

Test acuto con Daphtoxkit F[®] magna per la valutazione della tossicità di un effluente industriale e l'individuazione dei composti tossici[§]

[§] Relazione presentata al workshop "Test di tossicità con *Daphnia magna* per il controllo di acque reflue e corpi recettori. Milano, 29 ottobre 1999.

Silvana Galassi^{1*} e Valeria Croce²

¹ Università degli Studi di Milano-Bicocca, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Piazza della Scienza, 2 - 20126 Milano

² Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Biologia, Via Celoria 26 - 20133 Milano

* Autore referente per la corrispondenza (fax: 02 64483565; e-mail: silvana.galassi@unimib.it)

Pervenuto il 18.4.2000, accettato il 22.7.2000

Riassunto

Viene valutata la tossicità di un effluente di industria tessile e delle sue frazioni, ottenute mediante tecniche cromatografiche, con il saggio acuto su *Daphnia magna*. Per il saggio ecotossicologico è stato adottato un biokit commerciale, che utilizza forme quiescenti del dafnide, dopo aver confrontato la sua sensibilità con quella del saggio tradizionale su dafnidi partenogenetici. La maggior parte degli effetti tossici riscontrati è stata attribuita a sostanze xenobiotiche, recuperate nella frazione meno polare ottenuta mediante HPLC preparativa. È stato possibile identificare il composto responsabile dell'effetto tossico di questa frazione mediante gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). Le procedure adottate, seppur complesse, rivelano aspetti innovativi dell'indagine che possono indirizzare le tecniche di depurazione e consentire la sostituzione di componenti tossiche presenti nei cicli produttivi.

PAROLE CHIAVE: Biokit / Acque di scarico / *Daphnia magna* / Saggi ecotossicologici

Abstract

Daphtoxkit F[®] magna acute test in waste water monitoring.

Toxicity of a textile effluent and of its fractions, obtained by chromatographic techniques, has been evaluated by *Daphnia magna* acute test. For the bioassays a commercial kit using *Daphnia magna* resting eggs was adopted after comparison of its sensitivity with the traditional test on parthenogenetic daphnids. Most toxicity was due to xenobiotics, recovered in the most hydrophobic HPLC fraction. The compound responsible of the observed toxicity was identified and quantified by GC-MS. The adopted procedures, notwithstanding their complexity, offer new useful tools to address effluent treatments and to replace dangerous chemicals in production cycles.

KEY WORDS: Biokit / wastewaters / *Daphnia magna* / ecotoxicological tests

INTRODUZIONE

L'impiego dei saggi ecotossicologici si sta sempre più affermando nell'ambito dei controlli ambientali volti alla prevenzione della contaminazione delle acque, grazie al fatto che offre la possibilità di valutare in modo rapido e integrato gli effetti complessivi di sostanze tossiche provenienti dalle varie attività antropiche presenti sul territorio.

Daphnia magna è l'organismo più ampiamente utilizzato in ecotossicologia acquatica per il controllo delle nuove sostanze da immettere sul mercato (diretti-

va della Comunità Economica Europea, CEE 831/79) e per le acque di scarico: il Testo Unico per la tutela delle Acque, recentemente approvato (D.Lgs. n. 152, 11 maggio 1999), prevede l'adozione del saggio acuto per gli effluenti e per gli estratti pre-concentrati di acque superficiali. Del resto, l'utilizzo di quest'organismo nei saggi di tossicità era stato proposto dall'IRSA (Istituto di Ricerca sulle Acque) fin dal 1991 (GUZZELLA e MARCHETTI, 1991) in alternativa o in aggiunta a quello d'ittiotossicità, previsto dalla legge Merli (319/76), che

era ampiamente disatteso per la difficoltà a reperire e mantenere in laboratorio la trota (*Oncorhynchus mykiss*) soprattutto nei periodi caldi dell'anno.

L'allevamento della dafnia è indubbiamente meno difficoltoso di quello della trota e questo organismo ha una sensibilità paragonabile a quella dei pesci (BACCI e MARCHETTI, 1993).

L'esecuzione di biotest sulle acque di scarico, pur presentando, come detto, il vantaggio di ottenere una valutazione globale della tossicità del campione, ha la limitazione di non consentire l'immediata determinazione degli agenti tossici. Per arrivare all'identificazione e quantificazione delle sostanze responsabili della tossicità in miscele complesse, quali sono le acque di scarico, è quindi necessario abbinare ad un controllo di tipo biologico un approccio di tipo analitico.

Una procedura che va in questa direzione è stata proposta negli USA alla fine degli anni '80 (U.S.EPA, 1989) e integra lo screening dell'effluente tramite test di tossicità con tecniche di frazionamento, allo scopo di separare le componenti tossiche di uno scarico da quelle non tossiche prima di eseguire le analisi strumentali, in modo che solo le prime vengano sottoposte alla fase analitica. Questa procedura, chiamata TIE (Toxicity Identification Evaluation), consente non solo di identificare i composti tossici di una miscela, ma anche di arrivare a questo risultato in modo relativamente rapido ed economico, in quanto i test condotti sulle frazioni consentono di avere un'idea sulla natura chimico-fisica dei tossici e di utilizzare la tecnica analitica più adeguata per la loro identificazione e quantificazione. La procedura TIE s'inserisce nel più ampio programma TRE (Toxicity Reduction Evaluation) per la riduzione della tossicità di scarichi non in regola con i limiti di legge, che prevede il TIE come seconda fase, preceduta da una fase di caratterizzazione chimico-fisica dei tossici mediante manipolazione dei campioni, (per esempio aggiunta di acido etilendiamminotetracetico [EDTA], aerazione, estrazione su fase solida) e saggi di tossicità sulle miscele così alterate.

Il progetto PERICLES (Protocol for the Evaluation of Residues in Industrial Contaminated Liquid Effluents), finanziato dall'Unione Europea, all'interno del quale si colloca questo lavoro, si propone di mettere a punto un protocollo per la valutazione del rischio ambientale delle acque di scarico rifacendosi a questi principi d'abbinamento di metodologie biologiche di screening, di frazionamento di miscele complesse e d'uso di biotest per la selezione delle componenti tossiche delle miscele. Poiché scopo del protocollo è anche quello di semplificare le procedure utilizzate, è sembrato di grande interesse valutare l'applicabilità di un biokit commerciale (Daphtoxkit® *magna*) che utilizza forme quiescenti di *Daphnia magna*, conservabili

per diversi mesi in frigorifero e attivabili successivamente, al momento dell'esecuzione dei saggi.

Il principale vantaggio di questo biokit è evitare l'allevamento dell'organismo test –che richiede di dedicare quotidianamente qualche ora di personale esperto– a quei laboratori che debbono eseguire saggi solo occasionalmente. Un ulteriore vantaggio è costituito dal fatto che la ripetibilità del test e la sensibilità degli organismi sono garantite dalla ditta fornitrice e che l'adeguatezza delle pratiche di laboratorio adottate nell'esecuzione del saggio può essere verificata per ogni serie di prove valutando semplicemente la sopravvivenza dei controlli e la tossicità ottenuta con una sostanza di riferimento.

MATERIALI E METODI

Preparazione delle frazioni

Come tipologia industriale è stato considerato un effluente di industria tessile, non sottoposto a trattamento di depurazione, proveniente dallo scarico di un impianto situato in Portogallo. I campioni sono stati raccolti in due occasioni (marzo e settembre '97), trasportati in recipienti di vetro e ricevuti entro 48 ore dalla spedizione. Successivamente sono stati conservati al buio alla temperatura di 4 °C in contenitori di vetro a chiusura ermetica fino al momento del primo frazionamento, che è stato eseguito entro 48 ore dal giorno di ricevimento.

Per il primo livello di frazionamento, che si proponeva di separare le sostanze inorganiche e quelle organiche molto polari dai microinquinanti organici a media e alta idrofobicità, un'aliquota di 50 mL di campione, filtrata su filtri in acetato di cellulosa con una porosità nominale di 0,45 µm (*filtrato*), è stata sottoposta ad estrazione su fase solida (SPE) utilizzando colonnine a perdere LiChrolut® EN (3 mL, Merck). In tal modo sono state ottenute due frazioni: il *passato*, che non viene trattenuto dalla colonnina, e l'*estratto* in solvente organico della matrice solida (Fig. 1). Il filtrato e il passato sono stati sottoposti al saggio di tossicità anche dopo aggiunta di EDTA per valutare il ruolo dei metalli pesanti e di altre sostanze che possono essere chelate e quindi rese non biodisponibili, mentre l'estratto è stato sottoposto ad un ulteriore frazionamento tramite HPLC preparativa in fase inversa con colonna del tipo C₁₈. Sono state ottenute 5 frazioni, caratterizzate da lipofilia crescente. Gli intervalli di lipofilia d'ogni frazione sono stati stimati in base ai tempi d'uscita di composti di riferimento a K_{ow} (coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua) noto (GALASSI e BENFENATI, 2000). L'intera procedura è schematizzata nella figura 1.

Esecuzione del saggio di tossicità

L'obiettivo dei test era la determinazione della tossicità acuta (IC50 a 24 e 48 h, dove IC50 indica la concentrazione che causa l'immobilizzazione del 50% degli individui esposti). Come organismo test è stato scelto *Daphnia magna* nella versione disponibile in commercio che utilizza le uova durature. Il Daphtoxkit F® *magna* (CREASEL, Belgio) è un kit commerciale per la conduzione di saggi biologici che impiega dafnidi (*Daphnia magna* Straus), sviluppato da Persoone e coll. presso l'Università di Ghent (Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution).

Gli organismi test sono forniti come uova dormienti, immerse in un mezzo di conservazione. Le uova sono racchiuse in un rivestimento chitinoso, l'efippio, che le protegge e le mantiene vitali per alcuni mesi, a

condizione che esse siano mantenute al buio e alla temperatura di 4°C.

Le forme quiescenti sono state attivate secondo la seguente procedura: gli efippi, posti in un microsetaccio, sono stati lavati con acqua corrente, in modo da eliminare ogni traccia del mezzo di conservazione, e sono stati quindi trasferiti in una capsula Petri contenente circa 50 mL del mezzo di conduzione dei test; la capsula coperta è stata incubata per 3-4 giorni a 21 °C sotto illuminazione continua a 7500 lux. I dafnidi di meno di 24 ore sono stati trasferiti in un recipiente di vetro, dove sono stati alimentati con l'alga unicellulare *Spirulina* sp. per integrare le loro riserve interne ed evitare così un'elevata mortalità nei controlli, dato che per tutta la durata del test non viene loro somministrato cibo.

Il kit è provvisto di soluzioni concentrate di sali da

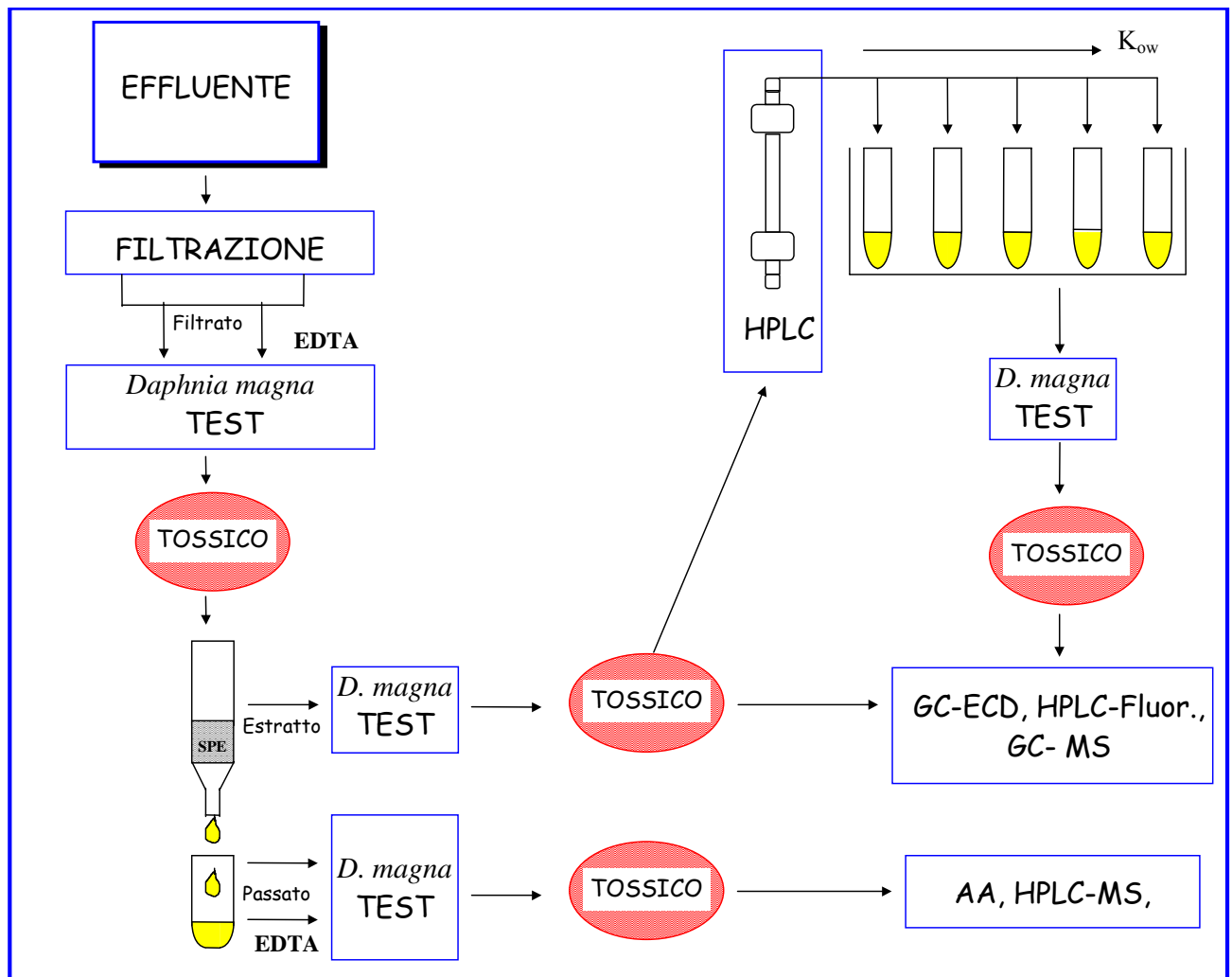


Fig. 1. Schema generale del frazionamento di un effluente per il bioscreening e la determinazione analitica delle componenti tossiche.

aggiungere all'acqua deionizzata in adeguate proporzioni, in modo da preparare un mezzo per l'attivazione degli efippi e la conduzione dei test con caratteristiche simili a quelle proposte dall'ISO (International Organization for Standardization).

In questo lavoro, tuttavia, abbiamo preferito utilizzare un mezzo acquoso con composizione analoga a quella proposta dall'IRSA (MARCHETTI e VIGANÒ, 1991) per confrontare la sensibilità di dafnidi schiusi da efippi con quelli partenogenetici. Come sostanza di riferimento è stato utilizzato il $K_2Cr_2O_7$, precedentemente impiegato in un esercizio di intercalibrazione su *Daphnia magna* (MARCHETTI e VIGANÒ, 1991) e proposto come sostanza di riferimento anche dalla ditta che fornisce il kit.

Per l'esecuzione dei saggi di tossicità acuta l'effluente filtrato, o le sue frazioni, dalle quali era stato eliminato l'eventuale solvente per evaporazione, sono stati diluiti con lo stesso mezzo acquoso utilizzato per i saggi col bicromato, nelle proporzioni previste dal saggio (nel caso dei test definitivi sono state utilizzate 5 concentrazioni prese a intervalli logaritmici tra le due concentrazioni estreme, cioè la più bassa che dà il 100% di immobilizzazione e la più alta che dà il 100% di non effetto). 40 mL di ogni diluizione venivano versati in beaker di vetro da 50 mL. L'aumento del volume e l'adozione di vetreria invece dei pozzetti monouso in plastica è l'altra variante da noi utilizzata nella procedura di saggio, in quanto era stato osservato precedentemente che i controlli eseguiti nei pozzetti di plastica da 10 mL presentavano un'alta percentuale di immobilizzazione (RUSSO, 1997).

In ciascun recipiente sono stati introdotti 5 dafnidi e per ogni concentrazione sono state allestite due repliche. Per ogni saggio di tossicità sono stati allestiti due beaker di controllo contenenti 40 mL del solo mezzo acquoso e 5 animali per ogni replica. I beaker, coperti con un vetrino da orologio, sono stati mantenuti al buio e alla temperatura di 20 °C per tutta la durata del test.

A 24 e 48 ore dall'inizio del test sono stati contati gli organismi immobili ed è stata calcolata la IC50 con i rispettivi limiti fiduciali. L'analisi statistica dei dati è stata condotta tramite il programma PROBIT (U.S.EPA, versione 1.4).

Determinazioni analitiche

L'analisi chimica della quinta frazione ottenuta tramite HPLC preparativa, per la quale è stata osservata la massima tossicità, è stata condotta mediante GC-MS dall'Istituto di Ricerche farmacologiche Mario Negri di Milano (GALASSI e BENFENATI, 2000), che ha fornito anche le sostanze pure sulle quali sono stati successivamente eseguiti i saggi di tossicità acuta.

Preparazione delle soluzioni test per sostanze poco solubili

Alcuni dei composti organici identificati analiticamente nella quinta frazione HPLC (bis-2-etilesil-ftalato, 4-nonilfenolo) sono stati giudicati potenzialmente tossici per *Daphnia* in base alla loro struttura chimica e ai dati di letteratura su organismi affini. Per questi composti è stata determinata la 24h e 48h IC50 controllando analiticamente le concentrazioni di esposizione. Per ciascuno di questi due composti sono state preparate soluzioni sature, sospendendo il composto puro nel mezzo acquoso in forte eccesso rispetto alla concentrazione corrispondente alla solubilità acquosa e tenendolo in agitazione a 20 °C per 24 h. Tali soluzioni sono state filtrate su filtri in acetato di cellulosa con una porosità nominale di 0,45 µm e titolate analiticamente. Le successive diluizioni sono state preparate a partire dalla soluzione satura filtrata.

Per l'analisi delle soluzioni concentrate di bis-2-etilesilftalato e delle diluizioni successive, usate per il saggio di tossicità, le soluzioni acquose sono state estratte con esano, nel rapporto campione/solvente 10:1, e analizzate tramite GC-ECD nelle seguenti condizioni: gas cromatografo C. Erba Top 8000 con rivelatore a cattura di elettroni ^{63}Ni , colonna tipo CP/Sil. 8 CB (50 m X 0,25 mm d.i., spessore del film 0,25 µm), gas di trasporto elio, 1 mL/min, gas ausiliario per il rivelatore azoto, 30 mL/min. Programmazione della temperatura del forno: 1 min a 100 °C, da 100 °C a 180 °C in 20 °C/min, da 180 °C a 200 °C in 1,5 °C/min, da 200 °C a 270 °C in 3 °C/min, 13 min isoterma finale. Temperatura rivelatore 320 °C. Sistema di integrazione Chrom-card per Windows (Fisons Instruments).

Le soluzioni acquose di 4-nonilfenolo sono state analizzate direttamente mediante HPLC-fluorescenza con uno strumento Jasco, LC 900, nelle seguenti condizioni: colonna Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm), Merck (125 mm X 4 mm d.i.), loop di iniezione da 20 µL, fase mobile, acqua-metanolo, 0,5 mL min⁻¹ in gradiente da 20:80 a 0:100 in 11 min. Il rivelatore fluorimetrico (Jasco FP920) è stato impostato a 230 nm di λ_{ex} e 290 nm di λ_{em} .

I dati di tossicità sono riferiti alle concentrazioni rilevate analiticamente nelle stesse condizioni delle soluzioni di partenza.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati relativi ai saggi di tossicità della sostanza di riferimento ($K_2Cr_2O_7$) eseguiti con Daphtoxkit F® *magna* sono riportati nella tabella I insieme ai valori forniti dalla ditta produttrice e alla media dei valori ottenuti in

Tab. I. IC₅₀ su *Daphnia magna* del cromo VI ($\mu\text{g Cr L}^{-1}$) con Daphtoxkit F® magna (valori trovati nel nostro laboratorio e forniti dalla ditta produttrice) e con dafnidi partenogenetici (dati di letteratura).

		IC ₅₀ 24h	Lim. Fid. 95%	IC ₅₀ 48h	Lim. Fid. 95%
Saggi con Daphtoxkit®	15/04/97	291,7	208,6-421,4	191,0	122,9-261,2
	09/06/97	298,9	185,8- 1286,2	134,2	93,6-200,8
	28/10/97	412,8	334,9-528,9	302,3	246,7-371,2
	28/10/97	383,0	326,8-451,0	249,5	200,0-313,1
	23/03/98	377,7	313,9-475,9	254,0	213,3-302,0
	media	352,8	328,6-377	226,2	197,2-255,2
	produttore, 1996	530,2	424,2-636,3	282,8	212,1-353,5
produttore, 1998	354	247,5-459,6	n.d.*	n.d.*	
Saggi con dafnidi partenogenetici	Marchetti e Viganò, 1991	456,9	398,9-514,9	n.d.*	n.d.*
	Guilhermino, 1997	262,1	260,9-263,3	229,1	227,9-230,4

un esercizio di intercalibrazione eseguito con dafnidi partenogenetici (MARCHETTI e VIGANÒ, 1991).

I primi kit, acquistati nel 1996, avevano una sensibilità al bicromato inferiore a quella dei dafnidi partenogenetici. Successivamente i valori di IC50 sono diminuiti, indicando che erano stati evidentemente selezionati ceppi più sensibili. I valori di IC50 da noi ottenuti con differenti lotti di efippi, acquistati nell'arco di un anno, dal marzo 1997 al marzo 1998, sono risultati sempre nell'ambito di variabilità considerato accettabile e mediamente inferiori a quelli riportati per l'esercizio di intercalibrazione con il saggio tradizionale su dafnidi partenogenetici (MARCHETTI e VIGANÒ, 1991).

È stato riportato anche il valore di tossicità più basso tra quelli reperiti in letteratura (GUILHERMINO *et al.*, 1997) per evidenziare che la sensibilità dei cloni di dafnia partenogenetica può essere molto ampia, tanto da rendere difficile il confronto dei risultati ottenuti in diversi laboratori.

Anche nel caso dell'effluente di industria tessile e delle frazioni ottenute mediante estrazione su fase solida (SPE) è stato fatto un confronto delle risposte del kit commerciale e del saggio tradizionale (Tab. II). Nella tabella è indicata la data di esecuzione del saggio nell'ipotesi che si possa avere un calo di tossicità dei campioni nel tempo. Nella maggior parte dei casi il kit

Tab. II. 48h IC50 su *Daphnia magna* espressi come % dell'effluente.

		Daphtoxkit F® magna	Data	Test tradizionale (dafnidi partenogenetici)	Data
Marzo 97	Effluente filtrato	3.10 (2.65-3.63)	21/4/97	3 (1-5)	21/5/97
	passato	6.82 (5.88-8.11)	2/6/97	17.9 (10-32)	21/5/97
	estratto			17.9 (10-32)	21/5/97
Settembre 97	Effluente filtrato	1.64 (1.22-2.13)	27/10/97	6 (3.2-9)	25/9/97
	passato	2.68 (2.03-3.50)	27/10/97	> 20%	20/1/98
	estratto	2.64 (2.20-3.10)	3/11/97	< 10%	20/1/98

si è dimostrato altrettanto o maggiormente sensibile dei dafnidi partenogenetici anche quando il saggio con dafnidi schiusi da effipi era stato leggermente posticipato rispetto al test con dafnie d'allevamento. Solo nel caso del passato e dell'estratto del campione di settembre è da ritenere che la minor tossicità misurata con il test tradizionale sia dovuta ad un'alterazione dei campioni per i lunghi tempi di conservazione.

Ritenendo, a questo punto, che la risposta dei biokit potesse essere considerata soddisfacente, tutte le prove successive sono state eseguite unicamente con Daphtoxkit F® *magna*.

Innanzitutto si è cercato di evidenziare il contributo di metalli pesanti e di altre sostanze complessabili con EDTA alla tossicità dei due effluenti d'industria tessile e alle relative frazioni polari cioè quelle non trattenute dalle colonnine LiChrolut® EN (Tab. III). L'aggiunta del complessante non ha modificato visibilmente l'effetto tossico dell'effluente tal quale saggiato alla concentrazione minima che provocava completa immobilizzazione, mentre ha ridotto drasticamente la tossicità del passato. Questo comportamento è stato attribuito alla presenza, nel tal quale, di microinquinanti organici non complessabili con EDTA, che prevalgono sui metalli nel determinare la tossicità su dafnia. Questi microinquinanti sono quelli che vengono recuperati nella frazione denominata estratto.

In ogni caso il contributo dei metalli e di altre sostanze complessabili alla tossicità è indubbiamente rilevante in entrambi i campioni. Le indicazioni del saggio di tossicità con aggiunta di EDTA sono tali da rendere necessaria una caratterizzazione analitica di queste componenti.

Per agevolare l'individuazione degli agenti tossici nell'estratto, dal momento che i microinquinanti organici presenti in un effluente industriale potrebbero presentarsi come miscele molto complesse, si è proceduto ad un ulteriore frazionamento dell'estratto dell'effluente di settembre, dimostratosi maggiormente tossico, mediante HPLC preparativa. La fase stazionaria, del tipo C-18, separa in base alla polarità dei composti e, trattandosi di tecnica a fase inversa, eluisce prima i

Tab. III. Percentuale d'immobilizzazione di *Daphnia magna* da biokit a 24 h, senza aggiunta e con aggiunta di EDTA.

Campione	Senza EDTA	+ EDTA (150 µmoli/L)
Effluente (marzo 97) Conc. 10%	100 %	100 %
Passato (marzo 97) Conc. 10%	30 %	0 %
Effluente (sett. 97) Conc. 5,6 %	90 %	100 %
Passato (sett. 97) Conc. 5,6 %	80 %	40 %

composti più polari e successivamente i più lipofili. Gli ambiti di polarità delle cinque frazioni ottenute con questa procedura sono stati definiti come intervalli dei logaritmi dei coefficienti di ripartizione n-ottanolo/acqua ($\log K_{ow}$) (Tab. IV) e sono stati calcolati sulla base dei tempi di uscita di sostanze di riferimento a K_{ow} noto.

La maggior parte dell'effetto tossico è stato osservato nella frazione 5. La tossicità sembra decrescere al crescere della polarità indicando che gli agenti tossici esercitano prevalentemente una tossicità aspecifica di tipo narcotico.

Disponendo di una piccola aliquota della frazione 5, è stata provata una ulteriore diluizione, corrispondente al 10% del campione originario, che ha causato il 45% di immobilizzazione a 48 ore.

Le analisi gascromatografiche della frazione 5 e l'identificazione delle singole componenti mediante spettrometria di massa hanno consentito di individuare una serie di composti che sono stati successivamente quantificati mediante l'uso di standard puri disponibili in commercio e, in qualche caso, sintetizzati ad hoc. Le concentrazioni sono state rapportate alla diluizione del 10%, che ha dato valori di tossicità della frazione 5 vicini all'IC50 e confrontate con le IC50 dei composti puri determinate nel nostro laboratorio (Tab. V).

Tab. IV. Percentuale d'immobilizzazione di *Daphnia magna* causata dalle frazioni HPLC saggiate a una diluizione corrispondente al 20% del volume originario di campione.

	Frazione 1	Frazione 2	Frazione 3	Frazione 4	Frazione 5
Intervallo di Log K_{ow}	- 0,59 ↓ - 0,28	- 0,28 ↓ 0,52	0,52 ↓ 1,7	1,7 ↓ 2,81	2,81 ↓ 5,16
Immobilizzazione % 24h	0	0	0	20	100
Immobilizzazione % 48h	0	10	10	30	100

Tab. V. Confronto tra le concentrazioni dei composti presenti nella quinta frazione dell'effluente di industria tessile diluito al 10% e le rispettive IC₅₀ su *Daphnia magna*.

composto	IC50 48h (µg L ⁻¹)	concentrazione (µg L ⁻¹) presente nella diluizione della frazione 5 che dà il 45% di immobilizzazione a 48h
dibutilftalato	3953,2	4,5
nonilfenolo	50,4	51
bis-2-etilesilftalato	237,1	25,4

Tab. VI. Tossicità su *Daphnia magna* a 48 ore della miscela ricostruita dei composti presenti nella frazione 5 dell'effluente di industria tessile.

diluizione %	n° individui esposti	n° individui immobili	% d'immobilizzazione
controllo	20	1	5
5	20	1	5
10	20	2	10
20	20	18	90

Come si può osservare l'effetto tossico è attribuibile al solo nonilfenolo, un metabolita del nonilfenolo polietossilato, utilizzato come detergente non ionico in questo tipo di lavorazioni industriali.

La frazione 5 è stata successivamente ricostruita sulla base delle concentrazioni determinate analiticamente, sottoposta al confronto analitico con quella originale e saggiata per la tossicità su dafnia (Tab. VI).

La tossicità della frazione ricostruita è debolmente inferiore a quella della frazione preparata con HPLC, ma si può ritenere che le differenze siano nell'ambito della normale variabilità dei saggi ecotossicologici.

CONCLUSIONI

Il Daphtoxkit F® *magna* si è dimostrato un valido strumento diagnostico per la ricerca delle componenti

tossiche in miscele acquose complesse quali sono gli effluenti industriali.

La sensibilità del kit è paragonabile, se non superiore, a quella dei dafnidi partenogenetici abitualmente utilizzati per il saggio acuto. Questo risultato è abbastanza sorprendente, dal momento che ci aspetteremmo una maggior resistenza dalle dafnie schiuse da uova durature e nate quindi da una riproduzione di tipo sessuale, piuttosto che da quelle derivanti da cloni partenogenetici.

La riproduzione sessuale in ecosistemi naturali è una strategia che aumenta la variabilità genetica e quindi la capacità di sopravvivere in condizioni avverse; essa è in grado comunque di generare anche individui più sensibili che possono essere selezionati allo scopo di produrre organismi adatti all'esecuzione dei saggi. I biokit da noi utilizzati sia per la loro buona ripetibilità (risultati molto simili con diversi lotti di efippi) sia per l'elevata sensibilità, sembrerebbero indicare che la produzione avvenga con un controllo del patrimonio genetico.

Le tecniche di frazionamento si sono dimostrate efficaci per evidenziare le componenti tossiche sia a livello di classi di composti (polari, non polari, metalli), sia come singole specie chimiche. In particolare la componente maggiormente tossica nel caso dell'effluente d'industria tessile considerato in questo studio è risultata la frazione meno polare dei microinquinanti organici e per la prima volta in studi di questo tipo è stato individuato il composto responsabile della tossicità: il 4-nonilfenolo, principale metabolita dei nonilfenoli polietossilati.

Sebbene una procedura di questo tipo sia difficilmente applicabile a tutti gli scarichi, tuttavia, essa può rivelarsi un valido strumento per la caratterizzazione di diverse tipologie d'effluente. L'individuazione delle componenti tossiche potrebbe aprire la via sia all'adozione della più appropriata tecnologia di depurazione, sia alla sostituzione di componenti tossiche con altre meno pericolose in alcune lavorazioni industriali. Non a caso i nonilfenoli polietossilati sono già proibiti per usi industriali in alcuni Paesi Europei, sia per i loro effetti tossici sulla vita acquatica, sia perché hanno dimostrato un'azione estrogeno simile, rientrando quindi nella categoria dei "modificatori endocrini".

BIBLIOGRAFIA

- BACCI E., MARCHETTI R., 1993. Misura della tossicità in acqua. In: Marchetti R., *Ecologia applicata*. Città Studi, Torino: 773-801.
- GALASSI S., BENFENATI E., 2000. Fractionation and toxicity identification of waste waters. *J. Chromatogr., A*, **889**: 149-154.

- GUILHERMINO L., DIAMANTINO T.C., RIBEIRO R., GONÇALVES F., SOARES A.M.V.M., 1997. Suitability of test media containing EDTA for the evaluation of acute metal toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **38**: 292-295.
- GUZZELLA L., MARCHETTI R., 1991. Il saggio di tossicità della 319/

- 76: pregi, difetti e alternative. In: Atti Giornata di Studio "Saggio di tossicità con *Daphnia*", Milano, 29 ottobre 1991. Quad. Ist. Ric. Acque, **93**: 2.1-2.23.
- MARCHETTI R., VIGANÒ L., 1991. Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna*. In: Atti Giornata di Studio "Saggio di tossicità con *Daphnia*", Milano, 29 ottobre 1991. Quad. Ist. Ric. Acque, **93**: 2.1-2.23.
- RUSO G., 1997. Valutazione delle acque di scarico con Daphtoxkit® *magna*. Tesi di laurea in Scienze Biologiche, 1996-1997.
- U.S.EPA.1989. Generalized methodology for conducting industrial Toxicity Reduction Evaluation. EPA/600-2-88070.