

EDITORIALE

Questo numero del Notiziario completa l'impegno che era stato assunto in accordo con gli obiettivi della Legge n. 133. L'integrità dell'ecosistema acquatico auspicata da questa legge richiede l'applicazione di diverse modalità di controllo, che devono potersi avvalere anche di strumenti di tipo biologico atti a rilevare le caratteristiche qualitative degli effluenti di scarico e delle acque recettrici.

Alcuni metodi, capaci di evidenziare la potenzialità di effetti tossici acuti, sono stati pubblicati nei numeri precedenti del Notiziario. In questa occasione vengono descritti altri metodi che pur essendo ancora dedicati agli effetti tossici complessivi di acque di scarico o recettrici, ne affrontano la caratteristica più frequente e per questo motivo più temibile, e cioè quella di manifestarsi solo in seguito ad esposizione di tipo cronico (prolungato).

Si tratta di saggi mediamente più impegnativi dei rispettivi saggi acuti, ma che, a differenza di questi, possono fornire risultati con un contenuto informativo assolutamente superiore e quindi di grande valore per chi aspiri ad una effettiva tutela della vita acquatica. Gran parte della letteratura più recente e gli attuali dibattiti in sede normativa confermano l'importanza di questi temi ed anzi, in tale prospettiva, possiamo anticipare che altri metodi biologici sono in corso di stesura e saranno presto divulgati da queste pagine.

Alcuni lettori, infine, noteranno che R. Marchetti è tuttora indicato tra i membri di un gruppo di lavoro. Non si tratta di una svista, che sarebbe perlomeno imbarazzante, bensì di un piccolo ringraziamento a colui che, nonostante il male che lo affliggeva, ebbe ancora la passione di rivedere la prima stesura di questi metodi.

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, maggio 1998

METODO PER TEST DI TOSSICITA' CRONICA (7 GIORNI) CON *MYSIDOPSIS BAHIA**

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

RIASSUNTO

Questo metodo standardizzato descrive come effettuare dei saggi (sub)cronici di 7 giorni con il crostaceo marino *Mysidopsis bahia* su acque di scarico e recettrici. La valutazione della tossicità cronica del campione è basata sull'esame dell'attività riproduttiva, della sopravvivenza e dell'accrescimento degli organismi saggiati. Una nota conclusiva descrive come analizzare i dati ottenuti con il saggio e quali procedure statistiche debbano essere applicate. I risultati sono generalmente espressi in termini di minima concentrazione capace di effetti significativi e concentrazione di non effetto (LOEC; NOEC).

INDICE	
EDITORIALE	1
METODO PER TEST DI TOSSICITA' CRONICA (7 GIORNI) CON <i>MYSIDOPSIS BAHIA</i>	1
METODO PER TEST DI TOSSICITA' CRONICA (7 GIORNI) CON <i>CERIODAPHNIA DUBIA</i>	8
METODO PER TEST DI TOSSICITA' CRONICA (7 GIORNI) CON <i>CYPRINODON VARIEGATUS</i>	13
METODO PER SAGGIO DI TOSSICITA' PROLUNGATO (14-28 giorni) CON <i>TROTA IRIDEA (ONCORHYNCHUS MYKISS)</i>	19
ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI DI SAGGI CRONICI	26

* Il metodo è stato discusso ed approvato dal sottogruppo "Metodi con Crostacei" del Gruppo Metodi Biologici composto da: Amodei M., Bacci E., Baudo R., Buffagni M., De Marco N., Ferraro M., Marchetti R., Marchini S., Pasini M., Rampa P., Sbrilli G. e Viganò L..

SUMMARY

The present standardized method describes how to conduct 7-day (sub)chronic toxicity tests on whole effluents and surface waters with the marine crustacean *Mysidopsis bahia*. The evaluation of chronic toxicity of water samples is based on the observation of such endpoints as reproduction, growth and survival of test organisms. A final note describes the statistical analysis of the data and suggests which procedures have to be adopted. Results are usually expressed in terms of no observable and lowest observable effect concentration (NOEC; LOEC).

1 - INTRODUZIONE

E' descritta la procedura standard per condurre un saggio atto a stimare la tossicità cronica, più esattamente sub-cronica, di effluenti di scarico o di acque naturali sul crostaceo marino *Mysidopsis bahia*.

La mancata osservazione di effetti cronici con un dato campione non esclude il riscontro di effetti tossici in campioni prelevati in momenti diversi, e ciò a causa della possibile variabilità di uno scarico come pure della capacità di diluizione delle acque recettrici o anche della variabilità delle sorgenti di contaminazione diffuse che nel recettore trovano recapito.

2 - GENERALITÀ SUL METODO

Giovani esemplari di 7 giorni di età del crostaceo marino *Mysidopsis bahia* sono esposti ad uno scarico acquoso o all'acqua di mare di un'area indagata, con lo scopo di evidenziare se sono presenti sostanze tossiche a concentrazioni tali da causare effetti di tipo cronico. La procedura di saggio per un effluente richiede che un minimo di cinque gruppi di giovani organismi sia esposto ad altrettante concentrazioni del campione da saggiare, per un arco di tempo di 7 giorni. Al termine della sperimentazione, vengono esaminati la sopravvivenza, l'accrescimento e la fecondità dei cinque gruppi sperimentali, si esaminano cioè quei parametri la cui riduzione è comunemente la manifestazione dell'effetto cronico di singole sostanze tossiche o di loro miscele. Il successivo confronto con i risultati di un gruppo di esemplari di controllo rende possibile individuare quella diluizione del campione che non inibisce significativamente (NOEC) l'accrescimento, la fertilità o la sopravvivenza dell'organismo. I dati relativi ad eventuali decessi possono anche essere elaborati per calcolare la diluizione del campione che è letale per una determinata percentuale di organismi (es. LC50) e per tempi crescenti di esposizione, fino al limite dei 7 giorni della sperimentazione.

Una procedura analoga, che prevede cioè di saggiare diverse concentrazioni di campione, può essere

adottata anche per lo studio della tossicità cronica delle acque dell'area recettrice. E', tuttavia, infrequente che i contaminanti raggiungono nelle sue acque delle concentrazioni così elevate da giustificare la diluizione del campione nel saggio di tossicità. Ne consegue che spesso si procede a saggiare l'acqua del recettore "tal quale" (non diluita), limitandosi a verificare se le eventuali risposte degli organismi così trattati si discostano significativamente da quelle del gruppo di organismi di controllo.

3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

3.1 - Materiali e strumentazione

La conduzione del saggio di tossicità richiede:

- numero minimo di 48 bicchieri di vetro borosilicato (beaker) con volume utile pari ad almeno 200 mL;
- lampade fluorescenti ad ampio spettro controllate da un temporizzatore, con il quale regolare il fotoperiodo, e possibilmente anche da un dispositivo che permetta la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- bagno o camera termostata per il mantenimento della temperatura delle soluzioni da saggiare a 26-27°C per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- misuratore di salinità;
- fonte di aria compressa a bassa pressione con diffusori a pietra porosa o cannule di vetro. I piccoli aeratori usati in acquariologia rappresentano una soluzione adeguata. I compressori che comunemente alimentano gli impianti centralizzati, immettono oli e altri contaminanti nella rete di distribuzione che vanno rimossi con cartucce di carbone attivo o dispositivo analogo;
- 2-4 imbuto separatori con volume di 2 L per la schiusa di *Artemia salina*;
- cisti di *A. salina* che rispondono ai requisiti indicati in Appendice al "Metodo per test di tossicità acuta con *M. bahia*" (Viganò, 1996);
- 2 vasche, preferibilmente in tutto-vetro, con capacità di circa 20 L per il mantenimento dei neonati fino al 7° giorno di età;
- miscela di sali per la preparazione di acqua di mare artificiale. La miscela commercializzata con il marchio Forty Fathoms® ha dato buoni risultati nella conduzione dei saggi e nella coltura di *M. bahia*.

3.2 - Organismi per il saggio

Si utilizzano individui appartenenti alla specie *Mysidopsis bahia* la cui età deve essere pari a 7 giorni e deve avere un ambito di variabilità il più possibile ristretto e certamente inferiore alle 24 ore.

I giovani individui di *M. bahia* sono ottenuti da femmine adulte secondo la procedura descritta nella Appendice al "Metodo per test di tossicità acuta con *M. bahia*" (Viganò, 1996). Gli organismi appena nati (tempo 0) vengono trasferiti dalla vasca di schiusa ad una o più vasche di mantenimento aventi volume di circa 20 L, nelle quali gli organismi sono allevati fino all'età di 7 giorni, e cioè fino all'allestimento del saggio (Fig. 1). Le vasche sono mantenute in aerazione moderata, con rinnovi di almeno il 50% del mezzo ogni 48 h e si raccomandano densità di individui $\leq 20/L$. Giornalmente si somministrano naupli appena schiusi di *A. salina* (cfr § 3.6) in quantità di circa 150 larve per ogni misidaceo, preferibilmente ripartiti in due momenti della giornata, di modo che alcuni naupli siano sempre disponibili all'interno delle vasche e, nel contempo, siano evitati deficit significativi della concentrazione di ossigeno disciolto. Il periodo di mantenimento fino all'età di 7 giorni può essere utilizzato per acclimatare gli organismi al valore di salinità a cui il saggio sarà condotto. Tale valore deve essere compreso tra 20 e 35 ‰. Le variazioni apportate al mezzo in questa fase di acclimatazione non devono superare il valore di 2 ‰ nell'arco di 24 h. Se in laboratorio fossero disponibili più allevamenti mantenuti a diverse salinità, si sceglieranno i neonati prodotti da quello avente la salinità più prossima a quella del saggio.

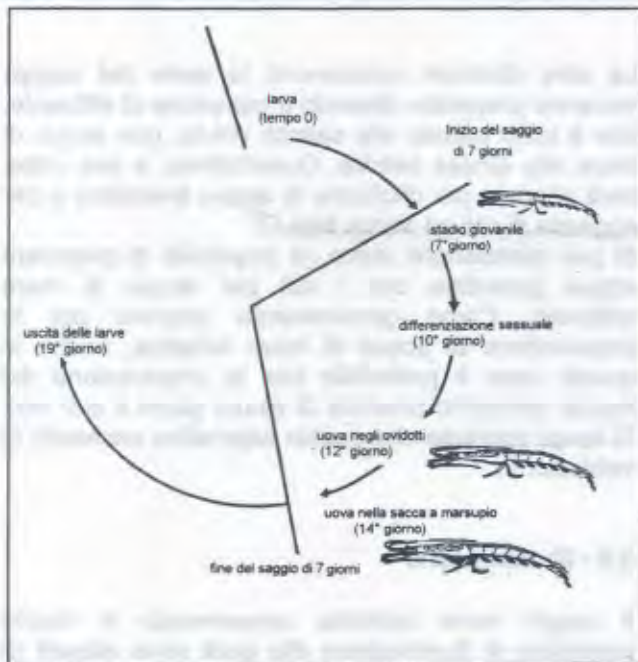


Fig. 1 - Test (sub)cronico di 7 giorni con il crostaceo *M. bahia*

Sia nel periodo di mantenimento che durante l'esecuzione del saggio la temperatura è un fattore molto importante poiché, regolando la velocità di sviluppo degli organismi, fa sì che i tempi previsti per l'allestimento, la conduzione del saggio e le osservazioni di effetto sulla fertilità si dimostrino

sperimentalmente corretti. A tale scopo la temperatura deve essere mantenuta a 26-27°C.

3.3 - Acqua di diluizione

In base alle finalità del saggio, è opportuno scegliere il tipo di acqua di diluizione più adeguato.

a) Se l'obiettivo è di stimare la tossicità cronica di un effluente producendo un dato assoluto, indipendente dalle caratteristiche delle acque recettrici, è necessario operare in condizioni il più possibile standardizzate per quanto riguarda la salinità e l'acqua di diluizione. La salinità prevista per il saggio a 7 giorni in condizioni standard ha valore pari a 35 ‰.

Per la preparazione dell'acqua di mare sintetica si suggerisce l'uso di miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quale ad esempio Forty Fathoms® dimostratasi adeguata allo scopo, o anche altre purché soddisfino i criteri di validità del saggio (cfr § 6) o siano utilizzabili con successo per l'allevamento del crostaceo (vedi Appendice al "Metodo per test di tossicità acuta con *M. bahia*").

Anche un'acqua di mare ipersalina (vedi poi) può essere utilizzata per allestire un test di tipo standard purché sia stata ottenuta da un'area pelagica non contaminata e abbia dimostrato una variabilità trascurabile delle caratteristiche chimico fisiche. Si tenga presente che adottando quest'ultima soluzione l'effluente è saggiabile ad una concentrazione massima di circa il 65%, a meno di adottare ulteriori accorgimenti ((vedi poi).

b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità cronica delle acque del recettore a seguito dell'immissione di uno scarico nelle stesse, sarà necessario usare come acqua di diluizione quella prelevata nell'area di sversamento ma in una zona non inquinata. L'acqua di diluizione dovrebbe essere prelevata immediatamente prima del saggio, o comunque, non oltre 96 h dallo stesso. Se non usata entro 24 h dal prelievo, l'acqua di diluizione verrà refrigerata (4°C). Oltre al gruppo di controllo, in cui gli organismi sono esposti all'acqua non contaminata prelevata dall'area recettrice, può essere utile disporre anche di un secondo gruppo di controllo in cui i crostacei sono esposti al mezzo normalmente utilizzato per l'allevamento di laboratorio. Tale soluzione rende disponibili più dati di riferimento a tutto vantaggio della interpretazione dei risultati.

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 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, purchè prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. In questo tipo di saggio si avranno maggiori garanzie di corretta interpretazione dei risultati se si allestiscono due, ma preferibilmente tre gruppi di controllo. Nel primo i giovani individui di *M. bahia* sono esposti a quella stessa acqua dell'area di recezione che è utilizzata per diluire il campione di scarico; nel secondo gli organismi vengono esposti all'acqua non contaminata della zona recettrice, e nel terzo, infine, si utilizza il mezzo comunemente usato per l'allevamento di laboratorio. In questo modo dovrebbe essere possibile discriminare tra i possibili effetti nutrizionali e tossici che possono concorrere al risultato finale.

Generalmente un'acqua di scarico ha salinità trascurabile. Gli organismi devono tuttavia essere esposti alle varie diluizioni del campione da saggiare senza che le differenze di 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'aggiunta di quegli stessi sali usati per la preparazione dell'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, al buio e a temperatura ambiente, 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 ‰ (Tab. 1). 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 alterare in tal modo anche la tossicità del campione. In generale, si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo 7,5-8,5 sono da considerare come potenziale causa di danno per gli 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.

Se fosse necessario saggiare l'effluente di scarico anche alla concentrazione del 100%, tra le due soluzioni descritte, solo l'aggiunta diretta di sali al campione "tal quale" può soddisfare questa esigenza procedurale.

Tab. 1 - Esempio di calcolo dei volumi necessari all'allestimento di un saggio con un generico effluente di scarico avente salinità trascurabile. L'esempio ipotizza sei concentrazioni da saggiare in otto repliche da 150 mL ciascuna, una salinità di 20‰ e l'uso di acqua ipersalina (100‰) e Milli-Q per le diluizioni del campione.

Concentrazione effluente (%: v/v)	Milli-Q (mL)	Effluente (mL)	Ipersalina (mL)
80	-	960	240
40	480	480	240
20	720	240	240
10	840	120	240
5	900	60	240
2,5	930	30	240

Le altre diluizioni componenti la serie del saggio verranno preparate diluendo il campione di effluente, che è stato portato alla salinità voluta, con acqua di mare alla stessa salinità. Quest'ultima, a sua volta, sarà ottenuta per diluizione di acqua ipersalina o per aggiunta di sali ad acqua Milli-Q®.

Si può menzionare, infine, la possibilità di preparare acqua ipersalina con i sali per acqua di mare artificiale. Come generalmente previsto per la preparazione di acqua di mare sintetica, anche in questo caso è preferibile che la preparazione del mezzo ipersalino preceda di alcuni giorni il suo uso. Si tenga presente che questa alternativa necessita di validazione.

3.4 - Illuminazione

Il saggio viene condotto conservando le stesse condizioni di illuminazione alle quali sono allevati gli organismi. Il sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro, deve fornire a livello dell'area di sperimentazione un'intensità luminosa compresa tra 500 e 1000 lux con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio.

3.5 - Temperatura

La temperatura a cui devono essere mantenute le soluzioni sottoposte a saggio è fissata in 26-27°C.

Questa condizione è raggiunta immergendo i beaker del saggio in un bagno termostato od operando all'interno di un ambiente interamente condizionato alla temperatura voluta.

3.6 - Alimentazione

I giovani di *M. bahia* sono alimentati con naupli di *A. salina* schiusi preferibilmente da alcune ore e comunque da non più di 24 h. I naupli sono somministrati sia durante il periodo di accrescimento che precede il saggio (cfr § 3.2) che durante il saggio stesso. Nel corso della prova l'alimentazione è quotidiana e può essere quantificata in 150 naupli per ogni misidaceo. Se la somministrazione dell'intera quantità di cibo causasse un deficit significativo della concentrazione di O₂ disciolto, essa può essere ripartita in due tempi (75 naupli/misidaceo) adeguatamente distanziati nell'arco della giornata. La procedura per ottenere la dieta a base di *A. salina* è descritta in Appendice al "Metodo per test di tossicità acuta con *M. bahia*".

3.7 - Ossigeno disciolto

In presenza di valori elevati di BOD e alle concentrazioni più elevate di acqua di scarico, è maggiore il rischio che l'ossigeno disciolto scenda a livelli critici, non compatibili con la sopravvivenza degli organismi. Si raccomanda pertanto di controllare questo parametro e con maggior frequenza durante le prime ore di sperimentazione. Se la concentrazione di O₂ disciolto scende al di sotto del 60% del valore di saturazione (Tab. 2) si rende necessario aerare le soluzioni di effluente, facendo gorgogliare aria nei beaker di saggio mediante cannule in vetro o pipette pasteur. Nel caso si debba procedere all'aerazione di una diluizione del campione, tutte le restanti devono essere aerate in modo analogo, includendo anche i recipienti di controllo. Il flusso d'aria deve essere mantenuto ad un livello minimo che non arrechi disturbo agli organismi. Usando delle cannule di vetro o delle pipette pasteur, si può considerare che un flusso pari, indicativamente, a 100 bolle/minuto possa soddisfare tali requisiti.

Tab. 2 - Valori di solubilità (mg/L) dell'ossigeno in acqua a diverse temperature e salinità ed alla pressione di 760 mm Hg (Richards and Corwin, 1956)

Temperatura	Salinità (‰)									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	43
0	14,2	13,8	13,4	12,9	12,5	12,1	11,7	11,2	10,8	10,6
1	13,8	13,4	13,0	12,6	12,2	11,8	11,4	11,0	10,6	10,3
2	13,4	13,0	12,6	12,2	11,9	11,5	11,1	10,7	10,3	10,0
3	13,1	12,7	12,3	11,9	11,6	11,2	10,8	10,4	10,0	9,8
4	12,7	12,3	12,0	11,6	11,3	10,9	10,5	10,1	9,8	9,5
5	12,4	12,0	11,7	11,3	11,0	10,6	10,2	9,8	9,5	9,3
6	12,1	11,7	11,4	11,0	10,7	10,3	10,0	9,6	9,3	9,1
8	11,5	11,2	10,8	10,5	10,2	9,8	9,5	9,2	8,9	8,7
10	10,9	10,7	10,3	10,0	9,7	9,4	9,1	8,8	8,5	8,3
12	10,5	10,2	9,9	9,6	9,3	9,0	8,7	8,4	8,1	7,9
14	10,0	9,7	9,5	9,2	8,9	8,6	8,3	8,1	7,8	7,6
16	9,6	9,3	9,1	8,8	8,5	8,3	8,0	7,7	7,5	7,3
18	9,2	9,0	8,7	8,5	8,2	8,0	7,7	7,5	7,2	7,1
20	8,9	8,6	8,4	8,1	7,9	7,7	7,4	7,2	6,9	6,8
22	8,6	8,4	8,1	7,9	7,6	7,4	7,2	6,9	6,7	6,6
24	8,3	8,1	7,8	7,6	7,4	7,2	6,9	6,7	6,5	6,4
26	8,1	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0	6,7	6,5	6,3	6,1
28	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0	6,8	6,5	6,3	6,1	6,0
30	7,6	7,4	7,1	6,9	6,7	6,5	6,3	6,1	5,9	5,8
32	7,3	7,1	6,9	6,7	6,5	6,3	6,1	5,9	5,7	5,6

4 - PROCEDURA DI SAGGIO CON DILUIZIONE (EFFLUENTE)

4.1 - Saggio preliminare

Nel caso di campioni a tossicità sconosciuta o sospettati di essere particolarmente tossici, può essere vantaggioso effettuare una prova preliminare per meglio definire l'intervallo di tossicità entro cui condurre, successivamente, il saggio definitivo. Tuttavia, fatta eccezione per quegli scarichi la cui tossicità è imputabile a sostanze di confermata persistenza, è di solito molto importante allestire il saggio cronico nel più breve tempo possibile dal prelievo del campione. Pertanto un saggio preliminare a breve termine (24 h) può generalmente rappresentare il solo utile compromesso tra il rispetto dei limiti di conservabilità e la disponibilità di indicazioni sul grado di tossicità del campione stesso. Un saggio preliminare di questo tipo è allestito seguendo la procedura descritta per il "Metodo per test di tossicità acuta con *M. bahia*" al quale si rinvia (Viganò, 1996). Al contrario, se si sospetta che la tossicità dello scarico non sia affatto persistente, si rende necessario l'allestimento immediato del saggio cronico, seguendo le indicazioni fornite nel seguito (cfr. § 4.2).

Se nell'eventuale prova preliminare si osservano effetti tossici acuti, si può suggerire di adottare la minima concentrazione di campione che ha causato tale tipo di effetti come la massima di quelle che saranno poi saggiate nella prova definitiva a 7 giorni.

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 0,5, è applicabile a gran parte delle situazioni. Basandosi sulle informazioni eventualmente ottenute da un saggio preliminare, si potrà adottare un diverso intervallo di sperimentazione, un diverso fattore di diluizione o anche un maggior numero di concentrazioni. In generale, è comunque utile che gli organismi esposti alle concentrazioni più elevate vengano osservati più frequentemente nelle prime ore dopo l'avvio del saggio. Se si osservasse mortalità diventerebbe, infatti, possibile allestire nuove diluizioni di campione aggiungendole all'estremità inferiore dell'intervallo di tossicità che sarebbe così ampliato e migliorato nel suo potenziale informativo. Nel corso del saggio, le osservazioni relative alle diluizioni aggiunte andranno corrispondentemente ritardate rispetto ai tempi di allestimento originali.

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 26-27°C. Preparate le diluizioni

previste con le eventuali correzioni di salinità, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima o inferiore al limite di 4 mg/L si procede ad aerare i contenitori (cfr § 3.7 "Ossigeno disciolto"). Quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si introducono i giovani di *M. bahia*.

Ogni diluizione del campione viene distribuita in 8 repliche da 150 mL ciascuna. Per ogni replica si utilizzano 5 organismi di 7 giorni di età. 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. Questi sono trasferibili più facilmente se la pipetta (4 mm d.i.) provvista di bulbo elastico, è mantenuta in posizione verticale sopra l'organismo da prelevare, piuttosto che frontalmente o posteriormente allo stesso. Durante le operazioni di trasferimento, la reotassia del crostaceo fa sì che esso tenda ad aderire alle pareti del contenitore o alla superficie interna della pipetta. Attenzione, quindi, al rischio di perdite accidentali di individui.

E' necessario limitare l'evaporazione delle soluzioni di saggio per non causare variazioni della salinità e della concentrazione degli inquinanti. Per controllare il fenomeno si possono usare dei fogli di polietilene trasparenti o altri dispositivi (vetro d'orologio), con i quali coprire i recipienti di saggio.

Quotidianamente si ispezionano gli organismi e si provvede al rinnovo delle soluzioni di campione ed alla somministrazione di cibo fresco. Prima del rinnovo e con l'aiuto di una pipetta con bulbo in lattice, vengono rimossi gli organismi deceduti e i naupli di artemia non consumati. Sono registrati come deceduti quegli organismi che non reagiscono ad una leggera stimolazione.

Durante le operazioni di ricambio, i gruppi di misidacei non vengono rimossi dai contenitori di saggio. Le soluzioni a cui essi sono stati esposti, sono versate lentamente in un contenitore avente lo scopo di permettere il recupero degli individui eventualmente fuoriusciti nel travaso, oltre alle misure di O₂ disciolto, pH e altri parametri. Raggiunto un volume residuo minimo di circa una decina di mL si procede a reimmettere lentamente nel contenitore di saggio 150 mL di soluzione fresca. Per preparare le soluzioni fresche si opera secondo le condizioni precisate a proposito dell'allestimento della prova.

Le acque di scarico o dell'area recettrice possono essere campionate con diverse modalità e frequenze la cui scelta è dettata dagli obiettivi della sperimentazione. L'argomento è trattato da altre pubblicazioni, mentre in questo documento è utile evidenziare che la conduzione del saggio può essere in parte coordinata con le modalità del campionamento. In pratica sono possibili tre diverse soluzioni:

- a) un solo campione è usato per la conduzione di tutto il saggio, per cui gli organismi sono esposti,

quotidianamente, a soluzioni fresche preparate con aliquote del medesimo campione che è conservato al buio e a 4°C;

- b) il saggio è condotto utilizzando tre campioni prelevati secondo la sequenza d'uso; il primo campione è usato per l'allestimento e per i primi due rinnovi delle soluzioni di saggio (1° e 2° giorno), il secondo campione serve per il 3° e 4° giorno ed il terzo per il 5° e 6° giorno della sperimentazione. I tre campioni sono conservati al buio e a 4°C;
- c) il saggio è condotto utilizzando 7 diversi campioni, prelevati secondo la sequenza di impiego, per cui i misidacei vengono esposti a delle soluzioni di saggio che sono allestite, come al solito, quotidianamente, ma ogni volta con un nuovo campione.

Al termine dei sette giorni di sperimentazione tutti gli organismi sopravvissuti vengono esaminati per determinarne il sesso e il grado di maturazione delle gonadi. Questo esame deve essere effettuato entro un massimo di 12 h dal termine del saggio e se si prevede di operare al limite di questo arco di tempo è necessario sostituire le soluzioni di campione con la sola acqua di diluizione, lasciando comunque gli organismi nei propri contenitori. In questo modo si mantengono in vita i misidacei per il tempo necessario al completamento delle osservazioni e si evita che essi rimangano esposti ai tossici anche dopo il termine della sperimentazione.

Mediante l'esame dei singoli individui effettuato con un microscopio da dissezione, per ogni trattamento vengono registrati il numero degli organismi sessualmente immaturi, quello dei maschi e delle femmine, e per queste ultime, il numero di quelle aventi uova negli ovidotti o nel sacco di incubazione (Figg. 2-3). Queste osservazioni sono possibili solo negli individui vivi, poichè dopo la morte il corpo si opacizza rapidamente assumendo un colorazione biancastra.

Completato l'esame microscopico ogni organismo viene trasferito ad un retino, sciacquato ripetutamente con acqua deionizzata o Milli-Q® e quindi deposto in una navicella d'alluminio, o anche su un foglietto dello stesso materiale (2-3 cm²), di cui sia stato registrato il peso. Si ripete l'operazione per tutti gli organismi di ogni contenitore e si pone la navicella con i 5 crostacei in stufa a 60°C per 24h. Si trasferisce la navicella in un essicatore e dopo 1 h si procede alla pesatura con bilancia analitica.

Con questa procedura e in assenza di mortalità, si ottengono, per ciascun trattamento, otto valori medi di peso secco e dunque altrettante valutazioni di accrescimento dei misidacei.

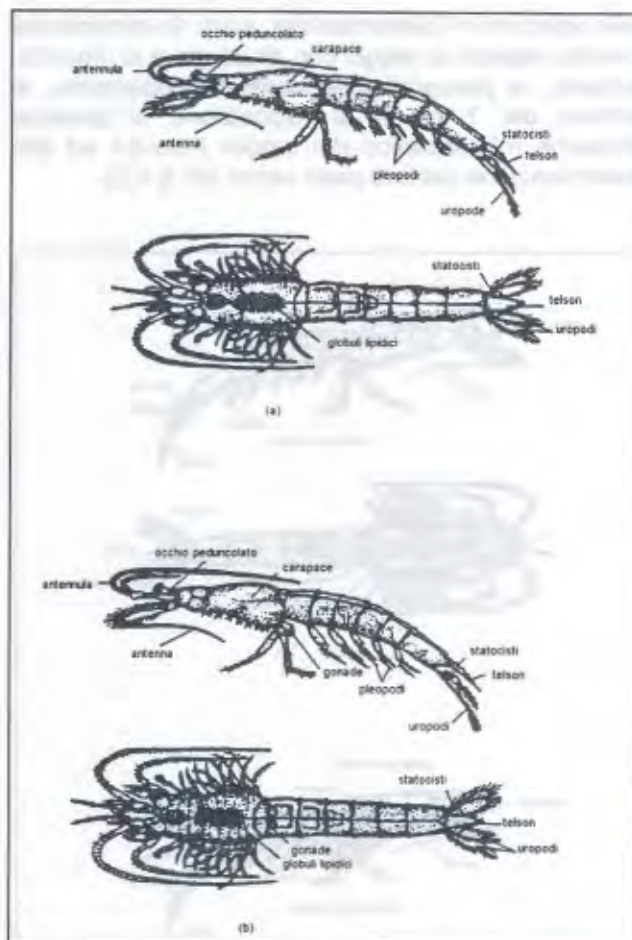


Fig. 2 - Misidaceo immaturo (a) e maschio adulto di *M. bahia* (b)

5 - PROCEDURA DI SAGGIO SENZA DILUIZIONE (CORPO IDRICO)

5.1 - Saggio definitivo

La soluzione che viene comunemente adottata per individuare la presenza di effetti tossici di tipo cronico nelle acque del corpo idrico, consiste nell'esporre degli individui di *M. bahia* ad un campione non diluito delle sue acque.

Se l'acqua di allevamento ha salinità diversa da quella del campione da saggiare, si procede ad acclimatare i crostacei secondo le indicazioni date al paragrafo 3.2. L'acqua usata per completare l'acclimatazione degli organismi, sia che si tratti di acqua naturale che di acqua sintetica, è utilizzata anche per l'allestimento del controllo.

A differenza del saggio su effluenti, il campione di acqua del corpo idrico è saggiato in un'unica serie di otto repliche. Questa viene affiancata, a seconda delle finalità del saggio, da una o più serie di organismi di controllo (cfr § 3.3). In ogni replica, avente il volume di 150 mL, vengono trasferiti 5 giovani individui di *M. bahia* di 7 giorni di età. Tutti gli altri aspetti procedurali quali l'aerazione, il rinnovo

delle soluzioni o l'alimentazione, sono da considerare invariati rispetto al saggio con diluizione e si rimanda, pertanto, ai paragrafi precedenti. Analogamente, al termine dei 7 giorni di esposizione si procede all'esame microscopico dei singoli individui ed alla determinazione del loro peso secco (cfr § 4.2).

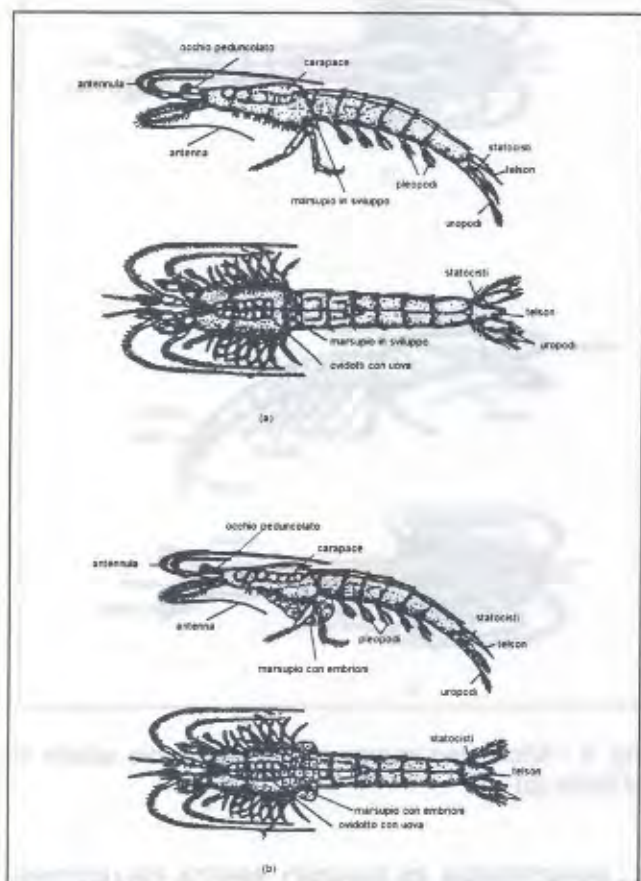


Fig. 3 - Femmina adulta di *M. bahia* con uova in sviluppo negli ovidotti (a) e con uova negli ovidotti ed embrioni nella sacca a marsupio (b).

6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

I risultati del saggio sono considerati accettabili se la concentrazione di ossigeno disciolto non è mai scesa al di sotto dei 4 mg/L in nessuno dei trattamenti; se al termine dei 7 giorni di sperimentazione la sopravvivenza degli organismi di controllo è $\geq 80\%$ e se il loro peso secco medio è $\geq 0,20$ mg/misidaceo. Oltre alla sopravvivenza e all'accrescimento degli organismi anche la fecondità può essere utilizzata per valutare la tossicità del campione. Ciò è possibile se, al termine del saggio, la produzione di uova è osservabile in almeno il 50% delle femmine di controllo.

BIBLIOGRAFIA

Viganò, L. (1996): "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia*", *Notiz. Metodi Anal. Acque*, giugno 1996, 19-31.

METODO PER TEST DI TOSSICITÀ CRONICA (7 GIORNI) CON *CERIODAPHNIA DUBIA**

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

RIASSUNTO

Viene descritto un metodo standardizzato per condurre dei test di tossicità della durata di 7 giorni con il crostaceo *Ceriodaphnia dubia* su campioni di acque di scarico o di corpi idrici superficiali. L'individuazione di effetti negativi sugli organismi acquatici, quali potrebbero essere causati da basse concentrazioni di contaminanti (tossicità cronica), si basa su misurazioni dell'attività riproduttiva, dell'accrescimento e della sopravvivenza di *C. dubia*. Una breve nota conclusiva descrive come effettuare l'analisi statistica dei risultati e quali metodi applicare. I risultati sono generalmente espressi in termini di massima concentrazione priva di effetti e minima concentrazione con effetti significativi (NOEC; LOEC).

SUMMARY

A 7-day test method is described to conduct, under standardized conditions, chronic toxicity tests on effluent discharges and receiving waters with the crustacean *Ceriodaphnia dubia*. The detection of adverse effects on aquatic organisms as can be caused by low levels of contaminants (chronic toxicity) is based on measurements of reproduction, growth and survival of *C. dubia*. A final brief note describes how to perform data analysis and which statistical procedure should be used. In general, results are reported in terms of no observable and lowest observable effect concentration (NOEC; LOEC).

1 - INTRODUZIONE

Il metodo descrive la procedura con cui è possibile indagare se un effluente di scarico o un'acqua superficiale contengono inquinanti a concentrazioni

* Il metodo è stato discusso ed approvato dal sottogruppo "Metodi con Crostacei" del Gruppo Metodi Biologici composto da: Amodei M., Bacci E., Baudo R., Buffagni M., De Marco N., Ferraro M., Marchetti R., Marchini S., Pasini M., Rampa P., Sbrilli G. e Viganò L.

tali da causare effetti tossici di tipo cronico sul crostaceo *Ceriodaphnia dubia*. La mancata osservazione di effetti tossici di tipo cronico per un dato campione non esclude che essi siano osservabili saggiando campioni prelevati in altri momenti, e ciò in dipendenza della variabilità dello scarico o del corpo idrico superficiale e delle fonti di contaminazione che in essi trovano recapito.

2 - GENERALITÀ SUL METODO

In questo tipo di saggio giovani individui di *C. dubia* sono esposti per 7 giorni a campioni acquosi dei quali si voglia stimare la tossicità cronica. Generalmente, un campione di acqua di scarico, o più raramente di un corpo idrico superficiale, vengono saggiati ad almeno 5 diluizioni a ciascuna delle quali è esposto un numero definito di organismi neonati. Nell'arco di tempo di 7 giorni ed alle condizioni sperimentali descritte in questa metodica, i neonati di *C. dubia* raggiungono la maturità sessuale e sono in grado di produrre, a loro volta, tre schiuse di nuovi individui. Solitamente un campione capace di effetti cronici manifesta la propria tossicità inibendo l'attività riproduttiva del cladocero; tuttavia, anche l'accrescimento è facilmente alterabile dalle sostanze tossiche presenti nel campione e, pertanto, la valutazione della tossicità dovrà basarsi, ovunque possibile, sull'esame di questi due parametri. I dati relativi all'accrescimento sono ottenibili, a saggio ultimato, mediante misurazioni di peso secco o più semplicemente di lunghezza corporea. Il confronto tra la riproduzione e la crescita degli organismi esposti alle diverse diluizioni del campione e quelle di un gruppo mantenuto come controllo, permetterà di individuare il valore di diluizione che non inibisce significativamente i parametri considerati (NOEC = No Observed Effect Concentration; massima concentrazione/diluizione alla quale non si osservano effetti statisticamente significativi). La tossicità cronica del campione si può manifestare anche sulla sopravvivenza del crostaceo. Elaborando gli eventuali dati di mortalità può essere possibile stimare la diluizione letale per una determinata percentuale di individui (es. LC50), a diversi tempi di esposizione, sino a un massimo di 7 giorni.

3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

3.1 - Materiali e strumentazione

Per la conduzione del saggio di tossicità è necessario:

- un minimo di 120 contenitori del tipo beaker in vetro borosilicato con volume utile di 30 mL. Diversi laboratori utilizzano con successo dei contenitori "a perdere" in polistirene reperiti originariamente tra gli articoli commercializzati per

uso alimentare. Minimizzare l'adsorbimento dei probabili tossici è un obiettivo importante nella scelta dei contenitori;

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

3.2 - Organismi per il saggio

La specie utilizzata in questo saggio di tossicità è il crostaceo cladocero *Ceriodaphnia dubia* che è allevato in laboratorio seguendo le indicazioni fornite nella Appendice A2 del corrispondente "Metodo per test di tossicità acuta con *C. dubia*". Il saggio è allestito con i neonati appartenenti alla terza schiusa o ad una delle successive, prodotte da femmine mantenute in condizioni di allevamento controllate e rispondenti ai requisiti di buone condizioni culturali descritti in Appendice al citato metodo per saggio acuto. In generale, è necessario che i neonati destinati alla prova siano prodotti da femmine allevate per almeno 7 giorni nella stessa acqua usata per le diluizioni o in un'acqua con caratteristiche simili (cfr. par. 3.3).

La prova deve essere allestita con giovani individui nati entro le 24 h precedenti l'avvio del saggio. Inoltre, è preferibile che la differenza di età tra gli individui sia contenuta entro alcune ore a tutto vantaggio della contemporaneità degli eventi di schiusa osservabili nel corso della prova e della facilità di interpretazione dei risultati. Da un punto di vista pratico è facilmente applicabile la limitazione d'uso ad un arco di tempo massimo di 8-12 h.

Se i neonati non vengono utilizzati entro 2-3 ore dall'isolamento dai recipienti in cui sono schiusi, è necessaria la somministrazione di cibo (cfr par. 3.6).

3.3 - Acqua di diluizione

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

- a) Se lo scopo è di evidenziare la capacità di un effluente o delle acque di un corpo idrico di produrre effetti tossici cronici, studiandone l'andamento nel tempo o confrontando il grado di contaminazione di diverse aree, come diluente e controllo si adotterà un'acqua semisintetica (saggio in condizioni standard) preparata a partire da un'acqua minerale, scelta tra quelle disponibili in commercio, ad ottenere un mezzo semisintetico con le seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg CaCO₃/L, alcalinità 110-120 mg CaCO₃/L, Ca/Mg > 1 e prossimo a 4, Na/K > 1 e prossimo a 10.

Pur con la medesima finalità, si possono distinguere due modi di impiego di un'acqua minerale. Nel primo caso, ci si serve di un'acqua con un elevato contenuto di sali e ad una certa aliquota di acqua minerale viene aggiunta acqua Milli-Q® o di qualità equivalente, in modo da ottenere, per diluizione, il mezzo semisintetico con le caratteristiche volute. Nel secondo caso, ci si serve di un'acqua con basso contenuto di sali (oligominerale), che viene corretta nei suoi costituenti maggiori mediante l'aggiunta di sali di grado analitico a dare il mezzo con le caratteristiche indicate. Per ulteriori dettagli si rinvia alla Appendice A3 del "Metodo per test di tossicità acuta con *C. dubia*" (Viganò, 1996).

- b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità cronica delle acque del recettore a seguito dell'immissione di uno scarico nelle stesse, come diluente e controllo si userà l'acqua non contaminata del recettore, prelevata a monte dell'immissione o comunque al di fuori dell'area esposta a fonti di contaminazione. Nel caso essa non sia disponibile, si può utilizzare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale o un'acqua semisintetica (cfr "punto a") aventi approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore oggetto del controllo. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purché di qualità adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) e nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 h dallo stesso, mantenendo i campioni refrigerati (4°C) e al buio quando se ne faccia uso a più di 24 h dalla raccolta. Oltre al controllo rappresentato dagli

organismi esposti all'acqua non contaminata del recettore, dovrebbe essere allestito anche un secondo gruppo di controllo nel quale gli individui sono esposti all'acqua comunemente utilizzata per l'allevamento.

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

3.4 - Illuminazione

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

3.5 - Temperatura

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

3.6 - Alimentazione

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

Sono disponibili due tipi di diete che si differenziano solo per gli ingredienti somministrati come integratori mentre condividono lo stesso componente di base rappresentato dall'alga verde unicellulare *Selenastrum capricornutum* (recentemente riclassificata come *Pseudokirchneriella subcapitata*). Nelle Appendici A4 e A5 del "Metodo per test di tossicità acuta con *C. dubia*" (Viganò, 1996), è descritta la preparazione delle due diete che sono indicate, rispettivamente, come composita e semplificata. In ogni caso, per la conduzione del saggio deve essere usato lo stesso tipo di alimentazione che è adottato per l'allevamento degli organismi.

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

La seconda dieta, quella indicata come semplificata, prescrive una densità di cellule algali di 300.000 cell/mL mentre l'integrazione è data da una sospensione di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*), anch'esso somministrato in ragione di 300.000 cell/mL, e da una soluzione di tre vitamine. Quest'ultima è composta da tiamina cloridrato (B₁) 75 µg/L, biotina (H) 0,75 µg/L e cianocobalamina (B₁₂) 1 µg/L ed è somministrata nella quantità di 1 mL per litro di soluzione di saggio.

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

3.7 - Ossigeno disciolto

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

ossigeno disciolto entro l'intervallo 40-100 % del valore di saturazione.

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

4 - PROCEDURA DI SAGGIO CON DILUIZIONE (EFFLUENTE)

4.1 - Saggio preliminare

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

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

Per la conduzione di un saggio acuto preliminare la temperatura da adottare è $25 \pm 1^\circ\text{C}$, e cioè la stessa del saggio a 7 giorni, mentre la procedura è quella descritta nel "Metodo per test di tossicità acuta con *C. dubia*" al quale si rinvia (Viganò, 1996).

4.2 - Saggio definitivo

La procedura comunemente adottata consiste nell'allestimento di almeno 5 diluizioni del campione che, in assenza di dati pregressi, sono individuate nella seguente serie: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % e 6,25 % (v/v). I valori sono in serie geometrica con un fattore di diluizione pari a 0,5.

Se l'effluente è noto o sospettato di essere particolarmente tossico, la serie di concentrazioni deve essere opportunamente ampliata dal lato delle concentrazioni inferiori, non allestendo, eventualmente, quelle all'opposto più elevate, quali le concentrazioni 50 e 100%. Viceversa, se non si

hanno informazioni preliminari, si può adottare un semplice accorgimento che consiste nel controllare frequentemente le concentrazioni più elevate per le prime ore dopo l'inizio del saggio: se si osserva mortalità si provvede ad allestire altre diluizioni, ampliando la serie prescelta nella direzione delle concentrazioni minori.

Se è stato necessario refrigerare i campioni, le aliquote destinate al saggio sono prelevate dopo accurato mescolamento e portate alla temperatura scelta per la prova. Si procede poi alla misurazione della concentrazione di O₂ disciolto in accordo alle indicazioni date in precedenza (cfr par. 3.7). Solo quando le 5 o più diluizioni hanno raggiunto le condizioni indicate per il test, vengono immessi gli organismi. Ogni individuo è mantenuto singolarmente in un beaker contenente almeno 15 mL di soluzione di saggio. Per ciascuna diluizione di campione vengono saggiati 10 individui, ognuno dei quali rappresenta pertanto una replica di quella diluizione. Procedura analoga vale anche per il gruppo di organismi di controllo.

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

Quotidianamente si provvede al rinnovo delle soluzioni del saggio. Pertanto, ogni 24 h, gli individui di *C. dubia* vengono trasferiti ad una nuova serie di recipienti, contenenti soluzioni di saggio e cibo freschi, preparati secondo le stesse indicazioni seguite per l'allestimento della prova. In concomitanza con le operazioni di trasferimento, si registrano e rimuovono gli organismi deceduti, si contano e scartano i neonati prodotti e si misurano O₂ disciolto, pH o altri parametri.

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

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

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

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

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

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

Viceversa, un organismo che non si riproduce affatto per tutta la durata del test si rivela generalmente un

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

5 - PROCEDURA DI SAGGIO SENZA DILUIZIONE (CORPO IDRICO)

5.1 - Saggio definitivo

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

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

6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

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

BIBLIOGRAFIA

Viganò, L. (1996): "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia*", *Notiz. Metodi Anal. Acque*, giugno 1996, 9 - 19.

METODO PER TEST DI TOSSICITÀ CRONICA (7 GIORNI) CON *CYPRINODON VARIEGATUS**

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

RIASSUNTO

Viene descritta la procedura standard per effettuare dei saggi di tossicità (sub)cronici su effluenti di scarico e acque recettrici utilizzando il pesce marino *Cyprinodon variegatus*. La valutazione della potenziale tossicità cronica di scarichi e acque superficiali si basa sulle misurazioni di crescita e sopravvivenza effettuate su individui allo stadio larvale. Una nota sintetica descrive infine quale metodo statistico debba essere utilizzato per l'analisi dei dati tossicologici. I risultati sono comunemente espressi come concentrazione di non effetto e minima concentrazione con effetti significativi (NOEC; LOEC).

SUMMARY

The standardized procedure to perform 7-day (sub)chronic toxicity tests on effluents and receiving waters with the marine fish *Cyprinodon variegatus* is described. The assessment of chronic toxicity potential of whole effluents and surface waters is based on measurements of growth and survival of fish larvae. A brief note finally describes how to choose the statistical methods to analyze toxicity test data. Results are usually reported as no observable and lowest observable effect concentration (NOEC; LOEC).

1 - INTRODUZIONE

Viene descritto un metodo standard il cui scopo è quello di stimare la tossicità cronica, più esattamente sub-cronica, di effluenti di scarico ed acque di mare sul pesce *Cyprinodon variegatus*. La mancata osservazione di effetti tossici di tipo cronico per un particolare campione non esclude che essi potranno essere osservati con campioni prelevati in momenti successivi, e ciò semplicemente a causa della possibile variabilità delle fonti di contaminazione, siano esse puntiformi o diffuse, come anche della capacità di diluizione dell'area recettrice alla quale esse recapitano.

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

2 - GENERALITÀ SUL METODO

La metodologia di saggio per la valutazione della tossicità cronica di un effluente di scarico o di un'acqua di mare per *Cyprinodon variegatus*, prevede che gli avannotti di questa specie ittica, schiusi da meno di 24 h, siano esposti ad un campione delle acque da esaminare per un periodo di 7 giorni.

Gli effetti cronici di uno scarico vengono valutati mediante l'esposizione di almeno cinque gruppi di avannotti ad altrettante diluizioni dell'effluente. Al termine del periodo di esposizione la mortalità e l'accrescimento dei cinque gruppi sperimentali sono confrontati con le risposte di un ulteriore gruppo di avannotti mantenuti come controllo. Questo esame, condotto con metodi statistici, permette di individuare quella concentrazione di scarico che non riduce significativamente (NOEC) sia la sopravvivenza che l'accrescimento di *C. variegatus*. Le percentuali di organismi deceduti alle diverse diluizioni di campione possono essere ulteriormente elaborate per definire la concentrazione di scarico che si stima letale per una determinata percentuale dei giovani ciprinodontidi (es. LC50). Compatibilmente con il tipo di risposte ottenute, è possibile calcolare questo valore di concentrazione letale per tempi di esposizione crescenti sino al termine massimo dei 7 giorni del saggio.

La ricerca in acqua di mare di inquinanti capaci di effetti tossici cronici si può avvalere dello stesso tipo di procedura descritta per un effluente. Tuttavia, a causa dei rapporti di diluizione, generalmente elevati, tra la fonte di contaminazione e l'acqua recettrice, è facile prevedere che l'allestimento di una serie di diluizioni riuscirebbe a ridurre la concentrazione degli inquinanti al di sotto del limite di rilevabilità del saggio stesso. Per questi motivi, la tossicità cronica delle acque di mare viene comunemente valutata con un saggio senza diluizione nel quale gli avannotti di *C. variegatus* sono esposti al campione "tal quale". Anche in questo caso la significatività di eventuali riduzioni di sopravvivenza o di accrescimento è determinata per confronto statistico con un gruppo di organismi di controllo.

3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

3.1 - Materiali e strumentazione

In aggiunta alla comune dotazione strumentale di laboratorio, la conduzione del saggio a 7 giorni richiede:

- almeno 18 contenitori per l'esposizione degli avannotti alle soluzioni di saggio. Devono essere utilizzati dei recipienti con volume utile di 750 mL, in vetro borosilicato, del tipo beaker, cristallizzatori o anche vaschette come quella illustrata in Fig. 1. Il compartimento laterale di quest'ultima, che è separato dal principale mediante un retino, serve

ad effettuare le operazioni di rinnovo delle soluzioni senza arrecare disturbo agli organismi del saggio;

- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro, controllato da un temporizzatore per la simulazione del fotoperiodo e possibilmente da un dispositivo che consenta la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- bagno termostato o altro dispositivo per il mantenimento della temperatura delle soluzioni da saggiare a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e per l'intera durata del saggio;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- misuratore di salinità;
- fonte di aria compressa a bassa pressione con cannule in vetro o pipette pasteur. Negli impianti centralizzati gli oli sono contaminanti comuni e devono essere rimossi con cartucce a carbone attivo. Gli aeratori usati in acquariologia costituiscono una soluzione adeguata;
- 2-4 imbuto separatori da 2 L per la schiusa delle cisti di *Artemia salina*;
- cisti di *Artemia salina* con le caratteristiche di idoneità descritte in Appendice al "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *C. variegatus*" (Viganò, 1996);
- miscela di sali per la preparazione di acqua di mare artificiale. Le miscele commerciali identificate dal marchio Forty Fathoms® e HW Marinemix® hanno dato buoni risultati sia per la coltura che per la conduzione dei saggi.

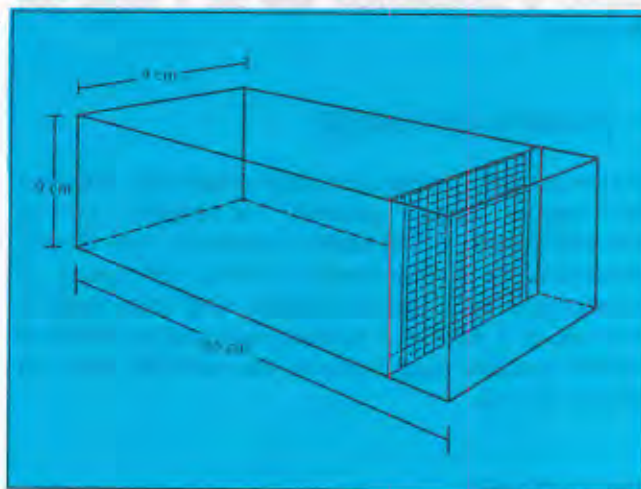


Fig. 1 - Vaschetta in vetro a due compartimenti separati da un retino in teflon o altro materiale idoneo. Il compartimento più ampio è dedicato all'esposizione dei pesci, l'altro alle operazioni di rinnovo delle soluzioni di saggio (Norberg e Mount, 1985)

3.2 - Organismi per il saggio

Per la conduzione del saggio a 7 giorni, si utilizzano le larve di *C. variegatus* di età pari o inferiore a 24 h

(Fig. 2, stadio C). Le uova fecondate necessarie alla produzione degli avannotti possono essere acquistate da allevatori specializzati od ottenute in laboratorio da esemplari adulti mantenuti secondo la procedura descritta in Appendice al "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *C. variegatus*" (Viganò, 1996). In breve, 7-8 giorni prima dell'avvio del saggio si isolano i riproduttori nelle apposite vasche. Al fine di disporre del numero sufficiente di larve aventi l'età richiesta, è necessario raccogliere le uova deposte nell'arco di 2-3 giorni. Ciò è dovuto sia ad una consistenza variabile dei singoli eventi riproduttivi come al fatto che, anche in condizioni ideali, le uova appartenenti alla stessa deposizione schiudono distribuite in un arco di tempo che può raggiungere le 72 h. Da ciò deriva che il mantenimento in incubazione di più gruppi di uova, che per quanto detto avranno tempi di schiusa sovrapposti, offre maggiori garanzie di disporre del numero di larve necessario al saggio.

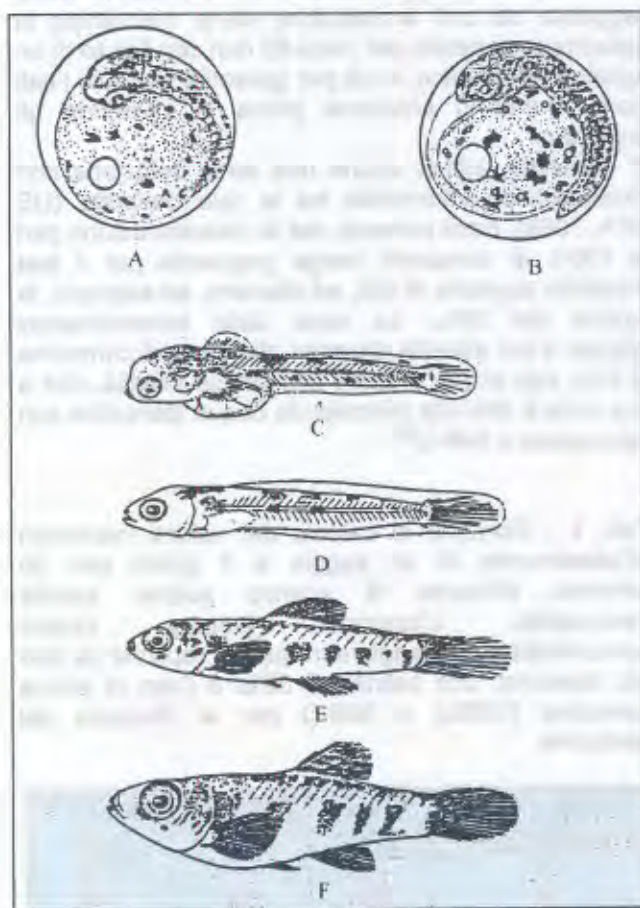


Fig. 2 - Sviluppo embrionale di *C. variegatus*. A: embrione 48 ore dopo la fecondazione, interamente segmentato e con pigmentazione sul sacco e sul corpo; B: embrione di 72 ore, libero di muoversi all'interno dell'uovo; C: larva appena schiusa, lunghezza 4 mm; D: giovane individuo di 5 giorni con sacco vitellino completamente assorbito; E e F: giovani esemplari rispettivamente di 9 e 12 mm (modificata da U.S. EPA, 1988)

A 25°C lo sviluppo dell'embrione si completa mediamente in 6-7 giorni. Per facilitare la cura e l'osservazione degli embrioni durante il periodo di incubazione, è necessario ripulire le uova dai filamenti di cui sono provviste e che le farebbero aderire le une alle altre. Per fare questo, almeno 4 ore dopo la deposizione, si fanno rotolare su di una reticella di nylon (250-500 μm), pressandole delicatamente con un dito. A 48-72 h dalla fertilizzazione, l'embrione, osservato con un microscopio da dissezione, ha l'aspetto illustrato in Fig. 2 (stadi A e B). Le uova non fecondate, gli embrioni deformi o deceduti, vengono scartati durante il rinnovo quotidiano del mezzo di incubazione. Circa 24 h prima della schiusa, la salinità del mezzo di incubazione viene adeguata, se necessario, a quella di conduzione del test.

La distribuzione degli eventi di schiusa in un arco di tempo di più giorni, fa sì che anche nelle 48 h precedenti l'avvio del saggio una frazione degli embrioni in incubazione schiuda. E' opportuno raccogliere e mantenere in un recipiente a parte anche questi organismi poichè potrebbero essere utilizzati, a loro volta, per il saggio.

E' già stato precisato che il saggio deve essere allestito con gli avannotti nati entro le 24 h antecedenti. Se, tuttavia, nonostante gli accorgimenti indicati, il numero degli organismi non fosse sufficiente, i pochi individui mancanti possono essere prelevati proprio tra quelli schiusi nelle 24 h ancora precedenti (48 h dal test). Questi ultimi verranno aggiunti, nel numero necessario, agli organismi del gruppo principale e in tal modo saranno distribuiti casualmente tra i diversi trattamenti.

3.3 - Acqua di diluizione

Come condizione generale, le diluizioni del campione da saggiare ed il controllo sono preparati con lo stesso tipo di acqua che è stata usata per l'allevamento o l'incubazione di *C. variegatus*. In relazione alle finalità del test, è comunque possibile utilizzare altre acque di diluizione o di controllo, pertanto è opportuno caratterizzare almeno tre tipi di condizioni sperimentali:

- a) Se l'obiettivo è di stimare la tossicità cronica di un effluente o di un'acqua di mare naturale, producendo un dato assoluto atto a confronti nel tempo o tra diverse aree, verrà utilizzata un'acqua di diluizione artificiale standard. Per la preparazione di acqua di mare standard si ricorre a miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quali Forty Fathoms® e HW Marinemix®. La salinità prevista per un saggio in condizioni standard è pari a 35 ‰.

Anche un'acqua di mare ipersalina (vedi poi) è utilizzabile per condurre il saggio a 7 giorni, purchè sia stata ottenuta da acqua di mare prelevata in area pelagica non contaminata e con variabilità trascurabile delle caratteristiche chimico

fisiche. Se per effettuare il test di un effluente di scarico viene usata un'acqua ipersalina, si tenga presente che la massima concentrazione che può essere saggiata è pari a 65% (v/v), a meno di adottare ulteriori accorgimenti (vedi poi).

- b) Nel caso la finalità del saggio sia quella di stimare la tossicità cronica di uno scarico nelle acque recettrici non contaminate, sarà necessario usare come acqua di diluizione e controllo quella prelevata nell'area di sversamento ma al di fuori dell'influenza di 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 sintetiche aventi caratteristiche fisiche e chimiche il più possibile simili a quelle dell'acqua recettrice. Se si usano acque di diluizione sospettate di modificare, in qualche misura, l'accrescimento o la sopravvivenza di *C. variegatus*, è preferibile includere un secondo controllo preparato ad esempio con l'acqua di allevamento, un'acqua cioè i cui effetti sull'organismo siano ben documentati.
- c) Se, infine, l'obiettivo del saggio è di esaminare le interazioni tra i contaminanti dello scarico e quelli già presenti nell'acqua di mare recettrice, quest'ultima sarà utilizzata come acqua di diluizione, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, purchè prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. La conduzione di questo tipo di saggio richiede l'allestimento di due gruppi di controllo. Un primo gruppo in cui gli organismi sono esposti a quella stessa acqua di diluizione che ha, verosimilmente, un certo grado di contaminazione, ed un secondo gruppo in cui gli organismi sono esposti all'acqua non contaminata dell'area di ricezione. Anche in questo tipo di saggio, come in quello descritto al punto precedente, potrebbe essere vantaggioso disporre di un ulteriore gruppo di riferimento allestito con acqua di allevamento o incubazione.

Un effluente di scarico ha, comunemente, una salinità trascurabile. Gli organismi devono, tuttavia, essere esposti alle diluizioni di campione senza che le differenze di salinità possano rappresentare una fonte di stress o di variabilità dei risultati. E' dunque necessario uniformare la salinità delle diverse diluizioni di campione e a questo scopo, vi sono due possibili 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, previa filtrazione ($\leq 1\mu\text{m}$) e per evaporazione controllata (< 40°C), da una qualsiasi acqua di mare naturale purchè di elevata qualità, e a questo proposito si

consiglia il prelievo da aree pelagiche. L'acqua ipersalina contiene tutti i micronutrienti, i colloidali e alcune componenti microbiche che sono richiesti per l'accrescimento e l'attività riproduttiva degli organismi marini. Inoltre, può essere conservata per periodi prolungati, al buio e a temperatura ambiente, 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 ‰ (vedi es Tab. 1). La seconda soluzione non ha 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 7,5-8,5 sono da considerare come potenziale causa di danno per gli 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' accettata, infine, anche una terza soluzione con caratteristiche intermedie tra le due descritte (US EPA, 1988). Essa prevede che la concentrazione pari al 100% di campione venga preparata per il test mediante aggiunta di sali, ad ottenere, ad esempio, la salinità del 35‰. La serie delle concentrazioni inferiori è poi allestita diluendo aliquote del campione al 35‰ con acqua di mare alla stessa salinità, che a sua volta è ottenuta miscelando acqua ipersalina con deionizzata o Milli-Q®.

Tab. 1 - Esempio di calcolo dei volumi necessari all'allestimento di un saggio a 7 giorni con un generico effluente di scarico avente salinità trascurabile. L'esempio ipotizza cinque concentrazioni da saggiare in quattro repliche da 500 mL ciascuna, una salinità di 35‰ e l'uso di acqua ipersalina (100‰) e Milli-Q per le diluizioni del campione.

Concentrazione effluente (% v/v)	Milli-Q (mL)	Effluente (mL)	Ipersalina (mL)
60	100	1200	700
30	700	600	700
15	1000	300	700
7,5	1150	150	700
3,25	1235	65	700

3.4 - Illuminazione

Il saggio a 7 giorni è condotto mantenendo gli organismi nelle stesse condizioni di illuminazione che sono 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 di 16 h luce e 8 h di buio.

3.5 - Temperatura

Le soluzioni da saggiare sono mantenute per tutta la durata della sperimentazione a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ mediante immersione dei contenitori in bagni termostatici o mediante il condizionamento dell'intero ambiente dedicato alla sperimentazione.

3.6 - Alimentazione

Dall'allestimento del saggio sino al 6° giorno dello stesso, gli avannotti di *C. variegatus* sono alimentati quotidianamente con naupli di *Artemia salina* appena schiusi (< 24 h). Il 7° ed ultimo giorno della prova il cibo non viene somministrato.

Nei giorni 0-1-2 si diluiscono 4 mL di sospensione concentrata di naupli di artemia in 80 mL di acqua di mare e si distribuiscono 2 mL della sospensione risultante a ciascun recipiente di saggio. Nei giorni 3-4-5-6 della prova, la quantità di cibo viene aumentata, per cui 6 mL di sospensione concentrata di *A. salina* sono diluiti a 80 mL, mentre resta invariato il volume da distribuire (2 mL/recipiente). Dal momento che i naupli tendono a sedimentare, è importante che la sospensione sia mantenuta omogeneamente dispersa durante la somministrazione ai contenitori di saggio. A parità di altri fattori, infatti, la quantità di cibo disponibile per ciascun gruppo di avannotti è un fattore critico nel determinare il loro accrescimento.

Se nel corso della sperimentazione, la tossicità di un trattamento riduce del 50 % o più il numero di avannotti di un contenitore, il quantitativo di naupli somministrato deve essere parimenti dimezzato (1 mL/recipiente).

Per i criteri di scelta e le modalità d'impiego delle cisti di *A. salina* si rinvia al "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *C. variegatus*".

3.7 - Ossigeno disciolto

Alle concentrazioni di effluente più elevate è maggiore il rischio di una massiccia riduzione della concentrazione di ossigeno disciolto. Ciò rende necessario controllare questo parametro e con particolare attenzione durante le prime ore del saggio. La concentrazione di ossigeno disciolto non deve essere mai inferiore al 40% del valore di saturazione (v. Tab. 2 a pag. 6). In caso contrario si deve provvedere all'aerazione delle soluzioni facendo gorgogliare aria compressa priva di contaminanti mediante cannule in vetro. Il flusso d'aria deve essere regolato al minimo livello possibile, in modo tale da soddisfare il criterio di validità del saggio senza

causare eccessiva turbolenza od arrecare stress indesiderato agli organismi. Un flusso d'aria pari a 100 bolle/min. può costituire un limite indicativo che non dovrebbe essere superato. Se si rendesse necessario aerare un trattamento o una concentrazione, anche i restanti devono essere parimenti aerati.

4 - PROCEDURA DI SAGGIO CON DILUIZIONE (EFFLUENTE)

4.1 - Saggio preliminare

Se un campione ha tossicità sconosciuta o se si sospetta che esso sia molto tossico, può essere vantaggioso condurre dei saggi di tossicità preliminari per meglio definire l'ambito di concentrazioni entro cui condurre poi il test definitivo.

L'entità delle alterazioni che possono intervenire in un campione durante la sua conservazione, ha più volte confermato la necessità che esso venga saggiato nel più breve tempo possibile. E' quindi molto difficile poter condurre col medesimo campione un saggio esplorativo di 7 giorni e un successivo saggio definitivo ed ottenerne dei risultati attendibili. Pertanto, ad eccezione di quegli scarichi la cui tossicità sia marcatamente persistente, solo un saggio a breve termine (24-48 h) può essere fonte dei dati tossicologici preliminari che sono utili alla sperimentazione definitiva. Un saggio esplorativo di questo tipo deve essere allestito secondo il "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *C. variegatus*" (Viganò 1996), condotto alla temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$. In merito all'età degli organismi come agli altri aspetti procedurali per quali il metodo ammette un certo ambito di variabilità, è opportuno scegliere quelle condizioni che sono il più possibile simili a quelle del saggio definitivo.

Se, infine, si teme che la tossicità del campione non sia per nulla persistente, diventa necessario, all'opposto, l'allestimento immediato del test cronico definitivo, seguendo la procedura descritta nel seguito.

4.2 - Saggio definitivo

Per la conduzione della prova definitiva si preparano almeno 5 diluizioni del campione da esaminare. La serie di concentrazioni 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % e 6,25 % (v/v), che è definita da un fattore di diluizione pari a 0,5, può essere adottata nella generalità dei casi. Se sono disponibili dei dati tossicologici preliminari che evidenziano un diverso intervallo di tossicità, la serie di concentrazioni da saggiare verrà adattata di conseguenza, ricorrendo anche ad un diverso fattore di diluizione o a un maggior numero di concentrazioni.

In ogni caso, a prescindere dalla disponibilità di dati preliminari, è opportuno controllare, nelle prime ore di

saggio, gli avannotti esposti alle concentrazioni più elevate. Se si osserva mortalità entro 1-2 ore, è infatti consigliabile ampliare la serie prescelta per la sperimentazione, aggiungendo altre concentrazioni all'estremità inferiore dell'intervallo di tossicità. Proseguendo nell'esempio già proposto, verrebbero allestite le concentrazioni 3,1 %, 1,5 % e così via.

I volumi di campione necessari alla conduzione del saggio sono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Preparate le diluizioni previste con le eventuali correzioni di salinità, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima o inferiore al limite del 40 % del valore di saturazione si devono aerare i contenitori. Solo dopo che le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si possono introdurre gli avannotti di *C. variegatus*. Ogni concentrazione di campione è preparata in almeno 3 repliche da 500 mL, e in ciascuna di esse vengono esposte almeno 10 larve di pesce. L'eventuale incremento del numero di repliche o del numero di avannotti per replica, deve basarsi sulla disponibilità orientativa di 50 mL di soluzione per ogni individuo.

Gli organismi vengono distribuiti secondo una sequenza casuale nei diversi contenitori sino al completamento del numero richiesto. Per evitare di diluire le soluzioni del saggio, è opportuno ridurre al minimo il volume d'acqua trasferito con gli organismi, prestando, tuttavia, la massima attenzione a non danneggiare o stressare inutilmente gli avannotti. È necessario limitare l'evaporazione delle soluzioni di saggio per non causare variazioni della salinità e della concentrazione degli inquinanti. Per controllare il fenomeno si possono usare dei fogli di polietilene trasparenti con i quali coprire i recipienti di saggio.

Quotidianamente si ispezionano gli organismi e si provvede al rinnovo delle soluzioni di campione ed alla somministrazione dei naupli di *Artemia* appena schiusi. Durante il rinnovo delle soluzioni, gli avannotti non vengono rimossi dai contenitori di saggio, e pertanto, prima delle operazioni di ricambio e di alimentazione, si provvede alla pulizia dei contenitori stessi. Con l'aiuto di una pipetta con bulbo in lattice, si rimuovono i naupli di *artemia* non consumati e gli avannotti deceduti, registrando come tali quelli che non mostrano movimenti opercolari o non reagiscono ad una leggera stimolazione. Si può anche operare utilizzando un sifone, sebbene in tal caso si deve prestare molta attenzione a non aspirare anche gli organismi. Questa soluzione si rivela più pratica per la successiva rimozione del mezzo, e soprattutto se il saggio è condotto con le vaschette illustrate in Fig. 1, in quanto lo scomparto laterale semplifica ulteriormente questa operazione, minimizzando il disturbo degli avannotti. In ogni caso, la soluzione di campione da scartare, viene raccolta in un contenitore avente lo scopo di permettere il recupero degli individui accidentalmente rimossi, oltre alle misure di O_2 disciolto, pH o altri parametri. Raggiunto un volume residuo minimo che sia sufficiente a lasciare le larve immerse, si trasferiscono lentamente nel contenitore di saggio i 500 mL di soluzione fresca.

Nel caso delle vaschette menzionate, il comparto laterale serve anche alla operazione di riempimento. Le soluzioni fresche vengono preparate rispettando le stesse condizioni descritte per l'allestimento della prova.

I campioni delle acque da esaminare sono prelevati con modalità e frequenze differenti in relazione agli obiettivi della sperimentazione. La conduzione del saggio a 7 giorni con *C. variegatus* può essere in parte adattata agli obiettivi dell'indagine e alle modalità del campionamento. In pratica si possono distinguere tre diverse soluzioni:

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

Il saggio termina dopo 7 giorni di esposizione. Allo scadere del 7° giorno si preparano tutti gli organismi sopravvissuti per le successive misurazioni del peso secco.

A questo scopo gli avannotti di ogni contenitore vengono raccolti su di un retino ($500 \mu\text{m}$), sciacquati ripetutamente con acqua deionizzata o Milli-Q® e quindi sacrificati mediante immersione in un beaker contenente acqua deionizzata e ghiaccio. Il gruppo di larve è poi trasferito ad una navicella di alluminio, di peso noto, che è posta in stufa a 60°C per 24h. Al termine la navicella è raffreddata in essiccatore per circa 1 h e quindi pesata con bilancia analitica.

Ipotesizzando l'allestimento minimo di 3 repliche da 10 individui e la completa sopravvivenza degli organismi, si ottengono, secondo la procedura descritta, tre valori di peso medio per ogni trattamento (US EPA, 1988). L'esame statistico degli effetti sull'accrescimento potrebbe risultarne penalizzato, riscontrando differenze significative solo nei casi più evidenti. Si può quindi tentare di raddoppiare il numero delle misurazioni di peso medio dividendo i 10 esemplari di ogni contenitore di saggio in due sottogruppi di 5 avannotti ciascuno. Così facendo l'esame statistico sarebbe basato sul confronto tra gruppi di sei valori di peso secco per ogni trattamento. A causa del peso modesto di un singolo individuo (cfr. par. 6), l'ulteriore frazionamento in un maggior numero di sottogruppi aumenterebbe

progressivamente il rischio di errore nelle determinazioni del peso secco, a meno di non adottare procedure e strumentazioni adeguate alla misurazione di pesi inferiori a 1 mg.

Se allo scadere del 7° giorno non fosse possibile procedere alle operazioni di essiccamento e pesatura, esse possono essere rinviate. In questo caso è necessario conservare i gruppi di larve di *C. variegatus* in una soluzione di formalina al 4% o di etanolo al 70 %.

5 - PROCEDURA DI SAGGIO SENZA DILUIZIONE (CORPO IDRICO)

5.1 - Saggio definitivo

La diluizione esercitata dalle acque marine sulle fonti di contaminazione, spesso riduce la concentrazione degli inquinanti a livelli tali da rendere inutile un saggio che preveda la diluizione del campione. La procedura comunemente adottata per indagare se un'acqua di mare è tossica a livello cronico per *C. variegatus*, consiste pertanto nel condurre un saggio a 7 giorni con un campione "tal quale" (non diluito) delle sue acque.

Il campione di acqua di mare è saggiato in un'unica serie composta da un minimo di 3 repliche corrispondenti alla concentrazione 100 % (v/v). Questa viene affiancata, in relazione alle finalità del saggio, da una o più serie di organismi di controllo (cfr. anche par. 3.3). In ogni replica, avente il volume di 500 mL, viene immerso un numero minimo di 10 avannotti di *C. variegatus* di età < 24 h.

Le operazioni di preparazione del campione, rinnovo quotidiano delle soluzioni di saggio, alimentazione delle larve e determinazione del loro peso secco, vengono effettuate seguendo le stesse procedure descritte per il saggio con diluizione (cfr par. 4).

Il confronto, basato su metodi statistici, tra i risultati dei due o più gruppi sperimentali, permette di valutare se l'eventuale inibizione della crescita, o della sopravvivenza, degli avannotti è significativa e quindi imputabile alla presenza di sostanze tossiche.

6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

I risultati dei saggi sono accettabili se nel corso della sperimentazione la concentrazione di ossigeno disciolto nei diversi trattamenti non è scesa al di sotto del 40 % del valore di saturazione, se la sopravvivenza degli avannotti di controllo è $\geq 80\%$ e se il loro peso secco medio è $\geq 0,60$ mg per singolo individuo. Nel caso la misurazione del peso secco venga effettuata sulle larve conservate (cfr par. 4.2), il limite di accettabilità si riduce a 0,50 mg per individuo.

BIBLIOGRAFIA

Kuntz, A. (1916): "Notes on the embryology and larval development of five species of teleostean fishes", *Bull. U.S. Bur. Fish.* **34**, 409-429.

Norberg, T.J. and D.I. Mount (1985): "A new fathead minnow (*Pimephales promelas*) subchronic toxicity test. Environ", *Toxicol. Chem.*, **4**, 711-718.

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.

Viganò L. (1996): "metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Cyprinodon variegatus*", *Not. Metodi Anal. Acque*, settembre 1996, 7-16

METODO PER SAGGIO DI TOSSICITÀ PROLUNGATO (14-28 GIORNI) CON TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

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

RIASSUNTO

La presente proposta di metodo descrive la procedura per realizzare dei test di tossicità prolungata (14-28 giorni) su acque di scarico o recettrici utilizzando la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). L'esame degli effetti sfavorevoli è basato sull'accrescimento di giovani individui di trota iridea esposti all'effluente di scarico o all'acqua recettrice ed è valutato relativamente a lunghezza, peso e velocità di crescita dei pesci. Una nota aggiuntiva fornisce alcuni concetti essenziali in merito alla scelta della procedura statistica appropriata all'analisi dei dati. I risultati possono essere espressi come concentrazione di non effetto e minima concentrazione ad effetto significativo (NOEC; LOEC).

SUMMARY

This test method proposal describes how to perform prolonged toxicity tests (14-28 days) on effluents and surface waters with the freshwater fish rainbow trout

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

(*Oncorhynchus mykiss*). The analysis of adverse effects is based on the growth of juvenile rainbow trout exposed to effluents or receiving waters and evaluated with respect to fish length, weight and growth rates. An additional note provides some basic concepts for the selection of appropriate statistical techniques of data analysis. Results can be reported as no observable and lowest observable effect concentration (NOEC; LOEC).

1 - INTRODUZIONE

Viene proposto un metodo atto alla valutazione di effetti tossici che possono insorgere in trota iridea in seguito all'esposizione prolungata a miscele di inquinanti quali sono quelle comunemente presenti nelle acque di scarico o nei corpi idrici recettori. Si tratta di una proposta di metodo in quanto la procedura non è stata ancora oggetto del consenso e della validazione che sono invece necessari ad un metodo standard. La lunghezza della prova ed i rinnovi frequenti delle soluzioni di saggio rendono necessari dei volumi relativamente elevati di campione. Tuttavia è probabile che questo aspetto procedurale possa essere sostanzialmente migliorato in una prossima versione del metodo.

In generale, si tenga presente che la variabilità, talvolta elevata, sia delle fonti di contaminazione che del corpo idrico che ne è recapito, possono essere la causa di una corrispondente variabilità degli effetti osservati. Pertanto, la mancata osservazione di effetti tossici con un certo campione o in un preciso momento del regime idrologico del corpo idrico, non escludono che si possano riscontrare degli effetti tossici sperimentando con campioni prelevati in momenti e condizioni idrologiche differenti.

2 - GENERALITÀ SUL METODO

Il saggio di tossicità utilizza giovani individui di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*, in precedenza *Salmo gairdneri*), ovvero individui che sono in fase di crescita attiva. Essi vengono esposti ad un saggio della durata minima di 14 giorni, la cui metodologia è proposta per consentire la valutazione di effetti più tipicamente subletali, quali sono quelli osservabili sull'accrescimento dell'organismo. Tra i vari parametri indagabili, l'accrescimento merita una particolare attenzione in virtù del suo elevato contenuto informativo. Questa peculiarità deriva dal fatto che l'accrescimento di un organismo è l'espressione ultima di molteplici aspetti, sia di natura biochimica, fisiologica come anche comportamentale, tutti potenzialmente alterabili, in vario grado, quando un organismo venga esposto ad una miscela di contaminanti.

In ogni caso, il metodo si presta alla valutazione anche degli effetti letali che pure potrebbero manifestarsi a causa dell'esposizione prolungata ai contaminanti.

Per effettuare un saggio di questo tipo su acque di scarico, un minimo di cinque gruppi di individui viene esposto ad altrettante diluizioni del campione da esaminare. Il numero di decessi eventualmente osservati può essere utilizzato per calcolare la concentrazione di campione che è letale al 50% degli organismi (LC50) e a diversi tempi di esposizione. Peraltro, proprio perchè nelle acque di scarico sono facilmente osservabili elevate concentrazioni di inquinanti, è opportuno scegliere delle diluizioni tali da non causare elevate mortalità e permettere, al contrario, la sopravvivenza degli organismi e l'osservazione degli effetti subletali.

Gli effetti osservati nei gruppi di trote esposte alle diluizioni di campione vengono confrontati con individui di controllo che sono stati mantenuti in condizioni sperimentali analoghe ma in assenza di campione. Mediante tale confronto, che è condotto con metodi statistici, è possibile determinare quale diluizione del campione non esercita effetti significativi sull'accrescimento di trota iridea (NOEC).

Per condurre il saggio sulle acque di un corpo idrico si può adottare lo stesso schema sperimentale proposto per gli effluenti di scarico. Frequentemente, tuttavia, questo tipo di saggio è condotto esponendo i pesci ad un campione non diluito ("tal quale") evitando che la procedura di diluizione applicata al campione ne riduca eccessivamente la concentrazione degli inquinanti, di per sé raramente elevata, precludendo l'osservazione di effetti significativi. Nel caso venga saggiato un campione non diluito l'analisi statistica dei risultati si limiterà a stabilire se il gruppo di organismi esposti manifesta alterazioni significative dell'accrescimento o eventualmente della sopravvivenza.

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 almeno 40-50 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 indicativamente nel valore massimo di 0,5 g/L · giorno⁻¹;
- retini di varie dimensioni per il trasferimento dei pesci;
- eti o coperture trasparenti in materiale atossico per evitare la fuoriuscita degli animali dalle vasche;
- 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;

- 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 e/o cannule in vetro. Gli aeratori commercializzati in acquariofilia soddisfano appieno le necessità della sperimentazione. Nel caso si ricorra ad impianti centralizzati per aria compressa, è necessario adottare idonei sistemi di filtrazione per rimuovere oli ed altri vapori organici che sono contaminanti frequenti.

Tutti gli oggetti che sono destinati ad entrare in contatto con l'acqua di diluizione o di mantenimento, o con i campioni da saggiare, debbono essere realizzati con materiali inerti, che non adsorbano i tossici significativamente e che tanto meno ne possano rilasciare. Il vetro borosilicato e le plastiche fluorurate dovrebbero essere impiegati ovunque possibile. Gli oggetti costruiti con questi materiali possono essere riutilizzati dopo le necessarie procedure di pulizia. Materie plastiche quali il polietilene, il polipropilene, il Tygon[®], o altre ancora, possono trovare usi limitati nell'apparato sperimentale mentre sono da considerare assolutamente come "monouso" se impiegate nel prelievo e nel trasporto dei campioni da saggiare. Al contrario, contenitori costruiti con questi materiali, con il polietilene ad alta densità in particolare, ben si prestano ad essere specificamente riutilizzati per conservare acque di diluizione o acque sintetiche preparate in laboratorio. 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

Si utilizzano giovani esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), che sono disponibili, quasi per l'intero arco dell'anno, presso gli allevamenti ittici specializzati in trotticoltura. In relazione alle condizioni esistenti in allevamento o a quelle di mantenimento in laboratorio, può rendersi necessario acclimatare gli organismi alle condizioni previste per la sperimentazione. Ciò è ottenibile mediante un periodo di acclimatazione che deve avere una durata minima di 7 giorni e preferibilmente di un paio di settimane. Durante il periodo di mantenimento e acclimatazione le trotelle vengono alimentate con un quantitativo giornaliero minimo di cibo che deve essere equivalente al 1-2 % del loro peso fresco (ECETOC, 1986; ISO, 1992; OECD, 1994). Per ulteriori dettagli in merito al trasporto ed alla acclimatazione degli organismi si rinvia alla

Appendice A2 del "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con trota iridea" (Viganò, 1996).

Come verrà chiarito nel seguito, il saggio può essere organizzato secondo due diverse soluzioni sperimentali che condizionano la scelta delle dimensioni degli organismi. Tuttavia, alcuni aspetti procedurali, che tra l'altro sono comuni ad entrambe le soluzioni sperimentali, limitano la scelta delle dimensioni ad un ambito relativamente ristretto. Infatti, da un lato, è necessario rispettare il carico di biomassa, che è fissato indicativamente al valore massimo di 0,5 g/L·d⁻¹, mentre all'opposto, la manualità necessaria alla misurazione della lunghezza e del peso degli organismi, preclude una riduzione eccessiva della loro taglia.

In accordo con la prima soluzione sperimentale ("a"), ogni individuo deve essere identificabile per l'intera durata del saggio, il che è ottenibile solo mediante un intervento di marcatura. La procedura di marcatura, la cui tecnica è descritta nelle pagine successive, richiede che la trotella abbia una taglia minima tale da poter essere facilmente manipolabile, ma senza eccedere nelle sue dimensioni, che pur nel rispetto del carico di biomassa, finirebbero col penalizzare inaccettabilmente l'entità dei volumi di campione necessari, nonché le dimensioni dell'apparato sperimentale. Trote che, al momento dell'allestimento del saggio, hanno un peso compreso tra 3 e 5 g, cui corrisponde indicativamente una lunghezza corporea tra 6 e 8 cm, sono idonee agli scopi indicati.

La seconda soluzione sperimentale ("b") esclude la marcatura dei pesci, nel qual caso ci si potrà avvalere dei vantaggi offerti dall'uso di organismi di minori dimensioni che, tra l'altro, consentono di rispettare molto più facilmente il limite stabilito per il rapporto "peso dei pesci/volume di soluzione" (~ 0,5 g/L·d⁻¹). La necessità di manipolare gli organismi per misurarne peso e lunghezza impone, comunque, un limite inferiore alla loro taglia, pena il rischio di mortalità dovute alla eccessiva delicatezza degli organismi stessi. E' quindi opportuno non scendere al di sotto dei 3 cm, cui corrisponde, indicativamente, un peso fresco di circa 0,5 g.

In questo tipo di saggio è di fondamentale importanza l'omogeneità di taglia degli organismi. Pertanto è necessario adottare una serie di accorgimenti il cui scopo ultimo è di ottenere un gruppo di circa 100-130 trote che all'allestimento del saggio abbiano un peso corporeo compreso entro un ambito di $\pm 10\%$ del loro peso medio. La lunghezza di un tale gruppo di organismi si dimostra compresa entro un ambito ancora più ristretto del valore di lunghezza media (Crossland, 1985). Per ottenere questo grado di omogeneità è necessario scegliere organismi il più possibile coetanei, meglio se appartenenti alla stessa schiusa, selezionarne la taglia già dalle prime fasi di mantenimento in laboratorio, scartando gli individui con dimensioni estreme, con comportamento marcatamente territoriale o, peggio, che praticano il cannibalismo. Condizioni idonee di mantenimento e acclimatazione contribuiscono, a loro volta, al raggiungimento dell'obiettivo (cfr. Appendice A2 del

"Metodo per la valutazione della tossicità acuta con trota iridea"; Viganò, 1996).

Per la misurazione della lunghezza corporea si può optare per uno dei 3 tipi di misurazioni possibili. A partire dall'estremità anteriore del capo, e più precisamente della mascella, esse hanno un diverso riferimento posteriore, terminando, rispettivamente, all'estremità della pinna caudale (lunghezza totale), al suo punto di biforcazione o all'estremità del peduncolo caudale (lunghezza standard) (Fig. 1). Quest'ultima misurazione è generalmente quella da preferire.

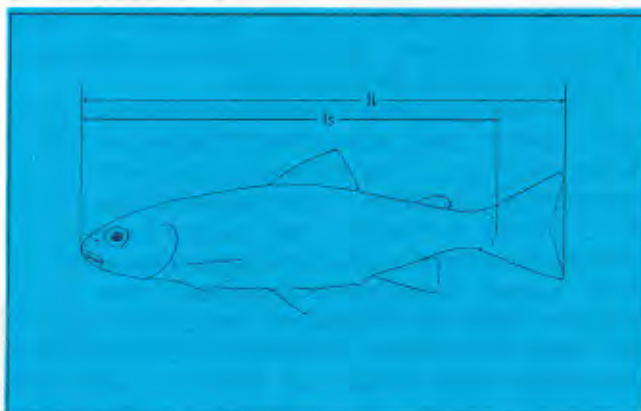


Fig. 1 - Riferimenti per la misurazione della lunghezza totale (lt) e della lunghezza standard (ls) del corpo del pesce

Nel giorno di allestimento del saggio vengono misurati il peso e la lunghezza media di un campione di trotelle che sia rappresentativo degli organismi medi del lotto destinato alla sperimentazione. In questo modo si ottiene una stima attendibile del peso e della lunghezza media degli organismi del lotto in esame, in base alla quale e nel rispetto dell'ambito indicato ($\pm 10\%$), si può procedere alla selezione definitiva delle trote che potranno essere immerse nelle vasche di saggio.

Per misurare accuratamente peso e lunghezza dei singoli individui è consigliabile che essi vengano anestetizzati. A questo scopo si prepara una vaschetta contenente una soluzione di alcuni litri di un anestetico, quale la tricaina (MS-222) o sostanza equivalente (es. benzocaina), alla concentrazione di 50-100 mg/L (ECETOC, 1986; ISO, 1992), debolmente aerata ed alla temperatura di $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Trattandosi di misurazioni di peso fresco è necessario adottare piccoli accorgimenti che minimizzino il rischio di errore dovuto alla presenza di gocce d'acqua sul corpo del pesce; esse possono essere rimosse, ad esempio, con carta da filtro o simile, senza tuttavia danneggiare lo strato di muco protettivo. Se il pesce anestetizzato risponde ai requisiti di peso e lunghezza desiderati, si procede all'eventuale operazione di marcatura (soluzione sperimentale "a"), dopo di che il pesce viene immerso in un vaschetta simile alla precedente ma

contenente solo acqua di acclimatazione/diluizione ($15 \pm 1^\circ\text{C}$), si attende che si riprenda dall'anestesia e si trasferisce definitivamente alla vasca di saggio. La stessa procedura, marcatura esclusa, viene seguita anche nel caso in cui non sia prevista l'identificazione degli organismi (soluzione sperimentale "b").

Rispetto ad altre tecniche, la marcatura per congelamento si è dimostrata relativamente semplice e senza danno per gli organismi (Crossland, 1985). Essa si effettua operando come segue: il marchio è realizzato sagomando del filo d'acciaio a forma di lettera o di numero, questo viene raffreddato in azoto liquido e pressato leggermente, per tre secondi, sul fianco del pesce anestetizzato, poco al di sotto della pinna dorsale. Il marchio, che subito dopo l'operazione è invisibile, si rende progressivamente evidente nelle successive 48 h e permane chiaramente visibile per almeno sei settimane. E' preferibile evitare i marchi che comprendono sagome circolari (chiuse) poiché favoriscono l'insorgenza di infezioni cutanee (ISO, 1992). In Fig. 2, sono riprodotte delle sagome idonee. La superficie del marchio deve essere priva di asperità e piatta, in modo che durante la marcatura, la cute non venga lesa in alcun modo e sia sottoposta ad una pressione omogenea in corrispondenza all'intero simbolo del marchio.

Tutte le operazioni descritte devono essere condotte rapidamente e ponendo la massima attenzione a non danneggiare in alcun modo gli organismi. Gli individui sopravvissuti ad un saggio non potranno venire riutilizzati in prove successive.

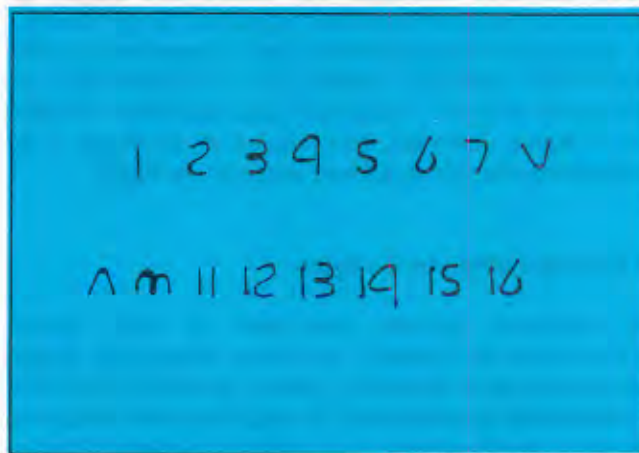


Fig. 2 - Esempi di sagome idonee alla marcatura dei pesci (ISO, 1992)

3.3 - Acqua di diluizione

Generalmente le diluizioni del campione da saggiare ed il controllo vengono allestiti con la stessa acqua usata per il mantenimento delle trotelle o quella eventualmente usata per l'acclimatazione. In relazione agli obiettivi del saggio sono utilizzabili, tuttavia, altre acque di diluizione o di controllo e si

rende quindi necessario distinguere tra alcune possibili soluzioni.

- a) Se lo scopo è di evidenziare la presenza di effetti tossici cronici in un effluente o nelle acque di un corpo idrico, studiandone l'andamento nel tempo o confrontando il grado di contaminazione di diverse aree, come diluente e controllo si adotterà un'acqua sintetica (standard) preparata per aggiunta di 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 NaHCO₃, 53 mg MgSO₄ e 183 mg CaSO₄·2H₂O. Il mezzo così ottenuto ha le seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg CaCO₃/L, alcalinità 110-120 mg CaCO₃/L, Ca/Mg > 1 e prossimo a 4, Na/K > 1 e prossimo a 10.
- b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità derivante dall'immissione di uno scarico nelle acque del recettore, come diluente e controllo si userà l'acqua non contaminata del recettore, prelevata a monte dell'immissione o comunque al di fuori dell'area contaminata. Nel caso essa non sia disponibile, si può utilizzare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale o un'acqua sintetica (cfr "punto a") avente approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore oggetto del controllo. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purché di qualità adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) e nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 h dallo stesso, mantenendo i campioni refrigerati (4°C) e al buio quando se ne faccia uso a più di 24 h dalla raccolta. Se si sospetta che l'acqua del recettore, per proprie caratteristiche, possa modificare l'accrescimento degli organismi, è preferibile allestire un secondo gruppo di controllo nel quale gli individui sono esposti all'acqua comunemente utilizzata per il mantenimento o l'acclimatazione.
- c) Se, infine, lo scopo del saggio è quello di esaminare le interazioni tra i contaminanti presenti nello scarico e quelli veicolati dal recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore stesso, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o comunque al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. Questo terzo tipo di saggio richiede l'allestimento di due gruppi di organismi di controllo. Nel primo i pesci sono esposti all'acqua recettrice, quella cioè che già possiede, verosimilmente, un proprio grado di contaminazione. Nel secondo, i pesci sono esposti all'acqua del recettore prelevata da un'area non contaminata. In analogia al saggio precedente, se si sospetta che l'acqua del recettore possa di per sé alterare, in qualche

misura, la risposta degli organismi, si può prevedere un terzo gruppo di controllo nel quale i pesci sono mantenuti nell'acqua comunemente utilizzata per il mantenimento o l'acclimatazione.

3.4 - Illuminazione

Durante il saggio vengono mantenute le stesse condizioni di illuminazione cui gli animali sono stati acclimatati. Il fotoperiodo comunemente adottato 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 di tutte le soluzioni da saggiare deve essere mantenuta a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ per l'intera durata della sperimentazione.

3.6 - Alimentazione

Fatta eccezione per particolari finalità sperimentali, il cibo da somministrare è lo stesso impiegato nell'allevamento da cui provengono gli organismi. Si tratta solitamente di mangimi secchi, pellettizzati, aventi composizione e dimensione adeguata alla taglia delle trote da nutrire.

Durante la prova i pesci sono alimentati quotidianamente con una quantità di cibo che deve essere equivalente al 4% del loro peso fresco. E' consigliabile somministrare tale quantitativo suddividendolo in due porzioni distanziate di almeno 5 h. Se necessario, la somministrazione del cibo può essere affidata ad accessori automatizzati reperibili in acquariologia.

A parità di altre condizioni, la velocità di crescita è strettamente dipendente dalla quantità di cibo disponibile. Pertanto, il parametro alimentazione deve essere attentamente controllato. Per i primi 14 giorni di saggio la quantità di cibo giornaliera è calcolata in relazione al peso degli organismi a "tempo 0", e cioè quello misurato nella fase di allestimento del saggio. Se è necessario prolungare il test fino a 28 giorni, la dieta deve essere ricalcolata basandosi sulle misurazioni di peso fresco ottenute al 14° giorno. Qualora si verificassero dei decessi nel corso della sperimentazione, è parimenti necessario ricalcolare la dieta adeguandola alla minore biomassa presente. Viceversa, non è accettabile la conservazione della biomassa complessiva mediante sostituzione dei pesci deceduti con nuovi organismi di taglia similare (OECD, 1994).

La somministrazione del cibo deve essere interrotta 24h prima delle determinazioni di peso fresco degli organismi, evitando così che il contenuto dell'apparato digerente possa interferire in modo significativo. L'alimentazione viene, quindi, sospesa

consiste nel calcolo della velocità di crescita "pseudo" specifica (r_2) attraverso la seguente formula:

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w(\text{medio})_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

In pratica, non potendo fare riferimento al peso del pesce al tempo t_1 , l'accrescimento dell'organismo in esame viene valutato usando come riferimento il peso medio dell'intero gruppo di pesci immesso nella vasca al tempo t_1 , che è indicato come $w(\text{medio})_1$ (OECD, 1994).

Mediante opportuni metodi statistici i valori di lunghezza, di peso fresco e di velocità di crescita (r_1 o r_2) determinati per gli organismi esposti al campione "tal quale" o a sue diverse concentrazioni, vengono confrontati con i valori corrispondenti degli organismi di controllo. Se vengono dimostrate differenze statisticamente significative per almeno uno dei parametri, si può affermare che il campione contiene concentrazioni di contaminanti tali da ridurre l'accrescimento di trota iridea e se si dispone di più livelli di effetto, per una serie scalare di concentrazioni, diventa possibile individuare la diluizione di "non effetto" (NOEC) del campione in esame.

BIBLIOGRAFIA

Crossland N.O. (1985): "A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth", *Chemosphere*, **14**, 1855-1870.

ECETOC (1986): "The EEC sixth amendment: prolonged fish toxicity tests", Technical Report No. 24, Brussels, Belgium, pp 36.

ISO (1992): "Water quality - Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish. Part 1: Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae)", Draft International Standard, ISO/DIS 10229-1.

OECD (1984): "OECD guidelines for testing of chemicals. Fish, prolonged toxicity test: 14-day study", Guideline No. 204.

OECD (1994): "OECD guidelines for testing of chemicals. Proposal for fish, juvenile growth test - 28 days" Revised Draft Document, TG\94.214\November 1994.

Viganò L. (1996): "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)", *Notiz. Metodi Anal. Acque*, settembre 1996, 17-25

ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI DI SAGGI CRONICI

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

Questa nota, come le precedenti dedicate allo stesso argomento, si propone di fornire solo i criteri guida essenziali per poter effettuare una corretta elaborazione dei risultati. In commercio sono disponibili dei programmi per personal computer che permettono di applicare con relativa facilità gran parte dei metodi di interesse tossicologico, tra i quali anche quelli citati in questa nota. L'esistenza di tali programmi, l'elevato numero dei metodi che andrebbero trattati e la loro relativa complessità, ha fatto sì che, al contrario di quanto fatto in precedenza, l'operazione di darne descrizione dettagliata fosse ritenuta inopportuna. Per contro, la relativa facilità d'uso dei programmi disponibili in commercio non deve fuorviare e si consiglia di avvalersi sempre della collaborazione di un esperto di statistica che possa consigliare sulla scelta dei metodi di analisi più appropriati ai singoli casi sperimentali.

I saggi cronici proposti consentono di esaminare gli effetti a lungo termine di effluenti di scarico o di acque superficiali su parametri quali l'attività riproduttiva, l'accrescimento ed anche la sopravvivenza degli organismi. L'analisi statistica dei risultati ottenuti con questi saggi viene comunemente distinta in base al tipo di risultato da esaminare ed, ovviamente, in base al tipo di informazione che si desidera ottenere.

Nel caso un campione sia stato saggiato solo "tal quale", lo scopo dell'analisi statistica è di confrontare le risposte degli organismi che sono stati esposti a questa unica concentrazione di campione con quelle degli organismi di controllo e di valutare se le eventuali differenze, ad esempio di taglia corporea, siano da considerare significative e quindi imputabili agli inquinanti presenti nel campione stesso. A questo scopo si utilizza generalmente il test t con il quale è possibile valutare, con un certo grado di probabilità, se, ad esempio, la dimensione media degli animali di controllo sia significativamente diversa da quella dei trattati, e rifiutare pertanto l'ipotesi di differenza nulla (H_0). L'applicabilità di questo test richiede che i due campioni posti a confronto provengano da popolazioni normalmente distribuite e soprattutto che le varianze dei due gruppi di osservazioni non siano significativamente differenti.

Nel caso sia stato possibile saggiare più diluizioni di un campione si dovranno analizzare più serie di dati relativamente ad uno od anche più parametri. Queste serie andranno confrontate con la/e serie corrispondenti degli organismi di controllo. Lo scopo è comunemente quello di individuare la massima concentrazione di campione i cui effetti non sono significativi, od anche, quella concentrazione di campione alla quale gli organismi possono essere esposti senza che i valori dei parametri misurati siano

statisticamente distinguibili da quelli del gruppo di controllo. Questa concentrazione viene indicata con l'acronimo NOEC e viene solitamente individuata congiuntamente con la minima concentrazione, tra quelle saggate, che è stata capace di effetti significativi (LOEC). La procedura corretta è in questo caso l'analisi della varianza (ANOVA), mentre, al contrario, sarebbe inappropriato applicare ripetutamente il test *t* alle diverse coppie costituite da uno dei trattamenti e dal controllo. I presupposti per la corretta applicazione di ANOVA sono che i dati siano distribuiti normalmente e che la varianza dei gruppi sia omogenea. La prima condizione viene verificata con il test del Chi quadrato o con un test alternativo (es. Shapiro-Wilks), mentre la seconda, una volta soddisfatta la condizione di normalità, può essere verificata con il test di Bartlett o, parimenti, con test alternativi. Soddisfatte tali premesse, l'applicazione di ANOVA ad un criterio di classificazione, permetterebbe di concludere, in caso affermativo, che le differenze tra le medie dei diversi gruppi sperimentali sono significative. La verifica di variazione significativa tra i gruppi ottenuta mediante ANOVA è tuttavia un risultato generico che poco aggiunge alla caratterizzazione tossicologica del campione. Per ottenere informazioni più specifiche è necessario applicare altri metodi statistici il cui scopo, coerentemente con quanto anticipato, è quello di individuare quali tra le concentrazioni di campione abbiano causato alterazioni significative del parametro in esame. Un test comunemente utilizzato a questo scopo è quello di Dunnett, poichè confronta ogni gruppo di organismi con il controllo. Tuttavia esistono vari metodi alternativi o complementari come, ad esempio, il test di Bonferroni, che è da preferire nel caso i gruppi abbiano un diverso numero di repliche, oppure il test di Williams, che è specifico per analizzare le risposte a concentrazioni crescenti di tossici, o il test di Tukey che è preferibile qualora si sia interessati a confrontare tutti i gruppi tra loro, non potendo presupporre, come in taluni studi di campo, che vi siano relazioni evidenti tra i diversi trattamenti. In generale è preferibile escludere da questi confronti i dati relativi ai trattamenti che hanno causato elevate mortalità.

Se i dati non rispettassero la condizione di normalità o di omogeneità della varianza può essere risolutivo trasformarne i valori nei rispettivi logaritmo, radice quadra o arcoseno e risottoporli ai test statistici menzionati. Una valida alternativa è rappresentata, tuttavia, dall'impiego di metodi statistici di tipo non parametrico che non sono condizionati, nella loro applicazione, dalla distribuzione dei dati, e possono pertanto essere utilizzati senza alcuna trasformazione dei dati medesimi. I test proponibili in tal senso sono, ad esempio, il metodo di Steel, analogo non parametrico del metodo di Dunnett, quello di Wilcoxon e il metodo di Kruskal-Wallis, che a sua volta dovrebbe essere utilizzato in sostituzione del test di Tukey.

Se sono stati osservati dei decessi tra gli organismi esposti al campione è possibile confrontare la

mortalità degli organismi trattati con quella degli organismi di controllo e, compatibilmente con i criteri di validità del saggio, stabilire se il campione saggiato sia responsabile di effetti letali significativi. A tal fine si applica il test di Fisher che permette di verificare, come spesso nei test statistici, un'ipotesi nulla e cioè che la percentuale di organismi sopravvissuti nei gruppi posti a confronto non differisca significativamente. Si possono utilizzare anche altri metodi tra i quali, ancora, il test di Dunnett, previa tuttavia la necessaria trasformazione delle percentuali di sopravvivenza nei corrispondenti valori di arcoseno. Se i dati lo permettono e vi è interesse ad esprimere la tossicità come concentrazione letale per una percentuale definita di organismi (LC50, LC20 etc), si applicheranno gli stessi metodi (es. probit) già descritti per i saggi di tossicità acuta.

E' da segnalare, infine, il crescente interesse per la possibilità di esprimere anche la tossicità subletale di un campione in termini di concentrazione capace di effetti definiti. In altre parole è interessante poter stimare quale concentrazione di campione possa inibire l'accrescimento o la riproduzione, ad esempio, del 20% rispetto al valore di controllo (EC20). Se per i dati di mortalità, tipicamente qualitativi, l'uso di metodi destinati a questo tipo di stime è ampiamente consolidato (es. probit), per i dati di tipo continuo quali, ad esempio, il numero di neonati prodotti o la lunghezza corporea, l'analisi dei risultati termina generalmente con l'individuazione della NOEC e della LOEC e con il calcolo del "chronic value", noto in precedenza, ma meno correttamente, come massima concentrazione accettabile (MATC).

Questo tipo di risultati è dipendente dalla sequenza di concentrazioni saggate, dal rapporto di diluizione prescelto, dalla variabilità dei risultati e quindi dalla qualità del lavoro sperimentale, ed inoltre, non è possibile associarvi stime di precisione o limiti fiduciali. Al contrario, esprimere la tossicità cronica come EC20, o qualsiasi altra concentrazione di efficacia definita, permetterebbe di superare questi limiti ed offrirebbe alcuni innegabili vantaggi. Per esprimere la tossicità in questo modo, è necessario individuare la relazione esistente tra le concentrazioni di campione e le risposte del parametro indagato e ciò è possibile applicando dei metodi di regressione che sono solitamente parametrici ma, con opportuni aggiustamenti, è possibile usare anche procedure non parametriche. L'equazione di una curva logistica ha spesso dimostrato di poter descrivere in modo adeguato l'andamento delle risposte subletali (lunghezza, peso, riproduzione, ecc.) al crescere della concentrazione..

