

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**Dipartimento delle Scienze Biologiche**

**XXII CICLO** Dottorato di ricerca in **Biologia Avanzata**



**TESI**

**PROGETTO DI RICERCA**

**DOTTORATO IN BIOLOGIA AVANZATA**

**‘ EFFETTI DEL PERCOLATO DI DISCARICA RSU SULLO SVILUPPO  
EMBRIONALE DI *DANIO RERIO* ’**

**TUTOR**

*Prof. Luciano Gaudio*

**COTUTOR**

*Prof. Francesco Aliberti*

**DOTTORANDO**

*Dott. Antonio Arcuri*

<b>INDICE</b>	<b>pag.</b>
Abstract	<b>3</b>
Scopo della ricerca	
1.0 Introduzione	<b>6</b>
1.1 Relazione sullo stato dell'ambiente in Campania 2009	<b>7</b>
<b>1.2</b> Il percolato di discarica come agente inquinante	<b>12</b>
<b>1.3</b> Caratteristiche chimico-fisiche del percolato nella Regione Campania	<b>15</b>
<b>1.4</b> La misura del danno.	<b>22</b>
<b>2.0</b> I bioindicatori ambientali e l'uso degli embrioni di <i>Danio rerio</i>	<b>24</b>
<b>2.1</b> <i>Daphnia Magna</i>	<b>26</b>
<b>2,2</b> <i>Balanus amphitrite</i>	<b>27</b>
<b>2.3</b> <i>Danio rerio</i>	<b>29</b>
<b>3.0</b> Strategia sperimentale	<b>36</b>
3.1 Materiali e metodi	<b>39</b>
3.2 Metodi di microscopia ottica	<b>45</b>
<b>4.0</b> Osservazioni e risultati sperimentali	<b>50</b>
4.1 Detossificazione, biodegradabilità e tossicità del percolato.	<b>50</b>
Conclusioni	<b>66</b>
<b>4.2</b> Studio dell'embriotossicità e teratogenicità del percolato di discarica su <i>Danio rerio</i> .	<b>69</b>
<b>4.2°a</b> Il percolato della discarica di Parco Saurino	<b>82</b>
<b>4.2b</b> Il percolato della discarica di Serre	<b>90</b>
<b>6.0</b> Conclusioni	<b>103</b>
Bibliografia	<b>104</b>

## **Effects of landfill leachate(Pergolato) on the embryonic development of zebrafish (Danio rerio)**

### **Abstract**

Leachate is a liquid derived from the infiltration of rainwater into the landfill which, going through the waste, is enhanced by substances resulting either from the decomposition of the waste and liquids derived from the metabolism of the present organic colliquativa. The result is a complex mixture of organic and inorganic substances, and in particular, in the leachate samples analyzed from different systems of landfills, it appears in the inorganic component a high concentration of ammonia, nitrates, sulfates, iron and zinc. In the present work we attempted to assess the acute toxicity of leachate using specific ecotoxicological models and, in a more detailed study, to test this pollutant on *Danio rerio* embryos to check for any morphological changes and teratogenic aspects. In particular, the exposure to the leachate showed a high mortality, a declining trend in the development of zebrafish embryo from the earliest stages of gastrulation, however these effects were closely related to the dose of leachate used. The object of this study was also to evaluate new scientific approaches for the detoxification of leachate based on the capacity of self-detoxification, using active biomass from urban wastewater treatment plant and bacterial strains, specially selected from the same leachate. The data obtained from toxicological tests show a high toxicity of landfill leachate with obvious alterations in embryonic development of zebrafish and alterations of phenotypic effects derived with dilutions of leachate pressures. The detoxification of the leachate by biological approach has not produced encouraging results, however also indicating that the use of more massive bacterial inoculation with selected strains of flocculants or trials in anaerobic environment can provide additional

tools for those purposes. Finally, in a preliminary study we tried to use the leachate, diluted appropriately, such as cells culture of microalgae, especially the strain *Tetraselmis suecica*, where we observed a good performance of algal growth, letting us introducing new scientific approaches for the treatment of detoxification landfill leachate.

## **SCOPO DELLA RICERCA**

Il presente lavoro si è posto il compito di studiare una miscela complessa quale è il percolato di discarica per valutarne la tossicità acuta su specifici modelli biologici e per verificare la capacità di autodetossificazione. Il percolato sta attirando l'attenzione dei mass-media per via dell'uso eccessivo delle discariche quale strumento di conferimento e smaltimento dei rifiuti. Con la promulgazione del Decreto Legislativo n. 152 dell'11 maggio 1999, corretto ed integrato dal D.Lgs n. 258 del 18 agosto 2000 e recentemente ampliato nel management ambientale dal D.Lgs n°152 del 3 aprile 2006, anche il nostro Paese si è dotato di un sistema per il biomonitoraggio ambientale. Dalla Relazione sullo stato dell'ambiente in Campania 2009, redatto dall'Arpac Campania, emergono dati drammatici relativi alla produzione di rifiuti urbani annuali nella Provincia di Napoli ed in particolare alla quota annuale di indifferenziata prodotta sul totale. L'elevata produzione di percolato che ne deriva pone l'attenzione dei ricercatori a valutare le potenzialità tossicologiche di tale inquinante con nuovi approcci sperimentali ed a individuare nuove strategie scientifiche per il trattamento di detossificazione del percolato. Poiché negli ultimi anni è andata affermandosi l'impostazione volta a valutare lo stato complessivo dell'ambiente in relazione all'impatto provocato dalle attività umane ed a quantificare gli eventuali danni a livello ecosistemico, è risultato indispensabile, a questo fine, utilizzare strumenti adeguati all'analisi del percolato attraverso l'impiego di specifici studi eco-tossicologici.

## 1.0 INTRODUZIONE

La nuova sfida per l'umanità nel terzo millennio è coniugare sviluppo economico e conservazione delle risorse naturali nella ricerca di un giusto equilibrio. Le conoscenze biologiche diventano uno strumento imprescindibile sia per attuare una gestione razionale del territorio e sia per attuare quel risanamento ambientale vista la pressione continua esercitata dalle attività antropiche sull'ecosistema. Il monitoraggio ambientale, lo sviluppo di nuovi approcci scientifici nella valutazione ambientale, la necessità di approfondire le conoscenze per capire le variabili in gioco dei processi naturali rappresentano l'oggetto del ricercatore. Dopo tali premesse è opportuno introdurre l'oggetto del presente progetto di ricerca relativo all'inquinamento ambientale. Le immissioni degli inquinanti nell'ambiente, a volte potenzialmente devastanti quando trattasi di miscele complesse, o vedi recentemente gli scarichi nel Mediterraneo di rifiuti radioattivi, ma basterebbe citare l'incidente verificatosi sulla piattaforma petrolifera nel Golfo del Messico con lo sversamento in mare di quasi 800 milioni di litri di greggio, rappresentano un vero problema generale perché possono alterare in maniera irreversibile i cicli naturali dell'ecosistema considerato. Il presente lavoro si è focalizzato sul problema del percolato di discarica come prodotto di scarto derivante dalle discariche, luogo deputato al confinamento dei rifiuti urbani e industriali differenziati.

## 1.1 RELAZIONE SULLO STATO DELL'AMBIENTE IN CAMPANIA 2009

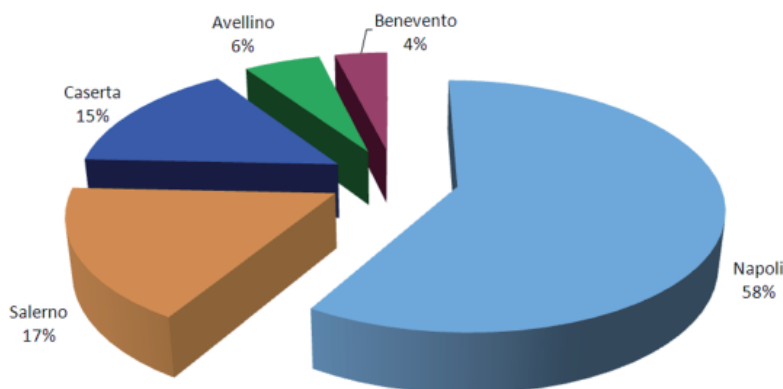
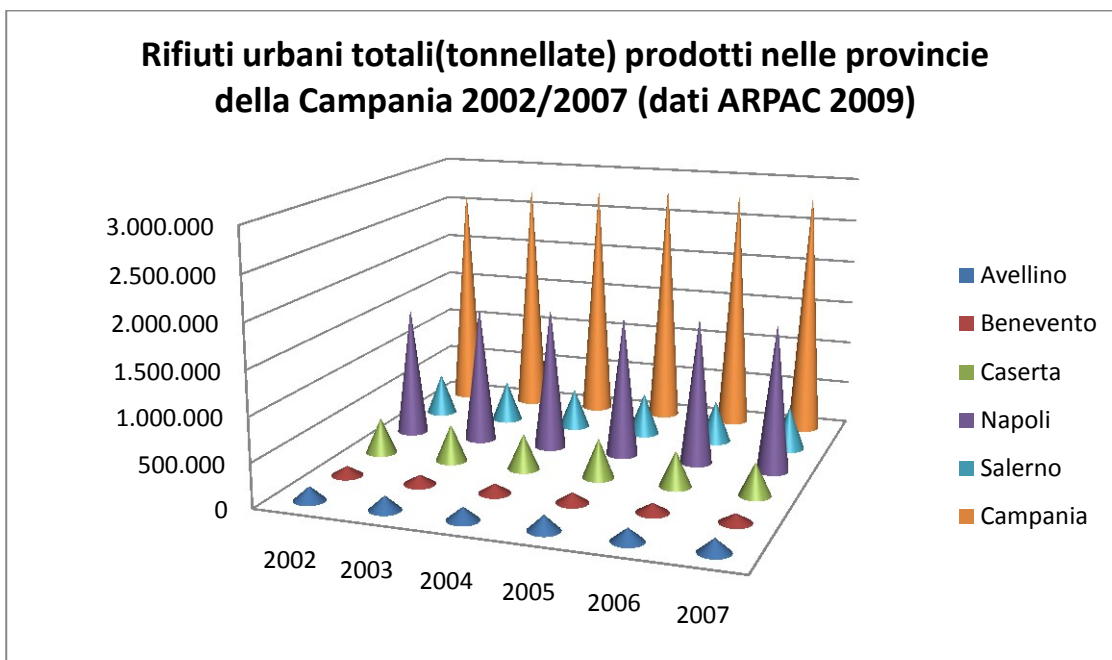
Con la “Relazione sullo stato dell’ambiente in Campania 2009”, reporting realizzato dall’ARPAC sulla base dei dati ambientali raccolti in questi anni di attività, in particolare la parte dedicata ai *Rifiuti e flussi di materia*, si può avanzare un quadro generale utile per entrare meglio nella problematica ambientale del percolato. Dal report ambientale si evince un ciclo dei rifiuti monco, caratterizzato da ritardi per la realizzazione di un piano efficiente, carenze nella gestione e nella bonifica della matrice ambientale, *un ricorso diretto allo smaltimento in discarica* quale principale sistema di confinamento dei rifiuti. Per meglio comprendere i problemi connessi allo smaltimento dei rifiuti introduciamo alcuni dati significativi iniziando dalla produzione totale dei rifiuti nella sola Regione Campania (**tab. 1**).

**Tabella 1:** Rifiuti urbani totali (tonnellate)prodotti in Campania, anni 2002-2007( ARPAC-2009).

Provincia	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Avellino	154.098	157.678	143.097	166.624	143.711	151.788
Benevento	103.735	104.731	106.731	112.209	103.904	99.432
Caserta	402.415	419.229	401.474	443.532	399.495	375.193
Napoli	1.483.907	1.566.209	1.632.684	1.597.557	1.658.179	1.673.616
Salerno	464.943	455.043	445.943	475.584	469.842	493.866
CAMPANIA	2.611.100	2.704.893	2.731.933	2.797.511	2.777.137	2.795.902

Questi dati sono sottostimati non tenendo conto probabilmente di ingenti quantitativi di rifiuti urbani allocati in siti di stoccaggio provvisori a causa della

grave 'crisi' nella raccolta dei rifiuti urbani, avutasi in quell'arco di tempo e non contemplati nei dati pervenuti dagli enti locali all'ARPAC. Con il grafico( **figura 1**) inerente la produzione % in Campania di r.s.u. sappiamo che: il 58% della produzione di rifiuti urbani in Campania è dovuta alla provincia di Napoli, il 32% alle province di Salerno e Caserta, ed infine il 10% alle province di Avellino e Benevento.



**Figura 1:**Percentuale di produzione r.s.u. per provincia in Campania, anni 2002-2007(ARPAC 2009):.

↓  
L'analisi della tipologia merceologica ( **figura 2**) dei rifiuti in Campania nel 2007 offre ulteriori spunti per la qualità del rifiuto che finisce a valle del sistema. La percentuale di raccolta differenziata (tab 4) sul totale prodotto, e di



contro la quantità del rifiuto indifferenziato confinato (**tab 2**), ci indicano la dimensione della drammaticità dell'emergenza rifiuti in Campania, per l'esclusivo allocamento in discarica del rifiuto urbano ed industriale prodotto. E' chiaro che la qualità del percolato è fortemente influenzata dalla caratteristica merceologica del rifiuto confinato, e il potenziale inquinante del percolato è una conseguenza di tali premesse, deduzioni che verranno con il presente studio di dottorato computati con dati specifici.

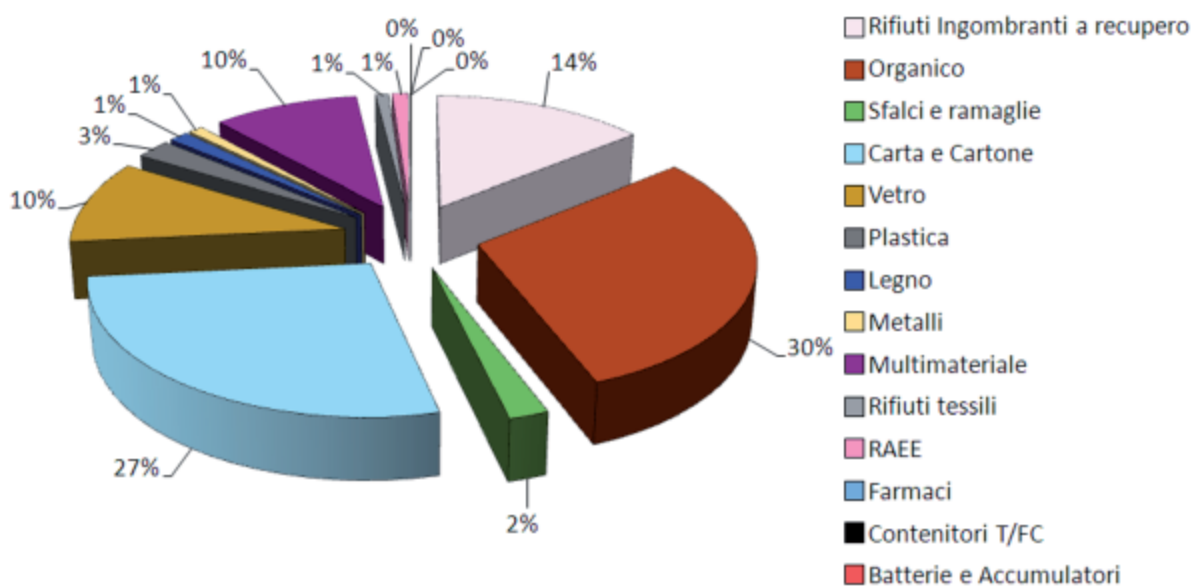


Figura 2: Composizione merceologica di raccolta differenziata in Campania, anno 2007 (ARPAC 2009)

L'obiettivo principale della raccolta differenziata (**tab 4**) è, in generale, quello di minimizzare la quantità di rifiuti indifferenziati avviati a smaltimento attraverso il confinamento in discarica.

**I dati della produzione regionale** di rifiuti urbani indifferenziati (**tab 2**) evidenziano, ad eccezione di alcuni territori virtuosi, l'inefficienza dei piani attuativi per la gestione dei rifiuti con conseguenze devastanti in termini di inquinamento delle matrici ambientali. In particolare nella tabella (dati ARPAC) è riportata la produzione di rifiuti indifferenziati per provincia relativa all'arco

temporale 2002-2007, dati quantitativi utili per capire le continue crisi anche sociali che investono determinati territori.

Provincia	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Avellino	139.183	140.244	124.716	140.275	107.809	109.549
Benevento	95.965	95.571	97.578	99.822	89.292	82.105
Caserta	380.574	394.578	366.199	398.647	357.506	348.733
Napoli	1.384.563	1.440.772	1.487.653	1.459.267	1.511.807	1.490.262
Salerno	406.619	383.171	357.486	385.107	369.733	363.443
CAMPANIA	2.408.906	2.456.339	2.435.636	2.485.123	2.438.153	2.396.099

**Tabella 2:**Rifiuti urbani indifferenziati (tonnellate) prodotti in Campania,anni 2002-2007 (ARPAC-2009).

La forma prevalente di gestione dei rifiuti urbani nel Sud Italia è stata rappresentata dall'uso massivo dello smaltimento in discarica (**tab. 3**). Questa soluzione, a volte forzata, di fatto si è rilevata fallimentare sia per il relativo fabbisogno del territorio e sia per l'elevata produzione di scarti (rifiuti) che deriva dai processi socio-economici attualmente dominanti. I dati mostrano un incremento progressivo in termini di 'produzione totale' di rifiuti (**tab 1**) ed un elevata produzione di rifiuto indifferenziato (**tab. 2**) che, visto l'aumento demografico del territorio e l'insorgenza di problematiche sociali, dovute alla necessità di individuare nuovi siti per la costruzione di impianti per lo smaltimento, rischiano di far cadere il Mezzogiorno in una crisi ambientale endemica. L'incapacità delle istituzioni di avviare tutti gli strumenti per la regolarizzazione e l'attuazione di un ciclo dei rifiuti ecosostenibile, come la costruzione di termovalorizzatori ed una politica del riciclo, ha portato progressivamente alle varie fasi emergenziali, i dati ARPAC mostrano tali indici negativi che prefigurano futuri contenziosi sociali.

	Quantità totale rifiuti urbani prodotti (tonnellate/anno)	Quantità totale rifiuti urbani smaltiti in discarica e in siti di stoccaggio balle (tonnellate/anno)	Percentuale dei rifiuti urbani prodotti smaltiti in discarica e in siti di stoccaggio balle
2003	2.704.893	2.266.015	83,77
2004	2.731.933	2.100.441	76,88
2005	2.797.511	2.262.979	80,89
2006	2.777.137	2.161.960	77,85
2007	2.795.902	2.094.125	74,90

**Tabella3:** Quantità rifiuti urbani indifferenziati smaltiti in discarica Campania,anni 2003-2007(ARPAC 2009).

<b>Tabella 4:</b> Percentuale di raccolta differenziata in Campania, anni 2002-2007(ARPAC 2009)						
Provincia	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Avellino	10,30	11,76	13,66	17,19	26,58	29,60
Benevento	7,97	9,30	9,13	12,00	14,96	18,54
Caserta	5,90	6,39	9,55	11,00	11,42	7,67
Napoli	7,28	8,71	9,66	9,41	9,59	11,91
Salerno	13,64	17,17	21,56	20,68	23,16	28,70
CAMPANIA	8,42	10,00	11,80	12,15	13,28	15,55

L'uso della discarica è molto frequente nei territori poco sviluppati, mentre in quelli avanzati tecnologicamente la tendenza generale è volta a limitare il conferimento in discarica applicando attivamente politiche di riduzione, di riuso e di riciclo del rifiuto, sfruttando tecnologie quali il compostaggio e l'incenerimento, condizione evidentemente non applicata in Campania.

**Partendo** da questi dati statistici (ARPAC 2009) possiamo introdurre la problematica del *'percolato'*, che si ricorda è il prodotto inquinante derivato dal confinamento dei rifiuti in discarica.

## 1.2 IL PERCOLATO DI DISCARICA COME AGENTE INQUINANTE

*Il percolato è un liquido derivante dall'infiltrazione di acqua meteorica nella discarica che, nel percolare tra i rifiuti, si arricchisce di sostanze derivanti dai processi di decomposizione dei rifiuti nonché dei liquidi derivanti dalla colliquazione metabolica della frazione organica presente. Non è possibile calcolare la durata del periodo di attività "biologica" di una discarica che è funzione delle tipologie dei rifiuti confinati, delle loro quantità e delle caratteristiche geologiche del sito. Si valuta comunque in non meno di alcuni secoli il periodo di attività biologica, perciò sembra evidente che in assenza di un piano per il controllo sistematico dei siti attivi ed inattivi tale incuria porterà al disastro ambientale di quel territorio. Finalmente va maturando l'idea che la discarica al pari di altri sistemi di trattamento per lo smaltimento dei rifiuti come il termovalorizzatore non è un semplice sito di confinamento, bensì un impianto che necessita di un continuo monitoraggio e adeguati interventi per l'ottimale gestione del sito stesso.*



Il percolato è un refluo con un tenore più o meno elevato di inquinanti organici ed inorganici, derivanti dai processi biologici e fisico-chimici. Nel confinamento in discarica del rifiuto come detto si manifestano intensi processi biochimici dovuti all'azione dei microrganismi che influenzano la natura organica ed inorganica del percolato e, nello specifico, vista la complessità dei processi che si istaurano in discarica possiamo individuare alcuni stadi caratterizzanti:

- Lo stadio aerobico, limitato nel tempo dalla disponibilità di ossigeno per i batteri, è caratterizzato da una degradazione principale delle proteine ad amminoacidi, da carboidrati convertiti a  $\text{CO}_2$  ed acqua, dall'idrolisi dei grassi in acidi grassi e glicerolo, da acidi volatili a alcali, mentre la cellulosa viene degradata a glucosio e, questa, a sua volta convertita in  $\text{CO}_2$  ed acqua e poi nitrati e solfati ecc.. La fase di degradazione aerobica è, in genere, di breve durata ed i quantitativi di percolato prodotti sono minimi. Il percolato formatosi in questa prima fase presenterà una leggera acidità e una elevata COD dovute alla presenza di sostanze organiche parzialmente degradate.
- Lo stadio anaerobico definito fase acidogenica, vede la conversione di substrati quali acidi grassi, zuccheri ed amminoacidi in altri prodotti: acidi organici e  $\text{CO}_2$  con conseguente diminuzione del pH (tra 5,5 e 6,5). Il percolato si arricchisce in questa fase di ioni inorganici (es.  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ /  $\text{Ca}^{++}$ /  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ), stadio in cui si assiste ad una riduzione dei solfati che diventano solfuri, ad una liberazione di elementi metallici quali ferro, manganese o altri metalli pesanti, solubilizzati nella fermentazione acida.
- Lo stadio anaerobico metanigeno in cui si ha la conversione della sostanza organica in metano e anidride carbonica, con incremento della concentrazione dei solfati, caratterizzata dalla diminuzione della concentrazione di COD, e per il consumo di acidi organici si ha un aumento del pH fino a valori di neutralità con la conseguente diminuzione della solubilità dei metalli e del calcio. L'Ammoniaca viene lisciviata perché non è convertita in ambiente anaerobico (nitrificazione solo in condizioni aerobiche).

- Lo stadio anaerobico metanigeno stabile, in cui la trasformazione della materia organica biodegradabile raggiunge un certo equilibrio con quantità di metano e anidride carbonica, si registra pH attorno alla neutralità, basse concentrazioni di acidi volatili e di solidi disciolti che si traduce in bassi valori di BOD<sub>5</sub> e bassi valori di BOD<sub>5</sub>/COD (<0,2), oltre al rilascio dell'ammoniaca per le condizioni anaerobiche ancora presenti.

Nel passaggio da fase acida a fase metanigena si ha un aumento di pH e una riduzione di COD e BOD<sub>5</sub>. Con il processo di biostabilizzazione dovuto al metabolismo microbico si ha una riduzione del carico organico, una precipitazione dei metalli pesanti in soluzione sottoforma di idrossidi e di carbonati, un aumento del pH ed una riduzione graduale del potenziale redox. Possiamo affermare che un percolato “vecchio” ha rispetto ad uno “giovane” un carico inquinante notevolmente inferiore. In ogni caso ha un elevato carico organico ed inorganico, esprimibile in COD (fra 3.000 ÷ 15.000 mg/litro) e da forti concentrazioni di ammonio (1.000 ÷ 6.000 ppm), cloruri (1.000 ÷ 6.000 ppm) e vari ioni metallici.

**FORMAZIONE DEL PERCOLATO**

**Il percolato è il risultato dei processi biologici, chimici e fisici che si svolgono all'interno delle discariche, strettamente legato alla tipologia del rifiuto confinato e al regime idrico della discarica**

1. *Stadio aerobico*
2. *Stadio anaerobico: fase acidogenica*
3. *Stadio anaerobico metanigeno*
4. *Stadio anaerobico metanigeno stabile*

### 1.3 CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DEL PERCOLATO CAMPANO

I tre grafici a seguire evidenziano le caratteristiche chimiche del percolato proveniente dalle discariche campane prese in esame:

- Macchia Soprano del Comune di Serre (Sa);
- Savignano (Bn);
- Parco Saurino (Av)

Il contenuto organico ed inorganico del percolato è variabile sia da uno stesso impianto di discarica, riferiti al periodo del campionamento, e sia da impianti diversi. Le concentrazioni delle singole sostanze sono influenzate dall'apporto meteorico meteo-climatico, dalla digestione batterica nella stesso sito considerato e dal tipo del rifiuto confinato. I dati analitici relativi al percolato inteso come miscela di sostanze sono stati rilevati attraverso le analisi chimiche svolte presso i centri di raccolta per il trattamento del percolato.

- **Analisi chimiche sul percolato di Savignano**

tabella discarica Savignano I.					
	gen-09	feb-09	apr-09	mag-09	lug-09
<b>BOD</b>	1440		2500	1512	mg/L O2
<b>COD</b>	5059	33577	8100	4640	21725 mg/L O2
<b>Nitrati</b>	49	198	0,1	69	36 mg/L
<b>Ammoniaca</b>	399	571	997	576	414 mg/L
<b>Solfati</b>	32,4		90	346	mg/L

	gen-09	feb-09	apr-09	mag-09	lug-09
<b>Cadmio</b>	0,2		0,2	0,2	mg/L
<b>Cromo T</b>	0,73	3,57	0,5	0,5	0,3 mg/L
<b>Ferro</b>	37	51	17,6	28	1,56 mg/L
<b>Manganese</b>	1,6	15,6	1,4	0,5	7,8 mg/L
<b>Mercurio</b>	0,1		1,2	0,1	0,005 mg/L
<b>Piombo</b>	0,8	1	2	2	1 mg/L
<b>Nichel</b>	1,5	1	1	2,5	1 mg/L
<b>Zinco</b>	6	3,2	0,5	0,5	0,02 mg/L
<b>IPA Tot</b>	1		1	1	mg/L
<b>Fenoli</b>	1,2		0,6	0,4	mg/L

- **Analisi chimiche sul percolato di Parco Saurino**

tabella percolato Parco Saurino	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	
	14 12 2007	14 12 2007	08 01 2008	17 01 2008	07 02 2008	18 02 2008	16 04 2008
<b>BOD</b>	3850	2500	3450	2500	3670	20400	4042
<b>COD ( mg/L O2)</b>	8364	5660	9930	7610	10752	57960	12850
<b>Ammoniaca</b>	850	540	1050	456	1720	8590	880
<b>Nitrati</b>	0,1	0,1	0,1	68	11,59	1	5
<b>Solfati</b>	15	15	18	26	564	1661	808
	14 12 2007	14 12 2007	08 01 2008	17 01 2008	07 02 2008	18 02 2008	16 04 2008
<b>Cadmio</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0.001	0,1
<b>Cromo T</b>	2,1	0,1	0,1	3	2,2	0,1	0,1
<b>Ferro</b>	18	0,2	0,3	17,7	8,8	15	250
<b>Manganese</b>	0,5	0,1	0,1	1,4	0,1	1,5	6,5
<b>Mercurio</b>	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Piombo</b>	0,4	0,1	0,1	0,5	0,07	0,01	0,01
<b>Nichel</b>	1,7	0,1	0,1	0,7	14.24	0,01	0,01
<b>Zinco</b>	2,9	0,1	0,1	2,3	1,6	0,53	28,1
<b>IPA Tot</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Fenoli</b>	4	1	1	1	25,4	0,1	25,6



	16 04 2008	06 05 2008	10 06 2008	07 07 2008	26 08 2008	20 02 2009	15 06 2009	
<b>BOD</b>	4042	1315	10560	8500	508	1800	3500	mg/L O2
<b>COD</b>	12850	6944	36480	28320	1856	6720	11000	mg/L O2
<b>Ammoniaca</b>	880	551	560	402	382	552	2096	mg/L
<b>Nitrati</b>	5	5	5	5	0,1	1,9	0,1	mg/L
<b>Solfati</b>	808	512	618	724	600	45	1	mg/L

	16 04 2008	06 05 2008	10 06 2008	07 07 2008	26 08 2008	20 02 2009	15 06 2009	
<b>Cadmio</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	mg/L
<b>Cromo T</b>	0,1	0,1	0,2	0,3	1,4	0,5	1,3	mg/L
<b>Ferro</b>	250	210	9,8	11,2	13,5	39,7	33	mg/L
<b>Manganese</b>	6,5	7,2	9	15,6	3,2	2,3	2,4	mg/L
<b>Mercurio</b>	0,1	0,1	0,1	9,8	0,2	0,1	0,1	mg/L
<b>Piombo</b>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,1	1	1	mg/L
<b>Nichel</b>	0,01	0,01	1,2	2,4	0,2	1	1,1	mg/L
<b>Zinco</b>	28,1	26,2	2,6	4,4	0,1	3,4	0,5	mg/L
<b>IPA Tot</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1	1	mg/L
<b>Fenoli</b>	25,6	11,1	7,8	2,3	1,8	1,4	0,1	mg/L

- **Analisi chimiche sul percolato di Macchia Soprana (Serre)**

**PERCOLATO DELLA DISCARICA DI Macchia Soprano (Serre) 2007-2008** Tabella percolato Macchia Soprano

	24 09 2007	08 10 2007	17 10 2007	25 10 2007	6 11 2007	19 11 2007	28 11 2007	
<b>BOD</b>	12500	46100	22500	28700	30000	33000	10500	mg/L O2
<b>COD</b>	41000	128650	80000	80000	90000	90528	31488	mg/L O2
<b>Ammoniaca</b>	492	640	576	860	740	476	616	mg/L
<b>Nitrati</b>	20	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	mg/L
<b>solforati</b>	18	28	20	25	46	38	18	mg/L

	24 09 2007	08 10 2007	17 10 2007	25 10 2007	6 11 2007	19 11 2007	28 11 2007	
<b>Cadmio</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	mg/L
<b>Cromo T</b>	0,3	0,6	0,4	0,2	5,6	1,9	0,6	mg/L
<b>Mercurio</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	mg/L
<b>Piombo</b>	1,1	0,6	0,1	0,1	3,5	1,9	0,65	mg/L
<b>Nichel</b>	4,6	1,1	13	13	7,2	11	1,5	mg/L
<b>IPA Tot</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	mg/L
<b>Fenoli</b>	0,1	0,1	0,1	26	32	18	12	mg/L
<b>Manganese</b>	1,9	10,6	26	10	59	35	7,3	mg/L

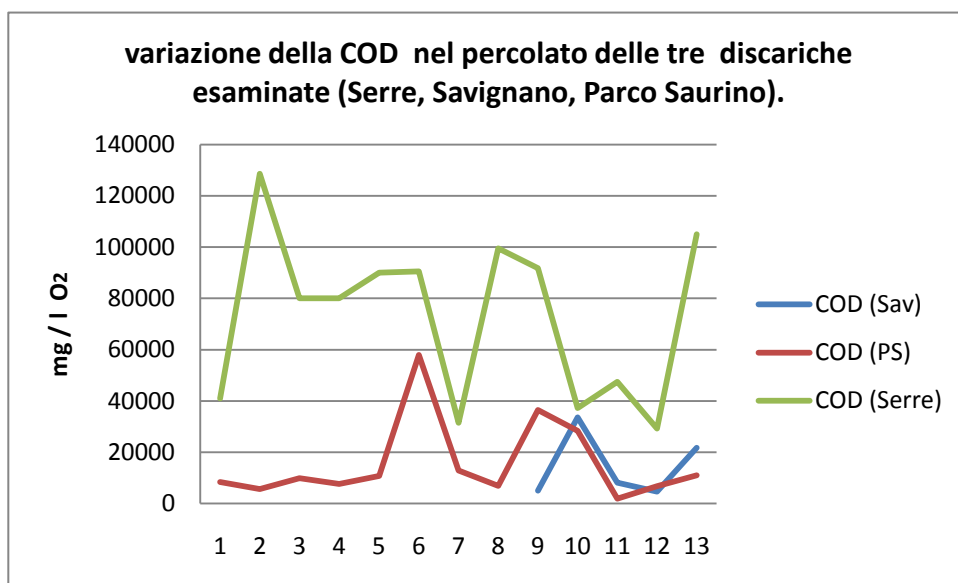
<b>Ferro</b>	63	173	600	231	936	755	86 mg/L
<b>Zinco</b>	6,6	16,6	82	7	102	51	7,3 mg/L

	12 03 2008	02 04 2008	22 04 2008	29 05 2008	14 07 2008	7 08 2008	
<b>BOD</b>	26800	20400	10500	12680	6500	39000	mg/L O2
<b>COD</b>	99500	91720	37200	47432	29300	105000	mg/L O2
<b>Ammoniaca</b>	713	1013	895	823	750	824	mg/L
<b>Nitrati</b>	16,8	50	5	5	5	5	mg/L
<b>Solfati</b>	680	980	409	370	410	170	mg/L
	12 03 2008	02 04 2008	22 04 2008	29 05 2008	14 07 2008	7 08 2008	
<b>Cadmio</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	mg/L
<b>Cromo T</b>	0,1	0,1	0,1	0,32	0,05	0,3	mg/L
<b>Ferro</b>	480	390	440	308	43	2	mg/L
<b>Manganese</b>	24	7,2	36,5	21,2	2,5	0,4	mg/L
<b>Mercurio</b>	2,3	0,01	0,1	0,1	0,03	0,01	mg/l
<b>Piombo</b>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	mg/L
<b>Nichel</b>	0,01	0,01	0,01	1,9	0,01	0,01	mg/L
<b>Zinco</b>	713	690	512	3,4	3,3	0,4	mg/L
<b>IPA Tot</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	mg/L
<b>Fenoli</b>	4,6	6,8	15,5	10,6	18,2	8,6	mg/L

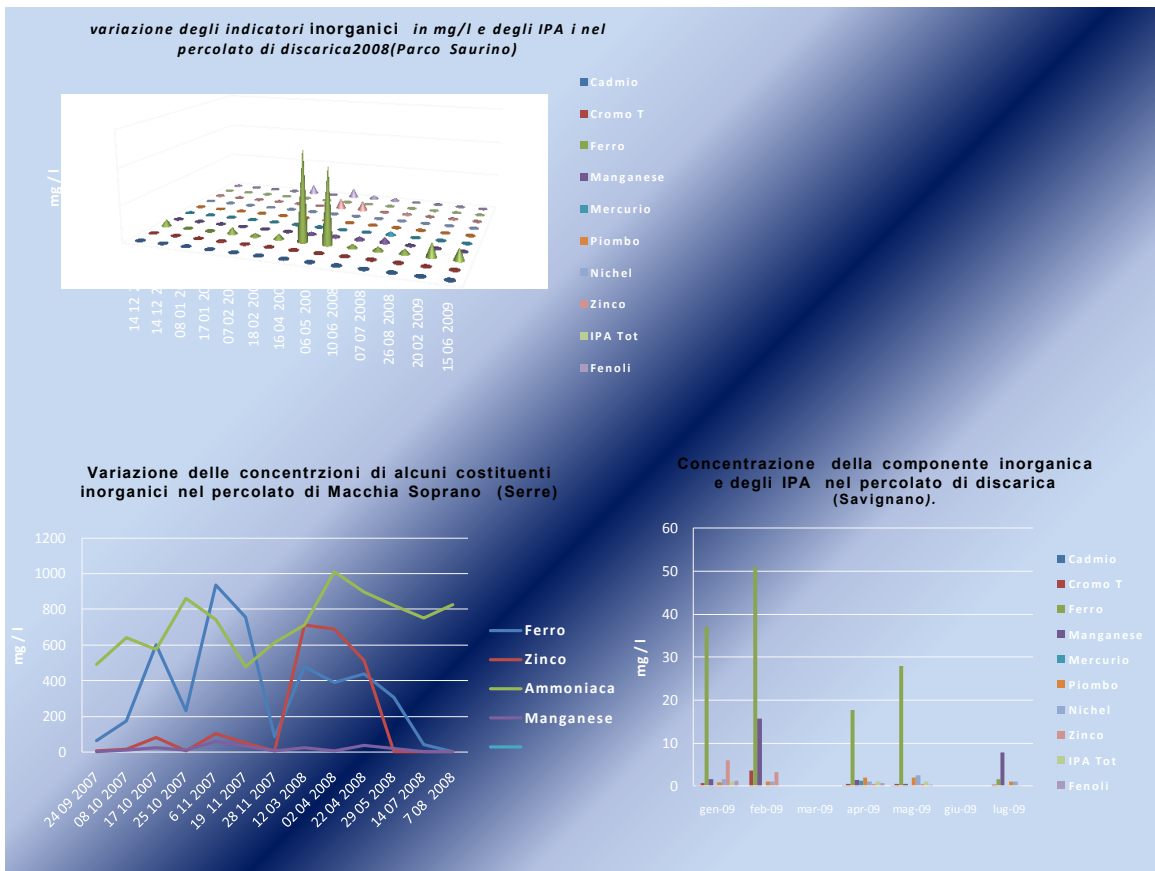
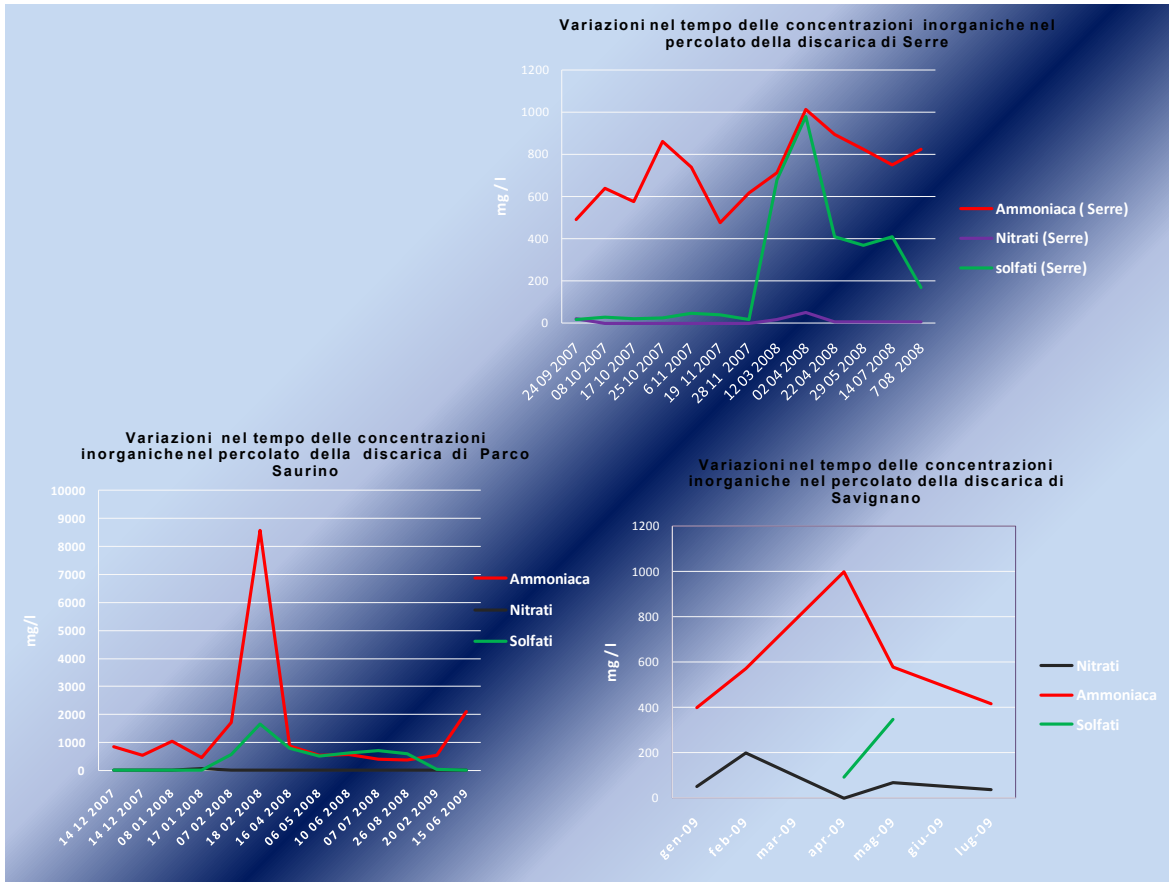
La discarica di Serre ha rappresentato per anni l'unico sversatoio della Campania in piena emergenza rifiuti. Lungo questo arco di tempo il conferimento di rifiuti indifferenziati nella discarica è stato indiscriminato, situazione aggravata per l'assenza di una programmazione seria nell'attuazione di un ciclo dei rifiuti. Il depotenziamento della raccolta differenziata ha prodotto un rifiuto esclusivamente di tipo indifferenziato e l'assenza di impianti per lo smaltimento alternativi alla discarica hanno determinato uno stato di perenne crisi nella gestione dei rifiuti in Campania.

Non vi è dubbio che il maggiore carico organico ed inorganico del percolato di Serre, rispetto agli altri, è la conseguenza di una diversa merceologia del rifiuto confinato in discarica. Perciò un confinamento di un rifiuto maggiormente indifferenziato produce un percolato più carico di inquinanti. Ulteriore fonte di variazione del carico inquinante nei campioni provenienti dalla stessa discarica è dovuto più marcatamente all'apporto meteorico nel sito stesso.

*Differenze del carico organico (COD) tra percolati provenienti da discariche diverse: il maggiore carico organico espresso in termini di COD nel percolato della discarica di Serre risulta evidente anche in funzione del tempo rispetto alle altre discariche.*



Di seguito vengono riportati i grafici relativi alle variazioni delle concentrazioni della componente inorganica in funzione del tempo di campionamento nel percolato relativamente alle discariche di Serre (Macchia Soprano), Savignano e Parco Saurino.

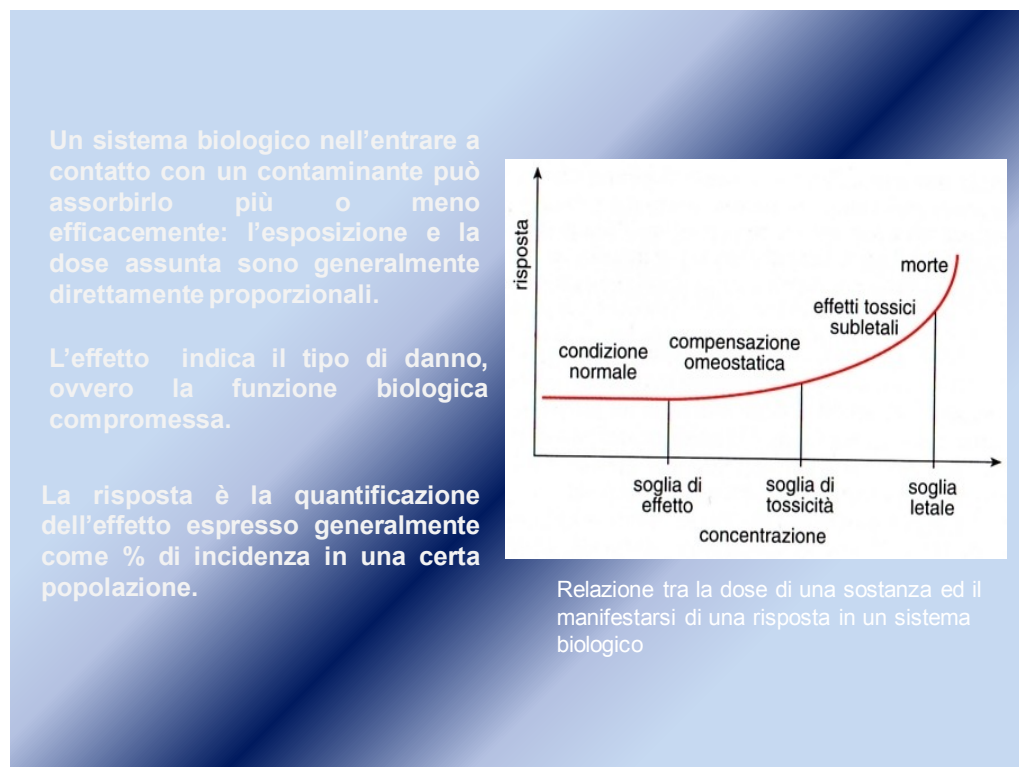


*Il campione proveniente dall'impianto di Serre presenta un range di concentrazione, quantitativo e qualitativo in termini di BOD, COD, ferro, zinco ed altri metalli pesanti, maggiore rispetto agli altri campioni delle discariche di Savignano e Parco Saurino, perciò possiamo già avanzare una diversa tossicologia di questo percolato rispetto agli altri che andremo a saggiare. Le altre discariche, Parco Saurino e di Savignano Irpino, presentano un percolato più diluito anche in virtù della qualità del rifiuto differenziato confinato, segno che una programmazione adeguata è possibile a monte del sistema nel ridurre potenziali pericoli di inquinamento ambientale. Trovare una correlazione tra aspetti quantitativi e qualitativi del percolato prodotto potrebbe essere interessante non solo per una migliore gestione stessa degli impianti deputati al trattamento del percolato ma anche per un'attenta analisi del rischio ambientale dei siti. Nei casi di dismissione degli impianti il percolato viene comunque prodotto per via dell'attività biologica di una discarica, anche per alcuni secoli dopo l'attività funzionale di confinamento, pertanto un monitoraggio ambientale in funzione dell'attività 'biologica' della discarica è una condizione da non trascurare nel prevenire nel tempo l'inquinamento delle falde acquifere. E' anche vero che nel tempo il percolato prodotto presenta un carico organico minore.*

## 1.4 LA MISURA DEL DANNO

Un sistema biologico nell'entrare a contatto con un contaminante può assorbirlo più o meno efficacemente: l'esposizione e la dose assunta sono generalmente direttamente proporzionali. Solo dopo l'identificazione dell'effetto dovuto all'esposizione all'agente tossico possiamo definire una misura della risposta biologica. L'effetto indica il tipo di danno, ovvero la funzione biologica compromessa, come la sopravvivenza, la motilità, la velocità di crescita, mentre la risposta è la quantificazione dell'effetto espresso generalmente come % di incidenza in una certa popolazione.

Definiamo la relazione tra la dose di una sostanza ed il manifestarsi di una risposta in un sistema biologico graficamente:



*relazione tra la risposta individuale e il grado di esposizione ad un tossico, (Gaggi G., 1998).*

Di norma si può assumere che esista un livello di soglia al di sotto del quale una sostanza non produce alcun effetto negativo. Superata tale soglia l'organismo mette in funzione i suoi meccanismi di difesa e di detossificazione, con un maggiore dispendio energetico ma non si manifesta nessun effetto negativo. Oltre questa fase l'effetto determina inizialmente manifestazioni croniche e, a dosi più elevate, fenomeni di tipo acuto. I test di tossicità possono essere distinti in due categorie: acuti, e cronici. Per tossicità acuta si intende l'insorgenza dell'effetto, dopo l'esposizione in un organismo, in un breve lasso di tempo compreso tra i 15 minuti e le 96 ore. Per tossicità cronica si intende l'insorgenza dell'effetto che la sostanza esercita in un certo periodo di tempo maggiore, in molti casi intorno al 10% della vita dell'organismo stesso.

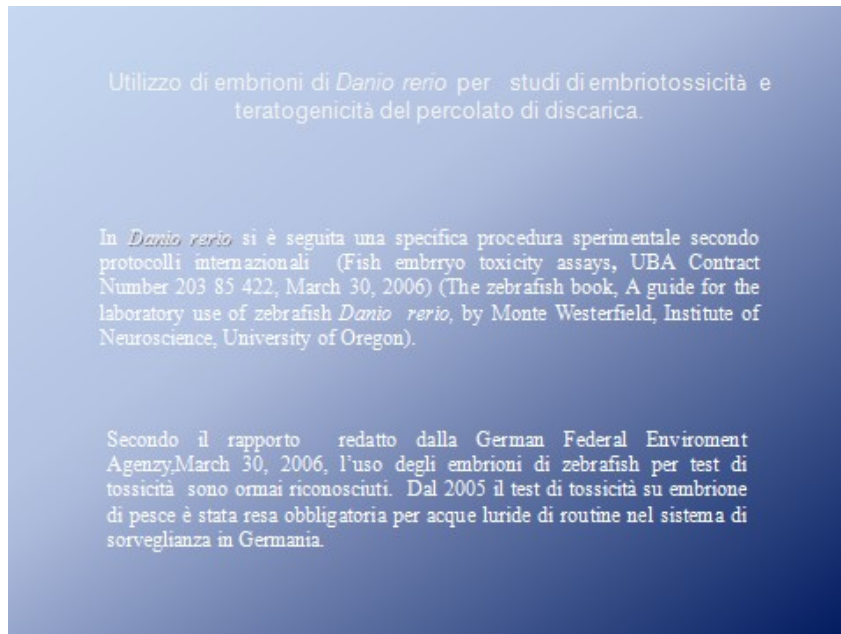
## **2 I BIOINDICATORI AMBIENTALI E L'USO DEGLI EMBRIONI DI *DANIO RERIO***

I saggi di tossicità con animali acquatici vengono effettuati per valutare se un dato composto, una miscela di composti o un campione d'acqua di scarico siano tossici e, in caso positivo, per definire il grado di tossicità o i valori di diluizione compatibili con la vita acquatica. Secondo il rapporto redatto dalla German Federal Environment Agency, March 30, 2006, l'uso degli embrioni di zebrafish per test di tossicità è ormai riconosciuto. Dal 2005 il test di tossicità su embrione di pesce è stato reso obbligatorio per acque luride di routine nel sistema di sorveglianza in Germania. Ultimamente è di uso valutare la tossicità acuta di singoli composti o di miscele complesse di composti, ciascuno a livelli di concentrazione molto più bassa. Per quanto riguarda effetti potenzialmente negativi in seguito all'esposizione a lungo termine, a concentrazione subletali di sostanze chimiche (miscele chimiche), maggiore enfasi è stata data allo sviluppo di metodologie più specifiche come ad esempio alterazioni del sistema endocrino.

In alcuni paesi europei si sta abbandonando LC50 con la sperimentazione sui pesci adulti e l'adozione di metodi di prova alternativi come il test sugli embrioni di pesce (Braunbeck et al., 2005), quest'ultimi vengono ad oggi richiesti da varie autorità di controllo in Europa ad integrare la fornitura di studi ecotossicologici. L'attendibilità degli studi su embrioni di zebrafish per i test acuti di tossicità è stata valutata da una recensione di 150 studi utilizzando pesci in diverse fasi di vita. McKim (1977) è giunto alla conclusione che in almeno l'80% dei casi di tossicità a lungo termine poteva essere prevista da risultati di studi ai primi stadi di vita. Questa



conclusione è stata successivamente confermata da altri studi, ad esempio da Woltering (1984) o Chorus (1987).



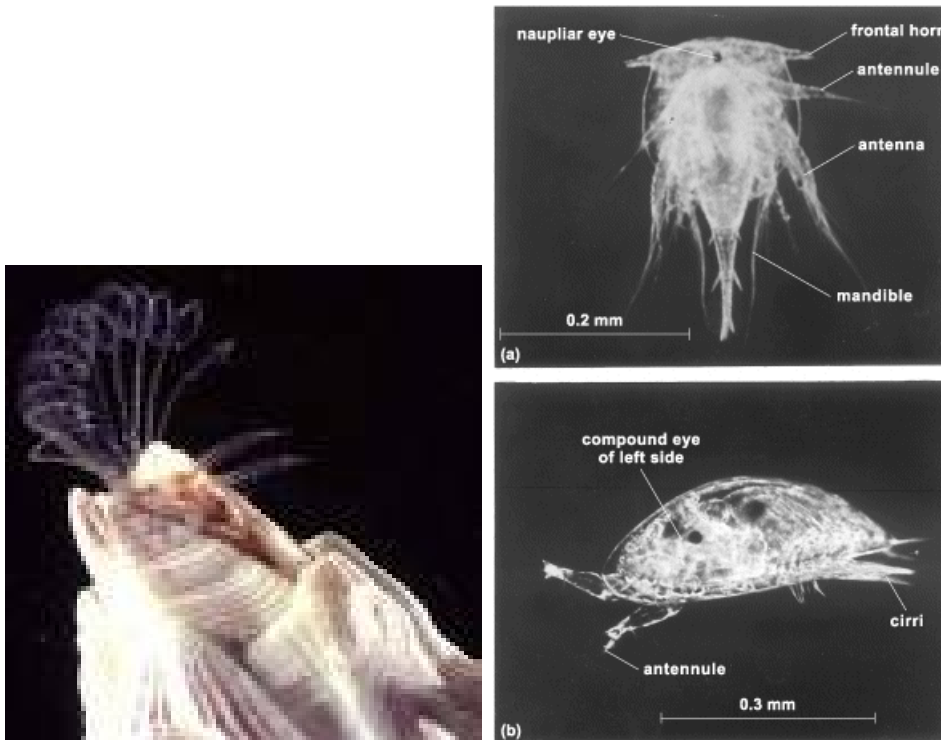
D'altronde i vantaggi che derivano dall'uso di zebrafish nella sperimentazione, sia per l'elevata produzione di uova, lo sviluppo rapido, la perfetta trasparenza delle sue uova, e, ultimo ma non meno importante, la conoscenza molto avanzata dello sviluppo di zebrafish (Braunbeck et al., 2005; Nagel, 2002), spingono all'uso di questa specie quale prima scelta per i test di routine di tossicità embrionale. Oggi tra l'altro si tende a sviluppare saggi "multispecie" condotti con organismi di livelli trofici diversi (batteri, alghe, crostacei, pesci), e di seguito si riportano gli organismi utilizzati per lo studio della tossicità del percolato, nello specifico *Danio rerio*, *Daphnia magna* di acqua dolce, e *Balanus amphitrite* di ambiente marino.

## 2.1 '*Daphnia magna*'



Le Dafnie sono piccoli crostacei plactonici tra i 2 e 5 mm di lunghezza, membri dell'ordine Cladocera. Essi vivono in diversi ambienti acquatici quali paludi, stagni, ruscelli e fiumi. Crostaceo di acqua dolce, con la divisione del corpo in segmenti quasi invisibile. La testa è fusa al corpo e nella maggior parte delle specie il resto del corpo è coperto da un carapace. Di forma simile ad un rene, possiede occhio composto, due antenne doppiamente-ramificate, il corpo appare quasi trasparente perciò con l'osservazione al microscopio è possibile vedere il battito del cuore, le lamelle branchiali, il semplice apparato digestivo e circolatorio. Il carapace copre il corpo, comprese le appendici toraciche, e viene utilizzato come camera di covata. L'addome e post-addome (distale all'ano) è generalmente piegato in avanti sotto il torace. Si riproduce partenogeneticamente determinando popolazioni geneticamente identiche, con ciclo vitale breve facilitando l'uso di tale organismo per gli studi di ecotossicologia.

## 2.2 *Balanus amphitrite*



Crostaceo Cirripede appartenente alla famiglia dei Balanidi; forse originario delle isole Hawaiane è ormai cosmopolita e presente in tutti i mari. Sessile con distribuzione cosmopolita (Desai et al., 2006) per la facilità di ottenimento ed allevamento delle fasi larvali viene particolarmente utilizzato come modello per studi di ecotossicologia. Costituisce una delle principali specie presenti nel Mediterraneo, vive anche in zone antropizzate per la capacità di tollerare elevati valori di nitrati, nitriti, ammoniaca, fosfati ed un basso contenuto di ossigeno. *Balanus amphitrite* appartiene ai Cirripedi detti opercolati, così definiti perché sprovvisti di peduncolo e dal corpo protetto da un guscio costituito generalmente da tre parti, la base, la muraglia e l'apparato opercolare. Le placche opercolari sono le uniche mobili, le altre costituiscono un complesso rigido. Le piastre principali sono; scuta, tergo, rostro e carena. Il guscio ha forma conica o tubulosa-conica, caratterizzato da striature longitudinali di colore bianco, rosa e porpora. L'alimentazione è di tipo microfago, avviene per filtrazione di particelle alimentari in sospensione e di piccoli organismi. Le sei paia di cirri, munite di lunghe setole utilizzate per convogliare gli alimenti verso la bocca,

sono situate sul cono orale. I cirri vengono utilizzati anche per la respirazione in quanto non presentano delle vere branchie. Il movimento delle parti molli è assicurato da muscoli tra i quali gli opercolari assumono grande importanza. Il corpo può essere suddiviso in due regioni, cefalica e toracica, la quale presenta una parte anteriore particolarmente estesa rispetto al pleon. La segmentazione è appena accennata, negli adulti mancano le antenne ed il cuore. La riproduzione è di tipo ermafrodita, con casi di autofecondazione in individui isolati rispetto alla norma che è di tipo incrociata. La temperatura ideale della fase riproduttiva compresa tra i 22°C e i 32°C, mai inferiore ai 17°C. Invertebrato coloniale, dalle abitudini di vita piuttosto inconsuete, presenta due fasi, una juvene ed una adulta completamente diverse l'una dall'altra. Un singolo individuo è in grado di liberare anche oltre 13000 larve. Lo stadio di schiusa è una larva nauplius, con carapace a forma di scudo, quando emesse dall'adulto sono al secondo stadio. Nell'ambiente le larve proseguono lo sviluppo con diverse quattro mute e relativi stadi naupliari. L'ultimo stadio naupliari è seguito da una larva cypris il cui corpo è racchiuso in un carapace bivalve e possiede sei paia di appendici Toraciche. Segue nel sesto stadio una fase definita lecitotrofica in cui non avviene alimentazione e successivamente si fissa ad un substrato mediante il secreto ghiandolare poste sulle prime antenne che svolgono funzione anche di induzione ad altri cypris con specifici. Durante la metamorfosi i cirri si allungano, il corpo si flette e compaiono i primordi delle piastre dell'esoscheletro. Gli individui che sopravvivono all'elevato tasso di mortalità inseguito all'insediamento vivono dai due ai sei anni.

## 2.3 *Danio rerio*

### 2.3.1 Tassonomia

*Danio rerio* ( Hamilton-Buchanan, 1822), facilmente riconoscibile dalla sua colorazione a strisce orizzontali chiari e scure, appartiene all'ordine Cypriniformes, sottordine Ciprinoidei, famiglia Cyprinidae, ed alla sottofamiglia Rasborinae, quest'ultime distinguibili dalle specie affini per il bottone sinfisiano , particolare anatomico caratterizzato da una sporgenza del labbro inferiore che combacia esattamente con una fossetta nel labbro superiore.

### 2.3.2 Caratteristiche generali

*Danio rerio* è una specie tropicale originaria dell'India orientale(Frank,1982), vive in acque quasi ferme, nei punti ristagnanti dei fiumi, in acque limpide e ricche di macrofite acquatiche. I parametri chimici-fisici che favoriscono un adattamento ottimale sono ph compreso tra 6 e 7, ossigeno disciolto tra 6 e 6,8 ppm, variazioni termiche tra i 18°C ai 36°C (Ferrerri 1995), nitriti tra 0 e 0,025, nitrati tra 0 e 10 ppm, ione ammonio totale tra 0 e 0,5 ppm. Predatore si alimenta in superficie, una dieta variegata basata di crostacei(24,25%), alghe verdi (10,28%), aracnidi(1,17%), insetti(63,33%) e diatomee (0,25%) (Dutta,1993). Dimorfismo sessuale poco accentuato, l'adulto maschio arriva a 4,5 cm mentre la femmina a 5 cm, il corpo compresso lateralmente, risulta buon nuotatore dai movimenti rapidi e fluidi. Come in tutti i Ciprinidi abbiamo l'assenza di denti su premaxillari, mascellare e dentale, con la funzione trituratrice assolta dalle fosse faringee dall'ultimo paio di archi branchiali. Questi si oppongono ad una placca masticatrice(organo di Dorièr-Bellon), a

cupola su un processo faringeo del basioccipitale. La vescica natatoria si presenta con due camere connessa alla porzione terminale dell'esofago attraverso un dotto pneumatico. L'apparato Weberiano costituito da una doppia catena di ossicini, il plaustro, il tripode, l'intercalare scafio, trasmette agli spazi perilinfatici, comunicanti con il labirinto, le variazioni di pressioni, originate dalle vibrazioni dell'ambiente circostante rappresentando un organo sensoriale efficiente. Per quanto riguarda gli aspetti riproduttivi sono limitanti temperature inferiori ai 24°C(Hisaoka e Firlit,1960), in condizioni sperimentali è possibile favorire la riproduzione in tutto l'arco dell'anno agendo sul fotoperiodo(14 ore di luce e 10 ore di buio) con start di deposizione ad un ora dalla accensione della luce artificiale.

**Vantaggi:** gli embrioni sono trasparenti, si sviluppano in breve tempo, impiegano tre giorni per raggiungere la schiusa dell'uovo. Producono un elevato numero di piccoli. Tollerano di essere allevati ad elevata densità.

**Condizioni ottimali dell'acqua:**  
 Temperatura 27°C, pH 7  
 Concentrazione di nitrati e nitriti 0%  
 Conducibilità 700 µs

**Ciclo di illuminazione:**  
 Primavera, 14 ore di luce e 10 ore di buio

**Alimentazione:**  
 Artemia (crostaceo)  
 Cibo secco

**Dimorfismo sessuale:**  
 I maschi sono di solito più piccoli, più snelli e di colore più rossiccio. Le femmine hanno un addome rigonfio e un colore che tende al grigio e al verde.

***Fasi caratterizzanti dello sviluppo di Danio rerio***

Fecondazione esterna, uova telolecitiche, segmentazione meroblastica discoidale.

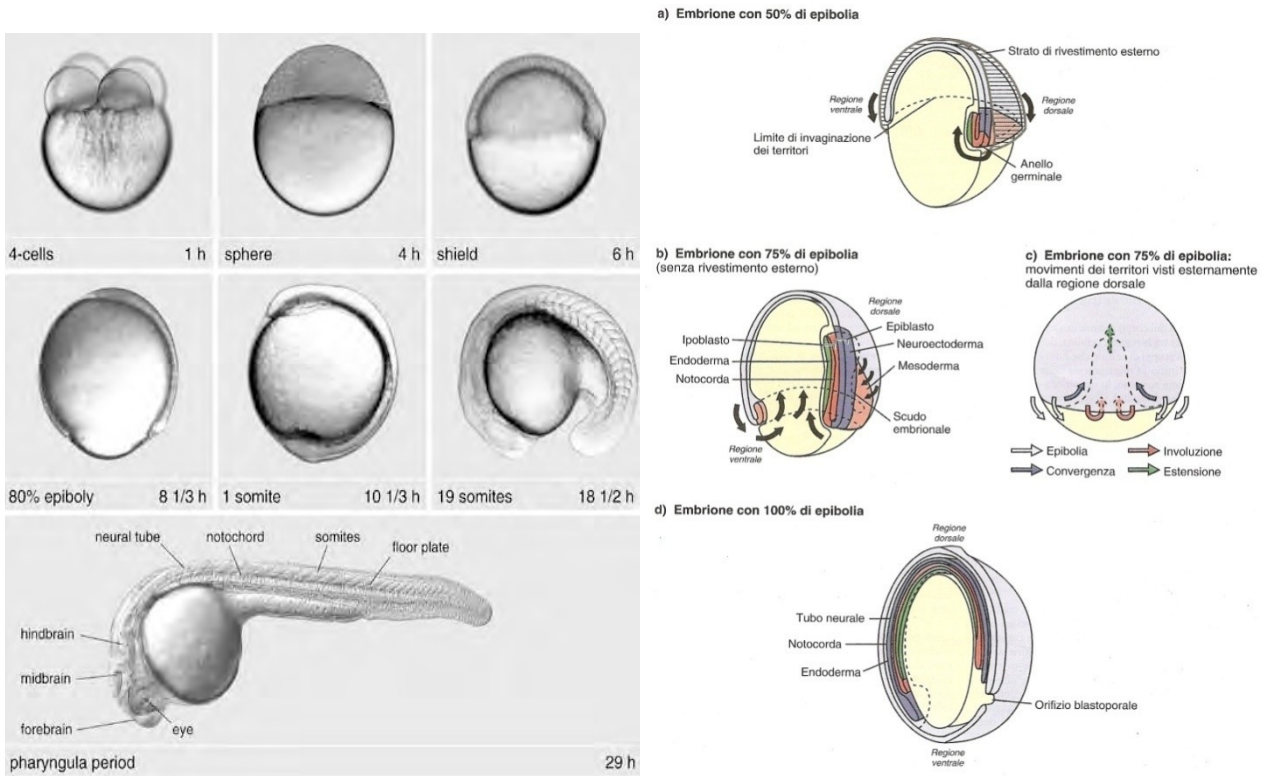
La deposizione delle uova in termini quantitativi dipende dall'alimentazione, dal tempo di deposizione precedente, dall'età dell'esemplare, in ogni caso tra le 40 e 100 uova ogni 48h(Nagel, 1986). La maturazione degli oociti è asincrona, nell'ovario si presentano in vari stadi di sviluppo, in ogni caso i tempi di maturazione avvengono di notte(Selman et al., 1993). L'ovulazione avviene in seguito all'instaurarsi dei comportamenti riproduttivi con l'aggregazione in gruppi e con il corteggiamento(Eaton e Farley,1974). Lo sviluppo embrionale

avviene in tempi rapidi, a 72h avviene la schiusa della larva con liberazione dal corion grazie a movimenti rotatori al suo interno. Le larve a 24 dalla schiusa aderiscono a mezzi sommersi per mezzo di ghiandole adesive, a 48h(120h dalla fecondazione) attivano la vescica natatoria iniziando la natazione attiva e l'alimentazione esogena. Il tuorlo viene rapidamente assorbito già dopo la schiusa, inizialmente rapidamente poi in modo completo al tredicesimo giorno di sviluppo. La maturità sessuale sopraggiunge già al 40° giorno di vita a 28°C ed a bassa densità di allevamento(Ferreri,1995) o a tempi maggiori se lo sviluppo prosegue a temperature minori. In ogni caso distinguiamo le varie fasi dello sviluppo embrionale :

la segmentazione, lo stadio di blastula che coincide con il periodo in cui il blastodisco assume una forma sferica fino all'inizio della gastrulazione, la gastrulazione che termina con la formazione del bottone caudale, la fase della formazione dei somiti, lo stadio di pharyngula che precede lo stadio della schiusa. Di seguito una descrizione dello sviluppo di *Danio rerio*.

### **2.3.3 Sviluppo embrionale.**

L'ovocita di *Danio rerio*, una volta fecondato e dopo il completamento della meiosi, entra nella fase di segmentazione che è meroblastica discoidale. Le varie divisioni cellulari e l'organizzazione dei blastomeri lungo i piani di divisione sono osservabili attraverso lo stereoscopio, assistiamo in questa fase agli stadi di maturazione della blastula, con formazione di una protrusione arrotondata(blastula media), la sterroblastula. Allo stadio di 512 cellule inizia il fenomeno di transizione di medio-blastula, fase che comprende il 9 e 10 ciclo, con l'inizio dell'attività di trascrizione embrionale. Tra lo stadio di blastula alta e lo stadio di sfera(sphere stage 3,8h) si è proceduto a selezionare gli embrioni ed al trattamento con il percolato. In questo intervallo di tempo hanno inizio le modificazioni morfologiche della blastula matura preparatorie all'epibolia.

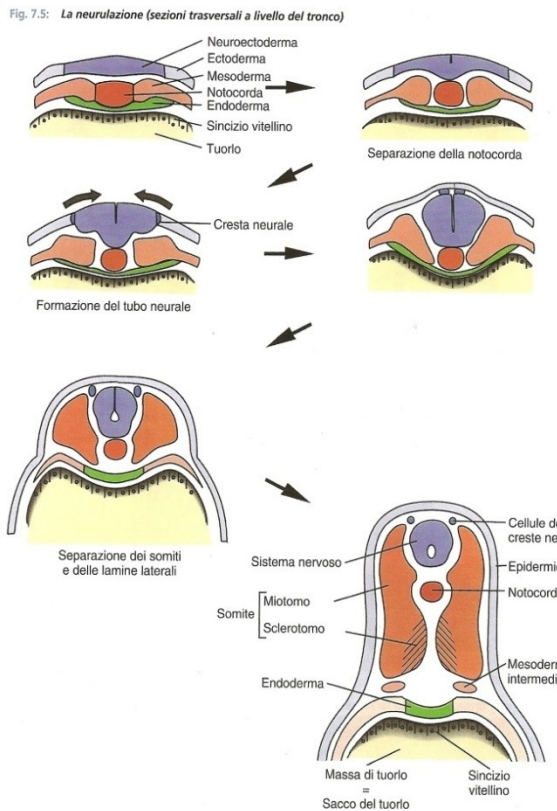


A 4 ore iniziano le modificazioni dovute a movimenti rapidi e alle ultime divisioni degli elementi cellulari con il passaggio dalla segmentazione alla gastrulazione, con il completamento del 50% dell'epibolia in cui si definisce la mappa dei territori presuntivi con l'epiblasto e l'ipoblasto. Il primo darà origine all'ectoderma, l'altro progredendo all'interno in direzione del polo animale definirà i territori endo-mesodermico. Ha inizio la gastrulazione a 5,15h dalla fecondazione, si susseguono la formazione dell'anello germinale, un ispessimento cellulare inizialmente nella futura regione dorsale e poi diffuso, anello in cui inizieranno ad opera dei territori blastodermici i movimenti d'involuzione. Qui si evidenziano lo strato esterno (epiblasto) e quello interno (ipoblasto). Poi seguono movimenti di convergenza che inducono l'epiblasto e l'ipoblasto a concentrarsi nell'area in cui si definirà l'embrione, con la formazione dello scudo embrionale.

L'estensione dello scudo porta alla formazione dell'asse antero-posteriore, definito con il contributo degli altri movimenti cellulari, ed in parallelo si verifica il restringimento laterale dello scudo sempre per riarrangiamenti cellulari. A 10 ore



l'epibolia ha raggiunto il culmine ed il blastoderma ha ricoperto la massa del tuorlo segnando la fine della gastrulazione. Siamo nella fase del bottone caudale, rigonfiamento nella regione caudale in posizione dorsale rispetto all'orifizio blastoporale. Dalle 10 alla 24 ore di sviluppo avviene l'organogenesi con la definizione delle future strutture quali il sistema nervoso, la notocorda e la muscolatura del corpo. Assistiamo ad un accrescimento dell'estremità caudale con un forte allungamento dell'embrione lungo l'asse antero-posteriore, fase in cui appaiono numerosi abbozzi degli organi, in particolare la segmentazione del corpo nel definire i tessuti muscolare, scheletrico e nervoso. La comparsa di strutture metameriche lungo questo asse a vari sfasamenti nel grado di avanzamento dell'organogenesi in funzione della posizione del corpo. La *somitogenesi* è uno degli eventi importanti che si manifesta in questo arco di tempo nello sviluppo di *Danio rerio*, inizio che ha luogo con la formazione del primo somite a circa 10 ore dalla fecondazione a metà altezza lungo l'asse cefalo-caudale. Si susseguono ad intervalli di 20 minuti gli altri 5 somiti, poi in maniera non sincrona i successivi con il 18° somite a 18 ore e i 30-34 a 24 ore dalla fecondazione. Il miotomo è nei pesci preponderante nella differenziazione territoriale del somite, divisi da setti trasversali assumono una forma a freccia dando origine ad una muscolatura parietale fondamentale per la funzione locomotoria. Lo sclerotomo e il dermatomo assumono una territorialità minore e per l'ultimo incerta.

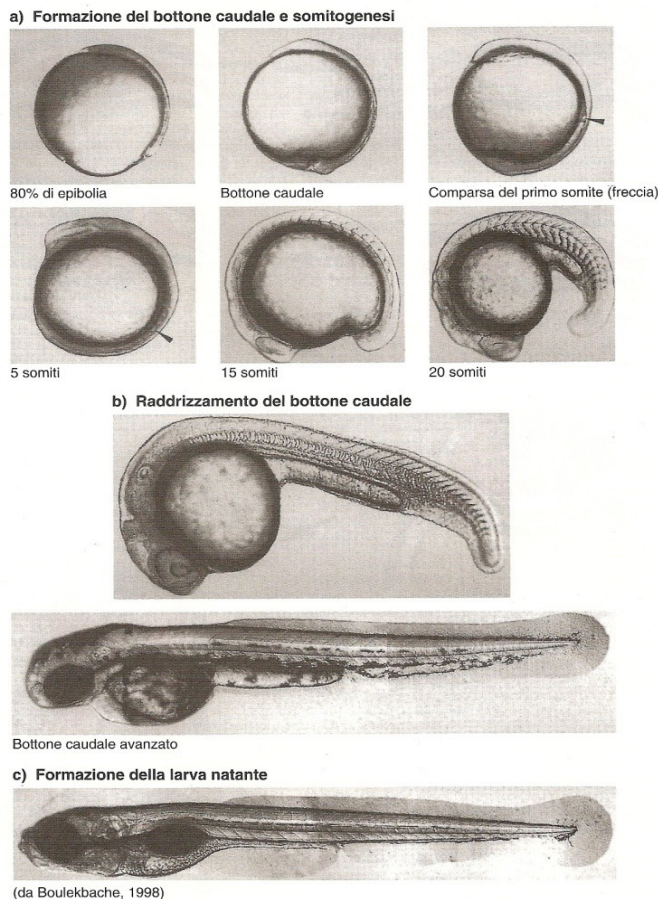


La **neurulazione** che parte alla fine della gastrulazione con la formazione della piastra neurale, zona appiattita ed ispessita dell'ectoderma nella regione medio-dorsale, va incontro a movimenti simili negli altri vertebrati senza però la formazione la formazione delle

pieghe neurali e poi doccia neurale, ma un primordio senza lume, poi di forma cilindrico ed infine con cavitazione (tubo neurale). In questa fase corrispondente allo stadio di 8 somiti avviene il distacco e la migrazione delle cellule, le cellule delle creste neurali.

A 12 ore si inizia a modellare la regione cefalica, a 18 ore l'inizio della metamerizzazione (abbozzo di telencefalo, diencefalo, mesencefalo e rombencefalo). Allo stadio di 5 somiti (6 ore) si differenziano gli **abbozzi** delle vescicole ottiche ed i placodi otici in coincidenza con lo stadio a 15 somiti. *A 18 ore si manifestano*

*contrazioni spontanee dei miotomi che indicano la presenza di una innervazione funzionale delle strutture muscolari.*



*Fino alla* fine della formazione dei somiti l'embrione è molto ricurvo, avvolto attorno al sacco vitellino, con la seconda fase di organogenesi(24/48h) si ha la perdita della curvatura con il **raddrizzamento** anche facilitato dal riassorbimento delle riserva di tuorlo. In questa fase si ha la differenziazione funzionale dell'organogenesi, il tubo cardiaco il cui abbozzo è comparso alla fine della gastrulazione con i primi battiti a 24 h, la vascolarizzazione, la formazione delle pinne e le formazione del tubo digerente. La schiusa avviene di norma alle 72 h.

### 3.0 STRATEGIA SPERIMENTALE

Lo studio sin qui svolto è stato impostato lungo due approcci sperimentali, uno rivolto ad analizzare la tossicità acuta del percolato in embrioni di *Danio rerio*, e l'altro per acquisire conoscenze di base per la detossificazione biologica del percolato di discarica utilizzando sia biomasse attive da impianto di trattamento reflui urbani e sia ceppi batterici opportunamente selezionati dal percolato stesso. Un ulteriore approccio biologico per la detossificazione, ma solo preliminare ed in fase di studio, è stato l'uso di alghe di acqua dolce e marina con tasso di crescita di 72h e / o biomassa di 72h. Prove preliminari di tossicità con il percolato sono stati effettuati anche su altre specie d'interesse eco-tossicologico, sia di ambiente marino che di acqua dolce, nello specifico *Daphnia magna* e *Balanus amphitrite*. Il test di tossicità acuta su embrioni di *Danio rerio* si basa sull'andamento della mortalità nelle 120 h dalla fecondazione, e inoltre nell'osservare gli eventuali effetti sub-letali nei vari endpoint di sviluppo ben descritti in bibliografia. Nello specifico vengono considerati nell'analisi embriotossicologica i vari stadi iniziali della segmentazione, l'inizio della gastrulazione, la fine dell'epibolia, la somitogenesi e l'organogenesi, la mancanza di battito cardiaco ed il non-distacco della coda del tuorlo, che devono normalmente essere registrati nello sviluppo entro le 24 e 48 ore.



- **I Parte sperimentale:**

**Studio della detossificazione, biodegradabilità e tossicità del percolato.**

Gli studi condotti hanno compreso la valutazione della tossicità del percolato e la possibile sua biotrasformazione utilizzando semplici sistemi di trattamento aerobico in varie condizioni sperimentali, ciò al fine di verificare se:

- a) la quota di sostanza biodegradabile può essere ulteriormente degradata;
- b) vi sia una completa detossificazione in seguito alle attività metaboliche;
- c) non vi sia un incremento di tossicità dovuti ai metaboliti intermedi derivanti dalla trasformazione.

- **II Parte sperimentale:**

- Studio dell'embriotossicità del percolato di discarica su *Danio rerio*.**

I vertebrati come gli invertebrati vengono utilizzati come bioindicatori per studi di biomonitoraggio ambientale e per l'identificazione di biomarcatori. Il bioaccumulo di un inquinante, per filtraggio, per esposizione diretta dei tessuti, più in genere per ingestione, può determinare alterazioni del metabolismo cellulare e dell'espressione genica, determinando effetti deleteri sulle funzioni vitali del bioindicatore, come nel sistema endocrino, nell'apparato riproduttivo, nella funzionalità del sistema nervoso e nel sistema immunitario. Molte delle sostanze chimiche che sono contenute nel percolato se disperse negli ambienti possono portare al danno ecosistemico, per persistenza e per bioaccumulo progressivo negli organismi attraverso le catene trofiche naturali. Gli studi realizzati nel saggiare il percolato di discarica su *Danio rerio*, sostanza eterogenea costituita da elementi di natura organica ed inorganica, da materiale particellare solido, disciolti in una componente acquosa, hanno fornito interessanti risultati nell'ottica di conoscerne le potenzialità tossicologiche ed embrio-tossicologiche. Il vantaggio sperimentale del modello biologico *Danio rerio*, dovuto sia alla rapidità nello sviluppo embrionale rispetto agli altri vertebrati e sia per la facilità nell'osservazione anche con semplici strumenti ottici, per via della trasparenza degli embrioni, facilita le osservazioni di eventuali alterazioni morfo-funzionali indotte dal percolato e derivanti da alterazioni dell'espressione genica.

### 3.1 MATERIALI E METODI

- Analisi microbiologiche con conta batterica totale a 22°C su terreno PCA e conta colonie muffe e lieviti a 22°C su Sabourad Dextrose Agar
- Richiesta chimica di ossigeno (COD);
- Saggio di tossicità su *Daphnia magna*;
- Saggio di tossicità su *Danio rerio*;
- Colorazione Emallume-Eosina;
- Colorazione Tricromico Secondo Galgano;

#### 3.1.a Analisi microbiologiche

La tecnica usata è quella dell'inclusione in piastra, è una tecnica di conteggio ed isolamento che consiste nel distribuire in piastre di Petri ( $\varnothing$  90 - 100 mm) in duplicato, 1 mL delle diluizioni da saggiare. Si aggiungono 10 ml di terreno di coltura a  $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , dopo agitazione con movimenti rotatori per permettere una buona miscelazione si procede a solidificazione del terreno a temperatura ambiente in ambiente asettico(sotto cappa a flusso laminare) ed incubazione delle piastre a temperatura adeguata alla crescita batterica.

I terreni di coltura si trovano in commercio in forma disidratata e si preparano sciogliendo i componenti per ebollizione ed effettuando, successivamente, una sterilizzazione a  $121^{\circ}\text{C}$  per 15'.

### **Conta batterica totale a 22°C**

Permette di evidenziare la presenza di microrganismi eterotrofi aerobi ed anaerobi facoltativi. La carica batterica totale indica la potenzialità che un substrato ha di sostenere la moltiplicazione microbica. L'isolamento viene effettuato su Plate Count Agar (PCA). Si effettua la semina, alla quale fa seguito l'incubazione a 22°C per 3 giorni. Dopo 72 h si contano tutte le colonie batteriche sviluppatesi sulle piastre e si riporta il valore ad 1 mL.

### **Muffe e Lieviti**

L'isolamento viene fatto su Sabourad Dextrose agar. Dopo la semina si mettono le piastre ad incubare a 22°C. Dopo 72 h si effettua la lettura e si riporta al valore di 1 mL.

### **3.1.b. Richiesta chimica di ossigeno (COD)**

La COD rappresenta la misura dell'ossigeno necessario ad ossidare chimicamente le sostanze presenti in un campione, per mezzo di un ossidante forte in ambiente acido a caldo. Il metodo prevede la seguente sequenza analitica:

- a) Un aliquota di campione viene sottoposta a digestione con acido solforico e solfato di argento in presenza di un forte ossidante, il dicromato di potassio.
- b) Dopo 2 ore di reazione a 150° viene titolato l'ossidante residuo con una soluzione riducente di solfato di ammonio e ferro, con la fenantrolina quale indicatore.
- c) Viene calcolato l'equivalente di ossigeno necessario all'ossidazione di tutte le componenti presenti nel campione applicando la seguente espressione:



$$C = (m_1 - m_2) * N * 8000 / V$$

dove:

C = richiesta chimica di ossigeno (mg/L);

$m_1$  = mL di soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) consumati nella prova in bianco;

$m_2$  = mL di soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) consumati per il campione;

N = normalità della soluzione di solfato di ammonio ferro (II) impiegata;

8000 = peso equivalente dell'ossigeno moltiplicato per 1000, per riferire il dato al volume di un litro;

V = volume (mL) di campione usato per l'analisi.

### **3.1.c Saggio di tossicità con *Daphnia magna*.**

La *Daphnia magna* è un crostaceo cladocero di acqua dolce di piccole dimensioni (non supera i 5 mm di lunghezza). Per i saggi sono stati utilizzati contenitori per urine aventi volume utile di 50 mL, contenenti i neonati di età inferiore alle 24 ore nati, partenogeneticamente, da femmine adulte. I daphnidi vengono esposti in gruppi di 10 esemplari a diverse concentrazioni di campione mantenuto a temperatura costante in ambito di  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , con ciclo di illuminazione di 16 ore di luce e 8 ore di buio. A tempi determinati viene rilevato il numero di organismi immobili e, cioè, non più in grado di nuotare. La soluzione della sostanza in esame viene saggiata in un primo momento con una prova preliminare e successivamente con una prova definitiva.



### ***Prova preliminare.***

La prova preliminare viene effettuata operando con 5 diverse concentrazioni della sostanza pura scelte in progressione geometrica, con una sola replica per ciascuna di esse ed un controllo. In ogni contenitore vengono trasferiti 50 ml della soluzione in esame e 10 neonati di *Daphnia* di età inferiore alle 24 ore. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, si trasferiscono alternativamente le *Daphnie* nei diversi recipienti fino a raggiungere il numero di 5, anziché completare un recipiente, per poi passare al successivo. A trasferimento avvenuto si registra l'ora d'inizio della prova che dura complessivamente 24 ore, in casi di elevata diluizione del campione anche a 48h. Durante questo periodo agli animali non viene somministrata alcuna alimentazione. Al termine del saggio, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore. Se nel controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%, il saggio va ripetuto. Il saggio va ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione

dell'ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2mg/l. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito ricambiando le soluzioni in esame durante le 24 ore della prova, oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenza o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali. Con i dati raccolti nella prova preliminare viene individuato l'intervallo di concentrazioni che comprende la no-observed-effect concentration (NOEC), ovvero la concentrazione massima non efficace, e la più bassa concentrazione che immobilizza completamente gli organismi usati per il saggio.

### **Prova definitiva**

La prova definitiva viene realizzata operando con 5 diverse concentrazioni della sostanza pura scelte in progressione geometrica secondo una serie di intervalli meno ampi rispetto a quelli della prova preliminare, con quattro repliche per ciascuna di esse e quattro controlli. Con i dati raccolti dopo le 24 ore si determina la tossicità acuta della sostanza saggiata.

#### **3.1.d Saggio di tossicità su *Balanus amphitrite*:**

Il test deve essere allestito entro 4-6 ore dalla raccolta dei nauplii di II stadio. Le procedure di allestimento prevedono: filtrazione dei nauplii con maglia da 80 µm, risospensione in acqua di mare portata a volume (300 mL) in beacker, prelievo con pipetta di 1 mL di nauplii per poi passare in Petri e procedere al conteggio con il microscopio binoculare. La concentrazione media deve essere di 15-20 nauplii in 1 mL. A questo punto si procede all'ossigenazione fino all'allestimento del test, poi in scatole multi pozzetto, dopo aver prelevato 1ml

di soluzione dal beacker. in cui statisticamente è dimostrato la presenza di 15-20 nauplii, si aggiunge 1ml di acqua di mare per avere un volume totale di 2mL. Una volta preparati i pozzetti la scatola dovrà essere chiusa con pellicola trasparente per prevenire l'evaporazione e poi posta a 20°C. La lettura può essere fatta a 24h e a 48h, distinguendo morti/immobili dai vivi. Per morte si intende gli immobili che per almeno 10 secondi non mostrano movimenti di alcuna appendice. Al termine del test sarà possibile determinare la % di mortalità/immobili.

### **3.1.d Saggio di tossicità su *Danio rerio*;**

Il *Danio rerio* viene allevato in vasche da 30 litri attrezzate per il mantenimento del fotoperiodo(14 ore di luce e 10 ore di buio), munite di termostati per mantenere una temperatura media tra i 27 e 28 °C adatta a stimolare la fase di riproduzione. Il prelievo degli embrioni si avvale dell'uso di comuni biglie di vetro poste sul fondo degli acquari, disposte per costituire un doppio strato continuo nel favorire sia nicchie di deposizione e sia per evitare la predazione degli stessi adulti. Gli embrioni successivamente prelevati con sifonazione vengono selezionati a valle attraverso l'ausilio di uno stereoscopio allo stadio di sviluppo desiderato. La fase di sviluppo in cui si precede all'incubazione è lo 'Sphere Stage', in questa fase già risultano attivati i geni zigotici, si susseguono i vari stadi di sviluppo sotto il controllo della programmazione genica. Dopo la selezione, in media dai 30 ai 50 embrioni, vengono posti in becker di 200 mL contenente 'Hank's solution' per il controllo e per saggiare la sostanza inquinante diluita nella soluzione di crescita. Una volta avvenuto l'allestimento dei preparati(becker) si procede all'incubazione per 120h in bagno termostatico a 27-28°C. Le osservazioni in vivo vengono fatte con

strumenti ottici(microscopio e stereoscopio) ogni 24h dalla fecondazione per 120 ore complessive(5 osservazioni).



### 3.2 METODI DI MICROSCOPIA OTTICA

Una volta prelevati, gli embrioni vengono fissati; la fissazione ha un duplice scopo, ossia quello di immobilizzare i costituenti cellulari e tissutali del campione in uno stato più vicino possibile a quello reale, preservando quanto più possibile le componenti tissutali, ed inoltre quello di consentire al preparato di sopportare gli stress fisici e chimici insiti nelle fasi di disidratazione ed inclusione.

### **3.2 a FISSAZIONE A BASE DI ALDEIDE FORMICA:**

L'aldeide formica è un composto abbastanza reattivo verso i numerosi gruppi chimici di un tessuto organico, facilmente allontanabile per idrolisi.

La formaldeide, gas allo stato naturale, viene utilizzata in istologia sotto forma di soluzione acquosa ed, in questo stato, viene chiamata "formalina". E' stata combinata con altre sostanze ad azione fissativa, nei seguenti rapporti:

5:15:1 di aldeide formica al 40% (Carlo Erba ITALIA), acido picrico in soluzione satura (Carlo Erba ITALIA), acido acetico glaciale (Carlo Erba ITALIA).

Tale fissativo prende il nome di *fissativo di Bouin*.

### **3.2 b INCLUSIONE IN PARAFFINA**

Alla fissazione segue dopo 4 giorni la disidratazione dei pezzi di taglia più grossa, in una serie di alcool a gradazione crescente, ossia etanolo 75%, etanolo 95% per 24 ore (2 cambi), etanolo 100% per 45 minuti (3 cambi). I pezzi più piccoli dopo 4 giorni di etanolo 75% sono stati disidratati in etanolo 95% per 3 ore (3 cambi) ed in etanolo 100% per 3 ore (3 cambi).

Tutti i pezzi sono poi stati immersi in metilbenzoato (Carlo Erba), ammorbidente che conferisce elasticità al pezzo irrigidito dalla disidratazione.

Appena affondati in esso, sono stati chiarificati in benzolo (Carlo Erba) per 10 minuti (2 cambi) ed immersi in paraffina liquida, in stufa a 58°, per tutta la notte e sottovuoto, consentendo una miglior penetrazione della paraffina, anche nella cavità più profonde. Il giorno successivo si è proceduto all'allestimento del blocchetto per l'affettatura al microtomo.

### 3.2c COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

Le sezioni in paraffina ottenute al microtomo sono state sparaffinate con due passaggi in xilolo, reidratate in alcool a concentrazioni decrescenti (etanolo 100%, 95%, 75% e 50%) e poste infine in acqua distillata. Su sezioni in serie alternate di embrione in toto e di esofago, sono state eseguite le seguenti colorazioni:

#### **EMALLUME-EOSINA:**

E' una colorazione istochimica che ci permette di riconoscere morfologicamente le singole parti di un tessuto, caratterizzate da acidofilia e basofilia.

La colorazione è stata eseguita secondo il seguente protocollo:

1. immersione dei preparati in una soluzione di emallume acido di Mayer (ematossilina + allume di potassio) per 12 – 15 minuti (il tempo dipende da quanto è fresco l'emallume), dopodiché si recupera;
2. lavaggio in acqua distillata;
3. lavaggio in acqua di fonte, la cui alcalinità permette di ottenere il viraggio di colore dei nuclei da violetto ad azzurro scuro;
4. rapida osservazione (per evitare l'essiccamento ed il distacco delle fette) al microscopio ottico, controllando la colorazione;
5. lavaggio in acqua distillata;
6. immersione dei preparati, per 1 minuto, in una soluzione acquosa di eosina all'1%, acidificata al momento con una goccia di acido acetico per ogni 10 ml di eosina;
7. lavaggio in acqua distillata;
8. disidratazione rapida con la serie di alcool crescenti, etanolo 75%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III (dopo ogni passaggio occorre osservare al microscopio ottico,

in quanto queste gradazioni decolorano le fette), Xilolo I per 3 minuti e Xilolo II per 3 minuti;

9. montaggio in Eukitt (Carlo Erba ITALIA).

10.

*Risultato: i nuclei delle cellule sono colorate in azzurro-blu ed il citoplasma in rosa.*

**METODO TRICROMICO SECONDO GALGANO** (cfr. Beccari & Mazzi, 1966):

è una colorazione istochimica allo scopo di evidenziare, nelle sezioni di embrioni in toto e di esofago isolato, la componente connettivale.

Può essere considerata una variante del metodo Mallory da cui differisce per una migliore differenziazione della fucsina acida e per l'introduzione di una colorazione nucleare.

La colorazione è stata eseguita secondo il seguente protocollo:

1. immersione dei preparati in emallume acido di Mayer, per 3 minuti;
2. lavaggio in acqua di fonte per 10 minuti, in modo da consentire il viraggio del colore dei nuclei verso il blu;
3. immersione dei preparati, per 1 minuto, in una soluzione acquosa di fucsina acida (Sigma USA) allo 0.1%, con aggiunta di 1 goccia di acido acetico glaciale per ogni 10ml di soluzione;
4. lavaggio in acqua distillata;



5. mordenzatura in una soluzione acquosa di acido fosfomolibdico (Sigma USA) all'1%, per 5 minuti;
6. lavaggio in acqua di fonte per la differenziazione, fino a decolorazione del fondo, agitando il vetrino continuamente;
7. immergere il vetrino in una soluzione acquosa di acido acetico glaciale all'1%, per arrestare la differenziazione e controllare la reazione al microscopio ottico;
8. lavaggio in una soluzione acquosa di acido fosfomolibdico all'1%, per 5 minuti;
9. lavaggio in acqua distillata;
10. immersione, per 40 minuti, in una miscela di Mallory modificata (Carlo Erba) (2 parti di soluzione di orange G al 2% sciolta in una soluzione acquosa di acido acetico al 2.5%, preparata a freddo e filtrata, + 1 parte di soluzione di verde luce allo 0.5% + 1 parte di una soluzione acquosa di blu di metile allo 0.5%, preparata facendola bollire per circa 3 minuti, lasciandola raffreddare completamente, aggiungendo 2.5ml di acido acetico per 100ml di soluzione e filtrandola);
11. lavaggio in acqua distillata e controllo al microscopio ottico;
12. asciugare con carta assorbente;

disidratazione in serie di alcool decrescenti, partendo dall'etanolo 95%, Xilolo I (per 1 minuto), Xilolo II (per 1 minuto) e montaggio in Eukitt.

Risultato: i nuclei si colorano di blu, il citoplasma di rosa, il tessuto muscolare di rosso, le emazie di rosso arancio, la cartilagine di blu-verde, le fibre connettivali con varie tonalità di verde-azzurro e la mucina di blu.

## 4.0 OSSERVAZIONI E RISULTATI SPERIMENTALI

### 4.1 DETOSSIFICAZIONE , BIODEGRADABILITA' E TOSSICITA' DEL PERCOLATO.

Ritornando all'analisi del percolato va ricordato che per il trattamento sono a tutto oggi adottate tecniche di coagulazione e flocculazione chimica; processi che in pratica concentrano i contaminanti senza sostanziali modifiche. Tutto ciò comporta da un lato la riduzione dei reflui tossici in esso contenuto dall'altro una maggiore pericolosità nell'atto dello smaltimento di questi ultimi.

BIODEGRADABILITA' E DETOSSIFICAZIONE DEL PERCOLATO

**OBIETTIVI SPERIMENTALI**

- ULTERIORE BIODEGRADABILITA' DELLA COMPONENTE ORGANICA  
AGENDO SULLA VARIABILE CONCENTRAZIONE E SUL DILUENTE CON  
VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' DEL PERCOLATO SU *DAPHNIA MAGNA*.
- SELEZIONE E USO DI CEPPI MICROBICI PER L'ABBATTIMENTO DEL CARICO  
ORGANICO DEL PERCOLATO (BIOREMEDIATION)

I sistemi di trattamento biologico, aerobico e anaerobico, potrebbero permettere processi di detossificazione e di degradazione delle sostanze biodegradabili come alternativa o ulteriore trattamento delle acque di percolato.



Nuovi approcci scientifici come la “ *bioremediation* ”, cioè l’utilizzo di organismi viventi, in particolare microrganismi quali batteri, funghi e lieviti, per la degradazione di composti chimici tossici, sono in fase di sperimentazione . Alcune tipologie di composti che possono essere trattati con le tecniche di bioremediation sono: idrocarburi alifatici., aromatici, aromatici policiclici (IPA), policiclici aromatici alogenati(diossine, PCB, dibenzofurani, dibenzotiofeni, ecc.), composti organici clorurati non aromatici (cloruro di vinile, policloroetileni, ecc.),fenoli e ammine aromatiche, composti di interesse agricolo (diserbanti, pesticidi, fungicidi, ecc.), reflui industriali (solventi, sgrassanti, detergenti, reagenti per la produzione dei polimeri, ecc.).

La possibilità di selezionare microrganismi fa sì che, dopo un tempo sufficientemente lungo, questi ceppi possono essere utilizzati, singolarmente o in consorzi composti da numerosi ceppi, per ridurre o eliminare composti chimici presenti in acque dolci o salate, suoli, sabbia e fondali marini. Sono stati già isolati e caratterizzati numerosissimi ceppi capaci di degradare un’ampia varietà di composti tossici come sopra menzionato.

Il percolato utilizzato, proveniente dai centri di raccolta regionali per i trattamenti di bonifica, si presenta come un liquido dal colore bruno, uniforme

nel colore o torbido a secondo del carico organico del campione, con una consistenza viscosa e di odore acidulo. I campioni sono stati posti in bottiglie di vetro scuro e messi in agitazione ad una temperatura di 22°C. Le indagini relative al monitoraggio microbiologico, tossicologico e le misurazioni della COD (Richiesta Chimica di Ossigeno) sono state effettuate con campionamenti ogni 48 ore in tre tipi di trattamento:

Nel I trattamento il campione è stato preparato come segue:

7 bottiglie così siglate TQ, 20D, 40D, 60D, 20T, 40T, 60T

TQ	200 mL di Percolato
20D	200mL (Per. + H <sub>2</sub> O (20%))
40D	200mL (Per. + H <sub>2</sub> O (40%))
60D	200mL (Per. + H <sub>2</sub> O (60%))
20T	200mL (Per. + H <sub>2</sub> O trip. (20%))
40T	200mL (Per. + H <sub>2</sub> O trip. (40%))
60T	200mL (Per. + H <sub>2</sub> O trip. (60%))
campione	composizione

contenenti 200 ml totali di soluzione, di cui uno con solo percolato (TQ) , tre diluiti con acqua distillata rispettivamente al 20% ( 20D= 40mL H<sub>2</sub>O D + 160

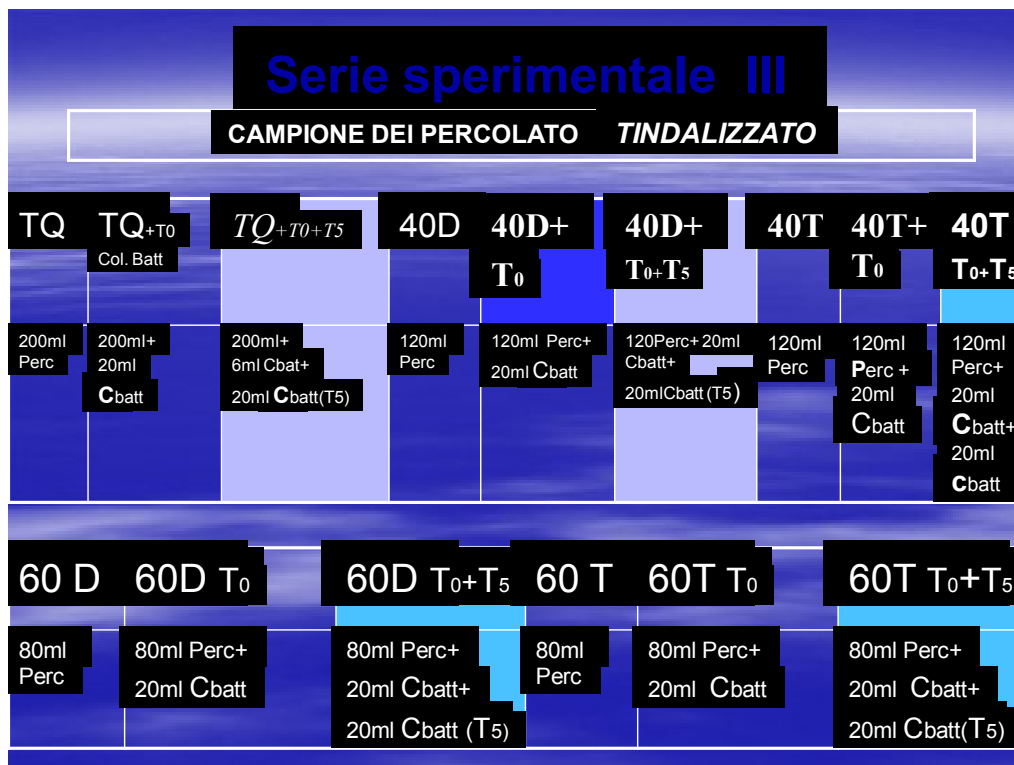
mL di Percolato), al 40% (40D) e 60% (60D), e tre con acqua peptonata con volume del diluente al 20%, 40%, 60%(20T,40T,60T) .

Nel II trattamento sono state ripetute le stesse prove del precedente esperimento affiancando ad esse alcune repliche dei campioni con aggiunta di biomassa di impianto di depurazione e di coltura batterica opportunamente selezionata:

TQ	200mL di Percolato
20D	160mL di Percolato + 40mL di H <sub>2</sub> O D.
40D	120mL di Percolato + 80mL di H <sub>2</sub> O D.
60D	80mL di Percolato + 120mL di H <sub>2</sub> O D.
20T	160mL di Percolato + 40mL di H <sub>2</sub> O D.
40T	120mL di Percolato + 80mL di H <sub>2</sub> O D.
60T	80mL di Percolato + 120mL di H <sub>2</sub> O D.
40D+ Bio	120mL Per ...+20mL di Biomassa
40T+ Bio	120mL Per ...+ 20mL di Biomassa
60T+ 20 C.batt.	80mL Per ....+20mL di C.batt
60T+ 40 C.batt.	80mL Per...+ 40mL di C.batt
Campione 200mL	soluzione

Il III° trattamento si è basato su analoghe procedure sperimentali utilizzando però percolato tindalizzato, aggiungendo ad alcuni campioni (repliche),

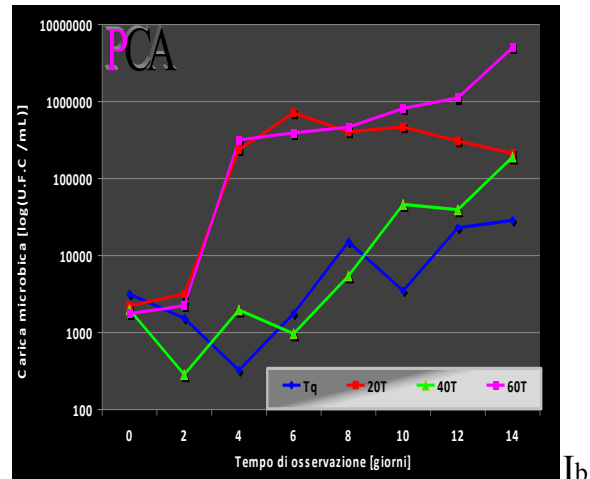
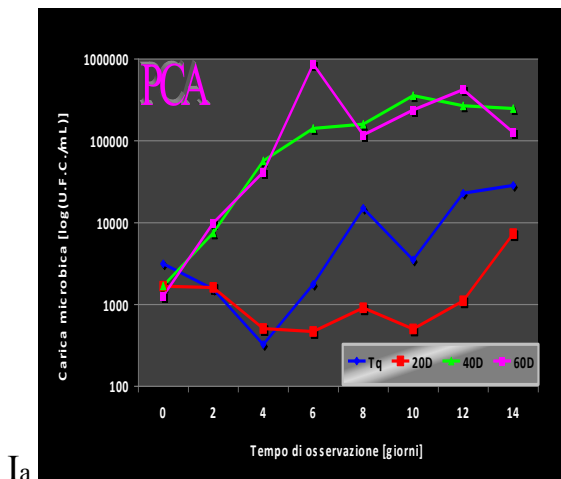
secondo le tre diluizioni come sopra specificate, quantità note di sospensione batterica in due tempi, T0 e T5. Al tempo T0 6 mL di soluzione batterica (sbat) e dopo 10 giorni (T5) altri 20 mL di coltura batterica. I campioni finali risultanti sono:



La numerosità dei dati ottenuti ha richiesto per una migliore comprensione l'organizzazione in grafici di singole unità sperimentali.

*Figura Ia* cariche microbiche nel campione tal quale e diluito (20%-40%-60% v/v) con acqua distillata

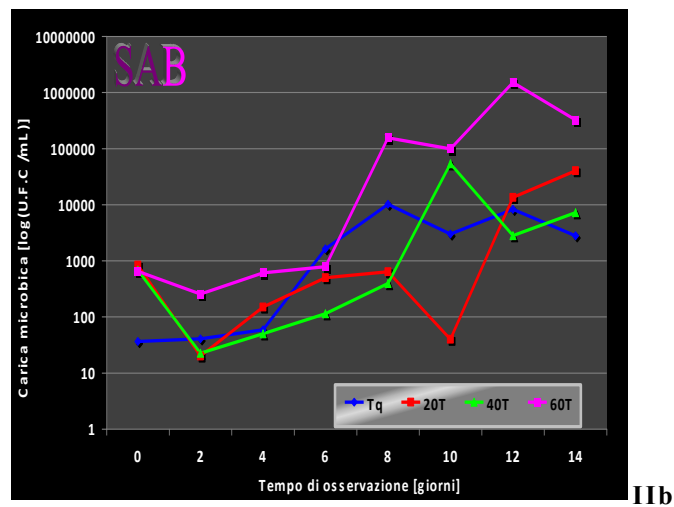
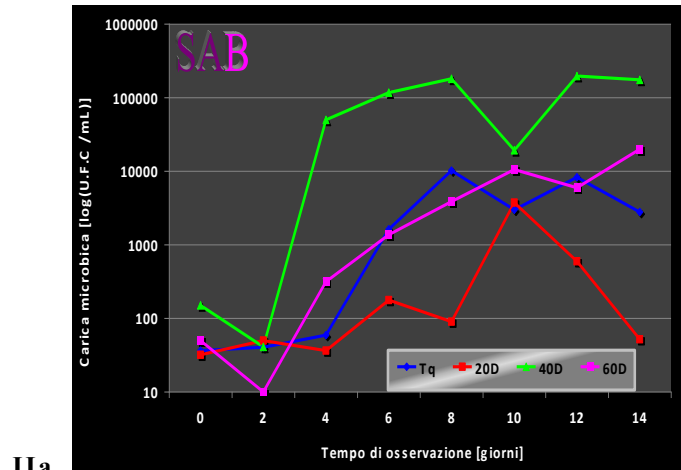
*Figura Ib* cariche microbiche nel campione tal quale e diluito (20%-40%-60% v/v) con acqua triptonata



Con il **primo** esperimento (figura Ia) è stato evidente che la sola diluizione parziale in acqua distillata al 40% e 60%, permette un miglior sviluppo della flora microbica autoctona rispetto ad altre condizioni sperimentali e al controllo.

Nella figura **Ib** analizzando l'andamento delle cariche microbiche in percolato variamente diluito in brodo, contrariamente a quanto notato con la sola aggiunta di acqua, le condizioni migliori per lo sviluppo microbico sono risultate quelle con aggiunta di acqua peptonata al 20% (20T) e al 60% (60T).

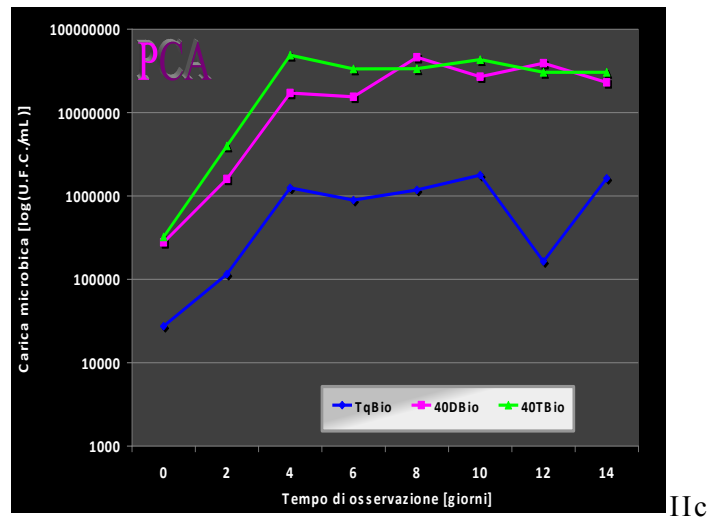
Nelle stesse condizioni sperimentali, figura **Ia** e **Ib** (aggiunta di acqua distillata e di acqua peptonata nelle stesse concentrazioni nel percolato), indagando sulla crescita di miceti i risultati si sviluppano con elevata variabilità non permettendo alcuna considerazione.



*cariche micotiche nel campione tal quale e diluito (20%-40%-60% v/v) con acqua distillata e triptonata*

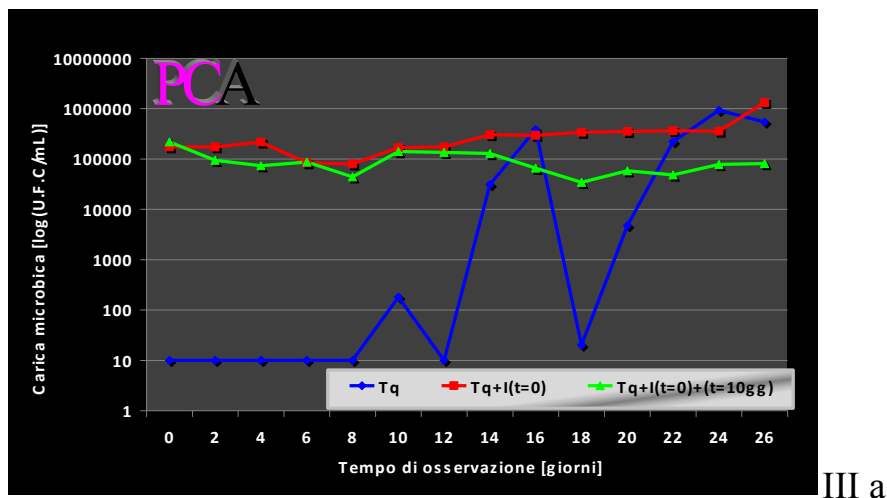
Nel secondo esperimento (IIc) l'aggiunta di biomassa da impianto di trattamento reflui, quale starter microbico per favorire il metabolismo nel percolato, il tal quale variamente diluito in acqua distillata e acqua triptonata, non evidenzia significative crescite microbiche se non nei campioni sottoposti ad inoculi massivi e diluizioni spinte.



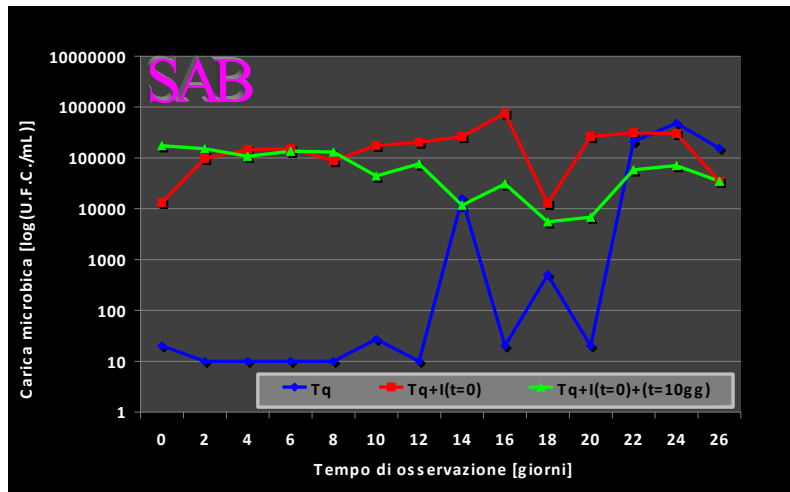


*valutazione della crescita microbica in seguito ad inoculo di biomassa non selezionata, derivante da impianto di trattamento reflui, nel campione tal quale e diluito al 40% v/v) con acqua distillata e triptonata*

Nel terzo esperimento ripetendo nelle stesse condizioni di analisi dei precedenti ma inoculando biomassa selezionata sia all'inizio dell'esperienza che dopo 10 giorni, appare evidente la maggior attività metabolica, sia batterica (III a) che micotica (III b) nei campioni con inoculo. Il secondo inoculo, però, non varia significativamente le cariche microbiche.



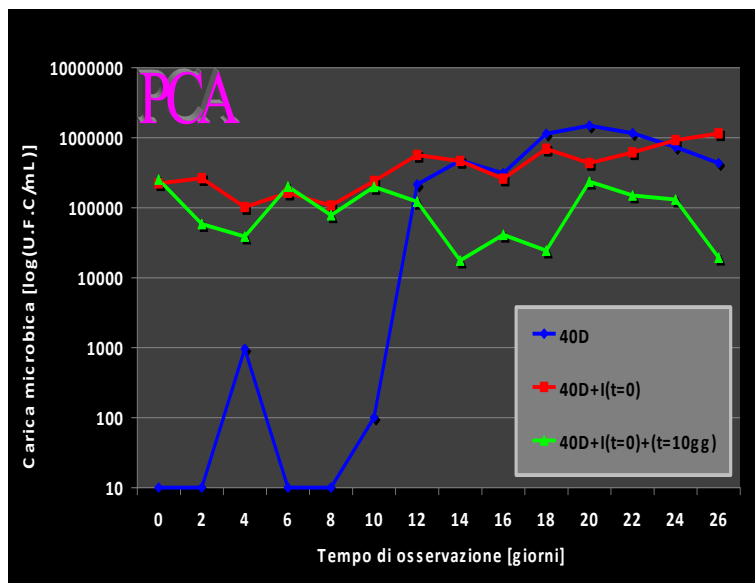
cariche microbiche (IIIa) e micotiche (IIIb) nel campione tal quale, ed in seguito a singolo e doppio inoculo di biomassa selezionata



III b

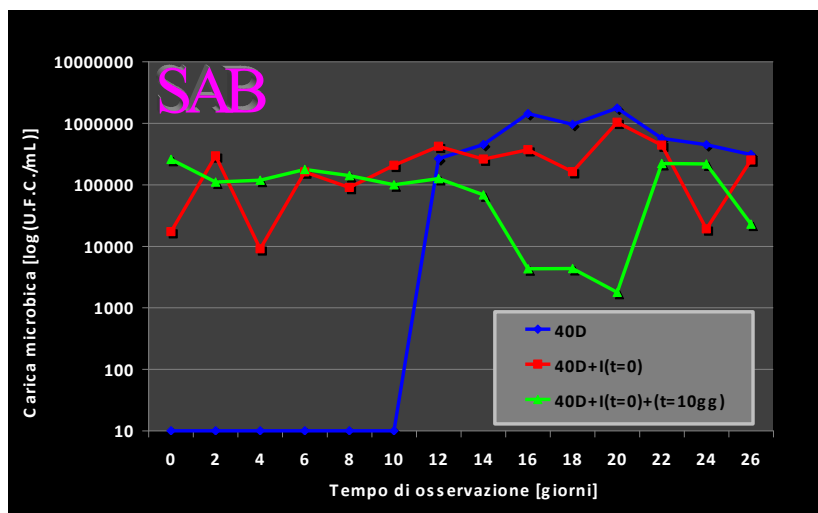
Il controllo evidenzia un andamento a dente di sega, probabile conseguenza di una successione nelle popolazioni microbiche che dopo lo sviluppo, probabilmente a causa dei loro stessi metaboliti, non trovano condizioni di vita adeguate. Anche la parziale diluizione del percolato con brodo nutritivo, unita al doppio inoculo a tempo 0 e dopo 10 giorni non modifica significativamente quanto commentato.

Ulteriori diluizioni in acqua, sempre con aggiunta in due tempi di biomassa sia per le cariche microbiche (IVa ) che per le cariche micotiche (IVb) evidenzia un andamento analogo, sebbene, con cariche microbiche più elevate.



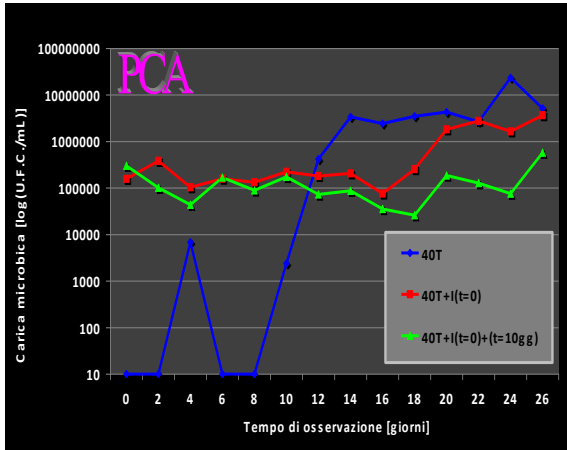
IVa

*cariche microbiche (IVa) e micotiche (IVb) nel campione diluito al 40% v/v con acqua distillata, ed in seguito a singolo e doppio inoculo di biomassa selezionata*

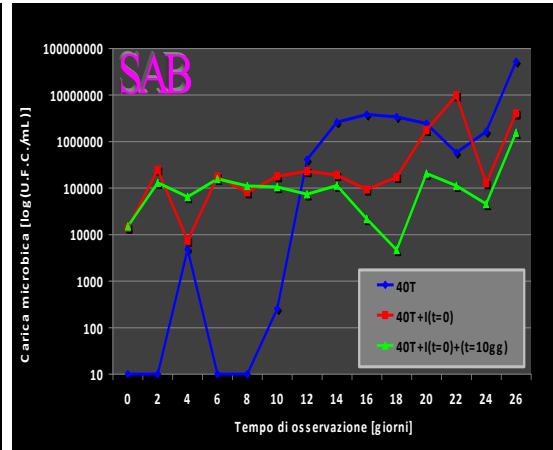


IVb

Anche la diluizione nelle stesse condizioni sperimentali di cui alla figura precedente con terreno nutritivo fa evidenziare gli stessi andamenti, sebbene per quanto riguarda le cariche microbiche si abbia un maggiore sviluppo nel controllo rispetto alle precedenti esperienze. È da ricordare che cariche microbiche più elevate comportano un più attivo metabolismo che può portare ad una rapida degradazione delle componenti organiche nel percolato.



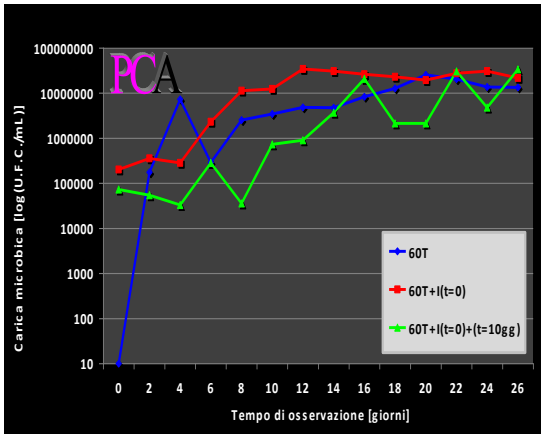
Va



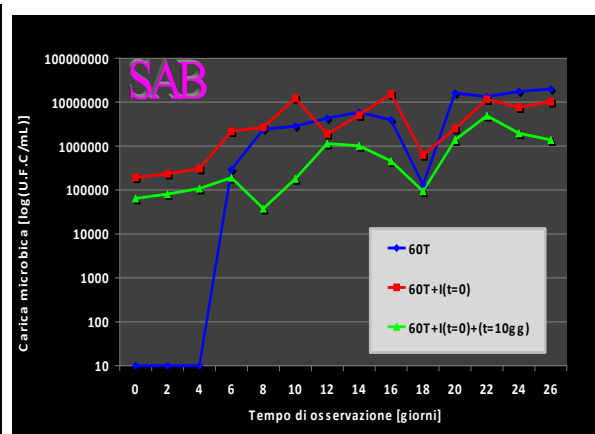
Vb

*cariche microbiche (Va) e micotiche (Vb) nel campione diluito al 40% v/v*

*con acqua triptonata, ed in seguito a singolo e doppio inoculo di biomassa selezionata*



Vc



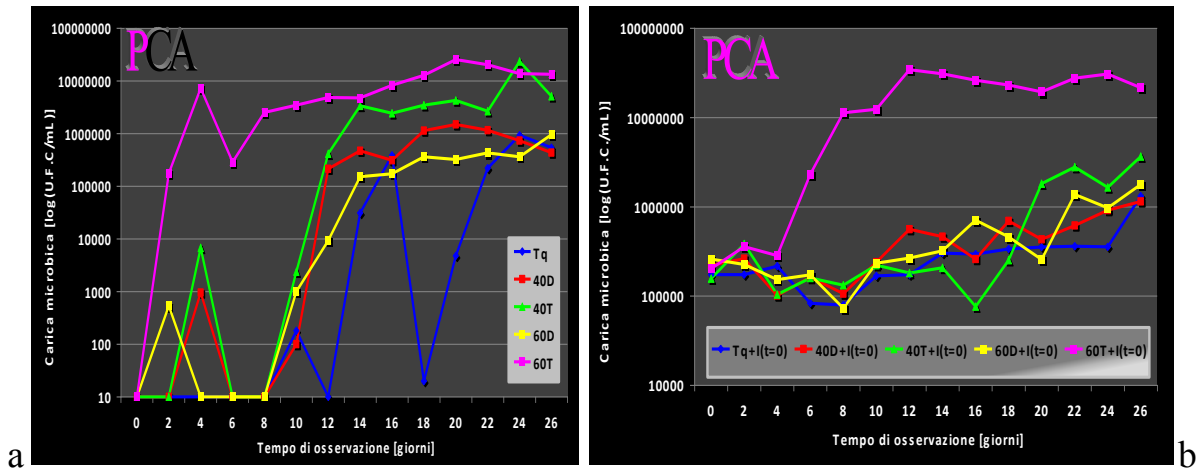
Vd

*cariche microbiche (Vc) e micotiche (Vd) nel campione diluito al 60% v/v*

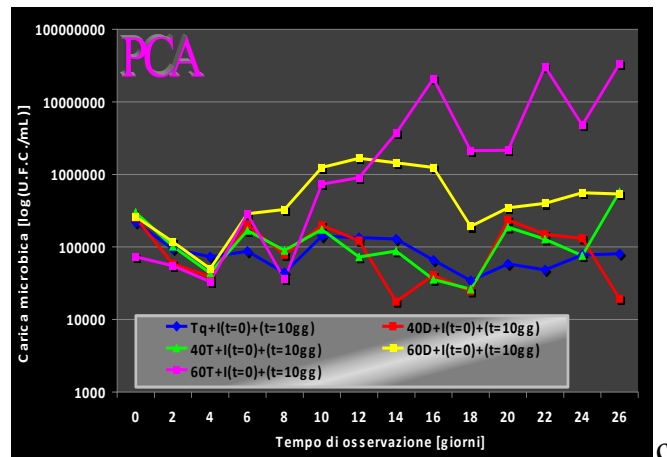
*con acqua triptonata, ed in seguito a singolo e doppio inoculo di biomassa selezionata*

Le variazioni delle concentrazioni microbiche nel percolato tindalizzato, variamente diluito con acqua distillata e terreno nutritivo, evidenziano andamenti diversificati a seconda se non vi è alcuna aggiunta di biomassa (a);

con un'unica aggiunta di sospensione batterica al tempo 0 (b) e con doppia aggiunta a tempo 0 e dopo 10 giorni di biomassa(c).



cariche microbiche nel campione tal quale e variamente diluito con acqua distillata e triptonata e senza aggiunta di biomassa (a), con un'aggiunta al tempo 0 (b) e con doppio inoculo, a tempo 0 e dopo 10 giorni (c)



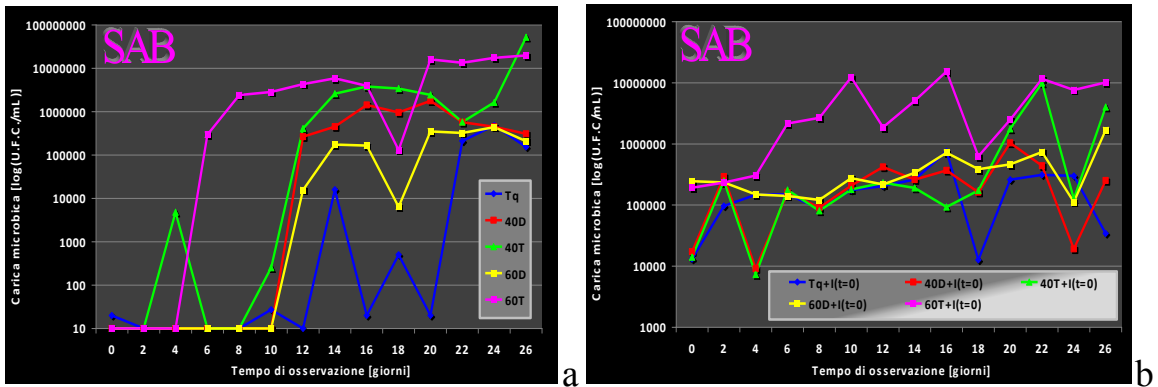
Si evidenzia:

Andamento a dente di sega nel controllo senza aggiunta, legato alle successioni di popolazioni microbiche, come descritto in precedenza;

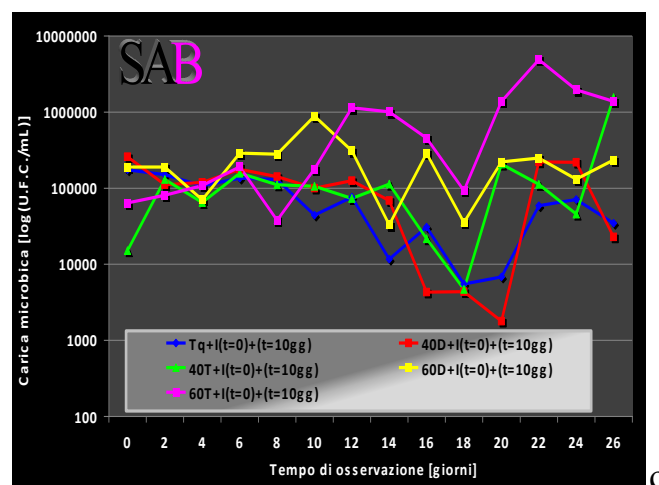
L'influenza positiva della diluizione e dell'inoculo al tempo 0. Questi andamenti però tra loro non differiscono significativamente, eccezione fatta per la diluizione spinta con acqua triptonata.

L'aggiunta dopo 10 giorni non ha alcuna influenza sull'andamento generale delle cariche microbiche.

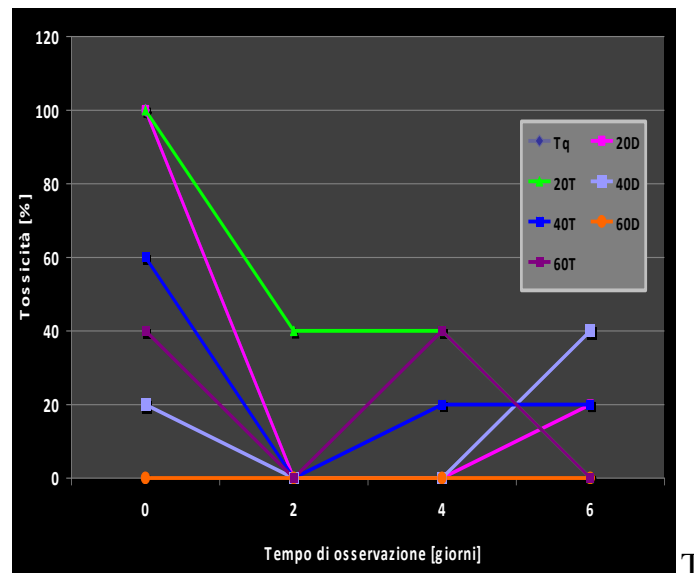
L'esperienza fatta nelle condizioni di cui alla figura precedente, indagando su cariche micotiche (a,b,c), consente una situazione sovrapponibile alla precedente.



cariche micotiche nel campione tal quale e variamente diluito con acqua distillata e triptonata e senza aggiunta di bomassa (a), con un'aggiunta al tempo 0 (b) e con doppio inoculo, a tempo 0 e dopo 10 giorni (c)

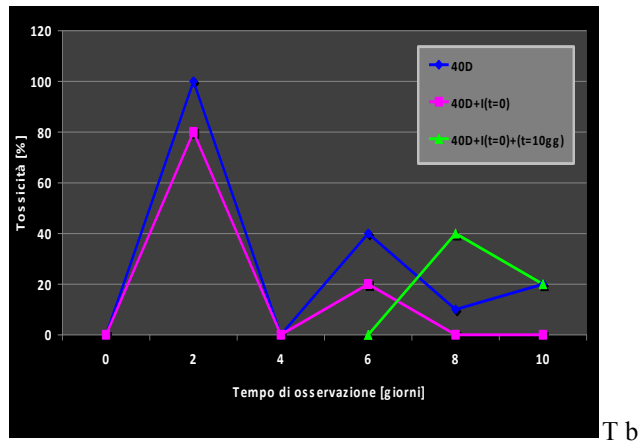
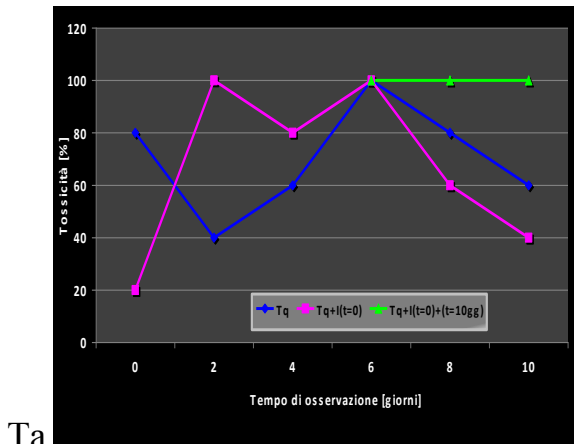


*L'andamento della tossicità nei campioni di percolato variamente diluiti in acqua distillata e triptone, lasciati in agitazione a temperatura ambiente, evidenzia una diminuzione della tossicità (T) in funzione della diluizione, conferma altresì che i metaboliti dell'attività fermentante possono comportare nel tempo un incremento della tossicità.*

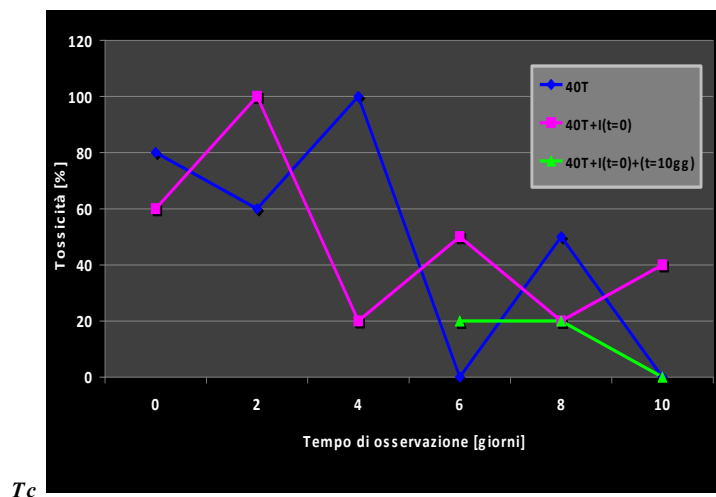


*(T) andamento della tossicità nei campioni di percolato variamente diluiti in acqua e triptone*

La variabilità nel decremento della tossicità e del suo incremento nel tempo è confermata anche in prove effettuate con doppio inoculo nel campione tal quale (Ta), nel campione diluito in acqua (Tb) e in brodo (Tc).

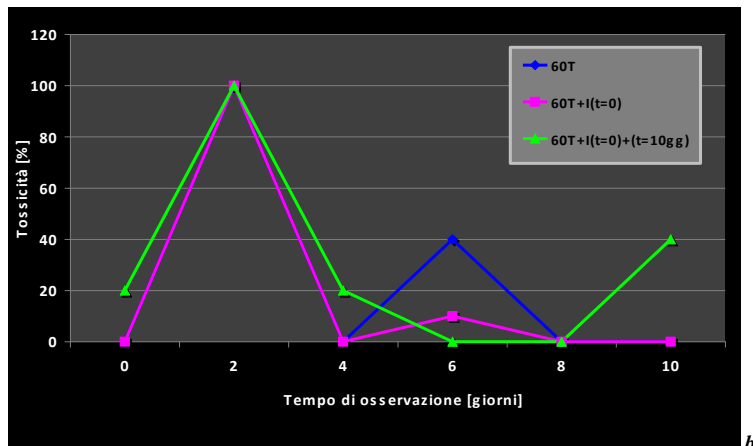
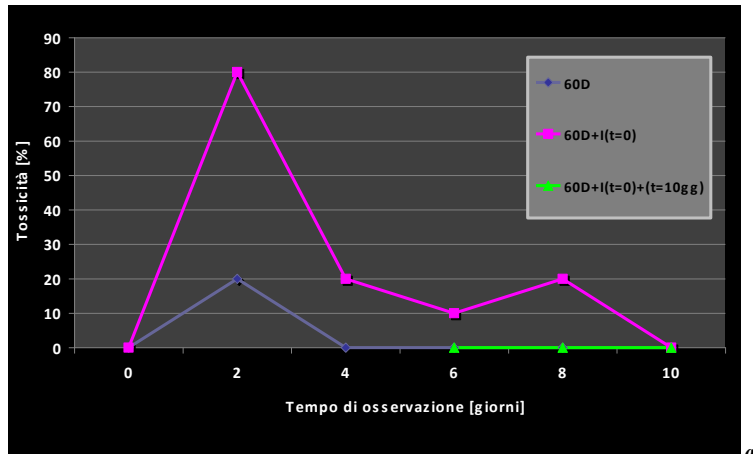


andamento della tossicità nei campioni di percolato tal quale (Ta), diluito in acqua (40% v/v) (Tb) e triptone (40% v/v) (Tc), senza inoculo, con singolo inoculo e con doppio inoculo



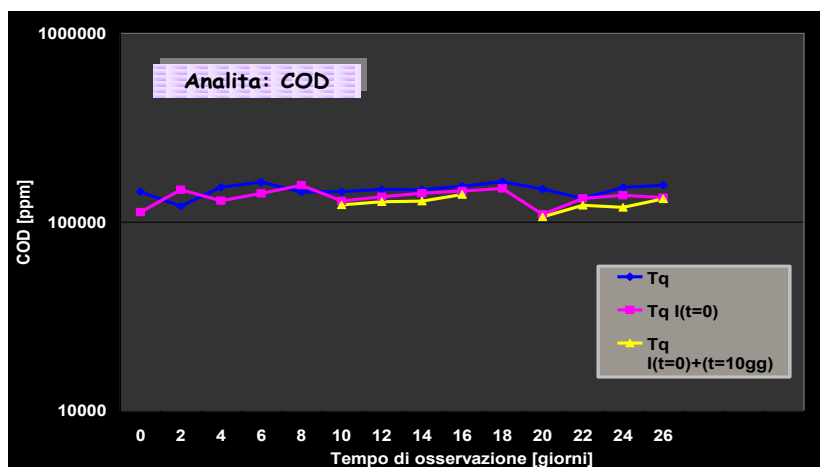
L'ulteriore diluizione in acqua distillata al 60% D (a) e in terreno 60%T (b), non modifica sostanzialmente le considerazioni fatte prima.





andamento della tossicità nei campioni di diluito in acqua distillata(60% v/v) (a) e in triptone (60% v/v) (b), senza inoculo, con singolo inoculo e con doppio inoculo

L'azione metabolica sollecitata con la diluizione e con l'aggiunta non ha comunque influenzato significativamente l'andamento della COD che permane a valori molto elevati e richiede pertanto un diverso approccio sperimentale.



Andamento della C.O.D.

### VALUTAZIONI SPERIMENTALI

- Andamento a dente di sega nel controllo senza aggiunta è legato alle successioni di popolazioni microbiche;
- Positiva è l'influenza per l'incremento della carica microbica con la diluizione e l'inoculo al tempo 0. Questi andamenti però tra loro non differiscono significativamente, eccezione fatta per la diluizione spinta con acqua triptonata
- L'aggiunta dopo 10 giorni non ha alcuna influenza sull'andamento generale delle cariche microbiche.
- L'esperienza fatta su cariche micotiche, consente una situazione sovrapponibile alle precedenti

### CONCLUSIONI

Dall'analisi dei grafici è possibile trarre alcune considerazioni:

Sebbene ci sia un maggiore incremento delle cariche microbiche con la diluizione di acqua o di brodo, che simula un processo di diluizione nel liquame, non dà luogo a significative differenze;

L'inoculo di biomassa generica da impianto di depurazione di acque reflue non evidenzia variazioni significative delle cariche microbiche. La biomassa da impianto non è quindi utilizzabile in un eventuale processo biotecnologico;

L'inoculo di biomassa unito alla diluizione sembra dare risultati più rilevanti con incrementi della carica microbica, non influenzate però da un inoculo ripetuto o da diverse diluizioni;

I processi sperimentati non comportano adeguati abbattimenti nella tossicità né della richiesta chimica di ossigeno.

A conclusione il trattamento del percolato di discarica rappresenta un grosso problema biotecnologico di ardua soluzione, specie considerando la variabilità delle caratteristiche chimiche e biologiche dello stesso in funzione delle tecnologie di confinamento in discarica.

Le future sperimentazioni in questo campo dovranno comprendere l'uso più massivo di inoculi batterici con selezione di ceppi flocculanti o sperimentazioni in ambiente anaerobio. L'uso di colture algali per studi di detossificazione del percolato, visto esiti positivi in esperimenti preliminari mostranti l'adattabilità della cellula algale nel crescere in soluzione con volumi noti di percolato, rappresenta una valida strategia sperimentale che sarà oggetto di ulteriori studi in tal senso.



Quanto finora sperimentato costituisce la base per l'applicazione di tecniche di "bioremediation" che come riportato nelle premesse rappresenta una prospettiva di ricerca allettante e realisticamente perseguibile. Tale tecniche vanno adattate alle tipologie di percolato e standardizzate ma con particolare cura degli aspetti di teratogenicità.

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'inoculo di biomassa generica da impianto di depurazione di acque reflue non evidenzia variazioni significative nella cariche totali microbiche. La biomassa da impianto non è quindi utilizzabile in un eventuale processo biotecnologico;

L'inoculo di biomassa selezionata unito alla diluizione sembra dare risultati più rilevanti con incrementi della carica microbica, non influenzate però da un inoculo ripetuto o da diverse diluizioni;

I processi sperimentati non comportano adeguati abbattimenti nella tossicità e della richiesta chimica di ossigeno.

Le future sperimentazioni in questo campo dovranno comprendere l'uso più massivo di inoculi batterici con selezione di ceppi flocculanti o sperimentazioni in ambiente anaerobio. In seguito ad esperimenti preliminari per valutare l'azione tossica del percolato nei confronti di una cultura cellulare di microalghe, in particolare per il ceppo *Tetraselmis suecica*, ho riscontrato una buona performance di crescita algale in campioni di percolato diluito

## 4.2 Studio dell'embriotossicità del percolato di discarica su *Danio rerio*. Osservazioni del fenotipo in vivo.

Il percolato di discarica è ricordiamo una miscela di sostanze tossiche presenti a concentrazioni variabili in base al tipo di rifiuto confinato nella discarica, dei processi biologici e fisici che originano in esso e influenzata dai fenomeni meteorici. L'attività tossicologica preliminare, testata sull'invertebrato *Daphnia magna*, ha mostrato già in partenza una variabilità dei dati nei vari campioni utilizzati di percolato delle tre discariche. In verità la variabilità organica ed inorganica del percolato si riscontra anche nei campioni della stessa discarica prelevati in tempi diversi, a maggior ragione tra percolati provenienti da impianti diversi fortemente influenzati da condizioni meteo climatiche locali. Abbiamo già visto i grafici relativi alle analisi chimiche del percolato delle varie discariche, accertate con specifiche analisi chimiche dopo il prelievo dall'impianto. Gli effetti tossicologici in embrioni di *Danio rerio* sono il risultato anche di sinergie tra le sostanze contenute nel percolato, come sarà evidente in esperimenti in cui il campione di percolato pur venendo diluito mantiene le potenzialità tossicologiche. L'uso di embrioni di zebrafish sembrerebbe adatto, rispetto ad altri modelli attualmente utilizzati in ecotossicologia, per una identificazione più fine degli effetti sub-letali. Di seguito saranno esposti gli studi tossicologici svolti su *Danio rerio*, dopo un test preliminare su *Daphnia magna*, applicando quantità note di percolato delle tre discariche diluite in soluzione di crescita, mantenendo il volume totale della soluzione invariato. Prima di saggiare 'i percolati' su embrioni di *Danio rerio*

sono stati allestiti dei test di tossicità preliminari su *Daphnia magna* e su *Balanus amphitrite*.

L'uso di ulteriori modelli biologici riconosciuti per i test di ecotossicologia sono stati usati semplicemente per validare la potenzialità tossicologica del percolato.

Un test di immobilità su *Balanus amphitrite* esposto al percolato di Serre, dopo separazione del particolato grossolano con siringa, ha fornito alcune conferme interessanti sul rapporto dose/effetto. All'incremento della quantità di percolato nel campione aumentano le anomalie funzionali osservate, attraverso stereomicroscopia. Ulteriori studi saranno rivolti per analizzare il comportamento tossicologico del percolato dopo trattamenti di purificazione e separazione dei vari costituenti.

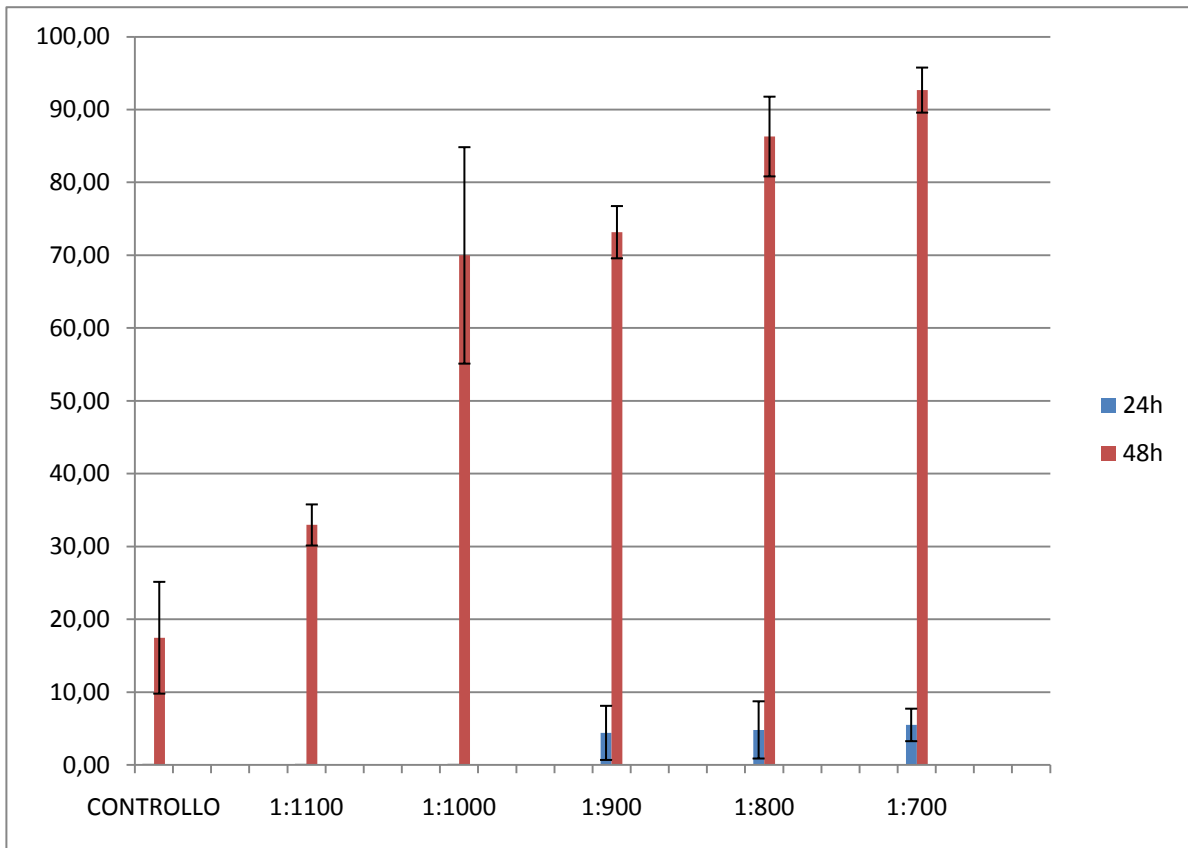
### CONTROLLO IMMOBILITA' 24h

	REPLICHE	MOBILI	IMMOBILI	TOT	% IMMOBILITA'	MEDIA %	DS
CONTROLLO	R1	23	0	23	0,00	0,00	0,00
	R2	27	0	27	0,00		
	R3	28	0	28	0,00		
	R4	27	0	27	0,00		
1:1100	R1	24	0	24	0,00	0,00	0,00
	R2	25	0	25	0,00		
	R3	24	0	24	0,00		
	R4	18	0	18	0,00		
1:1000	R1	22	0	22	0,00	0,00	0,00
	R2	20	0	20	0,00		
	R3	19	0	19	0,00		
	R4	18	0	18	0,00		
1:900	R1	20	2	22	9,09	4,40	3,72
	R2	12	0	12	0,00		
	R3	22	1	23	4,35		
	R4	23	1	24	4,17		
1:800	R1	23	1	24	4,17	4,81	3,93
	R2	19	2	21	9,52		
	R3	19	0	19	0,00		

	R4	17	1	18	5,56		
1:700	R1	26	1	27	3,70	5,50	2,23
	R2	26	2	28	7,14		
	R3	12	1	13	7,69		
	R4	28	1	29	3,45		

## CONTROLLO IMMOBILITA' 48h

	REPLICHE	MOBILI	IMMOBILI	TOT	% IMMOBILITA'	MEDIA %	DS	
CONTROLLO	R1	17	6	23	26,09	17,47	7,68	
	R2	25	2	27	7,41			
	R3	23	5	28	17,86			
	R4	22	5	27	18,52			
1:1100	R1	16	8	24	33,33	32,96	2,82	Movimento lento
	R2	16	9	25	36,00			
	R3	17	7	24	29,17			
	R4	12	6	18	33,33			
1:1000	R1	2	20	22	90,91	69,98	14,86	Mov. appendici agglom.di animali
	R2	6	14	20	70,00			
	R3	8	11	19	57,89			
	R4	7	11	18	61,11			
1:900	R1	5	17	22	77,27	73,17	3,59	Mov. Molto lenti
	R2	3	9	12	75,00			
	R3	7	16	23	69,57			
	R4	7	17	24	70,83			
1:800	R1	2	22	24	91,67	86,30	5,47	Statici, con mov. Appendici
	R2	3	18	21	85,71			
	R3	4	15	19	78,95			
	R4	2	16	18	88,89			
1:700	R1	3	24	27	88,89	92,68	3,10	Statici, con mov. Appendici



*Nel caso di *Daphnia magna** si è osservato l'andamento della mortalità a 24h e 48h dalla prima esposizione al percolato. Nelle soluzioni derivate da 0,02 mL di percolato (fig. 5.2a) in 50 ml di acqua di allevamento, rapporto  $v'/v=1/50$ , in cui sono stati posti 10 piccoli di *Daphnia*, si perviene alle seguenti osservazioni: bassa tossicità nei campioni contenenti percolato di Parco Saurino e Savignano, sia a 24h che a 48h, mentre il campione di Serre mostra già a 24 h un incremento sensibile della tossicità.





test tossicità (mortalità%) su 10 piccoli di *Daphnia magna*: confronto dei dati di tossicità dei campioni contenenti rispettivamente 2,5 mL (1/20) e 0,5 di percolato a due rapporti di volume v/v= [1/50][1/20]:

**1(volume percolato)/  
50/o 20 di volume di  
soluzione di crescita)**

	<b>Immobili a 24h</b>	<b>Immobili a 48h</b>
Parco Saurino <b>1/50</b>	0	0
Savignano (Aprile) <b>1/50</b>	0	10
Savigna.(Maggio) <b>1/50</b>	0	10
Serre <b>1/50</b>	90	100
Controllo	0	0
	<b>24h</b>	<b>48h</b>
Parco Saurino <b>1/20</b>	80	80
Serre <b>1/20</b>	100	100
Savignano (Aprile) <b>1/20</b>	50	90
Savignan. (Maggio) <b>1/20</b>	100	100

Nei campioni (fig. 5,2b)contenenti invece 0,05ml di percolato n 50ml di acqua di allevamento, con rapporto v'/v= 1/20, si registra un sensibile incremento della mortalità in tutti i casi considerati.

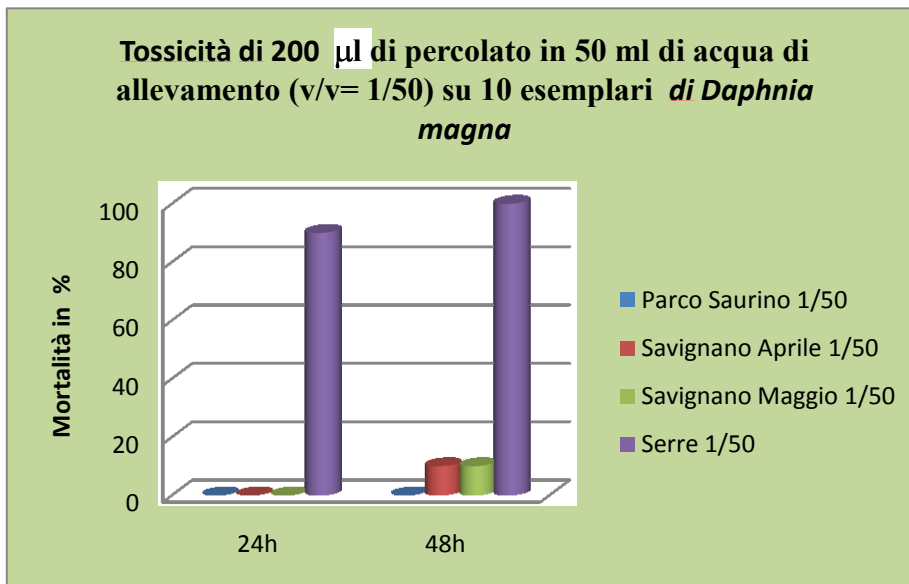


fig.5.2 a

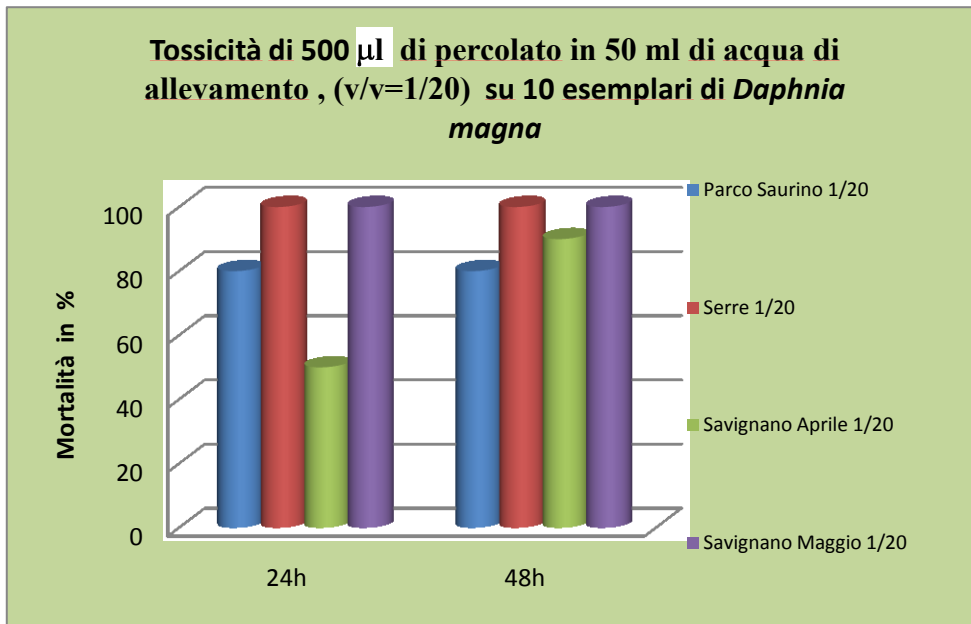
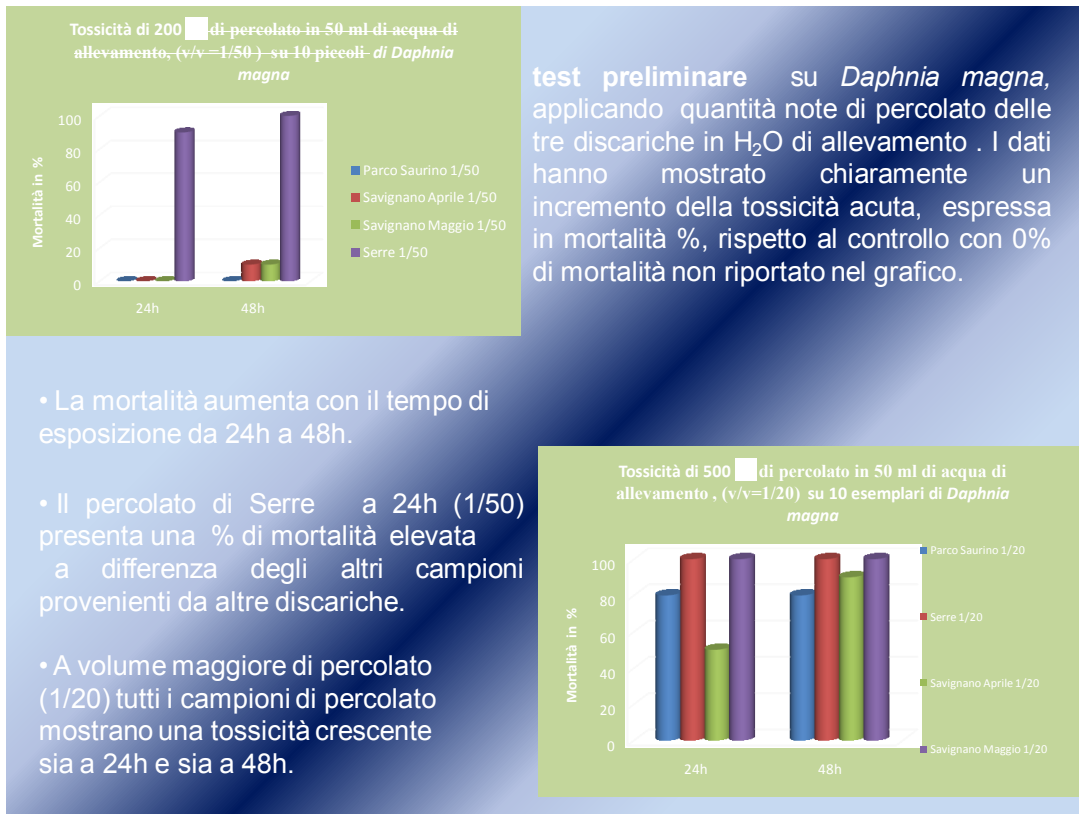


fig. 5.2 b

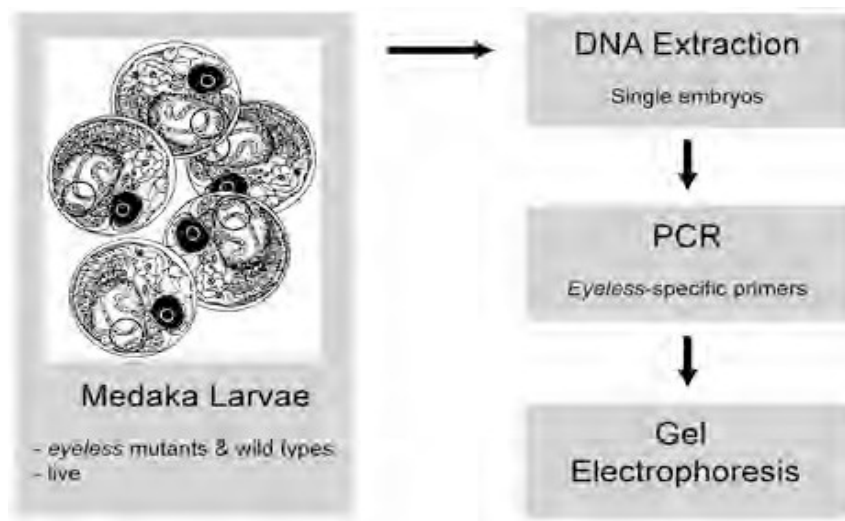
Pertanto i test preliminari dimostrano una intrinseca tossicità del percolato anche se diluiti in soluzione di crescita, tossicità che viene mantenuta nel caso del percolato di Serre anche a diluizioni maggiori. Il campione di Savignano (fig.5.2b) presenta a 24 h rispetto a ParcoS. una minore soglia di letalità visto il più basso tasso di mortalità, dato che assume valori % opposti tra i due percolati a 48h. E' evidente la maggiore tossicità del campione di Serre anche a volumi minori rispetto agli altri due campioni.

In definitiva possiamo ipotizzare con questo esperimento preliminare la maggior tossicità del percolato di Serre.



In *Danio rerio* si è seguita una specifica procedura sperimentale secondo protocolli internazionali (Fish embryo toxicity assays, UBA Contract Number 203 85 422, March 30, 2006) (The zebrafish book, A guide for the laboratory use of zebrafish *Danio rerio*, by Monte Westerfield, Institute of Neuroscience, University of Oregon). La Soluzione di crescita(madre) posta in beuta (200mL) rappresenta il nostro controllo mentre le sue repliche contenenti volumi noti di percolato gli altri campioni. Dopo il prelievo e la selezione degli embrioni (30/40 embrioni), eseguita ad un determinato stadio dello sviluppo embrionale, si procede al posizionamento degli stessi in beuta, e successivamente vengono posti ad incubazione a 27 gradi in bagno termostato. La soluzione di crescita (200mL) deriva a sua volta da una soluzione costituita da 1 litro di acqua distillata e da 1,5mL di I.O. al 30%. Gli embrioni prelevati dalla vasca di allevamento, dopo alcune ore dalla fecondazione vengono selezionati in fase di sviluppo 'Sphere Stage' in cui è attiva l'espressione

genica dei geni zigotici. Siamo a circa 3,8 ore dalla fecondazione, gli embrioni vengono posti in beuta in numero di 30 o 40, poi incubati per procedere all'osservazione ogni 24h. Nello specifico si studia il corretto sviluppo embrionale, eventuali alterazioni morfologiche e la mortalità nelle 120 h attraverso l'ausilio di un stereo microscopio. Ulteriori indagini istologiche, immunocitochimiche e molecolari possono evidenziare ulteriori riscontri del danno funzionale nell'embrione, al fine di valutare eventuali manifestazioni di **teratogenicità e di genotossicità** che altresì andrebbero svelati con trattamenti cronici.



Di seguito riportiamo i dati ottenuti con i test di tossicità acuti applicando alla soluzione di crescita volumi noti di percolato proveniente dalla discarica di Savignano:

#### ANALISI DEL PERCOLATO DI SAVIGNANO

Aprile/Maggio

2009

1 test tossicità su 30 embrioni stadio di sviluppo dome stage/Sphere Stage

Percolato discarica Savignano [1/50] [1/75] [1/100] [1/150] [1/200] [1/300] 1/400

	controllo	4 mL	2,66mL	2 mL	1,33 mL	1 mL	0,666 mL	0,5 mL
24h	3	10	3	7	7	5	4	4
48h	3	15	4	7	7	5	4	4
72h	3	30	8	10	8	6	4	4
96h	4	30	27	18	8	7	5	4

120h	4	30	30	30	9	7	5	4
Aprile/Maggio 2009								
2 test tossicità su 30 embrioni stadio di sviluppo dome stage/Sphere Stage								
Percolato discarica Savignano [1/50] [1/75] [1/100] [1/150] [1/200] [1/300] 1/400								
	controllo	4 mL	2,66mL	2 mL	1,33 mL	1 ml	0,666 mL	0,5 mL
24h	5	12	8	10	7	7	6	6
48h	5	14	9	10	8	7	6	6
72h	5	30	13	15	9	8	6	7
96h	5	30	30	17	9	8	6	7
120h	6	30	30	30	9	8	6	8

3 test-tossicità Aprile/Maggio 2009 su 30 embr. di *Danio rerio*

Percolato di Savignano								
	[1/50]	[1/75]	[1/100]	[1/150]	[1/200]	[1/300]	[1/400]	
	controllo	4 mL	2,66 mL	2 mL	1,33 mL	1 mL	0,666 mL	0,5 mL
24h	3	7	6	8	5	5	4	3
48h	3	14	9	10	6	5	4	3
72h	3	30	13	15	6	5	5	4
96h	3	30	30	25	6	5	5	4
120h	3	30	30	30	6	5	5	4

test di tossicità su 30 embrioni di *Danio rerio* in soluzione di crescita in 120h.

Xmedia/±σN

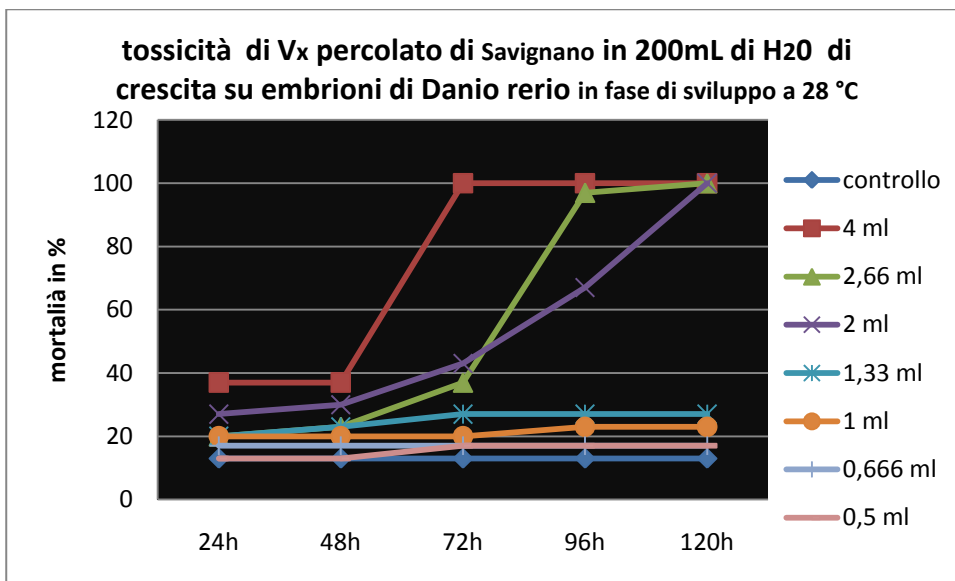
	[1/50]	[1/75]	[1/100]	[1/150]	[1/200]	[1/300]	[1/400]	
	controllo	4 mL	2,66 mL	2 mL	1,33 mL	1 mL	0,666 mL	0,5 mL
24h	4±1	11±1	6±1	8±1	6±1	6±1	5±1	4±1
48h	4±1	14±1	7±2	9±1	7±1	6±1	5±1	4±1
72h	4±1	30	11±2	13±2	8±1	6±1	5±1	5±1
96h	4±1	30	29±1	20±3	8±1	7±1	5±1	5±1
120h	4±1	30	30	30	8±1	7±1	5±1	5±1

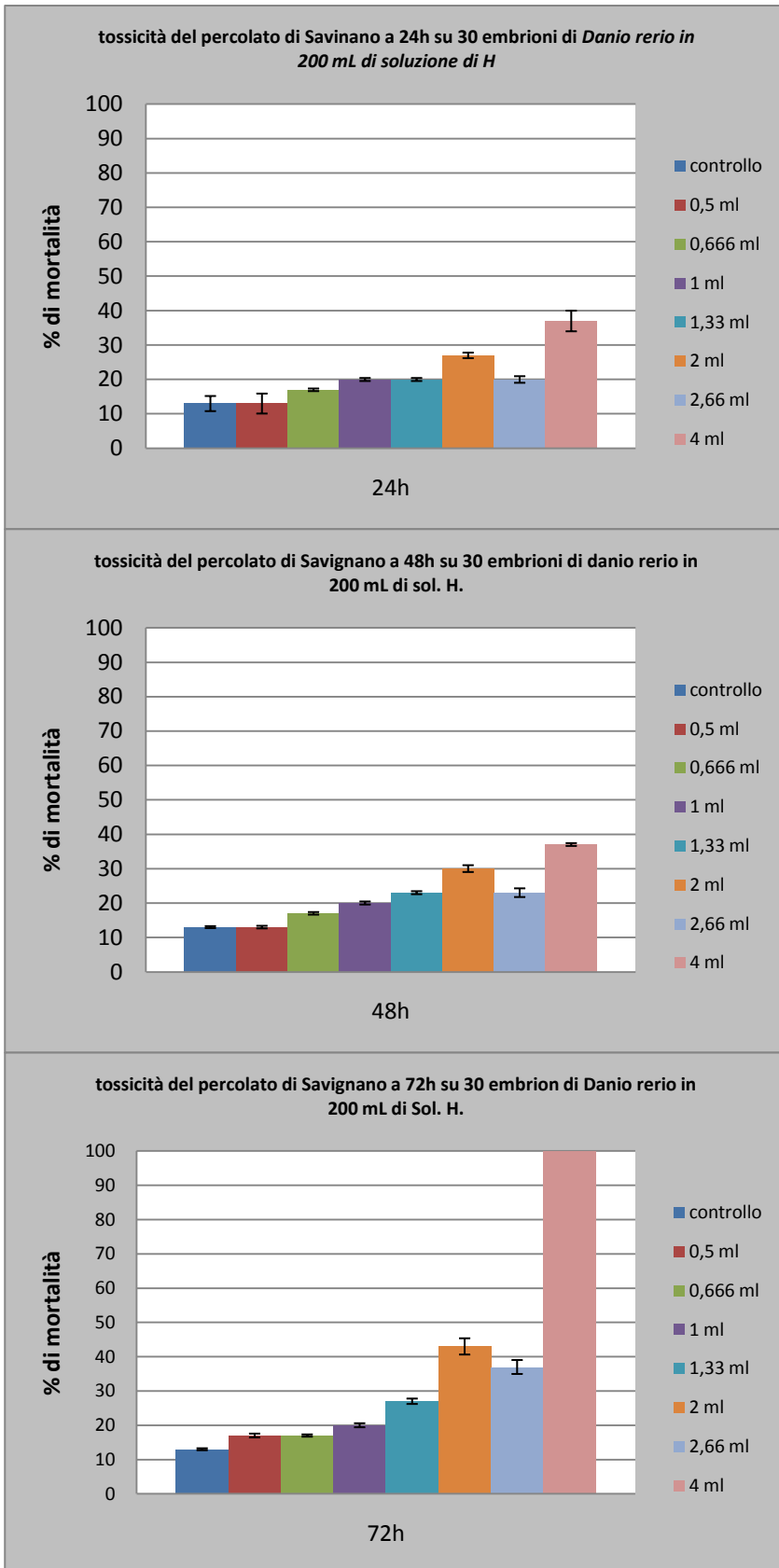
Xmedia%

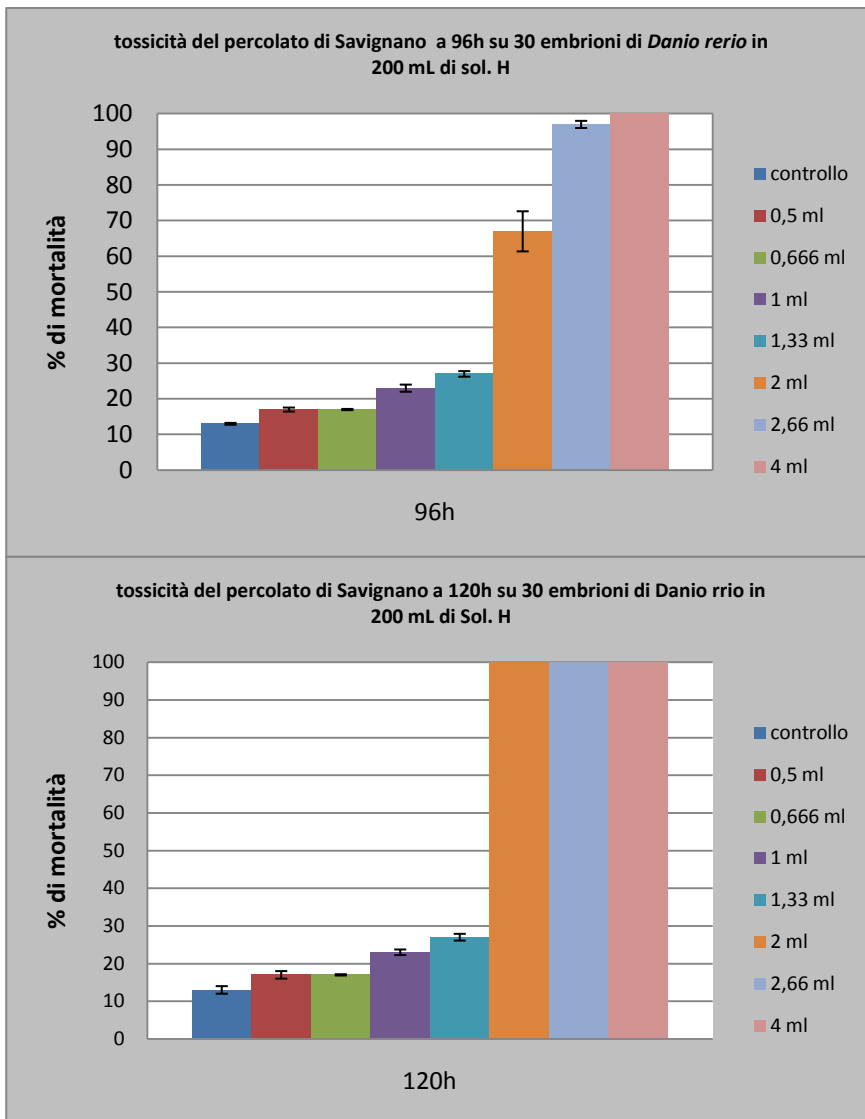
	controllo	4 mL	2,66 mL	2 mL	1,33 mL	1 mL	0,666 mL	0,5 mL
24h	13	37	20	27	20	20	17	13
48h	13	37	23	30	23	20	17	13
72h	13	100	37	43	27	20	17	17
96h	13	100	97	67	27	23	17	17
120h	13	100	100	100	27	23	17	17

Xmedia% tossicità del percolato di Savignano su embrioni di *Danio rerio*  
±DS

		[1/400]	[1/300]	[1/200]	[1/150]	[1/100]	[1/75]	[1/50]
	controllo	0,5 ml	0,666 ml	1 mL	1,33 mL	2 mL	2,66 mL	4 mL
24h	13±2	13±3	17±2	20±2	20±2	27±3	20±5	37±8
48h	13±2	13±3	17±2	20±2	23±2	30±3	23±6	37±1
72h	13±2	17±3	17±2	20±3	27±3	43±6	37±6	100
96h	13±2	17±3	17±1	23±3	27±3	67±8	97±3	100
120h	13±3	17±5	17±1	23±3	27±3	100	100	100



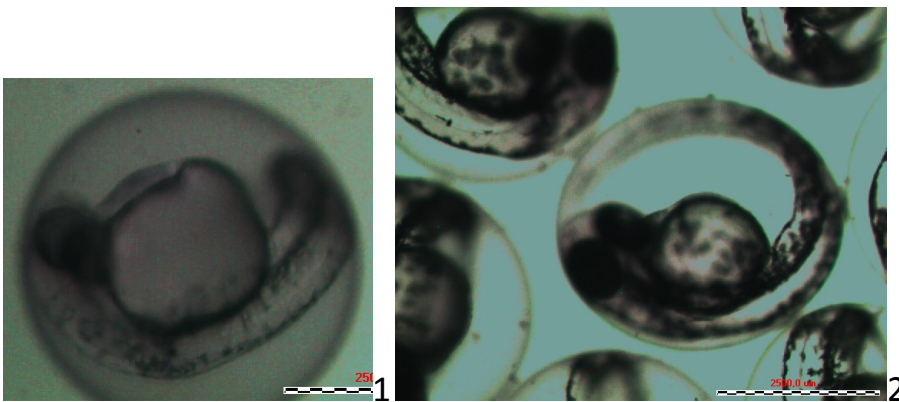




Il grafico mostra una bassa tossicità del campione con volumi di percolato inferiori a 2mL , nello specifico 1,33 mL a 0,5 mL di percolato in 200 mL di soluzione di crescita. A partire da 2mL di percolato e per volumi maggiori si registra un incremento della mortalità già a 24h, con un picco massimo di tossicità al maggiore volume di percolato usato,  $v^*/v= 1/50$ , come era prevedibile. Nel campione con 4 ml di percolato (1/50) si registra già a 48h la massima % di mortalità. Resta adesso studiare l'andamento della tossicità con gli altri due campioni di percolato, provenienti rispettivamente dalle discariche di Parco Saurino e di Serre. Nell'osservazione dello sviluppo embrionale di *Danio rerio*, tesa ad identificare effetti sub-letali, si è tenuto conto di

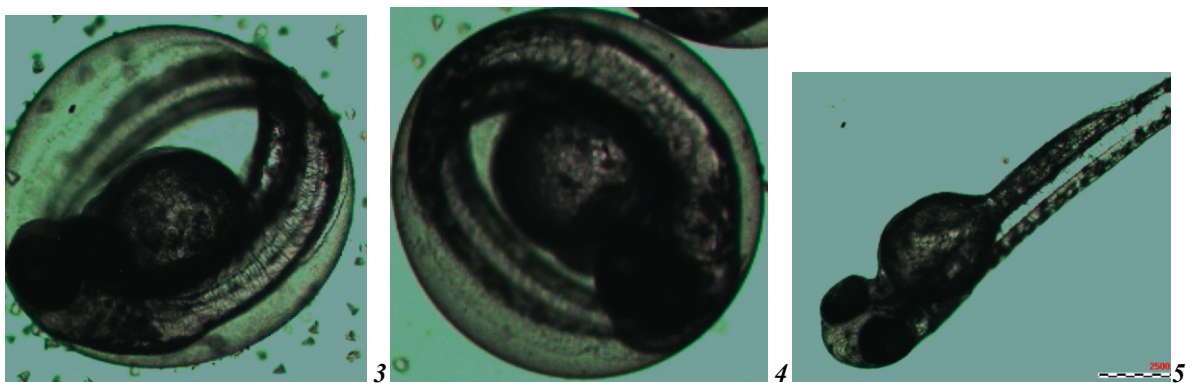


evidenziare le seguenti alterazioni: corretto assorbimento del sacco vitellino nelle 96h, comparsa della pigmentazione entro le 48h, motilità degli avanotti nel corion e dopo la schiusa entro le 72h, corretta definizione degli assi corporei, definizione dei somiti, distacco della coda dal sacco vitellino. Nel caso del percolato di Savignano possiamo affermare che a basse diluizioni si è osservato una bassa mobilità interna, una rigidità del sacco vitellino probabile concausa del ritardo nella schiusa rispetto al controllo tra le 48h/72 h, timida pigmentazione a 24h.



(1) Embrione A 24h Trattato con percolato di Savignano(Maggio con V'/V 1/100)

(2)Embrioni a 48h trattati con percolato di Savignano ( V'/V 1/350)



(3)Embrione a 48h trattato con percolato di Savignano(V'/V 1/300) e (4)controllo a 48h e(5) controllo a 48h schiuso

## 4.2a Percolato della discarica di Parco Saurino

Nel confrontare l'andamento della mortalità derivati dai vari saggi di tossicità, si deve anche tener conto del carico organico ed inorganico che caratterizza i vari percolati provenienti da discariche diverse, caratteristiche chimiche ben rappresentate dai grafici della COD (pag.16) . Nel caso della discarica di Parco Saurino i grafici mostrano una tossicità elevata soltanto con volumi di percolato di 4mL, in 200mL di soluzione di crescita, mentre con volumi minori non risultano incrementi della mortalità in % se non con 0,266mL di percolato ma in tempi di osservazione maggiori. I grafici indicano una soglia di letalità più alta per il campione proveniente da Parco Saurino e di conseguenza una tossicità minore rispetto al campione di Savignano. La minor tossicità però è caratterizzata da una maggior espressione di effetti sub-letali come mostrano le osservazioni sugli embrioni in fase di sviluppo:

- dati sperimentali:

### Test 1 di tossicità su 30 embrioni di *Danio rerio*

TABELLA 2: tasso di mortalità nelle 120h con diluizioni di percolato di Parco Saurino(Giugno)

		[1/50]	[1/75]	[1/100]	[1/200]	[1/300]	[1/400]
	controllo	4mL	2,66 mL	2mL	1 mL	0,666 mL	0,5 mL
24h	4	5	7	5	6	6	6
48h	4	10	7	5	6	6	6
72h	4	30	7	6	6	6	6
96h	4	30	9	6	6	6	6
120h	4	30	30	7	6	7	6

### Test 2 di tossicità su 30 embrioni di *Danio rerio*

TABELLA 2: tasso di mortalità nelle 120h con diluizioni di percolato di Parco Saurino(Giugno)

		[1/50]	[1/75]	[1/100]	[1/200]	[1/300]	[1/400]
	controllo	4mL	2,66 mL	2mL	1 mL	0,666 mL	0,5 mL

24h	3	6	6	5	4	4	3
48h	3	9	7	5	4	4	3
72h	3	28	7	5	4	4	4
96h	3	30	10	5	5	4	4
120h	3	30	15	6	5	4	4

### Test 3 di tossicità su 30 embrioni di *Danio rerio*

TABELLA 2: tasso di mortalità nelle 120h con diluizioni di percolato di Parco Saurino(Giugno)

		[1/50]	[1/75]	[1/100]	[1/200]	[1/300]	[1/400]
	controllo	4mL	2,66 mL	2mL	1 mL	0,666 mL	0,5 mL
24h	5	10	8	6	5	5	5
48h	5	10	8	6	5	5	5
72h	5	30	10	7	5	5	5
96h	5	30	10	7	6	5	5
120h	5	30	15	7	6	6	5
<b>Os +- </b>	<b>+-</b>	<b>+-</b>	<b>+-</b>	<b>+-</b>	<b>+-</b>	<b>+-</b>	<b>+-</b>
24h	1	3	1	1	2	2	2
48h	1	1	1	1	2	2	2
72h	1	1	2	1	2	2	1
96h	1		1	1	1	2	1
120h	1		9	1	1	2	1

### Test X di tossicità su 30 embrioni di *Danio rerio*

TABELLA 2: tasso di mortalità Xmedio nelle 120h con diluizioni di percolato di Parco Saurino(Giugno)

Xmedia±σ/N		[1/50]	[1/75]	[1/100]	[1/200]	[1/300]	[1/400]
	controllo	4mL	2,66 mL	2mL	1 mL	0,666 mL	0,5 mL
24h	4±0.3	7±2	7±0.6	5±0.6	6±1	6±1	5±1
48h	4±0.3	10±1	7±0.6	5±0.6	6±1	6±1	5±1
72h	4±0.3	29±1	8±1	6±0.6	6±1	6±1	5±1
96h	4±0.3	30	10±0.6	6±0.6	6±1	6±1	5±1
120h	4±0.3	30	20±5	7±0.6	6±1	7±1	5±0.6

### Test X% di tossicità su 30 embrioni di *Danio rerio*

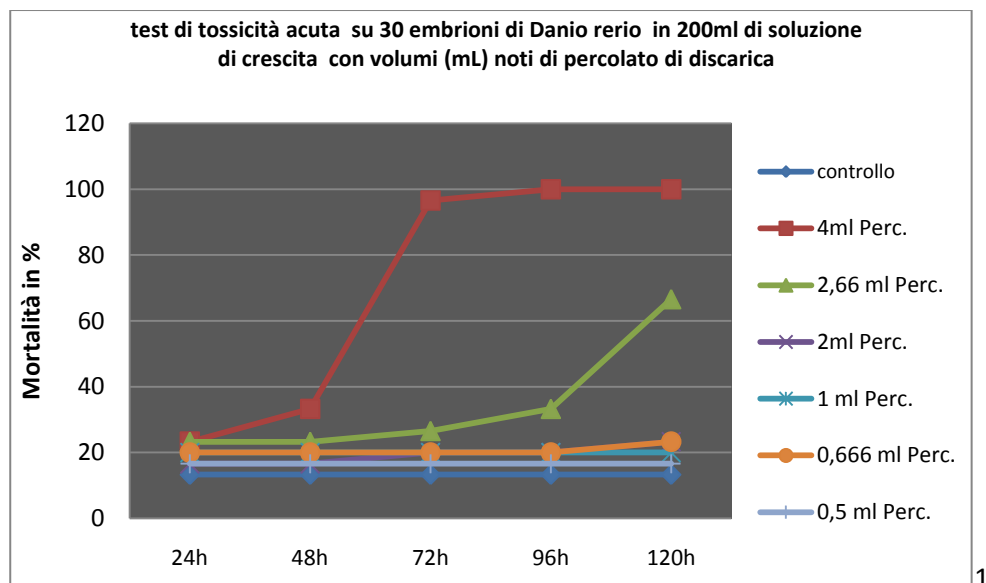
TABELLA 2: tasso di mortalità in % Xmedio nelle 120h con diluizioni di percolato di Parco Saurino(Giugno)

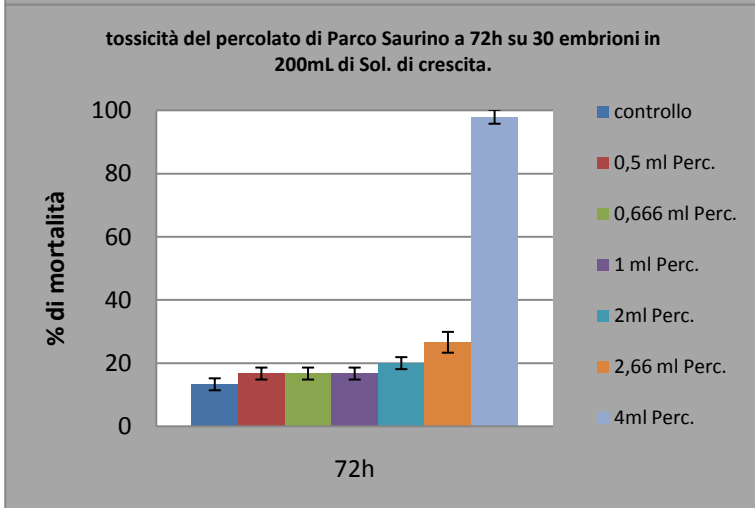
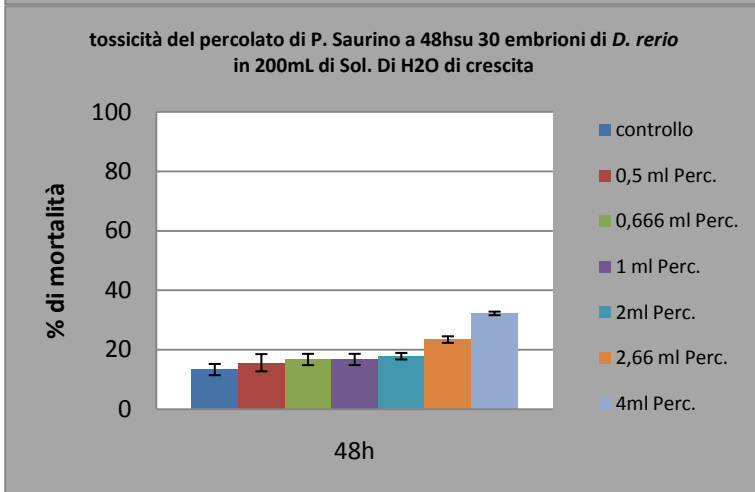
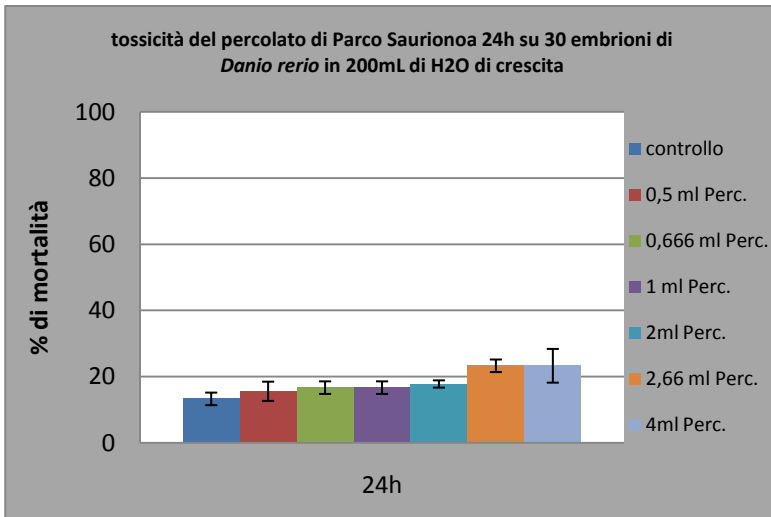
Xmedia%		[1/50]	[1/75]	[1/100]	[1/200]	[1/300]	[1/400]
	controllo	4mL Perc.	2,66 mL Perc.	2mL Perc.	1 mL Perc.	0,666 mL Perc.	0,5 mL Perc.
24h	13,3	23,3	23,3	16,6	20,0	20,0	16,6
48h	13,3	33,3	23,3	16,6	20,0	20,0	16,6
72h	13,3	96,6	26,6	20,0	20,0	20,0	16,6
96h	13,3	100	33,3	20,0	20,0	20,0	16,6
120h	13,3	100	66,6	23,3	20,0	23,3	16,6

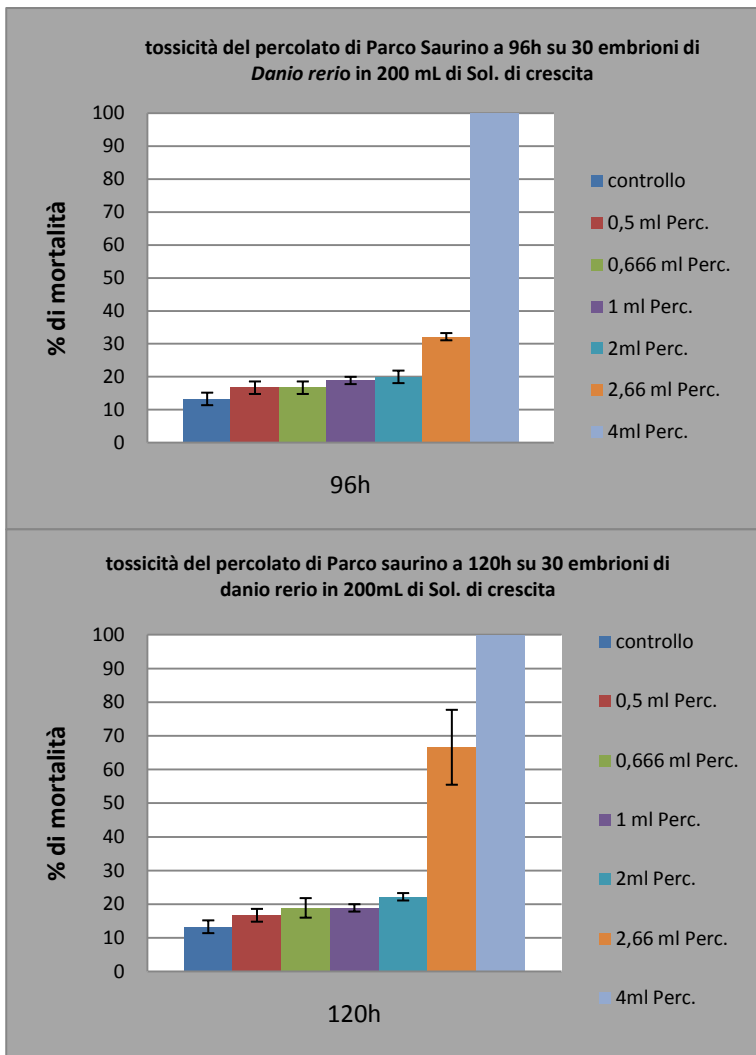
### Test X% di tossicità su 30 embrioni di *Danio rerio*

TABELLA 2: tasso di mortalità in Xmedio % con diluizioni di percolato di Parco Saurino(Giugno)

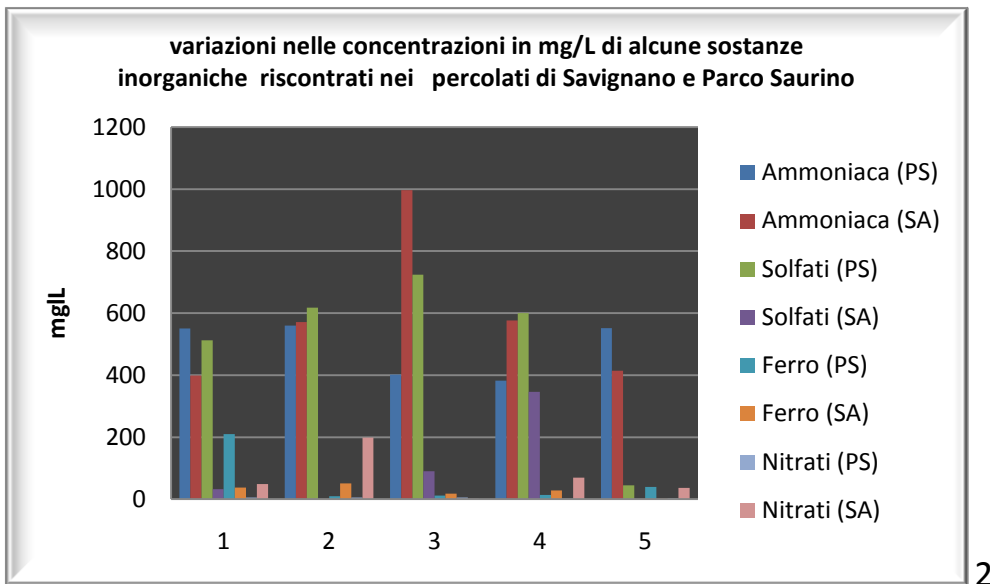
Xmedia% ±DS	[1/400] 0,5 mL	[1/300] 0,666 mL	[1/200] 1 mL Perc.	[1/100] 2mL	[1/75] 2,66 mL Perc.	[1/50] 4mL Perc.
controllo 13 ±1,9	Perc.					
24h	16±3	17±2	17±2	18±1	23±2	23±5
48h	13±2	16±3	17±2	17±2	18±1	23±1
72h	13±2	17±2	17±2	17±2	20±2	27±3
96h	13±2	17±2	17±2	19±2	20±2	32±1
120h	13±2	17±2	19±3	19±3	22±1	67±17







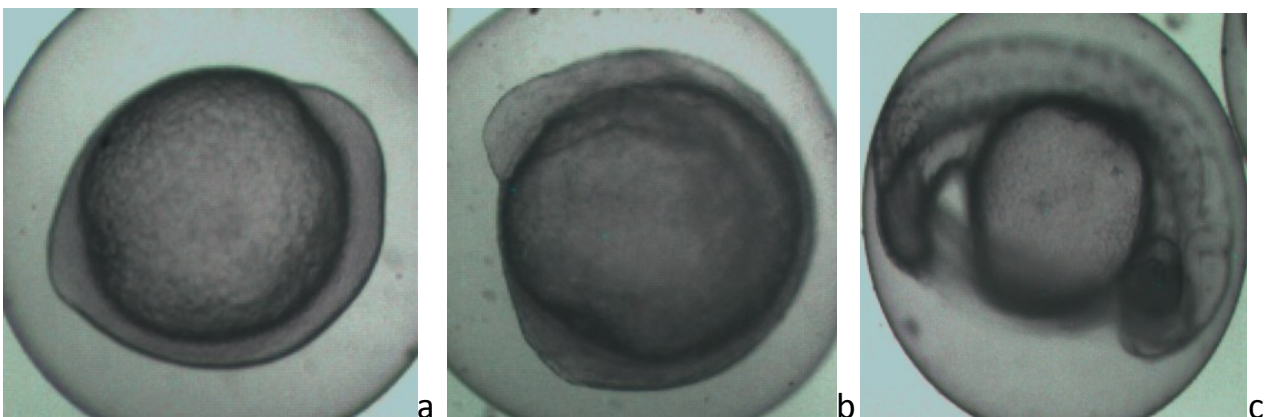
Nell'analisi stereoscopica degli embrioni già nelle soluzioni contenenti 2mL[1/100] di percolato si è registrato nelle 24h un forte **ritardo nello sviluppo embrionale**, e dalle immagini acquisite (a,b, controllo c) emerge un blocco dello sviluppo nella definizione dei somiti. A volumi minori di percolato (1mL) viene meno tale blocco nello sviluppo.



2

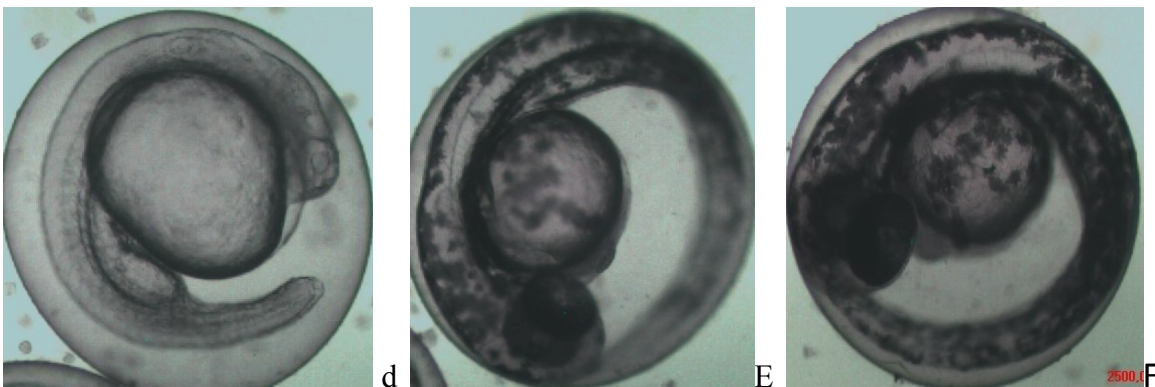
In questo grafico (2) vengono riportate le concentrazioni espresse in mg/L di Ammoniac, Solfati, Ferro, Nitrati sostanze presenti sia nel percolato di Parco Saurino e sia di Savignano, mediamente in quantità maggiori rispetto ad altre sostanze inorganiche, e messi a confronto. Registriamo pertanto il maggior potenziale tossicologico di Savignano rispetto a Parco Saurino, quest'ultimo con effetti sub-letali evidenti che lasciano ulteriori interrogazioni sulle cause di queste alterazioni nell'espressione della programmazione genica.

*Embrioni a 24h in fase di sviluppo nella soluzione di crescita(200mL) contenente 2ml di percolato di Parco Saurino (a) e(b); (c) il controllo .*



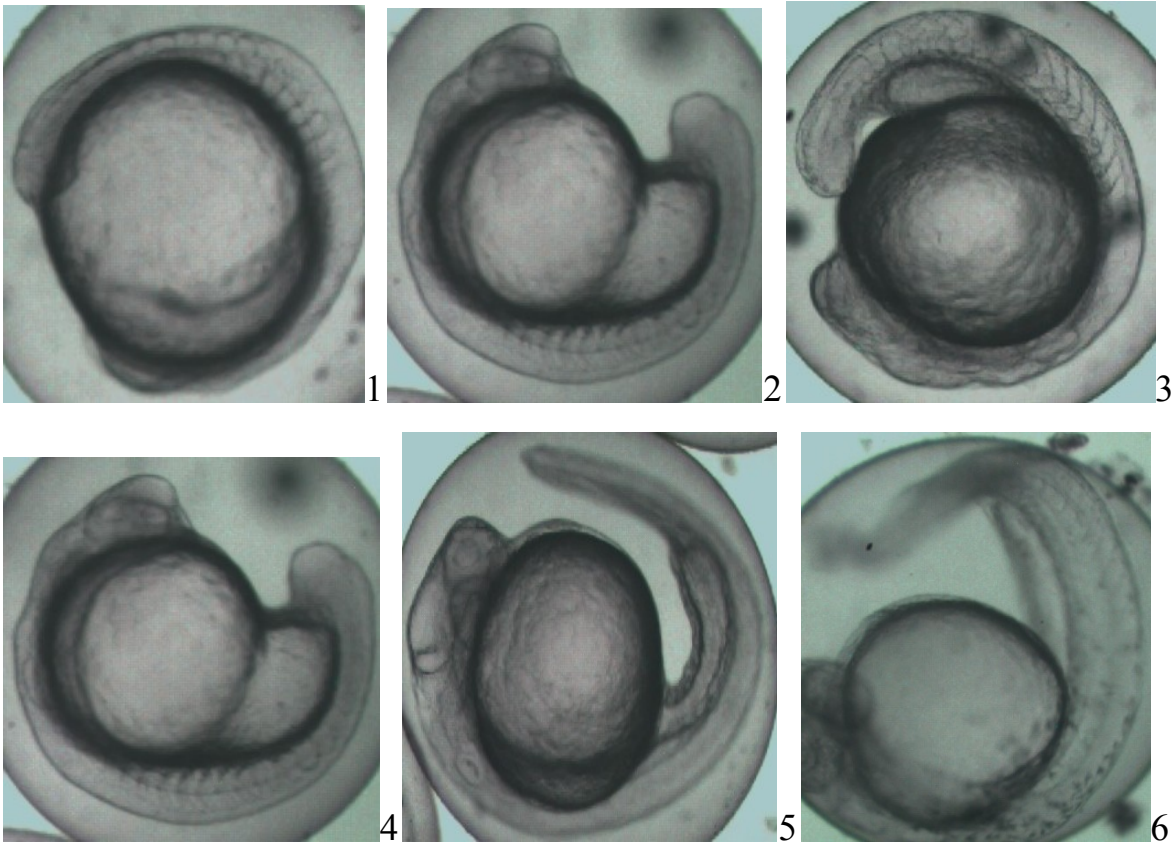
*In queste due immagini( a, b), rilevate a 24 ore dalla fecondazione, è evidente che si assiste ad un blocco nello sviluppo embrionale, presumibilmente a cavallo degli stadi **Bade stage**(10h) e nelle fase iniziali della formazione dei somiti (10,7h), osservazioni che risultano evidenti dal controllo (c). A volumi minori lo sviluppo appare normale, mentre a 48h del campione trattato con 2 ml di percolato(d) persiste un rallentamento nello sviluppo.*

*In d campione con 2mL di Percolato [1/100]48h, in E 1mL di Perc.[1/200] 48h notasi lo sviluppo rispetto al controllo(F)*



A 48h dalla fecondazione in condizioni normali dovrebbe avvenire la fine della organogenesi ed il raddrizzamento del bottone caudale nella regione caudale. In d si nota la completa assenza di pigmentazione a 48h rispetto al controllo (F). In 1,2,3,4 e 5 si riportano embrioni a 24h. E' evidente il blocco dello sviluppo nella **fase di formazione dei somiti (1)**, con volumi di percolato usati di 4mL tali da determinare un tasso di mortalità elevato nelle 72h di osservazione.





Nella figura 1 e 3, dopo le 24h, sono indistinguibili gli **abbozzi** delle vescicole ottiche ed i placodi ottici che dovrebbero formarsi in coincidenza con lo stadio a 15 somiti.

1 CONTROLLO A 24h d

2

3

Nell'analisi stereoscopica degli embrioni in soluzione di crescita con 2mL [1/100] di percolato di Parco Saurino si è registrato nelle 24h un forte **ritardo nello sviluppo embrionale**(2 e 3) rispetto al controllo (1), osservazione al M.O..

**Bud stage**

4

*Blocco dello sviluppo in 2 e 3 che possiamo ritenere vicino alla stadio (4) a cavallo tra la fase **Bude stage**(10h) e l'inizio della formazione dei somiti (10,7h),*

### 4.2b Percolato della discarica di Serre.

Valutazioni diverse si debbono fare per i campioni provenienti dalla discarica di Macchia Soprana(Serre), ultima discarica ad essere studiata, unico sito di confinamento dei rifiuti in Campania nella fase più grave dell'emergenza del 2006 . Dalle analisi chimiche del percolato proveniente dal sito di Macchia Soprana (Serre), riportate su appositi grafici esposti nella prima parte di questo lavoro, è evidente il maggior carico inquinante contenuto in questo campione. In tal caso anche la variabile climatica non ha apportato diluizione del percolato tenendo conto che il prelievo dalla discarica dei campioni saggiati risale al mese di Aprile 2008, evidenziando la pericolosità in termini quantitativi del confinamento in discarica di un rifiuto prevalentemente indifferenziato, come appunto è quello campano. Dai grafici di tossicità ottenuti (graf.1) si evince che ulteriori diluizioni del campione di questo percolato nella soluzione di crescita, non determinano una caduta in % della mortalità rispetto agli altri campioni di Savignano e Parco Saurino, mostrando un potenziale inquinante maggiore. Di seguito si riportano i dati sperimentali ottenuti testando la tossicità del percolato di Serre su 30 embrioni posti in 200mL di soluzione di crescita, perciò un'analisi della tossicità in funzione del tempo di volumi crescenti di percolato rispetto al controllo costituito dalla sola soluzione di crescita:

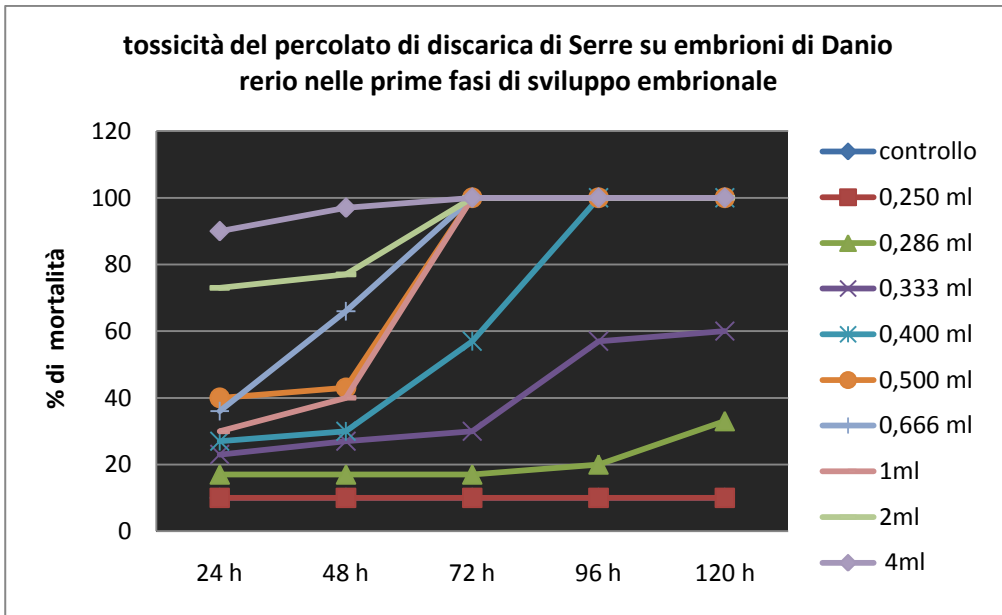
I Esperimento						
Tossicità di 30 embrioni in 200mL di soluzione di crescita contenente X mL di percolato						
	24h	48h	72h	96h	120h	V'/V
controllo	2	2	2	2	2	
0,250 mL	3	3	3	3	3	1/800
0,286 mL	5	5	5	7	23	1/700
0,333 mL	10	10	14	30	30	1/600
0,400 mL	8	8	17	30	30	1/500
0,500 mL	13	13	30	30	30	1/400
0,666 mL	10	30	30	30	30	1/300
1mL	9	9	30	30	30	1/200
2mL	22	24	30	30	30	1/100
4mL	27	30	30	30	30	1/050

II Esperimento . mortalità embrioni di <i>Danio rerio</i>						
	24h	48h	72h	96h	120h	V'/V
controllo	3	3	3	3	3	
0,250 mL	3	3	3	3	3	1/800
0,286 mL	6	6	6	6	7	1/700
0,333 mL	6	6	6	7	10	1/600
0,400 mL	9	10	17	30	30	1/500
0,500 mL	13	13	30	30	30	1/400
0,666 mL	10	15	30	30	30	1/300
1mL	9	15	30	30	30	1/200
2mL	22	24	30	30	30	1/100
4mL	28	29	30	30	30	1/050

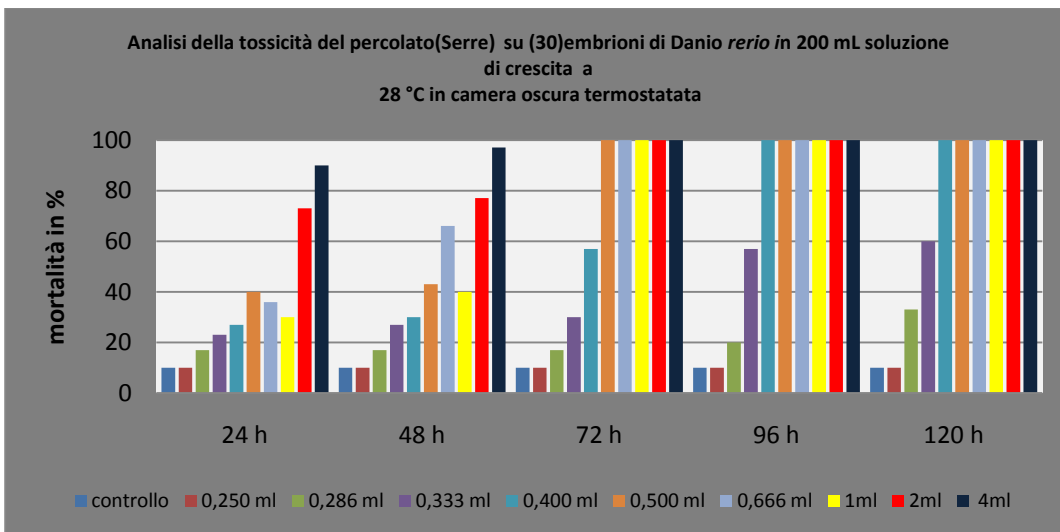
III						
Esperimento	24h	48h	72h	96h	120h	V'/V
controllo	4	4	4	4	4	200mL
0,250 mL	4	4	4	4	4	1/800
0,286 mL	4	4	4	6	9	1/700
0,333 mL	6	7	7	15	15	1/600
0,400 mL	8	9	17	30	30	1/500
0,500 mL	9	13	30	30	30	1/400
0,666 mL	13	15	30	30	30	1/300
1mL	10	13	30	30	30	1/200
2mL	19	22	30	30	30	1/100
4mL	27	27	30	30	30	1/050

ore	controllo	0,250 mL	0,286 mL	0,333 mL	0,400 mL	0,500 mL	0,666 mL	1mL	2mL	4mL
<b>24</b>	10 ±3	10 ±3	17 ±3	23 ±7	27 ±3	40 ±3	36 ±3	30 ±3	73 ±7	90 ±3
<b>48</b>	10 ±3	10 ±3	17 ±3	27 ±7	30 ±3	43 ±3	66 ±16	40 ±7	77 ±3	97 ±3
<b>72</b>	10 ±3	10 ±3	17 ±3	30 ±7	57 ±3	100 ±3	100 ±3	100 ±3	100 ±3	100 ±3
<b>96</b>	10 ±3	10 ±3	20 ±3	57 ±23	100 ±3	100 ±3	100 ±3	100 ±3	100 ±3	100 ±3
<b>120</b>	10 ±3	10 ±3	33 ±16	60 ±20	100 ±3	100 ±3	100 ±3	100 ±3	100 ±3	100 ±3
<b>Xmedio</b>	<b>1/800</b>	<b>1/700</b>	<b>1/600</b>	<b>1/500</b>	<b>1/400</b>	<b>1/300</b>	<b>1/300</b>	<b>1/200</b>	<b>1/100</b>	<b>1/050</b>

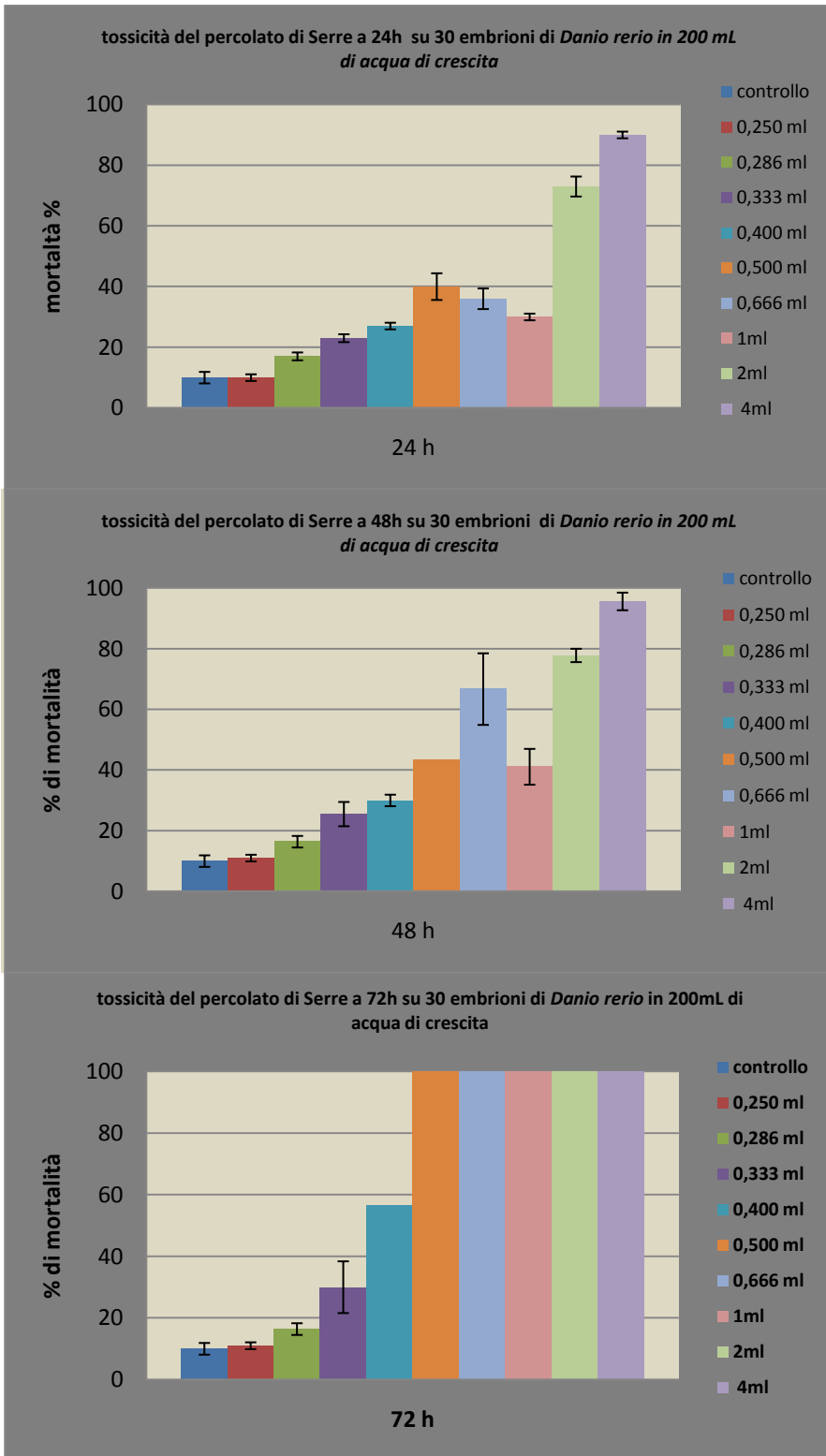
%		mortalità ± DS									
		controllo	0,250 mL	0,286 mL	0,333 mL	0,400 mL	0,500 mL	0,666 mL	1mL	2mL	4mL
<b>24 h</b>		10±2	11±1	16±2	28±1	28±1	39±4	37±3	31±1	70±3	91±1
<b>48 h</b>		10±2	11±1	16±2	26±4	30±2	43	67±12	41±6	78±2	96±3
<b>72 h</b>		10±2	11±1	16±2	30±8	57	100	100	100	100	100
<b>96 h</b>		10±2	11±1	21±1	58±22	100	100	100	100	100	100
<b>120 h</b>		10±2	11±1	43±17	61±20	100	100	100	100	100	100

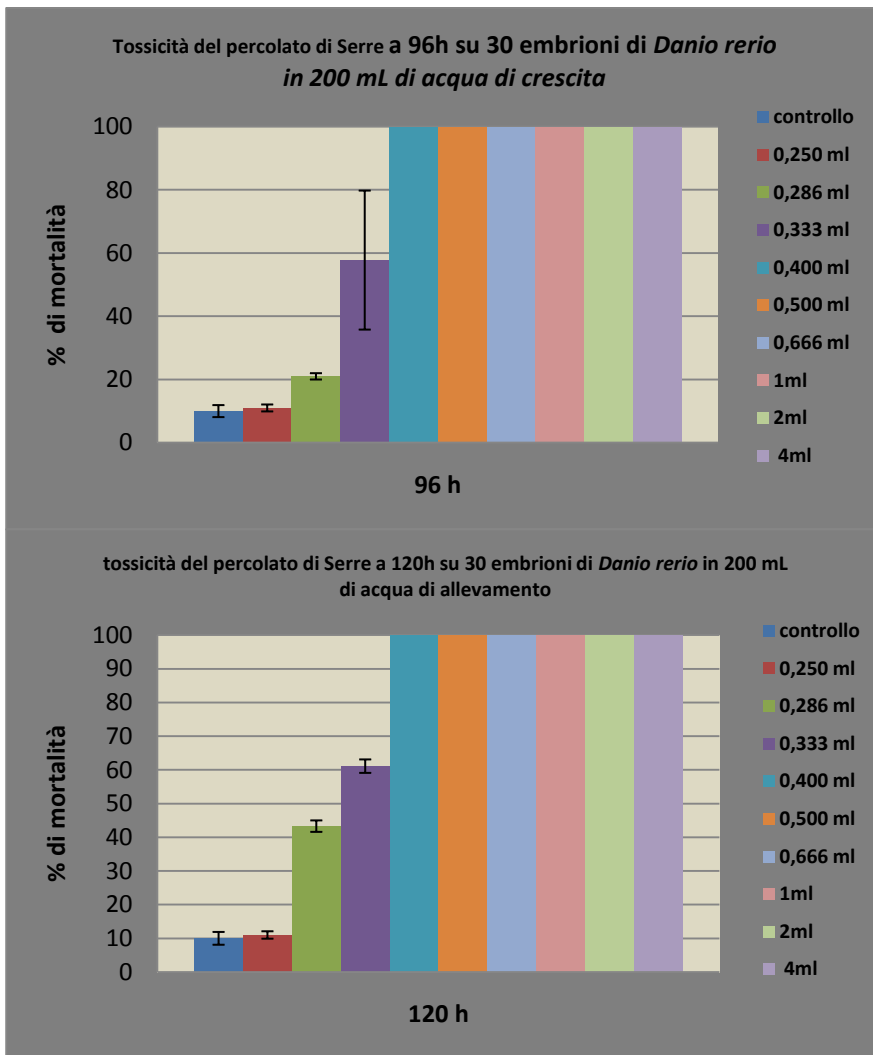


(graf1, graf2) Andamento della tossicità in funzione del tempo su embrioni di *Danio rerio* (30 embrioni per campione) in soluzione di crescita trattati con volumi crescenti di percolato



GRAF.2

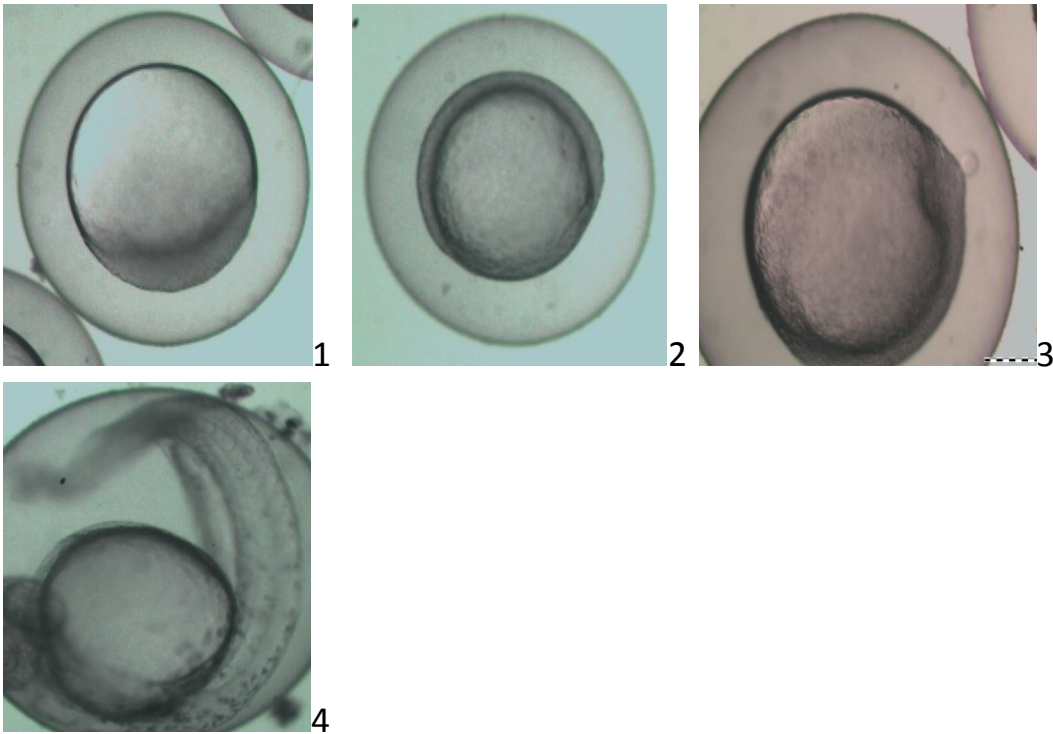




Analisi dei dati (DS) e andamento della tossicità *in funzione del tempo* su 30 embrioni di *Danio rerio* (sia per il controllo e sia per i vari campioni) nei vari campioni contenenti soluzione di crescita e volumi noti di mL di percolato. E' evidente l'elevata tossicità del percolato in funzione del tempo e della dose utilizzata. Soltanto il campione contenente 250 microlitri di percolato presenta un andamento in % della mortalità in linea con il controllo. Gli effetti sub-letali quali le alterazioni nello sviluppo e nel fenotipo sono particolarmente osservabili a volumi di percolato compresi tra i 333 e 286 microlitri di percolato.

I dati tossicologici, riportati nella tabella 5 e nei grafici a seguire, evidenziano da subito la tossicità espressa in termini % di mortalità anche con volumi di percolato minori ai 0,400mL, indicando una maggiore tossicità del percolato proveniente dalla discarica di Serre e la pericolosità di tale inquinante se dovesse essere accidentalmente immesso nell'ambiente. Il 'picco' massimo della mortalità si registra già a 24h, nello specifico nel campione 1/50 (4ml di campione in 200ml di soluzione), a 72h oltre la metà dei campioni raggiungono il 100% della mortalità.

Le eventuali alterazioni morfologiche nello sviluppo embrionale di *Danio rerio*, in seguito ad esposizione da percolato, sono state studiate sia con uno stereoscopio e sia con un microscopio ottico munito di microcamera. In particolare si è indagato per valutare la corretta manifestazione di alcune caratteristiche morfologiche in vivo quali la pigmentazione, la motilità, l'epibolia, la formazione dei somiti e la definizione degli assi corporei. Il corion rappresenta una barriera fisica che mitiga certamente l'azione degli inquinanti, una barriera che separa l'embrione dall'ambiente esterno. Nelle osservazioni sperimentali si è altresì registrato un allungamento nei tempi di schiusa degli avanotti nei vari campioni contenenti volumi noti di percolato di Serre, evento quello della schiusa ritardato in vari casi anche oltre le 96h. Il sacco vitellino inizialmente dovrebbe avere un volume irregolare ben evidente, dopo le 24 h tende a ridursi progressivamente per assorbimento delle sostanze nutritive, anche questa fase verrà influenzata negativamente dall'azione del percolato. *La pigmentazione che normalmente compare dopo le 24h diventa irregolare nei campioni contenenti concentrazioni significative di percolato.* Di seguito vengono riportate alcune immagini dello sviluppo embrionale di zebrafish in condizioni normali, in questo caso relativi ad un controllo (fig. 1; 2; 3; 4;), fasi che risulteranno essere utili per identificare alterazioni morfologiche negli embrioni causate dall'azione embriotossicologica del percolato di Serre.



*Alcune fasi dello sviluppo di un embrione di zebrafish:*

*Fig.1: embrione allo stadio di "Dome stage( 3,8h)" [controllo]. Fig. 2: embrione di Danio rerio allo stadio di "Shield stage"(6h) [controllo]. Fig. 3: embrione di Danio rerio oltre il 70% di epibolia.[controllo] . Fig. 4: controllo di embrione Danio rerio a 24h dalla fecondazione[controllo].*

Entrando nel vivo della fase sperimentale si possono fare delle giuste riflessioni: a volumi di percolato più elevati (tab5), a 4mL (1/50), si osserva nelle 24h un blocco dello sviluppo embrionale(figura 5a), nei primi stadi di epibolia ( shield stage), fase a poche ore dalla fecondazione. Il tasso di mortalità a 48h raggiunge il 100% dei casi osservati. Nella figura 5( a e b) si evidenzia un blocco nella tarda epibolia(oltre il 50%) nelle 24h, fase dello sviluppo embrionale caratterizzata da movimenti cellulari tipici della gastrulazione.



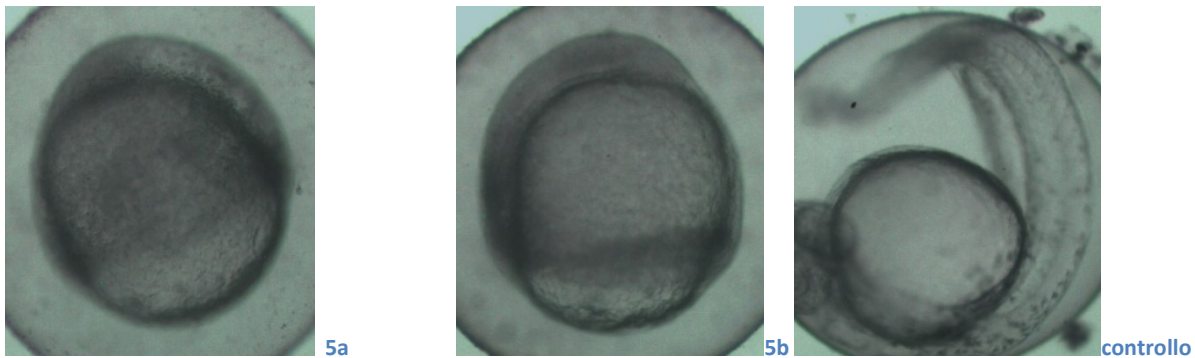
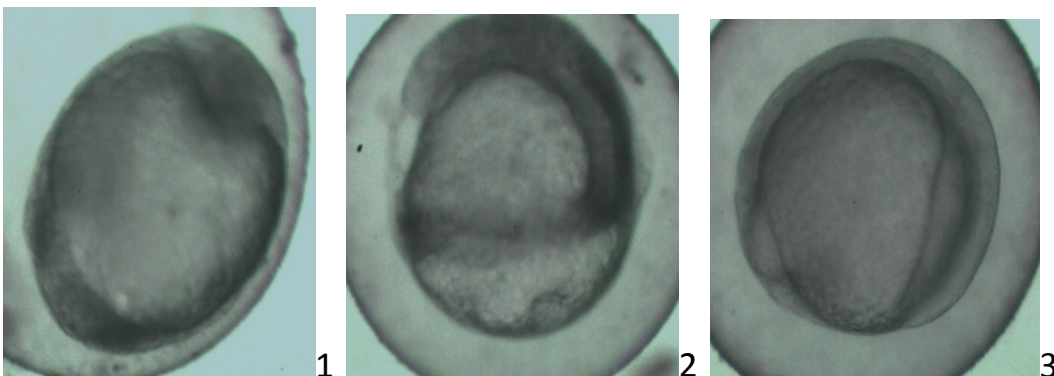


Figura 5: embrioni di *Danio rerio* in campioni contenenti 4mL di percolato[1/50] a 24h (a;b;). Evidente il blocco in fase iniziale della gastrulazione (5a; e 5b).

Nei campioni a volumi decrescenti di percolato il blocco dello sviluppo sembrerebbe traslato in stadi embrionali successivi, ed in questi casi(vedi grafico tab5) il tasso di mortalità raggiunge il suo massimo valore a 72 ore . Nei campioni con rapporto di volume [1/125], corrispondente a 1,20 mL di percolato in 200mL di soluzione H., lo sviluppo embrionale sembra bloccarsi a 10h dalla fecondazione, stadio di formazione dei somiti (fig.7). A questa diluizione si ricorda che a 48h dalla fecondazione si raggiunge il 100% della mortalità.

Figura 6: embrioni di *Danio rerio* esposti a 2,67 mL di percolato [1/75](1.,2.,3.,) a 24h. Blocco tra gastrulazione e formazione dei somiti.



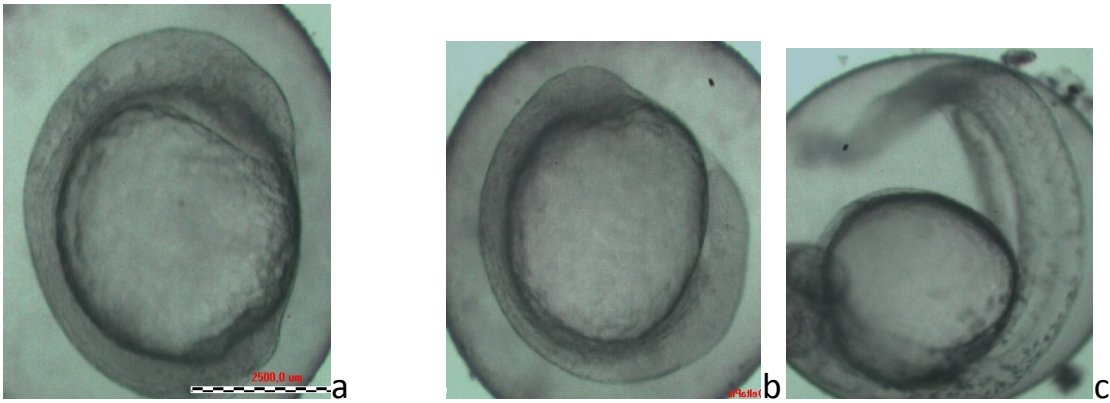


Figura 7: embrioni di *Danio rerio* in fase di sviluppo in campione di crescita contenente 1,6 mL di percolato [1/125] a 24h (a;b); c (controllo a 24h); evidente il rallentamento dello sviluppo embrionale di a e b rispetto al controllo.

Figura 8: embrioni (1,2,3,4,5,6) di *Danio rerio* esposti a 1,33 mL di percolato nella soluzione di crescita [1/150] a 24h(1,2,3,4,5,6)

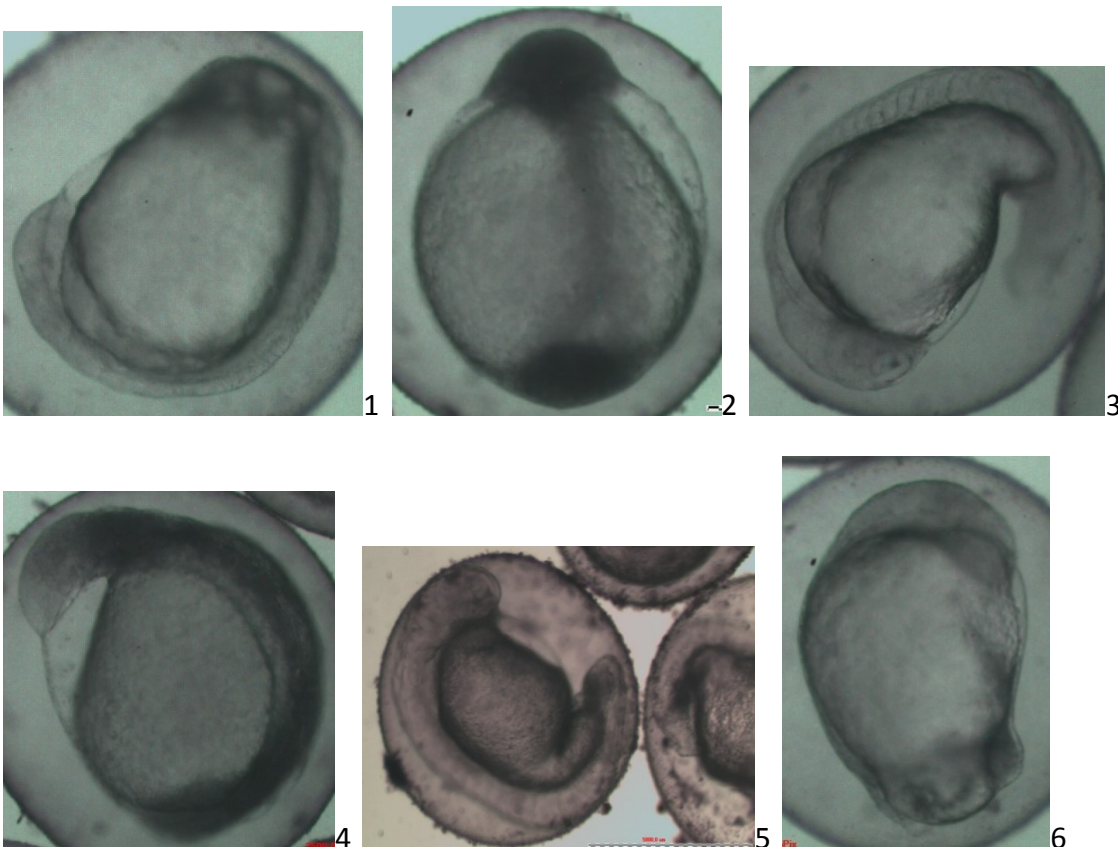
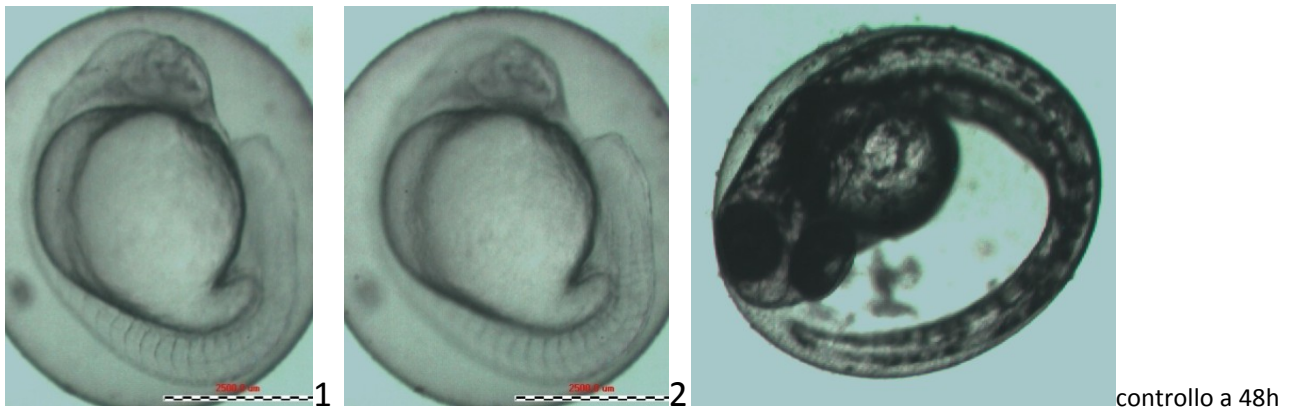
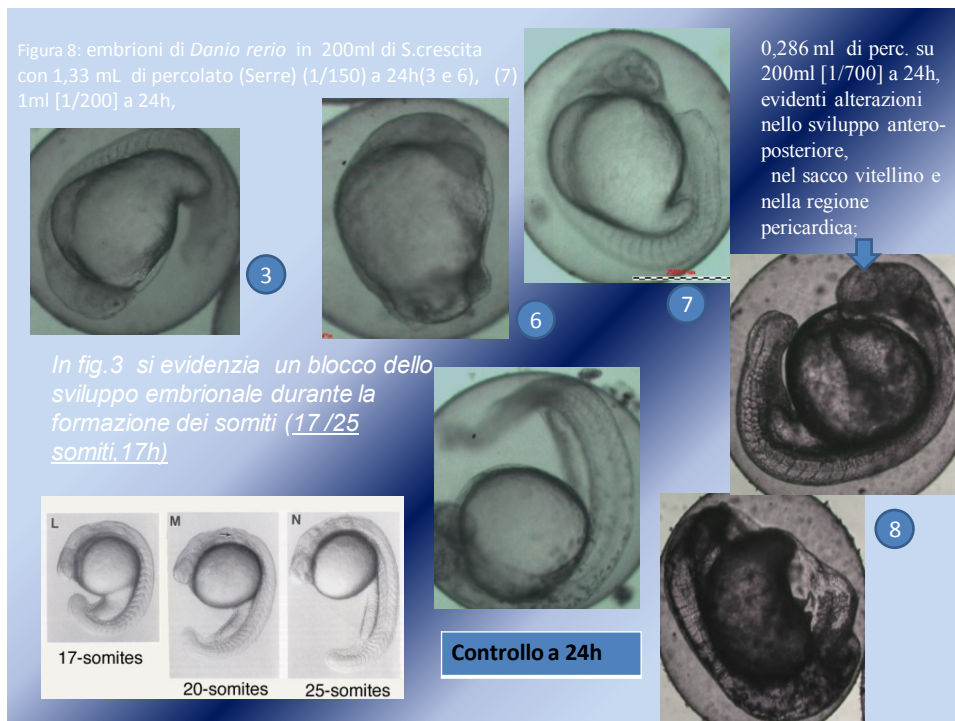


Figura 9: : embrioni di *Danio rerio* in 200mL di soluzione di crescita contenente 1 mL di percolato [1/200] a 24h ( 1) e 48h (2);



Dagli embrioni esposti a 1mL di percolato (vedi figura 9) si evidenziano: blocco dello sviluppo embrionale (1,2,) durante la formazione dei somiti, probabilmente a 17 somiti (17h), sia a 24 h che a 48h.



Agendo sulla concentrazione del percolato, cioè usando ulteriori volumi decrescenti di percolato in 200mL di soluzione di crescita, si osserva dai dati un andamento della tossicità acuta in linea con le precedenti osservazioni sperimentali, in particolare gli effetti sub-acute risultano nel manifestarsi traslati nel tempo in stadi successivi dello sviluppo. L'osservazione al microscopio di campioni con determinate concentrazioni, rapporto tra volumi  $v'/v = [1/700]$  e  $[1/600]$  corrispondenti a 0.286 ml e 0.333 ml di percolato, mostrano una certa variabilità nel manifestare varie alterazioni morfologiche e di teratogenicità. Alterazioni che interessano lo sviluppo embrionale lungo l'asse antero-posteriore, disfunzioni sostanziali e strutturali nell'apparato motore della regione della coda. Evidenti edemi nella regione pericardica e cefalica, un'alterata morfologia del sacco vitellino e anomalie nella gastrulazione e nella formazione dei somiti. Gli effetti teratogenici riscontrati richiederebbero ulteriori indagini istologiche e molecolari. Di seguito riportiamo alcune immagini su embrioni in fase di sviluppo in campioni contenenti volumi noti di percolato compresi tra 0.333mL e 0,286 mL con evidenti alterazioni morfologiche :

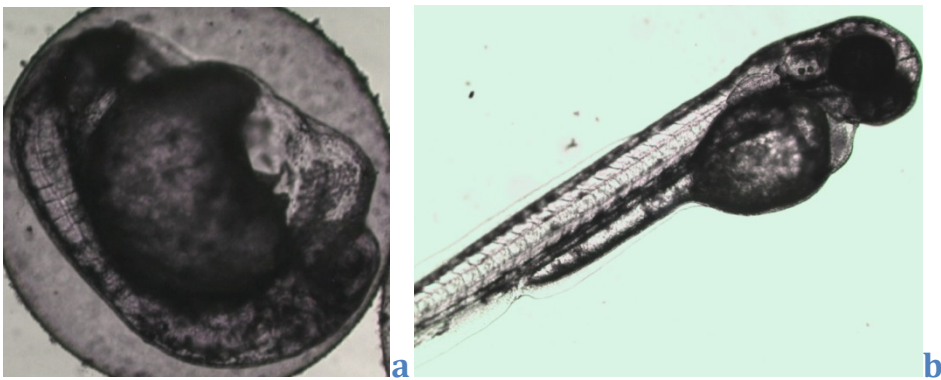
Controllo di 24h



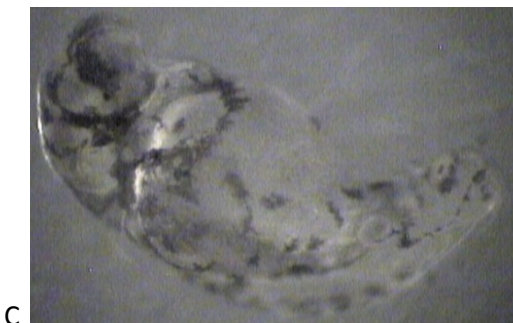


*(B)embrione in fase di sviluppo in 200mL di soluzione di crescita contenente 286  $\mu$ L di percolato [1/700] a 24h, con evidenti alterazioni nello sviluppo lungo l'asse antero-posteriore, e nella regione pericardica; in C embrione del campione[1/700]a 30h.*

A seguire (a,c) si evidenziano embrioni a 72h dalla fecondazione del campione a 0,286mL [1/700] con alterazioni generalizzate, in particolare nella regione caudale, nella regione pericardica e con edemi estesi. Di seguito il controllo negativo a 72h, fotografato con il microscopio ottico.



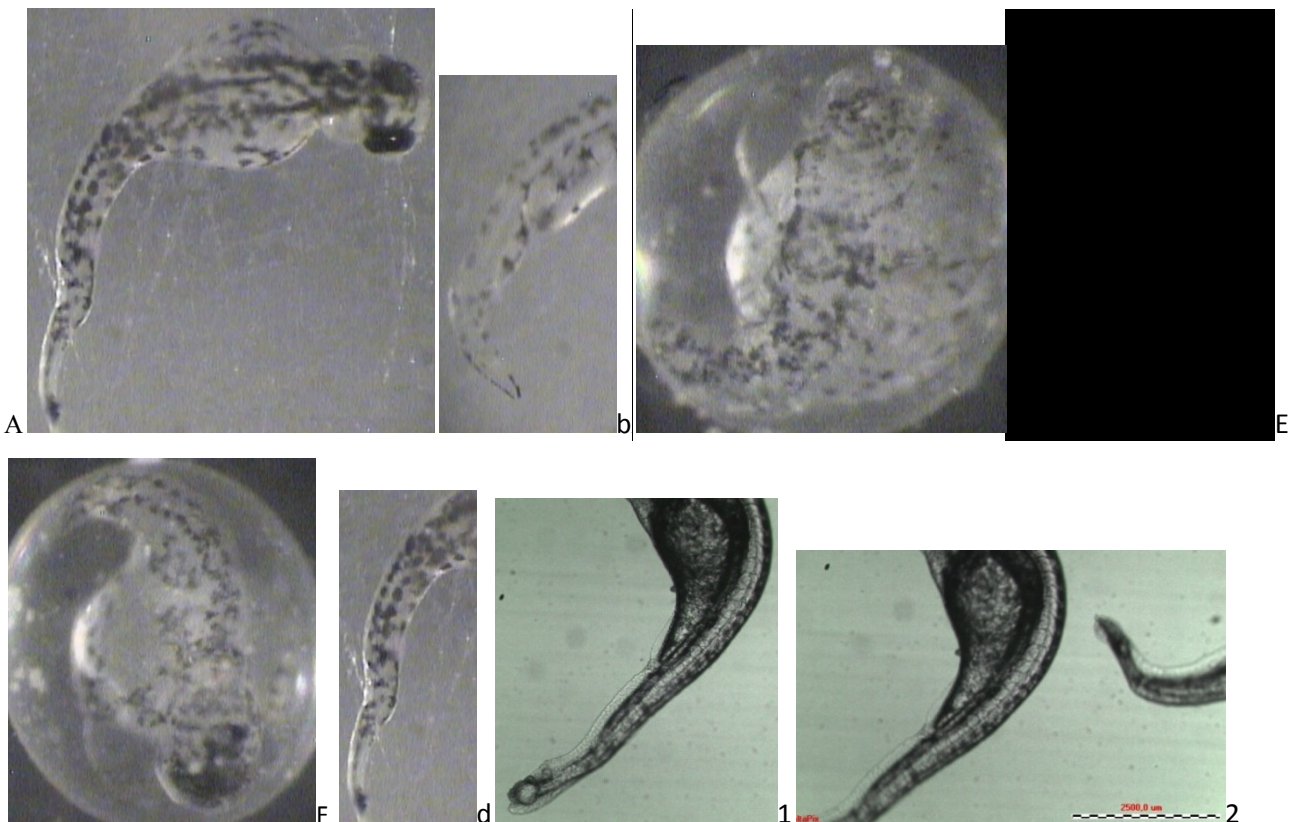
*In a Embrione in fase di sviluppo nel campione contenente 0,286 mL [1/700] a 48h, in c embrione oltre le 72h privo di coda (sotto), in b embrione normale del controllo a 72h.*



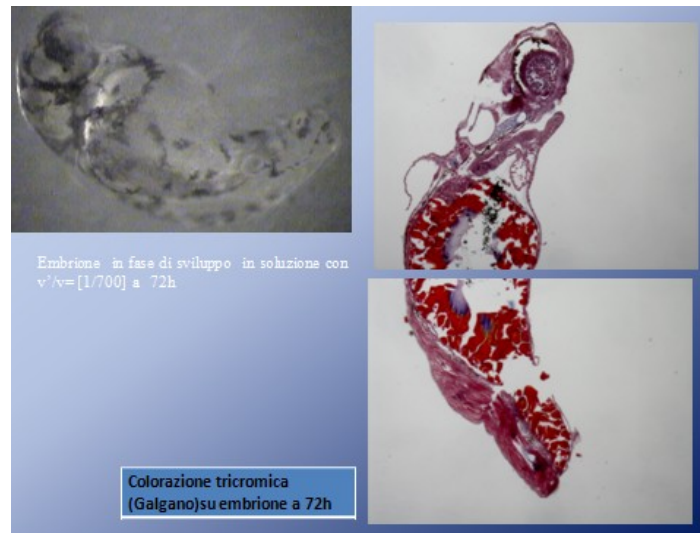
C

Da varie osservazioni svolte in vivo è emersa un elevata frequenza di alterazioni all'apparato motore, con funzionalità compromessa visto che gli avanotti non erano dotati di movimenti direzionali ma dei soli rotazionali. L'assenza di contrazioni anche dopo stimolazione meccanica a 48h lancia serie ipotesi di anomalie nella funzionalità motoria dovute ad alterazioni nell'innervazione e nella differenziazione dei miotomi. Ipotesi avvalorate anche dal normale assorbimento del sacco vitellino in questi fenotipi, l'unico caso in cui si sarebbe potuto ascrivere il mancato raddrizzamento del bottone caudale nella regione caudale.

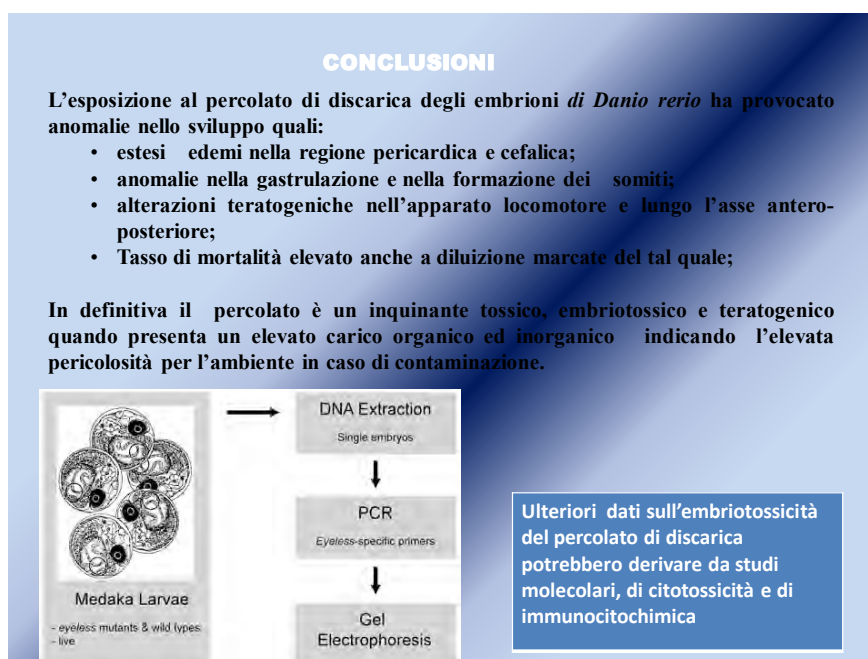
*Immagini di embrioni a 72h trattati con volumi di percolato tra 0,333ml e 0,286 ml.*



*In queste immagini si evidenziano embrioni in 200mL di soluzione di crescita contenenti 0,333mL e 0,286mL di percolato. Fenotipi caratterizzati da anomalie nella regione caudale, in alcuni è assente il raddrizzamento della coda, in altri gli effetti teratogenici della coda(a,b,d), estesi edemi pericardici (E,F).*



Dall'analisi chimica dei percolati emergono concentrazioni medie elevate quali l'ammoniaca, i solfati, i nitrati, il ferro e lo zinco, pertanto vista la tossicità del percolato potrebbe essere interessante capire, anche in virtù delle osservazioni svolte in precedenza, un loro ruolo attivo nonostante la complessità della miscela di sostanze che costituiscono il percolato di discarica. L'analisi molecolare rivolta a studiare l'influenza della tossicità del percolato sul sistema endocrino è un ulteriore passo per capire gli effetti embriotossicologici dell'inquinante ed infine possiamo affermare che gli embrioni di *Danio rerio* rappresentano un valido modello per questi tipi di studi.



## BIBLIOGRAFIA

### **BIOSTATISTICS A FOUNDATION FOR ANALYSIS IN THE HEALT SCIENSES –EDISES,**

Wayne W. Daniel

### **BRUCE ALBERTS**

BIOCHIMICA MOLECOLARE DELLA CELLULA, ZANICHELLI 2006

### **BLOOM &. FAWCETT**

TRATTATO DI ISTOLOGIA, MCGRAW-HILL 1996

### **E. BONUCCI**

MANUALE DI ISTOCHIMICA, EDI-LOMBARDO 1990

### **ELAINE N. MARIEB**

ANATOMIA E FISIOLOGIA DELL'UOMO, ZANICHELLI 2001

### **Frank S.**

La sistematica dei pesci. Il grande libro degli acquari. Ed. Rizzoli, Milano: 63-203, 1982.

### **John R. Taylor**

INTRODUZIONE ALL'ANALISI DEGLI ERRORI, , Zanichelli

### **JEFFRY B. KERR Phd**

ATLANTE DI ISTOLOGIA FUNZIONALE, casa editrice Ambrosiana 2005

### **LIEM ET ALL**

ANATOMIA COMPARATA DEI VERTEBRATI, EdISES 2002

### **M.T. MADIGAN, J.M. MARTINO, J. PARKER,**

BROCK, BIOLOGIA DEI MICRORGANISMI, Vol2,CASA EDITRICE AMBROSIANA 2007

### **Abdelilaever S., Solnica-Krezel L., Stainier DY, Driever W.**

'Implications for dorsoventral axis determination from the zebrafish mutation janus'. Nature, 1994 Aug 11;370(6489):468-71.



**ANDREOTTOLA G., RAFFAELLI A., RAGAZZI M., (1996).**

‘Mathematical model for assessment of leachate production *Proceedings sardinia*’ 97, *Sixth International Landfill Symposium*.

**COSSU R., de FRAJA FRANGIPANE,(1995)**

Scarico Controllato di RSU. C.I.P.A. s.r.l.

**Q.F. HUANG, Q. WANG, Y. YANG, L. DONG, (2005).**

Influence of landfill structure on leachate characteristics. *Proceedings Sardinia*’ 2005, Tenth International Waste Management and Landfill Symposium

**Dutta, S.P.S.**

‘Food and feeling habitus of *Brachidanio rerio*(Ham.Buch.) inhabiting Gadigarh Stream, Jammu.’ *Biol.*, 5(2):165-168,1993.

**Eaton F., Farley R.D.**

‘Growth and the reduction of depensation of zebrafish, *Brachidanio rerio*, reared in the laboratory’ 1074 *Copria* 1:204-209.

**Ferreri F.**

‘Contributi alla morfogenesi dei Teleostei in condizioni sperimentali: aspetti di base ed applicazioni in acquacoltura’. PhD in Citodifferenziamento e Morfogenesi Università dell’Aquila.

**FISH EMBRYO TOXICITY ASSAYS** (UBA Contract Number 203 85 422) March 30, 2006  
Thomas Braunbeck & Eva Lammer, GERMAN FEDERAL ENVIRONMENT AGENCY,

**GURDON JB, LEMAIRE P & KATO K (1993)**

‘Community effects and related phenomena in development’ *Cell* 75, 831-834

**Hamilton F., Buchanan F.**

An account of the fishes found in the River Ganges and its branches. Pp 321,390,405. Edimburgo e Londra: Archibald Constable and Co., 1822.

**Hisaoka K. K. Firlit C. F.**

Further studies on th embryonic development of the zebrafish, *Brachidanio rerio*. *J. Morphol.* 107:205-225, 1960.

**Nagel R.,**

Egg production and spawning cycle of zebrafish, *Brachidanio rerio*. J Appl. Ichthyol. 2(4):173-

**PAWSON T & NASH P (2000)**

‘Protein-protein interactions define specificity in signal transduction’. Genes Dev. 14, 1027-1047

**Regoli F.**

“ Monitoraggio della contaminazione chimica:eco tossicologia e biomarkers” In Danovaro R.(Ed), recupero Ambientale. Tecnologie, Bioremediation e Biotecnologie.(2002).UTET, Torino pp. 188-233.

**RELAZIONE SULLO STATO DELL’AMBIENTE IN CAMPANIA 2009 (2009)**

ISBN: 978-88-96122-07-5

**R. BIQUILLON, M. ROBUSTELLI, M. POITRENSUD, B. EFREMENKO,(2005).**

‘Characterisation and treatment of composting leachate. Proceedings Sardinia’ 2005, Tenth International Waste Management and Landfill Symposium.