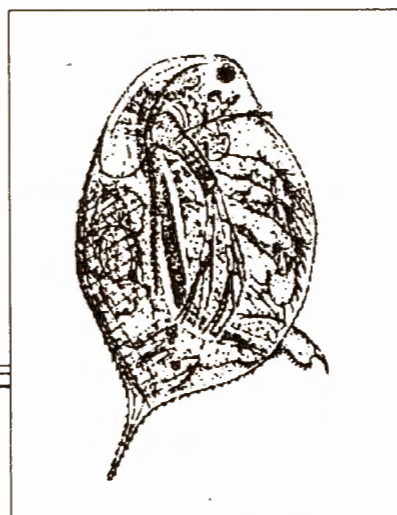


SAGGI TOSSICOLOGICI



SAGGIO DI TOSSICITA' ACUTA CON *Daphnia magna* SU REFLUI INDUSTRIALI DI AZIENDE ORAFE NELLA PROVINCIA DI AREZZO

Carlo Francalanci, Giuseppe Martini^(*)

La vigente normativa (Legge 319/76 e successive modifiche) in materia di effluenti di acque di scarico si dimostra quanto mai limitata e inadeguata sia per la caratterizzazione chimica e biotossicologica dello scarico stesso che per la tutela del corpo recettore in quanto:

- le determinazioni analitiche prevedono, quasi sempre, la ricerca di singoli inquinanti e non tengono nella dovuta considerazione che gli effluenti sono generalmente miscele complesse che possono contenere sostanze chimicamente sconosciute;
- il limite previsto dal parametro 10 "Metalli e non metalli totali" è risultato insufficiente per limitare gli effetti dovuti alla presenza di più elementi tossici (VIGANÒ, 1987);
- il saggio di ittiotossicità che richiede l'utilizzo della trota previsto dalla Tab. A, secondo una indagine effettuata dall'IRSA (CNR) (VIGANÒ et al., 1987), è rimasto disatteso sia per mancanza di richieste di esecuzione della prova, sia per difficoltà di stabulazione degli animali, sia perché tale prova è stata ritenuta laboriosa.

Dal momento che inquinanti e microinquinanti, pur rientrando nei valori permessi dalla normativa vigente, determinano effetti tossici per la vita in genere e per l'uomo (FOA-MONACO, 1986; GALASSI et al., 1985), ne consegue che i tests biologici rappresentano il modo migliore per stimare gli effetti reali, globali, di un effluente. La tossicità, infatti, può essere definita in maniera specifica solo attraverso risposte biologiche; il controllo chimico, invece, non potrà

^(*) Servizio Multizonale di Prevenzione USL n° 23, Arezzo.

mai essere completo, sia per le migliaia di nuovi prodotti chimici immessi nel mercato che per l'impossibilità di rilevare l'azione congiunta, antagonista o sinergica, di una miscela di sostanze. Emerge quindi la necessità di incrementare l'uso di tests tossicologici che prevedono metodologie semplici e immediate.

I saggi con la dafnia presentano vantaggi sostanziali rispetto al saggio ittiotossicologico: richiedono una metodologia di conduzione semplice e l'utilizzazione di volumi ridotti di campione (OCDE, 1987; ISO, 1982; GORBI, 1987) e di organismi che presentano una maggiore sensibilità ai tossici (tab. 1).

La pulce d'acqua *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) è stata ampiamente utilizzata e richiesta nei tests di tossicità acuta e cronica per saggiare sia le sostanze pure (VIGANÒ, 1987; FOÀ-MONACO, 1986; GALASSI et al., 1985; WINNER-FARREL, 1976; Ministero Sanità, 1985 e 1988) che gli scarichi industriali complessi (NIKUNEN-MIETTINEN, 1985; GARRIC-LARBAIGT, 1986).

Il test di tossicità acuta con questi crostacei è stato codificato attraverso Norme Standard

Internazionali (OCDE, 1987; ISO, 1982) ma, pur essendo citato nelle metodiche CNR (IRSA, 1979), non è previsto dalla normativa italiana in materia di controllo degli scarichi.

Arezzo, città per tradizione legata alla lavorazione dei metalli preziosi, presenta - tra attività a livello industriale e artigianale - circa 600 aziende orafe: ciò crea notevoli problemi di inquinamento per la elevata concentrazione delle aziende nel medesimo bacino e la pericolosità degli scarichi, ricchi di metalli pesanti, cianuri e tensioattivi.

Sulla base di queste considerazioni è nata la decisione di utilizzare il test con dafnia per valutare:

- le difficoltà operative connesse all'utilizzazione del crostaceo *Daphnia magna* in un test routinario per il controllo degli scarichi;
- la corrispondenza o meno tra parere chimico e parere tossicologico;
- i livelli di tossicità di scarichi industriali pericolosi e specifici: in questo lavoro sono stati infatti considerati gli effluenti prodotti dal settore orafa.

Tab. 1: Confronto tra valori di tossicità acuta di pesticidi e metalli per *Daphnia magna* e *Salmo gairdneri* (mg/l). (da VIGANÒ et al., 1987).

	<i>Daphnia magna</i>		<i>Salmo gairdneri</i>	
Lindano	48hLC ₅₀	1,25*	96hLC ₅₀	0,027
Dieldrina	"	0,25	"	0,01
Endosulfan	"	0,06	"	0,0003
Endrina	"	0,02	"	0,0006
Fenthion	"	0,0008	"	0,93
Malathion	24hLC ₅₀	0,0009	"	0,17
Diazinone	48hLC ₅₀	0,001	"	0,45
Fenitrothion	3hLC ₅₀	0,0092	48hLC ₅₀	1,28
Cr ^{VI}	48hLC ₅₀	0,26**	"	21-79**
Zn	"	0,16**	60hLC ₅₀	2**
Cd	24hLC ₅₀	0,35*	24hLC ₅₀	3,8*
Hg	"	0,013*	48hLC ₅₀	0,75*
Cu	"	0,02*	"	0,1*

* da Morris, Buckley, 1984

** per il Cr da EIFAC n. 43; per lo Zn da EIFAC n. 21.

(Tutti i dati senza asterisco sono tratti da Vershueren, 1983).

MATERIALI E METODI

Questa indagine preliminare è stata condotta su 28 scarichi di aziende orafe della provincia di Arezzo. I tests sono stati effettuati utilizzando individui di dafnia allo stadio neonatale (età inferiore alle 24 ore) ottenuti da femmine adulte alimentate con sospensione di alghe unicellulari *Scenedesmus* sp. ad una concentrazione di 80.000 cellule algali/ml.

Come soluzione di diluizione per i tests è stato utilizzato un mezzo acquoso artificiale ottenuto aggiungendo NaHCO_3 (200 mg/l), CaCl_2 (224 mg/l) e K_2SO_4 (26 mg/l) ad acqua distillata. Il mezzo, aerato per 24 ore e stabilizzato per 48 ore, è stato aggiustato ad un pH di $7,8 \pm 0,2$ (AFNOR, 1974); la durezza è 12 gradi francesi.

Sugli scarichi sono stati effettuati tests statici di tossicità acuta preliminari alle concentrazioni di 100% - 50% - 10% del campione per identificare l'intervallo di diluizione in cui presumibilmente cadeva la concentrazione letale mediana LC_{50} (intesa come percentuale del campione originale sul totale del volume utilizzato che provoca la morte del 50% degli organismi saggiati). Sulla base dei dati ottenuti dai tests preliminari si è proceduto ad eseguire tests definitivi per determinare la $\text{LC}_{50}/24$ h, la $\text{LC}_{50}/48$ h e la $\text{NOEC}/48$ h, quest'ultima intesa come la più alta concentrazione usata nei saggi che non mostra effetti letali dopo 48 ore.

Per ogni campione sono state preparate da un minimo di tre diluizioni-test, nei casi in cui è stata osservata una sopravvivenza del 100% sul campione tal quale, fino ad un massimo di dodici diluizioni per il campione n° 3, per il quale è stata definita una $\text{LC}_{50}/48$ h inferiore a 1/10.000. I tests preliminari sono stati realizzati entro 24 ore dal prelievo su campioni refrigerati a $+4^\circ\text{C}$ o, successivamente, su frazioni del campione congelate a -20°C fino all'esecuzione dei tests.

I saggi sono stati effettuati alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e con un'alternanza luce-buio di 12h / 12h circa. Generalmente il pH non è stato

modificato: solo nel caso di campioni con pH fuori dal range 6,5-8,5 (valori entro cui è garantita, in assenza di fattori inquinanti, la vita dei biota acquatici) (TARTARI et al., 1987) sono state eseguite prove in doppio con pH originale e con pH modificato a $7,8 \pm 0,2$ con NaOH o HCl 0,1 N.

Per ogni diluizione sono stati saggiati 10 individui in 50 ml di soluzione. L'effetto considerato (morte) è stato valutato, per differenza, contando il numero di organismi mobili e ritenendo morte le dafnie che presentavano assenza completa di attività visibile.

Il calcolo delle concentrazioni che provocano la morte del 50% degli organismi dopo 24 e 48 ore ($\text{LC}_{50}/24-48$ h) è stato eseguito attraverso l'analisi dei Probit secondo il metodo grafico (CAVALLI-SFORZA, 1973).

I pareri biotossicologici sono stati espressi come "regolamentari" quando i campioni diluiti 1:1 permettevano la sopravvivenza di oltre il 50% degli organismi saggiati nelle 48 ore (tab. 5). Si è ritenuto di esprimere il parere secondo questo criterio non perchè lo si consideri valido, ma esclusivamente per analogia con quanto dettato dalla legge 319/76 per il saggio ittiotossicologico e al fine di poter sviluppare eventuali raffronti. I pareri chimici di accettabilità sono stati espressi sulla base della Tab. A della legge 319/76, indipendentemente dall'immissione dell'effluente in fognatura o direttamente nel corpo recettore.

La sensibilità del ceppo di *Daphnia magna* utilizzato nel nostro laboratorio è stata controllata con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: il valore di $\text{LC}_{50}/24$ h ottenuto, pari a 1 mg/l, è compreso nel range riportato nelle Norme ISO (ISO, 1982).

I parametri chimici sono stati determinati sui campioni in base al tipo di lavorazione dei metalli preziosi e quindi alla qualità presunta dello scarico (tab. 2).

Sono state altresì calcolate le percentuali di mortalità sui campioni non diluiti e sui campioni diluiti 1:1 (tab. 4).

I prelievi degli effluenti saggiati sono stati

effettuati dagli operatori del S.I.P.T. (Servizio d'Igiene Pubblica e del Territorio) della USL 23 nell'arco di tre ore, secondo la normativa vigente.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati delle analisi chimiche e dei saggi tossicologici sono riportati nelle tabelle 3, 4 e 5.

Pur considerando il carattere preliminare della ricerca è emerso in primo luogo che il livello di tossicità acuta dei reflui liquidi provenienti dalla lavorazione dei metalli preziosi è

Tab. 2: Elenco degli effluenti considerati

N° Tipo di lavorazione	N° Tipo di lavorazione
1 Galvanica	15 Canna vuota
2 Acque saponose	16 Affinazione
3 Catene ottone	17 Canna vuota
4 Galvanica	18 Catene ottone
5 Galvanica	19 Canna vuota
6 Canna vuota	20 Meccanica
7 Galvanica	21 Canna vuota
8 Galvanica, Canna vuota	22 Meccanica
9 Galvanica	23 Canna vuota
10 Canna vuota	24 Canna vuota
11 Canna vuota	25 Galvanica, Canna vuota
12 Canna vuota	26 Canna vuota
13 Affinazione	27 Canna vuota
14 Galvanica	28 Canna vuota

Tab. 3 : Dati chimici dei 28 effluenti presi in esame

Campione n°	pH	Mat. sed. ml/l	Tens. MBAS	Cianuri Cn ⁻	Rame Cu	Cadmio Cd	Zinco Zn	Solfati SO ₄ ⁻	Cloro Cl	Cromo Cr VI	Parere chimico
Limiti Tab. A	5,5 9,5	0,5	2	0,5	0,1	0,02	0,5	1000	1200	0,2	
1	7,7	Ass.	2	2	1,4						Non Reg.
2	7,2	Ass.	2,5		6,1						Non Reg.
3	11,7*	Ass.		0,08	0,5	Ass.				740	Non Reg.
4	7,6	Ass.	13	Ass.	Ass.						Non Reg.
5	7,0		3,8	0,5 ^c	0,3	Ass.					Non Reg.
6	7,6	0,2	8,0		0,2						Non Reg.
7	7,6		4,75		0,56	0,4	0,56				Non Reg.
8	7,5	Ass.	1,4	Ass.		Ass.	1,4				Non Reg.
9	7,9	Ass.	2,6	Ass.	0,1	Ass.					Non Reg.
10	7,1	Ass.	18,0		0,33	Ass.	0,24	78			Non Reg.
11	9,8*	Ass.	1,88		1,18	0,1	0,09	880			Non Reg.
12	8,2	Ass.	Ass.		0,1						Reg.
13	8,7*	Ass.			0,1	Ass.					Reg.
14	8,1	Ass.	1,8	0,03	0,1	Ass.					Reg.
15	7,7	Ass.	Ass.		0,1						Reg.
16	7,3	Ass.	Ass.			Ass.					Reg.
17	7,0		Ass.		Ass.	Ass.					Reg.
18	6,1*	Ass.	Ass.		0,1	Ass.				Ass.	Reg.
19	7,7	Ass.	Ass.	0,2	0,1	Ass.	0,1				Reg.
20	8,5*	Ass.	Ass.		0,1						Reg.
21	7,0	Ass.	Ass.	0,013	0,1	Ass.	0,1				Reg.
22	7,6	0,2	0,84		Ass.	Ass.		100			Reg.
23	7,0	Ass.	0,8		0,1	Ass.					Reg.
24	7,8	Ass.	0,8		0,1	Ass.					Reg.
25	7,3	Ass.	Ass.	0,3	Ass.	Ass.	Ass.	1000	103,37		Reg.
26	7,8	Ass.	0,4	Ass.	Ass.			120			Reg.
27	8,0	Ass.	0,2		0,2	Ass.		108			Reg.
28	8,5	Ass.	0,45		0,1			42			Reg.

I valori di tensioattivi, anioni e metalli, sono espressi in mg/l.

(*) sono state fatte prove in doppio, con pH originale e con pH modificato a 7,8 ± 0,2.

molto elevato. Infatti sono risultati "non regolamentari" il 46,4% degli effluenti saggiati secondo il test biologico ed il 39,2% sulla base dell'analisi chimica. Il confronto fra i pareri di accettabilità espressi sulla base dei saggi tossicologici con quelli espressi sulla base delle analisi chimiche dei medesimi campioni dimostra una buona corrispondenza.

In particolare, si possono individuare tre tipi di giudizi:

- A- reflui "non regolamentari" sia chimicamente che tossicologicamente (39,3%);
- B- reflui "regolamentari" sia chimicamente che tossicologicamente (53,6%);
- C- reflui "regolamentari" chimicamente e

Tab. 4 : Percentuale di mortalità su campioni tal quali e diluiti 1:1

Campione n°	Non diluito % mortalità 24 h - 48 h		Diluito 1:1 % mortalità 24 h - 48 h	
1	100	100	80	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	55	70	0	50
7	100	100	100	100
8	100	100	100	100
9	100	100	100	100
10	100	100	100	100
11	100	100	100	100
12	100	100	90	100
13	100	100	100	100
14	0	0	0	0
15	50	70	10	20
16	0	10	0	10
17	0	0	0	0
18	0	20	0	10
19	10	20	0	0
20	0	30	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	60	100	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

"non regolamentari" secondo il saggio di tossicità acuta (7,1% del totale dei campioni).

E' stata, quindi, osservata una corrispondenza di valutazione del 92,9% tra i due tipi di esame. Su 17 campioni chimicamente "regolamentari", l'analisi biologica con la dafnia ha accertato due casi "non regolamentari" dal punto di vista tossicologico (11,7%). Altri Autori hanno riscontrato una analoga percentuale (10%) di casi regolamentari dal punto di vista chimico che risultavano non accettabili sulla base del saggio di tossicità acuta a 24 h con dafnia (GARRIC e LARBAIGT, 1986).

Mediante il test con la dafnia è stato possibile evidenziare i vari gradi di tossicità degli scarichi esaminati (tab. 5): costituiscono due esempi eclatanti quelli dei campioni n° 3 e 6, rispettivamente con $LC_{50}/48\text{ h} < 0,01\%$ e $LC_{50}/48\text{ h} = 40,75\%$. Questi due valori permettono di formulare pareri di "non accettabilità", parimenti punibili, per entrambi i reflui ma sottolineano anche la diversità del danno ambientale che può essere prodotto.

I casi dei campioni n° 6 e 10, con $LC_{50}/24\text{ h}$ pari all' 88,3% e al 52,5% rispettivamente, e $LC_{50}/48\text{ h}$ pari al 40,75% ed al 35,5% hanno altresì dimostrato, che la lettura dopo sole 24 ore può, a volte, condizionare anche il parere di accettabilità.

L' esempio dei campioni n° 12 e 13 ("regolamentari" all' analisi chimica e "non regolamentari" all' esame tossicologico) e la possibilità di valutare il livello di tossicità degli scarichi rivelano una maggiore capacità di informazione globale del test biotossicologico rispetto all' analisi chimica specifica.

E' importante notare che i test con la dafnia consentono non solo la valutazione del grado di tossicità dei campioni, ma anche l' individuazione della diluizione necessaria per rendere lo scarico privo di tossicità acuta attraverso il valore della NOEC, parametro di notevole importanza per la tutela della vita acquatica del corpo recettore.

Per quanto riguarda la necessità o meno di

aggiustare il pH del campione al pH del controllo, nei cinque casi osservati non si sono registrate sostanziali differenze della tossicità dei campioni aggiunti con pH tale quale e modificato.

Per quanto riguarda l'applicabilità del metodo, le nostre esperienze ed i risultati ottenuti mediante l'impiego del test con dafnia ci permettono di affermare che questo test è proponibile a livello routinario. Abbiamo, infatti, riscontrato i seguenti aspetti positivi:

- sensibilità degli organismi agli effluenti complessi;
- semplicità di conduzione e richiesta di un

moderato lavoro routinario di supporto (allevamento alghe, allevamento organismi, ecc.);

- costo moderato.

Uno dei problemi principali è rappresentato dalla necessità di disporre, sia per l'allevamento che per la conduzione dei tests, di un ambiente esente da contaminazione con aerosol, polveri o altre sostanze tossiche. La mancanza di questa struttura può rendere discutibile la riproducibilità e la standardizzazione del metodo, soprattutto se si opera in ambienti con forti variazioni di temperatura.

Tab. 5: Dati tossicologici dei 28 campioni esaminati

Campione n°	LC ₅₀ 24 h dil. %	LC ₅₀ 48 h dil. %	NOEC 48 h dil. %	Parere biotossicol.
1	2,25	2,25	0,5	Non Reg.
2	12,50	5,50	1,5	Non Reg.
3	n. d.	<0,01	<0,01	Non Reg.
4	1	1	1	Non Reg.
5	5,40	4,60	2,3	Non Reg.
6	88,30	40,75	10	Non Reg.
7	31,63	27,50	15	Non Reg.
8	8,10	6,70	3,2	Non Reg.
9	4,30	3,35	1	Non Reg.
10	52,50	35,50	23	Non Reg.
11	4,90	4,37	1	Non Reg.
12	22,40	19,50	10	Non Reg.
13	22,40	21,90	12	Non Reg.
14	>100	>100	100	Regolam.
15	98,40	71,30	10	Regolam.
16	>100	>100	100	Regolam.
17	>100	>100	100	Regolam.
18	>100	>100	10	Regolam.
19	>100	>100	65	Regolam.
20	>100	>100	50	Regolam.
21	>100	>100	100	Regolam.
22	>100	>100	100	Regolam.
23	>100	>100	100	Regolam.
24	>100	>100	100	Regolam.
25	85,00	59,00	50	Regolam.
26	>100	>100	100	Regolam.
27	>100	>100	100	Regolam.
28	>100	>100	100	Regolam.

CONCLUSIONI

L'esperienza condotta, per quanto sia preliminare e necessiti di conferme, ci permette di affermare che il test con la dafnia può essere applicabile a livello routinario per il controllo degli scarichi nell'attuale realtà dei Servizi Multizonali di Prevenzione.

In conclusione riteniamo inoltre che:

- sia consigliabile fare riferimento ai risultati dei tests a 48 ore in quanto il test a 24 ore risulta insufficiente per la valutazione della tossicità di uno scarico; si sono infatti registrati due casi (campioni n° 6 e 10) "regolamentari" dopo 24 h e "non regolamentari" dopo 48 h e che l'analisi chimica specifica indicava come non accettabili;
- il dato tossicologico riferito al campione tale quale, ove si siano riscontrate mortalità elevate, possa rappresentare un'informazione di notevole interesse anche nei casi di reflui considerati "regolamentari" dal punto di vista sia chimico che tossicologico;
- il test con *Daphnia magna* offra la possibilità di individuare la NOEC e la LC₅₀ con metodiche relativamente semplici, anche quando sono necessarie numerose prove e servono elevati quantitativi di organismi per i saggi;
- il test permetta di individuare su campioni chimicamente "regolamentari" caratteristiche tossicologiche "non regolamentari". Riteniamo pertanto che vada valutata la pos-

sibilità di introdurre il test della dafnia come parametro di riferimento dell' accettabilità di uno scarico in sostituzione (o in parallelo) al saggio ittiotossicologico previsto dal parametro 48 della Tab. A della legge 319/76.

Ci sembra inoltre importante sottolineare che l'attuale legislazione italiana ammette che una diluizione 1:1 del campione esaminato possa produrre una mortalità del 50% degli organismi saggiati in test acuto della durata di 24 ore; tuttavia nei periodi di magra o per la presenza di un elevato numero di attività tale valore accettato può essere insufficiente per prevenire i danni arrecati dai reflui tossici.

E' inoltre necessario, perchè sia garantita una maggiore protezione della vita acquatica, iniziare a prendere in considerazione anche i tests di tossicità cronica che, per quanto ri-

guarda la dafnia, si basano sulla fertilità degli organismi stessi osservati per un periodo di circa 21 giorni (SPRAGUE J.B., 1969).

E' auspicabile che in futuro i valori limite del saggio di tossicità della legge 319/76 vengano definiti non sulla base della mortalità, ma in relazione alle dosi senza effetto (NOEC) ed alle condizioni del corpo recettore.

Gli Autori ringraziano la dr.ssa GESSICA GORBI dell'Istituto di Ecologia dell' Università di Parma per la collaborazione fornita e per la revisione critica della ricerca.

Si ringrazia inoltre il dr. BEVVINO P.M. dell' U.O. di Chimica e Fisica Ambientale per il contributo offerto nella esecuzione e valutazione dei dati chimici, i tecnici PERUZZI M.V. e BEUCCI P. per l'opera prestata nell'esecuzione dei tests e gli operatori del S.I.P.T. dell' USL 23 che hanno eseguito i prelievi dei campioni.



BIBLIOGRAFIA

AFNOR, 1974. Determination de l' inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* STRAUS (Crustaces, Cladoceres).

Norme Experimentale NFT: 90-301.

CAVALLI SFORZA L., 1973. Analisi statistica per medici e biologi.

Ed. Boringhieri, Torino, pag. 155-191.

FOA V., MONACO E., 1986. La valutazione dei possibili effetti sulla salute dei metalli in traccia nell' ambiente generale.

Acqua-Aria, n° 10/86: 1076-1083.

GALASSI S., VIGANÒ L., BATTAGLIA C., 1985. Effetti

tossici dei microinquinanti organici presenti in acque superficiali.

Acqua-Aria, n° 9/85: 821-826.

GARRIC J., LARBAIGT G., 1986. Aspects de l' experience française dans le control biologique des effluents e du milieu recepteur continentale.

C.E.M.A.G.R.E.F.

GORBI G., 1987. Utilizzazione di *Daphnia magna* in tossicologia ambientale.

In: Atti del Corso di formazione "Utilizzazione di *Daphnia magna* in tossicologia ambientale". Reggio Emilia, maggio 1987, pagg. 7-38.

Ed. Centro It. Studi di Biol. Ambient., Reggio Emilia.

IRSA, 1979. Metodi analitici per le acque. Vol. 3, parte V.
CNR, Quaderni IRSA n° 11.

ISO, 1982. Water Quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* STRAUS (Cladocera, Crustacea).
International Standard 6341 E.

Legge 319/76. Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento.
Gazzetta Ufficiale 29/5/1976.

MINISTERO SANITÀ, 1985. Classificazione e disciplina dell'imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose, in attuazione delle direttive emanate dal Consiglio e dalla Commissione delle Comunità Europee. Tossicità acuta per la *Daphnia*.
Suppl. ordinario n° 2 alla G. U. n° 305, 30 dic. 1985.

MINISTERO SANITÀ, 1988. Decreto Legge 6 dic. 1988. Protocollo informativo sulle caratteristiche di sostituenti del fosforo in preparati per lavare e coadiuvanti del lavaggio.
Gazzetta Ufficiale n° 306, 31 dic. 1988.

NIKUNEN E., MIETTINEN V., 1985. *Daphnia magna* as an indicator of the acute toxicity of waste waters.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35: 368-374.

OCDE, 1987. Utilization des tests biologiques pour l'évaluation et le contrôle de la pollution de l'eau.
OCDE, Monographies sur l'environnement, II.

SPRAGUE J.B., 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity.
Water Research, 3: 793.

TARTARI G., SETTI F., MOSELLO R., SANNA M., 1987. Atti del Convegno "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque. Dieci anni di esperienza". Gruppo 8: pH. Roma, 26-27 giugno 1986.
CNR, Quaderni IRSA, n° 75: 453-502.

VIGANÒ L., 1987. Metalli e non metalli tossici totali: esame del limite della legge 319/76 con *Daphnia magna*.
Ingegneria Ambientale, 16 (6): 341-345.

VIGANÒ L., MARCHETTI R., PUDDU A., 1987. Atti del Convegno "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque. Dieci anni di esperienza". Gruppo 10: Saggio di tossicità. Roma, 26-27 giugno 1986.
CNR, Quaderni IRSA, n° 75: 513-524.

WINNER R.W., FARREL M.P., 1976. Acute and chronic toxicity of copper to four species *Daphnia*.
J. Fish. Res. Board Can., 33: 1685-1691.

