

8020. Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*

1. Materiali e strumentazione per il saggio

I materiali si riducono di fatto ad una serie di recipienti aventi un volume utile di 50 mL. Per la valutazione della tossicità di sostanze volatili i recipienti devono poter essere ermeticamente chiusi. Come ogni altro oggetto destinato ad entrare in contatto con l'acqua di allevamento o con i campioni da saggiare, non devono dar luogo a processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio. A questo fine vengono utilizzati recipienti in vetro borosilicato o in plastiche fluorurate.

Durante il saggio non è infrequente che alcuni animali si portino in superficie e, per ragioni di tensione superficiale o di adesione di bollicine d'aria alle strutture corporee, non possono ridiscendere nel liquido sottostante. Se l'inconveniente dovesse porsi con sistematicità, si potrà fare ricorso a reticelle in teflon di circa 1 mm di maglia mantenute sommerse a qualche mm sotto il pelo del liquido mediante un anello in teflon o altra struttura della forma interna dei recipienti usati per la prova.

Le soluzioni poste in questi recipienti devono essere mantenute a temperatura costante (20°C) e, a tal fine, può essere utilizzato un bagno termostatico o altra soluzione idonea (camera termostatica) che consenta il mantenimento della temperatura dei liquidi in esame nell'ambito di 20±1°C.

Il saggio viene eseguito in condizioni alterne di luce (16 ore) e di buio (8 ore) e, a tal fine, occorre disporre di una camera oscurabile e di un sistema di lampade fluorescenti (resa cromatica ≥ 90) che dia una illuminazione attenuata (circa 300 lux) al piano di lavoro. È opportuno che il sistema sia fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.

Oltre a questi materiali, l'esecuzione del saggio richiede la disponibilità della normale apparecchiatura di laboratorio. Richiede inoltre un misuratore di ossigeno disciolto il cui sensore abbia dimensioni tali da permettere il rilevamento nei contenitori utilizzati per il saggio.

2. Reagenti e acqua di diluizione

La preparazione delle soluzioni e la diluizione vengono effettuate con acqua che deve rispondere alle seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5; alcalinità 110-120 mg CaCO₃/L e durezza 140-160 mg CaCO₃/L. Per prepararla aggiungere a un litro di acqua deionizzata o distillata passata su colonna di carbone nell'ordine: 10 mg di KCl, 192 mg di NaHCO₃, 53 mg di MgSO₄ e 183 mg di CaSO₄·2H₂O. Questa soluzione deve essere aerata per 24 ore prima del suo impiego, alla temperatura di 20°C, con aria compressa priva di contaminanti.

3. Organismi per il saggio

L'organismo utilizzato per il saggio è il crostaceo cladocero della specie *Daphnia magna* Straus, che può essere ottenuto da laboratori di idrobiologia o di tossicologia acquatica. Per i saggi vengono utilizzati i neonati di età inferiore alle 24 ore. A questo scopo, prima dell'allestimento del saggio viene individuato nelle vasche di allevamento e isolato in acqua di diluizione, un numero adeguato di femmine adulte (4-5 mm di lunghezza corporea) prossime al parto, riconoscibili per il colore aranciato delle uova presenti nella camera di incubazione. Sono da scartare colture in riproduzione sessuata con elevata mortalità, bassa nata-

lità o con altri sintomi evidenti di condizioni colturali non adeguate. Queste femmine, quando rispondono ai suddetti requisiti di idoneità, potranno deporre un numero di neonati ciascuna, generalmente compreso tra 20 e 50.

METODO A - Valutazione della EC₅₀

- a) La soluzione del prodotto da esaminare va preparata utilizzando come solvente l'acqua standard debitamente aerata. Ai fini di una corretta conduzione del saggio è consigliabile acquisire alcune informazioni essenziali sui prodotti in esame, quali la solubilità in acqua e la tensione di vapore. Nel caso di tossici poco solubili sono da privilegiare i metodi di dispersione meccanica rispetto all'impiego di sostanze solubilizzanti. Qualora l'impiego di queste ultime si renda necessario, sono da utilizzare quelle a minore tossicità per la *daphnia*. In ogni caso nella valutazione dei risultati va tenuto conto che questi possono essere dovuti all'azione combinata della sostanza in esame e dell'agente solubilizzante.
- b) Per la valutazione della EC₅₀ di effluenti occorre disporre di un volume di almeno 1 L di campione. Se la prova viene allestita entro 6 ore, il campione non va refrigerato a 4 °C, necessità che invece si pone se la prova viene effettuata entro 48 ore dal prelievo. Si consiglia tuttavia, l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di entità non prevedibile.
- c) Il prodotto o l'effluente in esame vengono saggiati in un primo momento con una prova preliminare e successivamente con una prova definitiva. La prova preliminare si effettua operando con 5 diverse concentrazioni o diluizioni e una sola replica per ciascuna di esse. Il numero di contenitori necessario in questo caso è quindi sei, di cui uno di controllo con il solo liquido diluente. Queste concentrazioni di prodotto in esame o diluizioni di effluente vengono scelte in progressione geometrica. Nel caso di effetti tossici del tutto ignoti, si può procedere secondo un fattore 10 e la serie delle 5 concentrazioni o diluizioni può essere indicativamente la seguente: 0,01 mg/L; 0,1 mg/L; 1 mg/L; 10 mg/L; 100 mg/L di prodotto o % (v/v) di effluente.
- d) Individuato l'ambito di tossicità, viene allestita la prova definitiva effettuata con quattro repliche e secondo una serie ad intervalli meno ampi (ad esempio 0,1-0,4-0,8-1,6). Il numero di contenitori necessari in questo caso è 24, di cui 20 verranno usati per saggiare in quadruplo le 5 concentrazioni o diluizioni e 4 per la prova di controllo con la sola acqua di diluizione. Nel caso di tossici volatili dovranno essere usati contenitori a chiusura ermetica e completamente riempiti. Il volume di questi recipienti deve essere tale che l'ossigeno disciolto al termine della prova non risulti inferiore a 2 mg/L.
- e) In tutti i casi in cui sia possibile, è consigliato il controllo analitico delle concentrazioni del tossico in esame. Se lo scostamento tra la concentrazione misurata e quella nominale è superiore al 20%, i risultati del saggio dovranno essere basati sulla concentrazione misurata.
- f) In ogni contenitore vengono trasferiti 50 mL della soluzione in esame.
- g) In ciascuno dei 24 recipienti vengono quindi trasferiti 5 neonati di *daphnia*. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta in vetro dal diametro interno di circa 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua aspirato con le *daphniae* al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è opportuno che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le *daphniae* pipettate nei diversi recipienti fino a raggiungere il numero di 5, anziché completare un recipiente per poi passare al successivo.
- h) A trasferimento avvenuto si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare il fotoperiodo al quale gli animali sono stati allevati.
- i) Durante questo periodo agli animali non viene somministrata alcuna alimentazione.
- l) Al termine del saggio e, se necessario con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.

- m) Se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%, il saggio va ripetuto.
- n) Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione dell'ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2 mg/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.
- o) Con i dati raccolti nella prova a 24 ore può essere calcolata la $24hEC_{50}$ (in mg/L oppure in % di diluizione) e i rispettivi limiti fiduciali. La condizione necessaria per questi calcoli è che vi siano almeno due casi di parziale immobilizzazione (diversi cioè da 0 e 100%) e prossimi, possibilmente, al 50%. Se questa condizione non è raggiunta si può fare ricorso ad altri metodi di calcolo oppure si può ripetere la prova operando in un ambito più idoneo di concentrazioni o di diluizioni.
- p) Il saggio può essere prolungato per la valutazione della EC_{50} a 48 ore. A tal fine si procede al rinnovo delle 24 soluzioni con soluzioni fresche (ricorrendo nel caso di un effluente, al campione refrigerato) nelle quali vengono trasferiti gli animali che già hanno soggiornato per 24 ore nelle soluzioni a concentrazione o diluizione corrispondente.
- q) La procedura, le cautele ed i criteri per la seconda parte della prova sono gli stessi già descritti.
- r) Al termine della prova può essere calcolata la EC_{50} a 48 ore seguendo i criteri indicati.

METODO B - Valutazione dell'accettabilità di un effluente

- a) Il campione di circa 500 mL di effluente di cui deve essere valutata l'accettabilità, va utilizzato entro le 24 ore dalla raccolta e conservato alla temperatura di 4°C. Si consiglia l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di entità non prevedibile. In ogni caso è opportuno che il campione venga suddiviso in due aliquote di almeno 250 mL di cui una verrà utilizzata per il saggio e l'altra potrà tornare utile per ulteriori prove.
- b) Eventuali solidi galleggianti vanno rimossi per filtrazione su lana di vetro o su rete di teflon a maglie di circa 1 mm.
- c) Si procede quindi alla regolazione della temperatura del campione prima del suo trasferimento nei recipienti per il saggio ($20 \pm 1^\circ C$).
- d) Per il saggio si predispongono sei recipienti di cui tre contenenti ciascuno 50 mL di effluente e tre 50 mL di sola acqua di diluizione utilizzata come controllo.
- e) In ciascuno dei sei recipienti vengono trasferiti 10 neonati di *daphnia*. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta di vetro del diametro interno di circa 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua trasferito con le *daphniae* al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è consigliabile che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le dafnie pipettate nei sei recipienti fino a raggiungere il numero di dieci, anziché completare un recipiente per poi passare ai successivi.
- f) A trasferimento avvenuto, si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare i tempi di illuminazione ai quali gli animali sono stati allevati.
- g) Durante le 24 ore della prova gli animali non vengono alimentati.
- h) Al termine del saggio e, se necessario, anche con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.
- i) Il saggio va ripetuto se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%.

l) Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione di ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2 mg/L. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito ricambiando il liquido in esame durante le 24 ore della prova oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenze o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali.

Il giudizio di accettabilità del campione in esame viene dato quando al termine delle 24 ore la somma degli organismi immobili dei tre recipienti contenenti il campione in esame, risulta inferiore al 50%; se è pari o superiore al 50% il campione viene giudicato inaccettabile. Per effluenti che recapitano in fognatura il campione è giudicato inaccettabile se la percentuale di organismi immobili è pari o superiore all'80%.

APPENDICE 1 - Allevamento di *Daphnia magna*

1. Strumentazione

Oltre alla normale strumentazione di laboratorio sono necessari:

- un sistema di illuminazione che consenta di ottenere 1000 lux a livello delle vasche (lampade fluorescenti con indice di resa cromatica ≥ 90) fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
- un sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito di $20 \pm 1^\circ\text{C}$;
- un sistema di aerazione a bassa portata e pressione fornito di diffusori a pietra porosa del tipo da acquario;
- un misuratore di ossigeno disciolto;
- una camera di conta e microscopio o contatore automatico di particelle;
- vasche in tutto vetro con una capacità di circa 5 L.

Tutti gli accessori destinati ad entrare in contatto con l'acqua di allevamento non devono rilasciare sostanze tossiche. Vetro borosilicato e plastiche fluorurate sono da preferire in tutti i casi in cui sia possibile.

2. Acqua

Per l'allevamento della *daphnia* le acque di rete non clorate, di falda o di un corpo idrico superficiale sono tutte potenzialmente utilizzabili purchè non contaminate. Sono da preferire quelle che presentano una sufficiente stabilità delle caratteristiche chimico-fisiche. Qualunque sia l'acqua prescelta, l'aerazione per 24 ore ed un trattamento con carbone attivo, precedenti nel caso di acque superficiali da filtrazione su membrane di $0,22 \mu\text{m}$, assicurano un netto miglioramento della qualità. Se necessario, l'acqua trattata va corretta in alcuni dei suoi costituenti maggiori per ottenere approssimativamente una durezza di $150 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$, un rapporto $\text{Ca}/\text{Mg}=4$ e $\text{Na}/\text{K}=10$. La diluizione viene effettuata con acqua deionizzata o distillata filtrata su carbone attivo o con acqua Milli Q, mentre gli aumenti di concentrazione si ottengono per aggiunta di sali di grado analitico (es. CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3 , KCl , ecc.).

L'acqua così preparata va saggiata per verificarne l'idoneità all'allevamento di *Daphnia magna*. A questo scopo si utilizza un gruppo di almeno dieci organismi, di età inferiore alle 24 ore, mantenuti in 500 mL di acqua ed alle condizioni previste per l'allevamento. Ogni 48 ore si provvede al trasferimento in altri 500 mL di mezzo fresco, all'aggiunta di cibo nelle quantità indicate ed alla conta, previa rimozione, dei dafnidi prodotti.

La prova ha una durata di circa 14 giorni corrispondenti a tre schiuse. Le condizioni di idoneità dell'acqua di allevamento si hanno se:

- la prima schiusa avviene entro il nono giorno;
- il numero medio complessivo di neonati per femmina dopo tre schiuse è superiore a 20 e preferibilmente prossimo a 60;
- la mortalità non supera il 20%.

Il prolungamento della prova oltre la terza schiusa è comunque consigliabile offrendo maggiori garanzie di idoneità.

3. Termoregolazione

La temperatura per il mantenimento di *Daphnia magna* è di $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

4. Illuminazione

Le vasche di allevamento vengono illuminate con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

5. Ossigenazione

Nelle vasche di allevamento viene mantenuta una concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 6 mg/L insufflando aria mediante dei diffusori. Quest'aria può contenere contaminanti che vanno rimossi per passaggio su cartuccia di carbone attivo o altro materiale adsorbente.

6. Alimentazione e mantenimento

La dieta per il mantenimento in coltura di *Daphnia magna* è costituita da due organismi unicellulari, un'alga verde *Selenastrum capricornutum* ed un lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Sia la sospensione algale che quella di lievito vengono somministrate quotidianamente in quantità tali da assicurare una densità nelle vasche di allevamento di circa 300.000 cellule/mL per ciascuno dei due organismi. La somministrazione può avere luogo a giorni alterni e, in questo caso, i volumi delle sospensioni cellulari vanno raddoppiati. Il permanere della torbidità del mezzo acquoso può costituire un indice visivo in base al quale rinviare la somministrazione del cibo.

Il rinnovo parziale e bisettimanale dell'acqua delle vasche come pure il controllo della densità ad un massimo di circa 100 individui/L costituiscono condizioni necessarie per una corretta conduzione dell'allevamento. A questo fine occorre inoltre effettuare il trasferimento periodico (15-20 giorni) di alcuni organismi in attiva riproduzione partenogenetica, ad una vasca contenente cibo e mezzo freschi.

È consigliabile mantenere contemporaneamente almeno due vasche, evitando in tal modo che un qualsiasi inconveniente comporti la perdita dell'organismo. L'allestimento di queste vasche è utile che sia sfalsato di alcuni giorni al fine di disporre in modo pressoché continuo dei dafnidi necessari alla sperimentazione.

7. Coltura algale

La cloroficea *Selenastrum capricornutum* viene allevata in un mezzo di coltura allestito con le seguenti modalità. Si preparano quattro soluzioni in acqua bidistillata o Milli-Q filtrata su membrana da $0,22 \mu\text{m}$ dei sali di seguito indicati:

Soluzione 1			
	NaNO ₃	25,500	g/L
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12,164	g/L
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,410	g/L
	H ₃ BO ₃	185,520	mg/L
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	415,380	mg/L
	ZnCl ₂	3,270	mg/L
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,428	mg/L
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,012	mg/L
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,260	mg/L
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	160,000	mg/L
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	300,000	mg/L
Soluzione 2			
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	14,700	g/L
Soluzione 3			
	K ₂ HPO ₄	1,044	g/L
Soluzione 4 -			
	NaHCO ₃	15,000	g/L

Il mezzo di coltura è ottenuto diluendo 2 mL di ciascuna soluzione al volume finale di 1 litro con acqua bidistillata o Milli-Q filtrata su 0,22 µm. Il mezzo viene inoculato in modo da ottenere una densità iniziale di circa 200.000 cellule/mL. Le alghe vengono incubate a 20±2°C e con una illuminazione di circa 4000 lux fornita da lampade fluorescenti cool-white con fotoperiodo di 16 ore di luce.

La sospensione algale è mantenuta in agitazione continua insufflando aria filtrata e dopo 5-6 giorni di incubazione, raggiunge di norma una densità prossima ai 9-10 milioni di cellule/mL. La biomassa algale viene separata dai residui del mezzo di coltura mediante centrifugazione (400 RCF per 5-10 minuti). Il soprannatante viene scartato e le alghe ridisperse in acqua di allevamento con durezza ridotta a 30-50 mg CaCO₃/L. Si fa seguire una seconda centrifugazione e quindi si procede alla raccolta delle alghe.

Le cellule algali, risospese nello stesso tipo di acqua usata per i lavaggi in modo da ottenere una densità d'impiego di circa 100 milioni di cellule/mL, possono essere conservate al buio ed alla temperatura di 4°C. In tali condizioni si mantengono vitali per oltre 30 giorni e potranno essere utilizzate per inoculare la coltura successiva.

8. Sospensione di lievito

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, reperibile in confezioni commercializzate per la panificazione, viene disperso in acqua di durezza 30-50 mg CaCO₃/L ottenuta per miscelazione dell'acqua di allevamento con acqua bidistillata o Milli-Q. La densità d'impiego è di circa 100 milioni di cellule/mL. Anche la sospensione di lievito può essere conservata al buio ed alla temperatura di 4°C.

9. Idoneità degli organismi

È opportuno verificare periodicamente le condizioni generali di allevamento. A questo fine si può ricorrere all'esame visivo del contenuto lipidico degli organismi, indice lipidico, come pure ad una sostanza tossica di riferimento. Per quest'ultima si propone il bicromato di potassio di cui si determina la 24hEC₅₀ nelle condizioni sperimentali indicate dal metodo.

APPENDICE 2 - Calcolo della EC₅₀

Vengono proposti tre metodi per il calcolo della EC₅₀ e dei relativi limiti fiduciali. La corretta applicazione del primo metodo richiede che i risultati del saggio comprendano almeno due effetti parziali, diversi cioè da immobilizzazione 0 e 100%, quantunque esso possa fornire una stima della EC₅₀ e dei limiti di confidenza anche con un solo risultato parziale. Il secondo metodo viene utilizzato in assenza di effetti intermedi fra 0 e 100% e quando non siano necessarie particolari informazioni sulla relazione concentrazione/effetto del tossico in esame. È proposto infine un terzo metodo di calcolo, disponibile come programma per personal computer, la cui applicabilità necessita di almeno due risultati parziali.

1. Litchfield e Wilcoxon (metodo semplificato)

Retta concentrazione/effetto

Si tabulano le concentrazioni di sostanza o le percentuali (v/v) di effluente saggate e le corrispondenti percentuali cumulative di organismi immobilizzati (=100 x n/20). Non si considerano più di due concentrazioni consecutive che hanno causato la completa immobilizzazione (100%) e parimenti non più di due che hanno determinato effetto nullo (0%).

Escludendo gli effetti 0 e 100%, si rappresentano su carta logaritmo-probabilistica le percentuali di organismi immobilizzati in funzione delle concentrazioni corrispondenti. Queste ultime sono riportate sulla scala logaritmica e gli effetti sulla scala delle ordinate. Si traccia la retta che meglio approssima i punti ottenuti, privilegiando quelli compresi fra il 40 e il 60% di effetto. Utilizzando la retta si leggono e si tabulano gli effetti attesi per ciascuna delle concentrazioni saggate, scartando quelle il cui effetto atteso risulti inferiore a 0,01 o superiore a 99,99. Il grafico viene completato rappresentando anche le concentrazioni che hanno prodotto effetto 0 e 100%. A questo scopo si legge sulla retta tracciata l'effetto atteso per tali concentrazioni e si riporta in grafico il corrispondente valore corretto secondo le indicazioni di Tab. 1.

Se la retta ottenuta risulta insoddisfacente si traccia una nuova retta e si ripetono i passaggi descritti.

Tabella 1: Valori corretti per effetto 0 e 100%. Es.: ad un valore atteso di 98,6% corrisponde un valore corretto di 99,5%

Atteso	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0,3	0,7	1,0	1,3	1,6	2,0	2,3	2,6	2,9
10	3,2	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	4,9	5,2	5,5	5,7
20	6,0	6,2	6,5	6,7	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,1
30	8,3	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2	9,3	9,4	9,6	9,8
40	9,9	10,0	10,1	10,2	10,3	10,3	10,4	10,4	10,4	10,5
50	-	89,5	89,6	89,6	89,6	89,7	89,7	89,8	89,9	90,0
60	90,1	90,2	90,4	90,5	90,7	90,8	91,0	91,2	91,4	91,6
70	91,7	91,9	92,2	92,4	92,6	92,8	93,0	93,3	93,5	93,8
80	94,0	94,3	94,5	94,8	95,1	95,3	95,6	95,9	96,2	96,5
90	96,8	97,1	97,4	97,7	98,0	98,4	98,7	99,0	99,3	99,7

Test del Chi²

Si calcolano e si tabulano le differenze tra i valori osservati (o corretti) ed i valori attesi. Mediante il nomogramma di Fig. 1, per ciascuna differenza viene determinato e tabulato il corrispondente contributo al Chi². Si sommano poi i singoli contributi e si moltiplica il totale per il numero medio di animali saggiati per concentrazione calcolando a questo scopo, il rapporto fra il numero complessivo di organismi usati per le sole concentrazioni riportate in grafico e il numero delle medesime (=K).

Il dato così ottenuto rappresenta il valore del χ^2 della retta in esame. Il numero dei gradi di libertà è dato dal numero di concentrazioni rappresentate in grafico diminuito di due unità ($G.L.=K-2$). Se il χ^2 della retta è inferiore al valore riportato in Tab. 2 per n gradi di libertà, significa che la retta tracciata approssima in modo soddisfacente i risultati sperimentali. In caso contrario si traccia una nuova retta che possa approssimare meglio i dati ottenuti e si ripete l'esame descritto.

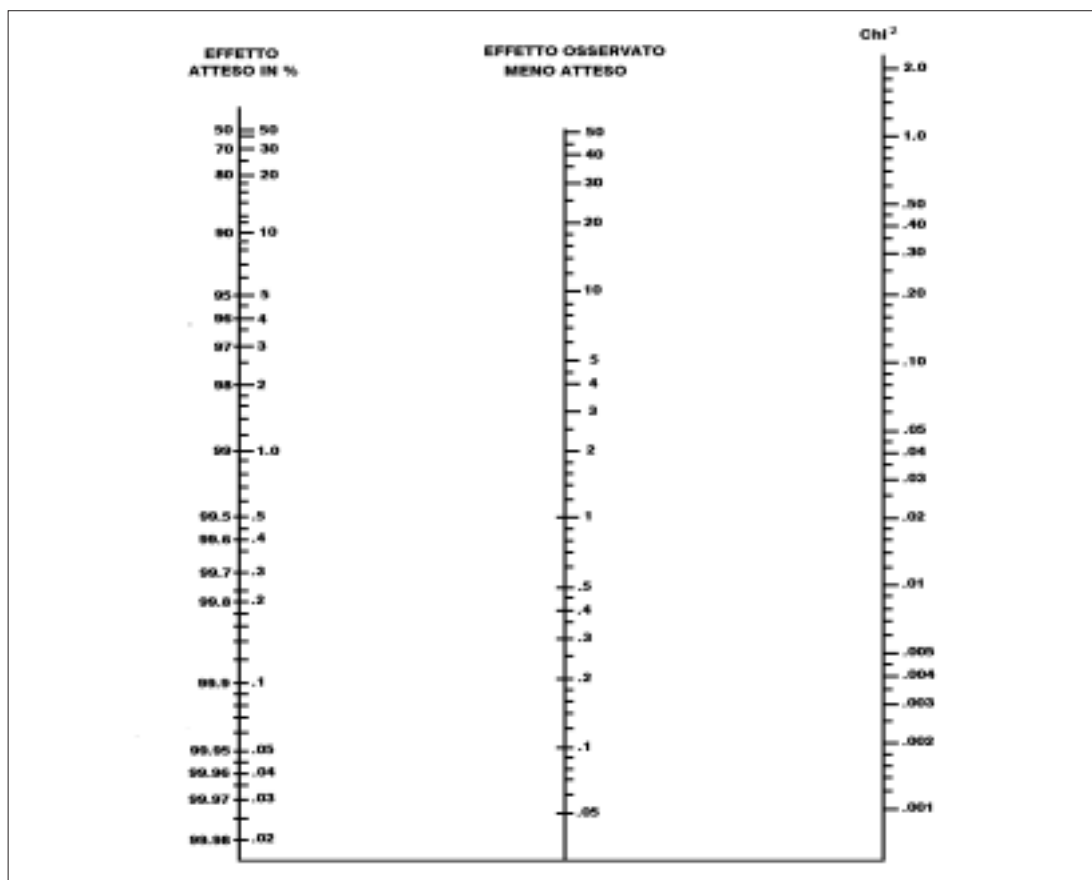


Figura 1: Nomogramma dei contributi al χ^2 . La retta che congiunge il valore ottenuto dalla differenza tra l'effetto osservato e quello atteso con il corrispondente effetto atteso indica, nel punto di intersezione con la scala del χ^2 il contributo cercato

Tabella 2: Valori del χ^2 (P= 0,05)

Gradi di libertà (G.L.)	χ^2
1	3,84
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,1
6	12,6
7	14,1
8	15,5
9	16,9
10	18,8

EC₅₀ e limiti fiduciali

Il valore della EC₅₀ (24 o 48h) è letto sulla scala logaritmica del grafico della retta in corrispondenza dell'effetto del 50%.

Mediante il grafico della retta si individuano le concentrazioni pari ad un effetto del 16 e dell'84% (EC₁₆; EC₈₄) e si calcola il valore della funzione S secondo la seguente espressione:

$$S = \frac{\left[\left(\frac{EC_{84}}{EC_{50}} \right) + \left(\frac{EC_{50}}{EC_{16}} \right) \right]}{2}$$

Si determina il valore di N che rappresenta il numero complessivo di organismi saggiati alle concentrazioni il cui effetto atteso è compreso fra 16 e 84% e si procede al calcolo del fattore f mediante la seguente espressione:

$$f_{EC_{50}} = S^{\left(\frac{2,77}{\sqrt{N}} \right)}$$

dove S e N hanno il significato già illustrato. I limiti fiduciali della EC₅₀ al 95% di probabilità si ottengono come segue:

$$\text{limite superiore} = EC_{50} \times f_{EC_{50}}$$

$$\text{limite inferiore} = \frac{EC_{50}}{f_{EC_{50}}}$$

2. Media geometrica

Calcolo della EC₅₀

In assenza di risultati parziali la EC₅₀ può essere calcolata come segue:

$$EC_{50} = \sqrt{A \cdot B}$$

dove A è la massima concentrazione che non ha causato immobilizzazione (effetto 0%) e B è la minima che ha determinato la completa immobilizzazione degli organismi saggiati (effetto 100%).

Limiti fiduciali

Le due concentrazioni A e B rappresentano i limiti fiduciali della EC₅₀ con un livello di probabilità che dipende dal numero medio di organismi utilizzato per concentrazione (N). Il livello di probabilità associato ad A e B è calcolato con la seguente espressione:

$$P = 100 \times \left[1 - 2 \left(\frac{1}{2} \right)^N \right]$$

Con 20 organismi per concentrazione, come previsto dalla presente metodologia di saggio, il livello di probabilità associato ai limiti fiduciali A e B è superiore al 99,99%.

3. Analisi dei "probits"

Questo terzo metodo è proposto come programma per personal computer con sistema operativo DOS versione 3.0 o successiva.

Partendo dai risultati sperimentali, che devono comprendere due effetti intermedi tra 0 e 100%, il programma fornisce la EC_{50} e la EC_1 con i relativi limiti fiduciali più una serie di informazioni sulla retta di regressione "probit" e sull'analisi statistica effettuata.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Toxicity test procedure for Daphnia". In: *Standard methods for the examination of water and wastewater*, XX Edition, 8-82, 8-86, (Washington, APHA).

ASTM (1984): "Standard practice for conducting static acute toxicity test on wastewaters with Daphnia", American society for Testing and Materials, E 4229-84.

ISO (1982): "Water quality - Determination of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)", International Organisations of Standardisation, ISO 6341.

MARCHETTI R. & VIGANÒ L. (1991): "Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con Daphnia magna". In saggio di tossicità con Daphnia, *Quad. Ist. Ric. Acque*, 93, 2.1 - 2.23.

OECD (1984): "Daphnia sp., acute immobilisation test and reproduction test". Guideline n. 202. In: *OECD Guidelines for testing of chemicals*, Effects on biotic systems, ISBN 92-64-12221-4.

PUDDU A. (1989): "Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei Probits", *IRSA-Notiziario Metodi Analitici per le Acque*, 9 (2), 19-37.

VIGANÒ L. (1991): "Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing Daphnia magna", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 775-782.

VIGANÒ L. (1993): "Reproductive strategy of Daphnia magna and toxicity of organic compounds", *Wat. Res.*, **27**, 903-909.