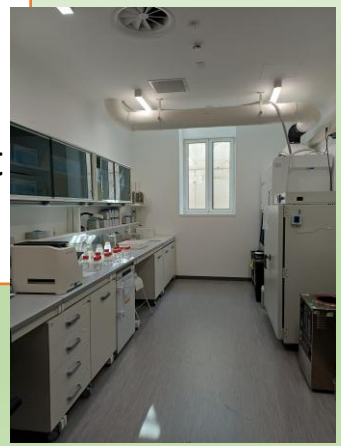
Innovazione al servizio dell'ambiente: il laboratorio di ARPA Lombardia di Milano

Il laboratorio di ecotossicologia e microbiologia

IL LABORATORIO DI ECOTOSSICOLOGIA

PERSONALE
- 1 DIRGENTE BIOLOGO
- 3 COLLABORATORI TECNICI PROFESSIONALI – BIOLOGO
- 1 ASSISTENTE TECNICO

- LABORATORIO + CAMERE TERMOSTATE PER ALLEVAMENTO/TEST con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Pseudokirchneriella subcapitata*
- Sala microscopia
- Laboratorio analisi microbiologiche
- Laboratorio per test fitotossicità



Campioni analizzati in un anno:
- 650 di acque reflue su cui vengono eseguiti test di tossicità con D,V e P
- 350 campioni di acque superficiali per la determinazione di *E. coli*
- Test di fitotossicità su compost/fanghi

TEST ECOTOSSICOLOGICI SULLE MATRICI AMBIENTALI

ACQUE DI SCARICO E ACQUE SUPERFICIALI

FANGHI DI DEPURAZIONE PER L'UTILIZZO IN AGRICOLTURA E COMPOST

TESTO UNICO AMBIENTALE - Decreto Legislativo n. 152/06 e s.m.i.

Limiti di emissione degli scarichi idrici – Allegato V Parte Terza

Per il «**Saggio di Tossicità Acuta**»:

- parametro **51**, tabella **3** - limiti di emissione in acque superficiali e in fognatura
- parametro **35**, tabella **4** – limiti di emissione per recapiti al suolo

Limiti di emissione per acque reflue urbane ed industriali

in corpo idrico superficiale: **50 %** di effetto

in fognatura: **80 %** di effetto

al suolo: **50 %** di effetto

TESTO UNICO AMBIENTALE - Decreto Legislativo n. 152/06 e s.m.i.

Nota 5 alla tabella 3:

- Il Saggio di tossicità acuta è obbligatorio
- Oltre al saggio su *Daphnia magna*, possono essere eseguiti saggi di tossicità acuta su *Ceriodaphnia dubia*, *Selenastrum capricornutum*, batteri bioluminescenti o organismi quali *Artemia salina*, per scarichi di acqua salata o altri organismi (…).
- In caso di esecuzione di più test di tossicità si consideri il risultato peggiore.
- Il risultato positivo della prova di tossicità non determina l'applicazione diretta delle sanzioni di cui al titolo V, determina altresì l'obbligo di approfondimento delle indagini analitiche, la ricerca delle cause di tossicità e la loro rimozione."……

I TEST DI TOSSICITA’

Batteria di test eseguita sulle acque di scarico e superficiali

- **Test di tossicità acuta a 24 h con *Daphnia magna***
  (metodo APAT CNR IRSA 8020 Man 29/2003 o metodo UNI EN ISO 6341:2013).

- **Test di tossicità cronica a 72 h con *Pseudokirchneriella subcapitata*** (metodo UNI EN ISO 8692:2012).

- **Test di tossicità acuta a 15 e a 30 minuti con *Vibrio fischeri*** (metodo UNI EN ISO 11348-3:2009).

Daphnia magna

- **CROSTACEO CLADOCERO** d'acqua dolce, comunemente noto col nome di "pulce d'acqua"
- Piccole dimensioni (massimo 5 mm di lunghezza per una femmina adulta)
- Il corpo è costituito da due valve saldate dorsalmente a formare il **CARAPACE**, dove sono racchiusi tutti gli organi
- Due paia di **ANTENNE**, il secondo paio ha funzione natatoria ed alimentare
- Il capo è provvisto di un solo **OCCHIO COMPOSTO** situato in posizione mediana
- Gli individui sono a sessi separati e presentano **DIMORFISMO SESSUALE**

immagine modificata da wikipedia/images.it

Le femmine sono già riproduttive dopo sette giorni di vita

- Due tipologie di riproduzione:

➢ La **RIPRODUZIONE SESSUATA** con fecondazione da parte dei maschi, avviene soltanto in condizioni ambientali sfavorevoli o di stress, con formazione di due grandi uova durature, chiamate EFIPPI.

➢ La **RIPRODUZIONE PER PARTENOGENESI** avviene in assenza di stress ambientali, non necessita di fecondazione e porta alla formazione di cloni.

- Le uova, anche trenta o quaranta per volta, vengono incubate all'interno di una camera dorsale, dove compiono l'intero ciclo.
- Lo sviluppo è diretto e l'accrescimento avviene per **MUTE** successive.

Daphnia magna

L'allevamento di *Daphnia magna* avviene in una camera termostatica in cui le condizioni vengono mantenute costanti:

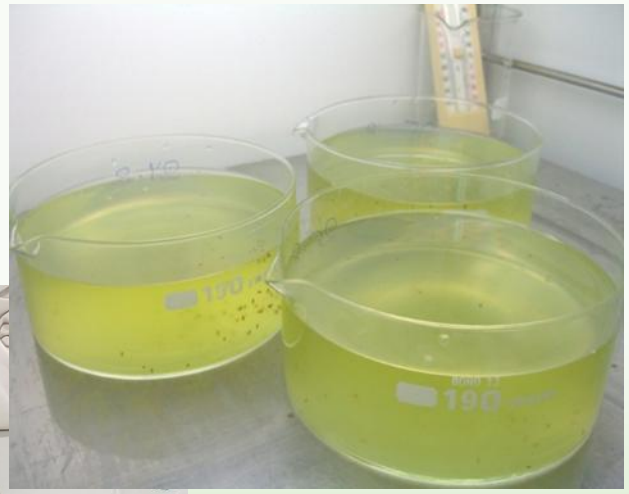
- ✓ temperatura di 20 ± 1˚C;
- ✓ illuminazione pari a 1.000 ± 200 lux;
- ✓ fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio;

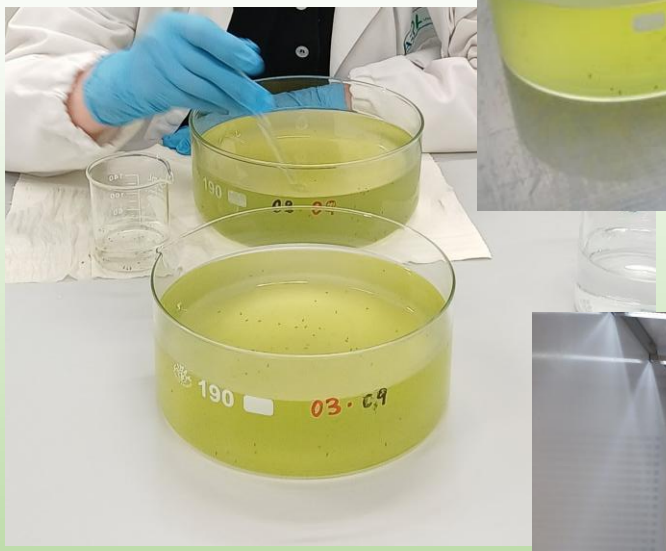
L'alimentazione è costituita da una sospensione di *P.subcapitata* e da una sospensione di *S.cerevisiae*.

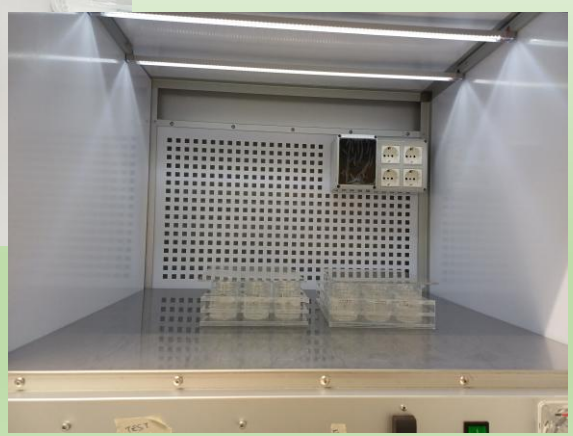
Il test prevede:

- ➢ dafnidi di età inferiore alle 24 h
- ➢ un tempo di contatto con il campione di 24 h
- ➢ al termine si contano gli organismi immobili

Effetto: Immobilizzazione percentuale (I%).

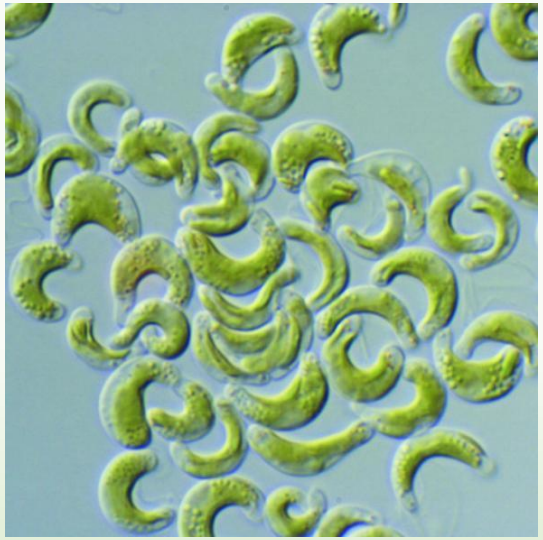






Pseudochirkneriella subcapitata

- **ALGA VERDE UNICELLULARE** planctonica
- Forma di **MEZZALUNA**
- Ubiquitaria in molte acque dolci
- **VOLUME CELLULARE** da 40 a 60 μm^3
- Riproduzione vegetativa principalmente per **SCISSIONE BINARIA**

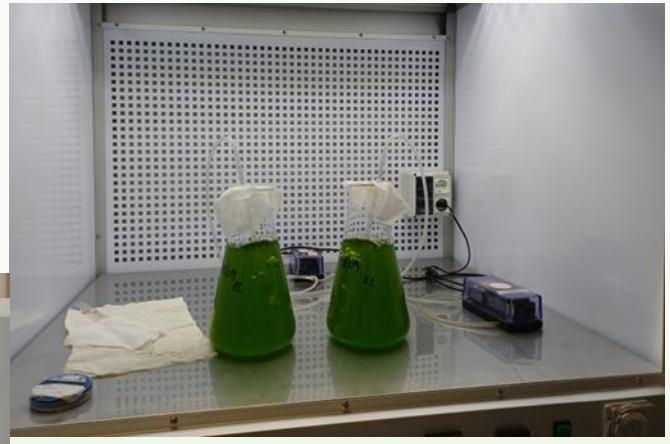


source img http://www.ccap.ac.uk/strain_info.php?Strain_No=278/4

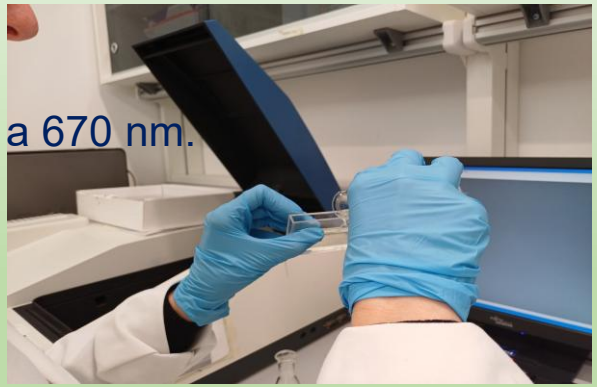
- Le alghe rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici: l'ossigeno, prodotto mediante il processo fotosintetico, è indispensabile per la sopravvivenza delle altre specie animali
- Rappresentano la base dell' alimentazione degli organismi consumatori
- La modificazione della comunità fitoplanctonica può alterare la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema (ad esempio eutrofizzazione)

Pseudokirchneriella subcapitata

Per il saggio si utilizza una coltura algale monospecifica mantenuta in continuo in laboratorio.
Il test dura 72 h all'interno di un termostato in cui le condizioni vengono mantenute costanti:



- Temperatura di 23 ± 2 °C;
- Illuminazione tra 6000 e 10000 lux;
- Agitazione a 100 rpm.



Dopo 72 h, si procede alla misura della densità algale mediante lettura allo spettrofotometro a 670 nm.

In presenza di sostanze tossiche si ha inibizione delle proliferazione delle cellule algali

Effetto: Inibizione della crescita algale (I%).

Vibrio fischeri

BATTERIO UNICELLULARE GRAM-NEGATIVO

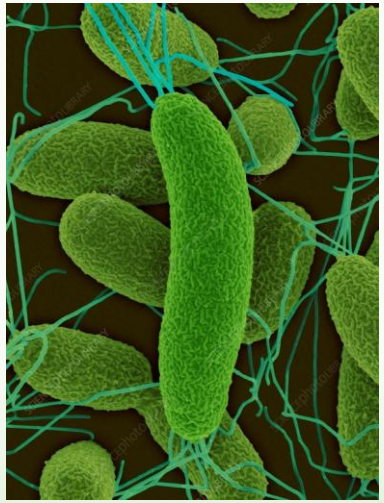


Immagine modificata da sciencephoto

- Forma bastoncellare dotato di flagelli
- Diffuso negli ambienti marini di tutto il mondo
- Spesso vive in simbiosi mutualistica con vertebrati
- Anaerobio facoltativo
- Emette **LUMINESCENZA DI COLORE BLU**, solo in presenza di ossigeno, quando la popolazione batterica è in concentrazione elevata (10^6 cell/mL) e in conseguenza dell'interazione cellula-cellula (quorum sensing)
- La reazione di bioluminescenza batterica, catalizzata dall'enzima luciferasi, rilascia energia finale sotto forma di fotoni alla lunghezza d'onda di **490 nm**.

Vibrio fischeri

Si utilizzano batteri liofilizzati e congelati disponibili commercialmente.

La presenza di sostanze inibenti nel campione testato determina una riduzione della bioluminescenza, direttamente proporzionale alla tossicità del campione.

Tramite bioluminometro a 490 nm si misura la bioluminescenza emessa in modo naturale dal batterio al tempo zero e dopo 15’ e 30’ di contatto con il campione in esame.

Effetto: inibizione percentuale della luminescenza (I%).

I TEST ECOTOSSICOLOGICI: FITOTOSSICITA’

- Deliberazione Regione Lombardia n°X/2031, Disposizioni regionali per il trattamento e l’utilizzo a beneficio dell’agricoltura, dei fanghi di depurazione delle acque reflue di impianti civili ed industriali…, 2014

Tabella 5.2 – Valori limite e concentrazioni caratterizzanti i fanghi di alta qualità ed i fanghi idonei avviati all’utilizzo in agricoltura.

Parametro	u. d m.	Valori limite	
		Fango di alta qualità	Fango idoneo
pH		5,5 < pH ≤ 11	
Sostanza secca (residuo secco a 105°C)	%		
Residuo secco a 600°C	%		
SSV/SST*	%	< 60	< 65
Metalli pesanti			
Cadmio	mg/kg ss	≤ 5	≤ 20
Cromo totale	mg/kg ss	≤ 150	≤ 750
Mercurio	mg/kg ss	≤ 5	≤ 10
Nichel	mg/kg ss	≤ 50	≤ 300
Piombo	mg/kg ss	≤ 250	≤ 750
Rame	mg/kg ss	≤ 400	≤ 1000
Zinco	mg/kg ss	≤ 600	≤ 2500
Arsenico	mg/kg ss	≤ 10	-
Parametri agronomici			
Carbonio organico	% ss	> 20	
Azoto totale	% ss	> 1,5	
Fosforo totale	% ss	> 0,4	
Potassio totale	% ss		
Grado di umificazione	DH%		
Inquinanti organici			
IPA	mg/kg ss	< 6	
PCB	mg/kg ss	< 0,8	
PCDD/F	ng TEQ/kg ss	< 50	
Parametri microbiologici			
Salmonelle	MPN/g ss	< 100	
Coliformi fecali	MPN/g ss	< 10.000	
Parametri biologici			
Test di fitotossicità	Test di accrescimento o di germinazione. Per l’accrescimento si applica la metodologia di cui all’Allegato B della d.g.r. 16/04/2003 n. 7/12764. Indice di germinazione (diluizione al 30%) deve essere > 60%		

TEST DI FITOTOSSICITA’

Vengono eseguiti su fanghi di depurazione per l’utilizzo in agricoltura e su compost:

- **Test di accrescimento a 21 giorni con *Lactuca sativa* (lattuga)**
  (DGR 16 Aprile 2003 N.7/12764 - Allegato B)

- **Indice di germinazione a 24 h con *Lepidium sativum* (crescione inglese)**
  (metodo UNI 10780:1998 – Appendice K)

Accrescimento a 21 giorni con *Lactuca sativa* (lattuga)

- Si valuta l'effetto di matrici complesse, quali fanghi e compost, sui vegetali.

- La crescita delle piante è correlata positivamente alla presenza di elementi nutritivi e negativamente alla presenza di elementi in eccesso e/o di sostanze tossiche.

- Viene coltivata una specie vegetale indicatrice, la lattuga, su un substrato cui è stata aggiunta, a concentrazioni diverse, la matrice da saggiare, fango o compost.

Accrescimento a 21 giorni con *Lactuca sativa* (lattuga)

Condizioni del test

- Fotoperiodo: 16 ore di luce e 8 di buio.
- Intensità luminosa: 4500 ± 1000 lux
- Temperatura: 25 ± 2 °C durante le 16 ore di luce;16 ± 2 °C durante le 8 ore di buio.
- Umidità: 80%.

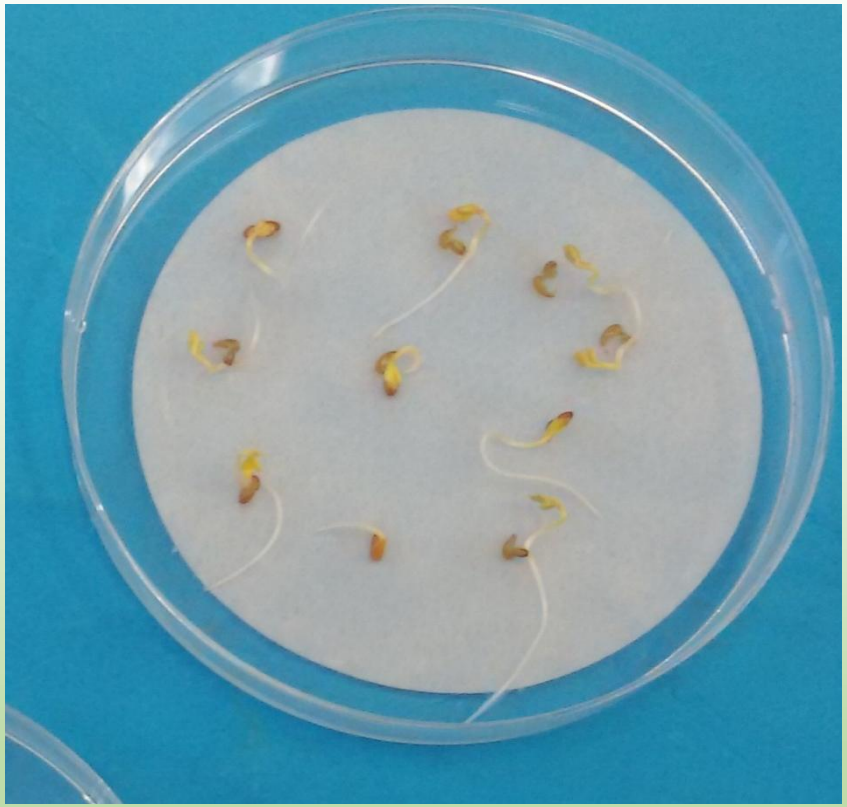
dopo 21 giorni

La crescita delle piante (biomassa fresca e secca prodotta) viene confrontata con quella ottenuta dalle medesime piante allevate sul solo substrato (controllo).

Indice di germinazione a 24 h con *Lepidium sativum* (crescione inglese)

Metodo UNI 10780:1998 - Appendice K

- Si valuta la tossicità di campioni di compost e fanghi destinati ad uso agricolo.
- Si prepara un estratto acquoso del campione, sul quale si valuta la germinazione dei semi di crescione inglese (*Lepidium sativum*), mediante conta dei semi germinati e misurazione della lunghezza radicale.
- La germinazione e l'allungamento radicale dei semi nei campioni viene confrontata con quella ottenuta dagli stessi semi nel controllo (acqua distillata).



Indice di germinazione a 24 h con *Lepidium sativum* (crescione inglese)

- Il test viene condotto al buio e a 27±1 °C per 24 h
- Viene calcolato L'INDICE DI GERMINAZIONE (Ig)

$$I_g = \frac{G_c \cdot L_c}{G_t \cdot L_t} \cdot 100$$

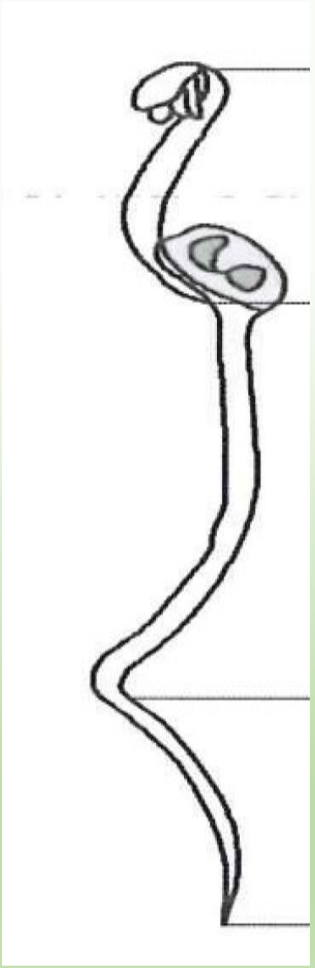
dove:

G_c è il numero medio semi germinati - campione;

G_t è il numero medio semi germinati - testimone;

L_c è la lunghezza radicale media - campione;

L_t è la lunghezza radicale media - testimone.



IL METODO MPN APPLICATO ALLE ACQUE

ISO 9308-2:2012 - Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 2: Most probable number method

Il metodo MPN applicato alle acque

Escherichia coli

- Batterio gram-negativo
- Forma bastoncellare
- Aerobio ed anaerobio facoltativo

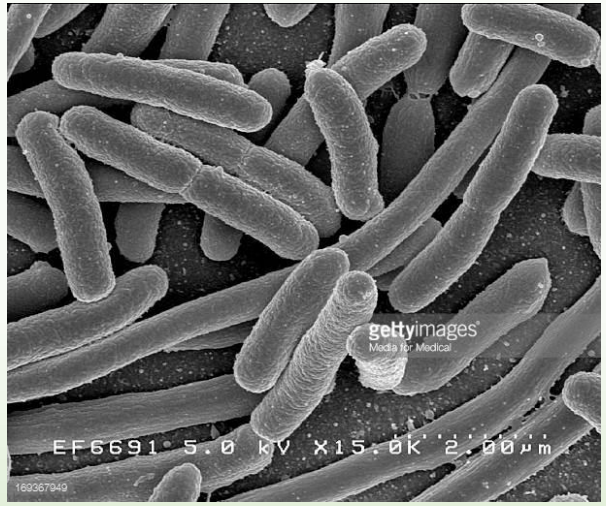


Immagine modificata da getty/images.it

- È una delle principali specie di batteri che vive nella parte inferiore dell'intestino di animali a sangue caldo, uomo compreso. È necessario per la corretta digestione del cibo
- È il principale indicatore di contaminazione fecale dei corpi idrici

Il metodo MPN applicato alle acque

Ricerca di ***E.coli*** tramite l'utilizzo di un Kit con tecnologia di substrato definito (DST)

Vantaggi

- Semplice utilizzo
- Non necessita della preparazione di terreni, in quanto vengono forniti terreni monodose disidratati
- Necessita di soli 100 ml di campione per l'allestimento
- Rapidità di esecuzione
- Identifica ***E.coli*** in modo specifico
- Risultati entro 18 ore

Il metodo MPN applicato alle acque

Valutazione della contaminazione da *Escherichia coli* in acque superficiali (metodo ISO 9308-2:2012)

- ✓ Ad un campione di acqua superficiale o ad una sua diluizione viene aggiunto un terreno disidratato, successivamente si trasferisce la miscela all'interno di vassoi che vengono sigillati

TERRENO DISIDRATATO

VASSOI con 49 pozzetti grandi e 48 pozzetti piccoli

- ✓ L'incubazione avviene a 36 ± 2 °C per 18-22 ore

Il metodo MPN applicato alle acque

Cosa avviene dopo 18-22 ore di incubazione?

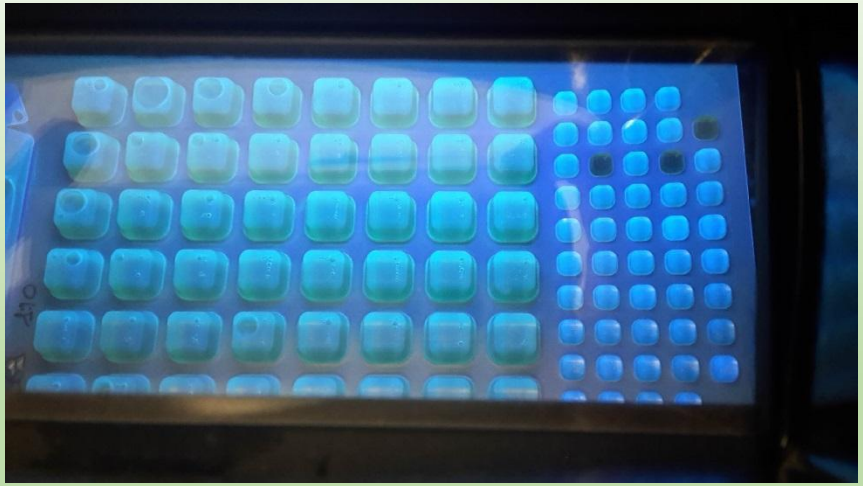
I pozzetti contenenti il campione possono aver subito un cambiamento di colorazione:

- ✓ I batteri coliformi eventualmente presenti nel campione metabolizzeranno il nutriente indicatore ONPG (orto-nitrophenil-β-galattoside) presente nel terreno. Questa reazione è un'idrolisi, che porta alla formazione di ortonitrofenolo di colorazione gialla.

Il metodo MPN applicato alle acque

- ✓ Contemporaneamente ***E.coli***, se presente, metabolizzerà il nutriente indicatore MUG(4-metilumbelliferil-β-D-glucoronide) determinando fluorescenza dei pozzetti.

I pozzetti gialli che, esaminati sotto la luce UV (365 nm) in una camera oscura, presentano qualsiasi grado di fluorescenza sono da considerarsi positivi per ***E. coli***.



Il metodo MPN applicato alle acque

- ✓ Contando il numero di pozzetti grandi e piccoli positivi per ***E.coli*** e per mezzo di tabelle statistiche a doppia entrata, può essere determinato il numero più probabile (MPN-most probable number) di ***E.coli*** in 100 ml del campione.

Positive large wells	Positive small wells	MPN	95% Confidence	
			Lower limit	Upper limit
39	9	90,9	66,6	121,6
39	10	93,4	68,4	124,2
39	11	95,9	70,2	127,6
39	12	98,4	72,1	130,6
39	13	101,0	74,0	133,7
39	14	103,6	75,9	135,3

Bibliografia

- Decreto Legislativo n° 152 e s.m.i., *Testo Unico Ambientale.* 3 aprile 2006
- APAT CNR IRSA 8020, *Metodi di valutazione della tossicità con Daphnia, 2003*
- *UNI EN ISO 6341:2013, Determinazione dell'inibizione sulla mobilità di Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) Prova di tossicità acuta.*
- UNI EN ISO 8692, *Prova di inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi* - Appendice A (*Annex* A),2012
- UNI EN ISO 11348-3, *Qualità dell'acqua – Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione luminosa di Vibrio fischeri (prova su batteri luminescenti) Parte 3: metodo con batteri liofilizzati e congelati*, 2009
- ISO 9308-2:2012 - Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 2: Most probable number method
- Deliberazione Regione Lombardia n°X/2031, Disposizioni regionali per il trattamento e l'utilizzo a beneficio dell'agricoltura, dei fanghi di depurazione delle acque reflue di impianti civili ed industriali…, 2014
- DGR 16 Aprile 2003 N.7/12764 - ALLEGATO B – TEST DI FITOTOSSICITA'- Effetto di matrici complesse sulla crescita delle piante superiori
- Decreto Legislativo n°75, Riordino e revisione della disciplina in materia di fertilizzanti, a norma dell'articolo 13 della legge 7 luglio 2009, n. 88, 2010
- UNI 10780:1998 Compost Classificazione, requisiti e modalità di impiego. Appendice K – Indice di germinazione

Grazie per l’attenzione