

EDITORIALE

Anche questo numero del "Notiziario dei Metodi Analitici" propone, così come quello del giugno 1996, tre metodi biologici per la determinazione della tossicità acuta delle acque.

Due di tali proposte riguardano test adottabili per le acque salmastre (quello che utilizza il crostaceo *Artemia salina* e quello che utilizza il pesce *Cyprinodon variegatus*), mentre la terza è una versione aggiornata del test con la trota iridea (*Onchorhynchus mykiss*), già previsto dalla vigente normativa. In questa nuova versione ampio spazio viene dato agli aspetti operativi che precedono la esecuzione del test (trasporto e mantenimento dei pesci, scelta dell'acqua e delle attrezzature per l'acclimatazione e l'alimentazione dei pesci, etc.) e che costituiscono un aspetto fondamentale per la corretta riuscita del saggio e per la riproducibilità dello stesso.

Con la proposta di questi nuovi metodi si amplia ancora di più la possibilità di utilizzare test specifici in funzione delle esigenze di controllo e quindi di consentire sempre più quella valutazione della "qualità ecologica" delle acque verso cui si sta indirizzando la politica europea relativamente al controllo delle risorse idriche.

Vale anche in questo caso la richiesta di collaborazione rivolta ai destinatari dei metodi affinché facciano pervenire osservazioni, suggerimenti, proposte e quant'altro sia ritenuto utile a migliorare l'applicazione dei metodi stessi. A tali proposte verrà dato adeguato risalto presentandole nella sezione "Osservazioni e quesiti" di questo stesso Notiziario.

Nella sezione "Informazioni" di questo numero viene data notizia della ricostituzione della nuova Commissione dei Metodi Analitici. Di tale Commissione vengono forniti gli elementi relativi alla sua composizione, ai compiti che alla stessa sono demandati ed alla sua articolazione in unità operative.

Ai lavori della Commissione saranno chiamati a collaborare in qualità di esperti, così come già avvenuto in passato, rappresentanti di istituzioni pubbliche e private operanti nel settore del controllo della qualità delle acque.

L'auspicio è di poter predisporre metodi analitici costantemente in linea con il progresso tecnico-scientifico e di reale applicabilità su tutto il territorio nazionale tenuto conto della diversità delle strutture deputate ai controlli.

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, settembre 1996

SAGGIO DI TOSSICITA' ACUTA CON ARTEMIA sp.<sup>(\*)</sup>

(Metodo per la determinazione di effetti tossici acuti con *Artemia sp.*)

a cura di L. Guzzella, IRSA-CNR, Brugherio (Milano)

RIASSUNTO

Il saggio che utilizza l'*Artemia sp.* viene proposto per determinare gli effetti tossici a breve termine (24-48 ore) di campioni d'acqua (superficiale, o di scarico) o solidi (estratti e eluati di sedimenti e fanghi). Il saggio permette di calcolare per ciascun campione i valori di EC50, EC20 o la diluizione di non effetto. Sono riportati nel metodo i risultati di un test di intercalibrazione condotto con alcune sostanze di riferimento.

SUMMARY

A standardized method for the determination of 24-48 h toxicity of *Artemia sp.* is evaluated. The proposed method can be applied for the analysis of liquid (superficial waters, eluates and wastes) and solid (sediments and muds) samples and permits the quantification of the EC50 and EC20 values of the no-effective sample dilution. The results of a interlaboratory ring tests conducted with reference substances are illustrated.

INDICE

EDITORIALE	1
SAGGIO DI TOSSICITA' ACUTA CON ARTEMIA SP.	1
METODO PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA CON CYPRINODON VARIEGATUS	7
METODO PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA CON TROTA IRIDEA (ONGORHYNCHUS MYKISS)	17
INFORMAZIONI	25

(\*) Il metodo è stato discusso ed approvato da un sottogruppo del Gruppo Metodi Biologici composto da: Bucci M., Gaiter S., Migliore L. e Buffagni M.

## INTRODUZIONE

Il metodo consente di valutare la tossicità acuta di campioni acquosi o estratti provenienti da corpi idrici marini o salmastri utilizzando come risposta l'immobilizzazione del crostaceo marino *Artemia sp.*

### 1 - PRINCIPIO DEL METODO

Naupli schiusi da cisti durature e allo stadio larvale II-III di *Artemia sp.* (artemia, Crostaceo Anostraco) vengono utilizzati per un saggio a 24 - 96 ore per la determinazione dell'EC50, dell'EC20 e della diluizione di non effetto.

### 2 - CAMPI DI APPLICAZIONE

Il metodo può essere utilizzato per valutare gli effetti tossici acuti di campioni di scarichi afferenti in acque salmastre, marine o a salinità superiore a quella di mare, di campioni di acqua superficiale salmastra, marina o a salinità superiore a quella di mare, di eluati di fanghi provenienti dal dragaggio aree portuali o da interventi di perforazione e assimilabili, di eluati o estratti di sedimenti marini, di eluati di materiali utilizzati per il ripascimento di litorali e assimilabili (per la preparazione di eluati ed estratti si rimanda ad un metodo IRSA che sarà pubblicato successivamente), e di sostanze chimicamente definite.

### 3 - POSSIBILI INTERFERENZE

Sostanze volatili o scarsamente solubili in acqua, composti che possono reagire con l'acqua di diluizione del saggio o che si possono alterare durante le prove, possono influenzare l'attendibilità del risultato ottenuto.

Valori di pH inferiori a 6,5 o superiori a 8,5 così come valori di salinità inferiori a 5 ‰ o superiori a 50 ‰ possono influire sulla sopravvivenza delle artemie inibendone le funzioni vitali.

Anche uno scarso contenuto in ossigeno disciolto del campione (inferiore al 40 % di saturazione a 25°C) può interferire con il risultato del saggio.

### 4 - REAGENTI E MATERIALI

#### 4.1 - Organismo test e reperibilità

Per il test si possono utilizzare le Reference Artemia Cysts (RAC) disponibili presso la Quality Assurance Research Division, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati OH 45268, U.S.A. oppure presso il Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution, University of Ghent, Belgium. Possono inoltre essere utilizzate cisti di *Artemia sp.* prodotte come indicato nell' Appendice B e che rispettino i criteri di validazione riportati nel paragrafo 6.2.

L'organismo utilizzato per il saggio è un nauplio di età inferiore a 48 ore allo stadio larvale II o III (cfr. Appendice A) del crostaceo marino *Artemia sp.*

#### 4.2 - Soluzione di allevamento e di diluizione

Per l'allevamento, per la riattivazione delle cisti, per la diluizione dei campioni e come soluzione controllo si possono utilizzare soluzioni ottenute con sali marini già miscelati come l'Instant Ocean<sup>R</sup> (si sciolgono in un litro d'acqua deionizzata sotto agitazione 35 g di sale marino e, quando necessario, si filtra la soluzione su carta da filtro) oppure si utilizza la soluzione ASPM così preparata:

- NaCl = 26,4 g;
- KCl = 0,84 g;
- CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O = 1,67 g;
- MgCl · 6 H<sub>2</sub>O = 4,6g;
- MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O = 5,58 g;
- NaHCO<sub>3</sub> = 0,17 g;
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> = 0,03 g

Isali indicati vengono sciolti in un litro di acqua deionizzata mantenuta in agitazione.

Le soluzioni così preparate sono stabili per circa 1-2 mesi se mantenute al buio a temperatura di 4 ± 2°C. Le soluzioni devono essere portate a temperatura ambiente (20 - 25°C) prima del loro utilizzo.

Si consiglia di utilizzare la soluzione Instant Ocean<sup>R</sup> per la riattivazione delle cisti in quanto permette una maggiore efficienza di schiusa e la soluzione ASPM per l'esecuzione del test in quanto permette una migliore ripetibilità dei risultati.

#### 4.3 - Strumentazione e vetreria

Per la conduzione del saggio sono necessari:

- un microscopio stereoscopico da 8 - 10 ingrandimenti oppure equivalente lente di ingrandimento; per l'osservazione si consiglia fondo scuro;
- un incubatore per una temperatura di 25 ± 2 °C;
- un sistema di illuminazione da 3 - 4.000 lux al piano di appoggio dei contenitori degli animali;
- un luximetro per misurare l'intensità luminosa;
- un pH-metro;
- un salinometro;
- un misuratore di ossigeno disciolto;
- piastre multi pozzetto monouso da 24 posti con capacità 3 mL ciascuno in polistirene per il saggio con le acque di scarico, oppure beaker in vetro da 50 mL per i campioni di acque superficiali;
- piastre Petri in vetro di 5 cm di diametro con coperchio per la riattivazione delle cisti;

- micropipette in polietilene o in vetro per il trasferimento delle larve;
- strisce di parafilm per sigillare i contenitori del saggio;
- contenitori a tubetto in plastica da 2 mL per la conservazione delle cisti;
- pipette a volume variabile da 1 - 5 mL con relativi puntali.

Per l'allevamento delle artemie in laboratorio occorre inoltre:

- beaker in vetro da 500 mL
- sistema di areazione a microbolle a bassa portata fornito di diffusori a pietra porosa del tipo da acquario.

Tutti gli accessori destinati a venire in contatto con l'acqua di allevamento non devono rilasciare sostanze tossiche.

## 5 - PROCEDURA

### 5.1 - Prelievo e preparazione del campione

Per quanto concerne il campionamento delle acque di scarico è necessario seguire le metodiche previste dall'IRSA (IRSA,1995). Il volume di campione necessario al test è di circa 10 - 100 mL a seconda del tipo di saggio. Per eventuali ripetizioni del test, si consiglia, tuttavia, di riempire completamente un contenitore da 250 mL in materiale chimicamente inerte (preferibilmente in vetro scuro). Questo accorgimento consente di evitare la perdita di eventuali sostanze volatili dal campione.

Il campione così prelevato deve essere conservato al buio e alla temperatura di 4°C per non più di 72 ore. Per tempi maggiori si consiglia di congelare il campione a -20°C; in quest'ultimo caso tuttavia non è possibile assicurare la totale conservabilità delle caratteristiche del campione ai fini del risultato del saggio.

Prima di condurre il saggio, il campione deve essere portato a temperatura ambiente. Si procede quindi alla misura del pH e della salinità (IRSA,1995). Nel caso che il valore del pH si collochi al di fuori dell'ambito di sopravvivenza dell'organismo (cfr. paragrafo 3) si effettua il test sia al pH naturale del campione sia a pH  $7,0 \pm 0,2$ , previa aggiunta di NaOH o HCl 1M. Nel caso che il pH del campione sia compreso tra 6,5 e 8,5 unità non è necessario alterare il pH. Per campioni d'acqua di mare, salmastra o a salinità superiore a quella di mare la salinità del campione non va modificata se si trova nell'ambito di sopravvivenza dell'organismo (cfr. paragrafo 3).

Per campioni d'acqua di scarico afferenti in acque di mare, il saggio va condotto alla salinità del corpo recettore.

### 5.2 - Riattivazione delle cisti

La riattivazione delle cisti deve avvenire circa 48 ore prima del saggio. A tal fine si versa nella piastra Petri (5 cm di diametro) una quantità di cisti pari a circa 100 mg. Si aggiungono 12 mL della soluzione 4.2; si chiude con il coperchio la piastra e la si espone per almeno un'ora a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e a 3 - 4.000 lux di intensità luminosa. Successivamente le cisti vanno incubate al buio alla stessa temperatura, per 24 ore. Il giorno successivo quindi si trasferiscono le larve schiuse in una nuova piastra di Petri riempita con 12 mL di soluzione salina (cfr. paragrafo 4.2) e si mantiene tale piastra per altre 24 ore alla stessa temperatura.

### 5.3 - Procedure di conduzione del saggio

Varie procedure di conduzione possono essere adottate a seconda che sia noto (saggio standard) o no (saggio preliminare) l'ambito di concentrazioni entro cui ci si aspetta di rilevare l'effetto tossico dell'acqua di scarico o degli estratti da analizzare. Per campioni poco tossici o per corpi idrici superficiali si consiglia, invece, di adottare la procedura di saggio a 96 ore.

#### 5.3.1 - Saggio preliminare

Quando sia ignota la tossicità del campione da analizzare occorre procedere saggiando un ampio intervallo di diluizioni. Si consiglia di saggiare, oltre alla soluzione controllo (si utilizza la soluzione diluente 4.2), il campione tal quale e almeno quattro diluizioni successive 1:10 con la soluzione diluente 4.2, pari al 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% del campione.

Per ogni singolo test si utilizzano le piastre a 24 posti (6 righe per 4 colonne). Nella prima riga si aggiunge 1 ml della soluzione di controllo, nelle successive righe il campione e le relative diluizioni. Si trasferiscono quindi nella prima colonna, con una pipetta in plastica, una cinquantina di artemie allo stadio larvale II e III prelevate dalla piastra Petri. L'operazione si effettua al binoculare e per facilitarla si consiglia di utilizzare una fonte luminosa in posizione laterale che favorisca l'aggregazione delle artemie sul bordo della piastra. Si trasferiscono quindi nelle colonne 2-3-4 i naupli in numero di 10 per ciascun pozzetto e per un totale di 30 individui per ciascuna diluizione, avendo cura di lavare in acqua deionizzata la pipetta prima di passare da una riga a quella successiva. Si chiude la piastra con uno strato di parafilm e con il coperchio relativo. Si pone in incubatore alla temperatura di  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  per 24 ore al buio.

Il giorno successivo si colloca la piastra al binoculare e si contano gli organismi vivi sul numero totale degli organismi iniziali. Le larve si considerano morte quando rimangono immobili durante 10 secondi continui di osservazione. Se la mortalità della soluzione controllo è superiore al 10% il saggio non è valido.

Al termine della prova preliminare è generalmente possibile individuare un ambito di concentrazioni entro cui procedere per il successivo saggio definitivo. Di norma tale intervallo è compreso tra la concentrazione che causa la completa inibizione della motilità del crostaceo e quella che non inibisce tale attività.

### 5.3.2 - Saggio definitivo a 24 ore

Per campioni di acque di scarico o per campioni molto tossici (cioè con percentuale di inibizione della motilità superiore al 50% alla massima concentrazione saggiata), si può condurre il test con la procedura precedentemente descritta (saggio preliminare) ma con un ambito di concentrazione da saggiare più ristretto (tra 0 e 100% di inibizione). Le concentrazioni scelte per il saggio definitivo devono essere in scala logaritmica in modo da permettere una facile rettificazione della curva di tossicità; per esempio 0,1 - 0,4 - 0,8 - 1,6.

### 5.3.3 - Saggio definitivo a 96 ore

Per campioni d'acqua raccolti da corpi recettori o per campioni poco tossici (cioè con percentuale di inibizione della motilità inferiore al 50%) è necessario prolungare la durata del saggio a 96 ore.

Dopo la riattivazione delle cisti come descritto in 5.2, 10 naupli allo stadio larvale II - III vengono trasferiti in beaker da 50 mL riempiti con 40 mL di soluzione test. Ciascuna concentrazione viene saggiata in tre repliche. Nel saggio si utilizza la soluzione di controllo 4.2 e cinque diverse concentrazioni per ciascun campione per un totale di 18 beaker. I beaker vanno chiusi con parafilm e tenuti a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  con un ciclo di illuminazione di 14:10 luce:buio. È necessario alimentare i naupli durante il saggio. Ogni 24 ore dall'inizio del saggio viene registrato il numero di individui vivi sul totale di quelli posti in esperimento.

## 6 - RISULTATI

### 6.1 - Elaborazione dei dati

Nell'elaborazione dei dati occorre sommare tutti i dati ottenuti per le diverse repliche in modo da ottenere per ciascuna concentrazione saggiata il numero totale degli individui vivi sul numero totale degli organismi utilizzati (es. morti =  $3 + 5 + 4 = 12$ , organismi utilizzati:  $10 \times 3 = 30$  individui). Per ciascuna concentrazione si divide il numero di individui morti sul totale degli individui utilizzati e si moltiplica per cento. Si ottiene così la percentuale di immobilizzazione.

#### 6.1.1 - Calcolo della diluizione di non effetto

La diluizione di non effetto per un determinato campione rappresenta la massima concentrazione

del campione alla quale si è registrata una percentuale di immobilizzazione inferiore al 20%.

#### 6.1.2 - Calcolo EC50 ed EC20

Escludendo gli effetti 0 e 100%, si rappresentano su carta log-probit le percentuali di organismi immobilizzati in funzione delle corrispondenti concentrazioni. Si traccia la retta che meglio approssima i punti ottenuti privilegiando quelli compresi tra 40 e 60% di effetto. A questo punto si legge sulla retta tracciata a quale concentrazione corrisponde l'effetto tossico atteso (EC50 o EC20 corrispondenti al 50 e 20% degli individui inibiti).

Un calcolo più preciso dell'EC50 o EC20 e dei suoi limiti fiduciali può essere effettuato utilizzando il metodo Probit e per il confronto statistico il test del Chi così come riportato per il metodo relativo alla *Daphnia magna* (IRSA, 1995).

### 6.2 - Criteri di validazione

La verifica delle condizioni sperimentali va effettuata ricorrendo a tre composti di riferimento: sodio lauril solfato, bicromato di potassio e solfato di rame, ottenendo i seguenti risultati:

- 24h EC50 per il sodio lauril solfato inferiore a 30 mg/L;
- 24h EC50 per  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  inferiore a 25 mg/L;
- 24h EC50 per  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  inferiore a 6,5 mg/L.

Inoltre il tempo di schiusa del 90% delle cisti deve essere inferiore o uguale a 32 ore.

### 6.3 - Risultati del test

Il protocollo analitico deve contenere informazioni relative a:

- identità del campione con dati relativi al campionamento (data, ora, luogo, tipologia del campione), e al tempo di conservazione in laboratorio;
- pH e salinità naturale del campione ed eventuali modifiche apportate;
- data di esecuzione del test e nome dell'operatore;
- indicazioni relative a eventuale pretrattamento del campione (filtrazione, centrifugazione, diluizione);
- origine delle artemie utilizzate ed eventuale indicazione della data di preparazione o del numero di lotto;
- tipologia di procedura utilizzata nel test e risultati delle analisi;
- elaborazioni dei risultati espresse come EC50, EC20 o diluizione di non effetto.
- risultati dei test con composti di riferimento.

## APPENDICE A - Biologia dell'organismo

*Artemia sp.* è un piccolo crostaceo marino euroalino anostraco di 2-3 cm in cui è possibile riconoscere, dal punto di vista morfologico, tre parti: un capo con due antenne e tre occhi di cui uno mediano, un torace con due paia di arti forniti di appendici lamellari e un addome in cui nell'utero della femmina si accumulano uova sferoidali di colore bruno. Nella larva, il nauplius, sono riconoscibili soltanto due parti: una prima, il capo, con un unico occhio mediano, due paia di antenne e due paia di appendici che diverranno le mandibole e una seconda parte senza appendici e non segmentata (Fig. 1).

Il numero di cromosomi del corredo genomico varia ed è pari a 42 nelle forme a riproduzione bisessuale e

a 84 nella maggior parte delle forme partenogenetiche. Le uova, o cisti, prodotte dalle femmine partenogenetiche, utilizzate nel presente metodo, danno origine soltanto a individui femmine. La produzione di maschi da femmine partenogenetiche è molto rara e non è ancora del tutto spiegabile.

Le cisti prodotte dalle femmine partenogenetiche possono essere conservate a secco per periodi molto lunghi di tempo. Immergendo le cisti in acqua di mare in condizioni di illuminazione e, ad una adatta temperatura, si sviluppano entro le successive 24 ore larve allo stadio I liberamente natanti. Nel successivo stadio II e III si assiste ad uno sviluppo degli arti motori e dell'addome. Le larve possono a questo stadio essere utilizzate nei test di tossicità.

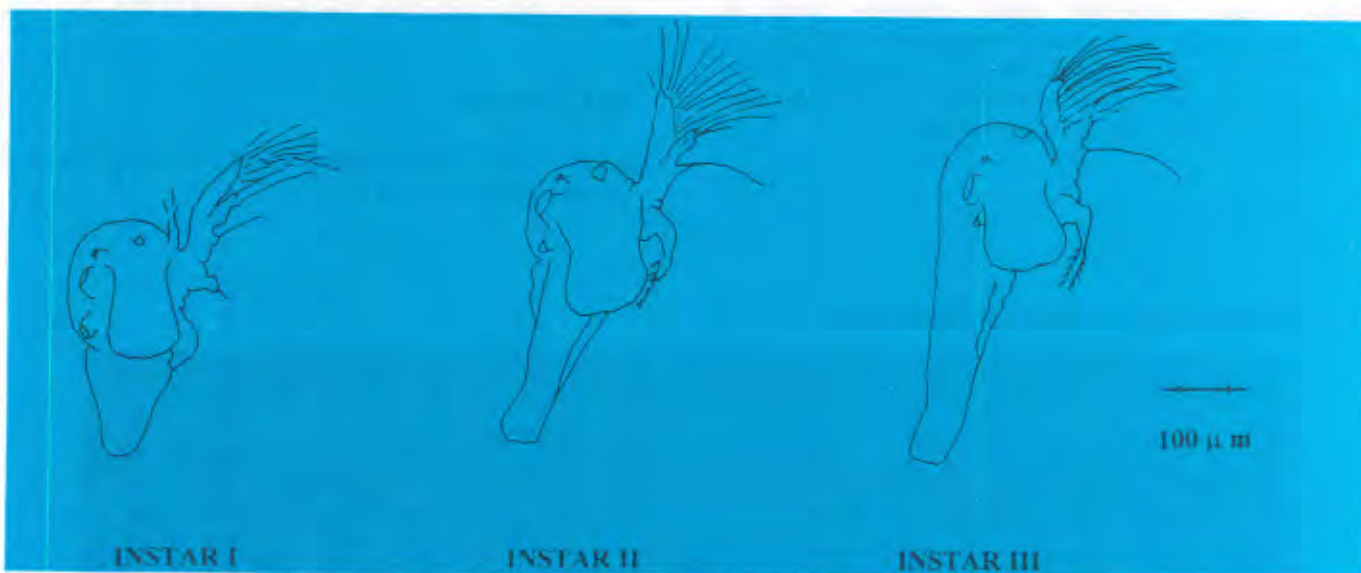


Fig. 1 - Caratteristiche morfologiche di nauplii di *Artemia sp.*

## APPENDICE B - Metodo per la preparazione di cisti in laboratorio

I nauplii di artemia possono essere allevati con la seguente procedura sino a raggiungere la maturità sessuale al fine di ottenere uova durature.

Utilizzando 250 mL della soluzione 4.2 alla concentrazione salina di 35 g/L si pongono in un baeker di vetro da 500 mL sino a 50 naupli. L'allevamento va effettuato a fotoperiodo e temperatura controllate (L:D 14:10 ore, 3 - 4.000 lux,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e sotto insufflazione d'aria a microbolle. I naupli devono essere nutriti con colture pure ( $10^{7-8}$  cellule/mL) di alghe verdi (es. *Dunaliella salina*, *Chlorella sp.*, *Chlamidomonas sp.*, *Phaeodactylum tricorutum*) con aggiunte almeno ogni 48 ore. Per la coltura algale vedi Metodo IRSA (1995). La quantità di alghe fornita all'allevamento va incrementata con l'aumentare delle dimensioni delle artemie sino a raggiungere le  $10^{5-6}$  cellule per mL di soluzione d'allevamento. Il permanere della torbidità del mezzo acquoso può costituire un indice visivo in base al quale rinviare la somministrazione del cibo. La maturità sessuale si raggiunge a partire dal 16 - 20°

giorno dall'inizio dell'allevamento; la quantità e la qualità del cibo condizionano la percentuale di individui che raggiungono la maturazione. Il rinnovo parziale e bisettimanale dell'acqua nei beakers costituisce una condizione necessaria per una corretta conduzione dell'allevamento. E' consigliabile mantenere contemporaneamente almeno tre contenitori di allevamento, in modo che un qualsiasi inconveniente non comporti la perdita dell'organismo. Le cisti prodotte vengono raccolte con una pipetta (in materiale plastico inerte o in vetro), si lasciano asciugare alla temperatura di  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , si pesano e si conservano in contenitori a tubetto da 2 mL di plastica alla temperatura di  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ . Si consiglia di utilizzare le cisti entro sei mesi dalla data di produzione.

## APPENDICE C - Risultati del test di intercalibrazione

L'Istituto di Ricerca sulle acque ha condotto nel 1994 un test di intercalibrazione utilizzando per il saggio le Artemia Reference Cysts (RAC) acquistate presso il

Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution, University of Ghent, Belgium. I laboratori che hanno partecipato al test sono i seguenti:

- Servizio Multizonale di Prevenzione Ambientale - USL 25, Piombino, (Dr M. Bucci);
- Laboratorio Medico Biotossicologico - PMP 3, Genova, (Dr S. Gaiter);
- Laboratorio Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura, Dipartimento di Biologia - Università Tor Vergata, Roma, (Dr. L. Migliore);
- Laboratorio Ambiente LAPO - AGIP, San Donato Milanese, MI, (Dr. M. Buffagni).
- Istituto di Ricerca sulle acque - CNR; Brugherio, MI, (Dr. L. Guzzella);

Sono state utilizzate quali sostanze test il sodiolarilsolfato, il bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ) e il solfato di rame ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ). Per ciascuna di queste sostanze è stata determinata l'EC50 a 24 ore utilizzando le seguenti concentrazioni :

Sodio lauril solfato	50-28-16-9-5 mg/L
$K_2Cr_2O_7$	50-28-16-9-5 mg/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	15-8,4-4,8-2,7-1,5 mg/L

Ciascun composto è stato saggiato conducendo tre test in parallelo; per ciascun saggio ogni concentrazione è stata saggiata in triplo. Il test di intercalibrazione ha permesso di ottenere per ogni laboratorio un valore medio di EC50 a 24 ore. Il saggio è stato condotto seguendo la metodica riportata per le acque di scarico (5.3.2) e utilizzando per la riattivazione e le diluizioni sia la soluzione ASPM che quella Istant Ocean. I risultati ottenuti sono indicati nella Tab. 1 e sintetizzati in Tab. 2.

#### BIBLIOGRAFIA

IRSA (1995): "Metodi analitici per le acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **100**, 342 pp.

Tab. 1 - Risultati dei saggi di intercalibrazione

Codice Laboratorio	Metodica	Sodiolarilsolfato		$K_2Cr_2O_7$		$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	
		media	deviazione standard	media	deviazione standard	media	deviazione standard
A	ASPM	20,9	2,2	10,2	0,6	3,6	0,3
A	Instant Ocean	19,8	3,6	9,8	1,0	3,6	0,5
B	ASPM	15,2	0,9	8,2	0,6	8,2	0,3
B	Instant Ocean	23,7	1,4	6,8	0,1	4,7	0,7
C	ASPM	32,2	0,1	13,7	2,9	4,8	0,5
C	Instant Ocean	29,5	4,5	16,1	0,1	8,0	1,2
D	ASPM	20,7	0,5	30,5	1,1	3,1	0,2
D	Instant Ocean	22,2	0,9	32,0	1,8	3,1	0,1
E	ASPM	30,1	0,7	17,2	4,1	2,9	0,2
E	Instant Ocean	33,0	0,3	11,1	1,3	3,4	0,3

Tab. 2 - Sintesi dei risultati ottenuti

Laboratori totali	Metodica	Sodiolarilsolfato		$K_2Cr_2O_7$		$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	
		media	deviazione standard	media	deviazione standard	media	deviazione standard
5	ASPM	23,2	6,5	16,0	8,4	4,5	2,0
5	Instant Ocean	25,6	5,5	15,1	9,6	4,5	2,0

# METODO PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA CON *CYPRINODON VARIEGATUS*

a cura di L. Viganò, IRSA-CNR, Brugherio (Milano)

## RIASSUNTO

Questo metodo descrive una procedura standard per saggiare gli effetti tossici acuti di acque di mare ed effluenti di scarico su *Cyprinodon variegatus*, un pesce marino appartenente alla famiglia dei Cyprinodontidae. Questo metodo per test di tossicità è consigliato per determinare la concentrazione di un effluente di scarico che è letale per il 50% degli organismi (LC50) e identificare quelle acque salmastre o marine che sono capaci di alterare significativamente la sopravvivenza dei pesci entro un intervallo di tempo definito. Una Appendice dettagliata fornisce numerose istruzioni per il mantenimento e la coltura di *C. variegatus*, i cui stadi giovanili sono utilizzati per la conduzione dei saggi.

## SUMMARY

This method describes a standard procedure for testing the acute toxic effects of sea waters and effluents on *Cyprinodon variegatus*, a marine fish belonging to the family of Cyprinodontidae. This toxicity test method is recommended for determining the concentration of a wastewater which is lethal to 50% of test organisms (LC50) and identifying brackish or sea waters which can significantly affect fish survival within a prescribed period of time. A detailed Appendix provides several instructions for holding and culturing *C. variegatus*, whose juvenile life stages are used to conduct the toxicity tests.

## 1 - INTRODUZIONE

Viene indicata nel seguito la procedura per valutare in acque di mare o in effluenti sversati in acque marine, la presenza di inquinanti a concentrazioni tali da causare effetti tossici acuti per il pesce *Cyprinodon variegatus*. L'assenza di effetti tossici acuti per un dato campione non esclude che essi siano osservabili in campioni prelevati in momenti diversi, semplicemente a causa della variabilità dello scarico o della capacità di diluizione dell'area in cui lo scarico è sversato. Si tenga presente, inoltre, che la mancata osservazione della tossicità di tipo acuto non esclude la presenza di effetti cronici.

\* Il metodo è stato discusso ed approvato dal sottogruppo "Metodi con Pesci" composto da: Arillo A., Azzoni R., Bacci E., Bonalberti L., Bucci M., Cicero A., Marchetti R. e Viganò L..

## 2 - GENERALITÀ SUL METODO

Il saggio ha una durata massima di 96 h e permette di valutare la tossicità acuta di acque di scarico e acque marine sugli avannotti del ciprinodontide *Cyprinodon variegatus*. Un campione di acqua di scarico viene comunemente saggiato per la sua tossicità a 5 diverse diluizioni con soggetti coetanei aventi età compresa tra 1 e 14 giorni. L'elaborazione del numero di individui deceduti alle diverse diluizioni nell'arco del periodo di esposizione, permette di stimare la diluizione letale per il 50% degli avannotti (LC50) relativamente al tempo di trattamento (48-96 h). Lo stesso schema sperimentale può essere adottato per la valutazione della tossicità acuta delle acque di mare recettrici. Raramente, tuttavia, esse contengono concentrazioni di contaminanti tali da permettere di individuare la relazione "dose-risposta". Più spesso il risultato si limita alla percentuale di organismi eventualmente deceduti in un campione non diluito e all'esame della significatività di tale dato. Si fa notare che la modesta differenza, pari a 3 giorni, esistente tra il presente metodo (96h) ed il corrispondente saggio cronico (7 giorni) con lo stesso organismo, fa sì che il secondo sia il più possibile da preferire, permettendo di ottenere entrambi i risultati, quello relativo alla tossicità acuta e a quella cronica, con un incremento limitato di lavoro sperimentale. Qualora si ricerchino contemporaneamente informazioni acute e croniche dallo stesso campione, la procedura deve attenersi alle indicazioni del saggio cronico (7 giorni) al quale, pertanto, si rinvia.

## 3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

### 3.1 - Materiali e strumentazione

La conduzione del test di tossicità richiede:

- almeno 12 contenitori (bicchieri) in vetro borosilicato con volume utile di 200 mL;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro, controllato da un temporizzatore per la simulazione del fotoperiodo e possibilmente da un dispositivo di transizione tra le fasi di luce e di buio;
- dispositivo per il mantenimento della temperatura delle soluzioni da saggiare a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  (o  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ) e per l'intera durata del saggio;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- misuratore di salinità;
- fonte di aria compressa a bassa pressione con diffusori a pietra porosa o cannule in vetro. Negli impianti centralizzati alimentati da un compressore, gli oli sono contaminanti comuni. Essi vanno rimossi con cartucce a carbone attivo;
- 2-4 imbuti separatori da 2 L;
- miscela di sali per la preparazione di acqua di mare sintetica. Le miscele commerciali Forty Fathoms® e HW Marinemix® hanno dato buoni risultati sia per la coltura che per la conduzione dei saggi;
- cisti di *Artemia salina* con le caratteristiche indicate in Appendice A5.

### 3.2 - Organismi per il saggio

Il saggio acuto viene allestito con gli stadi giovanili di *C. variegatus*. Sono utilizzabili individui di età compresa tra 1 e 14 giorni, che devono essere coetanei, e cioè di età che non differisce per più di 24 h. Gli avannotti possono essere acquistati da allevatori specializzati od ottenuti in laboratorio da esemplari adulti mantenuti secondo la procedura descritta in Appendice.

### 3.3 - Acqua di diluizione

In relazione alle finalità stabilite per il saggio, è possibile scegliere il tipo di acqua di diluizione più adeguato.

a) Se l'obiettivo è di stimare la tossicità acuta di un effluente producendo un dato assoluto ovvero svincolato dalle caratteristiche delle acque recettrici, verrà utilizzata un'acqua di diluizione sintetica standard. In Tab. 1 vengono elencati i sali con i rispettivi dosaggi necessari per la preparazione di acqua di mare sintetica con salinità pari a circa 31 ‰. Salinità maggiori o minori sono ottenute con quantità della miscela salina adeguate in proporzione. Per la preparazione dell'acqua di mare si usa una base di acqua Milli-Q® o deionizzata di qualità equivalente alla quale vengono aggiunti i nove sali elencati in Tab. 1, singolarmente, secondo la sequenza indicata e assicurandosi che ciascuno si sia sciolto prima dell'aggiunta del successivo.

Per lo stesso scopo sono altrimenti utilizzabili le miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quali Forty Fathoms® e HW Marinemix® o anche altre marche purché soddisfino i criteri di validità del saggio.

Si fa notare, che l'accrescimento, l'attività riproduttiva e altre manifestazioni vitali fortemente dipendenti dalla qualità dell'acqua, sono difficilmente soddisfatte da una miscela semplificata come quella riportata in Tab. 1 e, pertanto, se l'acqua sintetica deve essere impiegata anche in saggi cronici o per la coltura degli organismi, si consiglia solo l'uso di miscele complete. Il valore di salinità previsto per un saggio in condizioni standard è pari a 35 ‰.

b) Nel caso la finalità del saggio sia quella di stimare la tossicità acuta di uno scarico nelle acque recettrici non contaminate, sarà necessario usare come acqua di diluizione quella prelevata nell'area di sversamento ma al di fuori dell'influenza delle eventuali fonti di contaminazione. L'acqua di diluizione dovrebbe essere prelevata immediatamente prima del saggio e non oltre le 96 h dallo stesso. Se non usata entro le 24 h dal prelievo, l'acqua di diluizione verrà refrigerata (4°C). Se l'area recettrice è contaminata o sospettata di esserlo, si può ricorrere ad acque naturali o semisintetiche aventi caratteristiche fisiche e chimiche il più possibile simili a quelle dell'acqua recettrice.

c) Se, infine, l'obiettivo del saggio è di esaminare le interazioni, siano esse additive o antagoniste, tra i contaminanti dello scarico e quelli già presenti nell'acqua recettrice, quest'ultima sarà utilizzata come acqua di diluizione, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, purché prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. Nell'allestimento di questo tipo di saggio è necessario includere un secondo gruppo di controllo in cui gli organismi vengono esposti solo ad acqua di allevamento.

Tab.1 - Elenco dei sali di grado analitico e quantitativi necessari alla preparazione di acqua di mare artificiale di salinità 31‰.

COMPOSTO	CONCENTRAZIONE (g/L)	QUANTITA' RICHIESTA per 20 L (g)
1 NaCl	21,030	420,60
2 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,520	70,40
3 KCl	0,610	12,20
4 KBr	0,088	1,76
5 Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	0,034	0,68
6 MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	9,500	190,00
7 CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,320	26,40
8 SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,020	0,40
9 NaHCO <sub>3</sub>	0,170	3,40



Generalmente un effluente ha una salinità trascurabile. Gli organismi devono tuttavia essere esposti alle diverse diluizioni di uno scarico senza che le differenti salinità delle soluzioni possano rappresentare una fonte di stress aggiuntivo a quello dei tossici o più semplicemente una fonte di variabilità dei risultati. Si tratta pertanto di uniformare la salinità delle diverse diluizioni di acqua di scarico. A questo scopo, si dispone di due soluzioni: la prima prevede l'impiego di acqua di mare ipersalina (100 ‰) come acqua di diluizione, mentre la seconda consiste nell'aggiungere i sali commercializzati per la preparazione di acqua di mare artificiale.

Il principale vantaggio della prima soluzione è che l'acqua ipersalina può essere ottenuta, per evaporazione, da acqua di mare naturale di elevata qualità. Come tale essa contiene tutti i micronutrienti e colloidali biogenici richiesti per l'accrescimento e l'attività riproduttiva degli organismi marini, e può essere conservata per periodi prolungati senza apparente degradazione. Il limite della prima soluzione risiede nel fatto che un effluente può essere saggiato ad una concentrazione massima non superiore al 80 % se la salinità prescelta è del 20 ‰, od anche del 70 % se la salinità voluta è del 30 ‰. La seconda soluzione non presenta questo limite ma l'aggiunta di sali può, dal canto suo, modificare il pH dell'effluente o dell'eventuale acqua che richiede aggiustamenti, potendo modificare in tal modo anche la tossicità del campione. In generale, si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo 6,0-9,0 possono contribuire alla mortalità degli organismi. Se necessario il pH può essere riportato al valore desiderato con aggiunte di HCl o NaOH. Dopo l'aggiunta dei sali la soluzione viene mantenuta in agitazione moderata per circa 60 min con l'aiuto di un agitatore magnetico, e ciò per garantire che tutti i sali siano entrati in soluzione prima di introdurre gli organismi. E' consigliabile includere nella serie dei trattamenti anche un controllo con acqua preparata in modo analogo per aggiunta di sali, al fine di verificare che tale procedura non causi effetti negativi.

### 3.4 - Illuminazione

Nel corso della prova gli organismi sono esposti alle soluzioni da saggiare mantenendo le stesse condizioni di illuminazione applicate nell'area di allevamento. Le lampade fluorescenti ad ampio spettro, le stesse impiegate per illuminare gli allevamenti degli organismi nel laboratorio, devono fornire, nell'area di sperimentazione, un'intensità luminosa di circa 500-1000 lux con un fotoperiodo pari a 16 h luce e 8 h di buio. Questa intensità luminosa è quella comunemente riscontrabile nell'ambiente di laboratorio.

### 3.5 - Temperatura

Le soluzioni da saggiare sono mantenute per tutta la durata del saggio a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  mediante immersione dei contenitori in bagni termostatici o con il

condizionamento dell'intero ambiente dedicato alla sperimentazione. Se il risultato tossicologico dovrà essere utilizzato per studiare la relazione tra effetti acuti e cronici di una data sorgente di contaminazione, il saggio acuto deve essere condotto alla temperatura di  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , e cioè la stessa del saggio a 7 giorni.

### 3.6 - Alimentazione

Le giovani larve di *C. variegatus* sono nutrite con naupli di artemia fino all'avvio del saggio. Se il saggio ha una durata di 48 h, gli organismi sono mantenuti a digiuno. Se il saggio è protratto alle 96 h, l'alimentazione è sospesa per la prima metà della prova ma si provvede alla somministrazione di 0,2 mL di sospensione concentrata di naupli di artemia circa 2 h prima del rinnovo delle soluzioni, operazione che viene generalmente condotta allo scadere delle 48 h. Le artemie vengono concentrate con l'aiuto di un retino di nylon lasciando quel poco d'acqua necessario a permettere il loro trasferimento (cfr Appendice A5).

### 3.7 - Ossigeno disciolto

Poichè esiste la possibilità di una riduzione della concentrazione di ossigeno disciolto, soprattutto alle concentrazioni di effluente più elevate, si rende necessario controllare questo parametro, e con maggiore frequenza durante le prime ore del saggio. La concentrazione di ossigeno disciolto non deve essere mai inferiore al 40% del valore di saturazione (Tab. 1). In caso contrario si deve provvedere all'aerazione delle soluzioni facendo gorgogliare aria compressa priva di contaminanti mediante cannule in vetro, pipette pasteur od anche diffusori del tipo a pietra porosa. Il flusso d'aria deve essere regolato al minimo livello possibile, in modo tale da soddisfare il criterio di validità del saggio senza arrecare disturbo agli organismi. Indicativamente si può suggerire un flusso pari a 100 bolle/min. Se l'aerazione si rende necessaria per una diluizione, anche le altre dovranno essere parimenti aerate.

## 4 - PROCEDURA DI SAGGIO CON DILUIZIONE (EFFLUENTE)

### 4.1 - Saggio preliminare

Generalmente non è necessario condurre una prova preliminare con acque di scarico o del recettore, tuttavia quando ci si appresti a saggiare un campione d'acqua di qualità completamente sconosciuta può essere utile ottenere alcune informazioni preliminari per meglio individuare l'intervallo di tossicità nel cui ambito sarà poi condotto il saggio definitivo. A questo scopo si allestisce una prova semplificata e di durata ridotta rispetto a quella definitiva. Si preparano 5 diluizioni del campione, in serie geometrica ed

ampiamente spaziate tra loro; la sequenza 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% (v/v) può essere suggerita per tale scopo. Ad ogni diluizione vengono esposti 5 avannotti e dopo una durata massima di 24 h si registrano i risultati. Se lo stesso campione in esame dovrà poi essere saggiato nella prova definitiva si raccomanda di procedere nel rispetto dei limiti di conservabilità del campione stesso. Se viceversa le due prove sono condotte con campioni prelevati in momenti diversi si tenga presente che, a causa della variabilità più o meno elevata della tossicità dello scarico o del recettore, i risultati del saggio preliminare e di quello definitivo possono essere tra loro anche molto differenti.

#### 4.2 - Saggio definitivo

Per la conduzione della prova definitiva si allestiscono 5 diluizioni del campione da esaminare. La sequenza 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v), caratterizzata da un fattore di diluizione pari a 0,5, è applicabile a gran parte delle situazioni. Viceversa, basandosi anche sulle informazioni eventualmente ottenute dal saggio preliminare, si potrà adottare un diverso intervallo di sperimentazione, un diverso fattore di diluizione o anche un maggior numero di concentrazioni.

Se è stato necessario refrigerare i campioni di scarico o di acqua di diluizione, i volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Preparate le diluizioni previste con le eventuali correzioni di salinità, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima al limite del 40% del valore di saturazione si procede ad aerare i contenitori (cfr. 3.7 "Ossigeno disciolto"). Quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si introducono gli avannotti.

In un test di tossicità acuta i risultati ottenuti dalle diverse repliche vengono solitamente combinati ai fini del calcolo della LC50; ciò rende inutile, da un lato, la pratica di suddividere il gruppo di organismi in più contenitori. Per ogni diluizione di effluente e per il controllo si utilizzano almeno 10 avannotti di *C. variegatus* in soluzioni di volume minimo pari a 200 mL. Gli organismi vengono distribuiti secondo una sequenza casuale nei diversi contenitori sino al completamento del numero richiesto. Per evitare diluizioni significative delle soluzioni del saggio, è opportuno minimizzare il volume d'acqua trasferito con gli organismi.

Allo scadere delle 48 h di esposizione si procede al rinnovo delle soluzioni ed al trasferimento in queste ultime degli avannotti che già sono stati esposti per 48 h alle diluizioni di effluente corrispondenti. Se si sospetta che lo scarico contenga tossici facilmente ossidabili o degradabili o che l'eventuale aerazione aumenti la velocità di tali processi, si rende opportuno rinnovare giornalmente le soluzioni del saggio. In questo caso la procedura da seguire è analoga a quella descritta per l'allestimento della prova.

E' necessario evitare che l'eccessiva evaporazione delle soluzioni di saggio ne alteri la salinità e la concentrazione degli inquinanti. Il fenomeno può essere controllato con fogli di polietilene trasparenti, vetri di orologio o altro dispositivo atto a coprire i recipienti di saggio.

Giornalmente si osservano gli organismi e si registra il numero di avannotti deceduti, rimuovendoli al più presto dai contenitori del saggio. Sono considerati deceduti quei pesci che sono privi di movimenti opercolari o che non reagiscono ad un leggera stimolazione. E' utile disporre delle osservazioni a 24, 48, 72 e 96 h di esposizione, e può essere anche utile registrare ogni altra alterazione che sia osservabile negli avannotti trattati rispetto a quelli di controllo.

Il saggio di tossicità acuta termina allo scadere delle 96 h dal suo avvio.

Gli esemplari di *C. variegatus* sopravvissuti alle prove tossicologiche non possono essere riutilizzati. Inoltre, non appartenendo a specie indigene, non devono assolutamente essere liberati o dispersi nell'ambiente.

## 5 - PROCEDURA DI SAGGIO SENZA DILUIZIONE (CORPO IDRICO)

### 5.1 - Saggio definitivo

Per determinare se le acque del recettore contengono tossici in concentrazioni tali da causare effetti acuti, si espongono gli avannotti di *C. variegatus* a un campione non diluito delle acque del recettore stesso.

Se necessario, 24 h prima della schiusa, le uova di *C. variegatus* vengono acclimatate ad un'acqua, sia essa naturale che semisintetica, avente caratteristiche simili a quella da saggiare, almeno per quanto riguarda la salinità (cfr. Appendice). L'acqua di acclimatazione viene anche usata per l'allestimento del controllo.

A differenza del saggio con effluenti, il campione dell'area recettrice viene saggiato in quattro repliche ed altrettante ne vengono allestite per l'acqua di controllo. In ciascuna replica, avente volume di 200 mL, vengono trasferiti 10 avannotti. In questo saggio i risultati delle repliche non vengono cumulati ed al contrario, essi servono a determinare se la mortalità osservata nel campione è significativamente diversa da quella eventualmente osservata nel controllo. Le restanti condizioni sperimentali sono da considerare invariate (cfr. par. 4).

Se il campione non diluito dell'acqua del corpo recettore causa una mortalità superiore al 50% degli organismi esposti, si può procedere alla stima del grado di tossicità delle sue acque e cioè all'esame della relazione concentrazione-risposta. In questo caso si procede come è stato descritto per il saggio con diluizione (cfr. par. 4).

## 6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

I risultati dei saggi sono considerati accettabili se la sopravvivenza degli organismi di controllo è  $\geq 90\%$  e se la concentrazione di ossigeno disciolto si è mantenuta  $\geq 40\%$  del valore di saturazione nei diversi trattamenti.

Pur senza porre ulteriori vincoli alla validità dei risultati, periodicamente si consiglia la conduzione di saggi in condizioni standard con un tossico di riferimento, quale ad esempio il bicromato di potassio o il pentaclorofenolo. Questa pratica dovrebbe consentire di evidenziare condizioni sperimentali o lotti di organismi, per qualche motivo, anomali. In condizioni normali, disponendo di una congrua serie di LC50, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio di tale serie e dal doppio della corrispondente deviazione standard (media  $\pm 2$  D.S.). Viceversa, se la LC50 del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi dovrebbero essere considerati con cautela.

Con valore solamente indicativo, vengono riportati i risultati di alcune prove di intercalibrazione cui parteciparono da 4 a 6 laboratori utilizzando due sostanze tossiche, l'argento nitrate e l'endosulfan (US EPA, 1985). I saggi vennero condotti sia in condizioni statiche che in flusso continuo ed i rispettivi coefficienti di variazione furono 35 e 50%, per l'argento nitrate, e 37 e 46% per l'insetticida. Una serie di 5 saggi condotti da un medesimo laboratorio con cromo esavalente, diede 23,2 mg Cr<sup>+6</sup>/L come valore medio della 96hLC50 e un coefficiente di variazione pari a 25%. Una serie analoga di quattro saggi condotti da un diverso laboratorio diede per gli stessi parametri i valori di 21,4 mg Cr<sup>+6</sup>/L e 25,1%. La 96hLC50 del pentaclorofenolo ottenuta mediante un saggio in flusso continuo è risultata di 442 µg/L. Tutti questi dati, prodotti da autori diversi, sono tratti da McCulloch e Rue (1989).

## 7 - ANALISI DEI RISULTATI

### 7.1 - Calcolo della LC50

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta descritto in questa procedura si propone non solo l'identificazione delle sorgenti di contaminazione capaci di effetti tossici acuti ma anche la quantificazione della loro potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale al 50% degli organismi (LC50) per un dato tempo di esposizione (24-48 h). La determinazione della LC50 può essere effettuata con diversi metodi la cui applicabilità è in buona parte dipendente dal tipo di risultati ottenuti, e più precisamente dal numero di effetti parziali osservati, intermedi cioè tra la mortalità 100% e la mortalità nulla. La valutazione della LC50 dovrebbe basarsi sui risultati relativi ad almeno 5 concentrazioni di campione ed un controllo, sebbene molti metodi di analisi possono essere utilizzati con

un numero di dati inferiore. Se la massima concentrazione saggiata ha causato una mortalità inferiore al 50%, non si dovrebbe procedere al calcolo della LC50, il cui valore sarebbe in tal caso poco attendibile. Meglio ripetere il saggio, se possibile, cercando di migliorare la serie delle concentrazioni saggiate. In caso contrario la LC50 sarà più correttamente espressa come "maggiore della massima concentrazione sperimentata" (es.: 48hLC50 > 80%).

Nel metodo di saggio dedicato alla valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna* (IRSA, 1994) sono stati proposti tre diversi metodi, ampiamente validati, atti alla valutazione della LC50. Si tratta del metodo di Litchfield e Wilcoxon, del test binomiale e del metodo probit. Essi sono adeguatamente illustrati nell'ambito del metodo per *D. magna* al quale si rinvia. Infine, è opportuno segnalare che sono disponibili in commercio alcuni programmi per personal computer espressamente dedicati a diversi metodi di analisi statistica di risultati tossicologici, a questi prodotti parimenti si rinvia.

### 7.2 - Effetti da concentrazione unica

L'esame dei risultati ottenuti saggiando un campione non diluito del corpo idrico è riconducibile alla teoria del confronto tra due campioni. Nel presente schema sperimentale, i decessi osservati nelle repliche del corpo idrico e in quelle del controllo rappresentano i due campioni di dati posti a confronto.

Di fatto, se la mortalità degli organismi esposti al corpo idrico supera il valore del 10%, e cioè quel limite di decessi accettato come "naturale" in un gruppo di individui di controllo, si può già concludere che il campione contiene inquinanti a concentrazioni tossiche. Tuttavia può essere opportuno dare supporto statistico al risultato del saggio, verificando la cosiddetta ipotesi nulla o zero, e cioè che le medie dei decessi osservati nei due trattamenti siano uguali. Smentire l'ipotesi con un certo grado di probabilità, solitamente  $P = 0,05$ , equivale a verificare che la mortalità osservata per gli organismi esposti al corpo idrico è significativa.

Il test "t" è utilizzato per confrontare i due campioni e, dal momento che vi è un'attesa di contaminazione o di mortalità maggiore per il campione del corpo idrico piuttosto che per il controllo, un test unilaterale è generalmente adeguato. L'applicazione del test "t" richiede che le proporzioni di decessi osservati nelle repliche siano distribuite normalmente. Se i dati soddisfano questo requisito è necessario procedere anche alla verifica di omogeneità della varianza dei due gruppi di risultati e solo in caso affermativo è lecito passare all'esame della significatività dei decessi osservati. Se i dati non fossero distribuiti normalmente il problema viene comunemente risolto mediante opportune trasformazioni dei dati stessi. La conversione delle proporzioni di organismi deceduti nella radice quadra del loro arc sen è la trasformazione più comune. Se non si rivelasse risolutiva è necessario procedere all'esame dei risultati con metodi non parametrici. Se, a sua volta,

la condizione di omogeneità della varianza non fosse rispettata, il test "t" rimane valido ma deve essere applicato in forma modificata. Il valore calcolato per la funzione "t" è infine confrontato con il valore critico di "t" individuabile in apposite tabelle, in base al numero di gradi di libertà ed al livello di probabilità prescelto. Se il valore di "t" calcolato supera il valore tabellare, le due mortalità sono significativamente diverse. Fortunatamente sono disponibili in commercio dei programmi per personal computer che sono espressamente dedicati all'analisi statistica di risultati tossicologici e possono svolgere tutte le operazioni necessarie. A questi prodotti, pertanto, si rinvia.

## APPENDICE

### A1 - Note sulla biologia di *Cyprinodon variegatus*

La famiglia dei Cyprinodontidae include 45 generi e 300 specie distribuite in tutti i continenti, ad eccezione dell'Australia. La maggior parte delle specie sono d'acqua dolce mentre alcune popolano le acque salmastre e quelle marine costiere. Negli Stati Uniti sono presenti 13 specie del genere *Cyprinodon*, delle quali *C. variegatus* è l'unica specie marina ampiamente distribuita nelle acque costiere dell'Oceano Atlantico e del Golfo del Messico. In Italia il genere è rappresentato da una specie e cioè *C. fasciatus* noto anche coi sinonimi di *C. calaritanus* o di *Aphanius fasciatus* (Cottiglia, 1980).

Gli esemplari adulti di *C. variegatus* possono raggiungere una lunghezza totale di 93 mm, ma la lunghezza media comunemente riportata è di 35-50 mm. I maschi sono un poco più lunghi degli individui di sesso femminile ed in generale il dimorfismo è piuttosto evidente. Il corpo dei maschi è tozzo, compresso e con un certo sviluppo verticale che aumenta con l'età dell'individuo. A tale forma, il profilo superiore contribuisce maggiormente essendo più arcuato dell'inferiore. Il colore della regione dorsale è olivastro con una area verde-bluastro. Sui fianchi è presente una serie di strisce scure scarsamente definite mentre la colorazione del ventre varia dal bianco-giallastro all'arancio.

La femmina ha colorazione più chiara con varianti dall'olivastro, al bruno o all'arancio. I fianchi presentano 14 strisce scure che si alternano con 7-8 bande, parimenti scure, poste dorsalmente. Il ventre e l'area ventrale dei fianchi sono di colorazione bianco-giallastro. La pinna dorsale, all'altezza dei raggi posteriori, ha uno o due ocelli che negli individui maschili sono mancanti o trasformati in una chiazza scura poco definita.

*C. variegatus* è una specie eurialina che popola una varietà di habitat caratterizzati da acqua poco profonda, quali piccole baie, stagni salmastri, pozze di marea, potendo diventare tuttavia molto abbondante anche in aree litorali prive di vegetazione emergente, con fondali parzialmente sabbiosi e con modeste correnti o moto ondoso. E' stato anche osservato in laghi interni con elevate concentrazioni saline. La possibilità di occupare questi ambienti è

chiaramente legata alla sua tolleranza per valori estremi sia di temperatura che di salinità (Nordlie, 1987) ed è stato osservato sia in acque a salinità pressochè nulla che a salinità del 59‰ e anche superiori.

Questo pesce onnivoro è un importante componente degli ecosistemi estuariali fungendo da legame tra i livelli trofici più bassi, detrito e organismi bentonici, ed i carnivori dei livelli trofici superiori. Esso è spesso preda di specie ittiche aventi importanza commerciale o ricreativa.

*C. variegatus* si riproduce in acque di modesta profondità (2,5-60 cm) di lagune a mangrovie, pozze di marea e stagni costieri aventi fondali di sabbia, limo scuro o fango. I maschi occupano territori aventi un diametro di 30-60 cm all'interno dei quali costruiscono talvolta dei nidi. L'accoppiamento può essere indotto oltre che dalla temperatura dell'acqua anche da bruschi cambiamenti della salinità (Martin, 1972). Le uova sono pressochè bentoniche e grazie alla presenza di sottili filamenti distribuiti più o meno uniformemente sul corion, esse sono anche adesive. Calando verso il fondo si legano ad una varietà di substrati quali piante, sabbia, roccia od altro, potendo anche essere parzialmente coperte dal sedimento. Il tuorlo contiene un globulo oleoso molto grande e parecchi altri più piccoli. In relazione agli eventi climatici che caratterizzano una determinata area geografica, l'attività riproduttiva può essere pressochè continua per tutto l'arco dell'anno (Hansen e Parrish, 1977) o limitata alle stagioni favorevoli, che poi sono generalmente quella primaverile e quella estiva.

### A2 - Mantenimento degli organismi

Gli esemplari di *C. variegatus* necessari a costituire il gruppo dei riproduttori possono essere ottenuti o da allevatori specializzati o da laboratori di ricerca. In quest'ultimo caso essi possono derivare a loro volta da organismi nati in laboratorio. La periodica acquisizione di gruppi selvatici o l'impiego di organismi di prima generazione è una pratica da adottare allo scopo di minimizzare l'incrocio tra consanguinei. Qualora sia possibile ottenere gruppi di organismi selvatici, è opportuno che essi vengano mantenuti in osservazione per almeno una settimana al fine di poter individuare manifestazioni patologiche o mortalità elevate derivanti dallo stress della cattura e del trasporto. Gli individui danneggiati od ammalati devono essere scartati.

*C. variegatus* può essere allevato in condizioni semistatiche o con sistemi a flusso continuo. Questi ultimi richiedono grandi volumi d'acqua di buona qualità, il che può rappresentare un problema per talune strutture.

In laboratorio, *C. variegatus* può essere allevato dallo stadio di uovo sino a quello di adulto sessualmente maturo. I diversi stadi del ciclo vitale devono essere ospitati in vasche di dimensioni appropriate e mantenuti a temperatura ambiente, purchè compresa tra 18 e 20°C. In caso contrario è necessario adottare dei sistemi di termostatazione.

Gli adulti possono essere mantenuti sia in acqua di mare naturale che artificiale ed in vasche del tipo "tutto vetro". Se non è possibile il mantenimento in flusso continuo, le vasche devono essere dotate di un sistema di filtrazione biologica, capace cioè di rimuovere i cataboliti che altrimenti si accumulerebbero, potendo causare la morte dei pesci.

In condizioni semistatiche la densità di organismi che può essere mantenuta nelle vasche è molto legata alla capacità di depurazione del sistema di filtraggio biologico di cui esse devono essere dotate. E' comunque consigliato un volume di circa 20 L per ogni individuo adulto, volume riducibile se i risultati analitici di ammoniaca e nitriti dimostrano che il sistema è capace di trattare carichi di biomassa maggiori. Per gli avannotti è accettabile una densità di mantenimento di circa 300 larve in una vasca da 80 L.

Il sistema di filtraggio biologico, è costituito comunemente da due parti: una posizionata sul fondo delle vasche e detta pertanto "sotto sabbia", l'altra, esterna alla vasca stessa. L'acqua viene fatta fluire, mediante delle pompe di buona portata, attraverso l'unità esterna che è riempita con vari tipi di materiali inerti i quali, oltre all'azione filtrante di tipo meccanico, svolgono anche quella di supporto per la crescita dei microorganismi che operano la depurazione biologica. Il sistema di filtraggio biologico deve essere condizionato, come indicato nel seguito, prima che la vasca sia in grado di accogliere il numero di organismi desiderato. L'unità filtrante può considerarsi a regime quando si sono sviluppati batteri nitrificanti (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*) in grado di convertire ammoniaca e nitriti, prodotti dai pesci e dai residui di mangime, a nitrati.

Partendo da una vasca appena allestita, i modi più semplici di attivare il condizionamento del sistema di filtrazione consistono nell'introduzione di piccole quantità di mangime per pesci o di scarti sifonati da una vasca già in funzione o, meglio ancora, di parte dei "fanghi" del suo sistema di filtrazione. Il materiale in decomposizione causerà un aumento della concentrazione di ammoniaca al quale seguirà, dopo diversi giorni, anche un aumento dei nitriti, preceduto solitamente dalla diminuzione dell'ammoniaca stessa. La caduta al disotto dei limiti di rilevabilità delle due specie chimiche indica che il condizionamento del sistema filtrante è pressochè completato. Si tratta ora di aggiungere gradualmente i pesci continuando il controllo analitico della funzionalità del sistema biologico.

### A3 - Riproduzione in laboratorio

Gli embrioni di *C. variegatus* possono essere reperiti presso fonti esterne od ottenuti in laboratorio da individui adulti. A loro volta, le uova mature sono ottenibili o per deposizione naturale o iniettando le femmine intraperitonealmente con l'ormone gonadotropina corionica di origine umana. Nel seguito verrà esaminata solo la soluzione naturale che è generalmente da preferire. In questo caso più

deposizioni possono essere ottenute dagli stessi individui mentre, con l'iniezione ormonale, i pesci devono poi essere sacrificati per ottenere i gameti.

*C. variegatus* raggiunge la maturità sessuale dopo 3-5 mesi dalla schiusa. Se mantenuto in vasche di dimensioni adeguate e con buona alimentazione, la sua taglia è a questo stadio di circa 34 mm per il maschio e di circa 27 mm per la femmina. A questo punto il dimorfismo sessuale si rende evidente e gli individui di sesso maschile manifestano comportamento territoriale. La normale temperatura di mantenimento anche degli organismi sessualmente maturi deve aggirarsi sui 18-20°C, mentre per indurre l'attività riproduttiva i pesci adulti vengono trasferiti nelle vasche di deposizione, che sono mantenute alla temperatura di 25°C.

E' importante che gli organismi in riproduzione siano mantenuti in un'area del laboratorio lontana da fonti di disturbo, impiegando a tale scopo anche dei pannelli con i quali circoscrivere la zona dedicata all'allevamento. Occorre, inoltre, fare attenzione che fonti luminose esterne non interferiscano con il fotoperiodo artificiale applicato in detta zona.

Il numero di individui dedicati alla riproduzione e di conseguenza il numero delle vasche, dipende dalla richiesta di avannotti per la sperimentazione tossicologica. Una femmina adulta produce mediamente 10-30 uova per deposizione, potendosi riprodurre varie volte a intervalli di 1-7 giorni. Per ottenere gli embrioni necessari ad un saggio, normalmente si trasferiscono 8-10 femmine e 3 maschi in una vasca di riproduzione avente volume di circa 60 L, temperatura di 25°C e con fotoperiodo pari a 16 h luce e 8 h di buio. Il trasferimento viene effettuato 7-8 giorni prima dell'allestimento del saggio.

All'interno della vasca di riproduzione vengono alloggiati una camera di deposizione ed una sorta di vassoio per la raccolta degli embrioni. La camera è realizzata con rete di nylon® con maglia di 3-5 mm, od altro materiale atossico, atto alla realizzazione di un cesto avente dimensioni di circa 20 x 35 x 22 cm di altezza, che viene alloggiato all'interno della vasca. Per la realizzazione del vassoio di raccolta, si consiglia l'uso di griglie di materiale plastico con celle di dimensione 14 x 14 x 14 mm. Il vassoio è completato da una rete, con maglia di 250-500 µm, che viene incollata, con collante siliconico (per acquari), ad un lato (base) della griglia stessa. Tale accessorio semplifica la rimozione e la manipolazione delle uova.

Le uova fecondate cadono attraverso la rete di base della camera di deposizione e vanno ad aderire sulla superficie del vassoio di raccolta, che è posizionato in corrispondenza, sul fondo della vasca di riproduzione. Al mattino, si procede all'ispezione del vassoio di raccolta. Se il vassoio di raccolta non contiene sufficienti embrioni dopo le prime 24 h, quei pochi vengono scartati, si riposiziona il supporto, e si raccolgono le uova prodotte nelle successive 24 h. Per mantenere il più possibile pulita l'area di adesione degli embrioni, gli adulti vengono nutriti quando i supporti di raccolta sono rimossi. I vassoi con le uova

deposte entro le 24 h, vengono raccolti dalle vasche di riproduzione e le uova sono delicatamente asportate con l'aiuto di una spruzzetta o di uno spazzolino morbido. Terminata la raccolta del numero di uova necessarie alla sperimentazione, gli individui adulti sono riportati alle vasche di mantenimento (18-20°C), facendo sempre molta attenzione alla gradualità dei cambiamenti di temperatura. Se la frequenza di sperimentazione è elevata, è anche possibile garantire un rifornimento di uova pressoché quotidiano. A questo scopo si utilizza una vasca avente volume di circa 300 L, nella quale vengono mantenuti degli individui adulti, approssimativamente 12-15 maschi con 50-60 femmine, alla temperatura di 23-25°C. Le uova fecondate vengono prodotte quotidianamente e quando necessario, è sufficiente posizionare i vassoi di raccolta sul fondo della vasca. Quattro vassoi, ciascuno con dimensioni di circa 20 x 45 cm, possono coprire l'intero fondo della vasca. Il mattino seguente si procede alla loro ispezione in accordo a quanto già descritto. Indipendentemente dalla modalità riproduttiva prescelta, annualmente si procede alla sostituzione dei riproduttori con organismi provenienti da altri laboratori ma preferibilmente selvatici. Il rinnovo può essere effettuato anche con frequenza maggiore come nei casi in cui si osserva una diminuzione della fertilità degli organismi od ogni volta che l'elevata frequenza degli eventi riproduttivi o l'età avanzata dei riproduttori lo rendono consigliabile.

#### **A4 - Incubazione degli embrioni**

Generalmente le uova ottenute da diverse unità di deposizione vengono raccolte in un unico contenitore per garantire il numero di embrioni sufficiente all'allestimento di uno o più saggi. Le uova sono poi trasferite in una scatola petri o in un cristallizzatore riempito con acqua di diluizione fresca e vengono esaminate con un microscopio binoculare al fine di scartare quelle non fecondate, che presentano muffe o altri danni. Gli embrioni vengono incubati in cristallizzatori, alla temperatura di 25°C e con un fotoperiodo di 16 h di luce/8 h di buio. In ogni cristallizzatore viene posizionato un diffusore a pietra porosa col quale si assicura un'aerazione continua e moderata per tutta la durata dell'incubazione. L'acqua dei cristallizzatori è rinnovata quotidianamente. Se la salinità dell'acqua di diluizione del saggio è diversa da quella delle vasche di incubazione, 24 h prima della schiusa si provvede ad adeguare la salinità di queste ultime. L'adeguamento è tuttavia limitato a valori compresi tra il 20 e il 35‰ di salinità. Gli embrioni schiudono in 6-7 giorni a 25 °C, e in 4-5 giorni a 30°C.

#### **A5 - Alimentazione**

##### **A5.1 - Generalità**

Le colture di *C. variegatus* vengono alimentate giornalmente con quantità sufficienti di cibo di elevata

qualità. Gli adulti e gli stadi giovanili sono nutriti con *A. salina* congelata e mangime per pesci in scaglie. Le larve vengono invece nutrite con naupli vivi appena schiusi di *A. salina* e mangime sbriciolato (per la schiusa di *A. salina* cfr Appendice). In generale, la quantità di cibo considerata ottimale è quella che viene prontamente consumata dai pesci. Per gli avannotti, tuttavia, soprattutto se il cibo è somministrato una volta al giorno, è preferibile dare un quantità di naupli di *Artemia* in leggero eccesso rispetto al consumo immediato, di modo che alcuni di essi restino sempre disponibili nelle vasche dei neonati.

E' necessario evitare che nelle vasche si accumulino cibo non consumato, naupli deceduti, feci od altro residuo organico e particolarmente quando si operi in condizioni semistatiche. Almeno con frequenza settimanale o più spesso se necessario, si provvede a rimuovere dal fondo delle vasche i residui con un sifone. Anche l'eccessiva crescita di alghe deve essere controllata periodicamente mediante rimozione, anche se non completa, poichè queste alghe costituiscono un'integrazione della dieta.

##### **A5.2 - Idoneità della dieta**

In particolari condizioni ambientali il crostaceo *Artemia salina* produce delle cisti quiescenti che permangono vitali per lunghi periodi di tempo, purchè conservate all'asciutto e in condizioni anaerobiche (ASTM, 1992). Talvolta le cisti di *Artemia* sono indicate, impropriamente, come "uova"; in realtà si tratta di un embrione, allo stadio di gastrula, racchiuso da una cuticola che lo protegge dalla disidratazione. La resistenza di tale stadio quiescente fa sì che esso possa essere facilmente trasportato e commercializzato, e grazie alla sua praticità, venire ampiamente utilizzato in acquacoltura e in acquariologia per nutrire molti organismi acquatici. Reidratando le cisti in acqua di mare si riattiva lo sviluppo embrionale e dopo circa 24 h, ne schiudono i naupli al primo stadio di sviluppo.

Le varietà geografiche e le corrispondenti fonti commerciali di cisti di *Artemia* sono numerose; tuttavia è stato osservato che il contenuto di contaminanti, le dimensioni del nauplio e la composizione in acidi grassi, differiscono ampiamente, influenzando sulla idoneità del prodotto quale fonte di cibo (ASTM, 1992). Le cisti provenienti dal Brasile o dalla Columbia si sono dimostrate idonee sia per la modesta contaminazione che per le dimensioni adeguatamente ridotte delle giovani larve (US EPA, 1988). Anche altre aree di provenienza possono comunque rivelarsi adeguate, ma in ogni caso, l'unico modo di valutare l'accettabilità di una varietà di cisti è di condurre prove di alimentazione grazie alle quali si possono esaminare gli effetti su sopravvivenza e crescita di *C. variegatus*. Analogamente, anche se il fornitore rimane lo stesso, è necessario che ciascun nuovo lotto di cisti venga saggiato per verificarne l'idoneità. In entrambi i casi, si procede come segue: si conducono in parallelo due saggi cronici di 7 giorni, per ciascuno dei quali

sono utilizzate almeno 3 repliche di 10-15 organismi ognuna. Il primo gruppo viene alimentato con i naupli di *Artemia* giudicati a suo tempo idonei e che hanno pertanto valore di riferimento, il secondo gruppo viene invece nutrito con i naupli schiusi dal lotto in esame. La frequenza di somministrazione del cibo, la sua quantità, il volume dei recipienti e dell'acqua di mare in essi contenuta e tutto quanto caratterizza il saggio non deve essere modificato rispetto alla procedura di saggio cronico (vedi "Metodo per test di tossicità cronica (7 giorni) con *Cyprinodon variegatus*"). La nuova fonte di cibo viene considerata idonea se non si osservano differenze statisticamente significative tra i due trattamenti relativamente a sopravvivenza e crescita.

Ogni nuovo lotto dovrebbe anche essere analizzato per il contenuto di pesticidi organoclorurati e PCB. Se questi superano complessivamente la concentrazione di 0,3 µg/g (peso fresco), le cisti di *Artemia* non dovrebbero essere utilizzate (US EPA, 1988). E' quindi buona norma effettuare le necessarie analisi su un piccolo quantitativo di cisti, e nel caso si ottengano i risultati attesi, si può procedere all'acquisto di un lotto di notevoli dimensioni che potrà servire per diversi anni (ASTM, 1992).

#### A5.3 - Preparazione della dieta

Un imbuto separatore con un volume di 2 L costituisce un pratico contenitore per la schiusa delle cisti. Si utilizza 1 L di acqua di mare naturale o sintetica ma anche una soluzione contenente 35 g di NaCl si presta allo scopo. Si aggiungono 10 mL di cisti di *Artemia* e si aerano intensamente con un tubetto di vetro posizionato in modo che la sua estremità sia sul fondo dell'imbuto. Il tempo di schiusa, comunemente espresso come T<sub>90</sub> (numero di ore necessario alla schiusa del 90% delle cisti), varia in relazione all'area geografica di provenienza e alla temperatura di incubazione. Tuttavia, con una temperatura di 27°C le uova dovrebbero schiudere in circa 24 h. Dopo tale periodo si arresta l'aerazione e i gusci ormai vuoti si portano in superficie mentre i naupli si raccolgono sul fondo dal quale vengono prelevati mediante apertura del rubinetto dell'imbuto. Sfruttando la fototassia positiva delle larve, la raccolta può essere agevolata oscurando la parte superiore dell'imbuto. Tale operazione non deve protrarsi oltre i 5-10 minuti in quanto, l'elevata concentrazione di organismi raggiunta sul fondo del contenitore fa sì che, sospeso il gorgogliamento, l'ossigeno disciolto venga rapidamente esaurito provocando la morte dei naupli. L'apertura alterna del rubinetto dell'imbuto separatore consente di rimuovere a più riprese i naupli appena schiusi. Questi verranno filtrati e se necessario risciacquati o concentrati in mezzo fresco con l'aiuto di un contenitore col fondo di rete (maglie di 150 µm).

Il nauplio di *Artemia* è incapace di nutrirsi di fonti di cibo esterne per un periodo di circa 24 ore dalla schiusa (25°C), durante le quali utilizza le riserve di tuorlo di cui è provvisto. In questo arco di tempo il

valore nutrizionale e calorico del nauplio decadono progressivamente, e pertanto si consiglia di utilizzarlo subito dopo la schiusa o comunque entro le 2-6 ore dal T<sub>90</sub> (ASTM, 1992). Grazie alla ripetibilità del tempo necessario alla schiusa delle numerose varietà di *Artemia* (T<sub>90</sub> a temperatura costante), l'idratazione delle cisti può essere effettuata in base al momento giudicato più opportuno per la raccolta e la somministrazione dei naupli appena schiusi. A parità di altre caratteristiche tossicologiche e nutrizionali, la ridotta dimensione del nauplio deve costituire il criterio guida nella scelta della fonte commerciale di *A. salina*, e ciò per favorire l'attività predatoria degli avannotti di *Cyprinodon* (US EPA, 1988).

#### A6 - Acqua di mare artificiale

L'acqua di mare artificiale destinata al mantenimento in coltura di *C. variegatus* è preparata solubilizzando delle miscele di sali pronte all'uso e commercializzate a tale scopo. Nella versione originale del metodo US EPA per saggiare effetti cronici (7 giorni) con questo organismo è consigliata la miscela Forty Fathoms<sup>®</sup>, che ha fornito, in prove comparate, i migliori risultati (EPA, 1988). La miscela di sali viene disciolta in acqua deionizzata di buona qualità, Milli-Q<sup>®</sup> o equivalenti, in quantità tali da ottenere salinità comprese tra 20 e 30‰. Le istruzioni fornite con le confezioni di sali marini devono essere seguite scrupolosamente ed i sali devono essere solubilizzati in contenitori dedicati a tale scopo e non nelle vasche di mantenimento dei pesci. Prima del suo impiego, l'acqua artificiale viene aerata moderatamente per 24 h e lasciata in quiete per qualche giorno. L'aerazione porterà il pH, l'ossigeno disciolto ed altri gas in condizioni di equilibrio. Prima del suo impiego, la concentrazione di ossigeno nell'acqua artificiale deve risultare compresa tra il 90 e il 100% del valore di saturazione (Tab. 1).

Con frequenza mensile si provvede al ricambio di almeno 1/4 dell'acqua di mantenimento o preferibilmente, di circa 1/10 ogni 15 giorni. L'acqua nelle vasche deve essere limpida. Se al contrario si presentasse opalescente o colorata, deve essere sostituita per almeno il 50%. L'acqua utilizzata per il rinnovo deve avere oltre al contenuto di ossigeno indicato, anche la stessa temperatura e salinità di quella di mantenimento. L'evaporazione nelle vasche e il conseguente aumento di salinità vengono compensati mediante aggiunta di acqua deionizzata o Milli-Q<sup>®</sup>. Occorre provvedere inoltre all'aggiunta periodica di microelementi utilizzando delle soluzioni pronte all'uso e commercializzate per tale scopo. I dosaggi e la frequenza d'impiego sono indicati dal produttore.

Oltre al controllo delle concentrazioni di ammoniaca e nitriti, si consiglia di effettuare frequenti misurazioni di altri parametri aventi valore critico per il successo della coltura, quali: temperatura, pH, alcalinità, ossigeno disciolto ed anche nitrati. Nelle vasche di mantenimento e di coltura il tenore di ossigeno deve essere sempre maggiore del 60% della saturazione (Tab. 1), ottenibile ricorrendo, se necessario, a

diffusori a setto poroso. Il pH non deve scendere al di sotto di 7,5 e l'ambito di accettabilità è compreso tra 7,5 e 8,3. Nelle vasche a ciclo chiuso, in conseguenza a condizioni di elevato carico di organismi (sovraffollamento), alla somministrazione di cibo in eccesso e all'accumulo di rifiuti, è frequente osservare la diminuzione del valore di pH. In questi casi, rimossa la causa dell'acidificazione, il valore accettabile di pH può essere ristabilito mediante rinnovo di più del 50% dell'acqua della vasca con acqua di mare artificiale. Si raccomanda, infine, che i livelli di ammoniaca totale e di ione nitroso siano inferiori a 0,1 mg/L e che la concentrazione di ione nitrico non superi i 20 mg/L.

#### A7 - Organismi per il saggio

Per il saggio di tossicità acuta possono essere utilizzati individui di età compresa tra 1 e 14 giorni. Se si utilizzano gli avannotti entro 1-2 giorni dalla schiusa, è possibile mantenerli nei cristallizzatori in cui sono stati raccolti. Viceversa, superato questo limite, i giovani individui devono essere trasferiti in una vasca di mantenimento. Tutte le operazioni di trasferimento delle larve vengono effettuate con un tubetto di vetro avente diametro interno di 6-9 mm e lunghezza di 20-30 cm, provvisto di un bulbo elastico per l'aspirazione. L'uso dei retini solitamente impiegati per trasferire i pesci di maggiori dimensioni, è in questo caso sconsigliato, potendo causare elevate mortalità degli avannotti.

#### BIBLIOGRAFIA

ASTM (1992): "Standard practice for using brine shrimp nauplii as food for test animals in aquatic toxicology", American Society for Testing and Materials, ASTM E 1203-92.

Cottiglia, M. (1980): "Pesci lagunari", *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane*, Vol. 1, C.N.R. AQ/1/90, pp 140.

Hansen, D.J. e P.R. Parrish (1977): "Suitability of sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) for life-cycle toxicity tests", in: *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, ASTM STP 634. F.L. Mayer e J.L. Hamelink, eds. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 117-126.

IRSA (1994): "8020 - Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*", In "Metodi analitici per le acque", *Quad. Ric. Ist. Acque*, **100**, 336-342.

Martin, F.D. (1972): "Factors influencing local distribution of *Cyprinodon variegatus* (Pisces: Cyprinodontidae)", *Trans. Am. Fish. Soc.*, **101**, 89-93.

McCulloch, W.L. e W.J. Rue (1989): "Evaluation of a seven-day chronic toxicity estimation test using

*Cyprinodon variegatus*", In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*: 12th vol. ASTM STP 1027, U.M. Cowgill and L.R. Williams, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 355-364.

Nordlie, F.G. (1987). Plasma osmotic Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> regulation under eurhyaline conditions in *Cyprinodon variegatus* Lacepede. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **86A**, 57-61.

Richards, F.A. and N. Corwin (1956): "Some oceanographic applications of recent determinations of the solubility of oxygen in seawater", *Limnol. Oceanogr.*, **1**, 263-267.

US EPA (1985): "Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms", W.H. Peltier C.I. Weber, U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-85/013, Cincinnati, OH.

US EPA (1988): "Sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larval survival and growth test. Method 1004", in: *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*, C.I. Weber, W.B. Horning, D.J. Klemm, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, E.L. Robinson, J. Menkedick e F. Kessler, eds. EMSL, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA-600/4-87-028.



# METODO PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA CON TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)<sup>\*</sup>

a cura di L. Viganò, IRSA-CNR, Brugherio (Milano)

## RIASSUNTO

Il metodo qui descritto è strutturato per consentire l'esame degli effetti tossici acuti di acque di scarico o acque naturali su un pesce d'acqua dolce quale la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). La procedura di saggio può essere utilizzata per determinare la concentrazione di campione che è letale per il 50% degli organismi (LC50) o se il campione può causare effetti letali significativi entro un tempo di esposizione prestabilito. In Appendice sono riportati numerosi dati e suggerimenti che dovrebbero costituire una guida raccomandata per il trasporto ed il mantenimento dei pesci, per la scelta dell'acqua e delle attrezzature, per l'acclimatazione e l'alimentazione dei pesci.

## SUMMARY

The method described here is designed for the analysis of acute toxic effects of effluent discharges and receiving waters on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a freshwater fish. This test procedure is used to determine the concentration of a sample that is lethal to 50% of the organisms (LC50) or if a sample can cause significant mortality within a defined period of time. In the Appendix are included several data and instructions which should represent a guidance for fish transport and holding, equipment and water selection, fish feeding and acclimation.

## 1 - INTRODUZIONE

Viene indicata nel seguito la procedura standard per condurre dei saggi con trota su campioni di effluenti e su acque prelevate da corpi idrici recettori, allo scopo di individuare la presenza di sostanze tossiche in quantità tali da causare effetti tossici acuti. L'assenza di effetti acuti non preclude la possibilità di effetti cronici. Inoltre, a causa della variabilità temporale di uno scarico, un risultato negativo con un dato campione non esclude il riscontro di effetti tossici acuti in campioni prelevati in diversi momenti.

## 2 - GENERALITÀ SUL METODO

Sia per i saggi su effluenti che per quelli sul recettore, si utilizzano giovani esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), reperibili presso gli

<sup>\*</sup>Il metodo è stato discusso ed approvato dal sottogruppo "Metodi con Pesci" composto da: Arillo A., Azzoni R., Bacci E., Bonalberti L., Bucci M., Cicero A., Marchetti R. e Viganò L..

allevamenti ittici. Nel primo caso, almeno cinque gruppi di organismi vengono esposti ad altrettante diluizioni di uno scarico e, al termine del periodo di esposizione, il numero di pesci deceduti nei diversi gruppi viene utilizzato per determinare la diluizione letale per il 50% degli organismi (LC50).

Anche nel caso del corpo idrico recettore si può esaminare una serie di diverse diluizioni, ma più spesso si ricorre ad un unico campione non diluito, poichè, raramente, il corpo idrico dà luogo a effetti tossici acuti di tale entità da permettere di valutare la relazione "concentrazione-risposta". Il risultato si limita, in questo caso, alla percentuale di organismi deceduti ed all'esame statistico della sua significatività.

## 3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

### 3.1 - Materiali e strumentazione

Oltre alla comune strumentazione di laboratorio, la conduzione del saggio di tossicità richiede:

- vasche o recipienti in vetro aventi capacità netta di 5 L e che consentano di mantenere un livello del liquido non inferiore a 15 cm; l'adozione di volumi diversi deve sempre soddisfare il limite di carico di biomassa che è fissato al valore massimo di 0,5 g/L giorno<sup>-1</sup>;
- retini di varie dimensioni per il trasferimento dei pesci;
- reti o coperture trasparenti in materiale atossico per evitare la fuoriuscita degli animali dalle vasche;
- un dispositivo atto alla termostatazione delle soluzioni a 15 ± 1°C. Il condizionamento dell'ambiente di lavoro o l'immersione dei recipienti di saggio in bagni termostatati sono tra le soluzioni più comunemente adottate;
- ove possibile, detto ambiente potrà essere attrezzato con un sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro provvisto di temporizzatore e preferibilmente di un dispositivo per la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- sistema di aerazione a bassa pressione fornito di diffusori a pietra porosa o cannule in vetro. Oli ed altri vapori organici sono contaminanti frequenti degli impianti ad aria compressa e devono essere rimossi con filtri di carbone attivo.

I materiali di fabbricazione di vasche, tubi od altro oggetto destinato ad entrare in contatto con i campioni da saggiare o con l'acqua di diluizione e di mantenimento, devono essere scelti accuratamente. Il vetro borosilicato e le plastiche fluorurate dovrebbero essere impiegati ovunque possibile al fine di minimizzare l'assorbimento e il rilascio di sostanze tossiche. Gli oggetti costruiti con questi materiali possono essere riutilizzati dopo le necessarie procedure di pulizia. Materie plastiche quali il polietilene, il polipropilene, il Tygon<sup>®</sup>, o altre ancora, possono trovare usi limitati come nel prelievo e nel

trasporto dei campioni da saggiare, ma non devono essere riutilizzate. Al contrario, contenitori costruiti con questi materiali, con polietilene ad alta densità in particolare, ben si prestano ad essere specificamente riutilizzati per conservare acque di diluizione o acque sintetiche preparate in laboratorio. La fibra di vetro può essere impiegata per le vasche di mantenimento dei pesci come pure per la conservazione di grossi volumi di acqua. In ogni caso si raccomanda che a prescindere dalla natura dei materiali prescelti, sia i recipienti che gli accessori vengano sciacquati accuratamente, meglio se in flusso continuo, con l'acqua di diluizione o di mantenimento prima del loro impiego nei saggi.

### 3.2 - Organismi per il saggio

Per la conduzione del saggio devono essere utilizzati i giovani esemplari di trota iridea (*O. mykiss*) il cui stadio vitale può variare tra l'organismo che si nutre autonomamente da almeno un paio di settimane ( $\geq 0,1$  g; circa 2 cm) fino a quello avente lunghezza inferiore ai 6 cm, il cui peso dovrebbe risultare inferiore ai 3 g. Qualora siano disponibili più gruppi di organismi rispondenti a tale requisito, si dovrà sempre privilegiare lo stadio più precoce. Gli stadi più precoci consentono infatti di rispettare più facilmente il rapporto "peso dei pesci/volume di soluzione". Questo rapporto non deve essere superiore a 0,5 g/L se le soluzioni sono rinnovate giornalmente, od anche 0,25 g/L se si effettua il rinnovo con la frequenza minima prevista di 48h ( $0,5 \text{ g/L} \cdot \text{d}^{-1}$ ). In ogni caso, le dimensioni degli organismi devono essere il più possibile omogenee e tali che, per uno stesso saggio, la lunghezza delle trotelle più grandi dovrebbe essere inferiore al doppio di quella delle più piccole (EPS, 1990).

In base alle condizioni esistenti in trocicoltura o a quelle di mantenimento in laboratorio, può essere necessario acclimatare gli organismi alle condizioni previste per il saggio tossicologico (cfr. Appendice). Considerando che un saggio può articolarsi in una prova preliminare ed in una definitiva, il numero di organismi necessari a completare la sperimentazione e che eventualmente, dovrebbero essere acclimatati, si aggira sul centinaio.

Gli organismi sopravvissuti ad un saggio non potranno venire riutilizzati in prove successive.

### 3.3 - Acqua di diluizione

Le diverse diluizioni di un effluente sono preparate usando, quale acqua di diluizione, la stessa a cui sono state acclimate le trotelle. In funzione delle finalità del saggio si potranno scegliere diverse soluzioni. In particolare:

a) Se lo scopo è di evidenziare la presenza di effetti tossici acuti e il loro andamento nel tempo o fare confronti tra la tossicità di diversi effluenti, si adotterà un'acqua sintetica (standard), avente durezza di circa

150 mg/L  $\text{CaCO}_3$  per la cui preparazione si aggiungono sali di grado analitico ad acqua deionizzata di buona qualità o Milli-Q. Per un litro di acqua standard si solubilizzano nell'ordine: 10 mg di KCl, 192 mg di  $\text{NaHCO}_3$ , 53 mg di  $\text{MgSO}_4$  e 183 mg di  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Il mezzo così ottenuto ha 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.

b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità acuta dell'effluente nelle acque del recettore, si userà l'acqua non contaminata dello stesso (se non tossica), prelevata a monte dell'immissione o al di fuori dell'area esposta a fonti di contaminazione. Nel caso essa non sia disponibile, si può utilizzare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale od un'acqua sintetica aventi approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purchè 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 h dallo stesso, mantenendo refrigerati i campioni ( $4^\circ\text{C}$ ) quando se ne faccia uso a più di 24 h dalla raccolta.

c) Se, infine, lo scopo del saggio è quello di esaminare gli eventuali effetti additivi dei contaminanti presenti nello scarico e di quelli presenti nel recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. In questo caso è necessario aggiungere un gruppo di organismi di controllo esposti alla sola acqua di mantenimento o di acclimatazione.

### 3.4 - Illuminazione

Durante il saggio vengono mantenute le stesse condizioni di illuminazione cui gli animali sono stati acclimatati. Pertanto il fotoperiodo consigliato è di circa 16 h di luce e 8 h di buio. Deve essere evitata la luce solare diretta optando invece per le intensità luminose pari a quelle comunemente riscontrabili nei laboratori (500 - 1000 lux) o più attenuate.

### 3.5 - Temperatura

La temperatura delle soluzioni da saggiare deve essere mantenuta a  $15 \pm 1^\circ\text{C}$  per tutta la durata delle prove.

### 3.6 - Alimentazione

La somministrazione di cibo viene interrotta 24 h prima dell'inizio, del saggio durante il quale gli organismi non vengono alimentati.

### 3.7 - Ossigeno disciolto

E' necessario misurare quotidianamente la concentrazione di ossigeno disciolto ma più frequentemente durante le prime ore dall'avvio del saggio. Essa deve risultare  $\geq 60\%$  del valore di saturazione.

Nei test statici è frequente, soprattutto alle concentrazioni più elevate di effluente di scarico, che l'ossigeno disciolto scenda al di sotto del limite indicato. E' necessario in questi casi aerare le soluzioni del saggio facendovi gorgogliare aria priva di contaminanti utilizzando diffusori di spugna di vetro, pipette di vetro o, se compatibili, anche diffusori a pietra porosa. Compatibilmente con il tenore di ossigeno richiesto, l'aerazione deve essere regolata sul minimo flusso possibile, sia per non disturbare gli organismi che per minimizzare la perdita di eventuali tossici volatili.

## 4 - PROCEDURA DI SAGGIO CON DILUIZIONE (EFFLUENTE)

### 4.1 - Saggio preliminare

Quando ci si appresta alla conduzione di un saggio con un effluente di qualità sconosciuta, può essere consigliabile, ma non vincolante ai fini procedurali, acquisire dati preliminari sulla sua potenzialità tossica. Il saggio preliminare, normalmente impiegato a tale scopo, consiste in una prova a breve termine con almeno cinque diluizioni di scarico che siano ampiamente spaziate tra loro secondo una serie geometrica. Le diluizioni di effluente, comunemente espresse come percentuali di effluente sul totale della soluzione da saggiare (v/v), possono essere indicativamente le seguenti: 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% più un controllo con sola acqua di diluizione. Per ciascuna soluzione, saggiata in una sola replica, vengono utilizzati 5 organismi ed il tempo di esposizione è limitato alle 24 h. Al termine della prova è generalmente possibile individuare un ambito di tossicità acuta definito, ad un estremo, dalla completa mortalità degli organismi, ed all'estremo opposto dalla loro completa sopravvivenza. Se lo stesso campione di scarico dovrà essere poi impiegato anche nel saggio definitivo, è opportuno che i tempi di campionamento e di conservazione siano correttamente calcolati.

Si deve tenere presente che il saggio definitivo e quello preliminare possono dare risultati significativamente diversi e sostanzialmente per due motivi: a) poichè il saggio definitivo ha una durata superiore (96h) a quella del preliminare e b) poichè le due prove possono essere condotte con campioni

prelevati in tempi diversi che, come conseguenza della variabilità degli scarichi, possono avere contenuti di tossici anche molto differenti.

### 4.2 - Saggio definitivo

Per condurre la prova definitiva si preparano almeno 5 diluizioni del campione di effluente più un controllo con acqua di diluizione. Esse vengono allestite in due repliche da 5 litri ciascuna e, fatta eccezione per particolari intervalli di tossicità evidenziati con il test preliminare, le diluizioni di effluente di scarico comunemente adottate sono le seguenti:

100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v)

Queste diluizioni sono in serie geometrica, con fattore di diluizione pari a 0,5. Secondo questa procedura il test definitivo richiede un volume di circa 40 L di effluente di scarico essendo previsto almeno un rinnovo delle soluzioni allo scadere delle 48 h. Indicazioni più precise sul volume da prelevare non possono essere date in quanto detto volume dipende dal grado di tossicità del campione e dalla taglia degli organismi disponibili per il saggio (cfr. 3.2 "Organismi per il saggio").

Se dopo 1-2 ore dall'avvio del saggio si osserva la completa mortalità degli organismi alle concentrazioni più elevate (100 e 50%), si consiglia di aggiungere altre concentrazioni alla serie indicata, quali 3,1%, 1,5%, 0,75%. I tempi di osservazione degli effetti causati dalle concentrazioni aggiunte andranno adeguati in base al ritardo di allestimento.

La pratica di cumulare i risultati ottenuti dalle repliche di ogni diluizione fa sì che il loro allestimento risponda solo a requisiti di tipo pratico, quali la facilità di osservazione degli organismi, il più facile controllo del carico di biomassa per litro di soluzione o la possibilità di non perdere completamente il risultato di una diluizione qualora l'unica replica andasse perduta o scartata per un qualsiasi motivo. Se, tuttavia, altre motivazioni pratiche risultassero prioritarie (spazio limitato, eccessivo numero di recipienti etc.), le cinque diluizioni del saggio possono essere allestite in unica replica adeguando di conseguenza i volumi e il numero di organismi.

I volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ . Preparate le diluizioni previste, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse inferiore al limite del 60% del valore di saturazione si procede ad aerare i contenitori (cfr. 3.7 "Ossigeno disciolto"). Quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si introducono gli animali. Si raccomanda che il trasferimento degli organismi dalla vasca di acclimatazione ai contenitori del saggio venga effettuato con gli appositi retini, rapidamente e con la massima cura, al fine di minimizzare lo stress e non danneggiare gli organismi. Si raccomanda inoltre che l'ordine di trasferimento sia secondo una sequenza casuale, evitando, per esempio, di completare una diluizione

per passare poi alle successive. Subito dopo il trasferimento i recipienti dovranno essere coperti con reti o coperture trasparenti per impedire la fuoriuscita degli organismi.

A 24, 48, 72 e 96 h si registrano e si rimuovono gli organismi deceduti. Sono considerati tali quei pesci che non dimostrano movimenti opercolari o che non reagiscono ad un leggera stimolazione. Può essere utile registrare ogni altra alterazione osservabile quale il cambiamento della colorazione, la perdita di equilibrio, il nuoto scoordinato, l'aumentata velocità respiratoria ed altre ancora.

Allo scadere delle 48 h di esposizione si procede al rinnovo delle soluzioni ed al trasferimento in queste ultime delle trote che già sono state esposte per 48 h alle diluizioni corrispondenti di effluente. In presenza di tossici facilmente ossidabili o degradabili o se l'eventuale aerazione aumenta la velocità di tali processi, può essere opportuno rinnovare giornalmente le soluzioni.

Il saggio di tossicità acuta termina allo scadere delle 96 h.

## 5 - PROCEDURA DI SAGGIO SENZA DILUIZIONE (CORPO IDRICO)

### 5.1 - Saggio definitivo

Per il saggio di tossicità acuta sulle acque di un corpo idrico recettore, generalmente si espongono gli esemplari di trota a un campione non diluito.

In questo tipo di saggio i giovani organismi devono essere acclimatati ad un'acqua naturale, semisintetica o sintetica che sia simile a quella del corpo idrico da saggiare almeno per la sua durezza totale (per l'acclimatazione cfr. Appendice). Come precisato nella metodica per saggi su effluenti di scarico, anche in questo caso l'acqua di acclimatazione delle trote viene usata per l'allestimento della prova di controllo.

A differenza del saggio con effluenti, il campione del corpo idrico recettore viene saggiato in quattro repliche ed altrettante ne vengono allestite per l'acqua di controllo. In ciascuna replica vengono trasferiti 10 organismi.

In questo saggio i risultati delle repliche non vengono cumulati e, al contrario, contribuiscono a determinare se la mortalità eventualmente osservata nel campione è significativa. Per l'allestimento e la conduzione del saggio sul corpo idrico valgono tutte le indicazioni date per quello sugli effluenti.

Se il campione non diluito dell'acqua del corpo recettore causa una mortalità superiore al 50% degli organismi esposti, si può procedere alla stima del grado di tossicità delle sue acque e cioè all'esame della relazione dose-risposta. A questo scopo si procede esattamente come per il saggio su un effluente. In questo caso può essere preferibile definire la serie delle 5 diluizioni secondo un fattore di diluizione  $> 0,5$ .

## 6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

I risultati dei saggi non sono validi se tra gli organismi del controllo si osserva una mortalità  $> 10\%$  o se la concentrazione di ossigeno disciolto in una qualsiasi soluzione del saggio scende al di sotto del 60% del valore di saturazione.

Pur senza vincolare la validità del risultato, periodicamente si consiglia la conduzione di saggi in condizioni standard con un tossico di riferimento, quale ad esempio il bicromato di potassio o il pentaclorofenolo. Questa pratica dovrebbe consentire di evidenziare condizioni sperimentali o lotti di organismi, per qualche motivo, anomali. In condizioni normali, disponendo di una congrua serie di LC50, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio di tale serie e dal doppio della corrispondente deviazione standard (media  $\pm 2$  D.S.). Viceversa, se la LC50 del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi dovrebbero essere considerati con cautela.

Con valore puramente indicativo vengono citati i risultati ottenuti in prove di intercalibrazione rispettivamente tra 10 e 12 laboratori (US EPA, 1985). I tossici scelti per questo studio furono l'argento nitrato e l'endosulfan ed i risultati ottenuti, in termini di 96hLC50, dimostrarono un coefficiente di variazione per il primo tossico pari a 64 e 32% e per il pesticida, pari a 50 e 43%. Il primo dato di ciascuna coppia è stato ottenuto con saggi condotti in condizioni statiche mentre il secondo in flusso continuo. Può essere utile, infine, disporre di alcune informazioni sulla tossicità acuta del  $\text{Cr}^{+6}$ . In funzione della durezza dell'acqua di diluizione e della dimensione degli organismi, questo metallo dimostra delle 48-96hLC50 variabili tra 7,6 e 79,6 mg/L (EIFAC, 1983). Indicativamente minore è la durezza del mezzo o la dimensione degli organismi e maggiore è la tossicità del cromo esavalente.

## 7 - ANALISI DEI RISULTATI

### 7.1 - Calcolo della LC50

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta descritto in questa procedura si propone non solo l'identificazione delle sorgenti di contaminazione capaci di effetti tossici acuti ma anche la quantificazione della loro potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale al 50% degli organismi (LC50) per un dato tempo di esposizione (24-48 h). La determinazione della LC50 può essere effettuata con diversi metodi la cui applicabilità è in buona parte dipendente dal tipo di risultati ottenuti, e più precisamente dal numero di effetti parziali osservati, intermedi cioè tra la mortalità 100% e la mortalità nulla. La valutazione della LC50 dovrebbe basarsi sui risultati relativi ad almeno 5 concentrazioni di campione ed un controllo, sebbene molti metodi di analisi possono essere utilizzati con

un numero di dati inferiore. Se la massima concentrazione saggiata ha causato una mortalità inferiore al 50%, non si dovrebbe procedere al calcolo della LC50, il cui valore sarebbe in tal caso poco attendibile. Meglio ripetere il saggio, se possibile, cercando di migliorare la serie delle concentrazioni saggiate. In caso contrario la LC50 sarà più correttamente espressa come "maggiore della massima concentrazione sperimentata" (es.: 48hLC50 > 80%).

Nel metodo di saggio dedicato alla valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna* (IRSA, 1994) sono stati proposti tre diversi metodi, ampiamente validati, atti alla valutazione della LC50. Si tratta del metodo di Litchfield e Wilcoxon, del test binomiale e del metodo probit. Essi sono adeguatamente illustrati nell'ambito del metodo per *D. magna* al quale si rinvia. Infine, è opportuno segnalare che sono disponibili in commercio alcuni programmi per personal computer espressamente dedicati a diversi metodi di analisi statistica di risultati tossicologici, a questi prodotti parimenti si rinvia.

## 7.2 - Effetti da concentrazione unica

L'esame dei risultati ottenuti saggiando un campione non diluito del corpo idrico è riconducibile alla teoria del confronto tra due campioni. Nel presente schema sperimentale, i decessi osservati nelle repliche del corpo idrico e in quelle del controllo rappresentano i due campioni di dati posti a confronto.

Di fatto, se la mortalità degli organismi esposti al corpo idrico supera il valore del 10%, e cioè quel limite di decessi accettato come "naturale" in un gruppo di individui di controllo, si può già concludere che il campione contiene inquinanti a concentrazioni tossiche. Tuttavia può essere opportuno dare supporto statistico al risultato del saggio, verificando la cosiddetta ipotesi nulla o zero, e cioè che le medie dei decessi osservati nei due trattamenti siano uguali. Smentire l'ipotesi con un certo grado di probabilità, solitamente  $P = 0,05$ , equivale a verificare che la mortalità osservata per gli organismi esposti al corpo idrico è significativa.

Il test "t" è utilizzato per confrontare i due campioni e, dal momento che vi è un'attesa di contaminazione o di mortalità maggiore per il campione del corpo idrico piuttosto che per il controllo, un test unilaterale è generalmente adeguato. L'applicazione del test "t" richiede che le proporzioni di decessi osservati nelle repliche siano distribuite normalmente. Se i dati soddisfano questo requisito è necessario procedere anche alla verifica di omogeneità della varianza dei due gruppi di risultati e solo in caso affermativo è lecito passare all'esame della significatività dei decessi osservati. Se i dati non fossero distribuiti normalmente il problema viene comunemente risolto mediante opportune trasformazioni dei dati stessi. La conversione delle proporzioni di organismi deceduti nella radice quadra del loro arc sen è la trasformazione più comune. Se non si rivelasse risolutiva è necessario procedere all'esame dei risultati con metodi non parametrici. Se, a sua volta,

la condizione di omogeneità della varianza non fosse rispettata, il test "t" rimane valido ma deve essere applicato in forma modificata. Il valore calcolato per la funzione "t" è infine confrontato con il valore critico di "t" individuabile in apposite tabelle, in base al numero di gradi di libertà ed al livello di probabilità prescelto. Se il valore di "t" calcolato supera il valore tabellare, le due mortalità sono significativamente diverse. Fortunatamente sono disponibili in commercio dei programmi per personal computer che sono espressamente dedicati all'analisi statistica di risultati tossicologici e possono svolgere tutte le operazioni necessarie. A questi prodotti, pertanto, si rinvia.

## APPENDICE

### A1 - Note sulla sistematica e sulla "biologia" di trota iridea

La trota iridea è originaria dei corsi d'acqua montani della costa ovest degli Stati Uniti. Al di fuori del continente americano, questa specie è stata introdotta in moltissimi paesi tra cui, nel secolo scorso anche in Italia (Welcomme, 1988), spesso per la pesca sportiva, causando talvolta la scomparsa di specie native, e poi rapidamente adottata in acquacoltura il che l'ha resa una delle specie più diffusamente allevate in tutto il globo.

Recentemente, la validità del genere *Salmo* è stata messa in dubbio per alcune specie di trota nord americane, considerate, invece, molto più affini alle specie di salmoni del Pacifico appartenenti al genere *Oncorhynchus*. In base ai dati presentati da Smith e Stearly (1989), la American Fisheries Society ha adottato per la trota iridea il nome specifico di *Oncorhynchus mykiss* in sostituzione del precedente *Salmo gairdneri*.

Gli ambienti naturali in cui vive preferenzialmente la specie, hanno temperature variabili tra i 3°C e i 21°C, ma l'intervallo ottimale è situato tra 10 e 16°C. Gli estremi di temperatura ai quali la trota può essere gradualmente acclimata, generalmente ne inibiscono l'accrescimento.

Negli individui adulti, la temperatura e il fotoperiodo sono i fattori ambientali che regolano l'induzione dell'attività riproduttiva. La trota iridea ha originalmente attività riproduttiva primaverile (US EPA, 1985), tuttavia essa può riprodursi anche all'inizio del periodo estivo o di quello invernale in relazione al clima della regione, all'altitudine, al ceppo genetico. In ogni caso, nelle trote coltivate commercialmente, dove la riproduzione è solitamente invernale, sono stati isolati dei ceppi di individui capaci ormai di riprodursi in tutto l'arco dell'anno, assicurando una disponibilità pressoché continua di stadi giovanili.

L'avannotto ha lunghezza compresa tra 15 e 20 mm ed è provvisto di un grosso sacco vitellino le cui riserve vengono esaurite nell'arco di 180-220 gradi-giorno. Al riassorbimento del sacco vitellino, l'avannotto comincia a nutrirsi attivamente predando, in natura, varie specie di invertebrati. Negli allevamenti commerciali l'alimentazione è basata solo

sui mangimi pellettati secchi che, proposti in varie composizioni e dimensioni del pellet, soddisfano l'esigenza di una rapida crescita a costi contenuti. Gli individui di sesso maschile raggiungono la maturità sessuale nell'arco di 2 anni mentre raramente quelli di sesso femminile producono uova prima del terzo anno di vita. A questo stadio del ciclo vitale, il loro peso medio si aggira tra i 300 e 500 g (Giordani, 1972) ma pesi superiori sono frequenti. Verso il quarto anno di vita hanno lunghezza corporea tra 35 e 40 cm, ma individui più anziani possono raggiungere anche taglie eccezionali prossime ai 70 cm e ai 7 kg ed oltre di peso. Nelle popolazioni naturali, tali valori sono comunque molto variabili e legati spesso all'ambiente, se lenticolo o lotico, e alle varietà regionali.

## **2 - Mantenimento degli organismi e acclimatazione**

### *A2.1 - Vasche e strumentazione*

Oltre alla normale strumentazione di laboratorio, il mantenimento degli organismi richiede i contenitori e le apparecchiature descritte nel seguito.

- Vasche in materiale atossico, vetro e fibra di vetro sono da preferire. Il volume ed il numero delle vasche deve essere tale da consentire di stabulare il numero di pesci necessario in relazione alla frequenza dei saggi. In generale una o meglio due vasche in "tutto vetro", con un volume unitario di almeno 200 L, rappresentano una soluzione soddisfacente per una frequenza approssimativa di 3-4 saggi a settimana.
- Sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito di  $15 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Sistema di aerazione a bassa pressione fornito di diffusori a pietra porosa. L'aria insufflata deve essere priva di contaminanti. Oli ed altri vapori organici sono contaminanti frequenti degli impianti di aria compressa e devono essere rimossi con filtri di carbone attivo.
- Sistema di illuminazione realizzato con lampade fluorescenti, preferibilmente ad elevato indice di resa cromatica (>90) e che consenta di ottenere un'intensità luminosa, a livello delle vasche, tra i 500 e i 1000 lux. Il sistema deve essere dotato di un temporizzatore per il controllo del fotoperiodo e, possibilmente, anche di un dispositivo che attui una transizione graduale (almeno 15 min) tra le fasi di luce e di buio.
- Analizzatore di ossigeno disciolto;
- Retini di varie dimensioni per i trasferimenti dei pesci.

Per la conduzione del saggio di tossicità deve essere utilizzato lo stadio giovanile di trota iridea. Più precisamente vengono impiegati gli organismi che abbiano completato il riassorbimento del sacco vitellino da almeno due settimane e che non abbiano superato la taglia di circa 6 cm. In ogni caso, le

dimensioni degli organismi devono essere il più possibile omogenee.

Gli animali allo stadio vitale richiesto, sono acquisibili presso allevamenti specializzati.

### *A2.2 - Trasporto degli animali*

Per il trasporto, le trotelle vengono comunemente mantenute in sacchi di plastica, parzialmente riempiti d'acqua (circa 1/3) e, per il volume restante, con ossigeno puro. Tale accorgimento, in genere, permette di conservare elevate concentrazioni di ossigeno disciolto nel mezzo acquoso per l'intera durata del trasporto (qualche ora). Nella stagione calda dovranno essere adottati accorgimenti volti all'isolamento o, se necessario, anche al raffreddamento dei sacchi contenenti gli avannotti (materiale espanso, ghiaccio etc). Per evitare pericolosi sbalzi termici, all'arrivo in laboratorio i sacchi, ancora chiusi, verranno lasciati galleggiare nelle vasche di mantenimento per il tempo necessario al raggiungimento della temperatura dell'acqua di destinazione. Solo allora si potranno trasferire gli organismi.

### *A2.3 - Acqua di mantenimento e di acclimatazione*

Per il mantenimento delle trotelle è preferibile disporre di un sorgente continua di acqua non contaminata. La rete idropotabile, la falda o anche un corpo idrico superficiale possono rappresentare tale sorgente ed essere utilizzati per approvvigionare le vasche di mantenimento in flusso continuo. Orientativamente, sono da preferire acque con durezza compresa tra 50 e 250 mg/L  $\text{CaCO}_3$  e pH tra 6.0 e 8.5. Se necessario, lo stoccaggio, l'aerazione prolungata, il trattamento con carbone attivo e l'irraggiamento con luce ultravioletta, possono migliorare sensibilmente la qualità dell'acqua. La presenza di cloro residuo, a causa dell'elevata tossicità per la vita acquatica, è il problema più comunemente associato all'uso dell'acqua di rete. Si raccomanda, pertanto, di verificarne il contenuto ed eventualmente intervenire con i trattamenti indicati per ridurre la concentrazione ad un valore compatibile con la sopravvivenza degli animali ( $\leq 0,011$  mg/L; ASTM, 1993).

Le caratteristiche chimiche e fisiche dell'acqua possono variare nel tempo. E' opportuno controllare con la necessaria frequenza alcuni parametri come la durezza, il pH, la conducibilità, l'alcalinità, l'ammoniaca e il carbonio organico. Con frequenza minore, potranno essere misurati i metalli e i pesticidi o altri specifici contaminanti. A titolo d'esempio in Tabella 1 sono riportati i valori (guida) di alcuni dei parametri misurabili in base ai quali un'acqua è considerata accettabile.

Quando per la conduzione del saggio è necessario utilizzare un'acqua di diluizione, sia essa naturale o sintetica, avente una durezza che differisce più del 20% dall'acqua di mantenimento, le trotelle devono

venire acclimatate a tale durezza (EPS, 1990). Non rispettando questa procedura vengono vanificati i vantaggi derivanti dall'adozione di acque standard o di recettore non contaminato. La durata del periodo di acclimatazione non può essere definita in modo univoco. In ogni caso è consigliabile che l'acqua della vasca di acclimatazione venga cambiata gradualmente, passando, in un tempo minimo di due giorni, dal "100% acqua di mantenimento" al "100% acqua di acclimatazione". Similmente, per gli eventuali cambiamenti di temperatura si deve procedere in modo che la variazione non superi il limite di 3°C/giorno. A trasferimento completato, farà seguito un periodo 7 giorni, ma preferibilmente di durata superiore, nel corso del quale gli animali verranno mantenuti nello stesso tipo di acqua e alle stesse condizioni impiegate per il saggio tossicologico.

Quando l'acqua di mantenimento ha durezza elevata, l'acqua semi-sintetica può essere ottenuta per diluizione con acqua deionizzata. Viceversa si può operare con aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) alla stessa acqua di mantenimento o ad acqua deionizzata. E' conveniente preparare l'acqua sintetica in quantità adeguate da conservare, soprattutto se si usa acqua deionizzata, per un periodo di qualche giorno in aerazione moderata prima dell'uso.

E' raro disporre di volumi d'acqua sintetica, semi-sintetica o di recettore non contaminato in quantità tali da alimentare la vasca di acclimatazione in flusso continuo. Ne consegue che la procedura di acclimatazione deve essere completata necessariamente in condizioni semistatiche. Ciò significa che durante l'acclimatazione si procede quotidianamente a rinnovi parziali (circa 50%) dell'acqua della vasca di acclimatazione. E' consigliabile associare il rinnovo del mezzo alla pulizia della vasca (per sifonamento), dopo la somministrazione del cibo in modo da rimuovere anche i residui di quest'ultimo. Nella fase di acclimatazione, un considerevole risparmio di acqua è conseguibile con l'adozione di un sistema di filtraggio biologico simile agli acquari ornamentali, che evitando l'accumulo di cataboliti fa sì che la vasca possa operare in condizioni di riciclo. Qualunque sia la soluzione adottata, ammoniaca e nitriti debbono essere misurati frequentemente per assicurarsi che non raggiungano livelli tossici per gli organismi. Concentrazioni  $\leq 0,02$  e  $\leq 0,06$  mg/L di ammoniaca non ionizzata e di nitriti, rispettivamente, sono considerate di sicurezza per la tutela della vita acquatica (EPS 1990). Similmente, ASTM (1993) suggerisce che la concentrazione di ammoniaca non ionizzata nelle vasche di mantenimento e di acclimatazione non superi il valore di 0,035 mg/L (15°C e pH 8,0 - 9,0).

Sia nelle vasche di mantenimento che, a maggior ragione, nelle vasche di acclimatazione, non si devono superare determinati valori di densità degli organismi. Orientativamente può essere suggerito un carico di biomassa prossimo a 0,5 g/L (peso fresco) in condizioni semistatiche, mentre in flusso continuo possono essere mantenuti carichi maggiori,

dell'ordine di 1 g/L con un flusso che garantisca almeno tre ricambi al giorno. Con flussi d'acqua superiori, che sono generalmente da preferire, si possono mantenere a parità di carico unitario, molti più organismi nella stessa vasca o, viceversa, densità minori con miglioramento delle condizioni di mantenimento. In generale sono da evitare le condizioni di sovraffollamento che inducono stress e mortalità elevate.

#### *A2.4 - Ossigeno disciolto*

Sia nelle vasche di mantenimento che di acclimatazione deve essere mantenuto un contenuto di ossigeno disciolto  $\geq 80\%$  del valore di saturazione. A tale scopo si collocano sul fondo delle vasche dei diffusori a pietra porosa attraverso i quali si fa gorgogliare con flusso moderato ma continuo, l'aria priva di contaminanti, fornita da un sistema di aerazione a bassa pressione.

#### *A2.5 - Pulizia e disinfezione*

Le vasche e gli accessori in uso devono essere mantenuti in buone condizioni di pulizia. Lo scopo è di minimizzare i rischi di insorgenza di malattie e di contribuire alla elevata qualità delle condizioni di mantenimento. La rimozione mediante sifonamento delle feci e del cibo non consumato deve essere almeno quotidiana. E' consigliabile la disinfezione delle vasche e degli accessori prima dell'introduzione di ogni nuovo lotto di organismi. Disinfettanti a base di ipoclorito, aldeide formica, composti clorurati e iodofori od altri ancora possono essere utilizzati a questo scopo. Si tenga presente tuttavia che essi possono essere molto tossici anche per i pesci e pertanto, a disinfezione ultimata, sia le vasche che gli accessori devono essere sciacquati molto accuratamente.

#### *A2.6 - Alimentazione*

I giovani esemplari di trota iridea devono essere nutriti con diete commerciali aventi composizione idonea alle esigenze nutrizionali di questo salmonide. Si tratta generalmente di mangimi secchi pellettati e cioè preparati in cilindretti che hanno dimensione adeguata alla taglia del pesce. I lotti di mangime hanno un termine di conservabilità oltre il quale si ha un decadimento del valore nutrizionale.

La somministrazione del cibo può essere quotidiana o a giorni alterni, mentre la sua quantità dipende dalle dimensioni dei pesci e dalla temperatura dell'acqua ed è solitamente indicata in tabelle fornite dal produttore del mangime stesso. Fatta eccezione per precise esigenze sperimentali, è opportuno che la scelta del mangime privilegi quello in uso presso la trota coltura di provenienza degli animali, evitando in tal modo di dover acclimatare gli stessi ad una nuova dieta. L'alimentazione viene sospesa 24 h prima della conduzione del saggio.

## A2.7 - Mortalità e patologie

Nelle 24-48 h successive all'arrivo degli organismi in laboratorio, è comune osservare dei decessi dovuti allo stress da trasporto. Solo al termine di questa fase, nella quale i decessi possono essere anche nulli se il trasporto è stato eseguito correttamente, si comincia a registrare la mortalità degli organismi con particolare attenzione per la settimana di acclimatazione che precede la conduzione del saggio. Se la mortalità supera il 10%, il lotto deve essere scartato; se è compresa tra il 5 e il 10% è consigliabile prolungare l'acclimatazione per altri 7 giorni, mentre se è inferiore al 5% il lotto può essere utilizzato.

Sia durante il mantenimento che l'acclimatazione, gli organismi devono essere ispezionati quotidianamente per individuare eventuali sintomi di affezioni patologiche in corso o per rimuovere i pesci deceduti. Superate le conseguenze del trasporto, ogni alterazione del comportamento degli avannotti è generalmente un segnale di cattive condizioni di salute. La distribuzione anomala di alcuni organismi nelle vasche, il rifiuto del cibo, la colorazione scura, le pinne sfrangiate o corrose, le alterazioni del nuoto, la presenza di rigonfiamenti, di deformità, di macchie o ulcerazioni sulle pinne o sulla cute sono tutti sintomi di patologie in corso. Sebbene un intervento terapeutico sia spesso possibile esso è sconsigliato, perlomeno rispetto alla possibilità di un successivo impiego degli organismi nel saggio. In questo caso si procede a scartare il lotto, disinfettare le vasche e riacquistare un nuovo gruppo di organismi.

## BIBLIOGRAFIA

ASTM (1993): "Standard guide for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians", Annual Book of ASTM Standards, Sec.11, Water and Environmental Technology, E 729 - 88a.

EIFAC (1983): "Report on chromium and freshwater fish", European Inland Fisheries Advisory Commission, Working Party on Water Quality Criteria for European Freshwater Fish., EIFAC Tech. Pap. n.43, 31pp.

EPS (1990): "Biological test method. Reference method for determining acute lethality of effluents to rainbow trout", Environ. Prot. Series, Conservation and Protection, EPS 1/RM/13, Ottawa, Ontario, Canada.

Giordani G. (1972): "Idrobiologia e piscicoltura". Edagricole, Bologna, 292 pp.

IRSA (1994): "8020 - Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*", In "Metodi analitici per le acque", Quad. Ist. Ric. Acque, **100**, 336-342.

OECD (1984): "Guidelines for testing of chemicals. Fish acute toxicity test"; Guideline 203. Organization

for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

Smith, G.R and Stearly R.F. (1989): "The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts", *Fisheries*, **14**, 4-10.

US EPA (1985): "Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms", W.H. Peltier C.I. Weber, U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-85/013, Cincinnati, OH.

Welcomme, R.L. (1988): "International introductions of inland aquatic species", FAO Fish. Tech. Pap., 294, 318 pp.



## **COSTITUZIONE DELLA NUOVA COMMISSIONE DEI METODI ANALITICI**

In data 19 luglio 1996 si è costituita presso l'Istituto di Ricerca sulle Acque la nuova Commissione dei Metodi Analitici. La Commissione, presieduta dal direttore dell'IRSA e coordinata dal responsabile del Servizio Qualità delle Acque, è composta:

- da quattro professori universitari di ruolo di Chimica Analitica o discipline attinenti alle problematiche ambientali;
- da un rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità;
- da due rappresentanti degli ex Laboratori di Igiene e Profilassi o ex Presidi Multizonali, designati uno dall'Unione Italiana Chimici Igienisti e l'altro dalla Conferenza Stato-Regioni;
- da un rappresentante dell'ENEL;
- da un rappresentante della Confindustria;
- da un rappresentante dell'ENEA;
- da un rappresentante del Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale;
- da un rappresentante del Laboratorio Centrale di Idrobiologia del Ministero delle Risorse Agricole Alimentari e Forestali;
- da un rappresentante del Ministero dell'Ambiente;
- da cinque rappresentanti dell'IRSA-CNR, uno dei quali coordina le attività della Commissione ed un altro svolge le funzioni di segreteria.

Il lavoro che la Commissione è chiamata a svolgere rientra nelle attività connesse alla standardizzazione di metodi analitici per il controllo della qualità delle acque, che all'IRSA compete in base al disposto di alcune normative sulle acque (Legge 319/76; Delibera Comitato dei Ministri 4/2/1977; D.L.:130/92). La Commissione avrà una funzione di indirizzo e coordinamento dell'attività di standardizzazione individuando, secondo una scala di priorità, i parametri per i quali si rende necessario un adeguamento, revisione o innovazione dei relativi protocolli analitici e verificando periodicamente (due volte l'anno) lo stato di avanzamento dei programmi di attività. La Commissione dovrà inoltre procedere ad un'attenta revisione di tutti i metodi pubblicati nell'ultima edizione del Manuale IRSA "Metodi Analitici per le Acque" (Quad. Ist. Ric. Acque, n. 100,

1994) al fine di apportare non solo le necessarie correzioni sul piano formale ma anche di individuare eventuali punti critici meritevoli di approfondimento sul piano sperimentale.

La Commissione dura in carica quattro anni, intervallo di tempo entro il quale deve rendere disponibile per la pubblicazione una nuova edizione del volume "Metodi Analitici per le Acque", momento di sintesi di tutta l'attività svolta nel corso del quadriennio. I metodi che verranno via via licenziati dalla Commissione, potranno essere pubblicati, in attesa del loro definitivo inserimento nella nuova edizione del volume, sul Notiziario IRSA dei Metodi Analitici.

La Commissione articola i suoi lavori nelle seguenti unità operative:

- Campionamento;
- Controllo di qualità del dato analitico;
- Anioni in cromatografia ionica;
- Metodi biologici;
- Metalli e composti organometallici;
- Microinquinanti organici.

Mentre per le prime tre unità operative è evidente quale sarà l'obiettivo dei rispettivi programmi di attività, vale a dire la revisione e sostanziale modifica delle sezioni 1030 "Metodi di campionamento" e 1040 "Elaborazione dei risultati" del volume IRSA e la messa a punto di un protocollo analitico per la determinazione di anioni in cromatografia ionica, le restanti unità operative dovranno definire nelle prossime riunioni programmate per settembre gli indici di interesse prioritario sui quali avviare la sperimentazione interlaboratorio.

Alle unità operative partecipano in prima istanza, secondo le specifiche competenze, componenti della Commissione che si avvalgono del contributo di esperienza da parte di un numero sufficiente di laboratori di controllo pubblici e privati presenti sul territorio nazionale.

Al fine di utilizzare al meglio le risorse umane e strumentali disponibili, la loro attività dovrà inserirsi armonicamente nelle normali attività dei singoli laboratori partecipanti; per questo motivo verranno chiamati a far parte delle unità operative quei laboratori che già svolgono a livello di routine determinazioni analitiche riguardanti il parametro scelto. Le unità operative rimangono in vita il tempo necessario per lo sviluppo e/o la verifica del protocollo analitico di interesse.

## METODI ANALITICI PER LE ACQUE



La raccolta comprende i metodi  
previsti dalla Legge 10 maggio, 1976, n. 319  
e dal D.Lgs 25 gennaio 1992, n. 130

*Pubblicazione in vendita presso*

**l'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO**

Volume di 342 pagine del formato di cm 21 x 29,7  
Prezzo divendita L: 150.000

La pubblicazione viene spedita a tutti coloro che ne fanno richiesta versando, in via anticipata, il relativo importo sul C/C postale n. 387001 intestato a ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - ROMA  
Oppure acquistandolo direttamente presso le Agenzie di Roma (P.za Verdi, 10 e Via Cavour, 102) o presso le Librerie concessionarie in tutte le città capoluogo di Provincia.

## INDICE

	Pag.		
<b>PREMESSA</b>			
1000		METODI FISICI, CHIMICI E CHIMICO FISICI	1
1010	1	Strutture, attrezzature e reattivi	
1020	13	Lineamenti di tecniche analitiche	
1030	44	Metodi di campionamento	
1040	53	Elaborazione dei risultati	
<b>PARAMETRI FISICI, CHIMICI E CHIMICO FISICI</b>			
2010	61	Acidità e basicità	
2020	65	Colore <b>A(3)</b>	
2030	66	Conducibilità <b>B</b>	
2040	68	Durezza <b>B</b>	
2050	71	Materiali in sospensione <b>A(7); B; C(4)</b>	
2060	72	Materiali sedimentabili <b>A(6)</b>	
2070	73	Odore <b>A(4)</b>	
2080	75	pH <b>A(1); C(3)</b>	
2090	79	Salinità	
2100	86	Sapore	
2110	87	Temperatura <b>A(2); B; C(1)</b>	
2120	91	Torbidità	
<b>METALLI E SPECIE METALLICHE</b>			
3010	94	Alluminio <b>A(11)</b>	
3020	95	Arsenico <b>A(12); C(14)</b>	
3030	98	Bario <b>A(13)</b>	
3040	106	Berillio	
3050	108	Boro <b>A(14)</b>	
3060	109	Cadmio <b>A(15); B; C(15)</b>	
3070	112	Calcio <b>B</b>	
3080	116	Cromo <b>A(16,17); B; C(16)</b>	
3090	118	Ferro <b>A(18); B</b>	
3100	126	Litio	
3110	128	Magnesio	
3120	129	Manganese <b>A(19)</b>	
3130	131	Mercurio <b>A(20); B; C(17)</b>	
3140	133	Nichel <b>A(21); C(18)</b>	
3150	138	Piombo <b>A(22); B; C(19)</b>	
3160	140	Potassio <b>B</b>	
3170	145	Rame <b>A(23); B; C(20)</b>	
3180	146	Selenio <b>A(24)</b>	
3190	149	Sodio <b>B</b>	
3200	153	Stagno <b>A(25)</b>	
3210	154	Tallio	
3220	157	Tellurio	
3230	160	Zinco <b>A(26); B; C(21)</b>	
3230	161		
<b>COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI</b>			
4010	163	Azoto ammoniacale <b>A(35); B; C(11)</b>	
4020	163	Azoto nitrico <b>A(37); B;</b>	
4030	173	Azoto nitroso <b>A(36); B; C(7)</b>	
4040	178	Biossido di carbonio	
4050	180	Cianuri <b>A(27)</b>	
4060	183	Cloro <b>A(28); C(12)</b>	
4070	186	Cloruri <b>A(32); B</b>	
4080	189	Fluoruri <b>A(33)</b>	
4090	196	Fosforo <b>A(34); B; C(6)</b>	
4100	200	Ossigeno disciolto <b>B; C(2)</b>	
4110	204	Silice	
4120	209	Solfati <b>A(31); B</b>	
4130	211	Solfiti <b>A(30)</b>	
4130	213		
4140	217	Solfuri <b>A(29)</b>	
<b>COSTITUENTI ORGANICI</b>			
5000	219	Aldeidi alifatiche <b>A(41)</b>	
5010	219	Ammine alifatiche	
5020	221	Azoto organico <b>D</b>	
5030	223	Carbonio organico	
5040	225	Erbicidi azotati <b>E</b>	
5050	228	Fenoli <b>A(40); C(8)</b>	
5060	234	Pesticidi clorurati <b>A(ex 46); E</b>	
5070	237	Pesticidi fosforati <b>A(47)</b>	
5080	249	Policlorobifenili e policloroterfenili <b>E</b>	
5090	262	Richiesta biochimica di ossigeno (BOD) <b>A(8); B; C(5)</b>	
5100	279	Richiesta chimica di ossigeno (COD) <b>A(9)</b>	
5110	285	Solventi aromatici <b>A(42)</b>	
5120	289	Solventi clorurati <b>A(44)</b>	
5130	294	Sostanze oleose [Grassi e oli animali e vegetali <b>A(38); Oli minerali A(39); B; C(9)</b> ]	
5140	298	Tensioattivi anionici <b>A(45); C(13)</b>	
5150	301	Tensioattivi non ionici <b>A(45)</b>	
5160	304		
<b>METODI MICROBIOLOGICI</b>			
6000	308	Metodi di campionamento	
6010	309	Strutture ed attrezzature di laboratorio	
6020	310	Terreni di coltura	
6030	315	Lineamenti di tecniche analitiche	
6040	315		
<b>PARAMETRI MICROBIOLOGICI</b>			
7000	318	Coliformi totali <b>A(49); B</b>	
7010	318	Coliformi fecali <b>A(50); B</b>	
7020	322	<i>Escherichia coli</i>	
7030	323	Streptococchi fecali <b>A(51)</b>	
7040	325	Conta batterica a 36°C e a 22°C	
7050	327	Spore di clostridi solfito-riduttori	
7060	328	Batteriofagi anti <i>Escherichia coli</i>	
7070	329		
<b>PARAMETRI TOSSICOLOGICI</b>			
8000	331	Metodi di valutazione della tossicità con pesci <b>A(48)</b>	
8010	332	Metodi di valutazione della tossicità con <i>Daphnia</i>	
8020	336		

### NOTA

**A** = Tabella A, Legge n.319 del 10-5-1976

**B** = Decreto Consiglio Ministri del 4-2-1977 "Criteri, metodologie norme tecniche generali di cui all'art. 2, lettere b, d ed e della Legge n.319 del 10/5/1976

**C** = Decreto legge n. 130 del 25-1-1992

( ) = Il numero in parentesi è quello con cui è indicato il parametro nella legge

Supplemento a Quaderni 100 (Aut. Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)  
 Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche  
 Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque, Via Reno, 1 - 00198 Roma  
 Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861  
 Direttore responsabile: R. Passino  
 Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta  
 Segreteria di redazione: C. M. Blundo  
 Grafica ed elaborazione su computer: P. Fusco  
 Allestimento e stampa: C. Pastore

**NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI**  
*Istituto di ricerca sulle acque - CNR*

1	1	1	1
2	2	2	2
3	3	3	3
4	4	4	4
5	5	5	5
6	6	6	6
7	7	7	7
8	8	8	8
9	9	9	9
10	10	10	10
11	11	11	11
12	12	12	12
13	13	13	13
14	14	14	14
15	15	15	15
16	16	16	16
17	17	17	17
18	18	18	18
19	19	19	19
20	20	20	20
21	21	21	21
22	22	22	22
23	23	23	23
24	24	24	24
25	25	25	25
26	26	26	26
27	27	27	27
28	28	28	28
29	29	29	29
30	30	30	30
31	31	31	31
32	32	32	32
33	33	33	33
34	34	34	34
35	35	35	35
36	36	36	36
37	37	37	37
38	38	38	38
39	39	39	39
40	40	40	40
41	41	41	41
42	42	42	42
43	43	43	43
44	44	44	44
45	45	45	45
46	46	46	46
47	47	47	47
48	48	48	48
49	49	49	49
50	50	50	50
51	51	51	51
52	52	52	52
53	53	53	53
54	54	54	54
55	55	55	55
56	56	56	56
57	57	57	57
58	58	58	58
59	59	59	59
60	60	60	60
61	61	61	61
62	62	62	62
63	63	63	63
64	64	64	64
65	65	65	65
66	66	66	66
67	67	67	67
68	68	68	68
69	69	69	69
70	70	70	70
71	71	71	71
72	72	72	72
73	73	73	73
74	74	74	74
75	75	75	75
76	76	76	76
77	77	77	77
78	78	78	78
79	79	79	79
80	80	80	80
81	81	81	81
82	82	82	82
83	83	83	83
84	84	84	84
85	85	85	85
86	86	86	86
87	87	87	87
88	88	88	88
89	89	89	89
90	90	90	90
91	91	91	91
92	92	92	92
93	93	93	93
94	94	94	94
95	95	95	95
96	96	96	96
97	97	97	97
98	98	98	98
99	99	99	99
100	100	100	100