

## 8000 - PARAMETRI TOSSICOLOGICI

I saggi di tossicità con animali acquatici vengono effettuati per valutare se un dato composto, una miscela di composti o un campione d'acqua di scarico sono tossici e, in caso positivo, per definire il grado di tossicità e i valori di diluizione compatibili con la vita acquatica.

Tali saggi sono stati condotti fino ad oggi con organismi di una sola specie; allo scopo di aumentare il grado di protettività del dato ottenuto, si tende oggi a sviluppare saggi "multispecie" e, cioè, condotti con organismi di livelli trofici diversi (batteri, alghe, crostacei, pesci).

È questa la direzione che dovrà essere presa anche in sede di normativa italiana (che, attualmente, prevede due sole specie di pesci da utilizzare singolarmente) e verso la quale l'IRSA intende indirizzare le prossime edizioni del volume dei metodi di analisi delle acque tra i quali dovrà comparire anche il saggio per le acque di mare previsto dalla legge.

In questo volume sono riportate le metodiche relative a due saggi di tossicità con pesci e due con il

crostaceo *Daphnia magna*. Il primo dei due saggi con pesci (metodo A) consente di valutare la tossicità di un composto o di un campione d'acqua in termini di LC50 (concentrazione letale); il secondo (metodo B) è invece impostato nei termini richiesti dalla legge 319/76.

Dei due metodi con *Daphnia*, il primo (metodo A) permette di individuare la EC50 (concentrazione di effetto) mentre il secondo (metodo B) consente di valutare l'accettabilità di un effluente. È opportuno sottolineare che, al presente, solo il metodo B con pesci ha valore legale.

Nei saggi con *Daphnia* si riportano, in appendice, i metodi per l'allevamento dell'organismo test ed i metodi per i calcoli della EC.

In considerazione della specificità di questo raggruppamento rispetto ai precedenti (Metodi fisici, chimici e chimico-fisici e Metodi microbiologici) tutti gli aspetti di carattere generale quali campionamento, attrezzature, reattivi e metodi di calcolo sono trattati nei singoli saggi.

## 8010 - METODI DI VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON PESCI

### METODO A - Valutazione della LC50

#### 1 - Generalità

##### 1.1 - PRINCIPIO DEL METODO

Questo metodo, adottato nei casi in cui si presenti la necessità di salvaguardare ambienti biologici specifici od organismi particolari, si basa sulla determinazione della tossicità acuta espressa dalla LC50, che è la diluizione alla quale il 50% degli animali considerati decede in un tempo prestabilito (24-48 ore o più). Tale diluizione viene determinata con un saggio preliminare ed uno definitivo: il saggio preliminare serve ad individuare l'ambito approssimato di diluizione entro il quale si trova la LC50; il saggio definitivo invece permette di precisarne il valore. Per stabilire quali sono i rapporti di diluizione che debbono essere rispettati perché l'ambiente biologico che riceverà le acque esaminate sia salvaguardato nella sua funzionalità, occorrerà infine che dalla LC50 venga calcolata la "diluizione di sicurezza".

##### 1.2 - INTERFERENZE

Nella valutazione della tossicità le principali interferenze possono essere rappresentate da mortalità dovute a livelli troppo bassi di ossigeno, da perdite di sostanze tossiche (per esempio volatili) o da altre cause che aumentino o riducano la tossicità del campione (per esempio precipitazione di sali di metalli pesanti, variazioni di pH, ecc.).

Quando l'analisi chimica abbia dimostrato che queste interferenze effettivamente esistono, la loro eliminazione potrà aver luogo essenzialmente in due modi:

- 1) sostituendo le soluzioni in esame con frequenza maggiore di quella prevista dal metodo, oppure operando con apparecchiature che permettano un ricambio continuo della soluzione in esame;
- 2) fornendo l'ossigeno necessario in modo tale da compensare quello utilizzato nei processi ossidati-

vi dell'acqua e per la respirazione degli animali.

Controlli dovranno assicurare che durante tutto il periodo delle prove il livello di ossigeno si mantenga fra il 60 e 100% della saturazione.

##### 1.3 - RACCOLTA E CONSERVAZIONE CAMPIONI

Il volume del liquido necessario alle prove dipende dalla composizione e dal grado di tossicità del liquido stesso (in genere 10 ÷ 20 litri sono sufficienti). I campioni vanno raccolti in recipienti riempiti completamente e conservati a circa 4 °C.

#### 2 - Apparecchiature

Per le prove di tossicità di tipo convenzionale (e cioè a liquido non ricambiato in modo continuo), le apparecchiature necessarie sono rappresentate da vasche di vetro o bottiglie a collo largo. Ne occorre una serie di almeno 8, della capacità minima di 4 litri (per il saggio preliminare), ed una serie di almeno 4 della capacità minima di 10 litri (per il saggio definitivo). La forma dei recipienti non ha grande importanza, a condizione che la profondità del liquido non sia inferiore ai 15 cm. È inoltre indispensabile poter regolare (con bagni o camere termostate) la temperatura dei liquidi in esame durante tutto il tempo della prova. L'ambito di temperatura utile va, orientativamente, da 15 a 25 °C, con oscillazioni intorno a  $\pm 1$  °C. Le temperature d'esperimento saranno prestabilite in funzione della temperatura massima osservata nel recipiente in cui verrà scaricata l'acqua in esame. Occorrono infine vasche di stabulazione, nelle quali conservare gli animali prima del loro impiego. L'acqua di queste vasche dovrà essere portata gradualmente alla temperatura alla quale si effettueranno le prove, curando che rimanga limpida (con riciclo su carbone o con ricambio in maniera continua) e ad un adeguato livello di ossigenazione (60 ÷ 100%) ottenibile con gorgogliamento d'aria. Nel caso di vasche a riciclo, occorrerà sostituire l'acqua di stabulazione con una

frequenza che dipende dalla densità degli animali, e dalle loro esigenze. Analisi di alcune caratteristiche chimiche dell'acqua (per esempio  $N-NH_3$ ) eseguite in tempi successivi, potranno dare utili indicazioni sulla frequenza del ricambio. Questo sistema di stabulazione è comunque da adottarsi solo quando manchi ogni possibilità di un continuo ricambio. In queste circostanze il periodo di stabulazione dovrà essere ridotto al minimo indispensabile.

### 3 - Animali per il saggio e le soluzioni

#### 3.1 - ANIMALI PER IL SAGGIO

Il metodo A, per definizione, richiede che gli animali da usare nelle prove di tossicità vengano scelti in base all'interesse locale e contingente. Tale scelta cade generalmente sui pesci, ma anche altri rappresentanti della biocenosi acquatica possono essere utilizzati con successo (crostacei, insetti, ecc.) purché sufficientemente sensibili e tali da garantire la sopravvivenza anche delle altre componenti della biocenosi. In tutti i casi è condizione indispensabile che i soggetti prescelti sopportino bene le condizioni di acquario, e questa possibilità va controllata in base al loro comportamento e alla mortalità osservata durante il periodo di acclimatazione che precede le prove. Quando la mortalità naturale supera il 10%, il lotto intero di animali deve essere accantonato e rimesso in uso solo quando detta mortalità receda. Occorre inoltre che gli animali siano assolutamente sani e di dimensioni omogenee: nel caso dei pesci sono preferibili soggetti di lunghezza corporea tra 5 e 10 cm. È inoltre indispensabile che la loro classificazione sia effettuata con esattezza e che il nome scientifico sia indicato fino alla specie. Nell'ambito nazionale le specie di Pesci cui si fa generalmente ricorso per prove tossicologiche sono le seguenti: *Salmo gairdnerii* (trota iridea) attualmente denominata *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario* (trota di fiume), *Phoxinus laevis* (sanguinerola), *Alburnus albidus* (alborella), *Leuciscus cephalus cabeda* (cavedano). Queste specie si possono ottenere dalle piscicoltura o raccogliere nella maggior parte delle acque italiane. Durante il periodo di stabulazione, gli animali devono essere regolarmente ed opportunamente alimentati (sospendendo la somministrazione del cibo il giorno prima che inizino le prove e durante le prove stesse) e acclimatati alla temperatura alla

quale si effettuerà il test.

#### 3.2 - NUMERO DI ANIMALI E VOLUME DI LIQUIDO

Nel test preliminare, il numero minimo di animali da usare può essere di 2 per ogni diluizione e, in questo caso, anche il volume del liquido in esame potrà essere ridotto a 4 litri. Per la prova definitiva occorreranno invece almeno 10 soggetti per ogni diluizione a meno di non operare con organismi diversi dai pesci (crostacei, insetti ecc.) per i quali il numero dovrà essere più elevato (oltre 20). Il rapporto tra il peso complessivo degli animali ed il volume di acqua che li contiene dovrà essere stabilito in funzione di numerosi fattori, e soprattutto con determinazioni del contenuto di ossigeno residuo. Poiché usando 10 animali ciascuno del peso di 10 grammi occorrerebbero volumi di liquido notevoli, si consiglia di superare le difficoltà che comporta l'uso di grandi vasche, operando con animali di minori dimensioni o areando il liquido in esame.

#### 3.3 - ACQUA DI DILUIZIONE

In questo metodo, la condizione ideale sarebbe quella di poter effettuare le necessarie diluizioni del campione con l'acqua prelevata in una zona pura dello stesso corpo recipiente. Poiché, ciò è raramente possibile (il corpo recipiente può essere già contaminato oppure possono essere necessari volumi d'acqua troppo elevati), il diluente dovrà essere ricavato da altra fonte e corretto nelle sue principali caratteristiche (ad esempio pH, alcalinità e durezza) fino ad avere una composizione chimica simile a quella media del corpo recipiente.

### 4 - Procedimento

#### 4.1 - SAGGIO PRELIMINARE

Tale saggio deve indicare se esiste una tossicità e, in caso positivo, quale sia dopo 24 ore l'ambito di diluizione entro il quale si trova la LC50. A questo scopo si prepara, con gli accorgimenti indicati in precedenza, una vasca di 4 litri contenente il campione in esame tal quale (al 100%) e si controlla se il campione è tossico, introducendovi un piccolo gruppo di animali (per esempio 2 pesci). Se il campione non è tossico, il controllo di non tossicità viene continuato

per 48 ore, se invece entro le 24 ore si sono avuti esiti parziali o totali di mortalità, si procede all'allestimento delle diluizioni secondo una serie ad intervalli logaritmici uguali.

Per esempio: 100 - 89,1 - 79,4 - 70,8 - 63,1 - 56,3 - 50,1 - 44,7 - 39,8 - 35,5 - 31,6 - 28,2 - 25,1 - 22,4 - 19,9 - 17,8 - 15,8 - 14,1 - 12,6 - 11,2 - 10 ecc\*.

Esattamente a 24 ore di distanza dall'introduzione degli animali, la prova effettuata permetterà di individuare l'intervallo compreso tra la diluizione in cui la totalità o una parte soltanto (più della metà) degli animali usati è deceduta e quella che ha causato la morte solo di una parte (inferiore alla metà) o di nessuno degli animali usati. È evidente che, quando il saggio preliminare venga condotto con un elevato numero di intervalli di diluizioni, l'ambito cercato (e cioè quello in cui si trova la LC50) sarà più ristretto e la prova definitiva più agevole da effettuare.

#### 4.2 - SAGGIO DEFINITIVO

Quando nei recipienti contenenti il campione tal quale (100%) la sopravvivenza sia totale anche dopo 48 ore, il saggio definitivo consisterà semplicemente nel ripetere la prova con un numero maggiore di animali (almeno 10) con un maggiore volume di liquido. Quando invece con il saggio preliminare sia stato individuato l'ambito in cui si trova la LC50, il saggio definitivo dovrà servire ad indicare quali sono le diluizioni che determinano, dopo 24 e 48 ore, percentuali di sopravvivenza inferiori (ma non nulle) al 50% e superiori (ma non totali) al 50%. Allo scopo si preparano alcune soluzioni nell'ambito individuato con le prove preliminari, diluendo secondo lo schema degli intervalli logaritmici e vi si introducono gli animali, annotando dopo le 24 le percentuali di sopravvivenza come nel caso precedente e protraendo l'osservazione a 48 ore (gli animali che decedono devono essere rimossi dalle vasche appena possibile). Se dopo i tempi indica-

\* L'andamento del saggio effettuato con il campione tal quale, dà in linea di massima già un'indicazione da scegliere: per esempio con un campione che al 100% abbia causato la morte in circa 2 ore di tutti gli animali si potrà allestire la serie delle diluizioni alle concentrazioni del 25,1 - 12,6 - 6,31 - 3,16 e 1,58% mentre con un campione poco tossico si potrà utilizzare la serie 100 - 79,4 - 63,1 - 50,1. Quando una scelta a priori non sia possibile, occorrerà allestire una serie di prove tra 100 e 0,1%, per esempio 100 - 31,6 - 10 - 3,16 - 1 - 0,361 - 0,1.

ti si ottengono i risultati necessari si può procedere al calcolo della LC50. Diversamente, occorre ripetere la prova selezionando altri intervalli di diluizione.

#### 5 - Determinazione grafica della LC50

Si portano su carta logaritmica le percentuali di sopravvivenza osservate a due diluizioni successive (diluizioni sulla carta logaritmica) dopo 24 ore. Si uniscono con una retta i due punti (che devono essere situati, per quanto detto in precedenza, sopra e sotto la linea del 50%) e, dal punto in cui la retta interseca la linea del 50%, si traccia una perpendicolare all'asse delle diluizioni, ottenendo un valore corrispondente alla LC50-24 ore. Lo stesso procedimento si segue utilizzando le percentuali di sopravvivenza annotate a 48 ore, ottenendo così la LC50-48 ore (Fig. 1).

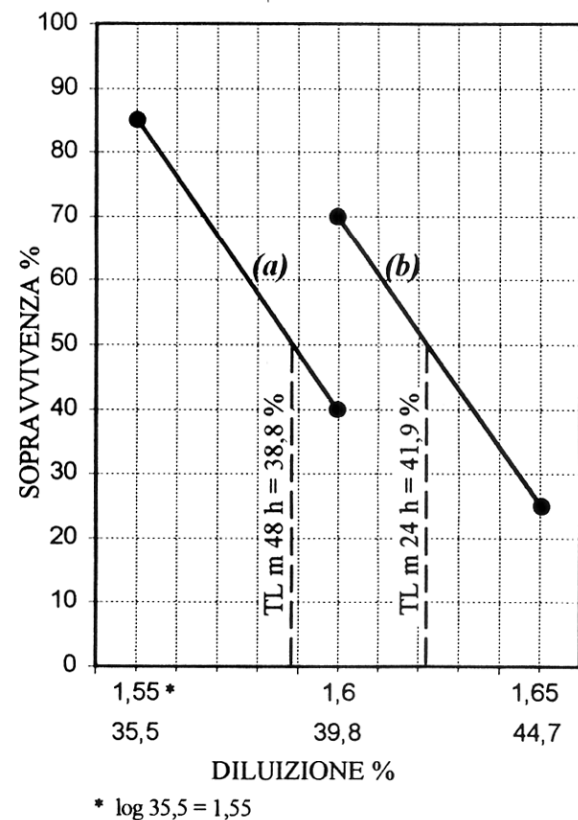


Fig. 1 - Determinazione grafica della LC50

\* I valori di sopravvivenza più indicativi e più corretti per il calcolo della LC50 sono quelli che si trovano, per le diluizioni, tra il 20 e l'80%.

Valutazioni più accurate della LC50 possono essere effettuate con le metodologie di calcolo riportate in appendice ai metodi che utilizzano la *Daphnia*.

### 6 - Calcolo della diluizione di sicurezza

La LC50 calcolata con il metodo descritto non è evidentemente utilizzabile tal quale; essa non prevede, tra l'altro, che la sopravvivenza del 50% della popolazione animale mentre non solo si esige che il 100% di detta popolazione sopravviva, ma occorre prevenire gli eventuali effetti nocivi che si potrebbero verificare in un tempo maggiore di quello previsto dal metodo A. I valori di LC50 24 e 48 h vengono a questo scopo elaborati come segue:

$$D = \frac{LC50_{48h} \cdot 0,3}{\left[ \frac{LC50_{24h}}{LC50_{48h}} \right]^2}$$

dove D è la diluizione di sicurezza cercata.

Questa diluizione, adottando animali molto sensibili, quali ad esempio i Salmonidi, può dare sufficienti garanzie ai fini della protezione dell'intero ambiente biologico.

*Esempio:* Un campione di acqua contaminata deve essere immesso in fiume di cui occorre salvaguardare l'intera biocenosi. Occorre stabilire, di conseguenza, quale è, nel caso specifico, la diluizione di sicurezza, adeguando il più possibile le condizioni sperimentabili e quelle del corpo recipiente (temperatura, caratteristiche del diluente, specie di animali da utilizzare ecc.). La ricerca si conduce in due tempi:

#### SAGGIO PRELIMINARE:

(Si può eseguire con 2 animali per diluizione). La prova del campione tal quale dà il seguente esito: entrambi gli animali decedono in 6 ore. Si procede di conseguenza all'allestimento di almeno 4 diluizioni, per esempio quelle comprese tra il 79,4 e il 19,9% (e cioè 79,4 - 50,1 - 31,6 - 19,9%. Se è il caso i valori possono essere approssimati). A 24 ore di distanza la prova preliminare dà il seguente esito: alle diluizioni 79,4 e 50,1 si ha sopravvivenza nulla; alle diluizioni 31,6 e 19,9 si ha sopravvivenza totale. Di conseguenza la LC50 si troverà tra 50,1 e 31,6%.

#### SAGGIO DEFINITIVO:

(Si può eseguire con 20 animali per ogni diluizione). Si preparano 3 diluizioni comprese tra 50,1 e 31,6% ad intervalli logaritmici eguali e cioè 44,7 - 39,8 e 35,5%. Si introducono 20 animali per ogni diluizione e si annotano i sopravvissuti a 24, 48 e 96 ore. Nell'esempio gli esiti di questa prova sono:

Diluizione	44,7%	39,8%	35,5%
Animali sopravvissuti a 24 h	5 (25%)	14 (70%)	20 (100%)
Animali sopravvissuti a 48 h	0 (-)	8 (40%)	17 (85%)

Si portano su un grafico semilogaritmico (cfr. Fig. 1) le diluizioni (sulla scala logaritmica) e le % di sopravvivenza osservate alle 24 ore (il 100% di sopravvivenza non è utilizzabile così come lo 0%). Si congiungono i due punti con una retta (*a* nella figura). Dal punto di intersezione con la linea del 50% si traccia la perpendicolare all'asse delle diluizioni ottenendo il valore logaritmico 1.622 il cui corrispondente in % è la LC50 24 h = 41,9%. Con analogo procedimento si trova la LC50 a 48 ore che è 38,8% (*b* nella figura). La diluizione di sicurezza, applicando l'equazione riportata al paragrafo 6, di conseguenza è:

$$D = \frac{0,3 \cdot 38,8}{\left[ \frac{41,9}{38,8} \right]^2} = 9,98\%$$

Se lo scarico in questione ha una portata per esempio di 8 litri al secondo si potrà così calcolare la portata minima (Q) che il corpo recipiente dovrà avere perché non abbiano luogo fatti tossici di nessun genere:

$$Q = \frac{8 (100 - 9,98)}{9,98} = 72 \text{ litri / secondo}$$

Dopo diluizione la portata sarà quindi di 80 litri al secondo.

### 7 - Controlli e precisione del metodo

Le prove di tossicità esigono controlli soprattutto quando la mortalità sia risultata, nel periodo che precede le prove, al limite del valore accettabile (10%).

I controlli vanno effettuati allestendo, con il solo diluente, delle vasche in condizioni identiche a quelle delle prove. Quando, durante la prova, si osservano tra gli animali di controllo mortalità superiori al 10%, la prova va ripetuta usando un altro lotto di animali.

La valutazione della LC50 può essere resa più precisa impiegando carta di probabilità o usando metodi statistici basati sul calcolo, anziché sull'extrapolazione grafica, della LC50.

Ai fini abituali per i quali vengono condotte queste determinazioni, il metodo descritto può essere tuttavia considerato soddisfacente. Incidono, però, sulla precisione del metodo anche altri fattori (numero e cariche degli animali, ampiezza dell'intervallo tra le diluizioni, uniformità della metodologia adottata, ecc.), che possono essere in buona parte ridotti aumentando il numero dei soggetti, riducendo gli intervalli tra le diluizioni ed adottando metodi con ricambio continuo o intervallato del liquido in esame.

## 8 - Espressione dei risultati

I risultati del saggio tossicologico vengono espressi in termini di LC50 a 24 a 48 ore (in volumi % del campione originale o altra unità). È indispensabile che accanto ai due valori di LC50 vengano indicate le condizioni sperimentali adottate e in particolare: specie usata, temperatura di esperimento, caratteristiche del diluente, modalità di ossigenazione, condizioni chimiche all'inizio e alla fine delle prove, volume del liquido usato, numero, dimensioni e peso degli animali.

## METODO B - Valutazione dell'accettabilità di un effluente

### 1 - Generalità

#### 1.1 - CAMPO DI APPLICAZIONE DEL METODO

Il metodo B si riferisce alla normativa in vigore in Italia (319/76) la quale richiede, per un giudizio di accettabilità delle acque di scarico, che il campione in esame, diluito 1:1 con acqua standard, consenta la sopravvivenza di almeno il 50% degli animali usati per il saggio, il carassio per la Tab. C e la trota per la Tab. A, per un periodo di 24 ore, alla temperatura di 20 °C o 15 °C nei due casi e in condizioni di aerazione.

Il metodo, quindi, a differenza di quello descritto in precedenza, è rigorosamente standardizzato, nella necessità di operare in condizioni confrontabili nell'esecuzione dei controlli con valore legale sui diversi scarichi.

#### 1.2 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo consiste nel valutare il numero di animali che sopravvivono dopo un periodo di 24 ore a contatto con il campione di effluente, in condizioni sperimentali standard e ad un'unica diluizione (50% con acqua standard).

#### 1.3 - RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il volume del campione necessario per il saggio è di 20 litri. Di questi, 10 vengono utilizzati per il saggio e 10 vengono tenuti come riserva nel caso che quest'ultimo debba essere ripetuto.

Il campione va conservato a 4 °C per non oltre 2 giorni in recipiente riempito completamente.

## 2 - Apparecchiature, reagenti e animali per il saggio

### 2.1 - APPARECCHIATURE

Sono necessarie due vasche di vetro o di altro materiale inerte, di almeno 20 litri di capacità. La forma dei recipienti non ha grande importanza, a condizione che sia assicurato un battente di almeno 15 cm. Particolarmente adatte possono essere vasche di cm 50x25 di base e cm 20-30 di altezza.

Le vasche per il saggio con trota devono essere fornite di una ricopertura a rete. Per la termoregolazione sono necessari bagni o camere termostatiche alla temperatura di 15 °C (saggio con trota) e 20 °C (saggio con carassio).

Per quanto riguarda l'aerazione le vasche devono essere fornite di un gorgogliatore ad aria che consenta di mantenere la concentrazione dell'ossigeno tra il 40 e il 100% di saturazione durante tutto il saggio.

Per le vasche di stabulazione vedasi il punto 2 del metodo A.

### 2.2 - ACQUA STANDARD

L'acqua standard, da utilizzare per la diluizione

del campione di effluente e per il saggio di controllo, va preparata con i seguenti sali:

NaHCO <sub>3</sub>	mg/L 192
CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	mg/L 120
MgSO <sub>4</sub>	mg/L 120
KCl	mg/L 8

I sali elencati vanno disciolti, nelle quantità indicate, in acqua distillata o deionizzata e la soluzione va aerata prima dell'uso. Il pH che si ottiene dopo aerazione è di 7,8-8, la durezza è 160-180 mg/L CaCO<sub>3</sub> e l'alcalinità 110-120 mg/L CaCO<sub>3</sub>.

#### 2.3 - ANIMALI PER IL SAGGIO

Per il saggio con carassio si utilizzano animali della specie *Carassius auratus* di 5-6 cm di lunghezza.

Per il saggio con trota si impiegano animali della specie *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mykiss*) di 8-12 cm di lunghezza.

Per quanto riguarda le condizioni di stabulazione si rinvia ai paragrafi 2 e 3.1 del metodo A.

#### 2.4 - NUMERO DI ANIMALI E VOLUME DEL CAMPIONE

Per ogni prova sono necessari 10 animali che dovranno essere mantenuti in vasche contenenti 20 litri di campione da saggiare, opportunamente diluito, aerato e termostatato.

### 3 - Procedimento

Si preparano due contenitori per il saggio. In uno vengono travasati 10 litri del campione da saggiare e 10 di acqua standard; nell'altro 20 litri di acqua standard. Si procede all'aerazione e alla termostatazione a 15 °C (trota) o a 20 °C (carassio).

A condizioni operative raggiunte si trasferiscono dalle vasche di stabulazione (che devono avere la stessa temperatura del saggio) 10 animali nella vasca con il campione diluito e 10 in quella con il solo diluente (controllo). Il trasferimento va eseguito utilizzando un retino che consenta di effettuare tutte le operazioni con rapidità e senza eccessivo stress per gli animali.

A 2-3 ore dall'inizio del saggio si verificano le condizioni di ossigenazione e si regola l'aerazione in modo da mantenere la saturazione sopra il 40% nel caso del carassio e sopra il 60% in quello della trota.

Dopo 24 ore si rileva il numero degli animali sopravvissuti. Se durante la prova si osservano mortalità, gli organismi deceduti vanno rimossi dalle vasche.

### 4 - Risultato del saggio

Il campione in esame è giudicato accettabile se, al termine della prova, sopravvivono 5 o più animali. Se nella vasca di controllo si è registrato anche un solo decesso la prova va ripetuta.

## 8020 - METODI DI VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON *DAPHNIA*

### 1 - Materiali e strumentazione per il saggio

I materiali si riducono di fatto ad una serie di recipienti aventi un volume utile di 50 mL. Per la valutazione della tossicità di sostanze volatili i recipienti devono poter essere ermeticamente chiusi. Come ogni altro oggetto destinato ad entrare in contatto con l'acqua di allevamento o con i campioni da saggiare, non devono dar luogo a processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possano interferire con il saggio. A questo fine vengono utilizzati recipienti in vetro borosilicato o in plastiche fluorate.

Durante il saggio non è infrequente che alcuni animali si portino in superficie e, per ragioni di tensione superficiale o di adesione di bollicine d'aria alle strutture corporee, non possono ridiscendere nel liquido sottostante. Se l'inconveniente dovesse porsi con sistematicità, si potrà fare ricorso a reticelle in teflon di circa 1 mm di maglia mantenute sommerse a qualche mm sotto il pelo del liquido mediante un anello in teflon o altra struttura della forma interna dei recipienti usati per la prova.

Le soluzioni poste in questi recipienti devono essere mantenute a temperatura costante (20 °C) e, a tal fine, può essere utilizzato un bagno termostatico o altra soluzione idonea (camera termostatica) che consenta il mantenimento della temperatura dei liquidi in esame nell'ambito di  $20 \pm 2$  °C.

Il saggio viene eseguito in condizioni alterne di luce (16 ore) e di buio (8 ore) e, a tal fine, occorre disporre di una camera oscurabile e di un sistema di lampade fluorescenti (resa cromatica  $\geq 90$ ) che dia una illuminazione attenuata (circa 300 lux) al piano di lavoro. È opportuno che il sistema sia fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.

Oltre a questi materiali, l'esecuzione del saggio richiede la disponibilità della normale apparecchiatura di laboratorio. Richiede inoltre un misuratore di ossigeno disciolto il cui sensore abbia dimensioni tali

da permettere il rilevamento nei contenitori utilizzati per il saggio.

### 2 - Reagenti e acqua di diluizione

La preparazione delle soluzioni e la diluizione vengono effettuate con acqua che deve rispondere alle seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5; alcalinità 110-120 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  e durezza 140-160 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  e che si prepara nel seguente modo: a un litro di acqua deionizzata o distillata passata su colonna di carbone attivo vengono aggiunti, nell'ordine, 10 mg di KCl, 192 mg di  $\text{NaHCO}_3$ , 53 mg di  $\text{MgSO}_4$  e 183 mg  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Questa soluzione presenta le caratteristiche di pH, alcalinità e durezza sopra indicate e deve essere aerata per 24 ore prima del suo impiego, alla temperatura di 20 °C, con aria compressa priva di contaminanti.

### 3 - Organismi per il saggio

L'organismo utilizzato per il saggio è il crostaceo cladocero della specie *Daphnia magna* Straus, che può essere ottenuto dai laboratori di idrobiologia o di tossicologia acquatica. Per i saggi vengono utilizzati i neonati di età inferiore alle 24 ore. A questo scopo, prima dell'allestimento del saggio viene individuato nelle vasche di allevamento e isolato in acqua di diluizione, un numero adeguato di femmine adulte (4-5 mm di lunghezza corporea) prossime al parto, riconoscibili per il colore aranciato delle uova presenti nella camera di incubazione. Sono da scartare colture in riproduzione sessuata, con elevata mortalità, bassa natalità o con altri sintomi evidenti di condizioni colturali non adeguate. Queste femmine, quando rispondono ai suddetti requisiti di idoneità, potranno deporre un numero di neonati ciascuna, generalmente compreso tra 20 e 50.



**METODO A - Valutazione della EC<sub>50</sub>**

a) La soluzione del prodotto da esaminare va preparato utilizzando come solvente l'acqua standard debitamente aerata. Ai fini di una corretta conduzione del saggio è consigliabile acquisire alcune informazioni essenziali sui prodotti in esame, quali la solubilità in acqua e la tensione di vapore. Nel caso di tossici poco solubili sono da privilegiare i metodi di dispersione meccanica rispetto all'impiego di sostanze solubilizzanti. Qualora l'impiego di queste ultime si renda necessario, sono da utilizzare quelle a minore tossicità per la *Daphnia*. In ogni caso nella valutazione dei risultati va tenuto conto che questi possono essere dovuti all'azione combinata della sostanza in esame e dell'agente solubilizzante.

b) Per la valutazione della EC<sub>50</sub> di effluenti occorre disporre di un volume di almeno 1 L di campione. Se la prova viene allestita entro 6 ore, il campione non va refrigerato a 4 °C, necessità che invece si pone se la prova viene effettuata entro 48 ore dal prelievo. Si consiglia, tuttavia, l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di entità non prevedibile.

c) Il prodotto o l'effluente in esame vengono saggiati in un primo momento con una prova preliminare e successivamente con una prova definitiva. La prova preliminare si effettua operando con 5 diverse concentrazioni o diluizioni e una sola replica per ciascuna di esse. Il numero di contenitori necessari in questo caso è quindi sei, di cui uno di controllo con il solo liquido diluente. Queste concentrazioni di prodotto in esame o diluizioni di effluente, vengono scelte in progressione geometrica. Nel caso di effetti tossici del tutto ignoti, si può procedere secondo un fattore 10 e la serie delle 5 concentrazioni o diluizioni può essere indicativamente la seguente: 0,01-0,1-1-10-100 mg/L di prodotto o % (v/v) di effluente.

d) Individuato l'ambito di tossicità, viene allestita la prova definitiva, effettuata con quattro repliche e secondo una serie ad intervalli meno ampi (ad es. 0,1-0,4-0,8-1,6). Il numero di contenitori necessari in questo caso è 24, di cui 20 verranno usati per saggiare in quadruplo le 5 concentrazioni o diluizioni e 4 per la

prova di controllo con la sola acqua di diluizione. Nel caso di tossici volatili dovranno essere usati contenitori a chiusura ermetica e completamente riempiti. Il volume di questi recipienti deve essere tale che l'ossigeno disciolto, al termine della prova, non risulti inferiore a 2 mg/L.

e) In tutti i casi in cui sia possibile, è consigliato il controllo analitico delle concentrazioni del tossico in esame. Se lo scostamento tra la concentrazione misurata e quella nominale è superiore al 20%, i risultati del saggio dovranno essere basati sulla concentrazione misurata.

f) In ogni contenitore vengono trasferiti 50 mL della soluzione in esame.

g) In ciascuno dei 24 recipienti vengono quindi trasferiti 5 neonati di dafnia. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta in vetro dal diametro interno di circa 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua aspirato con le dafnie al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è opportuno che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le dafnie pipettate nei diversi recipienti fino a raggiungere il numero di 5, anziché completare un recipiente per poi passare al successivo.

h) Al trasferimento avvenuto si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare il fotoperiodo al quale gli animali sono stati allevati.

i) Durante questo periodo agli animali non viene somministrata alcuna alimentazione.

l) Al termine del saggio e, se necessario, anche con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.

*m)* Se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%, il saggio va ripetuto.

*n)* Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione dell'ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2 mg/L. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito ricambiando le soluzioni in esame durante le 24 ore della prova, oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenza o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali.

*o)* Con i dati raccolti nella prova a 24 ore può essere calcolata la  $24hEC_{50}$  (in mg/L oppure in % di diluizione) e i rispettivi limiti fiduciali. La condizione necessaria per questi calcoli è che vi siano almeno due casi di parziale immobilizzazione (diversi cioè da 0 e 100%) e prossimi, possibilmente, al 50%. Se questa condizione non è raggiunta si può fare ricorso ad altri metodi di calcolo oppure si può ripetere la prova operando in un ambito più idoneo di concentrazioni.

*p)* Il saggio può essere prolungato per la valutazione della  $EC_{50}$  a 48 ore. A tal fine si procede al rinnovo delle 24 soluzioni con soluzioni fresche (ricorrendo, nel caso di un effluente, al campione refrigerato) nelle quali vengono trasferiti gli animali che già hanno soggiornato per 24 ore nelle soluzioni a concentrazione o diluizione corrispondente.

*q)* La procedura, le cautele ed i criteri per la seconda parte della prova sono gli stessi già descritti.

*r)* Al termine della prova può essere calcolata la  $48hEC_{50}$  seguendo i criteri indicati.

#### **METODO B - Valutazione della accettabilità di un effluente**

*a)* Il campione di circa 300 mL di effluente di cui deve essere valutata l'accettabilità, va utilizzato entro le 24 ore dalla raccolta e conservato alla temperatura di 4 °C. Si consiglia l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di

entità non prevedibile. In ogni caso è opportuno che il campione venga suddiviso in due aliquote di almeno 150 mL di cui una verrà utilizzata per il saggio e l'altra potrà tornare utile per ulteriori prove.

*b)* Eventuali solidi galleggianti vanno rimossi per filtrazione su lana di vetro o su rete di teflon a maglie di circa 1 mm.

*c)* Si procede quindi alla regolazione della temperatura del campione prima del suo trasferimento nei recipienti per il saggio ( $20 \pm 2$  °C).

*d)* Per il saggio si predispongono sei recipienti di cui tre contenenti ciascuno 25 mL di effluente più 25 di acqua di diluizione e tre 50 mL di sola acqua di diluizione utilizzata come controllo.

*e)* In ciascuno dei sei recipienti vengono trasferiti 10 neonati di dafnia. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta di vetro del diametro di 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua aspirato con le dafnie al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è consigliabile che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le dafnie pipettate nei sei recipienti fino a raggiungere il numero di 10, anziché completare un recipiente per poi passare al successivo.

*f)* A trasferimento avvenuto si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare i tempi di illuminazione ai quali gli animali sono stati allevati.

*g)* Durante le 24 ore della prova gli animali non vengono alimentati.

*h)* Al termine della saggio e, se necessario, anche con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche

dopo leggera agitazione del contenitore.

i) Il saggio va ripetuto se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%.

l) Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione di ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2 mg/L. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito ricambiando il liquido in esame durante le 24 ore della prova oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenze o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali.

m) Il giudizio di accettabilità del campione in esame viene dato quando al termine delle 24 ore la somma degli organismi immobili dei tre recipienti contenenti il campione in esame, risulta inferiore o uguale al 50%; se è superiore il campione viene giudicato inaccettabile.

## APPENDICE 1

### ALLEVAMENTO DI *DAPHNIA MAGNA*

#### 1 - Strumentazione

Oltre alla normale strumentazione di laboratorio sono necessari:

- un sistema di illuminazione che consenta di ottenere 1000 lux a livello delle vasche (lampade fluorescenti con indice di resa cromatica  $\geq 90$ ) fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
- un sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito di  $20 \pm 2$  °C;
- un sistema di aerazione a bassa portata e pressione fornito di diffusori a pietra porosa del tipo da acquario;
- un misuratore di ossigeno disciolto;
- una camera di conta e microscopio o contatore

automatico di particelle;

- vasche in tutto vetro con una capacità di circa 5 L.

Tutti gli accessori destinati ad entrare in contatto con l'acqua di allevamento non devono rilasciare sostanze tossiche. Vetro borosilicato e plastiche fluorurate sono da preferire in tutti i casi in cui sia possibile.

#### 2 - Acqua

Per l'allevamento della daphnia le acque di rete non clorate, di falda o di un corpo idrico superficiale sono tutte potenzialmente utilizzabili purché non contaminate. Sono da preferire quelle che presentano una sufficiente stabilità delle caratteristiche chimico fisiche.

Qualunque sia l'acqua prescelta, l'aerazione per 24 ore ed un trattamento con carbone attivo, preceduti nel caso di acque superficiali da filtrazione su membrane di 0,22  $\mu\text{m}$ , assicurano un netto miglioramento della qualità. Se necessario, l'acqua trattata va corretta in alcuni dei suoi costituenti maggiori per ottenere approssimativamente una durezza di 150 mg  $\text{CaCO}_3$ /L, un rapporto  $\text{Ca/Mg}=4$  e  $\text{Na/K}=10$ . La diluizione viene effettuata con acqua deionizzata o distillata, filtrata su carbone attivo, o con acqua Milli Q, mentre gli aumenti di concentrazione si ottengono per aggiunta di sali di grado analitico (es.  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KCl}$ , ecc.).

L'acqua così preparata va saggiata per verificare l'idoneità all'allevamento di *Daphnia magna*. A questo scopo si utilizza un gruppo di almeno dieci organismi, di età inferiore alle 24 ore, mantenuti in 500 mL di acqua ed alle condizioni previste per l'allevamento. Ogni 48 ore si provvede al trasferimento in altri 500 mL di mezzo fresco, all'aggiunta di cibo nelle quantità indicate ed alla conta, previa rimozione, dei dafnidi prodotti.

La prova ha una durata di circa 14 giorni, corrispondenti a tre schiuse. Le condizioni di idoneità dell'acqua di allevamento si hanno se:

- la prima schiusa avviene entro il nono giorno;
- il numero medio complessivo di neonati per femmina dopo tre schiuse è superiore a 20 e preferibilmente prossimo a 60;

- se la mortalità non supera il 20%.

Il prolungamento della prova oltre la terza schiusa è comunque consigliabile offrendo maggiori garanzie di idoneità.

### 3 - Termoregolazione

La temperatura per il mantenimento di *Daphnia magna* è di  $20 \pm 2$  °C.

### 4 - Illuminazione

Le vasche di allevamento vengono illuminate, con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

### 5 - Ossigenazione

Nelle vasche di allevamento viene mantenuta una concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 6 mg/L insufflando aria mediante dei diffusori. Quest'aria può contenere contaminanti che vanno rimossi per passaggio su cartuccia di carbone attivo o altro materiale adsorbente.

### 6 - Alimentazione e mantenimento

La dieta per il mantenimento in coltura di *Daphnia magna* è costituita da due organismi unicellulari, l'alga verde *Selenastrum capricornutum* e il lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Sia la sospensione algale che quella di lievito vengono somministrate quotidianamente in quantità tali da assicurare una densità nelle vasche di allevamento di circa 300.000 cellule/mL per ciascuno dei due organismi. La somministrazione può avere luogo a giorni alterni e, in questo caso, i volumi delle sospensioni cellulari vanno raddoppiati. Il permanere della torbidità del mezzo acquoso può costituire un indice visivo in base al quale rinviare la somministrazione del cibo.

Il rinnovo parziale o bisettimanale dell'acqua delle vasche come pure il controllo della densità ad un massimo di circa 100 individui/L costituiscono condizioni necessarie per una corretta conduzione dell'allevamento. A questo fine occorre inoltre effettuare il trasferimento periodico (15-20 giorni) di alcuni organismi, in attiva riproduzione partenogenetica, ad una

vasca contenente cibo e mezzo freschi.

È consigliabile mantenere contemporaneamente almeno due vasche, evitando in tal modo che un qualsiasi inconveniente comporti la perdita dell'organismo. L'allestimento di queste vasche è utile che sia sfalsato di alcuni giorni al fine di disporre in modo pressoché continuo dei dafnidi necessari alla sperimentazione.

### 7 - Coltura algale

La cloroficea *Selenastrum capricornutum* viene allevata in un mezzo di coltura allestito con le seguenti modalità. Si preparano quattro soluzioni in acqua bidistillata o Milli Q filtrata su membrana da  $0,22 \mu\text{m}$  dei sali di seguito elencati:

1 -	NaNO <sub>3</sub>	25,500 g/L
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12,164 g/L
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4,410 g/L
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185,520 mg/L
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	415,380 mg/L
	ZnCl <sub>2</sub>	3,270 mg/L
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,428 mg/L
	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,012 mg/L
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7,260 mg/L
	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	160,000 mg/L
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	300,000 mg/L
2 -	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14,700 g/L
3 -	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,044 g/L
4 -	NaHCO <sub>3</sub>	15,000 g/L

Il mezzo di coltura è ottenuto diluendo 2 mL di ciascuna soluzione al volume finale di 1 litro, con acqua bidistillata o Milli Q filtrata su  $0,22 \mu\text{m}$ . Il mezzo viene inoculato in modo da ottenere una densità iniziale di circa 200.000 cellule/mL. Le alghe vengono incubate a  $20 \pm 2$  °C e con una illuminazione di circa 4000 lux fornita da lampade fluorescenti cool-white con fotoperiodo di 16 ore di luce.

La sospensione algale è mantenuta in agitazione continua insufflando aria filtrata e, dopo 5-6 giorni di incubazione, raggiunge di norma una densità prossima ai 9-10 milioni di cellule/mL. La biomassa algale viene separata dai residui del mezzo di coltura mediante centrifugazione (400 RCF per 5-10 min.). Il soprannatante viene scartato e le alghe ridisperse in acqua di allevamento con durezza ridotta a 30-50 mg CaCO<sub>3</sub>/

L. Si fa seguire una seconda centrifugazione e quindi si procede alla raccolta delle alghe.

Le cellule, risospese nello stesso tipo di acqua usata per i lavaggi in modo da ottenere una densità d'impiego che è di circa 100 milioni di cellule/mL, sono conservabili al buio ed alla temperatura di 4 °C. In tali condizioni le cellule algali si mantengono vitali per oltre 30 giorni e potranno essere utilizzate per inoculare la coltura successiva.

## 8 - Sospensione di lievito

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, reperibile in confezioni commercializzate per la panificazione, viene disperso in acqua di durezza 30-50 mg CaCO<sub>3</sub>/L ottenuta per miscelazione dell'acqua di allevamento con bidistillata o Milli Q. La densità di impiego è di circa 100 milioni di cellule/mL. Anche la sospensione di lievito è conservabile al buio ed alla temperatura di 4 °C.

## 9 - Idoneità degli organismi

È opportuno verificare periodicamente le condizioni generali di allevamento. A questo fine si può ricorrere all'esame visivo del contenuto lipidico degli organismi, indice lipidico, come pure ad una sostanza tossica di riferimento. Per quest'ultima si propone il bicromato di potassio di cui si determina la 24hEC<sub>50</sub> nelle condizioni sperimentali indicate dal metodo.

## APPENDICE 2 CALCOLO DELLA EC<sub>50</sub>

Vengono proposti tre metodi per il calcolo della EC<sub>50</sub> e dei relativi limiti fiduciali. La corretta applicazione del primo metodo richiede che i risultati del saggio comprendano almeno due effetti parziali, diversi cioè da immobilizzazione 0 e 100%, quantunque esso possa fornire una stima della EC<sub>50</sub> e dei limiti di confidenza anche con un solo risultato parziale. Il secondo metodo viene utilizzato in assenza di effetti intermedi fra 0 e 100% e quando non siano necessarie particolari informazioni sulla relazione concentrazione/effetto del tossico in esame. È proposto infine un terzo metodo di calcolo, disponibile come programma

per personal computer, la cui applicabilità necessita di almeno due risultati parziali.

### 1. Litchfield e Wilcoxon (metodo semplificato)

#### RETTE CONCENTRAZIONE/EFFETTO

Si tabulano le concentrazioni e le percentuali (v/v) di effluente saggiate e le corrispondenti percentuali cumulative di organismi immobilizzati (=100 x n/20). Non si considerano più di due concentrazioni consecutive che hanno causato la completa immobilizzazione (100%) e parimenti non più di due che hanno determinato effetto nullo (0%).

Escludendo gli effetti 0 e 100%, si rappresentano su carta logaritmo-probabilistica le percentuali di organismi immobilizzati in funzione delle concentrazioni corrispondenti. Queste ultime sono riportate sulla scala logaritmica e gli effetti sulla scala delle ordinate. Si traccia la retta che approssima i punti ottenuti, privilegiando quelli compresi fra il 40 e il 60% di effetto. Utilizzando la retta si leggono e si tabulano gli effetti attesi per ciascuna delle concentrazioni saggiate, scartando quelle il cui effetto atteso risulti inferiore a 0,01 o superiore a 99,99. Il grafico viene completato rappresentando anche le concentrazioni che hanno prodotto effetto 0 e 100%. A questo scopo si legge sulla retta tracciata l'effetto atteso per tali concentrazioni e si riporta in grafico il corrispondente valore corretto secondo le indicazioni della Tab. 1.

Se la retta ottenuta risultasse insoddisfacente si traccia una nuova retta e si ripetono i passaggi descritti.

#### TEST DEL CHI<sup>2</sup>

Si calcolano e si tabulano le differenze tra i valori osservati (o corretti) ed i valori attesi. Mediante il nomogramma di Fig. 1, per ciascuna differenza viene determinato e tabulato il corrispondente contributo al Chi<sup>2</sup>. Si sommano poi i singoli contributi e si moltiplica il totale per il numero medio di animali saggiati per concentrazione, calcolando a questo scopo, il rapporto fra il numero complessivo di organismi usati per le sole concentrazioni riportate in grafico e il numero delle medesime (=K).

Il dato così ottenuto rappresenta il valore del

Tab. 1 - Valori corretti per effetto 0 e 100%. Es.: Ad un valore atteso di 98,6% corrispondente un valore corretto di 99,5%.

Atteso	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0.3	0.7	1.0	1.3	1.6	2.0	2.3	2.6	2.9
10	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	4.9	5.2	5.5	5.7
20	6.0	6.2	6.5	6.7	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.1
30	8.3	8.4	8.6	8.8	9.0	9.2	9.3	9.4	9.6	9.8
40	9.9	10.0	10.1	10.2	10.3	10.3	10.4	10.4	10.4	10.5
50	-	89.5	89.6	89.6	89.6	89.7	89.7	89.8	89.9	90.0
60	90.1	90.2	90.4	90.5	90.7	90.8	91.0	91.2	91.4	91.6
70	91.7	91.9	92.2	92.4	92.6	92.8	93.0	93.3	93.5	93.8
80	94.0	94.3	94.5	94.8	95.1	95.3	95.6	95.9	96.2	96.5
90	96.8	97.1	97.4	97.7	98.0	98.4	98.7	99.0	99.3	99.7

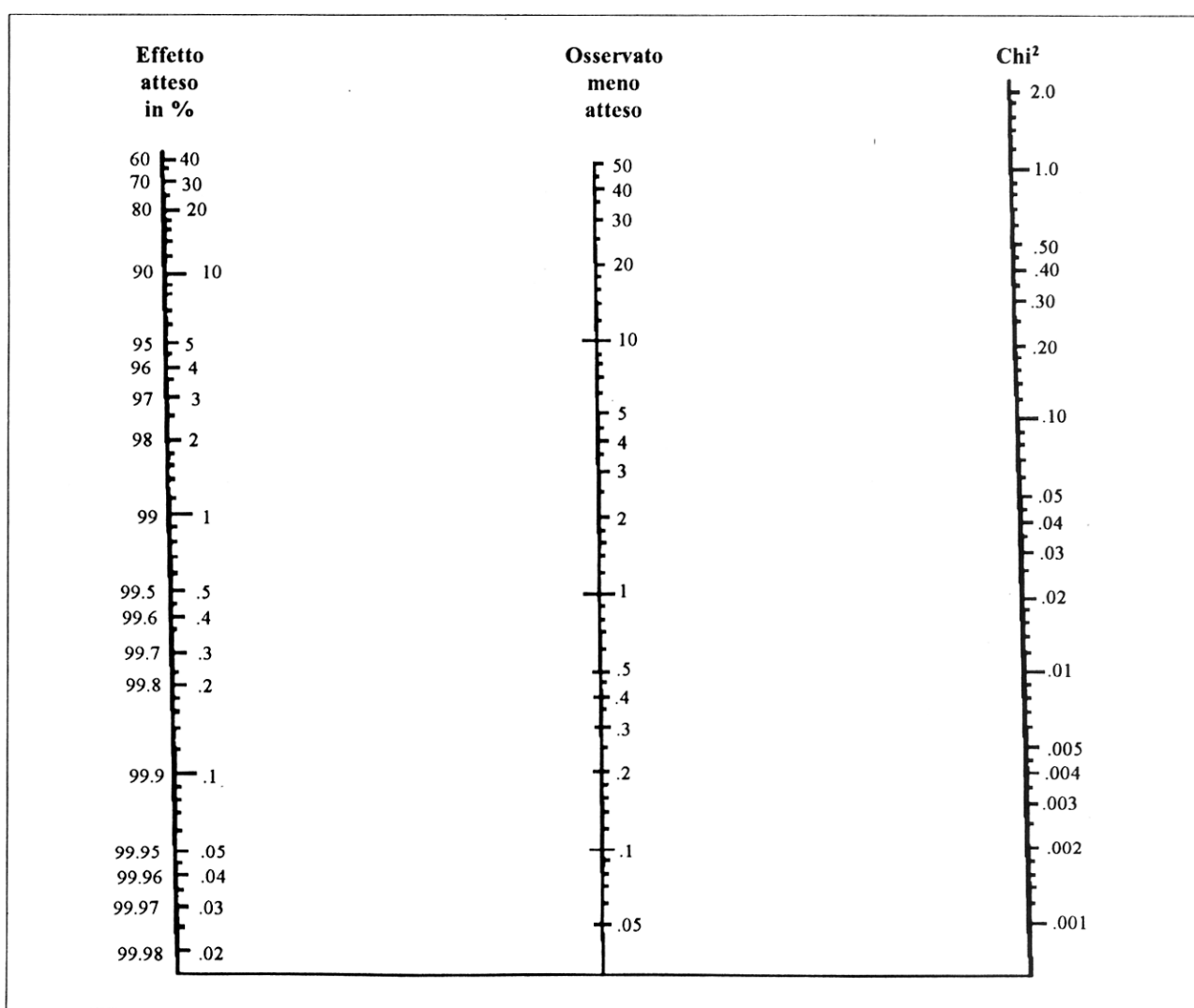


Fig. 1 - Nomogramma dei contributi al  $\chi^2$ . La retta che congiunge il valore ottenuto dalla differenza tra l'effetto osservato e quello atteso con il corrispondente effetto atteso indica, nel punto di intersezione con la scala del  $\chi^2$ , il contributo cercato.

Chi<sup>2</sup> della retta in esame. Il numero dei gradi di libertà è dato dal numero di concentrazioni rappresentate in grafico diminuito di due unità (G.L.=K-2). Se il Chi<sup>2</sup> della retta è inferiore al valore riportato in Tab. 2 per n gradi di libertà, significa che la retta tracciata approssima in modo soddisfacente i risultati sperimentali. In caso contrario si traccia una nuova retta che possa approssimare meglio i dati ottenuti e si ripete l'esame descritto.

Tab. 2 - Valori di Chi<sup>2</sup> (P=0,05)

Gradi di libertà (G.L.)	Chi <sup>2</sup>
1	3.84
2	5.99
3	7.82
4	9.49
5	11.1
6	12.6
7	14.1
8	15.5
9	16.9
10	18.8

#### EC<sub>50</sub> E LIMITI FIDUCIALI

Il valore di EC<sub>50</sub> (24 o 48h) è letto sulla scala logaritmica del grafico della retta, in corrispondenza all'effetto del 50%.

Mediante il grafico della retta si individuano le concentrazioni ad effetto 16 e 84% (EC<sub>16</sub>; EC<sub>84</sub>) e si calcola il valore della funzione S secondo la seguente espressione:

$$S = \frac{\left[ \left( \frac{EC_{84}}{EC_{50}} \right) + \left( \frac{EC_{50}}{EC_{16}} \right) \right]}{2}$$

Si determina il valore di N che rappresenta il numero complessivo di organismi saggiati alle concentrazioni il cui effetto atteso è compreso fra 16 e 84% e si procede al calcolo del fattore "f" mediante la seguente espressione:

$$f_{EC50} = S \left( \frac{2.77}{\sqrt{N}} \right)$$

dove S e N hanno il significato già illustrato. I limiti fiduciali della EC<sub>50</sub> al 95% di probabilità si ottengono come segue:

$$\begin{aligned} \text{limite superiore} &= EC_{50} \cdot f_{EC50} \\ \text{limite inferiore} &= EC_{50} / f_{EC50} \end{aligned}$$

## 2- Media geometrica

### CALCOLO DELLA EC<sub>50</sub>

In assenza di risultati parziali la EC<sub>50</sub> può essere calcolata come segue:

$$EC_{50} = \sqrt{A \cdot B}$$

dove A è la massima concentrazione che non ha causato immobilizzazione (effetto 0%) e B è la minima che ha determinato la completa immobilizzazione degli organismi saggiati (effetto 100%).

### LIMITI FIDUCIALI

Le due concentrazioni A e B rappresentano i limiti fiduciali della EC<sub>50</sub> con un livello di probabilità che dipende dal numero medio di organismi utilizzato per concentrazione (N). Il livello di probabilità associato ad A e B è calcolato con la seguente espressione:

$$P = 100 \cdot \left[ 1 - 2 \left( \frac{1}{2} \right)^N \right]$$

Con 20 organismi per concentrazione, come previsto dalla presente metodologia di saggio, il livello di probabilità associato ai limiti fiduciali A e B è superiore al 99,99%.

## 3 - Analisi dei probits

Questo terzo metodo è proposto come programma per personal computer con sistema operativo DOS versione 3.0 o successiva (Puddu, 1989).

Partendo dai risultati sperimentali, che devono comprendere due effetti intermedi tra 0 e 100%, il programma fornisce la EC<sub>50</sub> e la EC<sub>1</sub> con i relativi limiti fiduciali più una serie di informazioni sulla retta di regressione probit e sull'analisi statistica effettuata.

**BIBLIOGRAFIA**

- A.P.H.A., AWWA e WEF (1992): "Toxicity test procedure for *Daphnia* (tentative)". In: *Standard methods for the examination of water and wastewater*, XVIII Edition, Part 804 B, 739-742, (APHA, Washington).
- ASTM (1984): "Standard practice for conducting static acute toxicity test on wastewaters with *Daphnia*". American Society for Testing and Materials, E 4229-84.
- ISO (1982): "Water quality - Determination of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)". International Organisation of Standardisation, ISO 6341.
- MARCHETTI R. e VIGANÒ L. (1991): "Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna*". In saggio di tossicità con *Daphnia*. *Quad. Ist. Ric. Acque*, **93**, 2.1-2.23.
- OECD (1984): "*Daphnia sp.*, acute immobilisation test and reproduction test". Guideline n. 202. In: *OECD Guidelines for testing of chemicals*, Effects on biotic systems, ISBN 92-64-12221-4.
- PUDDU A. (1989): "Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei Probits". *Notiz. Metodi Anal. Acque IRSA*, **9** (2), 19-37.
- VIGANÒ L. (1991): "Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 775-772.
- VIGANÒ L. (1993): "Reproductive strategy of *Daphnia magna* and toxicity of organic compounds". *Wat. Res.* **27**, 903-909.

### **NOTA DELLA REDAZIONE DI BIOLOGIA AMBIENTALE**

*Si suggerisce di considerare la presente stesura del capitolo 8020 alla luce di quanto espresso nell'introduzione dell'articolo di Marchetti e Viganò «Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna*» pubblicato sul Quaderno dell'Istituto di Ricerca sulle Acque n. 93/1991 dal titolo **Saggio di Tossicità con *Daphnia***. Si consiglia pertanto di valutare l'accettabilità degli effluenti adottando sia le condizioni operative derivate dalla vigente normativa (campione diluito 1:1, motilità almeno 50%), sia quelle che assicurano al parametro "saggio di tossicità" un maggior livello di protezione (campione tal quale, motilità almeno 90%).*

*Ciò consentirà di creare un archivio di dati sul quale confrontarsi in sede di riformulazione legislativa del parametro "Saggio di tossicità".*