

## 8100. Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Ceriodaphnia dubia*

### 81. Introduzione

Il metodo descrive la procedura con cui è possibile indagare se un effluente di scarico o un'acqua superficiale contiene inquinanti a concentrazioni tali da causare effetti tossici di tipo cronico sul crostaceo *Ceriodaphnia dubia*. La mancata osservazione di effetti tossici di tipo cronico per un dato campione non esclude che essi siano osservabili saggiando campioni prelevati in altri momenti, e ciò in dipendenza della variabilità dello scarico o del corpo idrico superficiale e delle fonti di contaminazione che in essi trovano recapito.

### 2. Generalità sul metodo

In questo tipo di saggio giovani individui di *C. dubia* sono esposti per 7 giorni a campioni acquosi dei quali si voglia stimare la tossicità cronica. Generalmente, un campione di acqua di scarico, o più raramente di un corpo idrico superficiale, vengono saggiati ad almeno 5 diluizioni a ciascuna delle quali è esposto un numero definito di organismi neonati. Nell'arco di tempo di 7 giorni ed alle condizioni sperimentali descritte in questa metodica, i neonati di *C. dubia* raggiungono la maturità sessuale e sono in grado di produrre, a loro volta, tre schiuse di nuovi individui.

Solitamente un campione capace di effetti cronici manifesta la propria tossicità inibendo l'attività riproduttiva del cladocero; tuttavia, anche l'accrescimento è facilmente alterabile dalle sostanze tossiche presenti nel campione e, pertanto, la valutazione della tossicità dovrà basarsi, ovunque possibile, sull'esame di questi due parametri. I dati relativi all'accrescimento sono ottenibili, a saggio ultimato, mediante misurazioni di peso secco o più semplicemente di lunghezza corporea. Il confronto tra la riproduzione e la crescita degli organismi esposti alle diverse diluizioni del campione e quelle di un gruppo mantenuto come controllo, permetterà di individuare il valore di diluizione che non inibisce significativamente i parametri considerati (NOEC = "No Observed Effect Concentration"; massima concentrazione/diluizione alla quale non si osservano effetti statisticamente significativi). La tossicità cronica del campione si può manifestare anche sulla sopravvivenza del crostaceo. Elaborando gli eventuali dati di mortalità può essere possibile stimare la diluizione letale per una determinata percentuale di individui (es.  $LC_{50}$ ), a diversi tempi di esposizione, sino a un massimo di 7 giorni.

### 3. Condizione del saggio

#### 3.1 Materiali e strumentazione

Per la conduzione del saggio di tossicità è necessario:

- almeno 120 contenitori del tipo beaker in vetro borosilicato con volume utile di 30 mL. Diversi laboratori utilizzano con successo dei contenitori "a perdere" in polistirene reperiti originariamente tra gli articoli commercializzati per uso alimentare. Minimizzare l'adsorbimento dei probabili tossici è un obiettivo importante nella scelta dei contenitori;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro con un temporizzatore per il controllo del fotoperiodo e possibilmente un dispositivo che simuli la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;

- dispositivo per il controllo della temperatura delle soluzioni da saggiare nell'ambito di  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  per tutta la durata della sperimentazione;
  - analizzatore di ossigeno disciolto con sensore di dimensioni adeguate alla misura nei contenitori di saggio;
  - microscopio binoculare da dissezione, provvisto di illuminazione laterale;
  - micrometro oculare e micrometro obbiettivo;
- fonte di aria compressa a bassa pressione, con cannule in vetro o pipette Pasteur per far gorgogliare aria nelle soluzioni da aerare. L'uso di un piccolo compressore del tipo usato in acquariologia, può costituire una soluzione adeguata. L'aria distribuita dagli impianti centralizzati è spesso contaminata da vapori di oli o altri inquinanti che è necessario rimuovere con opportuni dispositivi di filtrazione.

### 3.2 Organismi per il saggio

La specie utilizzata in questo saggio di tossicità è il crostaceo cladocero *Ceriodaphnia dubia* che è allevato in laboratorio seguendo le indicazioni fornite nell'Appendice A2 del metodo 8040 per la valutazione della tossicità acuta con *C. dubia*. Il saggio è allestito con i neonati appartenenti alla terza schiusa o ad una delle successive, prodotte da femmine mantenute in condizioni di allevamento controllate e rispondenti ai requisiti di buone condizioni colturali descritti in Appendice al citato metodo per saggio acuto. In generale, è necessario che i neonati destinati alla prova siano prodotti da femmine allevate per almeno 7 giorni nella stessa acqua usata per le diluizioni o in un'acqua con caratteristiche simili (vedi Paragrafo 3.3). La prova deve essere allestita con giovani individui nati entro le 24 ore precedenti l'avvio del saggio. Inoltre, è preferibile che la differenza di età tra gli individui sia contenuta entro alcune ore a tutto vantaggio della contemporaneità degli eventi di schiusa osservabili nel corso della prova e della facilità di interpretazione dei risultati. Da un punto di vista pratico è facilmente applicabile la limitazione d'uso ad un arco di tempo massimo di 8-12 ore. Se i neonati non vengono utilizzati entro 2-3 ore dall'isolamento dai recipienti in cui sono schiusi, è necessaria la somministrazione di cibo (vedi Paragrafo 3.6).

### 3.3 Acqua di diluizione

Come regola generale le diluizioni del campione da saggiare ed il controllo sono allestiti con la stessa acqua usata per l'allevamento di *C. dubia*. In dipendenza dalle finalità del saggio sono utilizzabili, tuttavia, altre acque di diluizione o di controllo e si rende quindi necessario distinguere tra diverse possibili soluzioni.

- a) Se lo scopo è di evidenziare la capacità di un effluente o delle acque di un corpo idrico di produrre effetti tossici cronici, studiandone l'andamento nel tempo o confrontando il grado di contaminazione di diverse aree, come diluente e controllo si adatterà un'acqua semisintetica (saggio in condizioni standard) che abbia le seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , alcalinità 110-120 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ,  $\text{Ca}/\text{Mg} > 1$  e prossimo a 4,  $\text{Na}/\text{K} > 1$  e prossimo a 10, preparata a partire da un'acqua minerale scelta tra quelle disponibili in commercio. Pur con la medesima finalità, si possono distinguere due modi di impiego di un'acqua minerale. Nel primo caso, ci si serve di un'acqua con un elevato contenuto di sali e ad una certa aliquota di acqua minerale viene aggiunta acqua ultrapura o di qualità equivalente, in modo da ottenere, per diluizione, il mezzo semisintetico con le caratteristiche volute. Nel secondo caso, ci si serve di un'acqua con basso contenuto di sali (oligominerale), che viene corretta nei suoi costituenti maggiori mediante l'aggiunta di sali di grado analitico al fine di ottenere il mezzo con le caratteristiche indicate. Per ulteriori dettagli si rinvia all'Appendice A3 della Sezione 8040.
- b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità cronica delle acque del recettore a seguito dell'immissione di uno scarico nelle stesse, come diluente e controllo si userà l'acqua non contaminata del recettore, prelevata a monte dell'immissione o comunque al di fuori dell'area esposta a fonti di contaminazione. Nel caso essa non sia disponibile, si può utiliz-

zare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale o un'acqua semisintetica (cfr. "punto a") avente approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore oggetto del controllo. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purché di qualità adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) e nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 ore dallo stesso, mantenendo i campioni refrigerati (4°C) e al buio quando se ne faccia uso a più di 24 ore dalla raccolta. Oltre al controllo rappresentato dagli organismi esposti all'acqua non contaminata del recettore, dovrebbe essere allestito anche un secondo gruppo di controllo nel quale gli individui sono esposti all'acqua comunemente utilizzata per l'allevamento.

- c) Se, infine, lo scopo del saggio è quello di esaminare le interazioni tra i contaminanti presenti nello scarico e quelli veicolati dal recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore stesso, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o comunque al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. In questo caso per una corretta interpretazione dei risultati è necessario allestire tre tipi di controllo. Nel primo, gli organismi sono esposti alla stessa acqua del recettore che è usata per la diluizione dello scarico; nel secondo, sono esposti all'acqua del recettore prelevata in un'area non contaminata; nel terzo, infine, gli organismi sono mantenuti nell'acqua comunemente utilizzata per l'allevamento di laboratorio. In questo modo dovrebbe essere possibile discriminare tra i diversi contributi nutrizionali e tossicologici che spesso concorrono a determinare il risultato finale.

### 3.4 Illuminazione

Gli organismi esposti ai campioni da saggiare sono mantenuti nelle stesse condizioni di illuminazione in cui sono allevati. La sorgente luminosa è costituita da un sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro (Indice di resa cromatica  $\geq 90$ ), il fotoperiodo è di 16 ore di luce e 8 di buio e un'intensità luminosa al piano di lavoro compresa tra 500 e 1000 lux si è generalmente dimostrata adeguata. Compatibilmente con il potere tampone dell'acqua di saggio e con la densità di alghe presenti, può essere preferibile mantenere valori di intensità luminosa prossimi al limite inferiore dell'intervallo consigliato. Elevate intensità luminose possono indurre, infatti, un'attività fotosintetica tale da aumentare il pH del mezzo sino a valori che potrebbero rivelarsi dannosi o anche letali per il crostaceo. Più in generale si tenga presente che quando il pH approssima i valori di 6,5 e 9,0 è da considerare come possibile causa di danno.

### 3.5 Temperatura

Le soluzioni da saggiare e gli organismi in esse esposti sono mantenuti per tutta la durata della sperimentazione a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Questo ambito di temperatura è facilmente mantenibile immergendo i contenitori del saggio in un bagno termostato o condizionando la temperatura dell'intero ambiente in cui è condotto il lavoro sperimentale.

### 3.6 Alimentazione

I giovani individui di *C. dubia* vengono nutriti sin dall'allestimento del saggio e in seguito quotidianamente per tutta la sua durata. Se i neonati non vengono utilizzati entro 2-3 ore dall'isolamento dai contenitori in cui sono schiusi, si consiglia di non lasciarli a digiuno fino al momento del trasferimento alle soluzioni test ma di provvedere alla somministrazione della stessa dieta adottata per la conduzione dei saggi e nei medesimi quantitativi.

Sono disponibili due tipi di diete che si differenziano solo per gli ingredienti somministrati come integratori mentre condividono lo stesso componente di base rappresentato dall'alga verde unicellulare *Selenastrum capricornutum* (recentemente riclassificata come *Pseudokirchneriella subcapitata*). Nelle Appendici A4 e A5 della Sezione 8040 è descritta la preparazione delle due diete che sono indicate, rispettivamente, come composita e semplificata. In ogni ca-

so, per la conduzione del saggio deve essere usato lo stesso tipo di alimentazione che è adottato per l'allevamento degli organismi.

La dieta composita prevede che la sospensione concentrata di *S. capricornutum* sia somministrata in volumi tali da ottenere nelle soluzioni di saggio una densità di 200-250.000 cell/mL. L'alimento integratore, che per la dieta composita è indicato con la sigla YTC, è preparato in sospensioni contenenti 1,8 g/L di solidi ed è dosato in volumi pari a 100 µL per 15 mL di soluzione di saggio.

La seconda dieta, quella indicata come semplificata, prescrive una densità di cellule algali di 300.000 cell/mL mentre l'integrazione è data da una sospensione di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*), anch'esso somministrato in ragione di 300.000 cell/mL, e da una soluzione di tre vitamine. Quest'ultima è composta da tiamina cloridrato (B<sub>1</sub> 75 µg/L, biotina (H) 0,75 µg/L e cianocobalamina (B<sub>12</sub>) 1 µg/L ed è somministrata nella quantità di 1 mL per litro di soluzione di saggio.

Quotidianamente gli organismi sono trasferiti nelle rinnovate soluzioni di saggio che dovranno contenere le quantità indicate della dieta prescelta.

### 3.7 Ossigeno disciolto

Alla temperatura di conduzione del saggio si misura la concentrazione di ossigeno disciolto nelle soluzioni di campione più concentrate e nel mezzo di controllo destinati alla prova. Se la concentrazione risultasse prossima o inferiore al 40% del valore di saturazione, prima dell'allestimento del saggio si deve provvedere ad aerare le soluzioni con un moderato gorgogliamento di aria. Più raramente può verificarsi anche il problema opposto e cioè di sovra-saturazione. Anche in questi casi un'aerazione moderata dovrebbe ricondurre la concentrazione di ossigeno disciolto entro l'intervallo 40-100% del valore di saturazione.

Se durante il saggio si osserva che il consumo di ossigeno è tale da rischiare di invalidare la prova, si può intervenire con rinnovi più frequenti delle soluzioni, ricorrendo a nuove aliquote di campione preventivamente aerato.

## 4. Procedura di saggio con diluizione (effluente)

### 4.1 Saggio preliminare

Fatta eccezione per effluenti o acque superficiali la cui tossicità sia già stata saggiata in prove antecedenti, di solito mancano dei dati pregressi che sarebbero potenzialmente utili all'allestimento di un test a 7 giorni. Peraltro anche nei casi in cui tali informazioni siano disponibili, è osservazione comune che i campioni prelevati in momenti diversi possono dare effetti anche marcatamente diversi, in dipendenza della variabilità dello scarico o del recettore.

Un saggio preliminare acuto (24 ore) da condurre con *C. dubia* sullo stesso campione che deve essere saggiato nella prova a 7 giorni, può essere un utile compromesso tra la conservabilità del campione e la possibilità di avere indicazioni sul suo grado di tossicità. L'osservazione, ad esempio, di una elevata tossicità acuta può evitare l'inutile allestimento delle concentrazioni maggiori, quelle cioè che si dimostrerebbero incapaci di dare informazioni di tipo cronico, favorendo pertanto una scelta più efficace delle diluizioni da saggiare a 7 giorni. Questa possibilità vale ovviamente per tossicità che siano imputabili a contaminanti relativamente persistenti, viceversa si rende necessario l'allestimento immediato del saggio definitivo, con le precauzioni descritte nel seguito (vedi Paragrafo 4.2).

Per la conduzione di un saggio acuto preliminare la temperatura da adottare è 25±1°C, e cioè la stessa del saggio a 7 giorni, mentre la procedura è quella descritta nel metodo 8040 al quale si rinvia.

### 4.2 Saggio definitivo

La procedura comunemente adottata consiste nell'allestimento di almeno 5 diluizioni del campione che, in assenza di dati pregressi, sono individuate nella seguente serie: 100%, 50%, 25%,

12,5% e 6,25% (v/v). I valori sono in serie geometrica con un fattore di diluizione pari a 0,5. Se l'effluente è noto o sospettato di essere particolarmente tossico, la serie di concentrazioni deve essere opportunamente ampliata dal lato delle concentrazioni inferiori, non allestendo, eventualmente, quelle all'opposto più elevate, quali le concentrazioni 50 e 100%. Viceversa, se non si hanno informazioni preliminari, si può adottare un semplice accorgimento che consiste nel controllare frequentemente le concentrazioni più elevate per le prime ore dopo l'inizio del saggio: se si osserva mortalità si provvede ad allestire altre diluizioni, ampliando la serie prescelta nella direzione delle concentrazioni minori.

Se è stato necessario refrigerare i campioni, le aliquote destinate al saggio sono prelevate dopo accurato mescolamento e portate alla temperatura scelta per la prova. Si procede poi alla misurazione della concentrazione di O<sub>2</sub> disciolto in accordo alle indicazioni date in precedenza (vedi Paragrafo 3.7). Solo quando le 5 o più diluizioni hanno raggiunto le condizioni indicate per il test, vengono immessi gli organismi. Ogni individuo è mantenuto singolarmente in un beaker contenente almeno 15 mL di soluzione di saggio. Per ciascuna diluizione di campione vengono saggiati 10 individui, ognuno dei quali rappresenta pertanto una replica di quella diluizione. Procedura analoga vale anche per il gruppo di organismi di controllo.

Per il trasferimento si utilizza una pipetta di vetro, provvista di bulbo in lattice per l'aspirazione e con diametro interno di almeno un paio di mm, avendo cura di immettere gli organismi nel nuovo recipiente, solo quando l'estremità della pipetta è sotto la superficie del liquido. Per evitare una diluizione significativa delle soluzioni di saggio è necessario limitare al minimo il volume di acqua trasferito con gli animali. Si raccomanda la distribuzione casuale dei neonati nei recipienti contenenti le diverse concentrazioni come pure il posizionamento casuale dei recipienti nell'area di lavoro. A distribuzione completata ogni individuo risulterà identificato dal valore di concentrazione o comunque dal tipo di trattamento cui esso è esposto e da un numero progressivo compreso tra 1 e 10, tante sono le repliche che compongono ciascun gruppo sperimentale. Tale identificazione deve restare immutata sino al termine del saggio, permettendo così di documentare la vicenda espositiva di ogni singolo organismo (sopravvivenza, eventi riproduttivi, accrescimento ecc.).

Quotidianamente si provvede al rinnovo delle soluzioni del saggio. Pertanto, ogni 24 ore, gli individui di *C. dubia* vengono trasferiti ad una nuova serie di recipienti, contenenti soluzioni di saggio e cibo freschi, preparati secondo le stesse indicazioni seguite per l'allestimento della prova. In concomitanza con le operazioni di trasferimento, si registrano e rimuovono gli organismi deceduti, si contano e scartano i neonati prodotti e si misurano O<sub>2</sub> disciolto, pH o altri parametri.

In funzione del tipo di informazioni da ottenere, scarico o recettore sono campionati con diverse modalità e frequenze. Al tema specifico sono dedicati altri documenti, mentre nell'ambito di questo metodo è opportuno evidenziare che la conduzione del saggio a 7 giorni può essere coordinata con la frequenza e le finalità del campionamento. In pratica sono possibili tre diverse soluzioni:

- a) un solo campione è usato per la conduzione di tutto il saggio, per cui gli organismi sono trasferiti, quotidianamente, in soluzioni fresche preparate con aliquote del medesimo campione che è conservato al buio e a 4°C;
- b) il saggio è condotto utilizzando tre campioni prelevati secondo la sequenza d'uso; il primo campione è usato per l'allestimento e per i primi due rinnovi delle soluzioni di saggio (1° e 2° giorno), il secondo campione serve per il 3° e 4° giorno ed il terzo per il 5° e 6° giorno della sperimentazione. I tre campioni sono conservati per il periodo d'uso al buio e a 4°C;
- c) il saggio è condotto utilizzando 7 campioni prelevati secondo la sequenza di impiego, per cui quotidianamente gli organismi sono trasferiti alla serie di soluzioni di saggio allestita, ogni giorno, con un nuovo campione.

Gli organismi del gruppo di controllo mantenuti nelle condizioni indicate in questo metodo danno luogo a 3 schiuse di nuovi individui nei 7 giorni di sperimentazione. La prima schiusa è prodotta entro il quarto giorno di saggio; la seconda può essere prodotta indifferentemente al quinto o al sesto, mentre la terza ed ultima schiusa, è osservabile al settimo giorno di saggio.

Completata quest'ultima si può procedere anche alla valutazione dell'accrescimento degli organismi mediante la misurazione del peso secco o, più semplicemente, della lunghezza corporea di ciascuno di essi. Quest'ultima è misurata dall'apice dell'elmetto alla base della spina posteriore del carapace, mediante un microscopio e un micrometro oculare. Il peso secco è misurato con una microbilancia dopo esposizione di 24 ore alla temperatura di 60°C.

Talvolta alcuni organismi di controllo non riescono a produrre la terza schiusa entro il termine dei 7 giorni di sperimentazione. In questi casi, è di solito sufficiente attendere alcune ore per osservare il rilascio delle schiuse mancanti e completare così la raccolta dei risultati. Osservazione analoga può valere anche per gli altri gruppi sperimentali, sebbene, in questo caso, sia necessaria maggiore cautela poichè uno dei possibili effetti dell'esposizione a sostanze tossiche può essere l'aborto degli embrioni con l'exuvia e quindi la mancata osservazione di una o più schiuse. La terza schiusa, apparentemente tardiva, potrebbe essere, pertanto, il prodotto di una quarta deposizione. Un errore in tal senso causerebbe una valutazione errata dell'attività riproduttiva e dell'accrescimento dell'organismo.

Il trasferimento quotidiano degli animali può interrompere inavvertitamente la nascita di un gruppo di neonati la cui schiusa verrebbe così conteggiata come due eventi riproduttivi osservati in giorni consecutivi. L'esame delle exuvie del genitore permette di risolvere facilmente l'equivoco e di assegnare i neonati ad un unico evento riproduttivo.

Viceversa, un organismo che non si riproduce affatto per tutta la durata del test si rivela generalmente un individuo di sesso maschile, più raramente una femmina sterile, ed i suoi risultati vengono esclusi dall'esame del gruppo di appartenenza. Prima di scartare il dato è opportuno procedere, tuttavia, ad un esame accurato del singolo individuo e delle sue exuvie, in quanto gli organismi esposti ad un campione tossico o a carenze nutrizionali possono abortire gli embrioni manifestando una sterilità che si rivelerebbe, in questo caso, solo apparente.

## 5. Procedura di saggio senza diluizione (corpo idrico)

### 5.1 Saggio definitivo

I rapporti di diluizione tra sorgente di contaminazione e recettore rendono talvolta inutile la pratica di diluire il campione del corpo idrico al fine di completare con successo un saggio di tipo cronico. Ne deriva che la soluzione adottata per indagare se un corpo idrico contiene tossici capaci di causare effetti cronici su *C. dubia* è spesso quella di condurre il saggio a 7 giorni su un campione non diluito delle sue acque.

Per questo tipo di saggio si allestisce una sola serie di dieci contenitori, corrispondente a concentrazione 100% (v/v), cui vengono esposti dieci neonati di *Ceriodaphnia* mantenuti singolarmente secondo la procedura del saggio con diluizione (vedi Capitolo 4). Tale serie sarà affiancata da uno o più serie di organismi di controllo a seconda delle finalità del saggio medesimo (vedi Paragrafo 3.3). Anche in questo tipo di prova valgono le considerazioni fatte per il saggio con diluizione.

## 6. Validità del saggio

Al termine dei 7 giorni di sperimentazione, i risultati del saggio sono giudicati accettabili se la concentrazione di ossigeno disciolto nei diversi trattamenti si è mantenuta  $\geq 40\%$  del valore di saturazione, se la sopravvivenza degli organismi di controllo è  $\geq 80\%$  e il numero cumulativo medio di neonati prodotti dagli individui del controllo nelle tre schiuse è  $\geq 15$ .

## BIBLIOGRAFIA

VIGANÒ L. (1996): "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia*", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, Giugno 1996, 9-19.