



**Montecchio (VI), 23 aprile 2012**

**Biomonitoraggio scarico  
collettore A.RI.CA.**

**A. Cortesi. e M. Francese**

# TIPOLOGIA DI REFLUO

**Acque reflue** già depurate, veicolate da una condotta di **scarico** verso i corsi d'acqua superficiali della zona

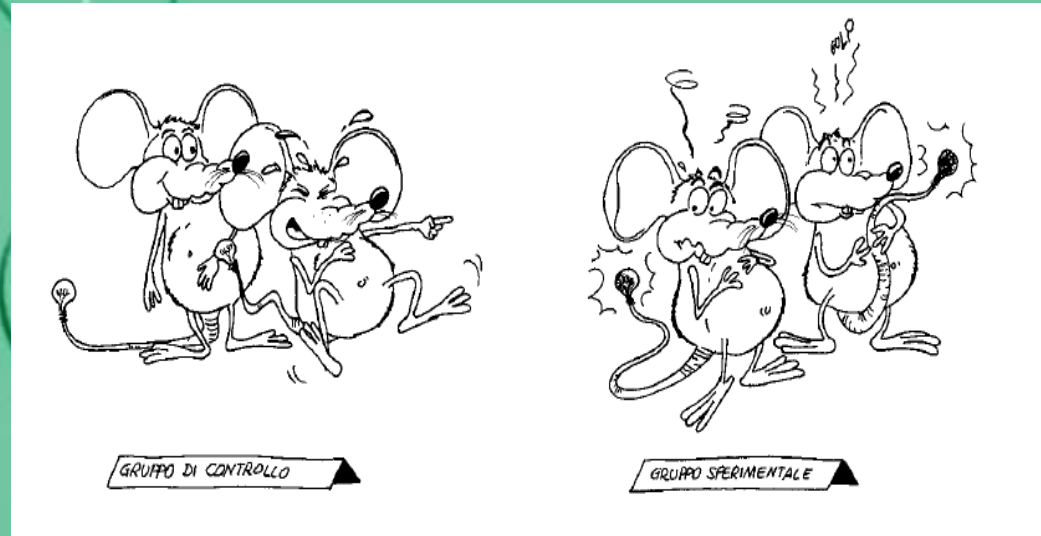


**Refluo misto**, del quale ci si propone di ricercare una risposta integrata



# BASE DELLO STUDIO DI BIOMONITORAGGIO

Il **principio** sul quale questa parte del lavoro si basa è quello eco tossicologico, ovvero la valutazione degli effetti di una matrice contaminata sulla componente vivente (altrimenti definito *biota*)



Questa tipologia di test si basa sulla valutazione delle **risposte biologiche** di specifici organismi **in presenza di sostanze tossiche**, gli effetti biologici comprendono: reazioni comportamentali, fisiologiche o biochimiche.

# QUALE MODALITA' DI BIOMONITORAGGIO

L'indagine ecologica prevede una fase di studio in campo sull'ecosistema stesso dell'area oggetto di indagine

I test di bioaccumulo servono a valutare il grado con cui le sostanze possono accumularsi nei tessuti degli organismi viventi. Permettono di identificare fenomeni di biomagnificazione.

I saggi biologici sono utilizzati per determinare e valutare gli effetti tossici acuti o cronici determinati da matrici ambientali su organismi ad essi esposti.

I test di mutagenotossicità servono a valutare il potenziale genotossico di una sostanza.

**Test di mutagenotossicità**

**Biomarkers**

**Saggio biologico**

**Bioaccumulo**

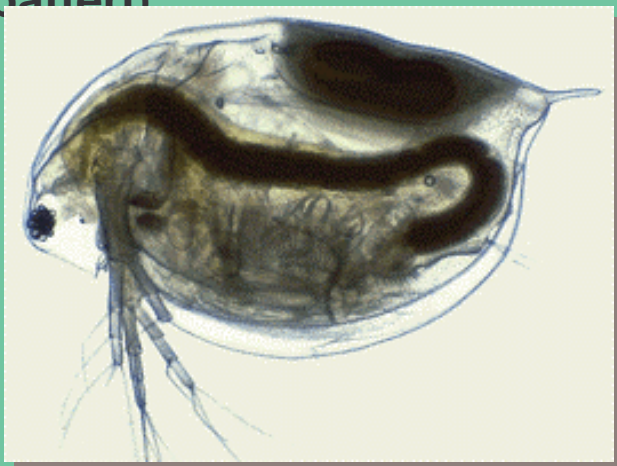
**Indagine ecologica**

I test sui biomarkers servono a valutare gli effetti indotti dalle sostanze tossiche sui processi, strutture o funzioni a livello cellulare, fisiologico o biochimico di un organismo.



# ACUTO, CRONICO E SUBCRONICO, CAMBIA L'END POINT

E' un test, compiuto prevalentemente in **laboratorio**, che utilizza un organismo vivente, posto a contatto con una sostanza in esame (acqua, sedimento, aria). L' **End point** è il segnale da cogliere per stimare l'effetto. Chiaramente cambia dalla letalità alla mobilità, fino allo sviluppo embrionale (non è mutagenesi) alla crescita di un individuo o al successo riproduttivo o di popolazione (ad es microalghe o batteri)



**Saggio acuto:** è l'effetto immediato che una sostanza tossica produce su un organismo vivente. Periodo di esposizione breve rispetto al ciclo vitale dell'organismo.

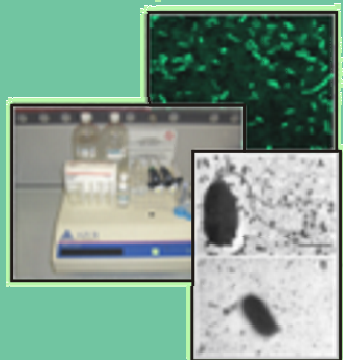


**Saggio cronico:** è l'effetto a lungo termine che una sostanza tossica produce su un organismo vivente; vengono prese in considerazione diverse generazioni dell'organismo test. Periodo di esposizione lungo rispetto al ciclo vitale dell'animale.

**Saggio subcronico:** periodo di esposizione meno lungo

# CON CHE SPECIE SI PUÒ FARE E ...

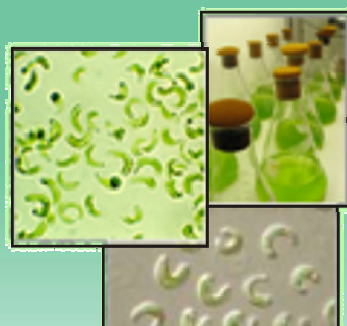
## BATTERI



## CROSTACEI



## ALGHE



## SEMI DI PIANTE



## VERMI



# ...QUALI SONO STATE USATE

ID	Tipologia	Saggi Biologici
C1	Effetto tossico <b>subcronico</b> Ambiente terreno	saggio biologico (96h) con semi di piante superiori: <b>Tris fanerogame (crescione et al)</b>
C2	Effetto tossico <b>acuto</b> Ambiente acquatico dolce/salato	saggio biologico (30 min) con Batteri bioluminescenti: <b>Vibrio fischeri</b> (test di screening)
C3	Effetto tossico <b>acuto</b> Ambiente acquatico dolce/salato	saggio biologico (30 min) con Batteri bioluminescenti: <b>Vibrio fischeri</b> (test di approfondimento)
C4	Effetto tossico <b>acuto</b> Ambiente acquatico dolce	saggio biologico (24h) con rotiferi: <b>Brachionus calyciflorus</b>
C5	Effetto tossico <b>subcronico</b> Ambiente acquatico dolce	saggio biologico (72h) con alghe unicellulari: <b>Pseudokirchneriella subcapitata</b>
C6	Effetto tossico <b>subcronico</b> Ambiente acquatico salato	saggio biologico (72h) con alghe unicellulari: <b>Phaeodactylum tricornutum</b>
C7	Effetto tossico <b>acuto</b> Ambiente acquatico salato	saggio biologico (24h) con crostaceo anostraco: <b>Artemia franciscana</b>
C8	Effetto tossico <b>mutagenetico</b> Ambiente acquatico dolce/salato	saggio di mutagenesi <b>AMES</b> ( <b>Salmonella/microsome assay</b> ) con i ceppi TA98 e TA100
C9	Effetto tossico <b>acuto</b> Ambiente acquatico salato	saggio biologico (48h) con rotiferi: <b>Brachionus plicatilis</b>
C10	Effetto tossico <b>acuto</b> Ambiente acquatico dolce	saggio biologico (24h) con cladocero: <b>Daphnia Magna</b>
C11	Effetto tossico <b>subcronico</b> Ambiente acquatico dolce	Saggio biologico (06 die) con <b>Hetrocypris incongruens</b>
C12	Effetto tossico <b>subcronico</b> Ambiente acquatico dolce	saggio biologico (72h) con <b>Brassica oleracea</b>
C13	Effetto tossico <b>subcronico</b> Ambiente acquatico dolce	saggio biologico (72h) con <b>Hordeum vulgare</b>
C14	Effetto tossico <b>subcronico</b> Ambiente acquatico dolce	saggio biologico (72h) con <b>Lycopersicum esculentum</b>

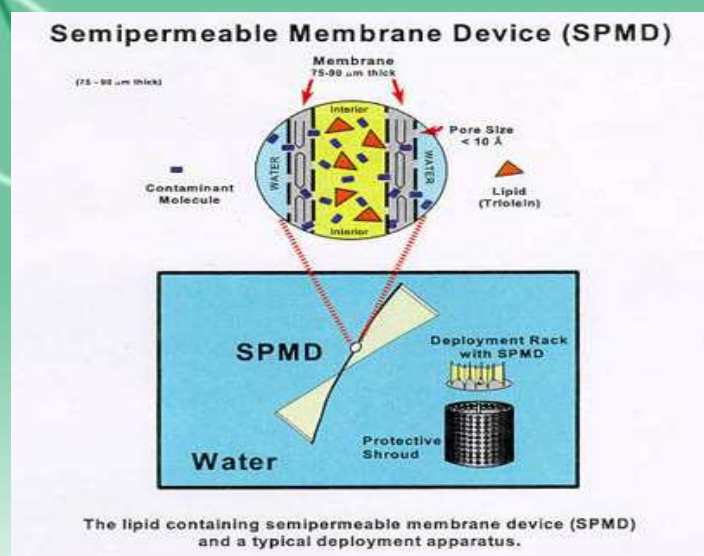
# DIVERSI APPROCCI NEL BIOACCUMULO E

**Bioaccumulo:** sono test che servono a valutare il grado con cui le sostanze possono accumularsi nei tessuti degli organismi viventi.

Questi test, vengono condotti in campo o in laboratorio, utilizzando in genere molluschi, vermi o vegetali o ancora, mediante biopsie, piccoli e grandi vertebrati.

Il risultato del test è fortemente **condizionato dal tipo di organismo** utilizzato, dalla sua capacità di assimilazione ed escrezione della sostanza tossica in esame e non ultimo dalle condizioni ambientali.

Per evitare le interferenze fisiologiche e la differenziazione tra specie e specie o addirittura tra individuo ed individuo, si può utilizzare un **simulatore di tessuto grasso di animale acquatico** chiamata **SPMD**.





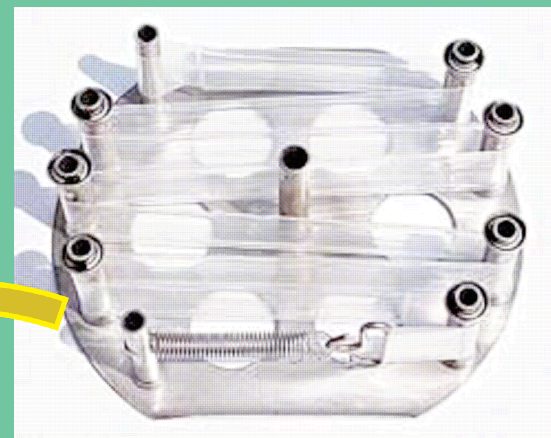
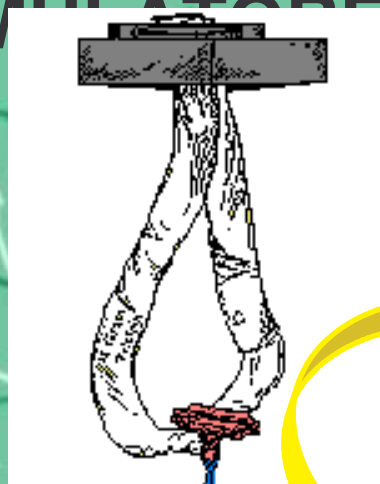
## ... LA SCELTA E' ANDATA SUL SIMULATORE

La **configurazione standard** di una SPMD è costituita da:

1 mL di trioleina che corrisponde a 0.915 g (con 95% purezza)

tubo di LDPE (low-density polyethylene) di circa 1 metro, 75-90  $\mu\text{m}$  di spessore

la superficie di membrana è di circa 450  $\text{cm}^2$



# PROCESSO PER FASI DEFINITO AD OGNI ANALISI CRITICA DELLA FASE PRECEDENTE

L'approccio è stato quello di voler/dover fare fasi diverse di approfondimento o di replica

## ATTIVITA' A

- A.1 SCREENING DI SAGGI BIOLOGICI
- A.2 STUDIO PRELIMINARE
- A.3 INDAGINI CHIMICHE DI TIPIIZZAZIONE
- A.4 SAGGI BIOLOGICI (ECOTOSSICOLOGICI) CLASSICI
- A.5 UTILIZZO DELLA SPMD PER ANALISI CHIMICHE

## ATTIVITA' B

ANALISI CRITICA

## ATTIVITA' C

- C.1 ALTRA TIPIIZZAZIONE CHIMICA
- C.2 APPROFONDIMENTI DI INDAGINE ECOTOSSICOLOGICA FUNZIONALI A DEFINIRE IL CORE SET

## ATTIVITA' D

- D.1 INDAGINI CHIMICHE DI TIPIIZZAZIONE
- D.2 SAGGI ECOTOSSICOLOGICI DI APPROFONDIMENTO

## A.1 SCREENING

Serviva a capire subito di che tipo di refluo si trattava, se molto o poco tossico.

Il campionamento è stato fatto senza preavviso.

Screening ecotossicologico  
supplementare per la verifica del  
livello di potenziale tossicità dei  
reflui su n.1 campione di refluo:

- Tipologia (C4): saggio effetto  
tossico acuto ambiente “acque  
dolci”

- Tipologia (C5): saggio effetto  
tossico subcronico ambiente  
“acque dolci”

Da prime indagini di  
screening, svolte con i saggi  
biologici più classici, si è  
potuto constatare che il refluo  
non dava segnali di tossicità,  
per quanto presentasse una  
logica eutrofia.

## A.4 PRIMA BATTERIA

A questo punto si è deciso di “aprire” alla batteria di saggi in acqua dolce e di simulare test anche in acqua salata visto l’elevata concentrazione di cloruri.

Esecuzione saggi ecotossicologici preliminari:

- Tipologia (C1): saggio effetto tossico subcronico ambiente “terreno”
- Tipologia (C2): saggio effetto tossico acuto ambiente “acque dolci”
- Tipologia (C5): saggio effetto tossico subcronico ambiente “acque dolci”
- Tipologia (C6): saggio effetto tossico subcronico ambiente “acque salate”

Anche in questo caso i saggi biologici acuti comunemente usati nei monitoraggi non evidenziavano segnali di tossicità, se non rilevando indicazione di eutrofia. Solo i test di fitotossicità davano lievi segnali di tossicità, forse dipendente dalle caratteristiche saline dell’acqua.

L’utilizzo di specie marine, su campioni condizionati in salinità non risultava coerente. Per ovviare, i cloruri , pur non rappresentando una variabile interferente, sono stati eliminati nei test con batteri mediante precipitazione con tiosolfato.



## A.5 L'ACCUMULO

Contemporaneamente alla prima batteria, si è proceduto a fare il test di accumulo mediante SPMD. Utilizzando un campionatore automatico opportunamente adattato, il campione era molto rappresentativo.

- Esecuzione di intervento in sito per prelievo di un campione rappresentativo di 21gg
- Tipologia (A2): installazione/prelievo membrana SPMD (determinazioni chimiche)



La simulazione del bioaccumulo ha messo in evidenza composti oleosi di origine vegetale, tipici della lavorazione delle pelli e fragranze usate in cosmetica. Non sono stati rilevati inquinanti tossici per eccellenza in concentrazioni preoccupanti.

## C.2 BATTERIA DI DEFINIZIONE

A questo punto si è deciso di “perfezionare” la batteria di saggi, quale approfondimento di indagine funzionale a definire il core set definitivo. Sono stati ripresi i saggi, anche quelli più classici come la Daphnia, e sono stati ripetuti per sicurezza i test su acqua salata o privata dei cloruri con 2 specie marine.

### Esecuzione saggi ecotossicologici

- Tipologia (C3): saggio effetto tossico acuto ambiente “acque dolci”

- Tipologia (C9): saggio effetto tossico acuto ambiente “acque salate”

- Tipologia (C10): saggio effetto tossico acuto ambiente “acque dolci”

Anche in questo caso i saggi biologici acuti comunemente usati nei monitoraggi non evidenziavano segnali di tossicità.

## D.2 BATTERIA DI APPROFONDIMENTO

A questo punto si è deciso di “aumentare il fuoco” verificando effetti cronici oltre a quelli subcronici e ripetendone di acuti.

Esecuzione saggi ecotossicologici

Tipologia (C3): saggio effetto tossico acuto ambiente “acque dolci”

Tipologia (C5): saggio effetto tossico subcronico ambiente “acque dolci”

Tipologia (C2): saggio effetto tossico acuto ambiente “acque salate”

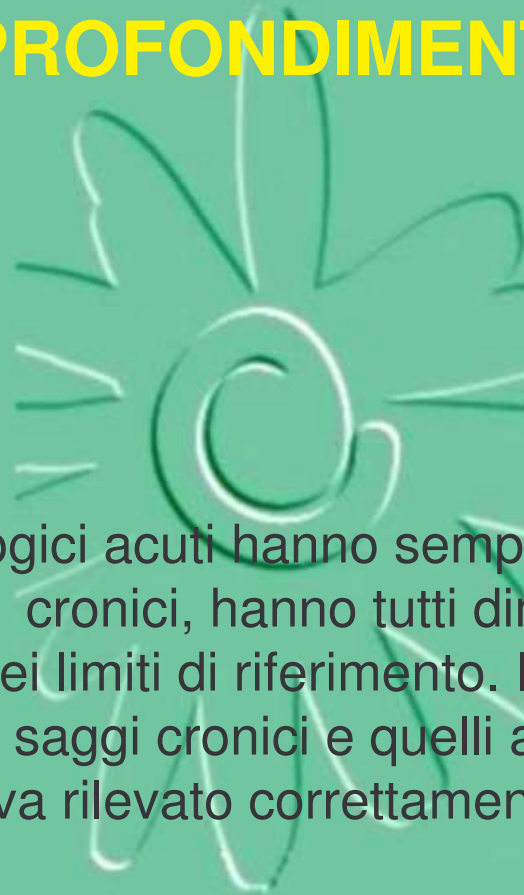
Tipologia (C11): saggio effetto tossico subcronico ambiente “acque dolci”

Tipologia (C12): saggio effetto tossico subcronico ambiente “acque dolci”

Tipologia (C13): saggio effetto tossico subcronico ambiente “acque dolci”

Tipologia (C14): saggio effetto tossico subcronico ambiente “acque dolci”

## D.2 BATTERIA DI APPROFONDIMENTO



In questo caso i saggi biologici acuti hanno sempre mantenuto un livello di non tossicità, mentre quelli cronici, hanno tutti dimostrato un primo segnale di tossicità del refluo, pur nei limiti di riferimento. Il confronto effettuato sullo stesso campione tra questi saggi cronici e quelli acuti, risultati non tossici, hanno dimostrato che veniva rilevato correttamente il fenomeno.