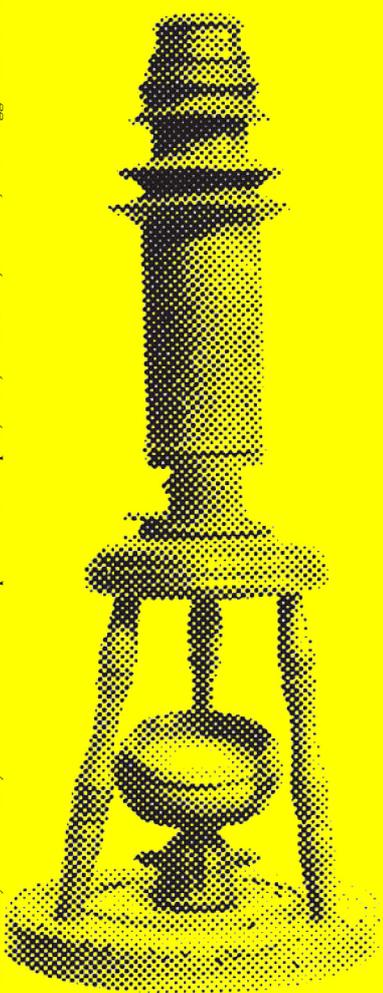


# biologia 4-5 ambientale

luglio  
ottobre  
1998

BOLLETTINO C.I.S.B.A.

Bimestrale, anno XII, n. 4-5/1998. Spediz. in abbon. post. art. 2, comma 20/c, L. 662/96, filiale Reggio Emilia. Tassa pagata - Taxe perçue



## SOMMARIO

EDITORIALE	1
METODI ANALITICI IRSA-CNR	3
Metodo per test di tossicità cronica (7 giorni) con <i>Mysidopsis bahia</i> a cura di L. Viganò	4
Metodo per test di tossicità cronica (7 giorni) con <i>Ceriodaphnia dubia</i> a cura di L. Viganò	12
Metodo per test di tossicità cronica (7 giorni) con <i>Cyprinodon variegatus</i> a cura di L. Viganò	18
Metodo per test di tossicità prolungato (14-28 giorni) con trota iridea ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) a cura di L. Viganò	25
Analisi statistica dei risultati di saggi cronici a cura di L. Viganò	33
L'UNIONE EUROPEA E L'AMBIENTE	35
Premessa	35
Nuovi valori limite per la qualità dell'aria	36
Strategia per combattere l'acidificazione a livello di Unione Europea	40
La dimensione energetica del cambiamento climatico	44
Per saperne di più sull'ambiente e sullo sviluppo economico in Europa	45
APPUNTAMENTI	47



# biologia ambientale

**Bollettino C.I.S.B.A. n. 4-5/1998**

**Autorizzazione del Tribunale di  
Reggio Emilia n. 837 del 14 maggio 1993**

proprietario

**Paola Manzini**

(Presidente del Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale)

direttore responsabile

**Rossella Azzoni**

## REDAZIONE

**Rossella Azzoni**

responsabile di redazione

**Giuseppe Sansoni**

responsabile grafico

**Roberto Spaggiari**

responsabile di segreteria

*Numero chiuso in redazione il 12/9/1998*

Il **C.I.S.B.A.** - Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale  
si propone di:

- divenire un punto di riferimento nazionale per la formazione e l'informazione sui temi di biologia ambientale, fornendo agli operatori pubblici uno strumento di documentazione, di aggiornamento e di collegamento con interlocutori qualificati
- favorire il collegamento fra il mondo della ricerca e quello applicativo, promuovendo i rapporti tecnico-scientifici con i Ministeri, il CNR, l'Università ed altri organismi pubblici e privati interessati allo studio ed alla gestione dell'ambiente
- orientare le linee di ricerca degli Istituti Scientifici del Paese e la didattica universitaria, facendo della biologia ambientale un tema di interesse nazionale
- favorire il recepimento dei principi e dei metodi della sorveglianza ecologica nelle normative regionali e nazionale concernenti la tutela ambientale.

Per iscriversi al **C.I.S.B.A.** o per informazioni scrivere al:

*Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale,  
via Amendola 2, 42100 Reggio Emilia  
o contattare il Segretario: Roberto Spaggiari  
tel. 0522/295460 - 0338/6252618; fax 0522/330546  
e-mail: rspaggiari@mail.arpa.emr.it*

Quote annuali di iscrizione al Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale: socio ordinario: £ 70.000; socio collaboratore £ 50.000; socio sostenitore £ 600.000.

conto corrente postale n. 10833424 intestato a: CISBA, RE

I soci ricevono il bollettino **Biologia Ambientale** e vengono tempestivamente informati sui corsi di formazione e sulle altre iniziative del **C.I.S.B.A.**

Per gli articoli originali, il testo va inviato alla Redazione, c/o: *Rossella Azzoni Gastaldi, via Cola di Rienzo, 26 - 20144 Milano* mentre i file vanno inviati a Giuseppe Sansoni per via postale o tramite e-mail: *sansonig@mail.dex-net.com*

I dattiloscritti, compreso il materiale illustrativo, saranno sottoposti a revisori per l'approvazione e non verranno restituiti, salvo specifica richiesta dell'Autore all'atto dell'invio del materiale.

Le opinioni espresse dagli Autori negli articoli firmati non rispecchiano necessariamente le posizioni del **C.I.S.B.A.**

---

---

## EDITORIALE

---

---



*L'*attività dell'uomo nei campi, che dura da millenni, ha modellato il nostro territorio e il paesaggio che ci circonda.

*Ai nostri giorni, la fruizione del tempo libero nelle aree rurali è in fase di crescita e ciò è un fatto molto positivo.*

*L'agricoltura, però, non può e non deve essere considerata una sorta di "giardiniere", stipendiato dalla collettività, per governare il paesaggio campestre ed il verde affinché i cittadini possano goderne nelle loro passeggiate domenicali.*

*L'agricoltura deve rimanere l'elemento economico essenziale delle aree rurali: l'opposto rischierebbe di dar vita ad un sistema che basa la propria sopravvivenza su rimesse esterne.*

*Nei Paesi industrializzati si parla ormai da alcuni anni di una nuova cultura agricola: l'agricoltore deve saper offrire al consumatore prodotti di qualità nel quadro di una comune sensibilità per i problemi ambientali e della salute, e servizi di fruizione dell'ambiente compatibili con la salvaguardia dell'ambiente stesso.*

*Il turismo rurale è così definito esclusivamente per il fatto di realizzarsi al di fuori delle aree urbane.*

*Attraverso l'agriturismo gli agricoltori hanno potuto valorizzare concretamente paesaggi integri ed edifici antichi correttamente restaurati: il successo dell'ospitalità in fattoria si è così concentrato in zone, quali*

*alcune regioni dell'Italia centrale, dove più rigorosa e "colta" è stata nel tempo la disciplina dell'edificazione rurale ed il recupero del patrimonio edilizio esistente.*

*Considerato che il gradimento delle vacanze è sempre più correlato con la qualità della natura e dei paesaggi, l'accoglienza agrituristica diviene particolarmente qualificata dalle caratteristiche della dimora in cui si è ospitati e dallo stretto contatto con l'ambiente naturale e agricolo.*

*Poiché il mondo rurale contiene valori estetici, biologici e culturali di antica origine, non meno preziosi dei centri storici o del patrimonio artistico e monumentale, per difendere questo patrimonio occorrerà dire:*

- *sì al recupero degli edifici esistenti;*
- *sì all'affermazione delle tipicità locali in campo gastronomico, artigianale e culturale;*
- *no allo sconvolgimento dei paesaggi storicamente affermati;*
- *sì ad un'oculata salvaguardia ambientale e paesaggistica.*

*Si può constatare, soprattutto in alcune regioni come Toscana ed Umbria, che la diffusione dell'agriturismo ha determinato una generale rivalutazione degli immobili, giustificando economicamente il restauro di un sempre maggior numero di strutture fatiscenti e addirittura influenzando sulle stesse quotazioni dei terreni.*

*Si è inoltre determinata l'accelerazione del ricambio dell'imprenditoria agricola, dipendente dall'ulteriore appetibilità dell'investimento fondiario quando connesso con la possibilità di realizzare anche attività ricettive.*

*Ormai è in movimento un fenomeno complesso che investe non solo il territorio agricolo ma anche i centri minori; non solo il turismo, ma anche altre opportunità.*

*I prodotti tipici rappresentano un'altra preziosa occasione perché le imprese agricole conquistino nuovo valore aggiunto, abbandonando produzioni eccedenti senza futuro di mercato e stimolando una migliore cultura dell'alimentazione.*

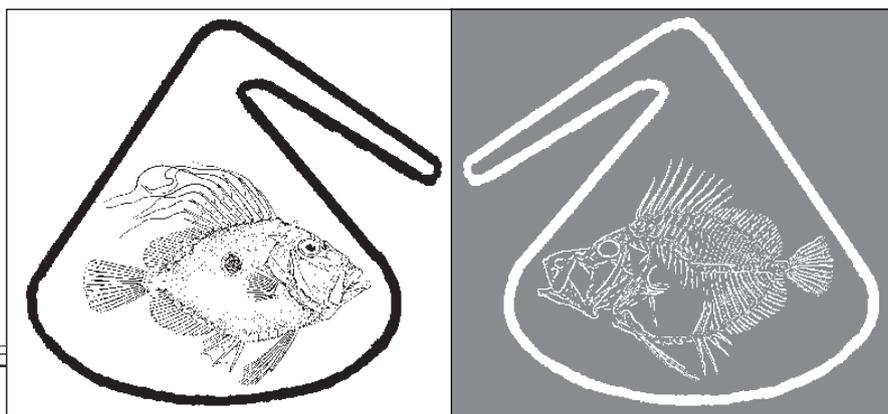
*La proposta di creare un marchio ufficiale "prodotto di fattoria" costituirà una delle condizioni prioritarie per rilanciare l'artigianato alimentare.*

*C'è una crescente richiesta di luoghi interessanti e belli da vedere, ove soggiornare in un ambiente incontaminato ed ove poter gustare tradizioni, cultura, arte e -perché no- gastronomia.*

*Occorre perciò insistere su quella che è la funzione principale dell'agricoltura: la fornitura di prodotti alimentari.*

*Non è più possibile tentare di vendere ciò che comunque si produce, ma è indispensabile produrre -bene e a costi contenuti- ciò che il mercato richiede.*

## SAGGI DI TOSSICITÀ CRONICA



Metodi riprodotti dal Notiziario dei Metodi Analitici dell'Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA-CNR), suppl. a Quaderni, n. 100

### EDITORIALE

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

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

*Si tratta di saggi mediamente più impegnativi dei rispettivi saggi acuti ma che, a differenza di questi, possono fornire risultati*

*con un contenuto informativo assolutamente superiore e quindi di grande valore per chi aspiri ad una effettiva tutela della vita acquatica. Gran parte della letteratura più recente e gli attuali dibattiti in sede normativa confermano l'importanza di questi temi ed anzi, in tale prospettiva, possiamo anticipare che altri metodi biologici sono in corso di stesura e saranno presto divulgati da queste pagine.*

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

*Prof. Roberto Passino  
Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque*

*Roma, maggio 1998*

# METODO PER TEST DI TOSSICITÀ CRONICA (7 GIORNI) CON *Mysidopsis bahia*\*

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

## RIASSUNTO

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

## SUMMARY

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

## 1 - INTRODUZIONE

È descritta la procedura standard per condurre un saggio atto a stimare la tossicità cronica, più esattamente

sub-cronica, di effluenti di scarico o di acque naturali sul crostaceo marino *Mysidopsis bahia*.

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

## 2 - GENERALITÀ SUL METODO

Giovani esemplari di 7 giorni di età del crostaceo marino *Mysidopsis bahia* sono esposti ad uno scarico acquoso o all'acqua di mare di un'area indagata, con lo scopo di evidenziare se sono presenti sostanze tossiche a concentrazioni tali da causare effetti di tipo cronico. La procedura di saggio per un effluente richiede che un minimo di cinque gruppi di giovani organismi sia esposto ad altrettante concentrazioni del campione da saggiare, per un arco di tempo di 7 giorni. Al termine della sperimentazione vengono esaminati la sopravvivenza, l'accrescimento e la fecondità dei cinque gruppi sperimentali, si esaminano cioè quei parametri la cui riduzione è comunemente la manifestazione dell'effetto cronico di singole sostanze tossiche o di loro miscele. Il successivo confronto con i risultati di un gruppo di esemplari di controllo rende possibile individuare quella diluizione del campione che non inibisce significativamente (NOEC) l'accrescimento, la fertilità o la sopravvivenza dell'organismo. I dati relativi ad eventuali decessi possono anche essere elaborati per calcolare la diluizione del campione che è letale per una determinata percentuale di organismi (es. LC<sub>50</sub>) e per tempi crescenti di esposizione, fino al limite dei 7 giorni della sperimentazione.

Una procedura analoga, che prevede cioè di saggiare diverse concentrazioni di campione, può essere adottata anche per lo studio della tossicità cronica delle acque dell'area recettrice. È, tuttavia, infrequente che i contaminanti raggiungano nelle sue acque delle concentrazioni

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

così elevate da giustificare la diluizione del campione nel saggio di tossicità. Ne consegue che spesso si procede a saggiare l'acqua del recettore "tal quale" (non diluita), limitandosi a verificare se le eventuali risposte degli organismi così trattati si discostano significativamente da quelle del gruppo di organismi di controllo.

### 3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

#### 3.1 - MATERIALI E STRUMENTAZIONE

La conduzione del saggio di tossicità richiede:

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

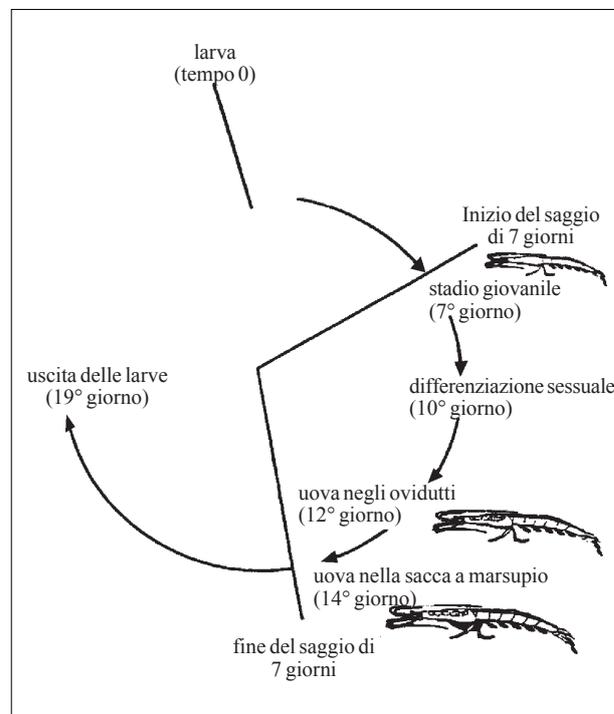
#### 3.2- ORGANISMI PER IL SAGGIO

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

I giovani individui di *M. bahia* sono ottenuti da femmine adulte secondo la procedura descritta nella Ap-

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

Sia nel periodo di mantenimento che durante l'ese-



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

cuzione del saggio la temperatura è un fattore molto importante poiché, regolando la velocità di sviluppo degli organismi, fa sì che i tempi previsti per l'allestimento, la conduzione del saggio e le osservazioni di effetto sulla fertilità si dimostrino sperimentalmente corretti. A tale scopo la temperatura deve essere mantenuta a 26-27 °C.

### 3.3 - ACQUA DI DILUIZIONE

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

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

Per la preparazione dell'acqua di mare sintetica si suggerisce l'uso di miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quale ad esempio Forty Fathoms® dimostrata adeguata allo scopo, o anche altre purché soddisfino i criteri di validità del saggio (cfr § 6) o siano utilizzabili con successo per l'allevamento del crostaceo (vedi Appendice al "Metodo per test di tossicità acuta con *M. bahia*"). Anche un'acqua di mare ipersalina (vedi poi) può essere utilizzata per allestire un test di tipo standard purché sia stata ottenuta da un'area pelagica non contaminata e abbia dimostrato una variabilità trascurabile delle caratteristiche chimico fisiche. Si tenga presente che adottando quest'ultima soluzione l'effluente è saggiabile ad una concentrazione massima di circa il 65%, a meno di adottare ulteriori accorgimenti (vedi poi).

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

Se l'area recettrice è contaminata o sospettata di esserlo, si può ricorrere ad acque naturali o semisintetiche aventi

caratteristiche fisiche e chimiche il più possibile simili a quelle dell'acqua recettrice.

c) Se, infine, l'obiettivo del saggio è di esaminare le interazioni tra i contaminanti dello scarico e quelli già presenti nell'acqua recettrice, quest'ultima sarà utilizzata come acqua di diluizione, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, purché prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. In questo tipo di saggio si avranno maggiori garanzie di corretta interpretazione dei risultati se si allestiscono due, ma preferibilmente tre gruppi di controllo. Nel primo i giovani individui di *M. bahia* sono esposti a quella stessa acqua dell'area di recezione che è utilizzata per diluire il campione di scarico; nel secondo gli organismi vengono esposti all'acqua non contaminata della zona recettrice, e nel terzo, infine, si utilizza il mezzo comunemente usato per l'allevamento di laboratorio. In questo modo dovrebbe essere possibile discriminare tra i possibili effetti nutrizionali e tossici che possono concorrere al risultato finale.

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

Il principale vantaggio della prima soluzione è che l'acqua ipersalina può essere ottenuta, per evaporazione, da acqua di mare naturale di elevata qualità. Come tale essa contiene tutti i micronutrienti e colloidali biogenici richiesti per l'accrescimento e l'attività riproduttiva degli organismi marini, e può essere conservata, al buio e a temperatura ambiente, per periodi prolungati senza apparente degradazione. Il limite della prima soluzione risiede nel fatto che un effluente può essere saggiato ad una concentrazione massima non superiore al 80 % se la salinità prescelta è del 20 ‰, od anche del 70 % se la salinità voluta è del 30 ‰ (Tab. 1). La seconda soluzione non presenta questo limite ma l'aggiunta di sali può, dal canto suo, modificare il pH dell'effluente o dell'eventuale acqua che richiede aggiustamenti, potendo alterare in tal modo anche la tossicità del campione. In generale, si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo 7,5-8,5 sono da considerare come potenziale causa di danno per gli organismi. Se necessario il pH può essere riportato al valore desiderato con aggiunte di HCl o

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

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

NaOH. Dopo l'aggiunta dei sali la soluzione viene mantenuta in agitazione moderata per circa 60 minuti con l'aiuto di un agitatore magnetico, e ciò per garantire che tutti i sali siano entrati in soluzione prima di introdurre gli organismi. È consigliabile includere nella serie dei trattamenti anche un controllo con acqua preparata in modo analogo per aggiunta di sali, al fine di verificare che tale procedura non causi effetti negativi.

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

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

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

### 3.4 - ILLUMINAZIONE

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

### 3.5 - TEMPERATURA

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

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

### 3.6 - ALIMENTAZIONE

I giovani di *M. bahia* sono alimentati con naupli di *A. salina* schiusi preferibilmente da alcune ore e comunque da non più di 24 h. I naupli sono somministrati sia durante il periodo di accrescimento che precede il saggio (cfr § 3.2) che durante il saggio stesso. Nel corso della prova l'alimentazione è quotidiana e può essere quantificata in 150 naupli per ogni misidaceo. Se la somministrazione dell'intera quantità di cibo causasse un deficit significativo della concentrazione di O<sub>2</sub> disciolto, essa può essere ripartita in due tempi (75 naupli/misidaceo) adeguatamente distanziati nell'arco della giornata. La procedura per ottenere la dieta a base di *A. salina* è descritta in Appendice al "Metodo per test di tossicità acuta con *M. bahia*".

### 3.7 - OSSIGENO DISCIOLTO

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

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

### 4.1 - SAGGIO PRELIMINARE

Nel caso di campioni a tossicità sconosciuta o sospettati di essere particolarmente tossici, può essere vantaggioso effettuare una prova preliminare per meglio definire l'intervallo di tossicità entro cui condurre, successivamente, il saggio definitivo. Tuttavia, fatta eccezione per quegli scarichi la cui tossicità è imputabile a sostanze di confermata persistenza, è di solito molto importante allestire il saggio cronico nel più breve tempo possibile dal prelievo del campione. Pertanto un saggio preliminare a breve termine (24 h) può generalmente rappresentare il solo utile compromesso tra il rispetto dei limiti di conservabilità e la disponibilità di indicazioni sul grado di tossicità del campione stesso. Un saggio prelimi-

nare di questo tipo è allestito seguendo la procedura descritta per il "Metodo per test di tossicità acuta con *M. bahia*" al quale si rinvia (VIGANÒ, 1996). Al contrario, se si sospetta che la tossicità dello scarico non sia affatto persistente, si rende necessario l'allestimento immediato del saggio cronico, seguendo le indicazioni fornite nel seguito (cfr. § 4.2).

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

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

Temperatura	Salinità (‰)									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	43
0	14.2	13.8	13.4	12.9	12.5	12.1	11.7	11.2	10.8	10.6
1	13.8	13.4	13.0	12.6	12.2	11.8	11.4	11.0	10.6	10.3
2	13.4	13.0	12.6	12.2	11.9	11.5	11.1	10.7	10.3	10.0
3	13.1	12.7	12.3	11.9	11.6	11.2	10.8	10.4	10.0	9.8
4	12.7	12.3	12.0	11.6	11.3	10.9	10.5	10.1	9.8	9.5
5	12.4	12.0	11.7	11.3	11.0	10.6	10.2	9.8	9.5	9.3
6	12.1	11.7	11.4	11.0	10.7	10.3	10.0	9.6	9.3	9.1
8	11.5	11.2	10.8	10.5	10.2	9.8	9.5	9.2	8.9	8.7
10	10.9	10.7	10.3	10.0	9.7	9.4	9.1	8.8	8.5	8.3
12	10.5	10.2	9.9	9.6	9.3	9.0	8.7	8.4	8.1	7.9
14	10.0	9.7	9.5	9.2	8.9	8.6	8.3	8.1	7.8	7.6
16	9.6	9.3	9.1	8.8	8.5	8.3	8.0	7.7	7.5	7.3
18	9.2	9.0	8.7	8.5	8.2	8.0	7.7	7.5	7.2	7.1
20	8.9	8.6	8.4	8.1	7.9	7.7	7.4	7.2	6.9	6.8
22	8.6	8.4	8.1	7.9	7.6	7.4	7.2	6.9	6.7	6.7
24	8.3	8.1	7.8	7.6	7.4	7.2	6.9	6.7	6.5	6.4
26	8.1	7.8	7.6	7.4	7.2	7.0	6.7	6.5	6.3	6.1
28	7.8	7.6	7.4	7.2	7.0	6.8	6.5	6.3	6.1	6.0
30	7.6	7.4	7.1	6.9	6.7	6.5	6.3	6.1	5.9	5.8
32	7.3	7.1	6.9	6.7	6.5	6.3	6.1	5.9	5.7	5.6

#### 4.2 - SAGGIO DEFINITIVO

Per la conduzione della prova definitiva si allestiscono 5 diluizioni del campione da esaminare. La sequenza 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % e 6,25 % (v/v) –caratterizzata da un fattore di diluizione 0,5– è applicabile a gran parte delle situazioni. Basandosi sulle informazioni eventualmente ottenute da un saggio preliminare, si potrà adottare un diverso intervallo di sperimentazione, un diverso fattore di diluizione o anche un maggior numero di concentrazioni. In generale, è comunque utile che gli organismi esposti alle concentrazioni più elevate vengano osservati più frequentemente nelle prime ore dopo l'avvio del saggio. Se si osservasse mortalità diventerebbe, infatti, possibile allestire nuove diluizioni di campione aggiungendole all'estremità inferiore dell'intervallo di tossicità che sarebbe così ampliato e migliorato nel suo potenziale informativo. Nel corso del saggio, le osservazioni relative alle diluizioni aggiunte andranno corrispondentemente ritardate rispetto ai tempi di allestimento originali.

Se è stato necessario refrigerare i campioni di scarico o di acqua di diluizione, i volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di 26-27 °C. Preparate le diluizioni previste con le eventuali correzioni di salinità, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima o inferiore al limite di 4 mg/L si procede ad aerare i contenitori (cfr § 3.7 "Ossigeno disciolto"). Quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si introducono i giovani di *M. bahia*.

Ogni diluizione del campione viene distribuita in 8 repliche da 150 mL ciascuna. Per ogni replica si utilizzano 5 organismi di 7 giorni di età. Gli organismi vengono distribuiti secondo una sequenza casuale nei diversi contenitori sino al completamento del numero richiesto. Per evitare diluizioni significative delle soluzioni del saggio, è opportuno minimizzare il volume d'acqua trasferito con gli organismi. Questi sono trasferibili più facilmente se la pipetta (4 mm diametro interno) provvista di bulbo elastico, è mantenuta in posizione verticale sopra l'organismo da prelevare, piuttosto che frontalmente o posteriormente allo stesso. Durante le operazioni di trasferimento, la reotassia del crostaceo fa sì che esso tenda ad aderire alle pareti del contenitore o alla superficie interna della pipetta. Attenzione, quindi, al rischio di perdite accidentali di individui.

È necessario limitare l'evaporazione delle soluzioni di saggio per non causare variazioni della salinità e della concentrazione degli inquinanti. Per controllare il fenomeno si possono usare dei fogli di polietilene trasparenti o

altri dispositivi (vetro d'orologio), con i quali coprire i recipienti di saggio.

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

Durante le operazioni di ricambio, i gruppi di misidacei non vengono rimossi dai contenitori di saggio. Le soluzioni a cui essi sono stati esposti, sono versate lentamente in un contenitore avente lo scopo di permettere il recupero degli individui eventualmente fuoriusciti nel travaso, oltre alle misure di O<sub>2</sub> disciolto, pH e altri parametri. Raggiunto un volume residuo minimo di circa una decina di mL si procede a reimmettere lentamente nel contenitore di saggio 150 mL di soluzione fresca. Per preparare le soluzioni fresche si opera secondo le condizioni precisate a proposito dell'allestimento della prova.

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

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

Al termine dei sette giorni di sperimentazione tutti gli organismi sopravvissuti vengono esaminati per determinarne il sesso e il grado di maturazione delle gonadi. Questo esame deve essere effettuato entro un massimo di 12 h dal termine del saggio e se si prevede di operare al

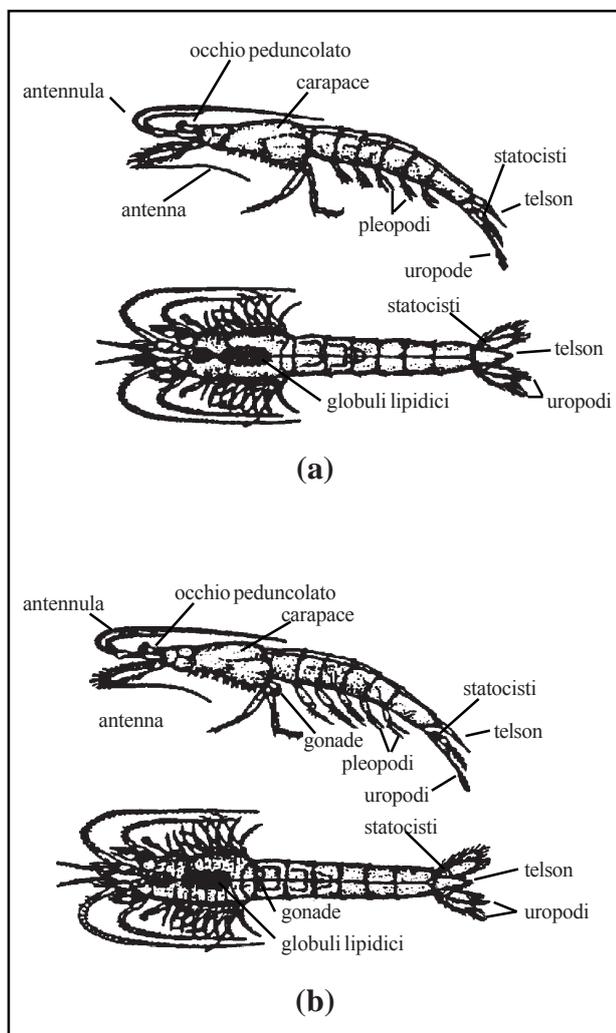
limite di questo arco di tempo è necessario sostituire le soluzioni di campione con la sola acqua di diluizione, lasciando comunque gli organismi nei propri contenitori. In questo modo si mantengono in vita i misidacei per il tempo necessario al completamento delle osservazioni e si evita che essi rimangano esposti ai tossici anche dopo il termine della sperimentazione.

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

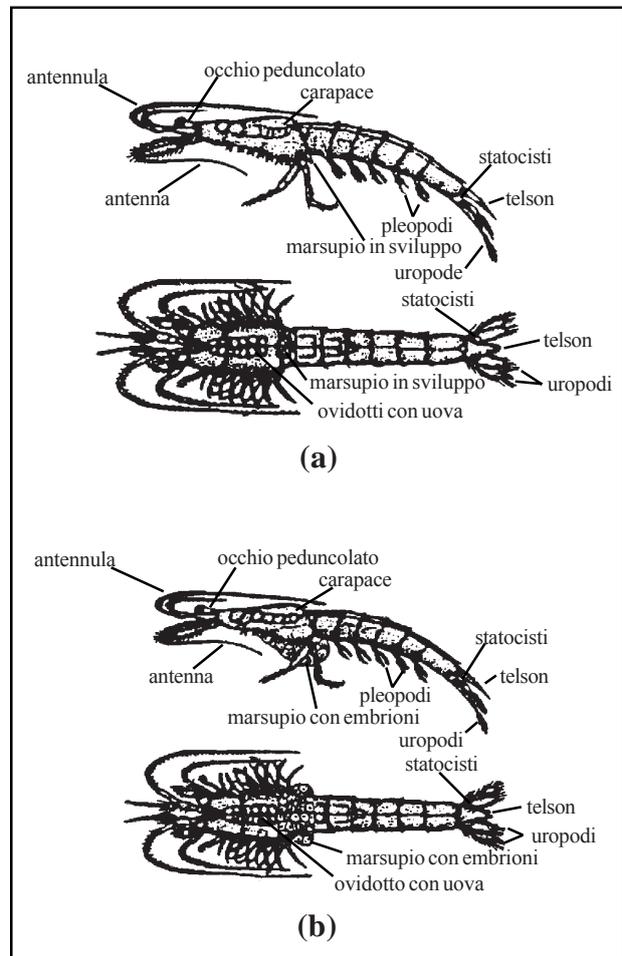
ché dopo la morte il corpo si opacizza rapidamente assumendo un colorazione biancastra.

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

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



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



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

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

### 5.1 - SAGGIO DEFINITIVO

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

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

A differenza del saggio su effluenti, il campione di acqua del corpo idrico è saggiato in un'unica serie di otto repliche. Questa viene affiancata, a seconda delle finalità del saggio, da una o più serie di organismi di controllo (cfr § 3.3). In ogni replica, avente il volume di 150 mL,

vengono trasferiti 5 giovani individui di *M. bahia* di 7 giorni di età. Tutti gli altri aspetti procedurali quali l'aerazione, il rinnovo delle soluzioni o l'alimentazione, sono da considerare invariati rispetto al saggio con diluizione e si rimanda, pertanto, ai paragrafi precedenti. Analogamente, al termine dei 7 giorni di esposizione si procede all'esame microscopico dei singoli individui ed alla determinazione del loro peso secco (cfr § 4.2).

## 6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

I risultati del saggio sono considerati accettabili se la concentrazione di ossigeno disciolto non è mai scesa al di sotto dei 4 mg/L in nessuno dei trattamenti; se al termine dei 7 giorni di sperimentazione la sopravvivenza degli organismi di controllo è  $\geq 80\%$  e se il loro peso secco medio è  $\geq 0,20$  mg/misidaceo.

Oltre alla sopravvivenza e all'accrescimento degli organismi anche la fecondità può essere utilizzata per valutare la tossicità del campione. Ciò è possibile se, al termine del saggio, la produzione di uova è osservabile in almeno il 50% delle femmine di controllo.

## BIBLIOGRAFIA

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

# METODO PER TEST DI TOSSICITÀ CRONICA (7 GIORNI) CON *Ceriodaphnia dubia*\*

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

## RIASSUNTO

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

## SUMMARY

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

## 1 - INTRODUZIONE

Il metodo descrive la procedura con cui è possibile indagare se un effluente di scarico o un'acqua superficiale contengono inquinanti a concentrazioni tali da causare effetti tossici di tipo cronico sul crostaceo *Ceriodaphnia dubia*. La mancata osservazione di effetti tossici di tipo cronico per un dato campione non esclude che essi siano osservabili saggiando campioni prelevati in altri momenti, e ciò in dipendenza della variabilità dello scarico o del corpo idrico superficiale e delle fonti di contaminazione che in essi trovano recapito.

## 2 - GENERALITÀ SUL METODO

In questo tipo di saggio giovani individui di *C. dubia* sono esposti per 7 giorni a campioni acquosi dei quali si voglia stimare la tossicità cronica. Generalmente, un campione di acqua di scarico, o più raramente di un corpo idrico superficiale, vengono saggiati ad almeno 5 diluizioni a ciascuna delle quali è esposto un numero definito di organismi neonati. Nell'arco di tempo di 7 giorni ed alle condizioni sperimentali descritte in questa metodica, i neonati di *C. dubia* raggiungono la maturità sessuale e sono in grado di produrre, a loro volta, tre schiuse di nuovi individui.

Solitamente un campione capace di effetti cronici manifesta la propria tossicità inibendo l'attività riproduttiva del cladocero; tuttavia, anche l'accrescimento è facilmente alterabile dalle sostanze tossiche presenti nel campione e, pertanto, la valutazione della tossicità dovrà basarsi, ovunque possibile, sull'esame di questi due parametri. I dati relativi all'accrescimento sono ottenibili, a saggio ultimato, mediante misurazioni di peso secco o più semplicemente di lunghezza corporea. Il confronto tra la riproduzione e la crescita degli organismi esposti alle diverse diluizioni del campione e quelle di un gruppo mantenuto come controllo, permetterà di individuare il valore di diluizione che non inibisce significativamente i

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

parametri considerati (NOEC = No Observed Effect Concentration; massima concentrazione/diluizione alla quale non si osservano effetti statisticamente significativi). La tossicità cronica del campione si può manifestare anche sulla sopravvivenza del crostaceo. Elaborando gli eventuali dati di mortalità può essere possibile stimare la diluizione letale per una determinata percentuale di individui (es.  $LC_{50}$ ), a diversi tempi di esposizione, sino a un massimo di 7 giorni.

### 3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

#### 3.1 - MATERIALI E STRUMENTAZIONE

Per la conduzione del saggio di tossicità è necessario:

- un minimo di 120 contenitori del tipo beaker in vetro borosilicato con volume utile di 30 mL. Diversi laboratori utilizzano con successo dei contenitori "a perdere" in polistirene reperiti originariamente tra gli articoli commercializzati per uso alimentare. Minimizzare l'adsorbimento dei probabili tossici è un obiettivo importante nella scelta dei contenitori;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro con un temporizzatore per il controllo del fotoperiodo e possibilmente un dispositivo che simuli la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- dispositivo per il controllo della temperatura delle soluzioni da saggiare nell'ambito di  $25 \pm 1$  °C per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto con sensore di dimensioni adeguate alla misura nei contenitori di saggio;
- microscopio binoculare da dissezione, provvisto di illuminazione laterale;
- micrometro oculare e micrometro obbiettivo;
- fonte di aria compressa a bassa pressione, con cannule in vetro o pipette pasteur per far gorgogliare aria nelle soluzioni da aerare. L'uso di un piccolo compressore del tipo usato in acquariologia, può costituire una soluzione adeguata. L'aria distribuita dagli impianti centralizzati è spesso contaminata da vapori di oli o altri inquinanti che è necessario rimuovere con opportuni dispositivi di filtrazione.

#### 3.2 - ORGANISMI PER IL SAGGIO

La specie utilizzata in questo saggio di tossicità è il crostaceo cladocero *Ceriodaphnia dubia* che è allevato in laboratorio seguendo le indicazioni fornite nella Appendice A2 del corrispondente "Metodo per test di tossicità

acuta con *C. dubia*". Il saggio è allestito con i neonati appartenenti alla terza schiusa o ad una delle successive, prodotte da femmine mantenute in condizioni di allevamento controllate e rispondenti ai requisiti di buone condizioni colturali descritti in Appendice al citato metodo per saggio acuto. In generale, è necessario che i neonati destinati alla prova siano prodotti da femmine allevate per almeno 7 giorni nella stessa acqua usata per le diluizioni o in un'acqua con caratteristiche simili (cfr. par. 3.3).

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

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

#### 3.3 - ACQUA DI DILUIZIONE

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

a) Se lo scopo è di evidenziare la capacità di un effluente o delle acque di un corpo idrico di produrre effetti tossici cronici studiandone l'andamento nel tempo o confrontando il grado di contaminazione di diverse aree, come diluente e controllo si adotterà un'acqua semisintetica (saggio in condizioni standard) preparata a partire da un'acqua minerale, scelta tra quelle disponibili in commercio, ad ottenere un mezzo semisintetico con le seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg  $CaCO_3/L$ , alcalinità 110-120 mg  $CaCO_3/L$ ,  $Ca/Mg > 1$  e prossimo a 4,  $N/K > 1$  e prossimo a 10.

Pur con la medesima finalità, si possono distinguere due modi di impiego di un'acqua minerale. Nel primo caso, ci si serve di un'acqua con un elevato contenuto di sali e ad una certa aliquota di acqua minerale viene aggiunta acqua Milli-Q® o di qualità equivalente, in modo da ottenere, per diluizione, il mezzo semisintetico con le caratteristiche volute. Nel secondo caso, ci si serve di un'acqua con basso contenuto di sali (oligominerale), che viene corretta nei suoi costituenti maggiori mediante l'aggiunta di sali di grado analitico a dare il mezzo con le caratteristiche

indicate. Per ulteriori dettagli si rinvia alla Appendice A3 del "Metodo per test di tossicità acuta con *C. dubia*" (VIGANÒ, 1996).

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

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

### 3.4 - ILLUMINAZIONE

Gli organismi esposti ai campioni da saggiare sono mantenuti alle stesse condizioni di illuminazione a cui sono allevati. La sorgente luminosa è costituita da un sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro (Indice di resa cromatica  $\geq 90$ ), il fotoperiodo è di 16 ore di luce e 8 di buio e un'intensità luminosa al piano di lavoro

compresa tra 500 e 1000 lux si è generalmente dimostrata adeguata. Compatibilmente con il potere tampone dell'acqua di saggio e con la densità di alghe presenti, può essere preferibile mantenere valori di intensità luminosa prossimi al limite inferiore dell'intervallo consigliato. Elevate intensità luminose possono indurre, infatti, un'attività fotosintetica tale da aumentare il pH del mezzo sino a valori che potrebbero rivelarsi dannosi o anche letali per il crostaceo. Più in generale si tenga presente che quando il pH approssima i valori di 6,5 e 9,0 è da considerare come possibile causa di danno.

### 3.5 - TEMPERATURA

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

### 3.6 - ALIMENTAZIONE

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

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

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

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

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

### 3.7 - OSSIGENO DISCIOLTO

Alla temperatura di conduzione del saggio si misura la concentrazione di ossigeno disciolto nelle soluzioni di campione più concentrate e nel mezzo di controllo destinati alla prova. Se la concentrazione risultasse prossima o inferiore al 40 % del valore di saturazione, prima dell'allestimento del saggio si deve provvedere ad aerare le soluzioni con un moderato gorgogliamento di aria. Più raramente può verificarsi anche il problema opposto e cioè di sovrassaturazione. Anche in questi casi un'aerazione moderata dovrebbe ricondurre la concentrazione di ossigeno disciolto entro l'intervallo 40-100 % del valore di saturazione.

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

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

### 4.1 - SAGGIO PRELIMINARE

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

Un saggio preliminare acuto (24 h) da condurre con *C. dubia* sullo stesso campione che deve essere saggiato nella prova a 7 giorni, può essere un utile compromesso tra la conservabilità del campione e la possibilità di avere indicazioni sul suo grado di tossicità. L'osservazione, ad

esempio, di una elevata tossicità acuta può evitare l'inutile allestimento delle concentrazioni maggiori, quelle cioè che si dimostrerebbero incapaci di dare informazioni di tipo cronico, favorendo pertanto una scelta più efficace delle diluizioni da saggiare a 7 giorni. Questa possibilità vale ovviamente per tossicità che siano imputabili a contaminanti relativamente persistenti, viceversa si rende necessario l'allestimento immediato del saggio definitivo, con le precauzioni descritte nel seguito (cfr par. 4.2).

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

### 4.2 - SAGGIO DEFINITIVO

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

Se l'effluente è noto o sospettato di essere particolarmente tossico, la serie di concentrazioni deve essere opportunamente ampliata dal lato delle concentrazioni inferiori, non allestendo, eventualmente, quelle all'opposto più elevate, quali le concentrazioni 50 e 100%. Viceversa, se non si hanno informazioni preliminari, si può adottare un semplice accorgimento che consiste nel controllare frequentemente le concentrazioni più elevate per le prime ore dopo l'inizio del saggio: se si osserva mortalità si provvede ad allestire altre diluizioni, ampliando la serie prescelta nella direzione delle concentrazioni minori.

Se è stato necessario refrigerare i campioni, le aliquote destinate al saggio sono prelevate dopo accurato mescolamento e portate alla temperatura scelta per la prova. Si procede poi alla misurazione della concentrazione di  $\text{O}_2$  disciolto in accordo alle indicazioni date in precedenza (cfr par. 3.7). Solo quando le 5 o più diluizioni hanno raggiunto le condizioni indicate per il test, vengono immessi gli organismi. Ogni individuo è mantenuto singolarmente in un beaker contenente almeno 15 mL di soluzione di saggio. Per ciascuna diluizione di campione vengono saggiati 10 individui, ognuno dei quali rappresenta pertanto una replica di quella diluizione. Procedura analoga vale anche per il gruppo di organismi di controllo.

Per il trasferimento si utilizza una pipetta di vetro, provvista di bulbo in lattice per l'aspirazione e con diametro interno di almeno un paio di mm, avendo cura di immettere gli organismi nel nuovo recipiente, solo quan-

do l'estremità della pipetta è sotto la superficie del liquido. Per evitare una diluizione significativa delle soluzioni di saggio è necessario limitare al minimo il volume di acqua trasferito con gli animali. Si raccomanda la distribuzione casuale dei neonati nei recipienti contenenti le diverse concentrazioni come pure il posizionamento casuale dei recipienti nell'area di lavoro. A distribuzione completata ogni individuo risulterà identificato dal valore di concentrazione o comunque dal tipo di trattamento cui esso è esposto e da un numero progressivo compreso tra 1 e 10, tante sono le repliche che compongono ciascun gruppo sperimentale. Tale identificazione deve restare immutata sino al termine del saggio, permettendo così di documentare la vicenda espositiva di ogni singolo organismo (sopravvivenza, eventi riproduttivi, accrescimento, etc).

Quotidianamente si provvede al rinnovo delle soluzioni del saggio. Pertanto, ogni 24 h, gli individui di *C. dubia* vengono trasferiti ad una nuova serie di recipienti, contenenti soluzioni di saggio e cibo freschi, preparati secondo le stesse indicazioni seguite per l'allestimento della prova. In concomitanza con le operazioni di trasferimento, si registrano e rimuovono gli organismi deceduti, si contano e scartano i neonati prodotti e si misurano  $O_2$  disciolto, pH o altri parametri.

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

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

Gli organismi del gruppo di controllo mantenuti nelle condizioni indicate in questo metodo danno luogo a 3 schiuse di nuovi individui nei 7 giorni di sperimentazio-

ne. La prima schiusa è prodotta entro il quarto giorno di saggio; la seconda può essere prodotta indifferentemente al quinto o al sesto, mentre la terza ed ultima schiusa, è osservabile al settimo giorno di saggio.

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

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

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

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

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

### 5.1 - SAGGIO DEFINITIVO

I rapporti di diluizione tra sorgente di contamina-

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

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

## **6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO**

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

## **BIBLIOGRAFIA**

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

# METODO PER TEST DI TOSSICITÀ CRONICA (7 GIORNI) CON *Cyprinodon variegatus*\*

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

## RIASSUNTO

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

## SUMMARY

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

## 1 - INTRODUZIONE

Viene descritto un metodo standard il cui scopo è quello di stimare la tossicità cronica, più esattamente sub-cronica, di effluenti di scarico ed acque di mare sul pesce

*Cyprinodon variegatus*. La mancata osservazione di effetti tossici di tipo cronico per un particolare campione non esclude che essi potranno essere osservati con campioni prelevati in momenti successivi, e ciò semplicemente a causa della possibile variabilità delle fonti di contaminazione, siano esse puntiformi o diffuse, come anche della capacità di diluizione dell'area recettrice alla quale esse recapitano.

## 2 - GENERALITÀ SUL METODO

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

Gli effetti cronici di uno scarico vengono valutati mediante l'esposizione di almeno cinque gruppi di avannotti ad altrettante diluizioni dell'effluente. Al termine del periodo di esposizione la mortalità e l'accrescimento dei cinque gruppi sperimentali sono confrontati con le risposte di un ulteriore gruppo di avannotti mantenuti come controllo. Questo esame, condotto con metodi statistici, permette di individuare quella concentrazione di scarico che non riduce significativamente (NOEC) sia la sopravvivenza che l'accrescimento di *C. variegatus*. Le percentuali di organismi deceduti alle diverse diluizioni di campione possono essere ulteriormente elaborate per definire la concentrazione di scarico che si stima letale per una determinata percentuale dei giovani ciprinodontidi (es. LC<sub>50</sub>). Compatibilmente con il tipo di risposte ottenute, è possibile calcolare questo valore di concentrazione letale per tempi di esposizione crescenti sino al termine massimo dei 7 giorni del saggio.

La ricerca in acqua di mare di inquinanti capaci di effetti tossici cronici si può avvalere dello stesso tipo di procedura descritta per un effluente. Tuttavia, a causa dei

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

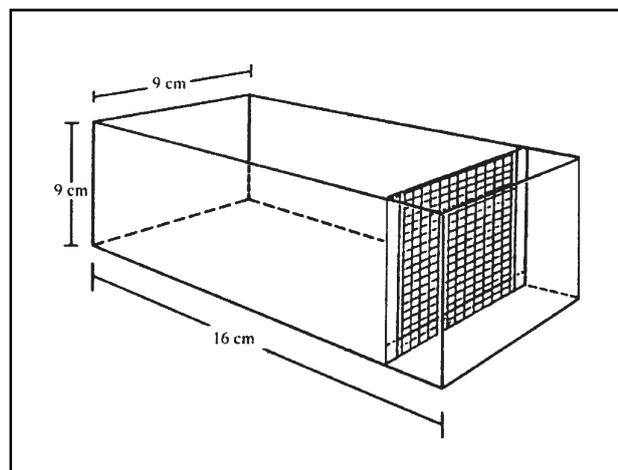
rapporti di diluizione, generalmente elevati, tra la fonte di contaminazione e l'acqua recettrice, è facile prevedere che l'allestimento di una serie di diluizioni riuscirebbe a ridurre la concentrazione degli inquinanti al di sotto del limite di rilevabilità del saggio stesso. Per questi motivi, la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

### 3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

#### 3.1 - MATERIALI E STRUMENTAZIONE

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

- almeno 18 contenitori per l'esposizione degli avannotti alle soluzioni di saggio. Devono essere utilizzati dei recipienti con volume utile di 750 mL, in vetro borosilicato, del tipo beaker, cristallizzatori o anche vaschette come quella illustrata in Fig. 1. Il compartimento laterale di quest'ultima, che è separato dal principale mediante un retino, serve ad effettuare le operazioni di rinnovo delle soluzioni senza arrecare disturbo agli organismi del saggio;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro,



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

controllato da un temporizzatore per la simulazione del fotoperiodo e possibilmente da un dispositivo che consenta la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;

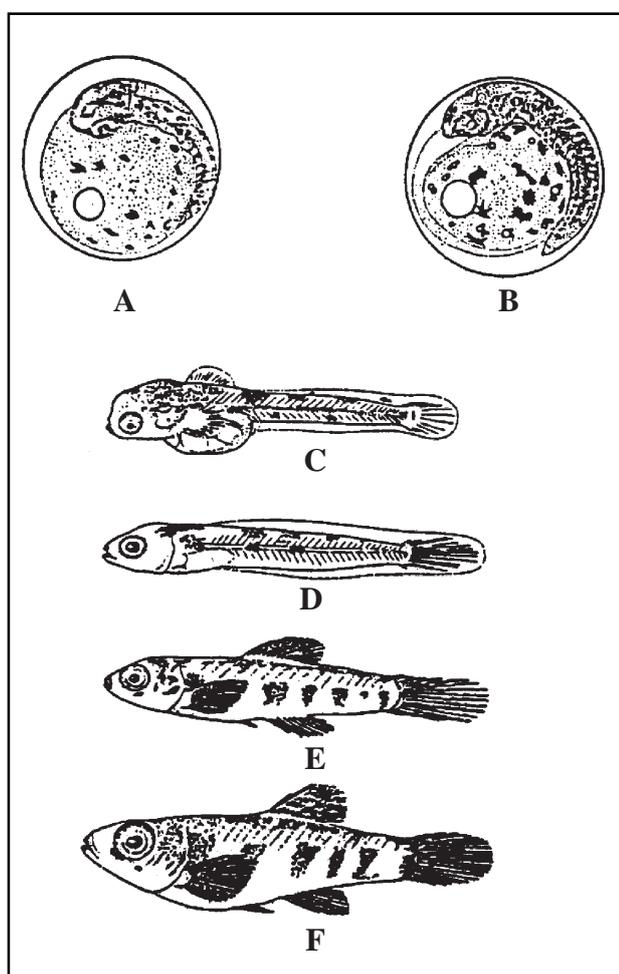
- bagno termostato o altro dispositivo per il mantenimento della temperatura delle soluzioni da saggiare a  $25 \pm 1$  °C e per l'intera durata del saggio;
- analizzatore di ossigeno disciolto; misuratore di salinità;
- fonte di aria compressa a bassa pressione con cannule in vetro o pipette pasteur.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

#### 3.2 - ORGANISMI PER IL SAGGIO

Per la conduzione del saggio a 7 giorni, si utilizzano le larve di *C. variegatus* di età pari o inferiore a 24 h (Fig. 2, stadio C). Le uova fecondate necessarie alla produzione degli avannotti possono essere acquistate da allevatori specializzati od ottenute in laboratorio da esemplari adulti mantenuti secondo la procedura descritta in Appendice al "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *C. variegatus*" (VIGANÒ, 1996). In breve, 7-8 giorni prima dell'avvio del saggio si isolano i riproduttori nelle apposite vasche. Al fine di disporre del numero sufficiente di larve aventi l'età richiesta, è necessario raccogliere le uova deposte nell'arco di 2-3 giorni. Ciò è dovuto sia ad una consistenza variabile dei singoli eventi riproduttivi come al fatto che, anche in condizioni ideali, le uova appartenenti alla stessa deposizione schiudono distribuite in un arco di tempo che può raggiungere le 72 h. Da ciò deriva che il mantenimento in incubazione di più gruppi di uova, che per quanto detto avranno tempi di schiusa sovrapposti, offre maggiori garanzie di disporre del numero di larve necessario al saggio.

A 25 °C lo sviluppo dell'embrione si completa mediamente in 6-7 giorni. Per facilitare la cura e l'osservazione degli embrioni durante il periodo di incubazione, è necessario ripulire le uova dai filamenti di cui sono

provviste e che le farebbero aderire le une alle altre. Per fare questo, almeno 4 ore dopo la deposizione, si fanno rotolare su di una reticella di nylon (250-500  $\mu\text{m}$ ), pressandole delicatamente con un dito. A 48-72 h dalla fertilizzazione, l'embrione, osservato con un microscopio da dissezione, ha l'aspetto illustrato in Fig. 2 (stadi A e B). Le uova non fecondate, gli embrioni deformi o deceduti, vengono scartati durante il rinnovo quotidiano del mezzo di incubazione. Circa 24 h prima della schiusa, la salinità del mezzo di incubazione viene adeguata, se necessario, a quella di conduzione del test.



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

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

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

### 3.3 - ACQUA DI DILUIZIONE

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

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

Anche un'acqua di mare ipersalina (vedi poi) è utilizzabile per condurre il saggio a 7 giorni, purché sia stata ottenuta da acqua di mare prelevata in area pelagica non contaminata e con variabilità trascurabile delle caratteristiche chimico-fisiche. Se per effettuare il test di un effluente di scarico viene usata un'acqua ipersalina, si tenga presente che la massima concentrazione che può essere saggiata è pari a 65% (v/v), a meno di adottare ulteriori accorgimenti (vedi poi).

b) Nel caso la finalità del saggio sia quella di stimare la tossicità cronica di uno scarico nelle acque recettrici non contaminate, sarà necessario usare come acqua di diluizione e controllo quella prelevata nell'area di sversamento ma al di fuori dell'influenza di eventuali fonti di contaminazione. L'acqua di diluizione dovrebbe essere prelevata immediatamente prima del saggio e non oltre le 96 h dallo stesso. Se non usata entro le 24 h dal prelievo,

l'acqua di diluizione verrà refrigerata (4 °C). Se l'area recettrice è contaminata o sospettata di esserlo, si può ricorrere ad acque naturali o sintetiche aventi caratteristiche fisiche e chimiche il più possibile simili a quelle dell'acqua recettrice. Se si usano acque di diluizione sospettate di modificare, in qualche misura, l'accrescimento o la sopravvivenza di *C. variegatus*, è preferibile includere un secondo controllo preparato ad esempio con l'acqua di allevamento, un'acqua cioè i cui effetti sull'organismo siano ben documentati.

c) Se, infine, l'obiettivo del saggio è di esaminare le interazioni tra i contaminanti dello scarico e quelli già presenti nell'acqua di mare recettrice, quest'ultima sarà utilizzata come acqua di diluizione, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, purché prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. La conduzione di questo tipo di saggio richiede l'allestimento di due gruppi di controllo. Un primo gruppo in cui gli organismi sono esposti a quella stessa acqua di diluizione che ha, verosimilmente, un certo grado di contaminazione, ed un secondo gruppo in cui gli organismi sono esposti all'acqua non contaminata dell'area di ricezione. Anche in questo tipo di saggio, come in quello descritto al punto precedente, potrebbe essere vantaggioso disporre di un ulteriore gruppo di riferimento allestito con acqua di allevamento o incubazione.

Un effluente di scarico ha, comunemente, una salinità trascurabile. Gli organismi devono, tuttavia, essere esposti alle diluizioni di campione senza che le differenze di salinità possano rappresentare una fonte di stress o di variabilità dei risultati. È dunque necessario uniformare la salinità delle diverse diluizioni di campione e a questo scopo, vi sono due possibili soluzioni: la prima prevede l'impiego di acqua di mare ipersalina (100 ‰) come acqua di diluizione, mentre la seconda consiste nell'aggiungere i sali commercializzati per la preparazione di acqua di mare artificiale.

Il principale vantaggio della prima soluzione è che l'acqua ipersalina può essere ottenuta, previa filtrazione ( $\leq 1 \mu\text{m}$ ) e per evaporazione controllata ( $< 40 \text{ °C}$ ), da una qualsiasi acqua di mare naturale purché di elevata qualità, e a questo proposito si consiglia il prelievo da aree pelagiche. L'acqua ipersalina contiene tutti i micronutrienti, i colloidi e alcune componenti microbiche che sono richiesti per l'accrescimento e l'attività riproduttiva degli organismi marini. Inoltre, può essere conservata per periodi prolungati, al buio e a temperatura ambiente, senza apparente degradazione. Il limite della prima soluzione risiede nel fatto che un effluente può essere saggiato ad una concentrazione massima non superiore al 80 % se la salinità prescelta è del 20 ‰, od anche del 70 % se la

salinità voluta è dei 30 ‰ (vedi es. Tab. 1). La seconda soluzione non ha questo limite ma l'aggiunta di sali può, dal canto suo, modificare il pH dell'effluente o dell'eventuale acqua che richiede aggiustamenti, potendo modificare in tal modo anche la tossicità del campione. In generale, si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo 7,5-8,5 sono da considerare come potenziale causa di danno per gli organismi. Se necessario il pH può essere riportato al valore desiderato con aggiunte di HCl o NaOH. Dopo l'aggiunta dei sali la soluzione viene mantenuta in agitazione moderata per circa 60 minuti con l'aiuto di un agitatore magnetico, e ciò per garantire che tutti i sali siano entrati in soluzione prima di introdurre gli organismi.

È accettata, infine, anche una terza soluzione con caratteristiche intermedie tra le due descritte (US EPA, 1988). Essa prevede che la concentrazione pari al 100% di campione venga preparata per il test mediante aggiunta di sali, ad ottenere, ad esempio, la salinità del 35 ‰. La serie delle concentrazioni inferiori è poi allestita diluendo aliquote del campione al 35 ‰ con acqua di mare alla stessa salinità, che a sua volta è ottenuta miscelando acqua ipersalina con deionizzata o Milli-Q®.

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

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

#### 3.4 - ILLUMINAZIONE

Il saggio a 7 giorni è condotto mantenendo gli organismi nelle stesse condizioni di illuminazione che sono applicate nell'area di allevamento. Le lampade fluorescenti ad ampio spettro, le stesse impiegate per illuminare gli allevamenti degli organismi nel laboratorio, devono fornire, nell'area di sperimentazione, un'intensità luminosa di circa 500-1000 lux con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio.

### 3.5 - TEMPERATURA

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

### 3.6 - ALIMENTAZIONE

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

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

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

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

### 3.7 - OSSIGENO DISCIOLTO

Alle concentrazioni di effluente più elevate è maggiore il rischio di una massiccia riduzione della concentrazione di ossigeno disciolto. Ciò rende necessario controllare questo parametro e con particolare attenzione durante le prime ore del saggio. La concentrazione di ossigeno disciolto non deve essere mai inferiore al 40 % del valore di saturazione (v. Tab. 2 a pag. 8) In caso contrario si deve provvedere all'aerazione delle soluzioni facendo gorgogliare aria compressa priva di contaminanti mediante cannule in vetro. Il flusso d'aria deve essere regolato al minimo livello possibile, in modo tale da soddisfare il criterio di validità del saggio senza causare eccessiva turbolenza od arrecare stress indesiderato agli

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

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

### 4.1 - SAGGIO PRELIMINARE

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

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

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

### 4.2 - SAGGIO DEFINITIVO

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

In ogni caso, a prescindere dalla disponibilità di dati

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

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

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

Quotidianamente si ispezionano gli organismi e si provvede al rinnovo delle soluzioni di campione ed alla somministrazione dei naupli di artemia appena schiusi. Durante il rinnovo delle soluzioni, gli avannotti non vengono rimossi dai contenitori di saggio e pertanto, prima delle operazioni di ricambio e di alimentazione, si provvede alla pulizia dei contenitori stessi. Con l'aiuto di una pipetta con bulbo in lattice, si rimuovono i naupli di artemia non consumati e gli avannotti deceduti, registrando come tali quelli che non mostrano movimenti opercolari o non reagiscono ad una leggera stimolazione. Si può anche operare utilizzando un sifone, sebbene in tal caso si debba prestare molta attenzione a non aspirare anche gli organismi. Questa soluzione si rivela più pratica per la successiva rimozione del mezzo, e soprattutto se il saggio è condotto con le vaschette illustrate in Fig. 1, in quanto lo scomparto laterale semplifica ulteriormente questa opera-

zione, minimizzando il disturbo degli avannotti. In ogni caso, la soluzione di campione da scartare, viene raccolta in un contenitore avente lo scopo di permettere il recupero degli individui accidentalmente rimossi, oltre alle misure di O<sub>2</sub> disciolto, pH o altri parametri. Raggiunto un volume residuo minimo che sia sufficiente a lasciare le larve immerse, si trasferiscono lentamente nel contenitore di saggio i 500 mL di soluzione fresca.

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

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

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

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

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

Ipotizzando l'allestimento minimo di 3 repliche da 10 individui e la completa sopravvivenza degli organismi, si ottengono, secondo la procedura descritta, tre valori di peso medio per ogni trattamento (US EPA, 1988). L'esa-

me statistico degli effetti sull'accrescimento potrebbe risultarne penalizzato, riscontrando differenze significative solo nei casi più evidenti. Si può quindi tentare di raddoppiare il numero delle misurazioni di peso medio dividendo i 10 esemplari di ogni contenitore di saggio in due sottogruppi di 5 avannotti ciascuno. Così facendo l'esame statistico sarebbe basato sul confronto tra gruppi di sei valori di peso secco per ogni trattamento. A causa del peso modesto di un singolo individuo (cfr. par. 6), l'ulteriore frazionamento in un maggior numero di sottogruppi aumenterebbe progressivamente il rischio di errore nelle determinazioni del peso secco, a meno di non adottare procedure e strumentazioni adeguate alla misurazione di pesi inferiori a 1 mg.

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

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

### 5.1 - SAGGIO DEFINITIVO

La diluizione esercitata dalle acque marine sulle fonti di contaminazione, spesso riduce la concentrazione degli inquinanti a livelli tali da rendere inutile un saggio che preveda la diluizione del campione. La procedura comunemente adottata per indagare se un'acqua di mare è tossica a livello cronico per *C. variegatus*, consiste per-

tanto nel condurre un saggio a 7 giorni con un campione "tal quale" (non diluito) delle sue acque.

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

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

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

## 6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

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

## BIBLIOGRAFIA

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

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

US EPA (1988): "Sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larval survival and growth test", Method 1004. In: Short-

term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. C.I. Weber, W.B. Horning, D.J. Klemm, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, E.L. Robinson, J. Menkedick e F. Kessier, eds. EMSL, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA-600/4-87-028.

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

# METODO PER SAGGIO DI TOSSICITÀ PROLUNGATO (14-28 GIORNI) CON TROTA IRIDEA (*Oncorhynchus mykiss*)\*

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

## RIASSUNTO

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

## SUMMARY

This test method proposal describes how to perform prolonged toxicity tests (14-28 days) on effluents and surface waters with the freshwater fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The analysis of adverse effects is based on the growth of juvenile rainbow trout exposed to effluents or receiving waters and evaluated with respect to fish length, weight and growth rates. An additional note provides some basic concepts for the selection of appropriate statistical techniques of data analysis. Results can be reported as no observable and lowest observable effect concentration (NOEC; LOEC).

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

## 1 - INTRODUZIONE

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

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

## 2 - GENERALITÀ SUL METODO

Il saggio di tossicità utilizza giovani individui di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*, in precedenza *Salmo gairdneri*), ovvero individui che sono in fase di crescita attiva. Essi vengono esposti ad un saggio della durata minima di 14 giorni, la cui metodologia è proposta per consentire la valutazione di effetti più tipicamente subletali, quali sono quelli osservabili sull'accrescimento dell'organismo. Tra i vari parametri indagabili, l'accrescimento merita una particolare attenzione in virtù del suo

elevato contenuto informativo. Questa peculiarità deriva dal fatto che l'accrescimento di un organismo è l'espressione ultima di molteplici aspetti, sia di natura biochimica, fisiologica come anche comportamentale, tutti potenzialmente alterabili, in vario grado, quando un organismo venga esposto ad una miscela di contaminanti.

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

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

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

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

### 3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

#### 3.1 - MATERIALI E STRUMENTAZIONE

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

- vasche o recipienti in vetro aventi capacità netta di almeno 40-50 L e che consentano di mantenere un livello del liquido non inferiore a 15 cm, l'adozione di

volumi diversi deve sempre soddisfare il limite di carico di biomassa che è fissato indicativamente nel valore massimo di 0,5 g/L · giorno<sup>-1</sup>;

- retini di varie dimensioni per il trasferimento dei pesci;
- reti o coperture trasparenti in materiale atossico per evitare la fuoriuscita degli animali dalle vasche;
- dispositivo atto alla termostatazione delle soluzioni a  $15 \pm 1$  °C. Il condizionamento dell'ambiente di lavoro o l'immersione dei recipienti di saggio in bagni termostatati sono tra le soluzioni più comunemente adottate;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro provvisto di temporizzatore e preferibilmente di un dispositivo per la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- sistema di aerazione a bassa pressione fornito di diffusori a pietra porosa e/o cannule in vetro. Gli aeratori commercializzati in acquariofilia soddisfano appieno le necessità della sperimentazione. Nel caso si ricorra ad impianti centralizzati per aria compressa, è necessario adottare idonei sistemi di filtrazione per rimuovere oli ed altri vapori organici che sono contaminanti frequenti.

Tutti gli oggetti che sono destinati ad entrare in contatto con l'acqua di diluizione o di mantenimento, o con i campioni da saggiare, debbono essere realizzati con materiali inerti, che non adsorbano i tossici significativamente e che tanto meno ne possano rilasciare. Il vetro borosilicato e le plastiche fluorurate dovrebbero essere impiegati ovunque possibile. Gli oggetti costruiti con questi materiali possono essere riutilizzati dopo le necessarie procedure di pulizia. Materie plastiche quali il polietilene, il polipropilene, il Tygon®, o altre ancora, possono trovare usi limitati nell'apparato sperimentale mentre sono da considerare assolutamente come "monouso" se impiegate nel prelievo e nel trasporto dei campioni da saggiare. Al contrario, contenitori costruiti con questi materiali, con il polietilene ad alta densità in particolare, ben si prestano ad essere specificamente riutilizzati per conservare acque di diluizione o acque sintetiche preparate in laboratorio. In ogni caso si raccomanda che, a prescindere dalla natura dei materiali prescelti, sia i recipienti che gli accessori vengano sciacquati accuratamente, meglio se in flusso continuo, con l'acqua di diluizione o di mantenimento prima del loro impiego nei saggi.

#### 3.2 - ORGANISMI PER IL SAGGIO

Si utilizzano giovani esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), che sono disponibili, quasi per l'inte-

ro arco dell'anno, presso gli allevamenti ittici specializzati in trotilcoltura. In relazione alle condizioni esistenti in allevamento o a quelle di mantenimento in laboratorio, può rendersi necessario acclimatare gli organismi alle condizioni previste per la sperimentazione. Ciò è ottenibile mediante un periodo di acclimatazione che deve avere una durata minima di 7 giorni e preferibilmente di un paio di settimane. Durante il periodo di mantenimento e acclimatazione le trotelle vengono alimentate con un quantitativo giornaliero minimo di cibo che deve essere equivalente al 1-2 % del loro peso fresco (ECETOC, 1986; ISO, 1992; OECD, 1994). Per ulteriori dettagli in merito al trasporto ed alla acclimatazione degli organismi si rinvia alla Appendice A2 del "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con trota iridea" (VIGANÒ, 1996).

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

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

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

tivamente, un peso fresco di circa 0,5 g.

In questo tipo di saggio è di fondamentale importanza l'omogeneità di taglia degli organismi. Pertanto è necessario adottare una serie di accorgimenti il cui scopo ultimo è di ottenere un gruppo di circa 100-130 trote che all'allestimento del saggio abbiano un peso corporeo compreso entro un ambito di  $\pm 10\%$  del loro peso medio. La lunghezza di un tale gruppo di organismi si dimostra compresa entro un ambito ancora più ristretto del valore di lunghezza media (CROSSLAND, 1985). Per ottenere questo grado di omogeneità è necessario scegliere organismi il più possibile coetanei, meglio se appartenenti alla stessa schiusa, selezionarne la taglia già dalle prime fasi di mantenimento in laboratorio, scartando gli individui con dimensioni estreme, con comportamento marcatamente territoriale o, peggio, che praticano il cannibalismo. Condizioni idonee di mantenimento e acclimatazione contribuiscono, a loro volta, al raggiungimento dell'obiettivo (cfr. Appendice A2 del "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con trota iridea"; VIGANÒ, 1996).

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

Nel giorno di allestimento del saggio vengono misurati il peso e la lunghezza media di un campione di trotelle che sia rappresentativo degli organismi medi del lotto destinato alla sperimentazione. In questo modo si ottiene una stima attendibile del peso e della lunghezza media degli organismi del lotto in esame, in base alla quale e nel

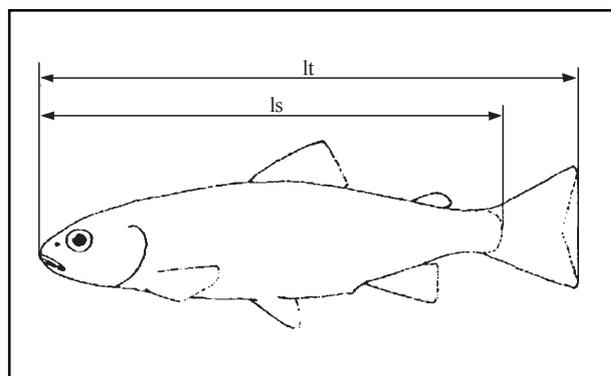
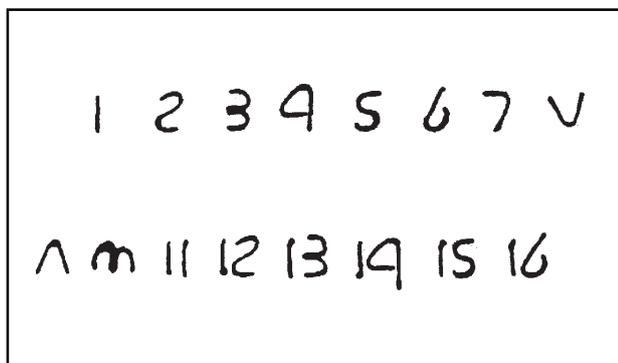


Fig. 1 - Riferimenti per la misurazione della lunghezza totale (lt) e della lunghezza standard (ls) del corpo del pesce.

rispetto dell'ambito indicato ( $\pm 10\%$ ), si può procedere alla selezione definitiva delle trote che potranno essere immerse nelle vasche di saggio.

Per misurare accuratamente peso e lunghezza dei singoli individui è consigliabile che essi vengano anestetizzati. A questo scopo si prepara una vaschetta contenente una soluzione di alcuni litri di un anestetico, quale la tricaina (MS-222) o sostanza equivalente (es. benzocaina), alla concentrazione di 50-100 mg/L (ECETOC, 1986; ISO, 1992), debolmente aerata ed alla temperatura di  $15 \pm 1$  °C. Trattandosi di misurazioni di peso fresco è necessario adottare piccoli accorgimenti che minimizzino il rischio di errore dovuto alla presenza di gocce d'acqua sul corpo del pesce; esse possono essere rimosse, ad esempio, con carta da filtro o simile, senza tuttavia danneggiare lo strato di muco protettivo. Se il pesce anestetizzato risponde ai requisiti di peso e lunghezza desiderati, si procede all'eventuale operazione di marcatura (soluzione sperimentale "a"), dopo di che il pesce viene immerso in un vaschetta simile alla precedente ma contenente solo acqua di acclimatazione/diluizione ( $15 \pm 1$  °C), si attende che si riprenda dall'anestesia e si trasferisce definitivamente alla vasca di saggio. La stessa procedura, marcatura esclusa, viene seguita anche nel caso in cui non sia prevista l'identificazione degli organismi (soluzione sperimentale "b").

Rispetto ad altre tecniche, la marcatura per congelamento si è dimostrata relativamente semplice e senza danno per gli organismi (CROSSLAND, 1985). Essa si effettua operando come segue: il marchio è realizzato sagomando del filo d'acciaio a forma di lettera o di numero, questo viene raffreddato in azoto liquido e pressato leggermente, per tre secondi, sul fianco del pesce anestetizzato, poco al di sotto della pinna dorsale. Il marchio, che subito dopo l'operazione è invisibile, si rende progressi-



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

vamente evidente nelle successive 48 h e permane chiaramente visibile per almeno sei settimane. È preferibile evitare i marchi che comprendono sagome circolari (chiuse) poiché favoriscono l'insorgenza di infezioni cutanee (ISO, 1992). In Fig. 2, sono riprodotte delle sagome idonee. La superficie del marchio deve essere priva di asperità e piatta, in modo che durante la marcatura, la cute non venga lesa in alcun modo e sia sottoposta ad una pressione omogenea in corrispondenza all'intero simbolo del marchio.

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

### 3.3 - ACQUA DI DILUIZIONE

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

a) Se lo scopo è di evidenziare la presenza di effetti tossici cronici in un effluente o nelle acque di un corpo idrico, studiandone l'andamento nel tempo o confrontando il grado di contaminazione di diverse aree, come diluente e controllo si adotterà un'acqua sintetica (standard) preparata per aggiunta di sali di grado analitico ad acqua deionizzata di buona qualità o Milli-Q®. Per un litro di acqua standard si solubilizzano nell'ordine: 10 mg di KCl, 192 mg di NaHCO<sub>3</sub>, 53 mg MgSO<sub>4</sub> e 183 mg CaSO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O. Il mezzo così ottenuto ha le seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg CaCO<sub>3</sub>/L, alcalinità 110-120 mg CaCO<sub>3</sub>/L, Ca/Mg > 1 e prossimo a 4, Na/K > 1 e prossimo a 10.

b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità derivante dall'immissione di uno scarico nelle acque del recettore, come diluente e controllo si userà l'acqua non contaminata del recettore, prelevata a monte dell'immissione o comunque al di fuori dell'area contaminata. Nel caso essa non sia disponibile, si può utilizzare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale o un'acqua sintetica (cfr "punto a") avente approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore oggetto del controllo. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purché di qualità

adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) e nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 h dallo stesso, mantenendo i campioni refrigerati (4 °C) e al buio quando se ne faccia uso a più di 24 h dalla raccolta. Se si sospetta che l'acqua del recettore, per proprie caratteristiche, possa modificare l'accrescimento degli organismi, è preferibile allestire un secondo gruppo di controllo nel quale gli individui sono esposti all'acqua comunemente utilizzata per il mantenimento o l'acclimatazione.

c) Se, infine, lo scopo del saggio è quello di esaminare le interazioni tra i contaminanti presenti nello scarico e quelli veicolati dal recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore stesso, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o comunque al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. Questo terzo tipo di saggio richiede l'allestimento di due gruppi di organismi di controllo. Nel primo i pesci sono esposti all'acqua recettrice, quella cioè che già possiede, verosimilmente, un proprio grado di contaminazione. Nel secondo, i pesci sono esposti all'acqua del recettore prelevata da un'area non contaminata. In analogia al saggio precedente, se si sospetta che l'acqua del recettore possa di per sé alterare, in qualche misura, la risposta degli organismi, si può prevedere un terzo gruppo di controllo nel quale i pesci sono mantenuti nell'acqua comunemente utilizzata per il mantenimento o l'acclimatazione.

### 3.4 - ILLUMINAZIONE

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

### 3.5 - TEMPERATURA

La temperatura di tutte le soluzioni da saggiare deve essere mantenuta a  $15 \pm 1$  °C per l'intera durata della sperimentazione.

### 3.6 - ALIMENTAZIONE

Fatta eccezione per particolari finalità sperimentali, il cibo da somministrare è lo stesso impiegato nell'allevamento da cui provengono gli organismi. Si tratta solitamente di mangimi secchi, pellettizzati, aventi composi-

zione e dimensione adeguata alla taglia delle trote da nutrire.

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

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

La somministrazione del cibo deve essere interrotta 24h prima delle determinazioni di peso fresco degli organismi, evitando così che il contenuto dell'apparato digerente possa interferire in modo significativo. L'alimentazione viene, quindi, sospesa prima dell'allestimento del saggio (cfr 3.2 "Organismi per il saggio"), come pure al 13° e al 27° giorno di trattamento, in preparazione alle misure di accrescimento.

### 3.7 - OSSIGENO DISCIOLTO

È necessario misurare quotidianamente la concentrazione di ossigeno disciolto e più frequentemente durante le prime ore del saggio. Essa deve risultare  $\geq 60$  % del valore di saturazione. Nei test statici, soprattutto alle concentrazioni più elevate di effluente di scarico, è frequente che l'ossigeno disciolto scenda al di sotto del limite indicato. È necessario in questi casi aerare le soluzioni del saggio facendovi gorgogliare aria priva di contaminanti. Compatibilmente con il tenore di ossigeno richiesto, l'aerazione deve essere regolata sul minimo flusso possibile, sia per evitare che l'eccessiva turbolenza arrechi disturbo agli organismi che per minimizzare la perdita di eventuali tossici volatili o facilmente ossidabili. Se si utilizzano pipette o cannule in vetro per l'aerazione delle vasche, si può fissare, indicativamente, a 100 bolle/min il flusso massimo di aria insufflata.

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

##### 4.1 - SAGGIO PRELIMINARE

Quando è disponibile un certo numero di dati tossicologici sull'effluente da esaminare, un saggio preliminare può ritenersi superfluo e si procede ad allestire direttamente il saggio definitivo, al più adottando qualche cautela in relazione a un certo grado di variabilità delle fonti di contaminazione. Al contrario, se ci si appresta alla conduzione di un saggio con un effluente di qualità sconosciuta, è consigliabile acquisire dei dati preliminari sul suo grado di tossicità, e ciò al fine di impostare correttamente l'intervallo di concentrazioni entro cui sperimentare.

Un saggio preliminare consiste normalmente in una prova semplificata, condotta con un minor numero di organismi ed una serie di concentrazioni ampiamente spaziate tra loro. Tuttavia, la limitata conservabilità dei campioni e soprattutto la durata del saggio in esame, rendono improponibile la conduzione di un saggio preliminare e successivamente di quello definitivo. Anche in quei casi in cui la tossicità è persistente, è dunque preferibile utilizzare un saggio a breve termine (acuto) per ottenere quei dati tossicologici preliminari che sono utili all'allestimento del saggio definitivo.

L'eventuale saggio esplorativo deve essere quindi condotto secondo il "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con trota iridea" (VIGANÒ, 1996), avendo cura di adottare, ovunque possibile, le stesse condizioni del saggio cronico definitivo, quali il carico di biomassa, l'acqua di diluizione, nonché la taglia degli organismi, meglio se appartenenti allo stesso lotto. Se la prova preliminare dimostra che lo scarico in esame è capace di effetti tossici acuti, si può suggerire di adottare la minima concentrazione che ha causato dei decessi come la massima che sarà saggiata nella prova definitiva. Disponendo di informazioni tossicologiche più esaurienti, si può optare per l'adozione di una concentrazione massima compresa tra un 1/3 e un 1/10 della  $96hLC_{50}$ , rispettivamente nel caso sia stata evidenziata, o meno, la soglia letale incipiente (ISO, 1992).

##### 4.2 - SAGGIO DEFINITIVO

Nei saggi sull'accrescimento, come quello qui descritto, è stato osservato che la variabilità tra repliche costituite da gruppi di organismi, è generalmente molto più modesta della variabilità esistente all'interno della singola replica, quella che origina, cioè, dalle risposte dei singoli individui che la compongono (OECD, 1994). Il confronto tra organismi sembra quindi più informativo

che non il confronto tra gruppi di organismi, o in altre parole, l'uso del singolo organismo come di una replica, sembra essere l'impostazione sperimentale da preferire.

Per condurre il saggio definitivo si preparano almeno 5 diluizioni del campione di effluente più i necessari trattamenti di controllo, e tutti vengono allestiti singolarmente in volumi di almeno 40-50 L ciascuno. Se le informazioni tossicologiche preliminari non suggeriscono un diverso intervallo di sperimentazione, le diluizioni di effluente di scarico da adottare sono le seguenti: 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v). Queste diluizioni sono in serie geometrica, con fattore di diluizione pari a 0,5.

Se è stato necessario refrigerare i campioni, i volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, dopo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di  $15 \pm 1$  °C. Preparate le diluizioni previste, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima o inferiore al limite del 60 % del valore di saturazione si procede ad aerare i contenitori (cfr. par. 3.7 "Ossigeno disciolto"). Solo quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si possono introdurre i pesci opportunamente selezionati per taglia ed eventualmente marcati (cfr. par. 3.2 "Organismi per il saggio"). Si raccomanda che il trasferimento degli organismi ai contenitori del saggio venga effettuato con gli appositi retini, rapidamente e con la massima cura, al fine di minimizzare lo stress e non danneggiare gli organismi.

In ogni soluzione viene trasferito un numero minimo di 10 trote per ciascuna delle quali è stato registrato il peso e la lunghezza, oltre all'eventuale marchio di identificazione (OECD, 1984). Tuttavia, compatibilmente con il carico di biomassa ( $\sim 0,5$  g/L · d<sup>-1</sup>), è preferibile usare un maggior numero di individui, nell'ordine di 15-20 per ogni soluzione di saggio (ISO, 1992; OECD, 1994), rinunciando eventualmente alla loro marcatura che, come già indicato, richiede pesci di maggiori dimensioni.

Particolarmente nei casi in cui non siano disponibili dati preliminari, è consigliabile che gli organismi esposti alle concentrazioni più alte vengano osservati con maggiore frequenza durante le prime ore di esposizione. qualora l'effluente possieda un elevato grado di tossicità, sono infatti queste le concentrazioni in cui i pesci manifesteranno più rapidamente i sintomi di una intossicazione acuta in atto, e ciò è tanto più importante a causa della lunghezza del saggio. L'osservazione di effetti tossici nelle prime ore della sperimentazione lascia infatti prevedere che una frazione troppo modesta degli organismi impiegati potrà sopravvivere fino al termine della prova, verosimilmente un frazione così esigua da escludere la produzione di risultati significativi sull'inibizione dell'accrescimento. Nel caso ipotizzato si renderebbe neces-

sario migliorare l'intervallo di sperimentazione indicato, allestendo rapidamente altre concentrazioni di effluente, quali 3,1%, 1,5 %, 0,75%, ed adeguando i tempi di osservazione in base al ritardo di allestimento.

Quotidianamente si provvede alla somministrazione della dieta ed alla pulizia delle vasche. Si registrano e si rimuovono gli organismi deceduti e si registra ogni altra alterazione osservabile quale il cambiamento della colorazione, la perdita di equilibrio, il nuoto scoordinato, l'aumentata velocità respiratoria ed altre ancora. Nel rispetto del rapporto di carico si deve provvedere anche al rinnovo delle soluzioni di saggio che, in ogni caso, dovrebbe essere effettuato almeno una volta ogni 48h.

Al 13° giorno viene sospesa la somministrazione del cibo ed al 14° i pesci vengono nuovamente anestetizzati e si procede alla misura del peso e della lunghezza che essi hanno raggiunto (cfr. par. 3.2). In base agli obiettivi del saggio ed ai risultati ottenuti dai primi 14 giorni di esposizione, si può decidere di prolungare la sperimentazione sino al compimento del 28° giorno. In questo caso restano valide tutte le indicazioni e i suggerimenti forniti per la conduzione della prima parte del saggio.

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

### 5.1 - SAGGIO DEFINITIVO

Allo scopo di saggiare se in un corpo idrico sono presenti sostanze tossiche a concentrazioni tali da inibire l'accrescimento di trota iridea, si espone un certo numero di individui ad un campione non diluito delle sue acque. L'adozione di tale procedura deriva dal favorevole rapporto di diluizione che normalmente esiste tra le fonti di contaminazione e il corpo idrico recettore, per cui le concentrazioni degli inquinanti sono raramente tali da richiedere una diluizione per poter completare con successo l'osservazione di effetti subletali.

Naturalmente, se si sospetta un elevato grado di tossicità o si hanno dati pregressi che ne diano conferma, può rivelarsi vantaggioso allestire alcune diluizioni del campione del corpo idrico in esame. Nel qual caso è necessario attenersi alla procedura di saggio per effluenti descritta al par. 4.2.

Anche in questo tipo di saggio il trattamento espositivo viene effettuato in una singola replica, o meglio, utilizzando una sola vasca nella quale le trote, accuratamente selezionate in base alla taglia, vengono esposte all'acqua del corpo idrico "tal quale" (100% v/v). I singoli individui, eventualmente marcati, divengono in tal modo le repliche del trattamento e le loro risposte verranno confrontate con quelle di uno o più gruppi di individui di

controllo esposti ad acque naturali o sintetiche in funzione delle finalità della prova (cfr. par. 3.3).

Il numero degli organismi per ogni trattamento deve essere almeno di 10 ma sono certamente da preferire gruppi più consistenti, prossimi a 20. I diversi aspetti della procedura sperimentale quali, ad esempio, la dimensione delle trote, l'alimentazione durante la prova, la misurazione della lunghezza e del peso, la durata del saggio e così via, sono da considerare comuni alla metodica di saggio per acque di scarico e si rinvia, pertanto, ai paragrafi precedenti .

## 6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

I risultati dei saggi sono considerati validi se tra gli organismi del controllo si osserva una mortalità  $\leq 10\%$  e se la concentrazione di ossigeno disciolto non scende al di sotto del 60% del valore di saturazione.

## 7 - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Al termine del saggio vengono riportati i valori di peso fresco, lunghezza e velocità di crescita dei singoli organismi.

Se i pesci sono stati marcati (soluzione sperimentale "a"), per ciascuno di essi è possibile calcolare la velocità specifica di crescita ( $r_1$ ) secondo la seguente espressione:

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

dove  $w_1$  e  $w_2$  rappresentano il peso del pesce ai tempi  $t_1$  e  $t_2$ , rispettivamente inizio e termine, del periodo sperimentale considerato (ISO, 1992; OECD, 1994). Se i pesci non sono stati marcati (soluzione sperimentale "b"), non è possibile disporre per uno stesso individuo delle misurazioni ai tempi  $t_1$  e  $t_2$ , e pertanto non è calcolabile il valore di  $r_1$ . Tuttavia si può ottenere una valutazione di tipo intermedio che consiste nel calcolo della velocità di crescita "pseudo" specifica ( $r_2$ ) attraverso la seguente formula:

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

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

Mediante opportuni metodi statistici i valori di lunghezza, di peso fresco e di velocità di crescita ( $r_1$  o  $r_2$ ) determinati per gli organismi esposti al campione "tal

quale” o a sue diverse concentrazioni, vengono confrontati con i valori corrispondenti degli organismi di controllo. Se vengono dimostrate differenze statisticamente significative per almeno uno dei parametri, si può affermare che il campione contiene concentrazioni di contaminanti tali

da ridurre l'accrescimento di trota iridea e se si dispone di più livelli di effetto, per una serie scalare di concentrazioni, diventa possibile individuare la diluizione di “non effetto” (NOEC) del campione in esame.

## BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

# ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI DI SAGGI CRONICI

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

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

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

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

Nel caso sia stato possibile saggiare più diluizioni di un campione si dovranno analizzare più serie di dati relativamente ad uno od anche più parametri. Queste serie andranno confrontate con la/e serie corrispondenti degli organismi di controllo. Lo scopo è comunemente quello di individuare la massima concentrazione di campione i cui effetti non sono significativi, od anche, quella concentrazione di campione alla quale gli organismi possono essere esposti senza che i valori dei parametri misurati siano statisticamente distinguibili da quelli del gruppo di controllo. Questa concentrazione viene indicata con l'acronimo NOEC e viene solitamente individuata congiuntamente con la minima concentrazione, tra quelle saggate, che è stata capace di effetti significativi (LOEC). La procedura corretta è in questo caso l'analisi della varianza (ANOVA), mentre, al contrario, sarebbe inappropriato applicare ripetutamente il test  $t$  alle diverse coppie costituite da uno dei trattamenti e dal controllo. I presupposti per la corretta applicazione di ANOVA sono che i dati siano distribuiti normalmente e che la varianza dei gruppi sia omogenea. La prima condizione viene verificata con il test del Chi quadrato o con un test alternativo (es. Shapiro-Wilks), mentre la seconda, una volta soddisfatta la condizione di normalità, può essere verificata con il test di Bartlett o, parimenti, con test alternativi. Soddisfatte tali premesse, l'applicazione di ANOVA ad un criterio di classificazione, permetterebbe di concludere, in caso affermativo, che le differenze tra le medie dei diversi gruppi sperimentali sono significative. La verifica di variazione significativa tra i gruppi ottenuta mediante ANOVA è tuttavia un risultato generico che poco aggiunge alla caratterizzazione tossicologica del campione. Per ottenere informazioni più specifiche è necessario applicare altri

metodi statistici il cui scopo, coerentemente con quanto anticipato, è quello di individuare quali tra le concentrazioni di campione abbiano causato alterazioni significative del parametro in esame. Un test comunemente utilizzato a questo scopo è quello di Dunnett, poiché confronta ogni gruppo di organismi con il controllo. Tuttavia esistono vari metodi alternativi o complementari come, ad esempio, il test di Bonferroni, che è da preferire nel caso i gruppi abbiano un diverso numero di repliche, oppure il test di Williams, che è specifico per analizzare le risposte a concentrazioni crescenti di tossici, o il test di Tukey che è preferibile qualora si sia interessati a confrontare tutti i gruppi tra loro, non potendo presupporre, come in taluni studi di campo, che vi siano relazioni evidenti tra i diversi trattamenti. In generale è preferibile escludere da questi confronti i dati relativi ai trattamenti che hanno causato elevate mortalità.

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

Se sono stati osservati dei decessi tra gli organismi esposti al campione è possibile confrontare la mortalità degli organismi trattati con quella degli organismi di controllo e, compatibilmente con i criteri di validità del saggio, stabilire se il campione saggiato sia responsabile di effetti letali significativi. A tal fine si applica il test di Fisher che permette di verificare, come spesso nei test statistici, un'ipotesi nulla e cioè che la percentuale di organismi sopravvissuti nei gruppi posti a confronto non differisca significativamente. Si possono utilizzare anche altri metodi tra i quali, ancora, il test di Dunnett, previa tuttavia la necessaria trasformazione delle percentuali di sopravvivenza nei corrispondenti valori di arcoseno. Se i dati lo permettono e vi è interesse ad esprimere la tossicità come concentrazione letale per una percentuale definita di organismi ( $LC_{50}$ ,  $LC_{20}$  etc), si applicheranno gli stessi metodi (es. probit) già descritti per i saggi di tossicità acuta.

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

Questo tipo di risultati è dipendente dalla sequenza di concentrazioni saggiate, dal rapporto di diluizione prescelto, dalla variabilità dei risultati e quindi dalla qualità del lavoro sperimentale, ed inoltre, non è possibile associarvi stime di precisione o limiti fiduciali. Al contrario, esprimere la tossicità cronica come  $EC_{20}$ , o qualsiasi altra concentrazione di efficacia definita, permetterebbe di superare questi limiti ed offrirebbe alcuni innegabili vantaggi. Per esprimere la tossicità in questo modo, è necessario individuare la relazione esistente tra le concentrazioni di campione e le risposte del parametro indagato e ciò è possibile applicando dei metodi di regressione che sono solitamente parametrici ma, con opportuni aggiustamenti, è possibile usare anche procedure non parametriche. L'equazione di una curva logistica ha spesso dimostrato di poter descrivere in modo adeguato l'andamento delle risposte subletali (lunghezza, peso, riproduzione, ecc.) al crescere della concentrazione.

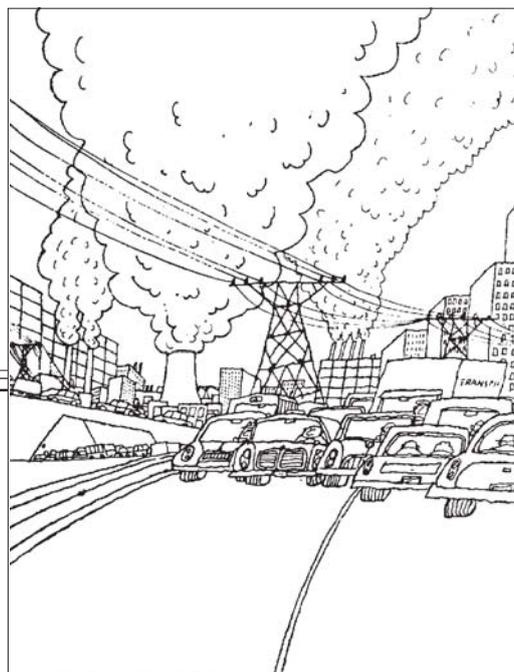
# L'UNIONE EUROPEA E L'AMBIENTE

*(Documenti a cura della rappresentanza a Milano della Commissione delle Comunità Europee. Aprile 1998)*

## Premessa

I cittadini europei sono preoccupati per l'ambiente, in quanto vogliono assicurare ai propri figli e nipoti lo stesso diritto ad avere aria ed acqua pulite e foreste sane e verdi. L'Unione europea, condividendo questa preoccupazione, ha accolto il principio dello sviluppo sostenibile. Obiettivo della politica ambientale dal 1992 è l'adeguamento dei modelli di crescita economica, consumo e produzione alla capacità dell'ambiente di sostenerne il peso nel lungo periodo, garantendo la continuità degli attuali ecosistemi. Il cambiamento climatico e la riduzione della fascia dell'ozono sono probabilmente due campi nei quali i limiti della sostenibilità sono stati superati. Prima del 1992 la politica ambientale dell'U.E. si concentrava su azioni correttive, in quanto non si era seguito un approccio volto ad integrare la protezione ambientale e le attività economiche negli altri settori che continuavano a danneggiare l'ambiente. Ora l'Unione europea promuove la compartecipazione e la condivisione delle responsabilità per prevenire e, ove possibile, contrastare il degrado ambientale e invita pertanto governi, industria e consumatori a coalizzarsi e ad impegnarsi al fine di conservare le risorse, riutilizzare e riciclare i prodotti usati, eliminare i rifiuti in maniera sicura e sviluppare fonti energetiche innocue per l'ambiente. L'inquinamento non conosce frontiere e l'Unione europea inquadra dunque la sua politica in una strategia globale mirante a salvaguardare l'ambiente a beneficio delle generazioni future.

Nel 1992 l'Unione europea si è prefissa un obiettivo ambizioso per il 2000, in risposta a vari studi effettuati, al



vertice di Rio e alle nuove disposizioni del trattato di Maastricht, al fine di porre le basi su cui costruire nel prossimo secolo lo sviluppo sostenibile.

Tale principio è stato sancito dal quinto programma in materia di ambiente del 1992 e ribadito nella proposta di revisione per tale programma di politica ed azione a favore dell'ambiente e di uno sviluppo sostenibile del 1996, nell'ambito del quale viene delineato un nuovo approccio all'ambiente, allo sviluppo ed alle attività economiche e sociali.

Il programma in questione segna una svolta nell'impostazione della politica ambientale, basata su cinque priorità fondamentali:

- integrazione dell'aspetto ambientale nelle altre politiche (agricoltura, trasporti, energia, industria, turismo);
- ampliamento degli strumenti (imposte, applicazione del concetto di responsabilità ambientale, valutazione dell'impatto ambientale, strumenti finanziari, ecc.);
- applicazione ed osservanza della normativa ambientale;
- sensibilizzazione ed informazione dei cittadini ai problemi legati alla tutela dell'ambiente;
- cooperazione internazionale in merito ai problemi ambientali.

I principi alla base del quinto programma sono stati confermati soprattutto negli ultimi tre anni anche per i trasporti, il settore che si è sviluppato in modo meno sostenibile dall'avvio del programma. E' ora evidente che per risolvere i gravi problemi di questo settore non basta

rendere sempre più severe le norme sulle emissioni degli autoveicoli. Alcune sostanze sono in aumento, così come altre emissioni già sotto controllo, a causa del previsto incremento del numero di autoveicoli in circolazione; esistono evidenti motivi economici per attuare un radicale cambiamento nel settore dei trasporti, individuando le strategie più opportune per risolvere i problemi attuali.

La Commissione ha già presentato alcuni documenti sulla politica dei trasporti e dell'energia per proporre, tra l'altro, un metodo di gestione della domanda che comporti sistemi di trasporto più integrati e sistemi di ottimizzazione del rendimento energetico.

Nel quadro della riforma della politica agricola comune, la Commissione si è impegnata a sviluppare ulteriori collegamenti tra strumenti di mercato in agricoltura e requisiti ambientali, diminuendo il sostegno ai prezzi di mercato in cambio di misure di aiuto diretto da collegare, eventualmente, a considerazioni di carattere ambientale.

Per quanto riguarda l'industria, la Commissione propone una maggiore assistenza alle PMI, al fine di consentire a queste imprese di utilizzare tecnologie pulite e partecipare appieno alla condivisione delle responsabilità dell'industria nel cammino verso uno sviluppo sostenibile. La Commissione sta inoltre tentando di sensibilizzare l'industria sui vantaggi che l'integrazione dell'ambiente nelle strategie aziendali offre sul piano dell'efficienza economica e della competitività.

Anche se la normativa continuerà ad essere uno strumento fondamentale della politica ambientale del-

l'Unione, la Commissione ritiene necessario dare maggiore importanza ad altri strumenti politici (come ad esempio l'introduzione di tasse e imposte ambientali), al fine di consolidare l'attuale progresso in direzione di uno sviluppo sostenibile.

Non deve essere trascurato il ruolo sempre più importante dell'UE a livello internazionale, in particolare per aiutare gli altri paesi a dirigersi verso uno sviluppo sostenibile, attraverso una maggiore cooperazione con i paesi confinanti dell'Europa centrale e orientale, i paesi del Mediterraneo e quelli del Baltico.

Tra gli argomenti che richiedono particolare attenzione si possono citare: cambiamento del clima e distruzione della fascia di ozono, acidificazione e qualità dell'aria, gestione delle risorse idriche, protezione della natura, rifiuti e gestione dei rischi connessi con gli impianti e con i prodotti chimici.

Con la proposta di revisione del programma d'azione sull'ambiente e sullo sviluppo sostenibile, la Commissione ha quindi lanciato una sfida ed ha riconosciuto che è indispensabile inviare ai cittadini europei chiari segnali circa l'importanza dello sviluppo sostenibile quale obiettivo strategico. Le azioni di oggi determineranno la qualità ambientale e la sostenibilità economica di domani. Per il futuro progresso sociale ed economico è indispensabile infatti garantire la quantità e la qualità delle risorse naturali. Se tutti gli operatori economici ai vari livelli dei settori interessati concentreranno i propri sforzi, entro la fine del secolo potranno essere costruite le basi per uno sviluppo sostenibile.

## Nuovi valori limite per la qualità dell'aria

La Commissione europea ha adottato una proposta di direttiva che stabilisce nuovi valori limite di qualità dell'aria per il biossido di zolfo, il biossido di azoto, le particelle e il piombo. Tale proposta è la prima di una serie da presentare conformemente al disposto della direttiva del Consiglio in materia di valutazione e di gestione della qualità dell'aria ambiente. L'obiettivo principale è di garantire un elevato livello di protezione della salute pubblica in tutto il territorio dell'Unione europea e di definire, per la prima volta, i valori limite di qualità dell'aria a scopo precipuo di tutela dell'ambiente. I nuovi valori limite si basano sulla versione riveduta delle linee guida sulla qualità dell'aria in Europa, adottate dall'Organizzazione mondiale della sanità nel 1996.

La proposta considera i seguenti aspetti principali: i valori limite per il biossido di zolfo, il piombo e le particelle, basati su criteri relativi alla salute pubblica, i quali devono essere applicati entro il 2005; i valori limite per il biossido di azoto basati su criteri sanitari e una serie di valori limite ancora più restrittivi per le particelle, da applicare entro il 2010; i valori limite per la protezione dell'ambiente nelle zone rurali contro gli effetti del biossido di zolfo e degli ossidi di

azoto; le modalità di valutazione degli agenti inquinanti in tutta l'UE ed infine l'obbligo di rendere facilmente disponibili al pubblico informazioni aggiornate su questi quattro agenti inquinanti. Per raggiungere questi obiettivi, in tutta l'UE occorre ridurre le emissioni di biossido di zolfo e di biossido di azoto di un ulteriore 10% circa rispetto a quanto già prefissato fino al 2010. Le emissioni di particelle negli agglomerati urbani dovranno essere ridotte di quasi il 50% rispetto ai valori attuali. La proposta adottata dalla Commissione rappresenta solamente un punto di partenza. Nel corso del 1998 e 1999, infatti, la Commissione presenterà altre proposte relative alla qualità dell'aria riferite sia alle concentrazioni di monossido di carbonio, benzene e ozono troposferico, sia a numerosi metalli pesanti e idrocarburi policiclici aromatici (IPA).

Dopo l'adozione della proposta da parte della Commissione, Ritt Bjerregaard, commissaria per l'ambiente, ha dichiarato che *"la qualità dell'aria nell'Unione europea è migliorata nell'arco degli ultimi dieci anni. Tutta-*

*via continuiamo ad assistere ad episodi di inquinamento che hanno importanti ripercussioni sulla salute umana. Recentemente, ad esempio, Dominique Voynet, ministro francese per l'ambiente, ha dovuto adottare severi provvedimenti di riduzione del traffico urbano per far fronte ai gravi problemi di inquinamento nella capitale. La direttiva-quadro sulla qualità dell'aria, adottata l'anno scorso dal Consiglio dei ministri, costituisce la base giuridica per garantire la protezione della salute dell'uomo e la tutela dell'ambiente in tutta l'Unione europea al minor costo possibile. La proposta della Commissione si iscrive appunto in questo quadro e contribuirà notevolmente al miglioramento della tutela della salute pubblica. Diminuirà così di alcune migliaia il numero dei decessi associati a malattie dovute all'inquinamento atmosferico e dei casi di ricovero d'urgenza, inoltre la popolazione in generale, ed in particolare le persone più sensibili, soffriranno meno di disturbi alle vie respiratorie e la qualità di vita migliorerà per molti cittadini. Per raggiungere i nostri obiettivi è necessaria una collaborazione tra le istituzioni comunitarie, i governi nazionali, le autorità locali e regionali, l'industria e la popolazione. Poiché tutti noi contribuiamo in un modo o nell'altro all'inquinamento atmosferico, dobbiamo partecipare alla soluzione del problema''.*

#### ELEMENTI ESSENZIALI DELLA

#### PROPOSTA DELLA COMMISSIONE

- Nuovi standard di qualità dell'aria per i quattro gruppi di sostanze inquinanti e date entro cui tali valori devono essere raggiunti.
- Piani d'azione degli Stati membri finalizzati alla riduzione delle emissioni onde raggiungere i livelli stabiliti entro le date previste.
- Procedure di valutazione (metodi uniformi di rilevamento del tasso di inquinamento e requisiti minimi relativi ai sistemi di monitoraggio della qualità dell'aria: numero e ubicazione delle stazioni di rilevamento, ecc.).
- Informazione rivolta ai cittadini.

#### L'IMPATTO DELLA PROPOSTA

##### LE EMISSIONI

##### *Biossido di zolfo*

Se i valori limite basati su criteri sanitari venissero rispettati in tutta l'Unione europea, le emissioni diminuirebbero ulteriormente del 10% circa rispetto a quanto già previsto fino all'anno 2010. Inoltre, se il Consiglio adottasse la proposta della Commissione sul tenore di zolfo nei carburanti liquidi, presentata nel marzo scorso, le emissioni di SO<sub>2</sub> potrebbero essere ridotte di un milione di

tonnellate all'anno, consentendo così il raggiungimento dei valori limite proposti già entro il 2005. Le analisi indicano che il valore limite stabilito per proteggere la popolazione contro gli effetti ecotossici è già ampiamente rispettato nelle zone rurali prestabilite.

##### *Biossido di azoto*

Si calcola che, rispettando i valori limite delle emissioni di NO<sub>2</sub> a tutela della salute pubblica in tutti gli agglomerati urbani dell'UE, tali emissioni diminuiranno di un ulteriore 10% rispetto alla tabella di marcia stabilita fino al 2010. Come per il biossido di zolfo, anche in questo caso il valore limite riferito agli effetti ecotossici è già ampiamente rispettato nelle zone rurali nelle quali andava applicato.

##### *Particelle*

I valori limite proposti per le particelle impongono rilevamenti delle PM<sub>10</sub>, ovvero le particelle con un diametro inferiore a 10 micron. Come tutte le particelle ambientali in genere, le PM<sub>10</sub> presentano una complessa struttura componenziale e provengono dalle fonti più disparate. I processi di combustione dei veicoli, degli impianti industriali e del riscaldamento domestico contribuiscono notevolmente all'emissione di particelle. Tuttavia le particelle che si formano nell'atmosfera provengono anche dalle emissioni di altri inquinanti, tra cui SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e ammoniacca. Per rispettare i valori limite proposti, occorrerà quindi ridurre le emissioni di tutti questi elementi inquinanti e di altri ancora. In città le emissioni dovranno diminuire del 50% circa rispetto ai valori attuali, in modo da raggiungere i valori proposti per il 2010 in tutta l'Unione europea.

Come è possibile stabilire i valori limite per le particelle se non esistono valori soglia riferiti ai loro effetti? I dati attualmente disponibili non consentono infatti di definire chiaramente i valori soglia al di sotto dei quali non si hanno effetti sulla salute, ma gli esperti ritengono sia comunque possibile fissare valori tali da garantire un elevato livello di protezione della salute pubblica. Inoltre, considerata la concentrazione di particelle attualmente piuttosto alta in alcune parti dell'UE e le diverse fonti di tale inquinamento, è necessario stabilire valori definiti che rappresentino un chiaro obiettivo da raggiungere per ridurre le emissioni.

##### *Piombo*

Grazie alla riduzione del consumo di benzina al piombo, nella maggior parte del territorio comunitario le concentrazioni di questo metallo nell'aria sono già inferiori rispetto al valore limite proposto. Con la graduale eliminazione della benzina contenente piombo, tali concentrazioni diminuiranno ulteriormente. I maggiori pro-

blemi rimarranno solamente in prossimità di alcuni impianti industriali, in particolare gli impianti di fusione dei metalli non ferrosi, per i quali i valori limite vanno stabiliti caso per caso.

#### ANTEFATTI

Nel 1996 il Consiglio ha adottato una direttiva in materia di valutazione e di gestione della qualità dell'aria ambiente, offrendo quindi un nuovo quadro per la definizione degli standard di qualità dell'aria ambiente, la cui osservanza è garantita in tutta l'Unione europea. Tale direttiva stabilisce infatti che la Commissione presenti proposte concernenti i valori limite dell'aria ambiente per una serie di inquinanti, allo scopo di tutelare la salute pubblica e l'ambiente. Tra le priorità definite dalla direttiva figura innanzitutto la revisione degli attuali valori limite per il biossido di zolfo, il biossido di azoto, le particelle e il piombo, alla luce dei dati più recenti riferiti ai loro effetti sulla salute e sull'ambiente.

#### EFFETTI DEL BISSIDO DI ZOLFO, DEL BISSIDO DI AZOTO, DELLE PARTICELLE E DEL PIOMBO SULLA SALUTE UMANA

I principali effetti del biossido di zolfo sulla salute umana si osservano a livello di apparato respiratorio. Ad alte concentrazioni si possono verificare disturbi della respirazione, in particolare nei soggetti asmatici. Un recente studio sull'inquinamento nelle città europee, finanziato dalla Commissione, ha rivelato inoltre che l'aumento di SO<sub>2</sub> è proporzionale all'incremento del numero giornaliero di ricoveri ospedalieri e di decessi.

Anche il biossido di azoto ha effetti a breve termine sulle vie respiratorie. Nei bambini un'esposizione prolungata si associa ad un aumento del tasso di infezioni dell'apparato respiratorio.

Per quanto concerne le particelle, una serie di recen-

ti studi, tra cui uno finanziato dalla Commissione, ha riscontrato un aumento dell'incidenza di attacchi di asma, del numero di ricoveri ospedalieri (in particolare per problemi respiratori) e del tasso di mortalità per malattie respiratorie e cardiopatie nei giorni in cui la concentrazione di particelle nell'aria è particolarmente alta. È difficile prevedere la portata di questi effetti dovuti a brevi periodi di aumentata emissione di particelle, soprattutto in termini di attesa di vita, ma un raffronto di tutti i risultati mostra chiaramente l'incidenza dei potenziali effetti delle particelle sulla salute pubblica. In base a studi a lungo termine si sospetta che l'esposizione cronica alle particelle possa ridurre significativamente l'attesa di vita.

Tra i principali effetti del piombo sulla salute umana si annoverano un basso quoziente intellettivo nei bambini e un aumento della mortalità neonatale a seguito dell'esposizione delle madri all'inquinamento da piombo.

#### EFFETTI DI QUESTI INQUINANTI SULL'AMBIENTE

Concentrazioni di biossido di zolfo nell'aria possono provocare danni alle piante in fase di crescita. Il biossido di azoto in concomitanza con il monossido di azoto è nocivo per la vegetazione. Entrambi fanno parte del gruppo dei maggiori inquinanti all'origine del processo di acidificazione. Il piombo che si deposita a terra forma degli accumuli nei vari strati del suolo e può nuocere direttamente ai microrganismi che lo compongono, compromettendo la crescita delle piante ed inoltre entrando nella catena alimentare degli animali. Il biossido di zolfo è il principale agente inquinante che influisce direttamente sulla velocità di deterioramento di numerosi materiali, tra cui anche i materiali da costruzione. Anche il biossido di azoto e le particelle possono avere lo stesso effetto distruttivo: gli antichi edifici e i monumenti storici che formano la ricchezza del patrimonio culturale europeo sono particolarmente vulnerabili a questi effetti.

**Tabella 1: Valori limite per il biossido di zolfo**

	Periodo medio	Valore limite	Data alla quale il valore limite deve essere rispettato
1. valore limite orario per la protezione della salute umana	1 ora	350 µgm <sup>-3</sup> da non superare più di 24 volte per anno civile <sup>1</sup>	1° gennaio 2005
2. valore limite giornaliero per la protezione della salute umana	24 ore	125 µgm <sup>-3</sup> , da non superare più di 3 volte per anno civile	1° gennaio 2005
3. valore limite per la protezione degli ecosistemi	anno civile e inverno (1° ottobre-31 marzo)	20 µgm <sup>-3</sup>	due anni a decorrere dall'entrata in vigore della direttiva

<sup>1</sup> Determinati per tutelare contro eventuali superamenti del limite di 10 minuti stabilito nelle linee guida dell'OMS sulla protezione della salute.

**Tabella 2: Valori limite per il biossido e il monossido di azoto**

	Periodo medio	Valore limite	Data alla quale il valore limite deve essere rispettato
1. valore limite orario per la protezione della salute umana	1 ora	200 $\mu\text{gm}^{-3}$ NO <sub>2</sub> da non superare più di 8 volte per anno civile	1° gennaio 2010
2. valore limite annuale per la protezione della salute umana	anno civile	40 $\mu\text{gm}^{-3}$ NO <sub>2</sub>	1° gennaio 2010
3. valore limite annuale per la protezione della vegetazione	anno civile	30 $\mu\text{gm}^{-3}$ NO + NO <sub>2</sub>	due anni dall'entrata in vigore della direttiva

**Tabella 3: Valori limite per le particelle (PM<sub>10</sub>)**

	Periodo medio	Valore limite	Data alla quale il valore limite deve essere rispettato
Fase 1			
1. valore limite di 24 ore per la protezione della salute umana	24 ore	50 $\mu\text{gm}^{-3}$ PM <sub>10</sub> da non superare più di 14 volte l'anno	1° gennaio 2005
2. valore limite annuale per la protezione della salute umana	anno civile	30 $\mu\text{gm}^{-3}$ PM <sub>10</sub>	1° gennaio 2005
Fase 2			
1. valore limite di 24 ore per la protezione della salute umana	24 ore	50 $\mu\text{gm}^{-3}$ PM <sub>10</sub> da non superare più di 7 volte l'anno	1° gennaio 2010
2. valore limite annuale per la protezione della salute umana	anno civile	20 $\mu\text{gm}^{-3}$ PM <sub>10</sub>	1° gennaio 2010

**Tabella 4: Valori limite per il piombo**

	Periodo medio	Valore limite	Data alla quale il valore limite deve essere rispettato
1. valore limite annuale per la protezione della salute umana	anno civile	0,5 $\mu\text{gm}^{-3}$	1° gennaio 2005

**Tabella 5: Linee guida dell'OMS del 1996 per la qualità dell'aria in Europa**

	Periodo medio	Concentrazione ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
biossido di zolfo: effetti sulla salute	10 minuti	500
	24 ore	125
	1 anno	50
biossido di zolfo: effetti ecotossici	media annuale e invernale	10 - 30 in funzione del tipo di vegetazione
biossido di azoto: effetti sulla salute	1 ora	200
	1 anno	4U
biossido e monossido di azoto: effetti ecotossici	1 anno	30
PM <sub>10</sub>	24 ore	dose/risposta
	un anno	dose/risposta
piombo	un anno	0,5

## Strategia per combattere l'acidificazione a livello di Unione Europea

La Commissione europea ha adottato una proposta della commissaria per l'ambiente, Ritt Bjerregaard, relativa a una strategia europea per combattere l'acidificazione al fine di ridurre in modo rilevante, entro il 2010, l'estensione delle aree dell'Unione europea nelle quali viene superato il livello di tolleranza degli ecosistemi sensibili all'acidità. Gli elementi principali della strategia comprendono la determinazione di limiti massimi nazionali di emissione per ogni sostanza inquinante contenuta nelle piogge acide; la ratifica del protocollo delle Nazioni Unite per l'ulteriore riduzione delle emissioni di zolfo; una proposta di direttiva per la limitazione del contenuto in zolfo degli oli combustibili pesanti; la revisione della direttiva sui grandi impianti di combustione; la designazione del mar Baltico e del mare del Nord come aree di controllo dell'anidride solforosa; la promozione di misure economicamente vantaggiose per ridurre le emissioni nei paesi dell'Europa centrale e orientale. Le previsioni attuali indicano che, in assenza di tale strategia, l'estensione delle aree colpite raggiungerebbe nel 2010 gli 8,7 milioni di ettari. L'applicazione della strategia ridurrebbe tale dato a 4,5 milioni di ettari.

La strategia presentata dalla Commissione deve essere considerata una fase di transizione verso la completa eliminazione del problema dell'acidificazione nell'Unione europea. Nel dicembre 1995 il Consiglio dei Ministri per l'ambiente aveva invitato la Commissione a elaborare tale strategia e a presentarla nella prima metà del 1997. La strategia proposta costituisce la risposta della Commissione alla richiesta del Consiglio. Contemporaneamente la Commissione ha anche approvato due azioni specifiche che formano parte integrante della strategia, ossia

- a) una proposta di direttiva per ridurre le emissioni di anidride solforosa derivante dalla combustione di certi tipi di combustibili liquidi. Viene proposto un tenore massimo di zolfo dell'1% per gli oli combustibili pesanti (usati principalmente nelle centrali e nell'industria) e dello 0,2% per il gasolio (usato per esempio per il riscaldamento domestico). Secondo le stime il risultato della proposta sarà una riduzione fino a 1 milione di tonnellate all'anno delle emissioni di anidride solforosa.
- b) una proposta di decisione del Consiglio con la quale l'Unione europea ratificherebbe il protocollo per un'ulteriore riduzione dello zolfo nel quadro della convenzione UN ECE sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero a grande distanza. La convenzione UN ECE ha dimostrato di essere un mezzo estremamente efficace per affrontare i problemi transfrontalieri a livello paneuropeo. L'Unione europea ha già firmato tale protocollo e la Commissione ritiene importante che il protocollo sia ratificato ed entri in vigore al più presto.

La commissaria Ritt Bjerregaard ha dichiarato a questo proposito:

*“L'impatto dell'inquinamento con effetto acidificante sugli habitat naturali dell'Unione europea, in particolare sui laghi e sulle foreste, è una delle problematiche ambientali più importanti che l'Unione europea deve affrontare. A causa della natura transfrontaliera del problema dell'acidificazione, un'azione concertata nell'Unione europea sarà considerevolmente più efficace di iniziative unilaterali da parte di singoli Stati membri. Allo stato attuale una parte rilevante degli habitat naturali dell'Unione europea è esposta a livelli di depositi acidi che superano i rispettivi livelli di tolleranza: tale situazione non è più sostenibile. La strategia proposta si basa su un'ampia valutazione scientifica delle misure economicamente più vantaggiose per ridurre le emissioni di anidride solforosa, di biossidi di azoto e di ammoniaca, che sono le sostanze inquinanti responsabili dell'acidificazione e prevede una serie di misure interconnesse e complementari a livello di Unione europea, di Stati membri e a livello regionale/locale”*

### COS'È L'ACIDIFICAZIONE?

I principali accusati sono tre sostanze inquinanti: l'anidride solforosa, i biossidi di azoto e l'ammoniaca. Tali gas, emessi da varie fonti (v. tabella 1) sono trasportati nell'atmosfera talvolta per migliaia di chilometri. Quando si depositano nel terreno o nell'acqua essi ne aumentano l'acidità. La maggior parte dei terreni e delle acque possono tollerare un certo grado di acidità ma il livello di tolleranza varia molto nell'Unione Europea. Quando viene oltrepassato il livello di tolleranza di un ecosistema (il termine tecnico per livello di tolleranza è «carico critico») i processi naturali sono alterati, con conseguenti effetti, talvolta drammatici, come quelli dell'impovertimento dei laghi e la morte delle foreste. L'unico modo efficace di limitare l'acidificazione consiste nella riduzione delle emissioni di  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$  e  $\text{NH}_3$ .

Nonostante considerevoli progressi nella riduzione delle emissioni, l'acidificazione costituisce ancora un grave problema ambientale per vaste aree forestali ed ecosistemi di acque correnti nell'Unione Europea. Nel 1990 i carichi critici per l'acidificazione sono stati superati in più di 33 milioni di ettari di ecosistemi sensibili nell'Unione Europea, un'area corrispondente a quella del Regno Unito, della Danimarca e dei Paesi Bassi.

**QUALI SONO I NOSTRI OBIETTIVI RISPETTO ALL'ACIDIFICAZIONE?**

L'obiettivo finale di qualità ambientale della strategia per combattere l'acidificazione, fissato nel quinto programma di azione dell'Unione Europea in materia ambientale, è quello di non superare in alcun luogo i carichi critici. Tale obiettivo rispecchia la ferma intenzione dell'Unione europea di rendere operativo il concetto di sviluppo sostenibile: avendo comunque riconosciuto la difficoltà di realizzare l'obiettivo nell'immediato futuro, il Consiglio ha conseguentemente chiesto alla Commissione di presentare una strategia per combattere l'acidificazione, invitandola a fissare degli obiettivi provvisori nell'ottica della realizzazione dell'obiettivo finale. La strategia presentata dalla Commissione mira a una riduzione progressiva dell'area degli ecosistemi colpiti.

**QUALE SARÀ L'IMPATTO DELLA STRATEGIA IN TERMINI DI RIDUZIONE DELLE EMISSIONI?**

Come risultato delle misure esistenti o già programmate, le emissioni di inquinanti ad effetto acidificante saranno già state ridotte considerevolmente per il 2010, ma sarà necessario in ogni caso realizzare ulteriori riduzioni sostanziali. Una valutazione preliminare dei livelli di emissione compatibili con il raggiungimento dell'obiettivo è esposta nella tabella 2.

**QUALI SARANNO I BENEFICI DELLA STRATEGIA PROPOSTA?**

Viene stimato che per il 2010 la strategia della Commissione ridurrà la superficie degli ecosistemi nei quali sono superati i carichi critici da 8,7 milioni di ettari (stima attuale della situazione raggiunta nel 2010 in assenza della strategia) a 4,5 milioni di ettari (tabella 3).

La strategia avrà anche importanti effetti collaterali positivi sulla salute umana e sui danni fisici con risparmi valutati a circa 20 miliardi di ECU all'anno.

**QUANTO COSTERÀ?**

Sulla base di una valutazione preliminare il costo aggiuntivo della strategia viene stimato a circa 7 miliardi di ECU all'anno (v. tabella 4). In pratica i costi saranno inferiori perché l'uso di energia verrà limitato per raggiungere gli obiettivi climatici già approvati dal Consiglio.

**QUALI SONO GLI ELEMENTI DELLA STRATEGIA DELLA COMMISSIONE?**

- fissazione per ciascuno Stato membro di limiti massimi nazionali delle emissioni di ciascun inquinante,
- ratifica del protocollo del 1994 per l'ulteriore riduzione delle emissioni di zolfo,
- adozione di una direttiva che limiti il tenore in zolfo degli oli combustibili pesanti,

- revisione della direttiva sui grandi impianti di combustione,
- designazione del mar Baltico e del mare del Nord come aree di controllo dell'anidride solforosa,
- promozione di misure economicamente vantaggiose di riduzione delle emissioni nei paesi dell'Europa centrale e orientale,
- intensificazione dell'analisi relativa a misure economicamente vantaggiose per il controllo delle emissioni di ammoniaca,
- riduzione delle emissioni imputabili al trasporto stradale e alle macchine mobili non stradali,
- risparmio energetico e ricorso a fonti alternative per consentire una riduzione delle emissioni di anidride solforosa e di biossidi di azoto. Le attuali iniziative dell'Unione Europea relative al consumo di energia e alle emissioni di CO<sub>2</sub>, nel contesto del dibattito sul cambiamento climatico, avranno un impatto rilevante sulle emissioni di inquinanti ad effetto acidificante, riducendole in modo considerevole. Programmi quali JOULE, FAIR, ALTENER e SAVE contribuiranno alla conservazione dell'energia e allo sviluppo di fonti alternative di energia pulita. A loro volta tali iniziative comporteranno la riduzione delle emissioni di inquinanti ad effetto acidificante.

**LA PROPOSTA DI DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE SUL TENORE IN ZOLFO DI DETERMINATI COMBUSTIBILI LIQUIDI**

L'anidride solforosa è uno dei principali agenti di acidificazione. Nell'analisi scientifica posta a base della strategia contro l'acidificazione della Commissione la riduzione delle emissioni di anidride solforosa derivanti dalla combustione di determinati tipi di combustibili liquidi è stata considerata parte integrante di una strategia economicamente vantaggiosa per combattere l'acidificazione nell'Unione Europea. La combustione di combustibili liquidi contribuisce per circa il 30% al totale delle emissioni di SO<sub>2</sub> nell'Unione Europea (v. tabella 5). Al fine di ridurre le emissioni di SO<sub>2</sub> derivanti dalla combustione di combustibili liquidi la Commissione ha suggerito di limitare il tenore in zolfo di alcuni di tali combustibili.

La Commissione ha proposto una direttiva che fissa dei limiti al tenore in zolfo degli oli combustibili pesanti e del gasolio. La proposta è basata sull'articolo 130S del trattato, coerentemente con il suo principale obiettivo, che è la protezione dell'ambiente: la scelta di tale base giuridica consente agli Stati membri anche di fissare norme più restrittive, a condizione che qualunque proposta relativa a tali norme sia notificata in conformità della direttiva 83/189/CEE. Inoltre gli Stati membri che hanno già fissato norme più restrittive sono autorizzati a mantenerle.

Quasi il 20% del totale delle emissioni di SO<sub>2</sub> deriva dalla combustione di oli combustibili pesanti, principalmente nelle centrali e nell'industria. Il tenore in zolfo di tale tipo di combustibile può arrivare al 4%. La Commissione ha proposto un tenore massimo di zolfo dell'1%. La proposta della Commissione prevede deroghe per le regioni nelle quali sussistono determinate condizioni ambientali e per gli impianti di combustione che realizzano bassi livelli di emissioni di SO<sub>2</sub> attraverso l'utilizzazione di metodi alternativi, quali la desolfurazione dei gas di combustione.

Per quanto riguarda il tenore in zolfo del gasolio la Commissione ha ritenuto che non sarebbe economicamente vantaggioso ridurre il valore limite generale dello

0,2% di zolfo, come previsto dalla direttiva vigente. Gli Stati membri che intendono introdurre norme più restrittive devono notificare i loro progetti in conformità delle disposizioni della direttiva 83/189/CEE. Gli Stati membri, quali l'Austria e la Finlandia, che dispongono già di norme più restrittive (il valore limite applicabile in entrambi i paesi è dello 0,1%) sono autorizzati a mantenere le loro norme attuali.

Si prevede che la proposta della Commissione ridurrà le emissioni di SO<sub>2</sub> derivanti dalla combustione di combustibili liquidi fino a 1 milione di tonnellate l'anno (v. tabella 6). Il costo stimato della proposta sarà di circa 750 milioni di ECU all'anno (v. tabella 7).

**Tabella 1: Emissioni di inquinanti ad effetto acidificante per settore (1990): Unione Europea**

Settore	% di SO <sub>2</sub>	% di NO <sub>x</sub>	% di NH <sub>3</sub>
Grandi impianti di combustione (LCP) > 300 MW	56	19	0
LCP 50-300 MW	7	2	0
Altri impianti di combustione	24	13	0
Processi industriali	4	2	3
Trasporto stradale	3	51	0
Altri tipi di trasporto	2	12	0
Rifiuti	0	1	1
Agricoltura	0	0	94
Naturali	3	0	2
	100%	100%	100%

Fonte: CORINAIR 1990

**Tabella 2: Sintesi dei livelli di emissioni per l'Unione Europea**

	1990	2010 (programmi attuali)	2010 (per realizzare l'obiettivo provvisorio)
SO <sub>2</sub>	16,5	5,6	2,7
NO <sub>x</sub>	13,4	6,9	6,0
NH <sub>3</sub>	3,5	3,0	2,5

**Tabella 4: Costi aggiuntivi del controllo delle emissioni per la realizzazione dell'obiettivo provvisorio (milioni di ECU/anno)**

	SO <sub>2</sub>	NO <sub>x</sub>	NH <sub>3</sub>	Totale
UE15	2940	1795	2305	7040

**Tabella 3: Ecosistemi nei quali sono superati i carichi critici di acidificazione. Situazione nel 1990, nel 2010 ai programmi attuali (quadro di riferimento (RIF)) e dopo applicazione della strategia di anti-acidificazione (STRAT) (migliaia di ettari)**

Paese	1990	2010 (RIF)	2010 (STRAT)
Austria	2896 (59%)	943 (19%)	642 (13,2%)
Belgio	477 (77%)	117 (19%)	9 (1,4%)
Danimarca	174 (18%)	38 (3,9%)	21 (2,2%)
Finlandia	5016 (16%)	1211 (3,8%)	1144 (3,6%)
Francia	618 (4,3%)	82 (0,6%)	40 (0,3%)
Germania	6972 (80%)	2541 (29%)	978 (11,3%)
Grecia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Irlanda	23 (4,8%)	4 (0,7%)	1 (0,1%)
Italia	1160 (18%)	285 (4,3%)	103 (1,6%)
Lussemburgo	15 (17%)	7 (7,5%)	2 (2,2%)
Paesi Bassi	282 (88%)	121 (38%)	23 (7,3%)
Portogallo	1 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Spagna	74 (0,9%)	24 (0,3%)	10 (0,1%)
Svezia	10108 (23%)	1235 (2,8%)	699 (1,6%)
RU	4741 (60%)	2112 (27%)	809 (10,3%)
UE15	32557 (24%)	8719 (6,5%)	4481 (3,3%)

**Tabella 5: Totale delle emissioni di SO<sub>2</sub> di diversi combustibili nel 1993**

COMBUSTIBILE	1993 Emissioni di SO <sub>2</sub> (UE15)	
	Milioni di ton/anno	%
Benzina	0,09	0,6
Cherosene	0,03	0,2
Gasolio/Diesel	1,08	7,0
Depositi	0,3	2,0
Oli combustibili pesanti	2,82	18,4
Carbone	9,66	62,9
Combustibili di raffineria	0,99	6,5
Altri	0,38	2,5
TOTALE	15,35	100

**Tabella 6: Stima delle emissioni di SO<sub>2</sub> nel 2010 (in migliaia di tonnellate) derivanti dalla combustione di combustibili pesanti con indicazione dell'impatto della proposta della Commissione**

	Riferimento/ situaz. ordinaria	con l'1% di zolfo	differenza
Belgio	104,1	54,4	49,7
Danimarca	12,2	10,6	1,4
Germania	125,2	76,2	49,0
Grecia	79,0	27,4	51,6
Spagna	400,1	151,9	248,2
Francia	177,1	63,6	113,5
Irlanda	94,6	33,7	60,9
Italia	500,2	240,7	259,5
Lussemburgo	0,2	0,1	0,1
Paesi Bassi	18,2	17,7	0,5
Austria	22,9	21,9	1,0
Portogallo	74,7	32,4	42,3
Finlandia	36,0	35,9	0,1
Svezia	23,6	23,6	-
Regno Unito	451,2	197,5	253,5
TOTALE	2119,0	987,6	1131,4

**Tabella 7: Incrementi di costo per paese e per settore industriale collegati all'introduzione del limite dell'1 % di zolfo per i combustibili pesanti (milioni di ECU/anno)**

Paese/Settore	Raffinerie & altre convenzionali	Altre industrie	Uso domestico	Trasporti	Centrali	Totale
Belgio	19,1	0,0	7,1	9,1	2,1	37,4
Danimarca	0,5	0,0	0,4	0,0	0,4	1,2
Germania	17,5	25,4	0,1	0,0	0,2	43,3
Grecia	5,1	2,3	0,6	16,2	11,0	35,1
Spagna	44,0	74,0	18,4	20,7	21,0	178,1
Francia	37,1	27,4	6,4	0,0	1,9	72,7
Irlanda	0,5	16,5	3,3	0,0	19,5	39,9
Italia	11,3	20,1	0,1	0,0	68,0	99,6
Lussemburgo	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
Paesi Bassi	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,4
Austria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5
Portogallo	4,6	21,3	3,0	0,3	4,3	33,6
Finlandia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Svezia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Regno Unito	9,2	8,4	35,3	2,5	162,2	217,5
TOTALE	148,9	195,8	74,8	48,8	291,1	759,4

## La dimensione energetica del cambiamento climatico

In previsione della terza conferenza delle Parti alla Convenzione quadro delle Nazioni Unite sul cambiamento climatico tenuta a Kyoto nel dicembre 1997, la Commissione europea ha elaborato, su iniziativa del commissario per l'energia, Christos Papoutsis, una comunicazione sulla dimensione energetica del cambiamento climatico volta a mettere in evidenza la sfida a carico dei responsabili delle politiche energetiche, individuare alcuni settori di intervento e promuovere un ampio dibattito sulle modalità da seguire per ridurre del 15% le emissioni di gas ad effetto serra tra il 1990 ed il 2010. La comunicazione costituisce un primo passo verso la messa a punto di misure ed azioni che permetteranno di rispettare gli impegni assunti ed affrontare i problemi posti dal cambiamento climatico.

In una dichiarazione, il commissario Christos Papoutsis ha sottolineato che: *"Il cambiamento climatico è un argomento che preoccupa tutti. I cittadini europei si aspettano da noi una decisa volontà politica per ridurre le emissioni di CO<sub>2</sub> e di altri gas. La politica energetica svolge in questo quadro un ruolo chiave. L'autentica sfida che ci troviamo ad affrontare consiste nell'adottare politiche efficaci e realistiche in campo energetico. L'Unione europea deve fare il possibile affinché la Conferenza di Kyoto si concluda con la firma di un protocollo volto a ridurre le emissioni di gas ad effetto serra in misura significativa. Data l'ampiezza delle modifiche strutturali che potrebbero rendersi necessarie per attuare le decisioni di Kyoto, dobbiamo essere consapevoli del fatto che sarà necessario un cambiamento radicale delle scelte politiche per rispondere agli imperativi della tutela dell'ambiente e dello sviluppo economico sostenibile continuando al tempo stesso a fornire energia sicura, economica e pulita"*.

Considerate le tendenze attuali, si stima che nel 2010 le emissioni di CO<sub>2</sub> saranno superiori dell'8% circa a quelle del 1990. Pertanto, il problema è tale da richiedere all'Unione europea e agli Stati membri di elaborare congiuntamente politiche e misure globali nel quadro di un approccio integrato.

A tal fine, è necessario sottolineare i seguenti aspetti:

- per conseguire una riduzione del 15% delle emissioni di gas ad effetto serra entro il 2010 sono necessarie decisioni importanti in materia di politica energetica, dalla riduzione dell'intensità energetica, attraverso la gestione e il risparmio dell'energia, alla riduzione del tenore di carbonio mediante fonti energetiche rinnovabili;

- per raccogliere una sfida di questa portata è necessario mobilitare tutte le risorse disponibili ed adottare una strategia specifica volta a massimizzare i risultati attraverso la ricerca delle soluzioni più efficaci e praticabili nei settori di intervento quali: efficienza e risparmio energetico, cooperazione tra operatori economici, accordi ambientali, maggiore diffusione delle fonti energetiche rinnovabili, migliore gestione energetica a livello locale, insulare e regionale, promozione della cogenerazione, integrazione con altre politiche, tecnologia e innovazione, limitazione dei gas ad effetto serra diversi da CO<sub>2</sub>, strumenti fiscali, ecc.

Alla conferenza mondiale di Kyoto si è raggiunta un'intesa di compromesso sulle emissioni di gas ad effetto serra con la firma di un protocollo da parte dei 38 paesi più industrializzati; non vi hanno aderito quelli che non intendono frenare la crescita economica più disordinata, come la Cina.

In media è stata concordata una riduzione del 5,2% rispetto alle emissioni del 1990, anno di riferimento. L'Europa si è impegnata a scendere dell'8% (si è presentata a Kyoto proponendo un -15% medio, con quote diverse secondo i singoli paesi), gli Usa del 7% (dopo aver suggerito la stabilizzazione al livello del 1990), il Giappone del 6%.

Malgrado le critiche si può ritenere che l'accordo sia comunque un passo importante e positivo verso uno sviluppo sostenibile per i seguenti motivi:

1. per la prima volta esiste un accordo corredato da date e impegni precisi che implica investimenti ingenti a breve termine, a fronte di benefici a lungo termine;
2. l'accordo non risolve il problema del clima, ma traccia un percorso di sviluppo economico favorevole all'ambiente. Nei prossimi anni i paesi oggi firmatari potranno attrarre nell'accordo i paesi emergenti e in via di sviluppo. Questa strada, già sperimentata con successo in accordi ambientali meno complessi (come il Protocollo di Montreal sui Cfc) trova appoggio nella più avanzata teoria dei negoziati internazionali;
3. l'accordo non è basato su prescrizioni amministrative, ma lascia amplissimo spazio a strumenti economici flessibili, come il meccanismo dei permessi negoziabili e le compensazioni tra diversi gas serra. Questi strumenti consentiranno di ridurre le emissioni senza danneggiare lo sviluppo economico.

# PER SAPERNE DI PIÙ sull'ambiente e sullo sviluppo economico in Europa

PER OTTENERE INFORMAZIONI SPECIFICHE SU:

## AMBIENTE, SICUREZZA NUCLEARE E PROTEZIONE CIVILE

Direzione generale XI  
Information and Communication  
Saturnino Muñoz Gómez  
Fax (32-2) 296 95 60  
Web site: <http://www.cc.cec:8080/en/comm/dg11/dg11home.html>

### *Programma LIFE*

Per le azioni nel settore dell'**ambiente**  
Fax (32 2) 296 95 61

Per le azioni nel settore della **protezione della natura**  
Fax (32-2) 296 95 56

Per le azioni nel settore dei **paesi terzi**  
Fax (32-2) 299 4123

## AFFARI SCIENTIFICI, RICERCA E SVILUPPO

Direzione generale XII  
General Information  
E-mail: [info-dgl2@dgl2.cec.be](mailto:info-dgl2@dgl2.cec.be)

Øtto von Schwerin  
Fax (32-2) 295 82 20

Michel Claessens  
Fax (32-2) 295 82 20  
E-mail: [michel.claessens@dgl2.cec.be](mailto:michel.claessens@dgl2.cec.be)

Stephen Gosden  
Fax (32-2) 295 82 20  
E-mail: [stephen.gosden@dgl2.cec.be](mailto:stephen.gosden@dgl2.cec.be)

### *Programma di ricerca*

*Ambiente e clima*  
Julia Acevedo Bueno  
Fax (32-2) 296 30 24  
E-mail: [environ-infodesk@dgl2.cec.be](mailto:environ-infodesk@dgl2.cec.be)

## ENERGIA

Direzione generale XVII

### *Programmi Altener, SAVE*

Fonti di energia rinnovabile e uso razionale dell'energia  
A. Colling  
Fax (32-2) 295 58 52

## AGENZIA EUROPEA DELL'AMBIENTE

Kongens Nytorv 6  
DK-1050 København K  
Tel. (45) 33 36 7100  
Fax (45) 33 36 7199

General Information  
E-mail: [eea@eea.eu.int](mailto:eea@eea.eu.int)

Library and Information services  
Albertus Jansen  
Tel. (45) 33 36 7164  
Fax (45) 33 36 72 99  
E-mail: [albertus.jansen@eea.eu.int](mailto:albertus.jansen@eea.eu.int)  
Web site: <http://www.eea.eu.int/>

## CONTATTARE IN ITALIA

### LIFE

Dott. Vincenzo La Presa  
Ministero dell'Ambiente  
Via Stoppani, 71  
I-00197 Roma  
Tel. (39-6) 807 70 56  
Fax (39-6) 808 43 74

**DOVE PROCURARSI I DOCUMENTI PUBBLICATI DALLE ISTITUZIONI EUROPEE****UFFICIO DELLE PUBBLICAZIONI UFFICIALI DELLE COMUNITÀ EUROPEE (UPUCE)**

L-2985 Luxembourg

Fax (352) 29 29-42763

Internet: <http://europa.eu.int/en/comm/upoce/wel.html>oppure <http://europa.eu.int/en/pubistat.html>**PUNTI DI VENDITA DELL'UFFICIO DELLE PUBBLICAZIONI IN ITALIA:**

Licosa SpA

Via Duca di Calabria 1/1

Casella postale 552

I-50125 Firenze

Tel. (39-55) 64 54 15

Fax (39-55) 64 12 57

E-mail: [licosa@ftbcc.it](mailto:licosa@ftbcc.it)**MILANO**

Corso Magenta, 59

I-20123 Milano

Tel. (39-2) 467 5141

Fax (39-2) 481 85 43

**UFFICIO DEL PARLAMENTO EUROPEO**

Roma

Via IV Novembre, 149

I-00187 Roma

Tel. (39-6) 69 95 01

Fax (39-6) 69 95 02 00

*Commissione europea Direzione generale X Task force  
«Azioni prioritarie d'informazione» Rue de la Loi 57  
Ufficio 6/47 s-1040 Bruxelles*

**L'UNIONE EUROPEA SU INTERNET****EUROPA**Server Internet della Commissione europea: <http://europa.eu.int>**EUROPARL**Server Internet del Parlamento europeo: <http://www.europarl.eu.int>European Parliament Document Exchange Server: <http://www.eppe.be>**DOVE INFORMARSI NEL VOSTRO STATO MEMBRO****UFFICI DI RAPPRESENTANZA DELLA COMMISSIONE EUROPEA****ROMA**

Via Poli, 29

I-00187 Roma

Tel. (39-6) 69 99 91

Fax (39-6) 679 16 58/679 36 52

Telex (043) 316200 EURMIL I

## Eurostat per tutti attraverso il Data Shop

Il Data Shop consente l'accesso diretto ai dati statistici relativi ai quindici Stati membri dell'Unione europea e fornisce, a pagamento, statistiche armonizzate, affidabili e comparabili, banche dati complete, risposte personalizzate e prodotti su misura per le diverse esigenze del settore politico, economico, finanziario, universitario, ecc.

Eurostat Data Shop  
presso ISTAT Centro di Informazione Statistica  
Piazza della Repubblica, 22  
20124 Milano  
Tel: 02 6595133-4  
Fax: 02 653075  
su appuntamento: Elena Longoni



Corso di formazione e aggiornamento professionale:

## CARATTERIZZAZIONE DELLA BIOMASSA IN IMPIANTI DI DEPURAZIONE A FANGHI ATTIVI

AGAC, via Gastinelli 30, Reggio Emilia

2-6 novembre 1998

### Lunedì 2 novembre

- Presentazione del corso - P. Madoni
- Problematiche e prospettive nella rimozione biologica dei nutrienti dalle acque di scarico - G. Bortone
- Significato e utilità delle stime di attività biologica dei fanghi attivi - G. Andreottola
- Analisi microscopica del fango attivo: principi e tecniche - P. Madoni
- Guida al riconoscimento dei principali microrganismi filamentosi tramite l'ausilio del software Lisa-Micro ed inizio della osservazione microscopica del fango - C. Stefanini, L. Meglioli

### Martedì 3 novembre

- Disfunzioni degli impianti connesse con la struttura del fango attivo: bulking, foaming, rising, pin point, washout, ashing ed effluente torbido - D. Davoli
- Esercitazioni: caratterizzazione del fiocco di fango e identificazione dei principali batteri filamentosi tramite osservazione microscopica e colorazioni (Gram, Neisser, test di China, test dello zolfo) - B. Vezzani, M. Vezzani

### Mercoledì 4 novembre

- Esercitazioni: caratterizzazione del fiocco di fango e identificazione dei principali batteri filamentosi tramite osservazione microscopica e colorazioni (Gram, Neisser, test di China, test dello zolfo) - C. Davoli, L. Meglioli
- Prosecuzione dell'esercitazione con analisi completa di campioni di fango e refertazione tramite Lisa-Micro - B. Vezzani, C. Stefanini

### Giovedì 5 novembre

- Aspetti operativi nella progettazione dei selettori e nella predisposizione del dosaggio di chemicals - M. Pergetti
- Esercitazioni: il corsista, attraverso l'utilizzo delle tecniche e delle informazioni apprese nelle giornate precedenti, dovrà analizzare situazioni verificatesi in impianti a fanghi attivi individuando la principale disfunzione e proponendo i possibili interventi correttivi - L. Guglielmi, D. Davoli

### Venerdì 6 novembre

- Esercitazioni: il corsista, attraverso l'utilizzo delle tecniche e delle informazioni apprese nelle giornate precedenti, dovrà analizzare situazioni verificatesi in impianti a fanghi attivi individuando la principale disfunzione e proponendo i possibili interventi correttivi - L. Guglielmi, D. Davoli

### Finalità e contenuti:

*Il corso intende offrire a coloro che a vario titolo operano nel campo della ricerca e della gestione degli impianti di depurazione a fanghi attivi, un momento di formazione ed approfondimento attorno a temi riguardanti la rimozione dei nutrienti e le anomalie legate a cattiva sedimentabilità del fango attivo. Il corso pone particolare attenzione alla qualificazione della biomassa, alla sua attività ed al suo valore di indicatore nei confronti di alcune disfunzioni.*

*Gli aspetti teorici sono completati da esercitazioni pratiche per la comprensione dei fenomeni e per la ricerca delle possibili soluzioni ai casi di studio affrontati.*

*N.B. - Al termine del Corso viene organizzato un Ring Test sull'analisi microscopica dei fanghi attivi per operatori esperti.*



### Segreteria e informazioni:

Servizio Controllo Qualità  
Sig.ra Maura Davoli

AGAC, Via Gastinelli 30, Reggio Emilia  
Tel. 0522 297207  
Fax 0522 297542

DIP. MEDICINA SPERIMENTALE ED APPLICATA,  
SEZ. IGIENE, UNIVERSITÀ DI BRESCIA

ISTITUTO DI RICERCA SULLE ACQUE - CNR  
BRUGHERIO (MI)

Corso pratico:

**APPLICAZIONI DI TEST DI  
GENOTOSSICITÀ SU BATTERI E PIANTE  
PER IL CONTROLLO DELLE  
ACQUE POTABILI**

Brescia

24-26 novembre e 1-3 dicembre 1998

**Obiettivi Formativi**

Il corso ha lo scopo di far sperimentare le principali tecniche di concentrazione delle acque, di applicare alcuni test batterici manuali e automatizzati (test di Ames e Mutatox) e di acquisire le tecniche di conduzione di due test di mutagenesi su piante (*Tradescantia*/micronuclei test e *Allium* test). Durante il corso verranno mostrate le modalità di ricerca on-line delle caratteristiche genotossicologiche degli inquinanti e della bibliografia sul tema utilizzando le risorse della rete Internet.

**Destinatari**

Il corso è diretto a biologi e medici che lavorano presso i laboratori degli acquedotti, dei Presidi Multizonali, delle Agenzie Regionali per l'Ambiente, dell'Università, dei Centri Privati di Controllo Ambientale, e che sono interessati ad acquisire o ad approfondire le tecniche per la valutazione dell'attività mutagena delle acque potabili.

**Svolgimento**

La durata del Corso è di tre giorni consecutivi, a scelta dal 24 al 26 novembre 1998 oppure dal 1 al 3 dicembre 1998.

Per permettere di sperimentare personalmente le tecniche, il Corso è aperto ad un massimo di 15 partecipanti a settimana.

*Direttore del corso:*

Prof. **Silvano Monarca**

Ordinario di Igiene, Facoltà di Medicina e Chirurgia,  
Università di Brescia

*Con la collaborazione di:*

Dr.ssa **Licia Guzzella**

IRSA-CNR, Brugherio (MI)

Prof. **Roberto Barale**

Ordinario di Genetica, Università di Pisa

Dr.sse **Donatella Ferretti, Ilaria Zerbini, Silvia Manfredi**

Dip. di Medicina Sperimentale ed Applicata, Sez. Igiene,  
Università di Brescia



**Segreteria scientifica:**

*Dr.sse Donatella Ferretti e Ilaria Zerbini  
Dip. di Medicina Sperimentale ed Applicata,  
Sezione di Igiene, Università di Brescia  
Via Cantore 20, Brescia  
Tel. 030 3838611-3838608  
Fax 030 3701404*