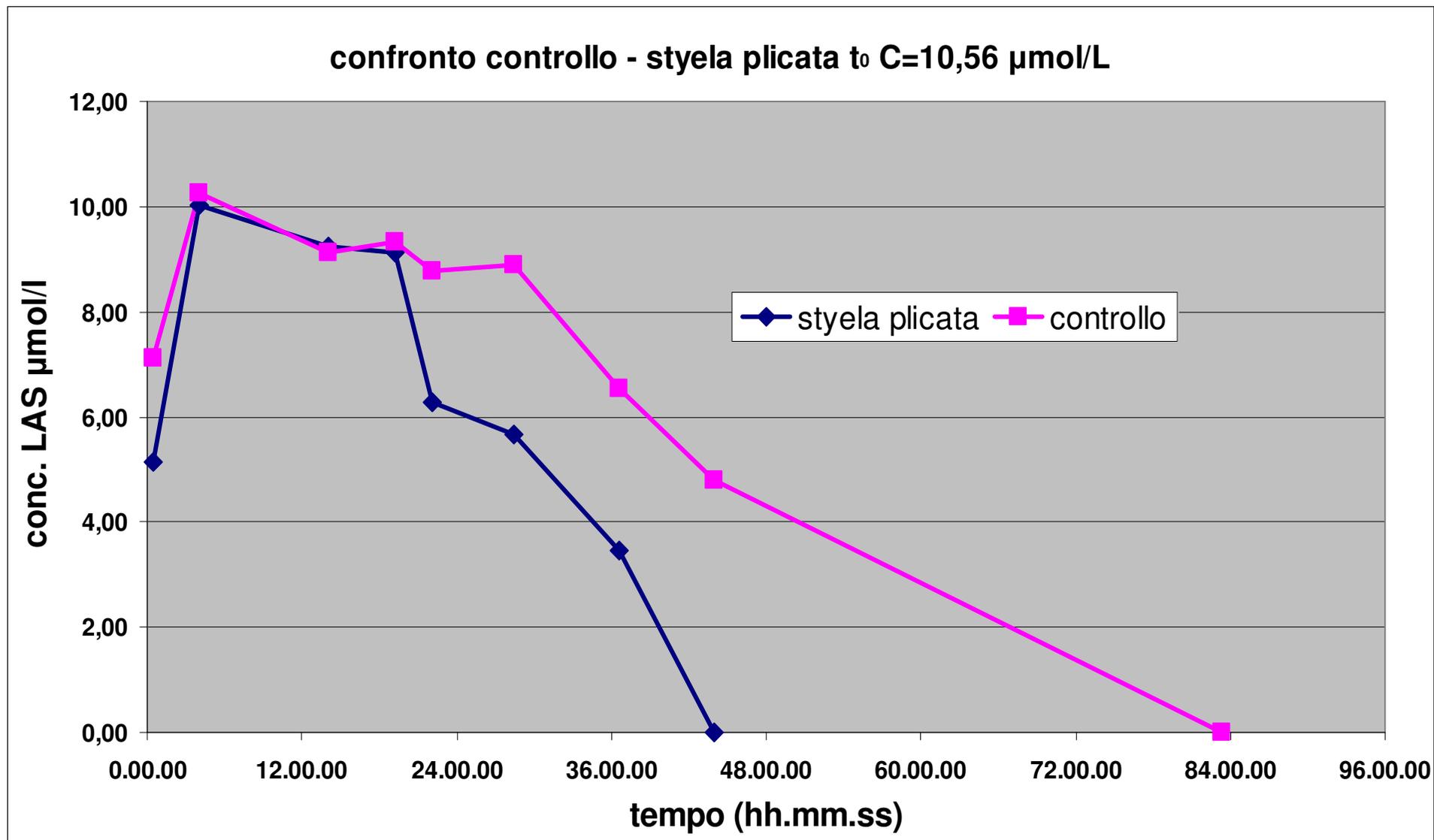


figura 4.10 – confronto controllo – *Styela plicata* a t₀ C=10,56 μmol/l

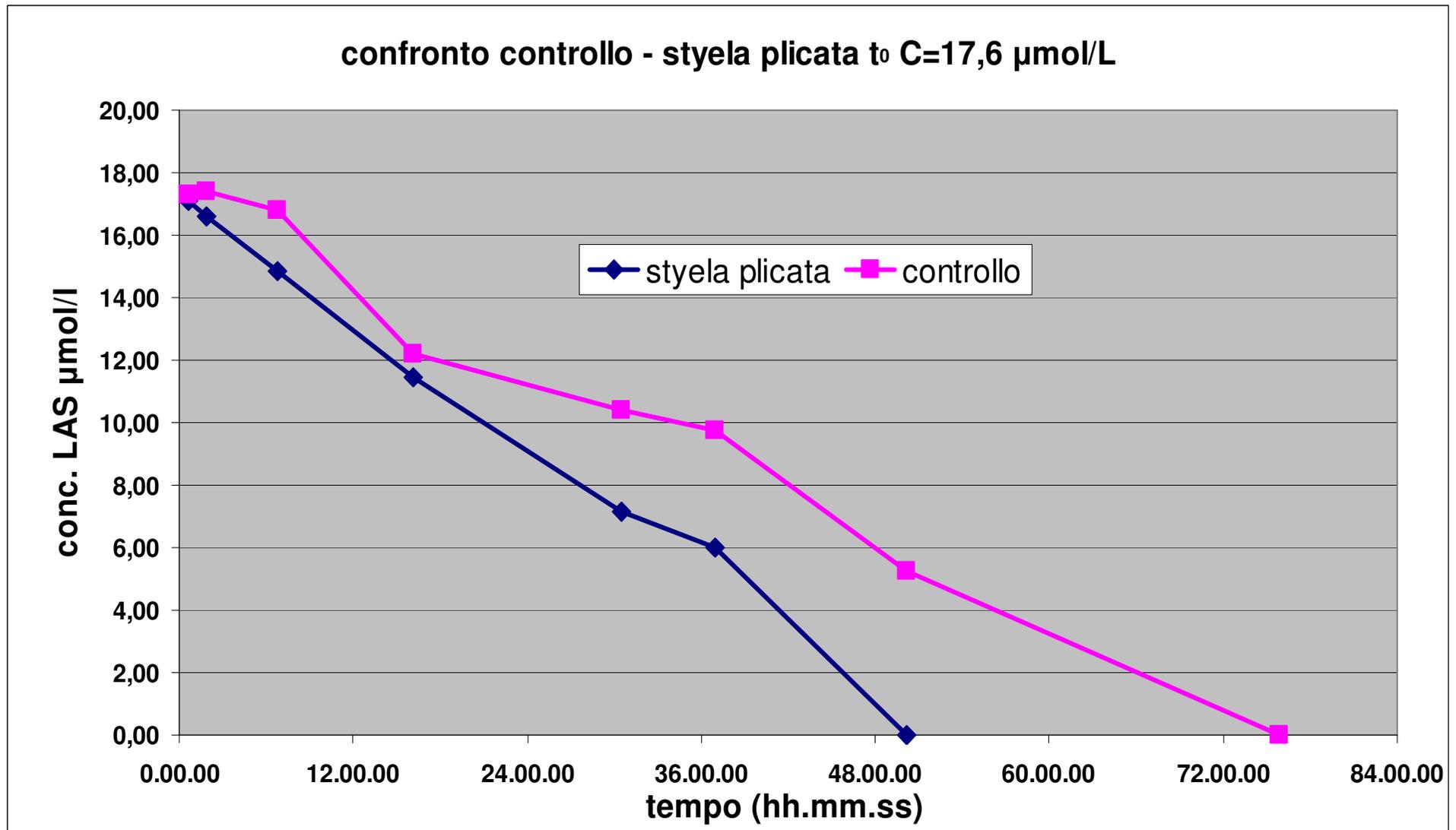


figura 4.11 – confronto controllo – *Styela plicata* a t_0 C=17,6 $\mu\text{mol/l}$

4.1.2 Dose Massima Tollerata e Dose Letale di 1-(*p*-sulfonil)nonano per la *Styela plicata*

Si definisce Dose Massima Tollerata (DMT), la concentrazione d'inquinante introdotto per cui, a basse concentrazioni di fosfati ($0,2 \div 0,4$ ppm) nella vasca sperimentale, alcuni organismi mostrano i primi segni d'insofferenza (valore 2 o 3 della scala di tab. 4.1).

Si definisce Dose Letale (DL) la concentrazione d'inquinante superiore alla Dose Massima Tollerata che, nelle 24 h dalla somministrazione, induce per tutti gli organismi decisi segnali di malessere e che nei giorni successivi ne induce la morte (valore 9 della scala di tab. 4.1).

In base ai valori riportati nelle tabelle 4.2 e 4.3 si sono costruiti rispettivamente i grafici di fig. 4.13 e di fig. 4.14. Entrambi gli esperimenti sono stati eseguiti con 6 individui (peso secco esperimento 1 10,91 g – esperimento 2 – 10,61 g) della specie *Styela plicata*.

Come si può osservare dai grafici e dalle tabelle, le condizioni delle ascidie risentono lievemente dell'inevitabile e graduale aumento della concentrazione degli ortofosfati, che è causato dalle loro stesse deiezioni. Questo avviene perlomeno fino alla concentrazione iniziale di $5,28 \mu\text{mol/l}$ ed in modo maggiore all'aumentare di quest'ultima.

Per concentrazioni iniziali di 1-(*p*-sulfonil)nonano pari a $10,56 \mu\text{mol/l}$, in entrambi gli esperimenti si riscontra la condizione 4 di tab. 4.1 al 3° giorno di prova dopo il cambio d'acqua e la successiva reintroduzione dell'inquinante. Da ciò si deduce che la DMT sperimentale è compresa tra i valori di $5,28 \div 10,56 \mu\text{mol/l}$. Il comportamento varia di poco per la concentrazione iniziale di $17,60 \mu\text{mol/l}$, mentre si sperimenta la DL alla concentrazione di $52,80 \mu\text{mol/l}$. Poche ore dopo l'introduzione di tali quantità dell'inquinante, tutti gli organismi chiudono i loro sifoni e solo dal terzo giorno in poi si osserva la formazione di chiazze bianche sulle loro tuniche, a conferma di un incipiente stato di decomposizione.

| Valore | Condizioni |
|----------|--|
| 1 | tutti gli organismi in vasca godono di buona salute; hanno tutti i sifoni ben aperti |
| 2 | meno del 30 % degli organismi hanno i sifoni socchiusi |
| 3 | meno del 50 % degli organismi hanno i sifoni socchiusi |
| 4 | meno del 30 % degli organismi hanno i sifoni chiusi |
| 5 | tutti gli organismi o quasi hanno i sifoni socchiusi |
| 6 | meno del 50 % degli organismi hanno i sifoni chiusi |
| 7 | tutti gli organismi o quasi hanno i sifoni chiusi |
| 8 | meno del 50 % degli organismi sono morti |
| 9 | tutti gli organismi o quasi sono morti |
| 0 | esperimento interrotto |

tabella 4.1 – associazione di valori numerici alle condizioni vitali della *Styela plicata*

| conc iniziale inquinante $\mu\text{mol/l}$ | conc. Fosfati mg/l | condizione organismi | conc. Fosfati mg/l | condizione organismi | conc. Fosfati mg/l | condizione organismi |
|--|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| t=0 | dopo 1 giorno | dopo 1 giorno | dopo 2 giorni | dopo 2 giorni | dopo 3 giorni | dopo 3 giorni |
| 0,53 | 0,125 | 1 | 0,224 | 1 | 0,338 | 2 |
| 1,06 | 0,155 | 1 | 0,216 | 1 | 0,347 | 2 |
| 5,28 (DMT) | 0,128 | 1 | 0,249 | 1 | 0,373 | 2 |
| 10,56 | 0,172 | 1 | 0,288 | 2 | 0,356 | 4 |
| 17,60 | 0,188 | 2 | 0,273 | 3 | 0,374 | 5 |
| 52,80 (DL) | 0,175 | 7 | 0,312 | 8 | 0,417 | 9 |

tabella 4.2 – esperimento 1 di determinazione della DMT e la della DL di 1C9-LAS per l'ascidia *Styela plicata*

| Conc iniziale inquinante $\mu\text{mol/l}$ | conc. Fosfati mg/l | condizione organismi | conc. Fosfati mg/l | condizione organismi | conc. Fosfati mg/l | condizione organismi |
|--|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| t=0 | dopo 1 giorno | dopo 1 giorno | dopo 2 giorni | dopo 2 giorni | dopo 3 giorni | dopo 3 giorni |
| 0,53 | 0,133 | 1 | 0,208 | 1 | 0,298 | 2 |
| 1,06 | 0,162 | 1 | 0,222 | 1 | 0,304 | 2 |
| 5,28 (DMT) | 0,175 | 1 | 0,239 | 2 | 0,312 | 3 |
| 10,56 | 0,121 | 2 | 0,288 | 2 | 0,392 | 4 |
| 17,60 | 0,139 | 1 | 0,280 | 3 | 0,336 | 4 |
| 52,80 (DL) | 0,162 | 6 | 0,348 | 8 | 0,425 | 9 |

tabella 4.3 – esperimento 2 di determinazione della DMT e la della DL di 1C9-LAS per l'ascidia *Styela plicata*

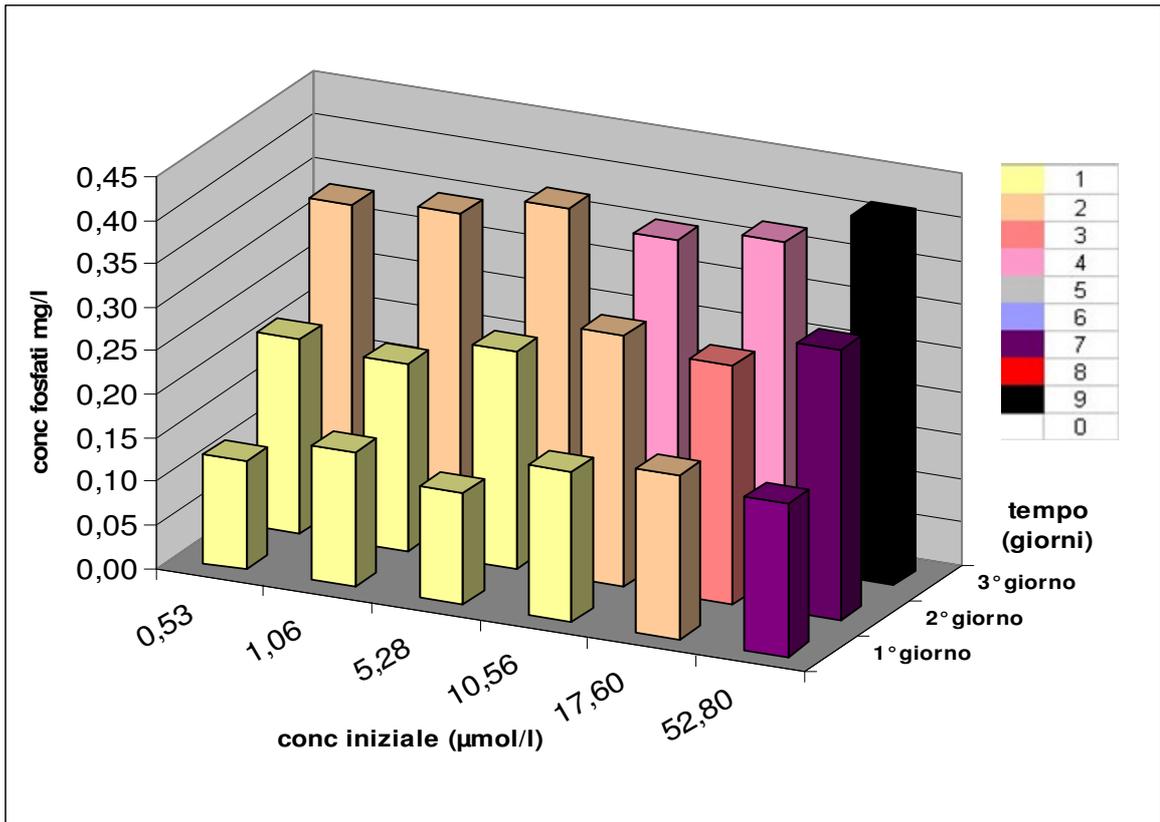


figura 4.13 – esperimento 1 DMT – DL di 1C9-LAS per *Styela plicata*

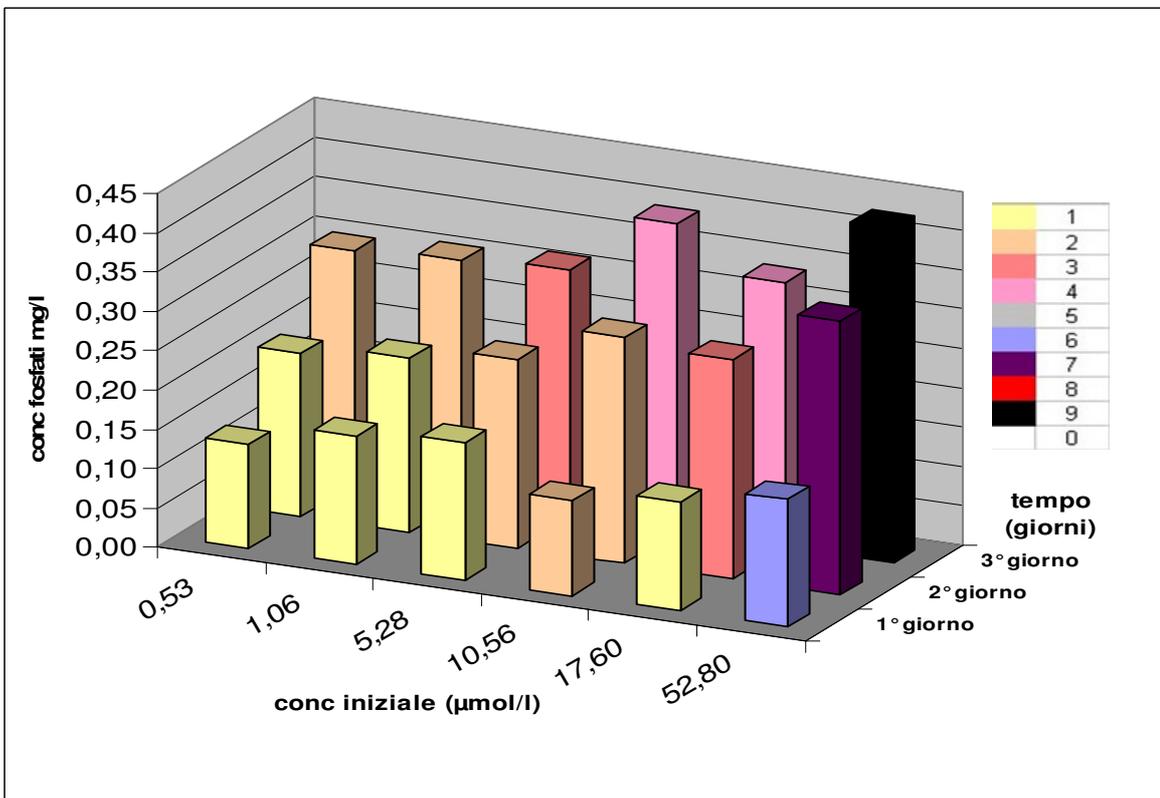


figura 4.14 – esperimento 2 DMT – DL di 1C9-LAS per *Styela plicata*

4.1.2.1 Differenza applicativa tra Dose Massima Tollerata e Dose Letale

Oltre ai motivi appena menzionati, è sembrato rilevante determinare sperimentalmente la DMT e la DL, perchè dal punto di vista applicativo rappresentano due limiti progettuali. Per concentrazioni inferiori alla DMT è possibile progettare applicazioni di biorimediazione, in quanto gli organismi che mostrano la peculiarità di accelerare la biodegradazione dell'inquinante, nell'intervallo compreso tra 0 e DMT tollerano bene quest'ultimo.

Per concentrazioni comprese tra la DMT e la DL, è teoricamente ancora possibile progettare applicazioni aumentando la densità di biomassa. La dose che, infatti, risulta mal tollerata da una certa quantità d'organismi, potrebbe essere in teoria molto meglio tollerata, qualora in loco fosse presente una quantità d'organismi superiore. Ad avvalorare tale affermazione vi è un esperimento a $C_0=52,8 \mu\text{mol/l}$, effettuato in presenza di 11 individui di *Styela plicata*, dal peso secco di 15,864 g.

I risultati ottenuti sono riportati in fig. 4.15, e come si vede dal confronto tra le due curve, a parità di C_0 la degradazione dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano avviene più velocemente in presenza di un maggior numero di animali, che tra l'altro, come evidenziato in fig. 4.16, soffrono notevolmente meno rispetto a quanto osservato negli esperimenti di fig. 4.13 e 4.14.

Infine, per concentrazioni superiori alla DL non è più possibile neanche teoricamente progettare delle applicazioni, in quanto dosi superiori alla DL sarebbero letali per qualsiasi quantità di biomassa.

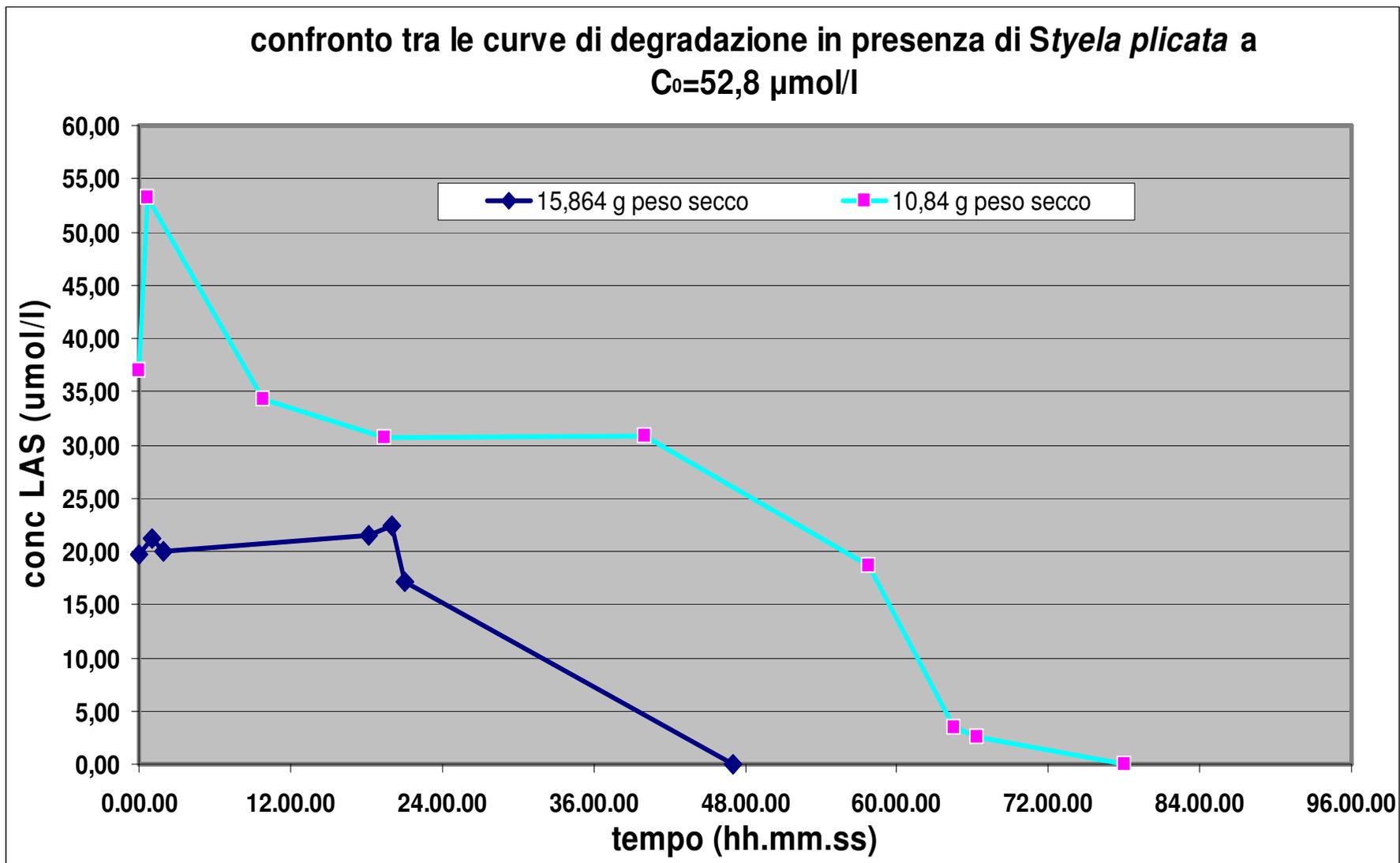


figura 4.15 – confronto fra curve di degradazione di 1C9-LAS con differenti quantità di individui

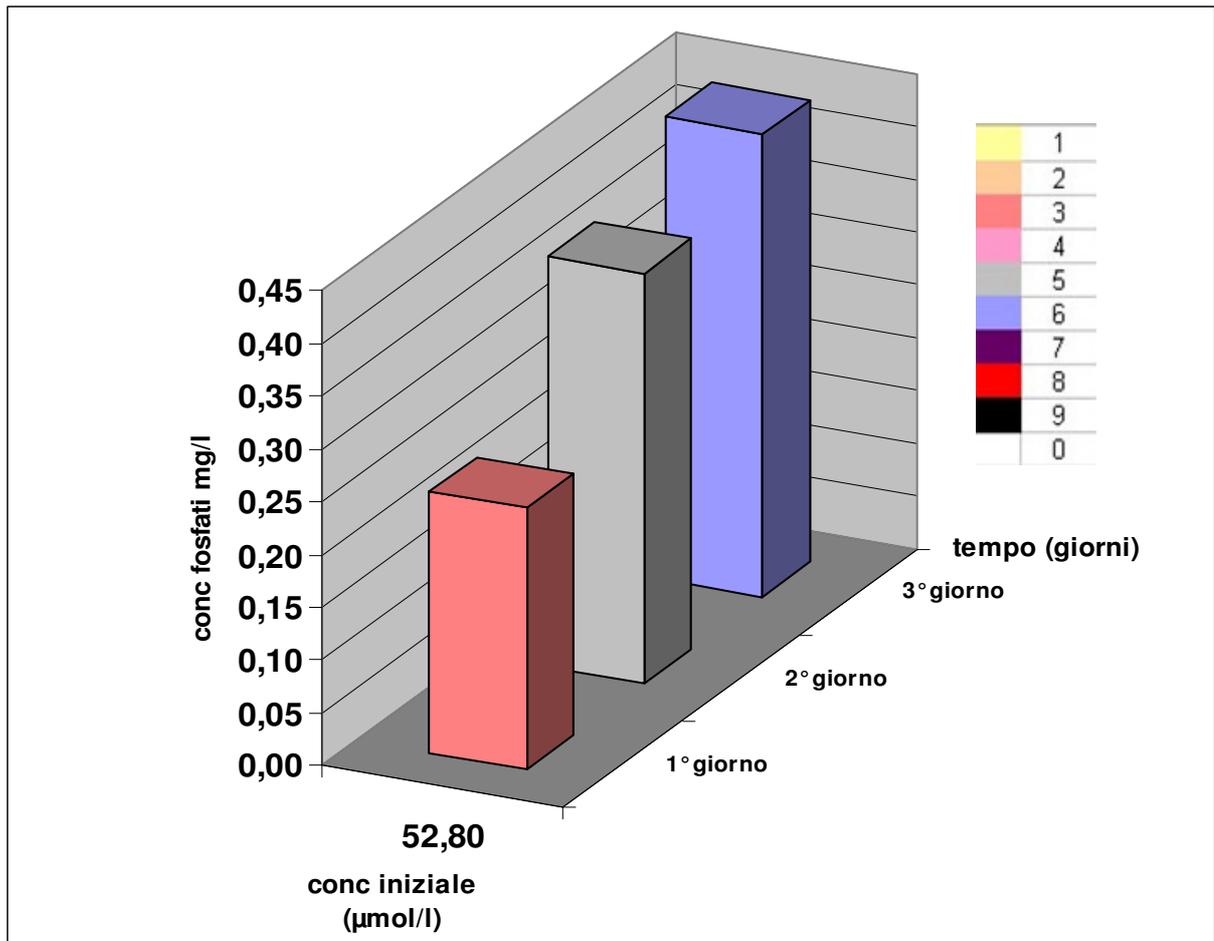


figura 4.16 – condizioni di 11 individui di *Styela plicata* in presenza di 1C9-LAS ($C_0=52,80 \mu\text{mol/l}$)

4.1.3 Salinità Minima Tollerata dalla *Styela plicata*

Così come la DMT e la DL, anche la SMT (Salinità Minima Tollerata) va intesa soprattutto come un parametro che fornisce informazioni sulla reale possibilità di progettare applicazioni di biorimediazione nei pressi delle foci e degli scarichi d'acqua dolce. Si fa notare che tale parametro fornisce anche indicazioni sulla capacità dell'organismo ad adattarsi a queste variazioni in tempi relativamente brevi. Sono note, infatti, località marine in cui cresce questa specie di ascidia, in condizioni di salinità inferiori a questo valore di SMT ricavato sperimentalmente. Probabilmente organismi cresciuti in quegli ambienti potrebbero tollerare condizioni di salinità ancora più basse rispetto a quelle in cui sono state rinvenute. In tab. 4.4 sono riportati i dati relativi all'esperimento di determinazione della SMT. Segue il grafico di fig. 4.17 da cui si osserva come per valori di salinità compresi tra $28,2 \div 24,5$ ppt il relativo peggioramento delle condizioni degli organismi, va imputato al naturale innalzamento degli ortofosfati, mentre per valori compresi tra $24,5 \div 20,2$ ppt le condizioni degli organismi

peggiorano sensibilmente (valori 6 – 7 della tab. 4.1) anche a basse concentrazioni di ortofosfati (0,1782 mg/l). Si deduce pertanto che la SMT è compresa tra i valori 28,2 ÷ 24,5 ppt.

| tempo hh.mm.ss. | salinità ppt | conc. Fosfati mg/l | condizioni organismo |
|------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 0.00.00 | 37,8 | 0,0092 | 1 |
| 21.15.00 | 35,4 | 0,042 | 1 |
| 26.00.00 | 33,0 | 0,0887 | 1 |
| 78.15.00 | 30,7 | 0,1873 | 2 |
| 140.00.00 | 30,7 | 0,3827 | 3 |
| 145.40.00 | 28,2 | 0,0098 | 1 |
| 332.45.00 | 28,2 | 0,4211 | 4 |
| 337.00.00 | 28,2 | 0,0086 | 2 |
| 337.30.00 | 24,5 | 0,0432 | 3 |
| 363.20.00 | 24,5 | 0,102 | 3 |
| 385.10.00 | 20,2 | 0,1782 | 6 |
| 391.40.00 | 20,2 | - | 7 |
| 392.00.00 | 20,2 | - | 0 |

tabella 4.4 – esperimento di determinazione della SMT da *Styela plicata*

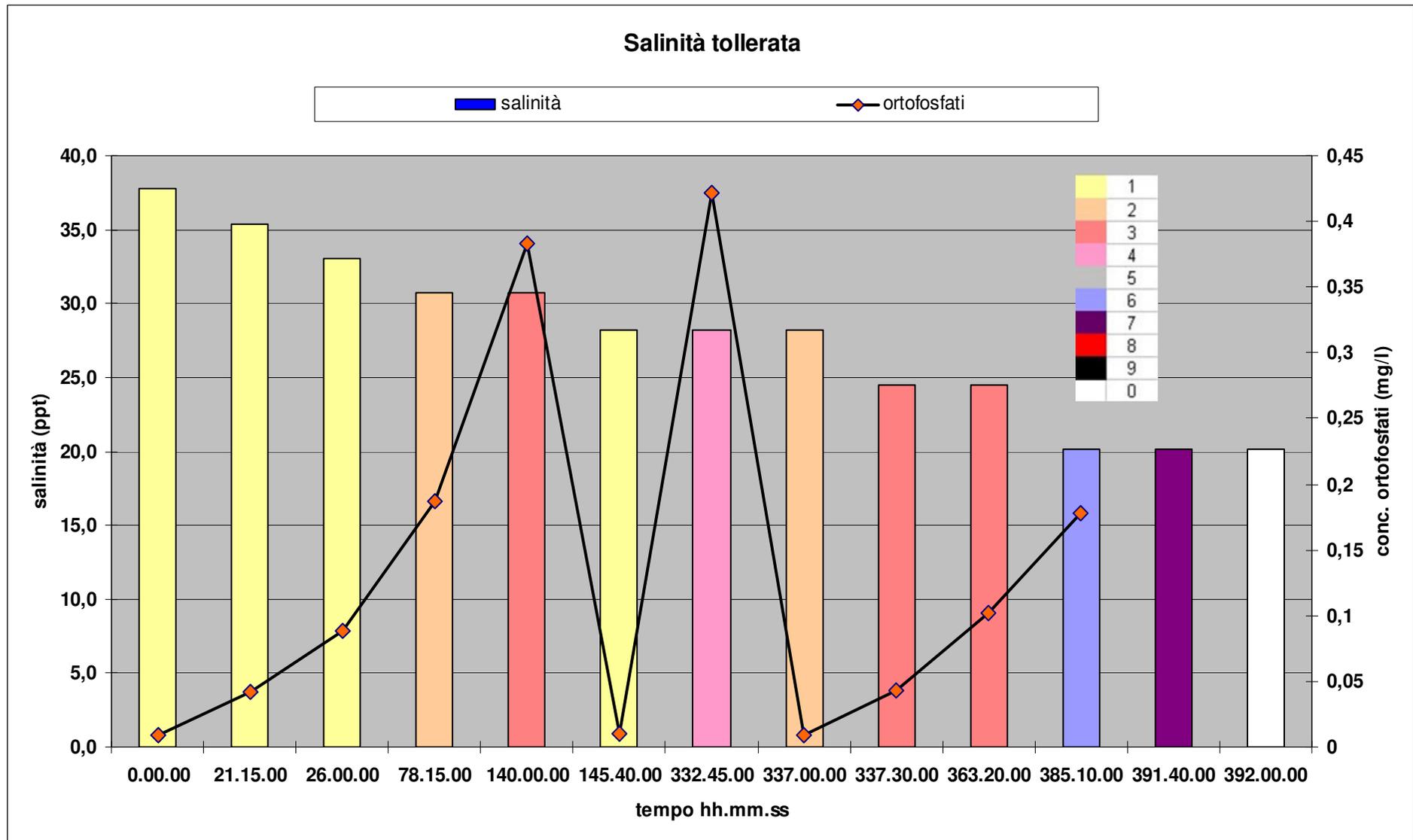


figura 4.17 – determinazione della SMT da *Styela plicata*

4.1.4 Accumulo dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano in *Styela plicata*

La determinazione della quantità di 1-(*p*-sulfofenil)nonano accumulato dalla *Styela plicata* fornisce dirette informazioni sulla reale capacità di filtrazione o d'accumulo dell'inquinante da parte di tali organismi. In tab. 4.5 ed in fig. 4.18 sono riportati i risultati inerenti agli esperimenti condotti ai fini su esposti, dai quali emerge quanto sia decisivo l'uso del sonicatore: un aumento di ½ ora di sonicazione, infatti, comporta l'estrazione di oltre 1 µmol/g col solvente misto cloroformio:metanolo 1:1. L'uso di questo solvente, inoltre, sembra essere maggiormente estraente rispetto ad acetonitrile:acqua 1:1, probabilmente per il fatto che il primo riesce a rompere le membrane cellulari e ad estrarre dunque quanto in esse è contenuto.

In tab. 4.6, in base ai valori d'accumulo espressi in termini di µmol/g di peso secco, si sono definiti gli intervalli d'accumulo percentuale dell'1C9-LAS in due diversi esperimenti, in altre parole in due diversi insiemi di organismi, uno dal peso secco di 10,84 g ed un altro dal peso secco di 10,77 g.

Come si deduce dal grafico di fig. 4.19, il fenomeno d'accumulo, nel caso dell'insieme di organismi dal peso secco di 10,84 g, sembra essere poco rilevante. A 78 h e 2 min. dall'inizio degli esperimenti si nota come si sia degradato il 100% dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano in presenza di *Styela plicata* e solo il 61,44% in presenza dei soli microrganismi marini. Un accumulo di sostanza nei tessuti pari al 3,78% delle moli di composto introdotte all'istante t_0 non basta a giustificare una differenza del 38,56% tra le percentuali di degradazione osservate nei due esperimenti. Stando a questi valori, infatti, solo circa un 10% della scomparsa di 1-(*p*-sulfofenil)nonano può essere attribuita all'accumulo negli organismi e non ad una reale degradazione occorsa. Detto in altri termini delle 610,8 µmol di 1C9-LAS residue nell'acquario senza ascidie (20,36 µmol/l) all'istante 78 h e 2 min. solo 62,19 µmol si sono accumulate negli organismi presenti nell'acquario dell'altro esperimento. L'accelerazione della biodegradazione dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano non può essere pertanto addebitata ad un accumulo dell'inquinante sui tessuti degli animali, o all'interno di essi.

Accanto al risultato dell'accelerazione della biodegradazione dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano, che emerge dai dati interpolati negli esperimenti di fig. 4.9, i dati che emergono dalla fig. 4.19 sono altrettanto importanti ed andrebbero sempre ricercati in una corretta sperimentazione tesa a correlare la reale capacità di biorimediare di un particolare organismo con la scomparsa di un qualsiasi inquinante. Non va dimenticato, infatti, che è logico parlare di biorimediazione qualora gli inquinanti, diminuendo di concentrazione

nell'ambiente marino, perdono al tempo stesso (o perlomeno la riducono) la loro dannosità. Quando i composti inquinanti si trasferiscono dall'ambiente marino all'interno degli organi e dei tessuti degli organismi, è corretto parlare solo di bioaccumulo. Questo presupporrebbe, sia in una fase progettuale, sia di realizzazione dell'applicazione di biorimediazione, che l'organismo fosse poi trattato esso stesso come un rifiuto, esattamente come avviene per i fanghi attivi di un impianto di depurazione.

C'è da evidenziare, tuttavia, che i valori di accumulo di 1C9-LAS riscontrati nei due diversi insiemi di organismi, andrebbero ricavati anche per concentrazioni inferiori a quella della DL (dose letale), in modo da verificare se l'accumulo si prolunga nel tempo, oppure se si risolve completamente una volta completata la degradazione del composto stesso.

| Area media picco HPLC | Conc. $\mu\text{mol/l}$ | dev st. | Vol. estrazione in ml | Miscela solvente di estrazione | Peso secco organismi in g | Accumulo inquinante $\mu\text{mol/g}$ | dev. st. | Tempo di sonicazione |
|-----------------------|-------------------------|---------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|------------|----------------------|
| 455004,02 | 247,28 | 29,26 | 200 | cl:me 1:1 | 10,84 | 4,56 | $\pm 0,54$ | 1/2 ora |
| 479378,67 | 260,53 | 15,53 | 200 | cl:me 1:1 | 10,77 | 4,84 | $\pm 0,29$ | 1 ora |
| 569812,81 | 309,68 | 25,22 | 200 | cl:me 1:1 | 10,84 | 5,71 | $\pm 0,47$ | 1 ora |
| 353122,69 | 191,91 | 12,03 | 250 | acnt:acq 1:1 | 10,77 | 4,46 | $\pm 0,28$ | 1 ora |
| 403277,45 | 219,17 | 12,93 | 250 | acnt:acq 1:1 | 10,84 | 5,05 | $\pm 0,30$ | 1 ora |

tabella 4.5 – esperimenti di accumulo 1C9-LAS in 6 individui di *Styela plicata*; $C_0=52,80 \mu\text{mol/l}$

| Condizioni di estrazione | peso secco (g) | accumulo 1C9-LAS ($\mu\text{mol/g}$) | dev. st ($\mu\text{mol/g}$) | 1C9-LAS tot (μmol) | | accumulo % |
|------------------------------------|-----------------------|--|---|---|--------------------------|-------------------|
| cl:me 1:1; 1/2h sonicaz.; 10,84 g | 10,84 x | 4,56 | $\pm 0,54 =$ | 48,89 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,09 |
| | | | | 49,97 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,15 |
| cl:me 1:1; 1h sonicaz.; 10,84 g | 10,84 x | 5,71 | $\pm 0,29 =$ | 61,61 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,89 |
| | | | | 62,19 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,93 |
| cl:me 1:1; 1h sonicaz.; 10,77 g | 10,77 x | 4,84 | $\pm 0,46 =$ | 51,66 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,26 |
| | | | | 52,59 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,32 |
| actn:acq 1:1; 1h sonicaz.; 10,84 g | 10,84 x | 5,05 | $\pm 0,30 =$ | 54,44 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,44 |
| | | | | 55,04 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,47 |
| actn:acq 1:1; 1h sonicaz.; 10,77 g | 10,77 x | 4,46 | $\pm 0,28 =$ | 47,75 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,01 |
| | | | | 48,31 | $\div 1584 \times 100 =$ | 3,05 |

tabella 4.6 – intervalli di accumulo % 1C9-LAS in *Styela plicata*

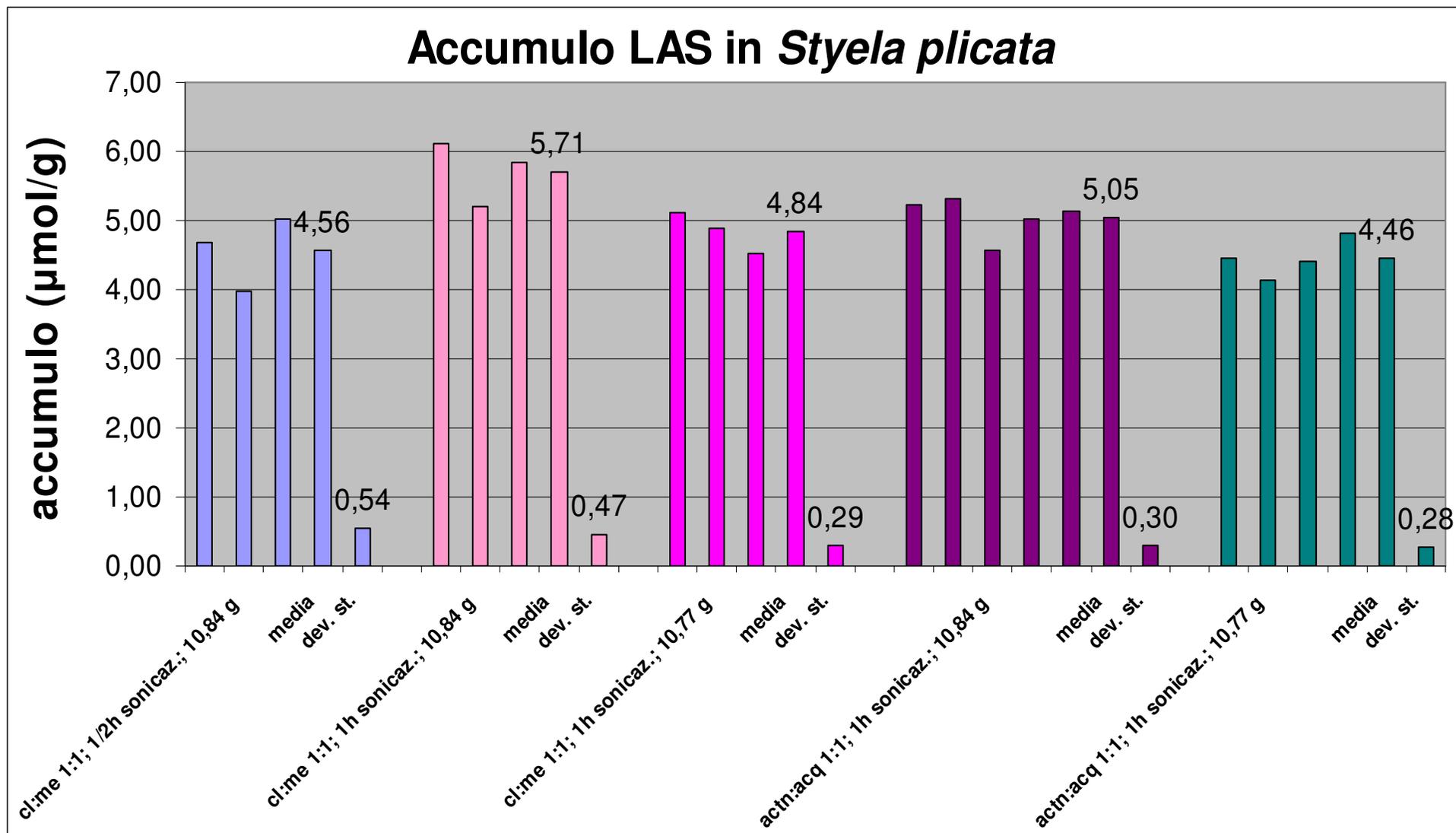


figura 4.18 – accumulo 1C9-LAS in *Styela plicata*

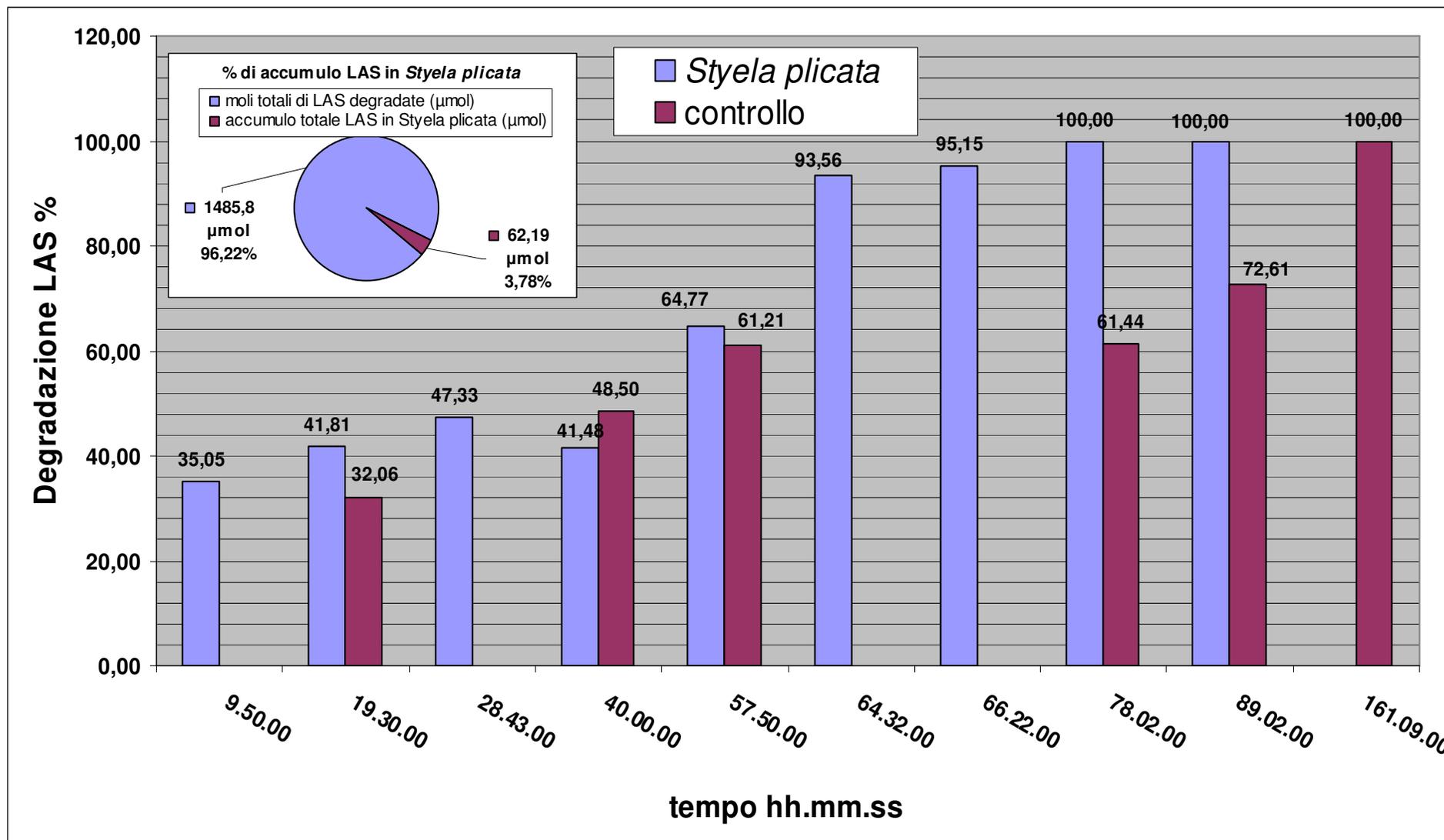


figura 4.19 – avanzamento della degradazione di 1C9-LAS in presenza ed in assenza di *Styela plicata*

Conclusioni e prospettive

Gli ecosistemi marini che sono maggiormente a rischio d'inquinamento sono in prima analisi: le foci dei fiumi, che raccolgono le acque reflue e le acque piovane inquinate dall'atmosfera e dal suolo, i porti, in cui si concentrano gli idrocarburi ed altri generi d'inquinanti chimici, le lagune in cui sussistono condizioni di bassa idrodinamicità e di spiccato eutrofismo, le spiagge e le coste degli ecosistemi menzionati, in prossimità di sbocchi fognari e di sversamenti accidentali di greggio, o altri composti chimici trasportati sulla superficie, o sul fondo del mare.

Affinché la biorimediazione si diffonda effettivamente, la biomassa collegata al suo impiego dovrebbe soddisfare ad alcuni precisi requisiti. Essa dovrebbe innanzi tutto poter adattarsi, crescere e svilupparsi abbastanza rapidamente negli ecosistemi inquinati o nei pressi delle fonti d'inquinamento considerate. La sua crescita, se sufficientemente veloce, deve poter essere controllata per scongiurare il pericolo d'infestazioni o d'inquinamenti biologici. Le sostanze inquinanti, in sua presenza, si dovrebbero degradare, completamente e quanto più rapidamente possibile in acqua ed anidride carbonica, od in composti di tossicità sempre più ridotta. Essa, in altre parole, non dovrebbe accumulare le sostanze inquinanti, ma favorirne la degradazione. Qualora accumulasse andrebbe trattata essa stessa come un rifiuto. Infine, dovrebbe poter trovare un utilizzo eco-sostenibile. A tal proposito, l'uso alimentare diretto alla specie umana non è attualmente preso neanche in considerazione e probabilmente nella quasi totalità dei casi sarà da escludere. L'uso alimentare indiretto, ovvero la sua somministrazione a specie successivamente edibili dall'uomo, è attualmente preso in considerazione. Soprattutto però, va attentamente valutata la possibilità di poter estrarre da questa biomassa delle sostanze utili all'uomo come farmaci, concimi, combustibili, ecc.

Lo studio finora condotto va quindi inquadrato nell'ambito di un vasto campo di ricerca di base. Ad esso, nel suo piccolo, si è cercato di dare un taglio di tipo applicativo, evidenziando, quando possibile, i collegamenti tra i risultati di cui si è andati alla ricerca e di quelli provenienti da altri studi, con gli aspetti pratici appena evidenziati. Si è inteso approcciarsi metodicamente alla ricerca nel campo della biorimediazione, che vede coinvolte per il suo stesso sviluppo competenze scientifiche molto diverse. Solo attraverso una collaborazione sinergica tra biologi, ecologi, ingegneri, chimici, tossicologi, geologi si potrà giungere allo sviluppo di efficaci applicazioni nel campo della biorimediazione.

In sintesi l'ascidia *Styela plicata* ha mostrato di essere un potenziale organismo biorimediatore per il tensioattivo 1-(*p*-sulfofenil)nonano in quanto ha più che dimezzato i suoi

normali tempi di degradazione. Di là dai limiti specifici delle tecniche sperimentali, i risultati ottenuti sono senz'altro incoraggianti. Resta infatti da interrogarsi sull'utilità applicativa della corretta interpretazione del quando e del perché le micelle si disgregano, in modo da poter seguire regolarmente la diminuzione di concentrazione dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano; oppure su quanto sia importante definire un protocollo sperimentale per contenere i fenomeni di adsorbimento sulle pareti degli acquari o del materiale accessorio presente in essi. A tal proposito si potrebbero definire le misure degli acquari, il materiale con cui costruirli, i mezzi con cui ossigenarli, ecc. Con l'adozione di un protocollo del genere non solo rimarrebbe valido il risultato comparativo tra l'esperimento di controllo e quello con l'organismo in vasca, essendo stati effettuati nelle medesime condizioni sperimentali, ma i risultati potrebbero essere così comparati in assoluto tra di loro.

Restano infine aperti gli interrogativi sulla reale solubilità del tensioattivo 1-(*p*-sulfofenil)nonano sperimentato, e quindi su un'eventuale e parziale precipitazione dello stesso sia nella fase di dissoluzione sia in quella di avanzamento dell'esperimento. Non sarebbe da escludere, infatti, una parziale scomparsa dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano per inglobamento e precipitazione di particelle eliminate dai filtratori stessi, o eventualmente presenti nell'acqua di mare non filtrata.

I risultati relativi alla Salinità Minima Tollerata sembrano essere anch'essi promettenti se si pensa alla possibilità di spostare ascidie allevate in aree con salinità tipiche del Mediterraneo, in aree prospicienti le foci fluviali e gli scarichi d'acqua dolce. La *Styela plicata*, infatti, sembra tollerare una diminuzione di salinità di oltre 10 ppt.

Dal paragone con i dati di bibliografia¹⁷ (Vengatesen Thiagarajan et al., 2003), si osserva inoltre che il limite di SMT, ricavato con esperimenti basati su osservazioni visive delle condizioni degli organismi, in corrispondenza delle variazioni di salinità, risulta in perfetto accordo con i dati relativi al mancato sviluppo delle larve metamorfosate di *Styela plicata* alla salinità di 22 ppt, ed alla mancata schiusa delle uova fertilizzate alle salinità di 22 e 26 ppt a qualsiasi temperatura.

Gli esperimenti di accumulo, infine, mostrano che le quantità accumulate sono relativamente basse. All'istante in cui nella vasca con le ascidie scompare il 100% dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano, nella vasca di controllo è presente ancora il 38,24%, e le percentuali di accumulo comprese tra 3,01 ÷ 3,93 % rappresentano circa un decimo della quantità stimata

nella vasca di controllo. In altre parole il 34,31% netto dell'1-(*p*-sulfofenil)nonano totale, scompare a causa della presenza delle ascidie.

La tab. 5.1 riassume i dati sperimentali salienti acquisiti durante lo svolgimento dello studio.

| | |
|---|---|
| Dose letale 1C9-LAS (DL) | $\geq 52,80 \mu\text{mol/l}$ |
| Dosi tollerate 1C9-LAS (DMT) | $5,28 \div 10,56 \mu\text{mol/l}$ |
| Salinità minima tollerata (SMT) | $24,5 \div 28,2 \text{ ppt}$ |
| Accumulo 1C9-LAS x somministrazione dose letale | $4,18 \div 6,18 \mu\text{mol/g peso secco}$ |
| % di accumulo | $3,01 \div 3,93 \%$ |
| t_{90} 1C9-LAS in presenza di <i>Styela plicata</i> (a $52,80 \mu\text{mol/l}$ - $0,36 \text{ g peso secco/l}$) | 64 ore, 33 min. e 11 sec. |
| t_{90} 1C9-LAS in assenza di <i>Styela plicata</i> (a $52,80 \mu\text{mol/l}$) | 118 ore, 41 min. e 40 sec. |
| t_{90} 1C9-LAS in assenza di <i>Styela plicata</i> (a $52,80 \mu\text{mol/l}$) ed in Acqua di mare artificiale (ASW) | 185 ore, 16 min. e 52 sec. |
| t_{90} 1C9-LAS in assenza di <i>Styela plicata</i> (a $17,60 \mu\text{mol/l}$) | 67 ore, 15 min. e 25 sec. |
| t_{90} 1C9-LAS in presenza di <i>Styela plicata</i> (a $17,60 \mu\text{mol/l}$ $0,36 \text{ g peso secco/l}$) | 46 ore, 18 min. e 58 sec. |
| t_{90} 1C9-LAS in assenza di <i>Styela plicata</i> (a $10,56 \mu\text{mol/l}$) | 74 ore, 41 min. e 35 sec. |
| t_{90} 1C9-LAS in presenza di <i>Styela plicata</i> (a $10,56 \mu\text{mol/l}$ $0,36 \text{ g peso secco/l}$) | 41 ore, 43 min. e 11 sec. |
| tabella 5.1 - scheda riepilogativa dell'interazione tra <i>Styela plicata</i> e 1C9-LAS | |

La sperimentazione delle coppie organismo – inquinante in acquari dalle dimensioni contenute presenta degli indubbi vantaggi: economicità dello studio, tempi relativamente brevi nella preparazione, nello svolgimento e nella conclusione dell'esperimento, buon mantenimento della stabilità di importanti variabili sperimentali quali temperatura e tenore di ossigeno, buone possibilità di controllare l'asetticità del sistema. E' facilmente immaginabile, però, che un impianto pilota posto nei pressi di una foce, di uno scarico fognario, o all'interno di un'area portuale permetterebbe di compiere studi di accrescimento della biomassa, calcolo di tempi e percentuali di abbattimento di vari inquinanti e di valutare in modo concretamente più vicino alla realtà la fattibilità e la sostenibilità di un impianto di biorimediazione marina. A tal proposito, recentissimi ed ancora in fase di avanzamento, sono degli esperimenti sulla

stima della biomassa di *Mytilus galloprovincialis* e *Styela plicata* in un'area a barriere artificiali nel Nord Adriatico¹⁸

Altrettanto importante è lo studio dei possibili impieghi della biomassa filtrante ed in questa direzione la ricerca nel campo della mangimistica per allevamenti ittici, della farmacologia e della chimica delle sostanze naturali dovrebbe sempre di più orientarsi verso le specie marine che maggiormente si accrescono in aree mediamente ed altamente inquinate, sì da tentare di utilizzare in modo alternativo la biomassa non direttamente edibile, che anche per questo è maggiormente disponibile.

Come già accennato nel par. 1.2.1 recentissimi esperimenti sulla *Styela plicata* mostrano che da essa potrebbero essere estratte sostanze farmacologicamente attive come antivirali per l'epatite cronica B²⁵ (Rui Wang et al., 2006), come anticoagulanti²⁴ (Cavalcante et al., 2000) e come antimicrobici²² (Tincu et al., 2003).

Molto interessante, e con aspetti correlati al presente studio, è nell'attualità un progetto di dottorato dell'Istituto Ambiente Marino Costiero (IAMC) del CNR di Napoli. Sono infatti in fase di studio dei possibili trattamenti chimico fisici di sedimenti inquinati da Idrocarburi Policiclici Aromatici. Questi sedimenti sono trattati con degli agenti ossidanti tra i più economici, quali ferro ed acqua ossigenata ed inoltre, per solubilizzare l'inquinante, e renderlo così maggiormente ossidabile, vengono sperimentati proprio alcuni tensioattivi. La resa di rimozione degli IPA sembra essere decisamente buona, la parte che rimane intrappolata nei sedimenti e la porzione acquosa usata per condurre l'ossidazione, rappresentano un problema che potrebbe essere affrontato con tecniche di biorimediazione. Sarebbe a tal proposito interessante sperimentare l'azione combinata di organismi bentonici filtratori quali la *Sabella spallanzani* ed il *Branchiomma luctuosum*, che vivono nei sedimenti e, per quanto riguarda la porzione acquosa, in cui è presente il tensioattivo e gli agenti ossidanti, si potrebbe provare a sperimentare proprio l'ascidia *Styela plicata*.

Bibliografia

- 1 Il globo terrestre e la sua evoluzione – Bruno Accordi, Elvidio Lupia Palmieri – Zanichelli **1987**;
- 2 Congress of the United States Office of Technology Assessment – Bioremediation for Marine Oil Spill, May **1991**;
- 3 J.R. Schwartz, J.D. Walker and L.L. Colwell – Deep sea bacteria: growth and utilization of hydrocarbons at ambient and in situ pressure – *Applied Microbiology*, vol. 28: 982 – 986, **1974**;
- 4 Treatment of Contaminated Soil, Fundamental Analysis Application – Editors: R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmano, G. Matz, **2001**;
- 5 Sphigel M., Neori A., Popper D.M., Gordin H. – A proposed model for “environmental clean” land-based culture of fish, bivalve and seaweeds – *Aquaculture*, 117: 115 – 128, **1993**;
- 6 A. Giangrande, A. Cavallo, M. Licciano, E. Mola, C. Pierri, L. Trianni – Utilization of filter feeder polychaete *Sabella spallanzanii* Gmelin (Sabellidae) as bioremediator in aquaculture - *Aquaculture International*, **2004** (in stampa);
- 7 Cavallo, dati non ancora pubblicati
- 8 A. Cavallo, A. Giangrande – Prove di sperimentazione ai fini dell'utilizzazione di *Sabella spallanzanii* (polychaeta) come biorimediatore in acquicoltura - *Biol. Mar. Medit.* 10: 438 – 440, **2002**;
- 9 M. Milanese, E. Chelossi, R. Manconi, A. Sarà, M. Sidri, R. Pronzato – The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture - *Biomolecular Engineering* 20: 363 – 368, **2003**;
- 10 World Intellectual Property Organization - Brevetto internazionale WO 02/ 055442, **2002**;
- 11 Cattaneo-Vietti R, Benatti U, Cerrano C, Giovine M, Tazioli S, Bavestrello G - A marine biological underwater depuration system (MUDS) to process waste waters - *Biomol Eng.:* 20 (4-6): 291-298, **2003**;
- 12 Burighel, P., Cloney, R.A., “Chapter 4: Urochordata: Ascidiacea”, in AAVV, Microscopic Anatomy of Invertebrates, vol. 15: Hemichordata, Chaetognatha, and the Invertebrate Chordates, pagg. 221-347, s.l., Wiley-Liss, Inc., **1997**;
- 13 Monniot, C., Monniot, F., Laboute P., "Coral Reef Ascidiaceans of New Caledonia", Parigi, Éditions de l'ORSTOM - INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION - Collection Faune tropicale n° XXX, **1991**;

- 14 Pough, F.H., Heiser, J.B., McFarland, W.N., VERTEBRATE LIFE, Third Edition, New York, Macmillan Publishing Company, **1989** (edizione italiana a cura di G. Mancino e V. D'Uva, Milano, C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana, 1993);
- 15 <http://www.pescicostieri.it/biologia/animali/tunicati.htm>;
- 16 A. Fiala – Médioni – Filter feeding ethology of benthic invertebrates (Ascidians). IV. Pumping rate, filtration rate, filtration efficiency. *Marine Biology* 48: 243 – 249, **1978**;
- 17 Vengatesen Thiyagarajan, Pei-Yuan Qian - Effect of temperature, salinity and delayed attachment on development of the solitary ascidian *Styela plicata* (Lesueur) - *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 290: 133– 146, **2003**;
- 18 E. Molin, M. Gomiero - Stime di biomassa di *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) e *Styela plicata* (lesueur, 1823) mediante monitoraggio fotografico in un'area a barriere artificiali nel Nord Adriatico – *Biol. Mar. Medit.*, **2006** (in press);
- 19 Francesca Cima, Lorian Ballarin, Giuliano Bressa, Gianbruno Martinucci, Paolo Burighel - Toxicity of organotin compounds on embryos of a Marine Invertebrate (*Styela plicata*; Tunicata) - *Ecotoxicology and environmental safety* 35: 174–182, **1996**;
- 20 Niina Tujula, Jane Radford, Sham V. Nair, David A. Raftos - Effects of tributyltin and other metals on the phenoloxidase activating system of the tunicate, *Styela plicata* - *Aquatic Toxicology* 55: 191–201, **2001**;
- 21 S. Orme and S. Kegley, - Sea squirt (*Styela plicata*) Toxicity Studies - Toxicology studies from the primary scientific literature on aquatic organisms - *PAN Pesticide Database*, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA. **2006**), <http://www.pesticideinfo.org>.
- 22 J. Andy Tincu, Lorenzo P. Menze, Rustam Azimov, Jennifer Sands, Teresa Hong, Alan J. Waring, Steven W. Taylor, and Robert I. Lehrer - Plicatamide, an Antimicrobial Octapeptide from *Styela plicata* Hemocytes - *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 278: 13546–13553, **2003**.
- 23 Mauro S. G. Pavao, Karin R. M. Aiello, Claudio C. Werneck, Luiz Claudio F. Silva, Ana-Paula Valenteş, Barbara Mulloy, Niall S. Colwelli, Douglas M. Tollefseni, and Paulo A. S. Mourao - Highly Sulfated Dermatan Sulfates from Ascidians *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 273, No. 43: 27848–27857, **1998**;
- 24 Moisés C. M. Cavalcante, Silvana Allodi, Ana-Paula Valente, Anita H. Strausi, Hélio K. Takahashii, Paulo A. S. Mourao, and Mauro S. G. Pava - Occurrence of Heparin in the Invertebrate *Styela plicata* (Tunicata) Is Restricted to Cell Layers Facing the Outside Environment - *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 275, No.46: 36189–36196, **2000**;

- 25 Rui Wang, Zhen-Lan Du, Wen-Jun Duan, Xin Zhang, Fan-Lin Zeng, Xin-Xiang Wan - Antiviral treatment of hepatitis B virus-transgenic mice by a marine organism, *Styela plicata* – *World J Gastroenterol* July 7; 12(25): 4038-4043, **2006**;
- 26 N.L. Allingher, M.P. Cava, D.C. De Jongh, C.R. Johnson, N.a. Lebel, C.L. Stevens – *Chimica Organica (II ed)* – ed. Zanichelli, **1990**;
- 27 C. Divo & G. Cardini – Primary and total biodegradation of linear alkylbenzenesulfonates – *Tenside Deterg.*, 17: 30–36, **1980**;
- 28 A. Di Corcia, L. Capuani, F. Casassa, A. Marcomini, R. Samperi - Fate of linear alkylbenzenesulfonates, coproducts, and their metabolites in sewage treatment plants and in receiving waters – *Environ. Sci. Technol.*, 33: 4119–4124, **1999**;
- 29 K. Amano, T. Fukushima, O. Nakasugi – Diffusive exchange of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) between overlying water and bottom sediment. *Hydrobiologia* 235/236: 491-499, **1992**;
- 30 T. Perez, L. Sarrazin, P. Rebouillon, J. Vacelet – First evidences of surfactant biodegradation by marine sponges (Porifera): an experimental study with a linear alkylbenzenesulfonate - *Hydrobiologia* 489: 225 – 233, **2002**;
- 31 L. Masotti – *Depurazione delle acque* – ed. Calderoni, **1999**;
- 32 Katherine R. Edwards, Joe Eugene Lepo, Michael A. Lewis - Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species – *Marine Pollution Bulletin*, 46: 1309–1316, **2003**;
- 33 P.H. Doe, M. El Emary, W.H Wade – Surfactants for producing low interfacial tension I: linear alkyl benzene sulfonates - *J.am.Oil Chem. Soc.*, 54: 570-577, **1977**;
- 34 Aminot, A. & M. Caussepier – *Manuel d'analyses chimiques en milieu marin*. CNEXO, Paris: 395 pp, **1984**;
- 35 *Nova Thalassia* 11: 123 – 132, **1990**;
- 36 Sarrazin L., Wafo W., Rebbouillon P. – Determination of a linear alkylbenzenesulfonate and its biodegradation intermediates in sea water using solid-phase extraction and RP-HPLC with UV-detection – *J. Liq. Chrom. & technol.* 22: 2511-2524, **1999**.

Ringraziamenti

Il completamento di questi studi sperimentali ha richiesto l'importante contributo di alcune persone. Desidero esplicitamente ringraziare l'amico e collega dott. Maurizio Giordano per aver messo a mia disposizione alcuni fondamentali spazi lavorativi e risorse strumentali, l'amico e collega dott. Antonio Massa per aver acquisito i dati sperimentali NMR e contribuito alla loro interpretazione, l'amico Alberto De Bonis, imminente dottore in Geologia, per aver partecipato alla prima raccolta ed al relativo trasporto degli organismi marini.

Desidero ringraziare ancora alcuni membri della Stazione Zoologica Anton Dorn di Napoli: la dott.ssa Paola Cirino per aver identificato l'ascidia *Styela plicata* e per avermi fornito, insieme ai collaboratori del suo gruppo di ricerca, preziose informazioni sulla biologia e sull'allevamento di questi organismi, il dott. Vincenzo Vellucci per avermi introdotto alla fruizione del database scientifico, la prof.ssa Maria Cristina Gambi e la sua collaboratrice dott.ssa Maria Michela Cigliano per avermi fornito materiale bibliografico e precise informazioni scientifiche utili al prosieguo della ricerca. Ringrazio quindi la prof. Adriana Giangrande del Dipartimento di Zoologia dell'Università di Lecce e le sue collaboratrici, e la dott.ssa Marialuisa Feo dell'Istituto Ambiente Marino Costiero di Napoli, per avermi fornito precise informazioni scientifiche e materiale bibliografico sulla biorimediazione.

Appendice

| tabella A.0 - rette di taratura - dati relativi alla figura 3.2 | | | | | |
|---|-------------------------|------------------|---|------------------|---|
| iniezione HPLC n. | conc. standard (µmol/l) | 10 µl Area (µVs) | deviaz. standard su area picco HPLC (µVs) | 20 µl Area (µVs) | deviaz. standard su area picco HPLC (µVs) |
| 1 | 105,60 | 183408,88 | | 366817,76 | |
| 2 | 105,60 | 208952,74 | | 417905,48 | |
| 3 | 105,60 | 220935,46 | | 441870,92 | |
| 4 | 105,60 | 230192,58 | | 460385,16 | |
| 5 | 105,60 | 224038,84 | | 448077,68 | |
| media su area picco HPLC (µVs) | 105,60 | 213505,70 | 18514,51 | 427011,40 | 37029,02 |
| 1 | 52,80 | 128267,26 | | 256534,52 | |
| 2 | 52,80 | 120134,86 | | 240269,72 | |
| 3 | 52,80 | 108438,55 | | 216877,10 | |
| 4 | 52,80 | 116177,17 | | 232354,34 | |
| 5 | 52,80 | 108747,08 | | 217494,15 | |
| media | 52,80 | 116352,98 | 8318,23 | 232705,97 | 16636,45 |
| 1 | 17,60 | 44372,92 | | 88745,83 | |
| 2 | 17,60 | 44844,39 | | 89688,78 | |
| 3 | 17,60 | 38613,74 | | 77227,47 | |
| 4 | 17,60 | 45227,15 | | 90454,29 | |
| media | 17,60 | 43264,55 | 3120,16 | 86529,09 | 6240,32 |
| 1 | 10,56 | 31651,81 | | 63303,62 | |
| 2 | 10,56 | 34770,19 | | 69540,38 | |
| 3 | 10,56 | 28100,56 | | 56201,11 | |
| media | 10,56 | 31507,52 | 3335,08 | 63015,04 | 6674,32 |
| m = coefficiente angolare retta 10 µl = (105,60 - 52,80)/(213505,70 - 116352,98) = | | | | | |
| | | | | | 0,00054347 |
| m = coefficiente angolare retta 10 µl = (52,80 - 17,60)/(116352 - 43264,55) = | | | | | |
| | | | | | 0,00048161 |
| m = coefficiente angolare retta 10 µl = (17,60 - 10,56)/(43264,55 - 31507,52) = | | | | | |
| | | | | | 0,00059879 |
| m = coefficiente angolare retta 20 µl = (105,60 - 52,80)/(427011,40 - 232705,97) = | | | | | |
| | | | | | 0,00027174 |
| m = coefficiente angolare retta 20 µl = (52,80 - 17,60)/(232705,97 - 86529,09) = | | | | | |
| | | | | | 0,00024080 |
| m = coefficiente angolare retta 20 µl = (17,60 - 10,56)/(86529,09 - 63015,04) = | | | | | |
| | | | | | 0,00029940 |

| tabella A.1 - esperimento di controllo Co=52,8 µmol/l - dati relativi alla figura 4.2 | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|--------------------------------------|---|--|--------------------------------------|---|--|----------------------------|
| campione n. | istante campion. (hh.mm.ss) | 1C9-LAS area picco HPLC (µVs) | deviaz. standard su area picchi HPLC (µVs) | volume estratto su fase solida SPE (ml) | volume iniettato in HPLC (µl) | area equivalente retta di taratura (µVs) | conc. 1C9-LAS acquario (µmol/l) | conc. fosfati (ppm) |
| 17 | | 213297,07 | | | 10 | | | |
| 17 | | 199812,30 | | | 10 | | | |
| 17 | | 180213,89 | | | 10 | | | |
| 17 | 0.00.00 | 197774,42 | 16635,4716 | 10 | | 59332,33 | 25,34 | |
| 18 | | 94903,32 | | | 10 | | | |
| 18 | | 115207,24 | | | 10 | | | |
| 18 | | 119730,89 | | | 10 | | | |
| 18 | 1.00.00 | 109947,15 | 13223,217 | 10 | | 32984,15 | 11,44 | 0,071 |
| 19 | | 162083,29 | | | 10 | | | |
| 19 | | 137689,91 | | | 10 | | | |
| 19 | | 170983,32 | | | 10 | | | |
| 19 | 2.00.00 | 156918,84 | 17237,066 | 10 | | 47075,65 | 19,44 | |
| 24 | | 270512,27 | | | 10 | | | |
| 24 | | 243736,99 | | | 10 | | | |
| 24 | | 264239,58 | | | 10 | | | |
| 24 | 7.00.00 | 259496,28 | 14003,6808 | 10 | | 77848,88 | 34,26 | 0,175 |
| 25 | | 294765,94 | | | 10 | | | |
| 25 | | 227011,39 | | | 10 | | | |
| 25 | | 291483,50 | | | 10 | | | |
| 25 | 8.00.00 | 271086,94 | 38205,8164 | 10 | | 81326,08 | 35,93 | 0,092 |
| 26 | 24.22.00 | | | | | | | 0,110 |
| 27 | | 244107,53 | | | 10 | | | |
| 27 | | 255381,58 | | | 10 | | | |
| 27 | | 204485,89 | | | 10 | | | |
| 27 | 25.00.00 | 234658,33 | 26731,2234 | 10 | | 70397,50 | 30,67 | |
| 30 | | 247532,96 | | | 10 | | | |
| 30 | | 256136,61 | | | 10 | | | |
| 30 | | 188806,05 | | | 10 | | | |
| 30 | 28.00.00 | 230825,21 | 36643,0463 | 10 | | 69247,56 | 30,11 | |
| 32 | | 224884,07 | | | 10 | | | |
| 32 | | 193231,79 | | | 10 | | | |
| 32 | | 217295,25 | | | 10 | | | |
| 32 | 30.00.00 | 211803,70 | 16525,2692 | 10 | | 63541,11 | 27,37 | 0,175 |
| 34 | | 201318,53 | | | 10 | | | |
| 34 | | 151109,11 | | | 10 | | | |
| 34 | | 168486,66 | | | 10 | | | |
| 34 | 50.00.00 | 173638,10 | 25498,0286 | 10 | | 52091,43 | 21,85 | 0,153 |
| 35 | | 53607,25 | | | 10 | | | |
| 35 | | 61728,43 | | | 10 | | | |
| 35 | | 62692,50 | | | 10 | | | |
| 35 | 72.40.00 | 59342,73 | 4990,40351 | 10 | | 17802,82 | 2,35 | 0,167 |
| 36 | | nd | | | 10 | | | |
| 36 | | nd | | | 10 | | | |
| 36 | | nd | | | 10 | | | |
| 36 | 144.00.00 | | | 10 | | | 0,00 | 0,203 |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |

| tabella A.4 - esperimento con <i>Styela plicata</i> Co=52,8 µmol/l - dati relativi alle figure 4.3 - 4.15 | | | | | | | | |
|---|-----------------------------|-------------------------------|--|---|-------------------------------|--|---------------------------------|---------------------|
| campione n. | istante campion. (hh.mm.ss) | 1C9-LAS area picco HPLC (µVs) | deviaz. standard su area picchi HPLC (µVs) | volume estratto su fase solida SPE (ml) | volume iniettato in HPLC (µl) | area equivalente retta di taratura (µVs) | conc. 1C9-LAS acquario (µmol/l) | conc. fosfati (ppm) |
| 78 | | 244876,64 | | | 10 | | | |
| 78 | | 290676,85 | | | 10 | | | |
| 78 | | 298320,36 | | | 10 | | | |
| 78 | 0.00.00 | 277957,95 | 28903,04 | 10 | | 83387,39 | 36,92 | |
| 80 | | 409628,98 | | | 10 | | | |
| 80 | | 410542,77 | | | 10 | | | |
| 80 | | 350027,01 | | | 10 | | | |
| 80 | 0.40.00 | 390066,25 | 34678,01 | 10 | | 117019,88 | 53,16 | |
| 83 | | 267788,65 | | | 10 | | | |
| 83 | | 268500,38 | | | 10 | | | |
| 83 | | 242903,59 | | | 10 | | | |
| 83 | 9.50.00 | 259730,87 | 14577,20 | 10 | | 77919,26 | 34,29 | |
| 85 | | 234831,21 | | | 10 | | | |
| 85 | | 240328,41 | | | 10 | | | |
| 85 | | 230030,69 | | | 10 | | | |
| 85 | 19.30.00 | 235063,44 | 5152,79 | 10 | | 70519,03 | 30,73 | 0,244 |
| 88 | 32.05.00 | | | | | | | 0,293 |
| 89 | | 220063,60 | | | 10 | | | |
| 89 | | 232676,82 | | | 10 | | | |
| 89 | | 256005,77 | | | 10 | | | |
| 89 | 40.00.00 | 236248,73 | 18235,37 | 10 | | 70874,62 | 30,90 | |
| 90 | 43.52.00 | | | | | | | 0,306 |
| 91 | 46.00.00 | | | | | | | 0,306 |
| 92 | 51.35.00 | | | | | | | 0,306 |
| 93 | | 192694,33 | | | 10 | | | |
| 93 | | 141240,42 | | | 10 | | | |
| 93 | | 119520,40 | | | 10 | | | |
| 93 | 57.50.00 | 151151,72 | 37580,33 | 10 | | 45345,52 | 18,60 | 0,294 |
| 94 | | 52932,68 | | | 10 | | | |
| 94 | | 62981,42 | | | 10 | | | |
| 94 | | 79618,00 | | | 10 | | | |
| 94 | 64.32.00 | 65177,37 | 13477,51 | 10 | | 19553,21 | 3,40 | 0,275 |
| 95 | | 44952,06 | | | 10 | 13485,62 | 0,00 | |
| 95 | | 48030,56 | | | 10 | 14409,17 | 0,32 | |
| 95 | 66.22.00 | 46491,31 | 2176,83 | | 10 | | | |
| 95 | | 144880,04 | | | 10 | 43464,01 | 4,71 | |
| 95 | | 150487,33 | | | 10 | 45146,20 | 5,21 | |
| 95 | 66.22.00 | 147683,69 | 3964,95 | | 10 | | | |
| 95 | 66.22.00 | | | | 10 | | 2,56 | |
| 96 | | nd | | | 10 | | | |
| 96 | | nd | | | 10 | | | |
| 96 | | nd | | | 10 | | | |
| 96 | 78.02.00 | 0,00 | | 10 | | | 0,00 | |
| 97 | 89.20.00 | | | | | | | 0,229 |
| 98 | 100.25.00 | | | | | | | 0,303 |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |

| tabella A.5 - esperimento di controllo Co=52,8 µmol/l - dati relativi alla figura 4.4 | | | | | | | | |
|---|-----------------------------|-------------------------------|--|---|-------------------------------|--|---------------------------------|---------------------|
| campione n. | istante campion. (hh.mm.ss) | 1C9-LAS area picco HPLC (µVs) | deviaz. standard su area picchi HPLC (µVs) | volume estratto su fase solida SPE (ml) | volume iniettato in HPLC (µl) | area equivalente retta di taratura (µVs) | conc. 1C9-LAS acquario (µmol/l) | conc. fosfati (ppm) |
| 202 | | 258130,17 | | | 10 | | | |
| 202 | | 266071,10 | | | 10 | | | |
| 202 | | 221354,06 | | | 10 | | | |
| 202 | 0.45.00 | 248518,44 | 23857,75 | 10 | | 74555,53 | 32,67 | |
| 203 | | 384538,94 | | | 10 | | | |
| 203 | | 359017,92 | | | 10 | | | |
| 203 | | 392564,81 | | | 10 | | | |
| 203 | 1.20.00 | 378707,22 | 17517,28 | 10 | | 113612,17 | 51,48 | 0,056 |
| 204 | | 332261,12 | | | 10 | | | |
| 204 | | 299510,62 | | | 10 | | | |
| 204 | | 333256,54 | | | 10 | | | |
| 204 | 3.40.00 | 321676,09 | 19202,31 | 10 | | 96502,83 | 43,24 | |
| 205 | | 323589,74 | | | 10 | | | |
| 205 | | 263488,07 | | | 10 | | | |
| 205 | | 287212,84 | | | 10 | | | |
| 205 | 5.20.00 | 291430,22 | 30271,97 | 10 | | 87429,06 | 38,87 | |
| 207 | | 273800,48 | | | 10 | | | |
| 207 | | 289717,35 | | | 10 | | | |
| 207 | | 261355,07 | | | 10 | | | |
| 207 | 14.40.00 | 274957,63 | 14216,50 | 10 | | 82487,29 | 36,49 | |
| 208 | | 220704,73 | | | 10 | | | |
| 208 | | 265366,12 | | | 10 | | | |
| 208 | | 229377,03 | | | 10 | | | |
| 208 | 24.00.00 | 238482,63 | 23682,14 | 10 | | 71544,79 | 31,22 | |
| 209 | | 186113,44 | | | 10 | | | |
| 209 | | 224883,72 | | | 10 | | | |
| 209 | | 182567,45 | | | 10 | | | |
| 209 | 40.20.00 | 197854,87 | 23474,72 | 10 | | 59356,46 | 25,35 | 0,177 |
| 211 | | 109043,00 | | | 10 | | | |
| 211 | | 167976,08 | | | 10 | | | |
| 211 | | 152927,09 | | | 10 | | | |
| 211 | 53.30.00 | 143315,39 | 30619,69 | 10 | | 42994,62 | 17,47 | |
| 212 | | 185673,76 | | | 10 | | | |
| 212 | | 186911,28 | | | 10 | | | |
| 212 | | 160349,39 | | | 10 | | | |
| 212 | 64.40.00 | 177644,81 | 14991,05 | 10 | | 53293,44 | 22,43 | |
| 213 | | 179134,44 | | | 10 | | | |
| 213 | | 170318,88 | | | 10 | | | |
| 213 | | 147559,80 | | | 10 | | | |
| 213 | 78.35.00 | 165671,04 | 16292,37 | 10 | | 49701,31 | 20,70 | |
| 214 | | 179156,84 | | | 20 | | | |
| 214 | | 190281,25 | | | 20 | | | |
| 214 | | 185226,81 | | | 20 | | | |
| 214 | 99.10.00 | 184888,30 | 5569,92 | 10 | | 55466,49 | 8,30 | 0,180 |
| 216 | | 145355,30 | | | 20 | | | |
| 216 | | 137021,05 | | | 20 | | | |
| 216 | | 148706,16 | | | 20 | | | |
| 216 | 138.20.00 | 143694,17 | 6017,06 | 10 | | 43108,25 | 4,60 | |

| tabella A.5 (continua) - esperimento di controllo Co=52,8 µmol/l - dati relativi alla figura 4.4 | | | | | | | | |
|---|------------------------------------|--------------------------------------|---|--|--------------------------------------|---|--|----------------------------|
| campione n. | istante campion. (hh.mm.ss) | 1C9-LAS area picco HPLC (µVs) | deviaz. standard su area picchi HPLC (µVs) | volume estratto su fase solida SPE (ml) | volume iniettato in HPLC (µl) | area equivalente retta di taratura (µVs) | conc. 1C9-LAS acquario (µmol/l) | conc. fosfati (ppm) |
| 217 | | nd | | | 20 | | | |
| 217 | | nd | | | 20 | | | |
| 217 | | nd | | | 20 | | | |
| 217 | 152.25.00 | | | 10 | | | 0,00 | 0,216 |

tabella A.7 - dati bibliografici²⁴ (Perez et al. 2002) relativi alla figura 4.5

| istante campion. (hh.mm.ss) | conc. 1C9-LAS acquario ($\mu\text{mol/l}$) |
|-----------------------------|--|
| 0.00.00 | 52,8 |
| 1.00.00 | 49,6 |
| 8.00.00 | 22,2 |
| 22.00.00 | 21,8 |
| 28.00.00 | 24,6 |
| 48.00.00 | 23,2 |
| 96.00.00 | 26,4 |
| 168.00.00 | 24,3 |
| 178.00.00 | 24,3 |
| 200.00.00 | 12 |
| 324.00.00 | 2,5 |
| 490.00.00 | 1,4 |

tabella A.8 - esperimento di controllo in ASW Co=52,8 $\mu\text{mol/l}$ - dati relativi alla figura 4.6

| campione n. | istante campion. (hh.mm.ss) | 1C9-LAS area picco HPLC (μVs) | deviaz. standard su area picchi HPLC (μVs) | volume estratto su fase solida SPE (ml) | volume iniettato in HPLC (μl) | area equivalente retta di taratura (μVs) | conc. 1C9-LAS acquario ($\mu\text{mol/l}$) | conc. fosfati (ppm) |
|-------------|-----------------------------|--|---|---|--|---|--|---------------------|
| 166 | | 122943,25 | | | | | | |
| 166 | | 153274,00 | | | | | | |
| 166 | | 128037,66 | | | | | | |
| 166 | 0.30.00 | 134751,64 | 16241,82 | 10 | | 40425,49 | 15,90 | |
| 167 | | 268819,81 | | | 10 | | | |
| 167 | | 260344,02 | | | 10 | | | |
| 167 | | 238608,73 | | | 10 | | | |
| 167 | 2.05.00 | 255924,19 | 15582,95 | 10 | | 76777,26 | 33,74 | |
| 168 | | 304823,96 | | | 10 | | | |
| 168 | | 355660,23 | | | 10 | | | |
| 168 | | 361229,16 | | | 10 | | | |
| 168 | 5.50.00 | 340571,12 | 31082,92 | 10 | | 102171,33 | 45,97 | 0,037 |
| 169 | | 308656,61 | | | 10 | | | |
| 169 | | 308305,85 | | | 10 | | | |
| 169 | | 286605,09 | | | 10 | | | |
| 169 | 14.15.00 | 301189,18 | 12631,41 | 10 | | 90356,75 | 40,28 | |
| 170 | | 294987,39 | | | 10 | | | |
| 170 | | 283425,62 | | | 10 | | | |
| 170 | | 314565,02 | | | 10 | | | |
| 170 | 16.30.00 | 297659,34 | 15740,71 | 10 | | 89297,80 | 39,77 | |
| 171 | | 261092,13 | | | 10 | | | |
| 171 | | 259834,18 | | | 10 | | | |
| 171 | | 274046,77 | | | 10 | | | |
| 171 | 21.50.00 | 264991,03 | 7867,68 | 10 | | 79497,31 | 35,05 | |
| 172 | | 289602,03 | | | 10 | | | |
| 172 | | 288405,32 | | | 10 | | | |
| 172 | | 269705,68 | | | 10 | | | |
| 172 | 41.35.00 | 282571,01 | 11157,76 | 10 | | 84771,30 | 37,59 | |
| 173 | | 381575,56 | | | 20 | | | |

tab. A.8 (continua) - esperimento di controllo in ASW Co=52,8 µmol/l - dati relativi alla fig. 4.6

| campione n. | istante campion. (hh.mm.ss) | 1C9-LAS area picco HPLC (µVs) | deviaz. standard su area picchi HPLC (µVs) | volume estratto su fase solida SPE (ml) | volume iniettato in HPLC (µl) | area equivalente retta di taratura (µVs) | conc. 1C9-LAS acquario (µmol/l) | conc. fosfati (ppm) |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|--|---|-------------------------------|--|---------------------------------|---------------------|
| 173 | | 391490,41 | | | 20 | | | |
| 173 | | 394787,14 | | | 20 | | | |
| 173 | 70.55.00 | 389284,37 | 6876,51 | 10 | | 116785,31 | 24,89 | 0,128 |
| 174 | | 542359,56 | | | 20 | | | |
| 174 | | 542050,38 | | | 20 | | | |
| 174 | | 515918,10 | | | 20 | | | |
| 174 | 97.25.00 | 533442,68 | 15177,52 | 10 | | 160032,80 | 35,30 | |
| 175 | | 492979,88 | | | 20 | | | |
| 175 | | 556761,64 | | | 20 | | | |
| 175 | | 503427,81 | | | 20 | | | |
| 175 | 126.20.00 | 517723,11 | 34209,57 | 10 | | 155316,93 | 34,16 | |
| 176 | | 386463,92 | | | 20 | | | |
| 176 | | 376906,38 | | | 20 | | | |
| 176 | | 358210,67 | | | 20 | | | |
| 176 | 136.35.00 | 373860,32 | 14370,82 | 30 | | 37386,03 | 14,08 | |
| 177 | | 290774,92 | | | 10 | | | |
| 177 | | 322307,86 | | | 10 | | | |
| 177 | | 295068,05 | | | 10 | | | |
| 177 | 160.55.00 | 302716,94 | 17101,48 | 30 | | 30271,69 | 9,82 | 0,181 |
| 178 | | 453348,36 | | 30 | 20 | 45334,84 | 5,27 | |
| 178 | | 228174,18 | | 30 | 10 | 22817,42 | 5,36 | |
| 178 | | 254803,73 | | 30 | 10 | 25480,37 | 6,95 | |
| 178 | | 234959,47 | | 30 | 10 | 23495,95 | 5,76 | |
| 178 | 184.45.00 | | 13838,16 | 30 | | | 5,84 | |
| 178b | | nd | | | 20 | | | |
| 178b | | nd | | | 20 | | | |
| 178b | | nd | | | 20 | | | |
| 178b | 190.20.00 | 0,00 | | 30 | | | 0,00 | 0,224 |

