

Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale

# biologia ambientale

# 5

settembre  
ottobre  
1992

BOLLETTINO C.I.S.B.A. anno VI n. 27

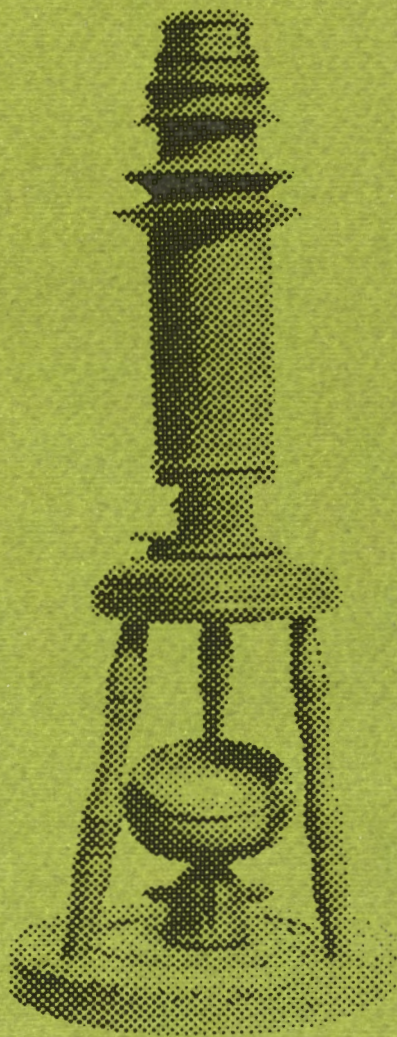
ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

SAGGIO DI TOSSICITA' CON

# DAPHNIA

MILANO, 29 OTTOBRE 1991

ISTITUTO DI RICERCA SULLE ACQUE  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE







# biologia ambientale

Bollettino C.I.S.B.A. n. 5/1992

direttore responsabile  
**Paolo Carta**

## REDAZIONE

<b>Rossella Azzoni</b>	responsabile di redazione
<b>Giuseppe Sansoni</b>	responsabile grafico
<b>Roberto Spaggiari</b>	responsabile di segreteria

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, c/o Dipartimento della Prevenzione USL n° 9, via Amendola 2, C.P. San Maurizio - 42100 Reggio Emilia* o telefonare al Segretario: *Roberto Spaggiari: 0522/295460; fax 0522/295446*

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

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.

Gli articoli originali e altri contributi vanno inviati alla Redazione:  
*Rossella Azzoni Gastaldi, via Cola di Rienzo, 26 - 20144 Milano.*

I dattiloscritti, compreso il materiale illustrativo, saranno sottoposti a referee 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.



ISTITUTO DI RICERCA SULLE ACQUE

Quaderni  
A cura di C.M. Blundo

93

ISSN 0390-6329

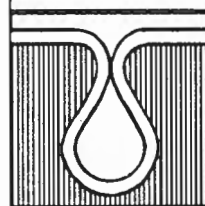
# SAGGIO DI TOSSICITA' CON DAPHNIA

Atti della Giornata di Studio organizzata dall'Istituto di Ricerca sulle  
Acque del C.N.R., in collaborazione con la USSL 75/III di Milano e il  
Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale

Milano, 29 ottobre 1991

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Roma, 1991



## PRESENTAZIONE

*Il 29 ottobre 1991 si è tenuto a Milano un incontro di lavoro tra specialisti che operano nel settore dell'analisi e del controllo dell'inquinamento delle acque con metodi biologici e, in particolare, con saggi di tossicità.*

*Durante tale incontro è stata riconosciuta unanimamente la necessità di sopperire agli inconvenienti che presenta il saggio di tossicità previsto dalla tabella A della legge 319/76, con l'adozione di un saggio alternativo che, insieme ad una maggiore facilità di esecuzione, assicuri il necessario livello di protezione ambientale.*

*L'organismo più idoneo per tale saggio è stato identificato nel crostaceo Daphnia magna, già previsto o adottato in altre metodologie di controllo di contaminanti, e già noto ai biologi che operano presso gli enti addetti ai controlli ambientali, grazie al preliminare lavoro di informazioni del CISBA e di talune Università.*

*Si tratta ora di procedere alla modifica della legge perché la proposta diventi norma dello Stato.*

*Si auspica che tale modifica, che spetta al Parlamento, possa avvenire con la sollecitudine che i problemi dell'ambiente esigono per una loro soluzione, alla quale ci si augura possa contribuire questo quaderno, che raccoglie i principali interventi dell'incontro di Milano.*

*Il Direttore  
Roberto Passino*

## INDICE

- 1 - IL SAGGIO DI TOSSICITA' DELLA 319/76: PREGI, DIFETTI E ALTERNATIVE  
L. Guzzella e R. Marchetti
- 2 - METODI PER LA DETERMINAZIONE DI EFFETTI TOSSICI ACUTI CON *DAPHNIA MAGNA*  
R. Marchetti e L. Viganò
- 3 - L'ALLEVAMENTO DI *DAPHNIA*  
R. de Bernardi
- 4 - PROBLEMI RELATIVI AI SAGGI DI TOSSICITA' CON *DAPHNIA*  
G. Gorbi, E. Manfredi e F. Moroni
- 5 - RISULTATI DELL'ESERCIZIO DI INTERCALIBRAZIONE SUL SAGGIO DI TOSSICITA' CON *DAPHNIA MAGNA*  
L. Viganò
- 6 - USO DI *DAPHNIA MAGNA* NEL CONTROLLO IDROPOTABILE D'EMERGENZA  
M. Amodei e R. Azzoni
- 7 - DETERMINAZIONE DEGLI EFFETTI TOSSICI SU *DAPHNIA MAGNA* DI ELUATI OTTENUTI DA RIFIUTI SPECIALI, TOSSICI E NOCIVI  
F. Moroni, M. Rozzi, R. Spaggiari, C. Lazzaretti e R. Messori
- 8 - TEST CRONICI DI TOSSICITA' CON *DAPHNIA MAGNA* SU SEDIMENTI FLUVIALI. Considerazioni sulla possibilità di confronto di due metodi biologici  
N. De Marco, E. Barabas, M. Lucchese, R. Loro e M. Zanetti
- 9 - APPLICAZIONE DEL SAGGIO DI TOSSICITA' CON *DAPHNIA MAGNA* SUGLI EFFLUENTI DEI DEPURATORI CIVILI DELLA PROVINCIA DI PAVIA  
A. Berri e G. Guarnaschelli

## CONTENTS

- 1 - THE TOXICITY TEST IN LAW 319/76: MERITS, DEFECTS AND ALTERNATIVES  
L. Guzzella and R. Marchetti
- 2 - METHODS FOR THE ASSESSMENT OF ACUTE TOXIC EFFECTS WITH *DAPHNIA MAGNA*  
R. Marchetti and L. Viganò
- 3 - THE CULTURE OF *DAPHNIA MAGNA*  
R. de Bernardi
- 4 - PROBLEMS RELATED TO *DAPHNIA* TOXICITY TEST  
G. Gorbi, E. Manfredi and F. Moroni
- 5 - RESULTS OF THE RING TEST ON THE *DAPHNIA MAGNA* TOXICITY TEST  
L. Viganò
- 6 - USE OF *DAPHNIA MAGNA* IN DRINKING WATER EMERGENCY CONTROL  
M. Amodei and R. Azzoni
- 7 - ASSESSMENT OF TOXIC EFFECTS ON *DAPHNIA MAGNA* OF EXTRACTS OBTAINED FROM SPECIAL, TOXIC AND HAZARDOUS WASTES  
F. Moroni, M. Rozzi, R. Spaggiari, C. Lazzaretti and R. Messori
- 8 - CHRONIC TOXICITY TEST WITH *DAPHNIA MAGNA* ON RIVER SEDIMENTS. Considerations on the possibility of comparing two biological methods  
N. De Marco, E. Barabas, M. Lucchese, R. Loro and M. Zanetti
- 9 - APPLICATION OF THE *DAPHNIA MAGNA* TOXICITY TEST TO THE EFFLUENTS OF SEWAGE TREATMENT PLANTS IN THE PROVINCE OF PAVIA  
A. Berri and G. Guarnaschelli

L. Guzzella e R. Marchetti

Istituto di Ricerca sulle Acque, C.N.R. - Brugherio (MI)

## 1.1 Introduzione

I saggi di tossicità richiesti dalla legge 319/76, sono stati inseriti nelle tabelle che fanno parte integrante della legge per una serie di ragioni, riconducibili sinteticamente alle seguenti:

- i saggi di tossicità assicurano una copertura dal punto di vista della protezione ambientale, anche nei riguardi dei contaminanti non considerati nelle tabelle della legge e di quelli di difficile determinazione chimica;
- consentono di individuare effetti semplicemente additivi e più che additivi tra i vari fattori di tossicità, effetti non altrimenti valutabili;
- danno una risposta diretta al quesito se il campione in esame possa essere dannoso per la vita acquatica.

Quest'ultima caratteristica dei saggi di tossicità assume particolare rilevanza se si considera che la maggior parte dei parametri riportati nelle tabelle, è stata formulata (Marchetti e Coll., 1973) proprio in funzione della protezione della vita acquatica, considerata come l'«utente» che, per ragioni di ubiquitarità e sensibilità, dava le maggiori garanzie ai fini della tutela dell'ambiente.

Nella logica di un progressivo adeguamento dei limiti ad obiettivi di qualità sempre più elevati, la legge 319/76, in origine, si poneva un primo traguardo transitorio, delineato dai limiti della tabella C, ed uno più avanzato, rappresentato da quelli della tabella A ulteriormente riducibili in funzione degli obiettivi dei piani regionali di risanamento o di particolari esigenze locali (Direttiva del Comitato Interministeriale per la tutela delle acque dall'inquinamento, G.U. n. 9 del 10/1/81). In questa logica di transitorietà, anche i saggi di tossicità sono stati formulati con criteri progressivamente restrittivi, utilizzando due specie, il *Carassius auratus* e il *Salmo gairdneri* (oggi denominato *Onchorhynchus mykiss*), la prima delle quali, il pesce rosso, è dotata di una resistenza ai tossici generalmente superiore a quella dell'altra.

### Riassunto

A quindici anni dall'entrata in vigore della legge 319/76 per le acque di scarico vengono riesaminati i vantaggi e gli svantaggi che comporta l'esecuzione del saggio di ittiotossicità previsto dalla legge. Viene inoltre presa in considerazione la possibilità di modificare l'attuale procedura, proponendo l'introduzione di un saggio di tossicità acuta con dafnia.

### Summary

The advantages and disadvantages of carrying out the acute toxicity test with *Salmo gairdneri* for the evaluation of waste water toxicity according to the bill 319/76, were considered. Successively the possibility of adopting a different type of test (i.e. the acute toxicity test with *Daphnia magna*) in alternative to the one established by the present bill was evaluated.

## 1.2 Vantaggi della scelta della trota iridea

Come è noto, la condizione di transitorietà è stata superata e, con l'eccezione degli scarichi in fognatura sprovvisti di depuratori o di limiti di accettabilità al depuratore, per i quali vale ancora



la tabella C, l'organismo attualmente richiesto per il saggio di tossicità dalla 319/76 per lo scarico di effluenti in corpi idrici superficiali, è la trota iridea.

Il motivo della scelta di un vertebrato, come organismo ideale per il saggio, è stato in primo luogo di ordine logico, ponendosi i pesci al livello più elevato del sistema trofico acquatico. L'individuazione della specie, invece, è guidata, in primo luogo da ragioni tossicologiche concernenti l'alto livello di sensibilità della trota iridea e, in secondo luogo dal fatto che, fin dall'epoca della scelta, le conoscenze sulle risposte di questa specie ai tossici erano notevolmente più numerose ed approfondite che per qualsiasi altro organismo acquatico. La situazione oggi non è diversa, essendo stati effettuati con questa stessa specie, gli studi più approfonditi di tossicologia acquatica ed il più grande numero di saggi per la valutazione della tossicità di sostanze pure e di effluenti. Oltre che per questi motivi la scelta è stata effettuata anche perché in altri Paesi nei quali la tossicologia acquatica negli anni '70-'80 ha avuto il maggiore sviluppo (Gran Bretagna, USA, Svizzera), la specie in questione, si è vieppiù imposta come organismo idoneo ad essere impiegato sia in saggi di tossicità da effettuare in condizioni standard per ragioni di sorveglianza ambientale, sia per la compilazione di liste di dati di tossicità per le nuove sostanze chimiche.

### 1.3 Svantaggi del saggio con la trota iridea

Nella realtà italiana, nonostante l'impostazione della legge, il saggio di tossicità, salvo casi particolari, non ha, per contro, ricevuto molta attenzione o è stato applicato con difficoltà e insuccessi. Queste difficoltà e i motivi degli insuccessi possono essere individuati a vari livelli.

Al livello che si potrebbe definire "storico", esiste tutt'oggi la tendenza generale a fare riferimento più alle analisi chimiche tradizionali che a quelle biologiche, le cui potenzialità sono ignote ai più, nonostante questo tipo di saggi sia oramai ampiamente riconosciuto nei più importanti testi di analitica delle acque (basterebbe a questo proposito citare lo Standard Methods che, nella sua ultima edizione, le sedicesima, riserva ai saggi biologici ben 134 pagine).

Esiste poi un motivo di tipo "culturale" che potrebbe giustificare il rifiuto di una metodologia analitica che introduce concetti non abituali (quale è quello di variabilità biologica, che comporta un

determinato grado di incertezza nell'esito dell'analisi) e che richiede una diversa operatività (per l'allevamento degli organismi in buono stato di salute, per la scelta delle condizioni alimentari ottimali, per il rilevamento delle risposte nel corso del saggio, ecc.) da quella che altri tipi di analisi, di norma, richiedono.

Ancora a livello culturale, un probabile motivo del ritardo è da ricercare in una sottovalutazione di fondo del significato per cui si è introdotto nella normativa di legge, il saggio di tossicità, che viene ritenuto interessante dal punto di vista della tutela della vita acquatica, ma non degli altri usi. A questo proposito già è stato ricordato, invece, che il saggio ha una funzione più ampia sul piano della protezione ambientale, in quanto un'acqua giudicata idonea per la vita acquatica, può ritenersi in larga misura tale anche per altri usi, con la riserva dei contaminanti microbici nel caso dell'uso potabile o di quello balneare. E' questo, probabilmente, il motivo per cui molte Unità Sanitarie Locali, non riconoscendo questa funzione più generale dei saggi di tossicità, non ne richiedono l'applicazione ai laboratori dei Presidi Multizonali incaricati dei controlli.

Al livello "pre-operativo", inoltre, va riconosciuto che il saggio con i pesci pone non poche oggettive difficoltà. Queste si presentano in qualche caso addirittura sul piano della reperibilità degli animali necessari per le prove e spesso su quello dell'ottenimento di una taglia costante durante tutto l'anno. Prima ancora di iniziare il saggio, problemi si presentano inoltre per la conservazione degli animali in condizioni metaboliche e sanitarie idonee, il che implica, tra l'altro, recipienti di grandi dimensioni per la stabulazione e per il ricambio continuo con acque di buone caratteristiche ed esenti da cloro.

Al livello di esecuzione del saggio, infine, le difficoltà non sono minori sia sul piano operativo, che su quello dell'equipaggiamento richiesto che non è usuale per un laboratorio convenzionale di controllo dell'inquinamento e, in taluni casi, anche di difficile reperimento sul mercato.

Se un certo numero di laboratori ha superato queste difficoltà e fa regolare uso del saggio di tossicità previsto dalla legge, altri, per contro, hanno riconosciuto che questa serie di inconvenienti è stata determinante nell'esclusione del saggio stesso.

Da un'inchiesta condotta di recente dall'IRSA, su un campione limitato di 32 laboratori dei Presidi Multizonali, di cui il 60% al Nord, il 34% al Centro e il 6% al Sud (Tab. 1.1), è emerso quanto

segue: dei laboratori intervistati 10 (31%) posseggono le attrezzature per lo svolgimento del test e le utilizzano tutte le volte che questo viene richiesto dalle rispettive Unità Sanitarie Locali; 4 (13%) hanno a disposizione le attrezzature, ma non le utilizzano; 18 (56%) non dispongono di alcuna attrezzatura per il saggio di ittiotossicità.

La metà dei laboratori che si sono attrezzati per il saggio lo hanno fatto negli anni '70, quando entrò in vigore la legge 319/76. L'altra metà ha, invece, acquistato l'attrezzatura solo di recente, negli ultimi cinque anni ed intende avviare ora, o lo ha già fatto, i primi saggi di ittiotossicità.

Mediamente vengono saggiati dai laboratori attrezzati il seguente numero di campioni all'anno:

Campioni analizzati	<10	10-50	50-100	>100
% dei laboratori	40	20	10	30

In tutti i casi considerati i saggi vengono condotti secondo la Metodica IRSA (IRSA, 1978) con la sola eccezione di due laboratori che non utilizzano acqua standard per la diluizione del campione.

Le maggiori difficoltà incontrate da chi esegue il test ittico sono riassunte nella tabella 1.2, dalla quale risulta che i problemi di tipo organizzativo ed alcuni di quelli metodologici, potrebbero riproporsi anche nell'ipotesi di una eventuale sostituzione del saggio con i pesci con altri saggi di tossicità. Altre difficoltà incontrate dai laboratori potrebbero, invece, essere in parte superate impiegando saggi biologici che richiedano un minor volume d'acqua, un costo più contenuto per il mantenimento degli animali, una ridotta disponibilità di spazio e che siano più standardizzati per

Tab. 1.1

Risultati relativi all'indagine svolta dall'IRSA per verificare quali laboratori dei Presidi Multizonali utilizzino il saggio di ittiotossicità

Laboratori intervistati		32
Distribuzione	Nord	60%
	Centro	34%
	Sud	6%
Eseguono il saggio		31%
Dispongono di attrezzature, ma non eseguono il saggio		13%
Mancano di attrezzature		56%
N° di campioni analizzati per anno	< 10	40%
	10-50	20%
	50-100	10%
	> 100	30%
		N° LABOR.

quanto riguarda le caratteristiche degli organismi.

La maggior parte delle difficoltà incontrate sono state, comunque, affrontate e risolte con successo dai laboratori dei Presidi Multizonali che eseguono il test di ittiotossicità con regolarità. Più interessante è, invece, la valutazione delle problematiche affrontate, e non risolte, da quei

Tab. 1.2

Difficoltà incontrate per l'esecuzione del saggio di ittiotossicità nei Presidi Multizonali (alcuni laboratori hanno fornito più di una risposta)

PROBLEMA	%
<b>ORGANIZZATIVO</b>	
carezza di personale	16
difficoltà di collaborazione col laboratorio chimico	12
<b>ECONOMICO</b>	
temperatura costante e consumi d'acqua	16
<b>METODOLOGICO</b>	
allevamento a temperatura costante	16
allevamento in acqua standard	12
eccessivo volume del campione per l'analisi	12
taglia costante dei pesci	8
spazio necessario	8

Tab. 1.3

Difficoltà che hanno determinato l'inapplicabilità del saggio di ittiotossicità nei Presidi Multizonali (alcuni laboratori hanno fornito più di una risposta)

PROBLEMA	%
<b>ORGANIZZATIVO</b>	
carezza di personale	27
mancanza di richiesta	16
difficoltà di collaborazione col laboratorio chimico	11
<b>ECONOMICO</b>	
costo delle attrezzature	11
<b>METODOLOGICO</b>	
allevamento a temperatura costante	13,5
mancanza di stabulario	13,5
impossibilità reperimento acqua di buona qualità	8



laboratori che ancora non si sono attrezzati per il saggio (Tab. 1.3). La maggior parte di queste difficoltà (il 54%) sono di tipo organizzativo (carenza di personale, poca collaborazione con i laboratori di chimica, mancata richiesta di esecuzione del saggio) e dovrebbero, comunque, essere risolte per poter effettuare un qualsiasi saggio biologico di tossicità sulle acque.

Altro elemento emerso dal censimento si riferisce all'utilizzo, già in parte avviato o in corso di attivazione, di altri saggi tossicologici. Il 44% dei laboratori, infatti, alleva o intende allevare la *Daphnia magna* per saggi di tossicità acuta. Il 19% dei laboratori ha acquistato, o intende farlo al più presto, la strumentazione per il saggio batterico di bioluminescenza. Il 3% si è rivolto, invece, all'utilizzo di un saggio algale di inibizione della crescita.

Di rilevante interesse è, infine, il fatto che il 22% dei laboratori sarebbe fin d'ora favorevole all'esecuzione di un saggio multispecie con i pesci, crostacei e batteri; il 9% ad un saggio in parallelo con pesci e crostacei.

Questo è il quadro che emerge dalla valutazione dei risultati dell'indagine svolta dall'IRSA, quadro che non si discosta molto da quello rilevato nel 1986 (Viganò e Coll., 1987). In tale occasione il 24% dei laboratori intervistati aveva dichiarato di essere in grado di svolgere il saggio di tossicità con il carassio, il 28% di aver utilizzato soltanto in passato le attrezzature e il 48% di non avere alcuna attrezzatura.

## 1.4 Proposte alternative

Considerato il rilevante significato che il saggio di tossicità ha ai fini della sorveglianza ambientale, per superare le difficoltà che si sono frapposte alla adozione generalizzata del metodo con la trota iridea, l'IRSA, l'istituto indicato nella legge 319/76 come ente cui compete di proporre modifiche ai limiti e di predisporre i metodi di analisi, ha ritenuto opportuno vagliare la possibilità di individuare alternative al saggio attualmente previsto nella tabella della legge.

Le alternative prese in esame, tenuto conto delle condizioni operative in cui si trova in Italia la maggior parte dei laboratori addetti ai controlli, sono state le seguenti:

- eliminazione del saggio di ittitossicità;
- sostituzione della trota iridea con altro organismo analogo (pesci);
- sostituzione della trota iridea con invertebrato;
- sostituzione della trota iridea con un organismo appartenente ad altri livelli trofici.

La prima alternativa è stata scartata considerato il ruolo, più volte riconosciuto, dei saggi biologici come strumento ideale di protezione ambientale.

Anche la seconda alternativa è stata scartata in quanto altre specie di pesci avrebbero comportato problemi analoghi a quelli del saggio con la trota iridea, senza assicurare altrettanta sensibilità e, quindi, grado di protettività nelle risposte.

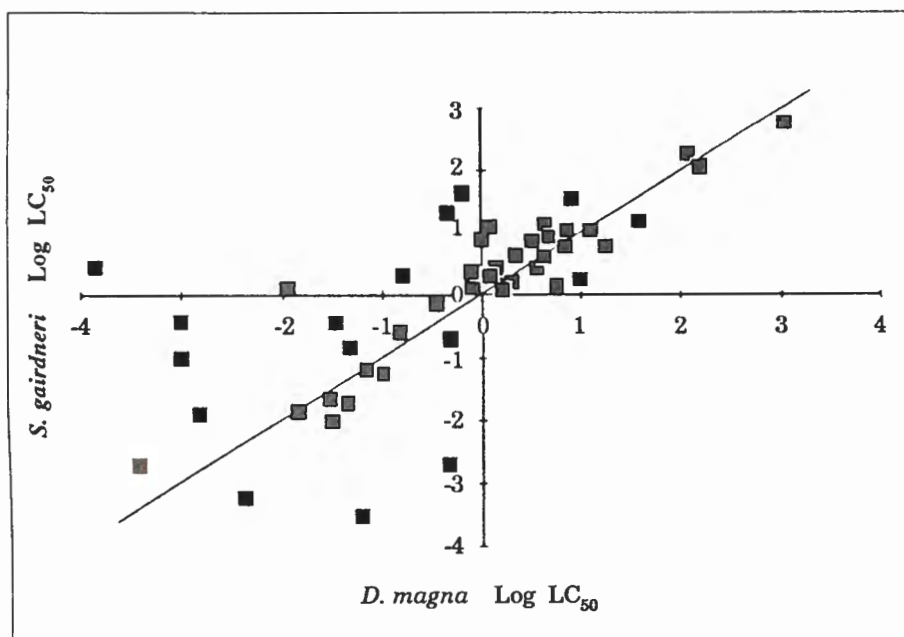


Fig. 1.1  
Confronto dei valori di  $LC_{50}$  ottenuti eseguendo test di tossicità acuta con trota iridea e dafnia per 49 elementi e composti (41 previsti dalla legge 319/76 e 9 non previsti da tale legge).

Un'analisi delle possibilità offerte dalla terza alternativa (invertebrato) ha portato ad individuare in *Daphnia magna* la specie più idonea. La dafnia infatti presenta un buon livello di sensibilità ai tossici, confrontabile con quello della trota (Fig. 1.1) e offre notevoli facilitazioni sul piano operativo (gli organismi in questione sono abbastanza piccoli da non creare problemi "logistici", ma abbastanza grandi da non costituire un inconveniente dal punto di vista delle osservazioni). La *Daphnia* è stata scelta, inoltre, in quanto già richiesta per altri saggi di controllo ambientale (Direttiva CEE n. 67/658 per le nuove sostanze chimiche) e raccomandata dalle principali organizzazioni (OCSE, AFNOR, U.S.EPA, ISO) che si occupano di problemi di sorveglianza ambientale e che hanno già proceduto ad impostare le procedure con cui effettuare il saggio (ISO, 1982; AFNOR, 1983; OECD, 1984; Peltier e Weber, 1985). Un motivo della scelta, infine, è da ricercare nell'ipotesi di adozione, per omogeneità, di un analogo organismo da destinare ai controlli di legge in acque salmastre e marine.

L'ultima delle alternative prese in esame, è stata quella di considerare come organismi per il saggio, alghe e batteri, e cioè organismi appartenenti a livelli trofici molto differenti da quelli considerati in precedenza. Fermo restando l'obiettivo di ottenere una semplificazione della metodologia in uso in Italia, onde favorirne una più ampia diffusione, il saggio con dafnia è stato anteposto a quello con le alghe in quanto quest'ultimo presenta alcune difficoltà a livello procedurale (mantenimento di colture axeniche, tempi maggiori per la prova); è più costoso in fatto di strumentazione (contatori elettronici di particelle); è più soggetto a interferenze (da parte delle condizioni nutrizionali o delle variazioni chimiche del mezzo indotte soprattutto dal processo di fotosintesi) e dà risposte difficilmente comparabili a quelle ottenibili con il test con la trota iridea.

Anche se questo tipo di saggio si è dimostrato molto utile per la valutazione della tossicità di sostanze pure e, in taluni casi, adatto anche al rilevamento di contaminanti presenti in scarichi civili e industriali (Joubert, 1981; Walsh e Coll., 1982), si può in altri termini concludere che, di per sé, la metodologia di sorveglianza ambientale basata sulla risposta delle alghe non può essere proposta come sostitutiva del saggio con la trota iridea.

Il saggio con dafnia è stato preferito, infine, anche a quelli che utilizzano i batteri. I batteri in generale sono meno sensibili di altri organismi in

valutazioni tossicologiche con composti singoli, mentre sembrano in grado di dare risposte paragonabili a quelle ottenute con altri saggi quando si opera con effluenti (Gucci e Coll., 1991). Le procedure sono inoltre in generale piuttosto semplici, tanto da essere disponibili, in qualche caso, in forma di "kit" (Microtox, Lumistox, Toxi-chromo test, ATP test, Dipstick, ecc.) e i tempi di esecuzione sono brevi. Inoltre, alcuni di questi saggi sono stati sottoposti a verifiche dell'U.S.EPA (1987), dal Californian Regional Water Analysis Control Board (1987), dal Bureau de Normalization dello Stato del Quebec (1987) con risultati promettenti. Nella scelta tra saggio con dafnia e saggi con batteri, allo stato attuale delle conoscenze si è ritenuto, tuttavia, che il quadro tossicologico offerto dalle procedure che fanno ricorso ai batteri non fosse ancora del tutto soddisfacente dal punto di vista delle garanzie offerte sul piano della protezione ambientale.

## 1.5 Soluzioni ottimali e scelte di necessità

Se, a conclusione di questa analisi delle possibili alternative, l'organismo più idoneo, nell'ipotesi di una sostituzione della trota iridea, è risultato essere la dafnia, va precisato che tale indicazione è da considerare, allo stato attuale, transitoria e determinata, come è stato già ricordato, dalla necessità di facilitare le operazioni di sorveglianza ambientale sempre più irrinunciabili e urgenti.

Fatta questa precisazione, va però anche ricordato che, se l'obiettivo è quello della tutela della salute dell'uomo e dell'ambiente, il saggio con dafnia non può essere considerato che una risposta parziale alle necessità che tale obiettivo pone. Tali necessità possono essere risolte solo adottando una ulteriore alternativa, che è quella dei "saggi multispecie" e dei "battery test" che già vengono utilizzati per la valutazione delle nuove sostanze chimiche (Direttiva CEE 67/658), ma ai quali si guarda con sempre maggiore interesse anche ai fini del controllo tossicologico di effluenti (Svanberg e Coll., 1988; Dutka e Coll., 1990; Vasseur e Coll., 1991). E' nel contesto di un approccio multispecifico che i saggi con singoli organismi (batteri, alghe, invertebrati e pesci) acquisiscono il loro massimo significato, consentendo di controllare possibili effetti negativi dei tossici sui diversi livelli della rete trofica (dal produttore primario al decompositore) e di verificare l'eventuale presenza di tossici "specifici",



quali sono, ad esempio, gli erbicidi per le alghe, gli insetticidi fosforati per gli artropodi e gli antibatterici per le popolazioni microbiche.

Questo tipo di saggio, inoltre, con la misura dell'effetto basata sulla crescita di una popolazione (è il caso delle alghe, che potrebbe essere esteso anche ai batteri e ad altri organismi), introduce un criterio nuovo che consente di superare la risposta tossicologica convenzionale (% di vivi o morti) e di prendere in esame risposte più complesse (riproduzione e crescita) che consentono di trarre, in molti casi, indicazioni di carattere previsionale più rispondenti alla realtà.

I saggi multispecie costituiscono, perciò, la soluzione ottimale alla quale occorre guardare nella prospettiva di una sempre maggiore garanzia di tutela ambientale; questa soluzione sarebbe però consentita a pochi laboratori nell'attuale situazione italiana, nella quale è invece più realistico per ora limitarsi a proporre un saggio semplificato, quale è quello della dafnia, nella convinzione che esso debba trovare la sua generale applicazione a livello nazionale.

## 1.6 Bibliografia

AFNOR, 1983. Essais des eaux - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*. Ass. Franç. de Normalisation, NF T90-310.

Californian Regional Water Quality Control Board - San Francisco Bay Region, 1987. Effluent toxicity characterization on program. San Francisco Bay Regional Water Quality Control Board, July 17th 1987.

Dutka B.J., Seidl P., Munro D., 1987. Using microbial and toxicant screening-test data to prioritize waterbodies. Encyclopedia of Fluid Mechanics. Gulf Publishing Company, Houston, 10: 429-452.

Gouvernement du Quebec - Ministère de l'Industrie et du Commerce, 1987. Normeaux - détermination de la toxicité. Méthode avec la bactérie bioluminescente - *Photobacterium phosphoreum* NQ 3600, 205: 11-30.

Gucci P.M.B., Bruno M., Viglione D., Carlini E., Volterra L., 1991. Possibilità di impiego del "MICROTOX" con particolare riferimento agli studi ambientali. *Inquinamento*, 9: 82-84.

IRSA, 1978. Prove di ittiotossicità. In "Metodi Analitici per le Acque". Quad. Ist. Ric. Acque, 11 (3): 1-23.

ISO, 1982. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Internat. Organisation of Standardisation, ISO 6341.

Joubert G., 1981. Étude comparative des réactions a la toxicité entre la truite *Salmo gairdneri* et quatre autres integrateurs biologiques sur 36 cas de bioessais statiques. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci., 990: 251-264.

Marchetti R., Gerletti M., Calamari D., Chiaudani G., 1973. Elementi e criteri per la definizione del livello di accettabilità delle acque di scarico. Quad. Ist. Ric. Acque, 24.

OECD, 1984. *Daphnia* sp., acute immobilisation test and reproduction test. Guideline n. 202 in "OECD Guidelines for testing of chemicals, Effects on biotic systems", ISBN 92-64-12221-4.

Peltier W.H., Weber C.I., 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. U.S.EPA/600/4-85/013. Environ. Monitoring Support Laboratory.

Svanberg O., Renberg L., 1988. Biological-chemical characterization of effluents for the evaluation of the potential impact on the aquatic environment. Symposium on "Organic micropollutants in the aquatic environment", Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London: 244-255.

Vasseur P., Ferard J.F., Babut M., 1991. The biological aspects of the regulatory control of industrial effluents in France. *Chemosphere*, 22: 625-633.

Viganò L., Marchetti R., Puddu A., 1987. Saggio di tossicità. Atti del Convegno "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque. Dieci anni di esperienza. Quad. Ist. Ric. Acque, 75: 513-524.

Walsh G.E., Kenneth M.D., Foster R.B., 1982. Algae and crustacean as indicators of bioactivity of industrial wastes. *Water Research*, 16: 879-883.

R. Marchetti e L. Viganò

Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR - Brugherio (MI)

### Riassunto

Vengono proposti due metodi per la determinazione di effetti tossici acuti sul crostaceo *Daphnia magna*. Il primo risponde al quesito di accettabilità di un effluente di scarico ed, in accordo con tale finalità e con la normativa vigente, viene proposto in una metodologia essenziale e di facile applicabilità. Il secondo dei due saggi permette la quantificazione degli effetti tossici acuti sia di un effluente di scarico che di una sostanza pura e quindi di ottenere informazioni più precise sul loro grado di pericolosità. In questo caso la tossicità viene espressa come  $EC_{50}$ ; in appendice sono descritti tre metodi per il calcolo del suo valore.

Premessa essenziale ad entrambi i saggi di tossicità è il successo dell'allevamento dell'organismo per la cui conduzione è allegata una metodologia molto dettagliata e dai risultati ampiamente confermati.

### Summary

Two acute toxicity test methods with the crustacean *Daphnia magna* are proposed. The first one is a legal test which has been designed to decide whether a discharge passes or fails Italian water pollution law. In accordance to this aim, this method is direct and easily applicable. The second test is used to measure the acute toxic effects of either an effluent discharge or a pure compound providing a more accurate information of their hazard. In this case, results are expressed as  $EC_{50}$  and three methods for calculate this parameter are reported in the appendix.

A successful culturing of the organism is the essential prerequisite for both the toxicity tests. Therefore a detailed and thoroughly tested culture method is also presented.

## 2.1 Introduzione

Vengono presentati nel seguito due metodi per la determinazione di effetti tossici acuti su *Daphnia magna* aventi lo scopo:

- a) di verificare il rispetto delle condizioni poste dalla normativa vigente per il controllo degli effluenti liquidi (319/76), nell'ipotesi che la proposta (Viganò e Coll., 1987) di modifica del saggio di tossicità richiesto dalla legge citata (parametro 48 di Tabella A) venga accettata con la sostituzione del *Salmo gairdneri* con la *Daphnia magna*
- b) di valutare per un dato prodotto (composto puro, effluente di scarico) la  $EC_{50}$  e, cioè, la concentrazione che arresta la motilità del 50% degli animali usati per il saggio in un tempo determinato.

Questo secondo metodo viene proposto anche allo scopo di soddisfare la specifica richiesta in merito alla "misura della tossicità acuta per la *Daphnia*" che compare nel Decreto del Ministero della Sanità, 6 dicembre 1988, relativo al "Protocollo informativo sulle caratteristiche di sostituenti del fosforo in preparati per lavare e coadiuvanti del lavaggio" (G.U. 306 del 31.12.1988).

Il metodo a) tiene conto delle condizioni attualmente imposte dalla legge e, cioè, si limita ad effettuare valutazioni degli effetti negativi (immobilizzazione degli animali) provocati da effluenti diluiti in parti uguali con acqua standard. Non è da escludere che in sede di modifica del metodo vengano riviste anche le condizioni operative, evitando ad esempio la diluizione del campione e prolungando i tempi della prova, allo scopo di assicurare al parametro "saggio di tossicità" un maggiore livello di protezione.

La semplice sostituzione del *Salmo gairdneri* con la *Daphnia magna* comporterebbe le seguenti modifiche minime nelle indicazioni operative che compaiono nella legge:

"Il campione diluito 1:1 con acqua standard deve permettere la motilità di almeno il 50% degli animali usati per il saggio per un periodo di 24 ore a 20 °C di temperatura".

Nel caso invece che, oltre alla sostituzione dell'organismo usato per il saggio, fosse possibile riformulare anche le condizioni operative indicate dalla legge, le specifiche al parametro 48 po-



trebbero essere le seguenti:

“Il campione tal quale deve permettere la motilità di almeno il 90% degli animali usati per il saggio per un periodo di 24 ore a 20 °C di temperatura”.

Nelle specifiche metodologiche indicate nel seguito si è considerata la prima delle due possibili riformulazioni del parametro.

La metodica qui descritta fa riferimento a quelle di maggior rilievo proposte a livello internazionale (ISO, 1982; AFNOR, 1983; ASTM, 1984; OECD, 1984; APHA, 1985; EPA, 1985) e, in particolare, a quella dell'ASTM.

Il successo dell'allevamento e la disponibilità di organismi in buone condizioni di salute sono da considerare tra i requisiti essenziali per la conduzione di entrambi i saggi di tossicità. Questa è la ragione per cui nella presente proposta viene dato ampio spazio alle condizioni di allevamento di *Daphnia magna* privilegiando quelle soluzioni che fossero contemporaneamente pratiche ed efficaci.

In sede di revisione della metodologia indicata dalla legge 319/76 potrebbe, infine, essere considerato e risolto anche il problema dei saggi “per gli scarichi di acque salmastre, marine e a salinità superiore a quelle del mare” per i quali alcune possibilità sono state a suo tempo esaminate (Marchetti e Calamari, 1983) e quello della “tossicità prolungata su *Daphnia magna*” pure richiesto dal Decreto del 6 dicembre 1988 del Ministero della Sanità.

## 2.2 Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna*

### 2.2.1 Obiettivi del metodo

Il metodo è articolato secondo due criteri che consentono di valutare: a) l'idoneità di un effluente ai fini della sua immissione in acque superficiali e b) la EC<sub>50</sub> e cioè la concentrazione di un prodotto o la diluizione di una soluzione che provocano in un tempo dato l'immobilizzazione del 50% degli organismi usati per il saggio, rappresentati da crostacei della specie *Daphnia magna* Straus (dafnia) descritta nell'appendice 2 A.

### 2.2.2 Generalità del metodo

Neonati di dafnie allevate con la procedura indicata nell'appendice 2 B, vengono esposti in

gruppi di numero prestabilito a diverse concentrazioni di una sostanza a tossicità ignota o a diluizioni date di acque di scarico. A tempi determinati viene rilevato per ciascun gruppo il numero di dafnie immobili e, cioè, non più in grado di nuotare, e tale numero viene utilizzato per giudicare sulla accettabilità di un effluente o per determinare la EC<sub>50</sub>.

La procedura è in parte comune ad entrambi i metodi che nel seguito sono denominati “saggio A” (valutazione dell'accettabilità di un effluente) e “saggio B” (valutazione della EC<sub>50</sub>).

### 2.2.3 Materiali e strumenti per il saggio

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

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

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

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

Oltre a questi materiali, l'esecuzione del saggio richiede la disponibilità della normale apparecchiatura di laboratorio. Richiede inoltre un

misuratore di ossigeno disciolto il cui sensore abbia dimensioni tali da permettere il rilevamento nei contenitori utilizzati per il saggio.

#### 2.2.4 Reagenti e acqua di diluizione

La preparazione delle soluzioni e la diluizione vengono effettuate con acqua che deve rispondere alle seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5; alcalinità 110-120 mg CaCO<sub>3</sub>/L e durezza 140-160 mg CaCO<sub>3</sub>/L e che si prepara nel seguente modo: a un litro di acqua deionizzata o distillata passata su colonna di carbone attivo vengono aggiunti, nell'ordine, 10 mg di KCl, 192 mg di NaHCO<sub>3</sub>, 53 mg di MgSO<sub>4</sub> e 183 mg di CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Questa soluzione presenta le caratteristiche di pH, alcalinità e durezza sopra indicate e deve essere areata per 24 ore prima del suo impiego, alla temperatura di 20 °C, con aria compressa priva di contaminanti.

#### 2.2.5 Organismi per il saggio

L'organismo utilizzato per il saggio è il crostaceo cladocero della specie *Daphnia magna* Straus che può essere ottenuto da laboratori di idrobiologia o di tossicologia acquatica. Per i saggi vengono utilizzati i neonati di età inferiore alle 24 ore. A questo scopo, prima dell'allestimento del saggio viene individuato nelle vasche di allevamento e isolato in acqua di diluizione, un numero adeguato di femmine adulte (4-5 mm di lunghezza corporea) prossime al parto, riconoscibili per il colore aranciato delle uova presenti nella camera di incubazione (cfr. Appendice 2.A sulle caratteristiche morfologiche e biologiche della *Daphnia*). Sono da scartare colture in riproduzione sessuata, con elevata mortalità, bassa natalità o con altri sintomi evidenti di condizioni colturali non adeguate (Appendici 2.A e 2.B). Queste femmine, quando rispondono ai suddetti requisiti di idoneità, potranno deporre un numero di neonati ciascuna, generalmente compreso tra 20 e 50.

#### 2.2.6 Procedura

##### 2.2.6.1 Saggio A: valutazione della accettabilità di un effluente

- a) Il campione di circa 300 mL di effluente di cui deve essere valutata l'accettabilità, va utilizzato entro le 24 ore dalla raccolta e conservato alla temperatura di 4 °C. Si consiglia l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di entità non prevedibile. In ogni caso è opportuno che il campione venga suddiviso in due aliquote di almeno 150 mL di cui una verrà utilizzata per il saggio e l'altra potrà tornare utile per ulteriori prove (paragrafi 2.2.6.1.i e 2.2.6.1.l).
- b) Eventuali solidi galleggianti vanno rimossi per filtrazione su lana di vetro o su rete di teflon a maglie di circa 1 mm.
- c) Si procede quindi alla regolazione della temperatura del campione prima del suo trasferimento nei recipienti per il saggio (20 ± 2 °C).
- d) Per il saggio si predispongono sei recipienti di cui tre contenenti ciascuno 25 mL di effluente più 25 di acqua di diluizione e tre 50 mL di sola acqua di diluizione utilizzata come controllo.
- e) In ciascuno dei sei recipienti vengono trasferiti 10 neonati di dafnia ottenuti secondo la procedura indicata al paragrafo 2.2.5. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta di vetro del diametro interno di circa 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua aspirato con le dafnie al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è consigliabile che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le dafnie pipettate nei sei recipienti fino a raggiungere il numero di dieci, anziché completare un recipiente per poi passare ai successivi.
- f) A trasferimento avvenuto, si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare i tempi di illuminazione ai quali gli animali sono stati allevati.
- g) Durante le 24 ore della prova gli animali non vengono alimentati.
- h) Al termine del saggio e, se necessario, anche con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.
- i) Il saggio va ripetuto se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%.
- l) Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova, in presenza di casi



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

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

### 2.2.6.2 Saggio B: valutazione della $EC_{50}$ (per prodotti puri o effluenti)

- a) La soluzione del prodotto da esaminare va preparata utilizzando come solvente l'acqua standard di cui al paragrafo 2.2.4 debitamente areata. Ai fini di una corretta conduzione del saggio è consigliabile acquisire alcune informazioni essenziali sui prodotti in esame, quali la solubilità in acqua e la tensione di vapore. Nel caso di tossici poco solubili sono da privilegiare i metodi di dispersione meccanica rispetto all'impiego di sostanze solubilizzanti. Qualora l'impiego di queste ultime si renda necessario, sono da utilizzare quelle a minore tossicità per la dafnia. In ogni caso nella valutazione dei risultati va tenuto conto che questi possono essere dovuti all'azione combinata della sostanza in esame e dell'agente solubilizzante.
- b) Per la valutazione della  $EC_{50}$  di effluenti occorre disporre di un volume di almeno 1 L di campione. Se la prova viene allestita entro 6 ore, il campione non va refrigerato a 4 °C, necessità che invece si pone se la prova viene effettuata entro 48 ore dal prelievo. Si consiglia, tuttavia, l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di entità non prevedibile.
- c) Il prodotto o l'effluente in esame vengono saggiati in un primo momento con una prova preliminare e successivamente con una prova definitiva. La prova preliminare si effettua operando con 5 diverse concentrazioni o diluizioni e una sola replica per ciascuna di esse. Il numero di contenitori necessari in questo caso è quindi sei, di cui uno di controllo con il solo liquido diluente. Queste concentrazioni di prodotto in esame o diluizioni di effluente, vengono scelte in progressione geometrica. Nel caso di effetti tossici del tutto ignoti, si può procedere secondo un fattore 10 e la serie delle 5 concentrazioni o diluizioni può essere indicativamente la seguente: 0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100 mg/L di prodotto o % (v/v) di effluente.
- d) Individuato l'ambito di tossicità, viene allestita la prova definitiva effettuata con quattro repliche e secondo una serie ad intervalli meno ampi (ad es. 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6). Il numero di contenitori necessari in questo caso è 24, di cui 20 verranno usati per saggiare in quadruplo le 5 concentrazioni o diluizioni e 4 per la prova di controllo con la sola acqua di diluizione. Nel caso di tossici volatili dovranno essere usati contenitori a chiusura ermetica e completamente riempiti. Il volume di questi recipienti deve essere tale che l'ossigeno disciolto, al termine della prova, non risulti inferiore a 2 mg/L.
- e) In tutti i casi in cui sia possibile, è consigliato il controllo analitico delle concentrazioni del tossico in esame. Se lo scostamento tra la concentrazione misurata e quella nominale è superiore al 20%, i risultati del saggio dovranno essere basati sulla concentrazione misurata.
- f) In ogni contenitore vengono trasferiti 50 mL della soluzione in esame.
- g) In ciascuno dei 24 recipienti vengono quindi trasferiti 5 neonati di dafnia ottenuti con la procedura indicata al paragrafo 2.2.5. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta in vetro del diametro interno di circa 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua aspirato con le dafnie al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è opportuno che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le dafnie pipettate nei diversi recipienti fino a raggiungere il numero di 5, anziché completare un recipiente per poi passare ai successivi.
- h) A trasferimento avvenuto, si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare il fotoperiodo al quale gli animali sono stati allevati.
- i) Durante questo periodo agli animali non vie-

- ne somministrata alcuna alimentazione.
- l) Al termine del saggio e, se necessario, anche con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.
  - m) Se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%, il saggio va ripetuto.
  - n) Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione di ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2 mg/L. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito ricambiando le soluzioni in esame durante le 24 ore della prova, oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenze o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali.
  - o) Con i dati raccolti nella prova a 24 ore può essere calcolata la  $24hEC_{50}$  (in mg/L oppure in % di diluizione) e i rispettivi limiti fiduciali, secondo le indicazioni di cui all'Appendice 2.C. La condizione necessaria per questi calcoli è che vi siano almeno due casi di parziale immobilizzazione (diversi cioè da 0 e 100%) e prossimi, possibilmente, al 50%: se questa condizione non è raggiunta si può fare ricorso ad altri metodi di calcolo (Appendice 2.C) oppure si può ripetere la prova operando in un ambito più idoneo di concentrazioni o di diluizioni.
  - p) Il saggio può essere prolungato per la valutazione della  $EC_{50}$  a 48 ore. A tal fine si procede al rinnovo delle 24 soluzioni con soluzioni fresche (ricorrendo, nel caso di un effluente, al campione refrigerato) nelle quali vengono trasferiti gli animali che già hanno soggiornato per 24 ore nelle soluzioni a concentrazione o diluizione corrispondente.
  - q) La procedura, le cautele ed i criteri per la seconda parte della prova sono gli stessi già descritti nei paragrafi da 2.2.6.2.f a 2.2.6.2.n.
  - r) Al termine della prova può essere calcolata la  $24hEC_{50}$  seguendo i criteri indicati nel paragrafo 2.2.6.2.o.

## 2.3 Bibliografia

- AFNOR, 1983. Essais des eaux - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*.  
*Ass. Franç. de Normalisation*, NF T90-310.
- APHA, AWWA, WPCF, 1985. Toxicity test procedure for *Daphnia* (tentative).  
In "Standard methods for the examination of water and wastewater", 16th Edition, Part 804 B: 739-742.
- ASTM, 1984. Standard practice for conducting static acute toxicity tests on wastewaters with *Daphnia*.  
American Society for Testing and Materials, E 4229-84.
- ISO, 1982. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).  
*Internat. Organisat. of Standardisation*, ISO 6341.
- Litchfield J.T., Wilcoxon-F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments.  
*J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 96: 99-113.
- Marchetti R., Calamari D., 1983. Proposta integrativa per saggi di tossicità.  
*Acqua Aria*, 10: 1113-1124.
- OECD, 1984. *Daphnia* sp., acute immobilisation test and reproduction test.  
Guideline n. 202 in "OECD Guidelines for testing of chemicals, Effects on biotic systems", ISBN 92-64-12221-4.
- Peltier W.H., Weber C.I., 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms.  
*U.S.EPA/600/4-85/013*. Environ. Monitoring Support Laboratory.
- Puddu A., 1989. Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei Probits.  
*Notiz. Metodi Anal. Acque IRSA*, 9 (2): 19-37.
- Tessier A.J., Goulden C.E., 1982. Estimating food limitation in cladoceran populations.  
*Limnol. Oceanogr.*, 27: 707-717.
- Viganò L., Marchetti R., Puddu A., 1987. Saggio di tossicità. Atti del Convegno "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque. Dieci anni di esperienza".  
*Quad. Ist. Ric. Acque*, 75: 513-524.



## 2.A NOTE SULLE CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E BIOLOGICHE DI *DAPHNIA MAGNA*

### 2.A.1 Morfologia e biologia

La *Daphnia magna* è un crostaceo d'acqua dolce di piccole dimensioni (non supera i 5 mm di lunghezza) con forma ovalare, compressa lateralmente. Esso è caratterizzato da una struttura bivalve saldata dorsalmente (carapace) che racchiude l'intero organismo ad eccezione del capo. Quest'ultimo presenta un singolo occhio composto, fortemente pigmentato, un ocello di dimensioni minori e due paia di antenne di cui le seconde, biramosse e molto sviluppate, hanno funzione natatoria.

La trasparenza del carapace permette di osservare alcuni organi all'interno del corpo dell'animale quali il cuore, capace di 300 pulsazioni al minuto, localizzato dorsalmente nella regione postcefalica, l'intestino medio, chiaramente visibile quando contiene materiale alimentare, e gli ovari, situati lateralmente allo stesso.

La regione toracica, anch'essa racchiusa nel carapace, è dotata ventralmente di una serie di appendici (arti toracici) provviste di setole a funzione filtrante deputate alla raccolta delle particelle alimentari disperse nell'acqua. Queste ultime, rappresentate da alghe, protozoi, batteri, come pure da detrito, una volta filtrate, vengono trasferite alla apertura orale, triturate dall'apparato boccale e quindi passate all'intestino per la digestione, che avviene in tempi variabili da 30 minuti a 3 ore.

L'accrescimento della dafnia avviene per stadi (mute), in modo discontinuo, con rigetto ad ogni stadio del vecchio esoscheletro che viene sostituito con uno di nuova formazione. Nella femmina sessualmente matura l'esoscheletro viene abbandonato dopo ogni parto.

Tra i maschi e le femmine esistono forti differenze di forma (dimorfismo sessuale), tra cui la più evidente è rappresentata dalla taglia: le femmine presentano maggiori dimensioni raggiungendo allo stadio adulto i 4-5 mm di lunghezza corporea. I maschi invece non superano i 2-3 mm.

Nel ciclo vitale della dafnia (60-100 giorni a 20

°C) possono essere descritte due modalità riproduttive che dipendono dalle condizioni ambientali. Quando queste sono favorevoli il popolamento è costituito, quasi esclusivamente, da individui di sesso femminile dalle cui uova schiudono, senza fecondazione, altre femmine in grado di riprodursi a loro volta con lo stesso meccanismo (partenogenesi). Viceversa in condizioni sfavorevoli si ha la riproduzione sessuata con l'intervento di individui di sesso maschile.

#### 2.A.1.1 Riproduzione partenogenetica

Le uova maturate nei due ovari situati lateralmente all'intestino passano nella camera di incubazione, localizzata dorsalmente, nel cui interno completano lo sviluppo. Quest'ultimo può essere frazionato in almeno cinque fasi di diversa durata, corrispondenti ad altrettanti livelli di differenziazione degli embrioni. A 20 °C lo sviluppo si completa in un arco di tempo compreso fra 2 e 3 giorni con la schiusa di individui già sostanzialmente identici all'adulto. Poco dopo il rilascio dei neonati la femmina muta e depone un nuovo gruppo di uova nella camera di incubazione, riattivando il ciclo descritto.

Entro 7-10 giorni dalla nascita la dafnia dà luogo alla prima schiusa, composta in media da una decina di individui. Il numero di neonati aumenta nelle schiuse successive, generalmente non oltre la quinta, collocandosi fra 20 e 50 o più, in dipendenza delle condizioni ambientali e dello stato nutrizionale della madre.

#### 2.A.1.2 Riproduzione sessuata

In condizioni ambientali sfavorevoli, da alcune delle uova partenogenetiche si sviluppano individui di sesso maschile e contemporaneamente alcune femmine producono un diverso tipo di uova (a corredo aploide) in numero massimo di due che vengono fecondate dai maschi. A fecondazione avvenuta il carapace della femmina "sessuata", in corrispondenza della camera di incubazione si scurisce e si inspessisce avvolgendo le uova fecondate in una struttura protettiva detta efippio, che verrà abbandonato alla successiva muta unitamente all'esoscheletro. Dall'efippio potranno schiudere 1 o, più raramente, 2 individui di sesso femminile.

Gli individui che hanno partecipato alla fase

sessuata possono riprendere la normale riproduzione partenogenetica in condizioni ambientali favorevoli.

## 2.B ALLEVAMENTO DI *DAPHNIA MAGNA*

### 2.B.1 Strumentazione

Oltre alla normale strumentazione di laboratorio sono necessari:

- un sistema di illuminazione che consenta di ottenere 1000 lux a livello delle vasche (lampade fluorescenti con indice di resa cromatica  $\geq 90$ ) fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
- un sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito di  $20 \pm 2$  °C;
- un sistema di aerazione a bassa portata e pressione fornito di diffusori a pietra porosa del tipo da acquario;
- un misuratore di ossigeno disciolto;
- una camera di conta e microscopio o contatore automatico di particelle;
- vasche in tutto vetro con una capacità di circa 5 L.

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

### 2.B.2 Acqua

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

Qualunque sia l'acqua prescelta, l'aerazione per 24 ore ed un trattamento con carbone attivo, preceduti nel caso di acque superficiali da filtrazione su membrane di  $0,22 \mu\text{m}$ , assicurano un netto miglioramento della qualità. Se necessario, l'acqua trattata va corretta in alcuni dei suoi costituenti maggiori per ottenere approssimativamente una durezza di  $150 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ , un

rapporto  $\text{Ca}/\text{Mg}=4$  e  $\text{Na}/\text{K}=10$ . La diluizione viene effettuata con acqua deionizzata o distillata, filtrata su carbone attivo, o con acqua Milli Q, mentre gli aumenti di concentrazione si ottengono per aggiunta di sali di grado analitico (es.  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KCl}$ , ecc.).

L'acqua così preparata va saggiata per verificare l'idoneità all'allevamento di *Daphnia magna*. A questo scopo si utilizza un gruppo di almeno dieci organismi, di età inferiore alle 24 ore, mantenuti in 500 mL di acqua ed alle condizioni previste per l'allevamento. Ogni 48 ore si provvede al trasferimento in altri 500 mL di mezzo fresco, all'aggiunta di cibo nelle quantità indicate (cfr. paragrafo 2.B.6) ed alla conta, previa rimozione, dei dafnidi prodotti.

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

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

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

### 2.B.3 Termoregolazione

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

### 2.B.4 Illuminazione

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

### 2.B.5 Ossigenazione

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

### 2.B.6 Alimentazione e mantenimento

La dieta per il mantenimento in coltura di *Daphnia magna* è costituita da due organismi unicellulari; un'alga verde *Selenastrum capricornutum* ed un lievito *Saccharomyces cerevisiae*



(cfr. paragrafi 2.B.7 e 2.B.8). Sia la sospensione algale che quella di lievito vengono somministrate quotidianamente in quantità tali da assicurare una densità nelle vasche di allevamento di circa 300.000 cellule/mL per ciascuno dei due organismi. La somministrazione può avere luogo a giorni alterni e, in questo caso, i volumi delle sospensioni cellulari vanno raddoppiati. Il permanere della torbidità del mezzo acquoso può costituire un indice visivo in base al quale rinviare la somministrazione del cibo.

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

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

### 2.B.7 Coltura algale

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

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

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

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

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

### 2.B.8 Sospensione di lievito

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

### 2.B.9 Idoneità degli organismi

E' opportuno verificare periodicamente le condizioni generali di allevamento. A questo fine si può ricorrere all'esame visivo del contenuto lipidico degli organismi, indice lipidico (Tessier e Goulden, 1982), come pure ad una sostanza tossica di riferimento. Per quest'ultima si propone il bicromato di potassio di cui si determina la 24hEC<sub>50</sub> nelle condizioni sperimentali indicate dal metodo.

## 2.C

CALCOLO DELLA EC<sub>50</sub>

## 2.C.1 Introduzione

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

## 2.C.2 Metodo 1: Litchfield e Wilcoxon (metodo semplificato)

## 2.C.2.1 Retta concentrazione/effetto

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

Escludendo gli effetti 0 e 100%, si rappresentano su carta logaritmo-probabilistica le percentuali di organismi immobilizzati in funzione delle concentrazioni corrispondenti. Queste ultime sono riportate sulla scala logaritmica e gli effetti sulla scala delle ordinate. Si traccia la retta che meglio approssima i punti ottenuti, privilegiando quelli compresi fra il 40 e il 60% di effetto. Utilizzando la retta si leggono e si tabulano gli effetti attesi per ciascuna delle concentrazioni saggiate, scartando quelle il cui effetto atteso risulti inferiore a 0,01 o superiore a 99,99. Il grafico viene completato rappresentando anche le concentrazioni che hanno prodotto effetto 0 e 100%. A questo scopo si legge sulla retta tracciata l'effetto atteso per tali concentrazioni e si riporta in grafico il corrispondente valore corretto secondo le indicazioni della Tab. 2.C.1.

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

2.C.2.2 Test del Chi<sup>2</sup>

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

Tab. 2.C.1

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

Atteso	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0,3	0,7	1,0	1,3	1,6	2,0	2,3	2,6	2,9
10	3,2	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	4,9	5,2	5,5	5,7
20	6,0	6,2	6,5	6,7	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,1
30	8,3	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2	9,3	9,4	9,6	9,8
40	9,9	10,0	10,1	10,2	10,3	10,3	10,4	10,4	10,4	10,5
50	-	89,5	89,6	89,6	89,6	89,7	89,7	89,8	89,9	90,0
60	90,1	90,2	90,4	90,5	90,7	90,8	91,0	91,2	91,4	91,6
70	91,7	91,9	92,2	92,4	92,6	92,8	93,0	93,3	93,5	93,8
80	94,0	94,3	94,5	94,8	95,1	95,3	95,6	95,9	96,2	96,5
90	96,8	97,1	97,4	97,7	98,0	98,4	98,7	99,0	99,3	99,7



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

Tab. 2.C.2  
Valori di  $\chi^2$  ( $P = 0,05$ )

Gradi di libertà (G.L.)	$\chi^2$
1	3,84
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,1
6	12,6
7	14,1
8	15,5
9	16,9
10	18,8

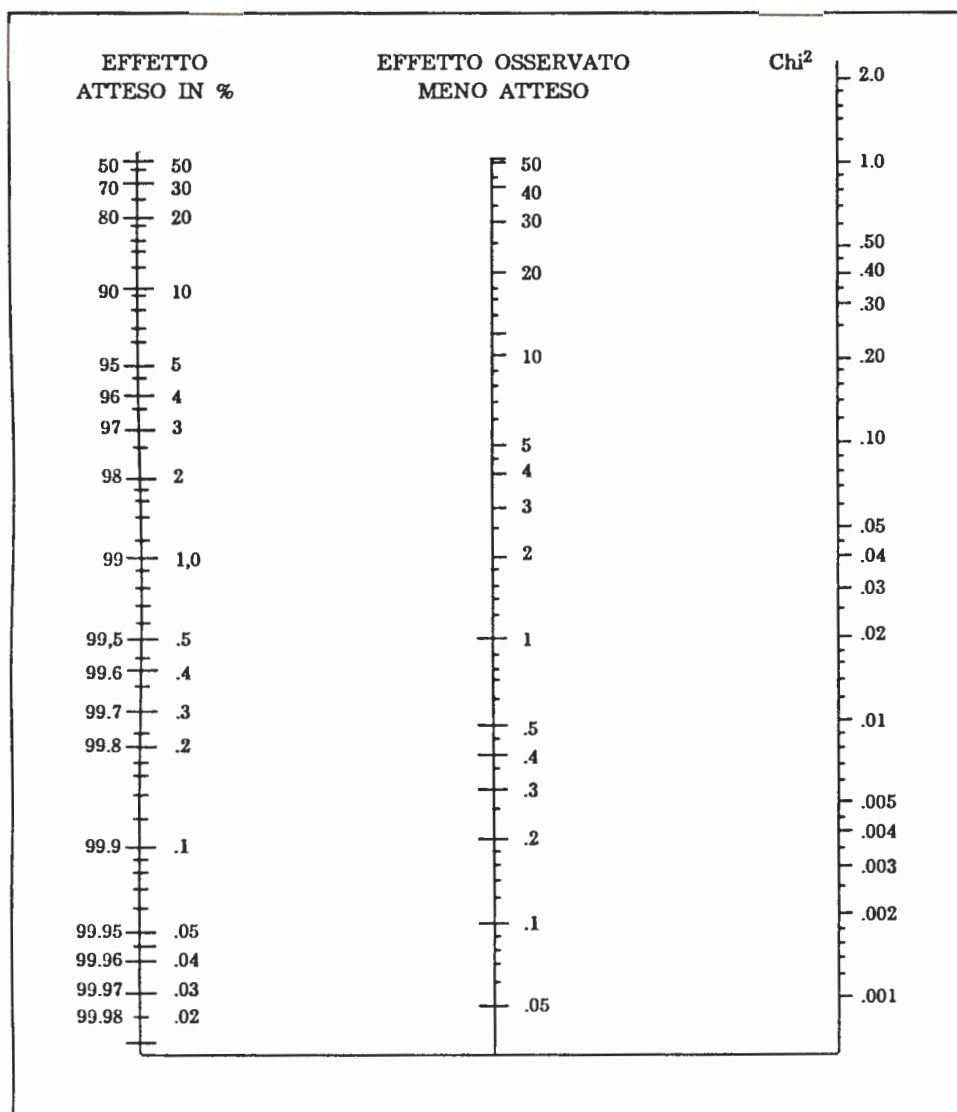


Fig. 2.C.1  
Nomogramma dei contributi al  $\chi^2$ . La retta che congiunge il valore ottenuto dalla differenza tra l'effetto osservato e quello atteso con il corrispondente effetto atteso indica, nel punto di intersezione con la scala del  $\chi^2$ , il contributo cercato.

### 2.C.2.3 $EC_{50}$ e limiti fiduciali

Il valore della  $EC_{50}$  (24 o 48 h) è letto sulla scala logaritmica del grafico della retta, in corrispondenza all'effetto del 50%.

Mediante il grafico della retta si individuano le concentrazioni ad effetto 16 e 84% ( $EC_{16}$ ;  $EC_{84}$ ) e si calcola il valore della funzione S secondo la seguente espressione:

$$S = [(EC_{84}/EC_{50}) + (EC_{50}/EC_{16})]/2$$

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

$$f_{EC50} = S^{(2,77/\sqrt{N})}$$

dove S e N hanno il significato già illustrato. I limiti fiduciali della  $EC_{50}$  al 95% di probabilità si ottengono come segue:

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

### 2.C.3 Metodo 2: media geometrica

#### 2.C.3.1 Calcolo della $EC_{50}$

In assenza di risultati parziali la  $EC_{50}$  può essere calcolata come segue:

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

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

#### 2.C.3.2 Limiti fiduciali

La due concentrazioni A e B rappresentano i limiti fiduciali della  $EC_{50}$  con un livello di probabilità che dipende dal numero medio di organismi utilizzato per concentrazione (N). Il livello di probabilità associato ad A e B è calcolato con la seguente espressione:

$$P = 100 \cdot [1 - 2(1/2)^N]$$

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

### 2.C.4 Metodo 3: analisi dei probits

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

Partendo dai risultati sperimentali, che devono comprendere due effetti intermedi tra 0 e 100%, il programma fornisce la  $EC_{50}$  e la  $EC_1$  con i relativi limiti fiduciali più una serie di informazioni sulla retta di regressione probit e sull'analisi statistica effettuata.

Il programma è disponibile presso IRSA, via Reno 1, 00198 Roma.



R. de Bernardi

Istituto Italiano di Idrobiologia, C.N.R. - Palianza

### Riassunto

Il problema dell'allevamento di popolazioni di *Daphnia* in condizioni di laboratorio controllate ha visto spesso l'utilizzo di metodologie empiriche, a volte non completamente idonee. Poiché i risultati che si ottengono da esperimenti di laboratorio sono in larga misura influenzati dalle condizioni di allevamento è evidente che si debba arrivare ad operare in condizioni il più possibile standardizzate, così da poter ottenere una loro maggiore raffrontabilità.

In questo lavoro, dopo aver delineato una breve sintesi delle caratteristiche della biologia di *Daphnia* si analizzano e si discutono i principali fattori che vanno controllati fornendo altresì indicazioni pratiche per un corretto allevamento di questi organismi.

### Summary

The culture of *Daphnia* in laboratory conditions presents a series of problems frequently solved on an empirical experience, so that often they differ substantially from one lab to another. However, as the culture conditions can greatly influence the results obtained in the experiment with laboratory cultured animals, it becomes more and more important to define standardized culture techniques in order to achieve a better comparability.

In this paper, after a short description of the main biological characteristics of *Daphnia* genus, the most important environmental factors that determine the success of a culture of *Daphnia* are analyzed and discussed owing to specific suggestion for a standardized methodology.

La verifica sperimentale degli effetti che gli elementi tossici esercitano sugli organismi acquatici può essere convenientemente realizzata utilizzando organismi del genere *Daphnia* sia in prove di tossicità acuta sia in prove di effetti cronici.

Questi piccoli crostacei, infatti, oltre ad essere presenti nella quasi totalità degli ambienti di acqua dolce, sono anche uno dei nodi chiave per il funzionamento delle reti trofiche e risultano più sensibili di altre specie animali o vegetali acquatiche anche a basse concentrazioni di inquinanti.

### 3.1 Generalità sul genere *Daphnia*

La posizione sistematica del genere *Daphnia* può essere così schematicamente riassunta (Scourfield e Harding, 1958): Classe *Crustacea*, Sottoclasse *Brachiopoda* (Entomostraca), Ordine *Cladocera*, Sottordine *Calyptomera*, Famiglia *Daphnidae*.

Le strutture esterne che caratterizzano la morfologia di una *Daphnia* (Fig. 3.1) sono il capo e il carapace che racchiude il corpo e termina generalmente in una spina. Sulla parte distale del capo sono inserite le seconde antenne che rappresentano l'organo locomotore e le prime antenne che hanno funzione sensoria. Il carapace è costituito da due valve aperte ventralmente e protegge tutto il corpo, vale a dire organi ed apparati e il postaddome. Per quanto riguarda le dimensioni che i Dafnidi possono raggiungere, si ha una forte variabilità sia tra specie diverse sia all'interno di una singola specie. All'interno di una singola specie, infatti, le dimensioni che l'adulto raggiunge dipendono dalla disponibilità di cibo: se questa disponibilità è scarsa, l'individuo cresce soltanto fino alla maturità riproduttiva; se la disponibilità è elevata l'accrescimento è continuo per tutta la sua esistenza. Indipendentemente dalle dimensioni, le variazioni morfologiche che si possono avere tra una specie e l'altra riguardano soprattutto le dimensioni relative dell'area del capo rispetto all'area del corpo. Infatti, il rapporto area capo/ area corpo può variare da 1,4 di *Daphnia cephalata* a 0,1 di *Daphnia nivalis* (Herbert, 1977).

Gli organismi appartenenti alla famiglia dei Dafnidi sono tutti filtratori. Il loro cibo è costituito da alghe, batteri, protozoi e particelle di detrito organico. Il movimento degli arti determina un

flusso di acqua verso la regione cefalica; questo flusso è portato ad un filtro, posto sulle appendici toraciche, costituito da strutture a pettine formate da setole che trattengono le particelle in sospensione nell'acqua. Le dimensioni delle particelle trattenute non sono note con esattezza. Alcuni autori (Burns, 1968; Nadin-Hurley e Duncan, 1976) hanno prospettato che la dimensione delle particelle ingerite sia direttamente proporzionale alla dimensione della *Daphnia*. L'assimilazione varia notevolmente a seconda dei tipi di alghe ingerite. Si passa, ad esempio, dal 90-100% per *Cryptomonas* e *Ankistrodesmus* all'11-15% di *Gloeocystis* e *Oocystis* (Schindler, 1970). L'efficienza con la quale un particolare cibo è assimilato dipende dalla sua abbondanza: alle alte concentrazioni l'efficienza di assimilazione diminuisce, probabilmente perché il cibo passa troppo rapidamente nel canale intestinale e la digestione non è completa (Schindler, 1970).

I Dafnidi abitualmente si riproducono per par-

tenogenesi e le popolazioni sono quasi esclusivamente costituite da femmine. Diventano riproduttivi dopo 5-8 stadi giovanili in rapporto alle disponibilità alimentari (Hrbackva, 1974) e, una volta diventati adulti, dopo ogni muta, producono una nuova covata di uova. Le uova vengono depositate e si sviluppano in una camera incubatrice dorsale e i giovani neonati sono morfologicamente simili agli adulti.

Il numero di uova per covata è molto variabile da specie a specie e dipende direttamente dalle dimensioni della madre e dalla quantità di cibo a sua disposizione.

Se il cibo a disposizione possiede solo l'energia necessaria al mantenimento metabolico di base, l'animale non produce uova. Ciò è stato constatato in popolazioni sperimentali allevate in condizioni di cibo limitate (Slobodkin, 1954; Corigliano e de Bernardi, 1978; de Bernardi, Lacqua e Soldavini, 1978).

In condizioni normali, le uova partenogeneti-

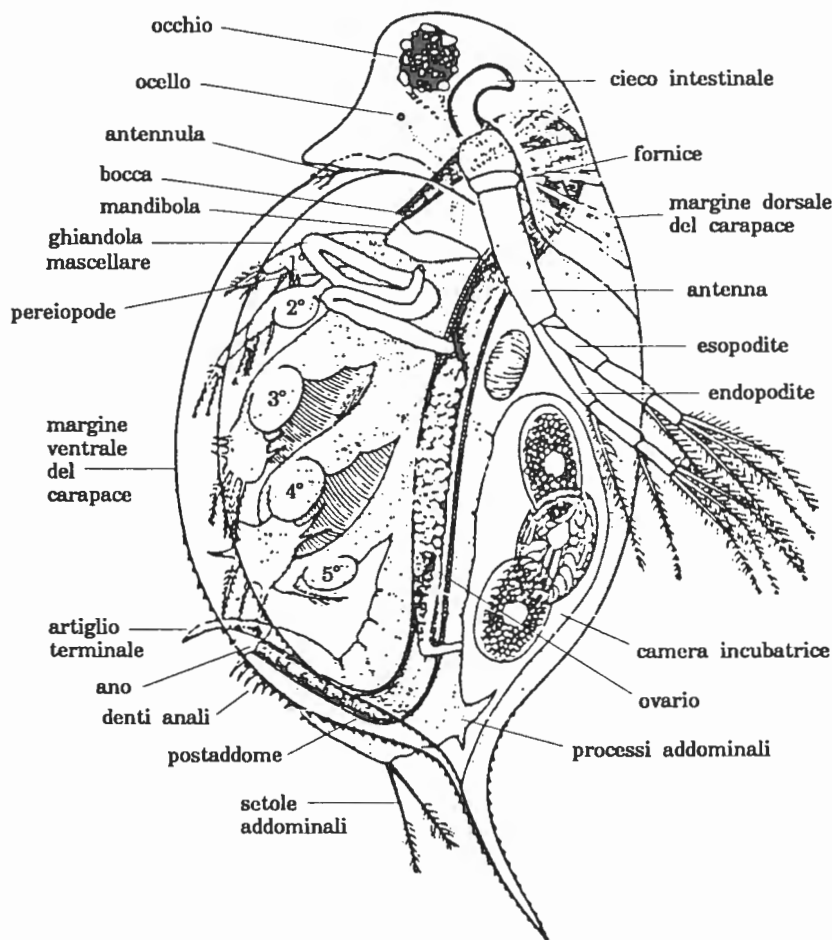


Fig. 3.1

Rappresentazione schematica della struttura anatomica di una femmina partenogenetica di *Daphnia*



che danno luogo ad una progenie femminile, ma quando una femmina è in condizioni di stress o di affollamento essa può produrre maschi (Banta e Brown, 1929). Dopo la produzione di maschi le femmine adulte della popolazione producono uova che di norma devono essere fecondate per potersi sviluppare. Queste uova sono rinchiusi in una struttura protettiva e il tutto viene detto efippio. Le uova durature restano allo stato di efippio per lunghi periodi depositate nei sedimenti litorali o profondi e si schiudono quando le condizioni ambientali permettono ai neonati una vita tollerabile. Il significato delle uova efippiali è pertanto quello di permettere alla specie di superare periodi di difficile sopravvivenza, quali bassa temperatura, siccità, insufficienza di cibo a causa del sovrappollamento, ecc., ma anche quello di permettere un rimescolamento del patrimonio genetico.

Per le peculiari caratteristiche della biologia dei singoli individui e della struttura delle popolazioni da essi formate, i Cladoceri appartenenti alla famiglia dei Dafnidi sono molto adatti a studi di laboratorio su dinamica di popolazione o in ecotossicologia. Slobodkin (1954) indica una serie di motivi per cui i Cladoceri sono da preferire ad altri animali per quanto riguarda la sperimentazione nel campo della dinamica di popolazione o per test ecotossicologici:

- a) la riproduzione partenogenetica consente di ottenere popolazioni composte da individui con materiale genetico praticamente identico, il che permette di eliminare i fattori legati a riproduzione sessuata e a fenomeni genetici, che complicano l'analisi della struttura della popolazione nel tempo e possono sovrapporsi alle variazioni legate ai fenomeni biologici ed agli ambienti che costituiscono l'oggetto di indagine;
- b) non esistono serie difficoltà per ottenere popolazioni sperimentali perché richiedono un ecosistema abbastanza semplice;
- c) producono le uova in una camera incubatrice dorsale trasparente e si può quindi, attraverso il loro conteggio al microscopio, stimare il potenziale riproduttivo della popolazione;
- d) ad eccezione della comparsa di efippi, peraltro poco incidente sulle variazioni di densità e di composizione della popolazione, e comunque legata ad eventi da considerarsi eccezionali, non ci sono stadi larvali che rendono difficile la tecnica di conteggio della popolazione;
- e) si nutrono filtrando il materiale sospeso nel mezzo di coltura e quindi non sono obbligati a spostamenti per la ricerca del cibo;
- f) le loro dimensioni sono tali da permettere di

ottenere popolazioni sufficientemente numerose (1000-1500 individui) in un volume d'acqua relativamente modesto (500 ml).

La coltura di *Daphnia* in laboratorio anche in grandi quantità, come detto, non presenta particolari difficoltà operative, tuttavia occorre tenere presenti alcune essenziali precauzioni. Queste precauzioni, ovviamente, diventano ancora più restrittive quando si passi dall'allevamento di colture madre alla realizzazione di piani sperimentali specifici.

### 3.2 Recipiente

L'allevamento di colture madre o di mantenimento degli stocks può essere realizzato molto semplicemente in comuni acquari. Al fine di evitare che il materiale costituente l'acquario possa rilasciare nell'ambiente sostanze tossiche è opportuno e preferibile usare acquari in vetro o ancora meglio in pirex o comunque di materiali plastici per i quali si sia accertata l'innocuità nei confronti degli organismi che si devono allevare, quali ad esempio teflon, polietilene e plexiglas mentre acquari in PVC e nylon possono risultare tossici.

Le dimensioni degli acquari possono essere molto variabili e vanno calibrate in rapporto al numero di individui che si vogliono allevare. Tuttavia, in colture di massa è opportuno tenere presente che la densità di popolazione tende a crescere col tempo dando quindi luogo ad una riduzione del volume a disposizione di ogni individuo e di conseguenza anche ad una diminuzione delle disponibilità alimentari.

Anche la forma del recipiente può risultare di una certa importanza; infatti, in recipienti rettangolari le condizioni di luce e turbolenza dell'acqua possono determinare l'aggregazione degli animali in aree ristrette. In generale sono quindi da preferire vasche a sezione circolare.

Nella maggior parte dei casi l'aerazione dell'acqua di coltura non si rende necessaria, ma, se del caso, questa deve essere realizzata, dopo opportuna filtrazione su carbone attivo, con un flusso molto modesto per evitare la cattura di bollicine nel carapace che provocherebbe il galleggiamento degli individui incapaci di rompere la tensione superficiale e quindi destinati a morte. Per lo stesso motivo si dovrà anche curare il rapporto superficie libera/volume del contenitore mantenendolo quanto più basso possibile. E' da rilevare, al proposito, che non esistono indicazioni specifiche, ma che la scelta si è spesso basata su esperienze empiriche.

### 3.3 Acqua

Come liquido di coltura si potrà utilizzare dell'acqua proveniente da ambienti naturali o, in mancanza di questa, della comune acqua di rubinetto. In entrambi i casi è comunque indispensabile accertarsi che l'acqua usata non contenga inquinanti che possano danneggiare gli organismi che si vogliono allevare. Nel caso si disponga di acqua di lago o di stagno è necessaria una sua preventiva filtrazione su filtri con apertura di luce massima di 0,4-0,5  $\mu\text{m}$ , così da eliminare altri organismi che potrebbero svilupparsi negli acquari e competere con le Dafnie per spazio e alimento. Nel caso normalmente più frequente che si debba far ricorso ad acqua di rubinetto è opportuno che questa venga lasciata stabulare per circa 24-48 ore onde ridurre fortemente la presenza di cloro abitualmente impiegato per la potabilizzazione.

Durante la realizzazione di esperimenti specifici e in caso di dubbi sulla qualità dell'acqua disponibile è comunque opportuno utilizzare "acqua artificiale" a composizione ionica nota (Tab. 3.1).

Tab. 3.1

Composizione ionica di "acqua artificiale" idonea per colture di *Daphnia* e di altri organismi acquatici (da Vollenweider e Saraceni, 1964)

Ioni	mg/l
Ca	53,7
Mg	15
Na	3,75
K	3,1
HCO <sub>3</sub>	152,5
SO <sub>4</sub>	59,23
Cl	1,8
N	5
P	0,45
Si	2,3
Fe	0,09
Mn	0,002
Conducibilità $\mu\text{S}/18\text{ }^\circ\text{C}$	390
pH	8,45

E' importante sottolineare che gli organismi appartenenti al genere *Daphnia* sono particolarmente sensibili a cambiamenti dell'acqua nella quale vengono allevati. E' quindi raccomandabile che i cambi d'acqua, quando necessari, avvengano in maniera graduale e parziale, così da permet-

tere un adattamento degli individui in coltura.

Secondo Peters (1987) non esiste una composizione dell'acqua di coltura che possa definirsi ottima per l'allevamento di *Daphnia*; tuttavia, acque ad elevata durezza sembrano essere preferibili (Murphy, 1970; Levis and Maki, 1981), così pure povere in potassio che sembra avere effetti negativi sul potenziale riproduttivo.

### 3.4 Temperatura

La temperatura influenza in maniera rilevante i tassi di crescita, sviluppo e riproduzione delle Dafnie. Così è opportuno operare un corretto controllo delle temperature di allevamento. Abitualmente il range ottimale di temperatura alla quale allevare *Daphnia* varia da 15 a 24  $^\circ\text{C}$ . A seconda della specie utilizzata e a seconda del fatto che essa, negli ambienti in cui vive compia o meno migrazioni verticali, la temperatura ambientale potrà essere fluttuante o costante.

La maggior parte degli autori sembra, tuttavia, concordare nel fatto che temperature costanti attorno ai 20  $^\circ\text{C}$  siano generalmente preferibili anche perché più facilmente ottenibili in maniera controllata.

### 3.5 Luce

Le colture possono essere mantenute illuminate con luce naturale indiretta, evitando che i raggi del sole incidano direttamente sulla vasca. In questo caso anche il fotoperiodismo sarà quello naturale.

La maggior parte degli autori sembra comunque preferire condizioni di illuminazione artificiale ottenuta per mezzo di lampade a fluorescenza a luce bianca e fredda. Nel caso di illuminazione artificiale si dovrà dare preferenza a lampade di tipo "daylight" (Philips TL 33-bianca) che presentano uno spettro di emissione molto simile a quello della luce naturale.

Anche nel caso di illuminazione artificiale è preferibile una sorgente diffusa ad una sorgente puntiforme che potrebbe causare un aggregarsi di individui in aree ristrette dell'acquario (Paffenhofer, 1970), con una intensità che può variare da 0,5 a 5  $\text{W m}^{-2}$  ma comunque sempre inferiore a 5,5  $\text{W m}^{-2}$  (Vijverberg, 1989).

Anche la durata del fotoperiodo può risultare importante in quanto ad esso è spesso legata nei Cladoceri la produzione di uova efippiate. Un fotoperiodo di 10 ore di buio e 14 di luce sembra essere il più adeguato ad una buona crescita delle popolazioni.



### 3.6 Alimentazione

Uno dei punti più importanti per assicurare la continuità delle popolazioni in allevamento è quella di garantire loro una costante disponibilità di alimento. Poiché le Dafnie sono organismi filtratori ad ampio spettro alimentare, sia un alimento basato sul detrito che un alimento a base di alghe planctoniche unicellulari possono risultare ugualmente appropriati.

Nella scelta dell'alimento più idoneo per la specie che si intende allevare si deve comunque tener conto del fatto che la selezione del cibo nei Cladoceri è generalmente basata su una combinazione di una selezione attiva in base al gusto delle particelle (De Mott, 1986), e di una selezione passiva in rapporto alle loro dimensioni (Persson, 1985), quest'ultima in larga misura influenzata dalle dimensioni delle aperture dell'apparato di filtrazione e quindi variabile con l'età e la specie.

In generale, si considera che le dimensioni massime delle particelle alimentari che possono essere ingerite non sono superiori ad 1/50 delle dimensioni corporee dell'individuo (Hrbacek, comunicazione personale).

Un metodo per la preparazione di un terreno di coltura per *Daphnia* essenzialmente basato sulla catena del detrito è quello descritto da Banta (1937). Molto succintamente il metodo consiste nel preparare 10 litri d'acqua nei quali vengono fatti macerare per 3 giorni a 15-20 °C 1 kg di terreno di giardino e 200 g di stallatico di cavallo. Dopo opportuna filtrazione l'acqua così ottenuta diventa una buona soluzione base che diluita serve ottimamente quale terreno per colture di *Daphnia*.

La maggior parte degli autori, tuttavia, preferisce oggi usare metodi di produzione di alimento per *Daphnia* basati su colture monospecifiche non axeniche di alghe planctoniche. Generalmente si fa uso di alghe verdi appartenenti ai generi *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Selenastrum* o ad alghe flagellate come *Chlamydomonas* ed *Euglena*. Queste ultime hanno il vantaggio di presentare una elevata capacità di mantenersi in sospensione e di non sedimentare rapidamente sul fondo dell'acquario.

L'alimentazione, a base di colture algali monospecifiche, può essere convenientemente integrata con sospensioni di lievito di birra, al fine di fornire uno spettro alimentare più completo da un punto di vista energetico.

Quando si usano alghe provenienti da colture è opportuno che queste vengano fornite alle Dafnie dopo una centrifugazione che le separi dal

terreno di coltura che può contenere cataboliti algali o altri composti indesiderati. Inoltre, per lo stesso motivo, è indispensabile che si faccia uso sempre di alghe provenienti da colture mantenute in fase esponenziale di crescita e mai da colture senescenti.

Quando non determinata direttamente dalle necessità sperimentali la quantità di cibo nelle colture di *Daphnia* deve essere tale da non limitare pesantemente la possibilità riproduttiva della popolazione e, per quanto possibile, mantenuta su valori costanti nel tempo.

Uno degli errori nei quali molto spesso si incorre per evitare che l'alimento sia scarso è quello di eccedere nella quantità; un eccesso di alimento può, infatti, tra l'altro, provocare un intasamento degli apparati di filtrazione e determinare la morte delle Dafnie. Come regola generale l'alimento aggiunto alle colture dovrà non superare le 100 cal · l<sup>-1</sup> o 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cellule ml<sup>-1</sup> che corrisponde ad imprimere all'acqua una appena accentuata opalescenza verdognola.

Diversi sono i metodi che possono essere utilizzati per valutare la quantità di cibo da fornire alla *Daphnia*: dalla misura della concentrazione di clorofilla, al conteggio diretto delle cellule algali, alla determinazione del carbonio organico particellato, ecc. Un metodo semplice molto rapido e sufficientemente preciso è quello della combustione umida o micro-C.O.D. che permette di esprimere le disponibilità alimentari direttamente in cal · l<sup>-1</sup>. Data la sua versatilità si ritiene utile fornire le procedure per il suo impiego in appendice 3.A.

### 3.7 Sistemi automatizzati di coltura

Accanto ai metodi sopra descritti esiste la possibilità di utilizzare sistemi in continuo che riducono fortemente la necessità di intervento esterno e permettono di ottenere una buona crescita delle popolazioni di *Daphnia*. Tali metodi si basano in generale su sistemi strumentali automatici che ricostruiscono per certi versi una catena alimentare artificiale che va dai nutrienti algali allo zooplancton erbivoro e volendo anche ad anelli gerarchicamente superiori.

Di rilievo sono quelli proposti da Kersting (1985) che permettono la realizzazione di tre ambienti (uno con autotrofi, l'altro con detritivori ed il terzo con *Daphnia*) che possono automantenersi con il solo input di luce; quello proposto da Lampert (1975, 1976) che avendo alla base un chemostato può nutrire diverse colture di *Daphnia* con livelli costanti di alimento; il terzo, infine,

quello messo a punto da Manca, Piazza e de Bernardi (1988) che permette, a partire da una riserva di terreno di coltura per alghe, di ottenere una serie parallela di colture di *Daphnia* che possono essere sottoposte a diversi trattamenti contemporanei quali spesso si utilizzano in test ecotossicologici.

Molto schematicamente il sistema strumentale approntato (fig. 3.2) consiste in un serbatoio per il terreno di coltura delle alghe, di una pompa peristaltica temporizzata ed a flusso variabile, di un sistema elettronico di controllo di una serie di elettrovalvole e di bottiglie di coltura di alghe e *Daphnia* poste in cascata. In particolare, l'apparecchiatura elettronica permette la realizzazione di catene alimentari artificiali a più stadi e con rifornimento costante di alimento. Il sistema consente, inoltre, la realizzazione contemporanea di più trattamenti a lungo termine in condizioni controllate per quanto riguarda le disponibilità

alimentari e, se necessario, per quanto riguarda sostanze tossiche, permettendo una facile realizzazione di test di tossicità in condizioni croniche.

### 3.8 Raccomandazioni conclusive

Una pulizia effettuata ad intervalli regolari degli acquari è essenziale per assicurare la bassa mortalità. Nella maggior parte dei casi è sufficiente pulire gli acquari con una spugna umida. Tuttavia, se si vuole allungare l'intervallo tra una pulizia e l'altra, è opportuno che negli acquari dove vengono coltivate le Dafnie venga anche lasciata crescere una popolazione mista di Ciliati e di Flagellati eterotrofi che possono contribuire con la loro attività a mantenere le superfici sgombre da popolazioni che potrebbero danneggiare la crescita di *Daphnia*. La frequenza di rinnovo dell'acqua di coltura è in larga misura influenzata dalla densità delle popolazioni coltivate e quindi

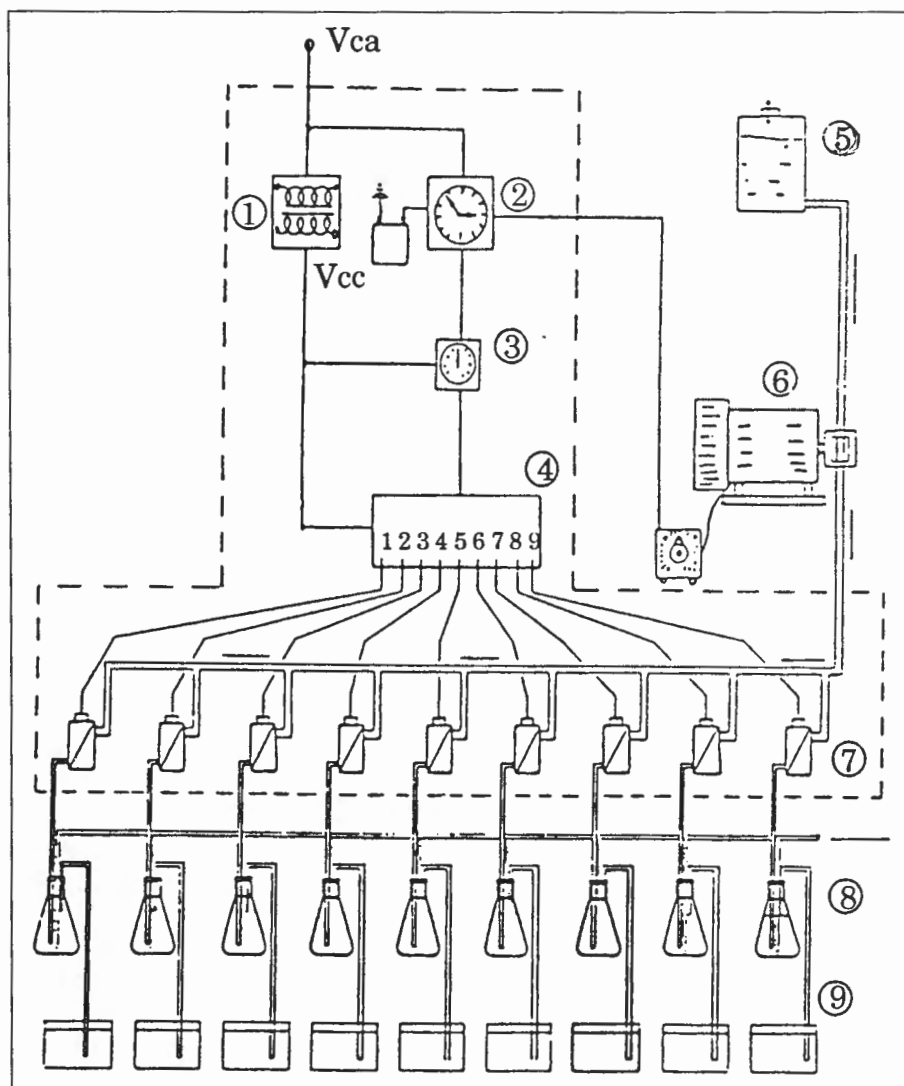


Fig. 3.2  
Schema generale di funzionamento:  
1 - alimentatore 220 Vca; Vcc;  
2 - orologio programmato;  
3 - temporizzatore regolabile da 1' a 15';  
4 - circuito sequenziale per la selezione dei nove canali;  
5 - terreno di coltura;  
6 - pompa peristaltica con regolazione della velocità;  
7 - elettrovalvole;  
8 - colture algali;  
9 - colture zooplanctoniche (da Manca, Piazza e de Bernardi, 1988)



dall'accumulo nell'ambiente di cataboliti, nonché da una riduzione dell'ossigeno contenuto nell'acqua. Questo, in larga misura, dipende dall'intensità di grazing delle Dafnie presenti e dalla temperatura. E' evidente che più alta è la temperatura e più alta è la densità degli individui più frequente dovrà essere il ricambio dell'acqua.

La qualità dell'acqua e l'alimento fornito sono, infatti, gli elementi di maggiore rilievo per la coltivazione di *Daphnia*. E' raccomandabile, quando possibile, usare acqua proveniente da ambienti naturali preventivamente filtrata su un filtro da 0,45-0,50  $\mu\text{m}$  di luce.

Come alimento per colture di mantenimento possono essere usati sia detrito in sospensione che colture algali monospecifiche ma non axeniche. Particolare cura dovrà essere, inoltre, posta nel non eccedere nella quantità di cibo fornita perché questa può diventare un fattore di mortalità per la popolazione. Nel caso si usino alghe vive da colture è importante che queste alghe provengano da popolazioni mantenute in fase esponenziale di crescita e comunque mai da popolazioni senescenti. Nel caso di utilizzo di colture monospecifiche di alghe come fonte alimentare le Cloroficee in generale rappresentano una buona sorgente di alimento, soprattutto con i generi *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus* e *Selenastrum*.

E' indispensabile che in occasione di tutte le manipolazioni delle colture e in fase sperimentale si ponga la necessaria cura per evitare che le Dafnie vengano a contatto con l'aria. Quando questo avviene, infatti, può verificarsi l'inglobamento nel carapace di bollicine di aria; gli animali verranno così costretti a galleggiare sulla superficie dell'aria, incapaci di vincere la tensione superficiale, andando incontro a morte sicura.

### 3.9 Bibliografia

- Banta A.M., Brown L.A., 1929. Control of sex in Cladocera. I - Crowding the mothers as/or means of controlling male production. *Physiol. Zool.*, 2: 80-92.
- Banta A.M., 1937. Culture of Cladocera. In: F.E. Lutz, P.S. Welch, P.S. Galtshoff and J.G. Meedaham (Eds.) "Culture methods for invertebrate animals". *Dover Publ.*: 207-210.
- Burns C.W., 1968. Direct observation of mechanisms regulating feeding behaviour of *Daphnia* in lake water. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, 53 (1): 83-100.
- Corigliano M.C. e de Bernardi R., 1978. Experimental population dynamics and competition in *Daphnia obtusa* Kurtz and *Simocephalus vetulus* Moller (Crustacea, Cladocera). *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 36, 65-83.
- De Bernardi R., Lacqua P. e Soldavini E., 1978. Effects of temperature and food upon developmental times and growth in *Daphnia obtusa* Kurtz and *Simocephalus vetulus* Muller (Crustacea, Cladocera). *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 36, 171-191.
- De Mott, 1986. The role of taste in food selection by freshwater zooplankton. *Oecologia*, 69: 334-340.
- Herbert P.D.N., 1977. The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biol. Rev.*, 53: 307-426.
- Hrbäckowa M., 1984. The size of primiparae and neonates of *Daphnia hyalina* Leydin (Crustacea, Cladocera) under natural and enriched food conditions. *Nest. Cesk. Spol. Zool.*, 38 (2): 98-105.
- Kersting K., 1985. Properties of an aquatic micro-ecosystem. V. Ten years of observation of the prototype. *Nerh. Internat. Verein. Limnol.*, 22: 3040-3045.
- Lampert W., 1975. A laboratory system for the cultivation of large numbers of *Daphniae* under controlled conditions. *Arch. Hydrobiol.*, suppl. 48: 138-140.
- Lampert W., 1976. A directly coupled, artificial two-step food chain for long term experiments with filter feeders at constant food concentrations. *Mar. Biol.*, 37: 349-355.
- Lewis M.A. and Maki A.W., 1981. Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Strauss in laboratory culture. *Hydrobiologia*, 85: 175-179.
- Manca M., Piazza S. e de Bernardi R., 1988. Apparecchiatura elettronica per la realizzazione di catene alimentari artificiali a due o più stadi con rifornimento costante di alimento. *Acqua e Aria*, 4: 471-477.
- Murphy J., 1970. A general method for monoxenic cultivation of Daphnidae. *Biol. Bull.*, 139: 321-337.
- Nadin-Hurley C.M. and Duncan A., 1976. A comparison of daphnid gut particles with the sestonic particles present in two Thames walley reservoirs throughout 1970 and 1971. *Freshwater Biol.*, 6 (2): 109-129.
- Paffenhofer G.A., 1970. Cultivation of *Calanus helgolandicus* under controlled conditions. *Helgolander Wiss. Meeres.*, 20: 346-354.
- Persson G., 1985. Clearance rates of crustacean macrofilters: the nature of *in situ* rate depression in a fertilized oligotrophic lake in the Knokkel Area, Northern Sweden. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol. Hydrogr.*, 70: 335-358.
- Peters R.H., 1987. *Daphnia* culture. In: R.H. Peters and R. de Bernardi (Eds.) "*Daphnia*". *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 45: 483-495.
- Schindler J.E., 1970. Food quality and zooplankton nutrition. *J. Anim. Ecol.*, 40: 589-595.

Scourfield D.J. and Harding J.P., 1958. A key to the British species of freshwater Cladocera. 2nd ed. *Scient. Publs. n. 5 Freshwat. Biol. Ass.*: 1-55.

Slobodkin L.B., 1954. An algebra of population growth. *Ecology*, 34: 513-519.

Vijverberg J., 1989. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of Copepods and Cladocerans under laboratory and *in situ* conditions: a review. *Freshwater Biol.*, 21: 317-373.

Vollenweider R.A. e Saraceni C., 1964. Un nuovo terreno nutritizio per la coltivazione di alghe planctoniche d'acqua dolce.

*Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 17: 215-221.

## APPENDICE

### 3.A METODO DELLA COMBUSTIONE UMIDA (MICRO C.O.D.) PER MISURARE LA CONCENTRAZIONE DI CIBO PER *DAPHNIA*, PROVENIENTE DA COLTURE ALGALI MONOSPECIFICHE

Rispetto al consueto metodo C.O.D., il micro C.O.D. presenta il vantaggio di una maggiore rapidità e dell'uso di un campione con volume molto più piccolo, anche se la sua precisione è lievemente inferiore. La sostanza organica non è bruciata da una sorgente esterna di calore, ma da una sorgente interna di calore (soluzione di  $K_2Cr_2O_7$  in  $H_2SO_4$ ). Il metodo permette di esprimere la concentrazione di alimento direttamente in  $cal \cdot L^{-1}$ .

#### Reagenti

- Soluzione 0,05 N di  $K_2Cr_2O_7$  in acqua distillata;
- $H_2SO_4$  per analisi (densità = 1,75) leggermente diluito (1/5  $H_2O$  e 4/5  $H_2SO_4$ );
- 10 mg di  $Ag_2SO_4$  in 50 mL +  $H_2SO_4$  (da conservare in frigorifero in bottiglia scura per un massimo di due giorni);
- $H_2O$  bidistillata;
- Soluzione standard. E' una soluzione di albumina e di glucosio in proporzioni tali che il suo contenuto calorico sia dato per il 60% dalla albumina e il 40% dal glucosio. La sua concentrazione deve essere tale che un mL di questa soluzione venga ossidato da 0,5 mL di  $K_2Cr_2O_7$  0,05 N.

#### Modo di operare:

Un mL di campione, un mL di soluzione di  $K_2Cr_2O_7$ , tre mL di  $Ag_2SO_4$  in  $H_2SO_4$  si mettono in una provetta per analisi e si mette la provetta per 20 minuti nel polistirolo espanso. Si raffredda quindi con acqua a temperatura ambiente e si misura l'assorbanza a 420 nm in celle da 5 mm.

Prima di ogni determinazione si fa un "bianco" (determinazione dell'assorbanza senza aggiunta di soluzioni contenenti carbonio organico) e uno standard (determinazione dell'assorbanza con aggiunta di soluzione standard).

Per la taratura dello strumento occorre determinare l'assorbanza di una soluzione completamente ridotta di  $K_2Cr_2O_7$ ,  $H_2SO_4$ ,  $Ag_2SO_4$ , uno o due mg/mL di glucosio.

Si costruisce quindi un grafico sulle cui ascisse sono riportate le calorie e sulle ordinate l'assorbanza. Si traccia una retta dal punto corrispondente al "bianco" al punto corrispondente alla soluzione di  $K_2Cr_2O_7$  completamente ridotta. L'assorbanza della soluzione standard deve cadere sulla retta; altrimenti bisogna dividere il valore teorico per quello ottenuto e moltiplicare per questo fattore i risultati ottenuti, che sono attendibili solo per i punti entro i 3/4 del grafico (Fig. 3.A.1).

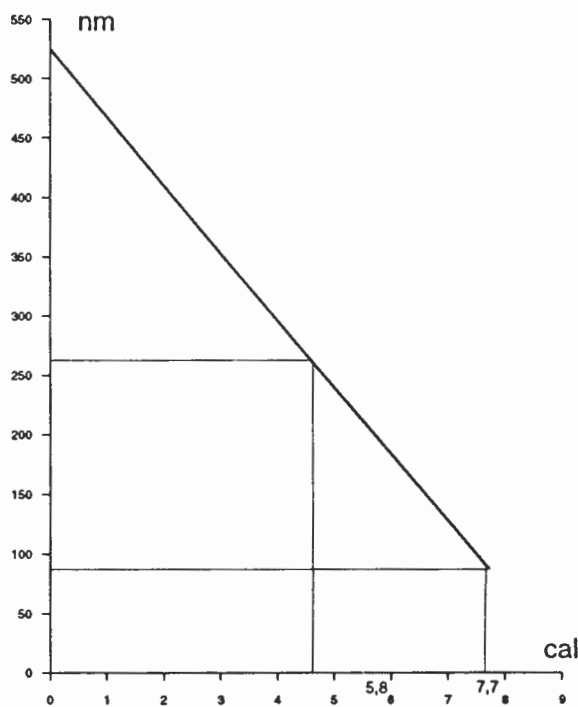


Fig. 3.A.1  
Assorbanza in funzione delle calorie contenute in un mL di campione.



Gorbi G.<sup>\*</sup>, Manfredi E.<sup>\*</sup> e Moroni F.<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Istituto di Ecologia, Università - Parma

<sup>\*\*</sup> IND.ECO. - Parma

## Riassunto

Il cladocero *Daphnia magna* è uno degli organismi maggiormente utilizzati in tossicologia ambientale. Diversi autori hanno tuttavia sottolineato l'importanza di alcune fonti di variazione che compromettono la ripetibilità del saggio biotossicologico con *Daphnia*. Il presente lavoro analizza alcune delle cause di variazione del dato tossicologico (eterogeneità genetica e alcune variabili dei metodi di allevamento). Sulla base dei dati disponibili, si suggerisce che anche la densità di popolazione rientri fra i parametri definiti nelle metodiche standard.

## Summary

The cladoceran *Daphnia magna* is one of the organisms widely used in aquatic toxicology. Variations in the response of this test organism to toxic stresses have been pointed out by many Authors. The influence of different variation sources (genetic heterogeneity and cultural methods) on the life history and toxicological responses of *Daphnia* is discussed. On the basis of the available data, population density should be considered among the parameters to be kept constant in the culture of test organisms.

## 4.1 Introduzione

Nella legislazione di molti Paesi compare il test biotossicologico su diverse specie come strumento per il controllo e la prevenzione ambientale. Una prerogativa dei saggi biotossicologici, con finalità legali, è la riproducibilità che può venire meno a causa di alcune fonti di variazione non controllate così riassumibili:

- diversa sensibilità degli organismi dovuta a diversità genetica;
- metodiche di produzione del materiale biologico;
- scarsa standardizzazione delle metodiche di conduzione del test.

Tra le specie più usate o proposte nella tossicologia ambientale vi è il cladocero *Daphnia magna*. Esiste un'ampia letteratura sulla biologia di questo organismo e sull'influenza che numerosi fattori (temperatura, fotoperiodo, concentrazione O<sub>2</sub>, composizione dell'acqua di diluizione) hanno sulla sua dinamica di popolazione e sui test tossicologici (Buikema e Coll., 1980; Baudo, 1987; Lampert, 1987; Peters, 1987; Viganò, 1989; Vijverberg, 1989).

Meno conosciuta è l'influenza della diversità genetica e, per alcuni aspetti, delle condizioni di allevamento sulla risposta di questo organismo agli stress ambientali (fisici o chimici).

Il fatto che organismi geneticamente diversi, appartenenti alla stessa specie, abbiano differenti sensibilità agli agenti esterni è cosa ben nota. La questione assume particolare importanza nel caso di organismi che, riproducendosi partenogeneticamente, danno origine a cloni. Potrebbe infatti essere relativamente facile che l'allevamento prolungato nei diversi laboratori porti col tempo alla selezione di popolazioni monoclonali geneticamente diverse e con diversa sensibilità.

Ci si è quindi posti i seguenti quesiti:

- in quale misura cloni geneticamente differenti possono divergere ecologicamente;
- genotipi diversi hanno sensibilità diverse alle sostanze tossiche e in quale misura;
- che conseguenze hanno le condizioni di allevamento delle femmine partenogenetiche sulla fitness e sulla sensibilità ai tossici degli organismi da esse prodotti.

## 4.2 Divergenza ecologica tra cloni geneticamente diversi

Le ricerche di Loaring e Hebert (1981) su *Daphnia pulex* hanno dimostrato che cloni geneticamente differenti possono non essere analoghi ecologicamente. I diversi cloni elettroforetici analizzati dagli Autori hanno infatti presentato, nelle medesime condizioni colturali, differenze significative nel tasso intrinseco di crescita, nella durata media della vita, nella produzione di efippi e nella capacità competitiva: la loro fitness differiva quindi significativamente (Tab. 4.1). In particolare negli esperimenti in cui è stata studiata la competizione interclonale, il continuo vantaggio di un clone,

dovuto alla fitness maggiore, portava alla esclusione di tutti gli altri: Loaring e Hebert (1981) hanno pertanto attribuito alla eterogeneità spaziale e/o temporale dell'ambiente la diversità clonale riscontrata negli habitat naturali. Al contrario, in laboratorio l'ambiente è rappresentato da spazi limitati ove viene mantenuta una omogeneità ed una costanza delle condizioni chimico-fisiche che potrebbero in breve selezionare popolazioni monoclonali.

Gli esperimenti da noi effettuati su cloni di *Daphnia magna*, geneticamente diversi, hanno confermato l'esistenza di differenze nell'accrescimento e nella attività riproduttiva anche in questa specie. I disegni sperimentali adottati ed il

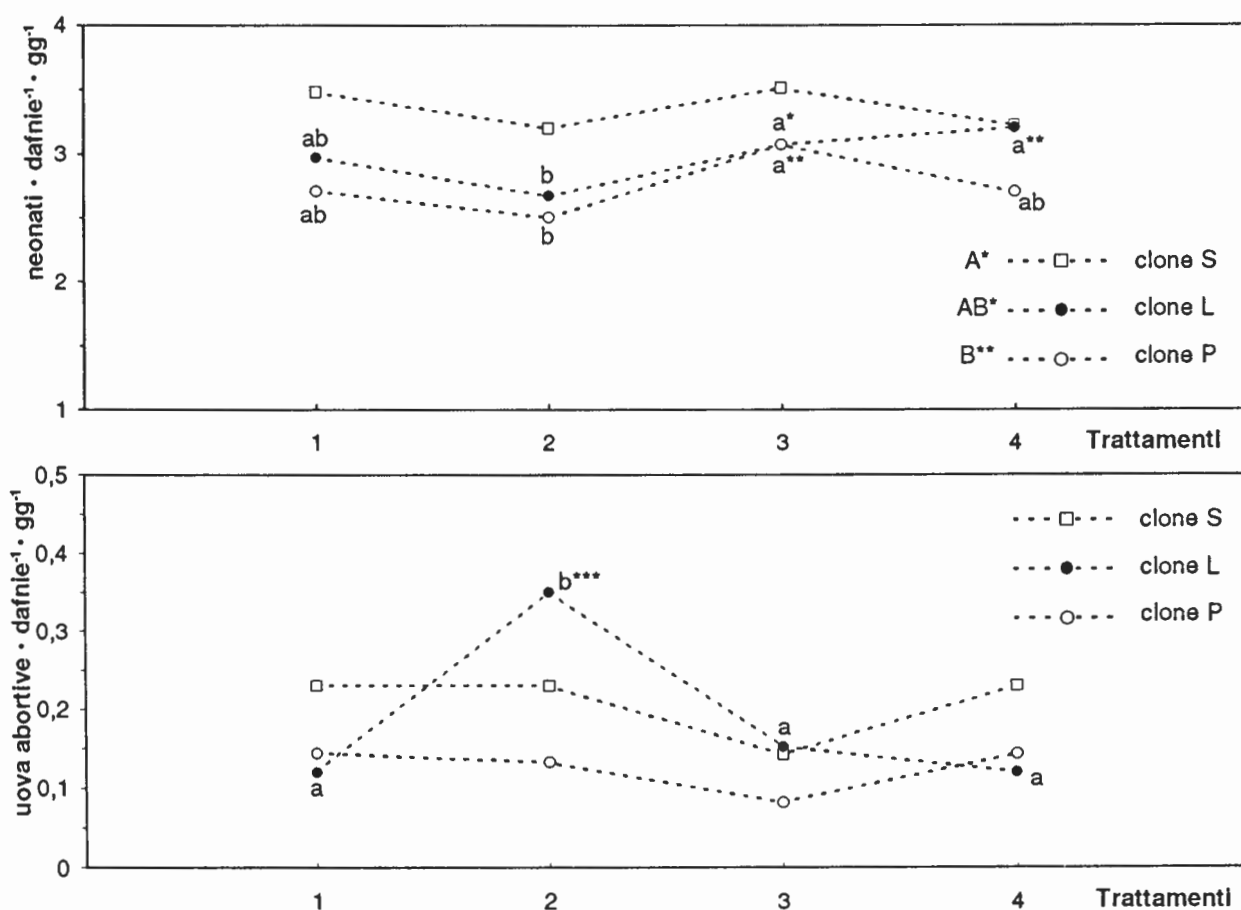


Fig. 4.1.a:

Tasso di produzione di neonati e di uova abortive osservati in *Daphnia magna* dopo 33 giorni di mantenimento con i seguenti trattamenti: 1- la sospensione algale (*Scenedesmus acutus*) è stata somministrata tal quale (alghe + mezzo colturale); 2- le alghe sono state somministrate dopo centrifugazione (2000 rpm per 15 min) e separazione dal mezzo colturale; 3- la sospensione algale è stata somministrata tal quale (alghe + mezzo colturale) con aggiunta di Vit B<sub>12</sub> (1 mg/L); 4- le alghe sono state somministrate, dopo centrifugazione e separazione dal mezzo colturale, con aggiunta di Vit B<sub>12</sub> (1 mg/L). Condizioni sperimentali comuni per tutti i trattamenti: temperatura 20 ± 1 °C, fotoperiodo di 12 h luce, ricambio del mezzo colturale (acqua naturale) e alimentazione a giorni alterni (1,2 · 10<sup>5</sup> cell/mL). Lettere minuscole diverse contrassegnano valori significativamente diversi tra trattamenti entro ciascun clone; lettere maiuscole diverse indicano differenze significative tra cloni (\*p < 0,20; \*\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,01).



Tab. 4.1

Differenze clonali nel tasso intrinseco di crescita, nella durata media di vita e nella produzione di efippi (efippi dafnie<sup>-1</sup> · gg fertili<sup>-1</sup>) di *Daphnia pulex*; le lettere diverse indicano valori significativamente diversi, P < 0,05 (Loaring e Hebert, 1981)

Cloni	r	Vita media (gg)	Efippi (20 °C)
1	0,224 <sup>A</sup>	35,1 <sup>A</sup>	0,017 <sup>AB</sup>
4	0,202 <sup>B</sup>	26,3 <sup>B</sup>	0,005 <sup>B</sup>
13	0,190 <sup>B</sup>	25,5 <sup>B</sup>	0,027 <sup>A</sup>
6	0,175 <sup>C</sup>	21,9 <sup>B</sup>	0,026 <sup>A</sup>

confronto statistico delle risposte osservate ai diversi trattamenti (ANOVA e test di Scheffé) hanno messo in evidenza la maggiore capacità di sfruttamento della risorsa alimentare del clone S rispetto agli altri cloni studiati e la maggiore sensibilità alla carenza di vitamina B<sub>12</sub> dei cloni P ed L (Fig. 4.1 a e b). Infine sono state osservate differenze interclonali nella percentuale di neonati di sesso maschile prodotti in determinate condizioni colturali (clone S 0%; clone P 1,02%; clone L 40,7%) (Gorbi e Coll., 1991). Poiché la comparsa di maschi nella popolazione è spesso considerata un indice di stress, una differenza

clonale molto marcata per questo parametro potrebbe comportare confusione nel giudizio della qualità dell'allevamento. I dati da noi rilevati sono comunque relativi ad esperimenti effettuati con un unico fotoperiodo (12 h luce): la nostra ipotesi a questo riguardo è che i cloni analizzati differiscano nella sensibilità alla durata della fase di illuminazione e verrà quindi ulteriormente approfondito questo aspetto.

Le risposte dei cloni di *D. pulex* e *D. magna* ai singoli trattamenti, per quanto quantitativamente diverse, sono comunque risultate qualitativamente analoghe.

### 4.3 Differenze clonali nella sensibilità alle sostanze tossiche

Differenze molto elevate nella sensibilità a cadmio e 3,4-dicloroanilina sono state osservate da Baird e Coll. (1990) in cloni di *D. magna*: le LC<sub>50</sub> del Cd risultavano infatti distribuite entro il range 0,06 - > 100 mg/L, mentre per DCA variavano di circa un fattore 10. Non è stata riscontrata inoltre concordanza nell'ordine relativo della sensibilità dei genotipi alle diverse sostanze tossiche. Questo, secondo gli Autori, implica che la tolleranza agli stress acuti non è dominata da una risposta generalizzata, ma dipende dalla capacità specifica dei singoli genotipi di reagire ai tossici.

I saggi da noi effettuati su *D. magna* non

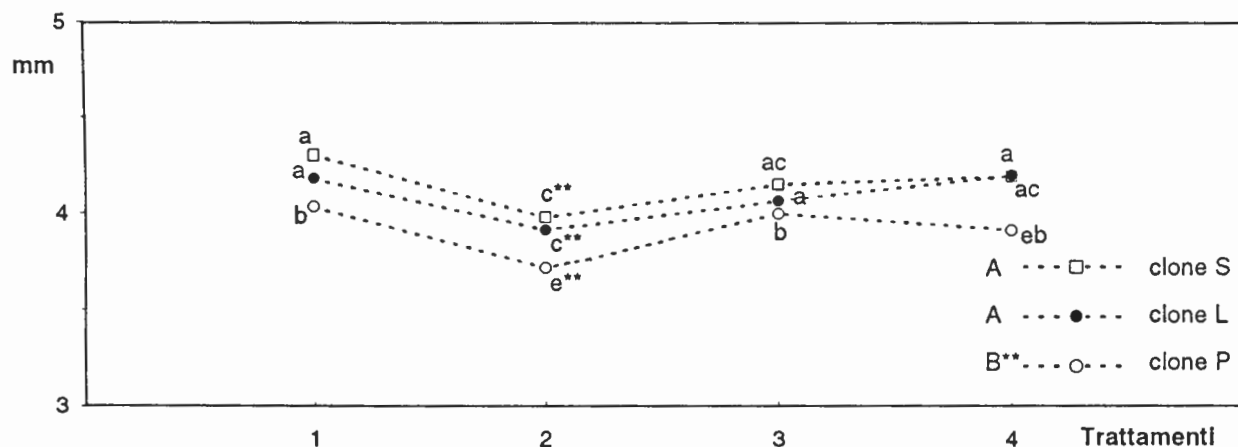


Fig. 4.1.b:

Lunghezza media del carapace rilevata in *Daphnia magna* dopo 33 giorni di mantenimento con i seguenti trattamenti: 1- la sospensione algale (*Scenedesmus acutus*) è stata somministrata tal quale (alghe + mezzo colturale); 2- le alghe sono state somministrate dopo centrifugazione (2000 rpm per 15 min) e separazione dal mezzo colturale; 3- la sospensione algale è stata somministrata tal quale (alghe + mezzo colturale) con aggiunta di Vit B<sub>12</sub> (1 mg/L); 4- le alghe sono state somministrate, dopo centrifugazione e separazione dal mezzo colturale, con aggiunta di Vit B<sub>12</sub> (1 mg/L). Condizioni sperimentali comuni per tutti i trattamenti: temperatura 20 ± 1 °C, fotoperiodo di 12 h luce, ricambio del mezzo colturale (acqua naturale) e alimentazione a giorni alterni (1,2 · 10<sup>5</sup> cell/mL). Lettere minuscole diverse contrassegnano valori significativamente diversi tra trattamenti entro ciascun clone; lettere maiuscole diverse indicano differenze significative tra cloni (\*p < 0,20; \*\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,01).

Tab. 4.2

Valori  $IC_{50}$  (mg/L  $K_2Cr_2O_7$ ) a 24 h calcolata per gli organismi (età < 24 h) nati nelle diverse condizioni di allevamento. Lettere diverse contrassegnano valori significativamente diversi entro ciascun clone ( $P = 0,05$ ; ANOVA e test di Scheffé). V:  $1,5 \cdot 10^5$  cell/mL di *Scenedesmus acutus*, pari a 0,700 mg/ind (peso secco, densità individui = 1 ind/100 mL. I:  $1,2 \cdot 10^5$  cell/mL, pari a  $0,51 \pm 0,040$  mg/ind, densità individui = 1 ind/100 mL. IV:  $6,0 \cdot 10^4$  cell/mL, pari a 0,250 mg/ind, densità individui = 1 ind/100 mL.

I test sono stati effettuati a  $20 \pm 1$  °C e fotoperiodo di 12 h di luce; come acqua di diluizione è stata utilizzata l'acqua naturale usata nell'allevamento (durezza =  $200 \pm 20$  mg/L come  $CaCO_3$ ; pH =  $7,6 \pm 0,2$ ).

TRATTAMENTI	V	I	IV	$IC_{50}$ media
$IC_{50}$ clone P	0,72 <sup>b</sup> s = 0,06 n = 4	0,83 <sup>a</sup> s = 0,05 n = 5	0,87 <sup>a</sup> s = 0,06 n = 5	0,82 s = 0,075 n = 17
$IC_{50}$ clone L	0,72 <sup>b</sup> s = 0,10 n = 6	0,89 <sup>a</sup> s = 0,10 n = 8	0,94 <sup>a</sup> s = 0,13 n = 3	0,84 s = 0,134 n = 17

Tab. 4.3

Valori di alcuni parametri biometrici osservati in organismi di taglia diversa (lunghezza alla nascita) allevati a due differenti livelli di cibo (cell/mL di *Ankistrodesmus falcatus*)

(da Tessier e Consolatti, 1989) (\*\*P < 0,001; \*\*P < 0,10; \*P < 0,11).

Concentrazione algale (cell/mL)	$5 \cdot 10^4$		$3 \cdot 10^3$	
Lunghezza alla nascita (mm)	0,49	0,57	0,49	0,56
Lunghezza alla maturità (mm)	0,99	1,01	0,86	0,93***
Peso alla maturità (mg)	7,53	8,04	3,75	4,56***
Dimensioni delle covate	3,80	3,96	1,36	1,62*
Tempo alla maturità (h)	123	108***	184	171**

Tab. 4.4a

Lunghezza media (mm) alla nascita di organismi prodotti ai diversi trattamenti.

I:  $1,2 \cdot 10^5$  cell/mL di *Scenedesmus acutus*, pari a  $0,514 \pm 0,040$  mg/ind (peso secco), densità individui = 1 ind/100mL. II:  $1,2 \cdot 10^5$  cell/mL, pari a 0,103 mg/ind, densità individui = 1 ind/20mL. III:  $2,4 \cdot 10^4$  cell/mL, pari a 0,103 mg/ind, densità individui = 1 ind/100mL. IV:  $6,0 \cdot 10^4$  cell/mL, pari a 0,250 mg/ind, densità individui = 1 ind/100mL. V:  $1,5 \cdot 10^5$  cell/mL, pari a 0,700 mg/ind, densità individui = 1 ind/100mL.

Condizioni sperimentali per tutti i trattamenti: temperatura  $20 \pm 1$  °C, fotoperiodo 12 h luce, ricambio del mezzo colturale (acqua naturale) e alimentazione a giorni alterni. Lettere diverse contrassegnano valori significativamente diversi (ANOVA e test di Scheffé;  $P < 0,05$ ).

TRATTAMENTI	I	II	III	IV	V
mm alla nascita	0,886 <sup>a</sup> s = 0,035 n = 267	0,983 <sup>b</sup> s = 0,037 n = 119	0,965 <sup>b</sup> s = 0,034 n = 65	0,914 <sup>c</sup> s = 0,032 n = 99	0,896 <sup>a</sup> s = 0,033 n = 140



hanno evidenziato differenze nella sensibilità al bicromato di potassio tra cloni geneticamente diversi che pure avevano presentato differenze significative per alcuni parametri biometrici (Tab. 4.2).

#### 4.4 Influenza delle condizioni di allevamento sulla sensibilità degli organismi

E' noto che, in *Daphnia*, la qualità dell'alimento influisce sulla sensibilità ai tossici: in particolare i neonati di organismi alimentati con alghe verdi mostrano una sensibilità inferiore rispetto ai neonati di dafnie mantenute con cibi sintetici, es. cibo per trota, alfalfa, cerophyl (Cowgill, 1987). Più scarse sono le informazioni sulle

differenze nella fitness e nella sensibilità ai tossici dei neonati di dafnie allevate con livelli di cibo differenti.

In alcune specie del genere *Daphnia* le dimensioni e/o la massa dei neonati variano in relazione alla concentrazione di alimento somministrato alle madri. Una discreta variabilità della taglia è stata comunque osservata anche fra i nati da diverse covate di uno stesso organismo ed entro una stessa covata (Tessier e Consolatti, 1991). Questi autori hanno dimostrato che i neonati di *Daphnia parvula*, *galeata*, *mendotae* e *pulicaria* di taglia maggiore sopravvivono più a lungo al digiuno e presentano fitness più elevata in condizioni di scarsità di cibo rispetto ai neonati di taglia inferiore (Tab. 4.3).

Negli esperimenti condotti su *Daphnia magna*, è stato osservato che le dafnie alimentate con

Tab. 4.4b

Lunghezza media (mm) dei neonati prodotti dagli stessi organismi in condizioni di bassa quantità di alimento (trattamento II:  $1,2 \cdot 10^5$  cell/mL, pari a 0,103 mg/ind, densità individui = 1 ind/20mL e dopo trasferimento a elevate quantità (trattamento V:  $1,5 \cdot 10^5$  cell/mL, pari a 0,700 mg/ind, densità individui = 1 ind/100mL).

Lettere diverse contrassegnano valori significativamente diversi (ANOVA e test di Scheffé;  $P < 0,05$ ).

TRATTAMENTI	II	V
mm alla nascita	0,983 <sup>a</sup> s = 0,037 n = 119	0,858 <sup>b</sup> s = 0,029 n = 126

Tab. 4.5

Tasso di produzione di neonati, lunghezza del carapace (ANOVA e test di Scheffé) e % di progenie di sesso maschile ( $\chi^2$  test) in *D. magna* (clone L) dopo 36 giorni di mantenimento nei diversi trattamenti.

I:  $1,2 \cdot 10^5$  cell/mL di *Scenedesmus acutus*, pari a  $0,514 \pm 0,040$  mg/ind (peso secco), densità individui = 1 ind/100mL. II:  $1,2 \cdot 10^5$  cell/mL, pari a 0,103 mg/ind, densità individui = 1 ind/20mL. III:  $2,4 \cdot 10^4$  cell/mL, pari a 0,103 mg/ind, densità individui = 1 ind/100mL.

Condizioni sperimentali per tutti i trattamenti: temperatura  $20 \pm 1$  °C, fotoperiodo 12 h luce, ricambio del mezzo colturale (acqua naturale) e alimentazione a giorni alterni. Lettere diverse contrassegnano valori significativamente diversi (ANOVA e test di Scheffé;  $P = 0,05$ ).

TRATTAMENTI	I	II	III
neonati $\cdot$ dafnie <sup>-1</sup> $\cdot$ giorni <sup>-1</sup>	3,34 <sup>a</sup> s = 0,313 n = 7	0,325 <sup>b</sup> s = 0,033 n = 6	0,509 <sup>c</sup> s = 0,049 n = 6
lunghezza (mm)	4,05 <sup>a</sup> s = 0,142 n = 31	3,05 <sup>b</sup> s = 0,093 n = 32	3,14 <sup>b</sup> s = 0,095 n = 25
% maschi	14 <sup>a</sup>	33 <sup>b</sup>	35 <sup>c</sup>

quantità di alghe discretamente elevate producevano neonati di taglia inferiore rispetto ai trattamenti con quantità di cibo più basse (Tab. 4.4a). Le prove effettuate trasferendo a condizioni di elevate quantità di alimento (0,700 mg/ind) organismi allevati per 36 giorni a basse quantità (0,103 mg/ind) sembrano confermare questo dato (Tab. 4.4b). E' da sottolineare che la lunghezza media del carapace, la percentuale di progenie di sesso maschile e la lunghezza dei neonati sono risultate analoghe in trattamenti che prevedevano concentrazioni algali e densità degli individui molto diverse ma una identica quantità di alimento in termini di mg/ind (Tab. 4.4a e 4.5: trattamenti II e III).

I neonati, prodotti nelle differenti condizioni alimentari, hanno mostrato variazioni nella sensibilità al bicromato di potassio: in generale, per i cloni analizzati e nelle condizioni sperimentali adottate, si è osservata una tendenza all'aumento della sensibilità all'aumentare della concentrazione algale utilizzata nell'allevamento degli organismi genitori (Tab. 4.2). Una risposta analoga è stata osservata da Baird e Coll. (1989) in *Daphnia magna* alimentata con differenti concentrazioni di *Chlorella* (Tab. 4.6). Questi risultati pongono diversi interrogativi sulle strategie riproduttive messe in atto dagli organismi appartenenti al genere *Daphnia*. Tessier e Consolatti (1991) ipotizzano che questi organismi possano modificare sia quantitativamente che qualitativa-

vamente le risorse investite per ciascun neonato in funzione della quantità di cibo disponibile. L'influenza di questo comportamento sulla fitness e sulla sensibilità ai tossici degli organismi prodotti non è tuttavia del tutto chiarita: l'approfondimento di questi aspetti della biologia di *Daphnia* ci sembra particolarmente interessante anche per l'utilizzazione di questo organismo in tossicologia.

#### 4.5 Conclusioni

I dati riportati, per quanto scarsi, dimostrano che cloni geneticamente diversi, oltre a non essere ecologicamente analoghi, possono presentare diversa sensibilità ai tossici; tuttavia la sensibilità relativa dei cloni e l'ampiezza dell'intervallo di variazione delle LC<sub>50</sub> possono essere diverse per le singole sostanze tossiche.

In base alle informazioni disponibili, si ritiene opportuno suggerire che anche la densità degli individui nell'allevamento rientri fra i parametri da mantenere entro limiti definiti nelle metodiche standard. Le variazioni di densità della popolazione provocano, come noto, variazioni dello spazio vitale e della quantità di cibo disponibile per ciascun individuo. Poiché i valori di alcuni parametri biometrici sembrano collegabili a quest'ultimo fattore e la sensibilità dei neonati può variare al variare del livello di cibo usato nell'allevamento, un'ampia fluttuazione della densità della popolazione potrebbe comportare la produzione di organismi con diversa sensibilità.

Con questa indagine, oltre a sottolineare alcuni aspetti della biologia di *Daphnia* non completamente chiariti, si è voluto evidenziare l'importanza di una rigida standardizzazione dei metodi da adottare anche nell'allevamento degli organismi test e la necessità di una rigorosa applicazione degli stessi. Secondo Baird e Coll. (1989) anche il genotipo degli organismi utilizzati in tossicologia dovrebbe essere specificato.

Tab. 4.6  
LC<sub>50</sub> di 3,4-dicloroanilina per organismi prodotti a differenti concentrazioni di cibo  
(da Baird e Coll., 1989)

	Quantità di cibo (mg C/L)	
	0,5	0,05
LC <sub>50</sub> (µg/L)	104 ± 4,2	195 ± 6,3



## 4.6 Bibliografia

Baird D.J., Barber I., Bradley M., Calow P. and Soares A.M.V.M., 1989. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia*, 188/189: 403-406.

Baird D.J., Barber I. and Calow P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. *Functional Ecology*, 4: 399-407.

Baudo R., 1987. Ecotoxicological testing with *Daphnia*. In "*Daphnia*", R.H. Peters e R. de Bernardi Eds., *Mem. Ist. Ital. Hydrobiol.*, 45: 461-482.

Buikema A.L., jr., Geiger J.G. and Lee D.R., 1980. *Daphnia* toxicity test. In "Aquatic invertebrate bioassay", A.L. Buikema, jr. and J. Cairns, jr., Eds., *American Society for Testing and Materials*: 48-69.

Cowgill U.M., 1987. Critical analysis of factors affecting the sensitivity of zooplankton and the reproducibility of toxicity test results. *Wat. Res.*, 21: 1453-1462.

Gorbi G., Paris G.M., Moroni F. and Bachiorri A., 1991. Differences in population dynamics of *Daphnia magna* clones. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* (in press).

Lampert W., 1987. Feeding and nutrition in *Daphnia*. In "*Daphnia*", R.H. Peters e R. de Bernardi Eds., *Mem. Ist. Ital. Hydrobiol.*, 45: 143-192.

Loaring J.M. and Hebert P.D.N., 1981. Ecological differences among clones of *Daphnia pulex* Leyding. *Oecologia*, 51: 162-168.

Peters R.H., 1987. Metabolism in *Daphnia*. In "*Daphnia*", R.H. Peters e R. de Bernardi Eds., *Mem. Ist. Ital. Hydrobiol.*, 45: 193-243.

Tessier A.J. and Consolatti N.L., 1989. Variation in offspring size in *Daphnia* and consequences for individual fitness. *OIKOS*, 56: 269-276.

Tessier A.J. and Consolatti N.L., 1991. Resource quantity and offspring quality in *Daphnia*. *Ecology*, 72: 468-478.

Viganò L., 1989. Test di tossicità con *Daphnia magna*: esame dei fattori che determinano l'idoneità dell'allevamento. *Inquinamento*, 9: 69-75.

Vijverberg J., 1989. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and *in situ* conditions: a review. *Freshwater Biology*, 21: 317-373.

L. Viganò

Istituto di ricerca sulle Acque, C.N.R. - Brugherio (MI)

### Riassunto

Vengono discussi i risultati ottenuti da un esercizio di intercalibrazione sul saggio di tossicità acuta con *Daphnia magna*, cui hanno partecipato undici laboratori. Il cromo esavalente è stato scelto come tossico di riferimento ed ogni laboratorio ne ha determinato la 24hEC<sub>50</sub> in tre differenti saggi condotti secondo il metodo proposto dall'IRSA. Il valore medio di 24hEC<sub>50</sub> è risultato di 456,9 µg Cr/L mentre le stime della variabilità inter- e intralaboratorio hanno fornito un coefficiente di variazione rispettivamente del 12,2 e 9,7%. I risultati di questo studio dimostrano che il test di tossicità con *Daphnia magna* può essere ben riproducibile purché venga condotto secondo una metodica che sia adeguatamente dettagliata in tutte le sue componenti, dall'allevamento dell'organismo all'elaborazione dei risultati.

### Summary

The results of an eleven-laboratory round robin study of the *Daphnia magna* acute toxicity test are presented. Hexavalent chromium was chosen as a reference toxicant and each laboratory determined the 24hEC<sub>50</sub> for three tests which were conducted according to the IRSA method. The mean 24hEC<sub>50</sub> value was 456.9 µg Cr/L and the analysis of the inter and intralaboratory variability gave coefficients of variation of 12.2 and 9.7% respectively. The results of this study show that *Daphnia magna* toxicity test data are well reproducible when the method is clearly defined in all its parts, from the culture of the organism to the analysis of results.

## 5.1 Introduzione

La capacità di produrre dati che siano simili tra diversi laboratori, è la premessa essenziale alla adozione di un metodo che si propone come strumento legale. La letteratura riguardante il saggio di tossicità con *Daphnia magna* ha ormai evidenziato come le diverse fasi della conduzione del saggio possono contribuire in vario grado alla variabilità del dato finale. In base a queste osservazioni è stato investito particolare impegno nella stesura della metodica IRSA affinché tutte le sue componenti, dall'allevamento dell'organismo all'elaborazione dei risultati, fossero chiaramente definite.

Il passo successivo è stato quello di verificare la riproducibilità dei risultati ottenibili con tale metodo e a questo scopo è stato indetto un primo esercizio di intercalibrazione cui hanno partecipato 11 laboratori dei 16 interpellati (Allegato 5.A.). Il tossico scelto per il confronto è stato il cromo esavalente. I risultati furono soddisfacenti ma certamente migliorabili poiché influenzati da una serie di problemi che per alcuni dei partecipanti sono riassumibili in ritardi organizzativi, inesperienza, nonché violazioni delle prescrizioni metodologiche.

Si è reso pertanto necessario organizzare un secondo esercizio di intercalibrazione con lo scopo di avere una misura più realistica della variabilità propria del metodo in esame permettendo anche agli stessi partecipanti di confrontarsi in un quadro che fosse parimenti più attendibile. Sebbene in questo secondo esercizio l'impegno richiesto ai partecipanti sia stato superiore al precedente, l'invito a mantenersi nel più rigoroso rispetto della metodologia è stato ampiamente raccolto e ciò ha avuto un evidente effetto positivo sulla qualità dei risultati. Anche in questo secondo esercizio i laboratori partecipanti sono stati solo 11 e nelle seguenti note vengono riassunti i dati relativi a ciascuno di essi.

## 5.2 Risultati

Il laboratorio n. 1 ha condotto i tre saggi previsti nel pieno rispetto della metodologia. Il controllo analitico delle concentrazioni di saggio come pure i valori riportati per il mezzo sintetico confermano la corretta procedura sperimentale. La media delle tre 24hEC<sub>50</sub> è pari a 513,3 µg Cr/L.



Il laboratorio n. 2 ha operato conformemente al metodo in esame. I risultati dell'analisi chimica concordano ampiamente con le concentrazioni attese di cromo mentre non vengono riportate durezza e alcalinità del mezzo sintetico. La media delle tre  $EC_{50}$  è di 461,1  $\mu\text{g Cr/L}$ .

Il laboratorio n. 3 a causa di ritardi organizzativi, non ha potuto garantire la termostatazione né dell'allevamento né dei saggi. L'ambito di temperatura entro cui è stato condotto il secondo dei due test presentati non soddisfa l'intervallo ammesso di  $20 \pm 2$  °C. È stato pertanto considerato soltanto il primo saggio la cui  $EC_{50}$  è stata calcolata essere di 265,3  $\mu\text{g Cr/L}$ , peraltro non confermata dai dati analitici. Il mezzo sintetico si conferma rispondente all'atteso. Per quanto detto il dato tossicologico è stato accettato con riserva.

Il laboratorio n. 4 ha presentato i dati di quattro saggi dei quali il primo, in accordo col partecipante, è stato scartato in quanto lo scostamento tra concentrazioni misurate ed attese era insolitamente elevato ed imputabile ad una micropipetta starata. Il laboratorio ha operato conformemente al metodo di saggio ed i risultati analitici relativi sia al mezzo sintetico che alle concentrazioni di tossico attestano la buona conduzione dei test. Il valore finale di  $EC_{50}$  è pari a 523,7  $\mu\text{g Cr/L}$ .

Dei tre saggi condotti dal laboratorio n. 6, il terzo è stato scartato perché ha fornito risultati significativamente dispersi (G.L. = 4;  $\text{Chi}^2 = 9,99$ ). I due restanti sono conformi al metodo sebbene solo una parte delle concentrazioni di esposizione siano state verificate analiticamente. Il dato finale della  $24hEC_{50}$  è di 424,8  $\mu\text{g Cr/L}$ .

Per il laboratorio n. 7, il primo dei tre saggi ha fornito delle percentuali di immobilizzazione insolitamente modeste e tali che anche alla massima concentrazione saggiata non veniva raggiunto il 50% di effetto; ciò ha reso inattendibile il corrispondente valore di  $EC_{50}$ . I dati analitici relativi sia al mezzo sintetico che alle concentrazioni di cromo confermano la buona conduzione dei saggi. La  $24hEC_{50}$  è risultata di 491,7  $\mu\text{g Cr/L}$ . Un caso di neonato immobile, l'unico di questo esercizio di intercalibrazione, è indicato per il terzo test.

Il laboratorio n. 9 ha registrato anche gli effetti a 48 h di esposizione sebbene non richiesti. Per contro, ha utilizzato 40 neonati per concentrazione e ha accomunato i risultati di repliche allestite, interamente o in parte, a tempi diversi. Si rilevano per il primo ed il terzo saggio degli scostamenti tra le concentrazioni misurate e quelle attese che superano la soglia comunemente accettata del

20%. Relativamente al mezzo sintetico, lo scostamento dai valori attesi lascia supporre che i due valori non siano stati riportati nell'unità richiesta e tuttavia l'originale non è dichiarata. Cospicua è infine la presenza di neonati galleggianti. L'unica informazione citabile deriva dal primo saggio per il quale si ottiene una  $24hEC_{50}$  di 540,9  $\mu\text{g Cr/L}$ , dato da considerare comunque con cautela.

Il laboratorio n. 13 dichiara dati di alcalinità e di durezza del mezzo sintetico che si discostano dal range di valori atteso. Una incompleta solubilizzazione dei sali sembra la causa più attendibile. Viceversa, l'analisi delle concentrazioni di cromo totale, conferma il corretto allestimento dei saggi. Il valore finale di  $EC_{50}$  è pari a 454,4  $\mu\text{g Cr/L}$ .

Il laboratorio n. 14 ha condotto i tre saggi conformemente al metodo proposto e l'accuratezza del lavoro sperimentale è confermata dai risultati analitici. La media dei tre valori di  $EC_{50}$  è di 524,8  $\mu\text{g Cr/L}$ . Commento analogo vale per i laboratori n. 15 e n. 16 i cui risultati finali sono rispettivamente di 506,0 e 333,2  $\mu\text{g Cr/L}$ .

### 5.3 Discussione

L'impressione generale che si ricava da questo secondo esercizio di intercalibrazione è che i laboratori partecipanti hanno adottato il metodo in esame in modo pressoché completo e ciò vale anche per il mantenimento degli organismi. Queste considerazioni derivano dalla constatazione che le  $24hEC_{50}$  sono molto meno disperse attorno al valore medio e dal fatto che il valore di quest'ultimo mostra una tendenza in aumento rispetto al corrispondente valore medio ottenuto dal primo ring test, il che lascia supporre che anche gli organismi saggiati fossero mediamente in migliori condizioni. Gli undici dati di  $24hEC_{50}$  ottenuti da altrettanti laboratori, hanno un valore medio di 456,9  $\mu\text{g Cr/L}$  con un coefficiente di variazione del 19%, risultato che di per sé testimonia il netto miglioramento già anticipato. I dati corrispondenti del primo saggio di intercalibrazione sono infatti 388,7  $\mu\text{g Cr/L}$  e 34% (tab. 5.1).

La verifica di normalità delle distribuzioni delle  $24hEC_{50}$ , ha permesso di sostituire le medie aritmetiche a quelle geometriche che sono comunemente impiegate nell'analisi di questo tipo di dati. A causa della diversa impostazione dei due saggi ed in particolare al diverso numero di repliche disponibili per ogni laboratorio, ulteriori confronti tra le due serie di dati sarebbero poco attendibili. Per questo secondo ring test è stato invece possibile approfondire l'esame dei risultati

**Tab. 5.1**  
Sintesi dei valori di  $24hEC_{50}$  ( $\mu g$  Cr/L) ottenuti nei due saggi di intercalibrazione per i diversi partecipanti

Laboratorio n.	1° Ring test	2° Ring test
1	*	513,3
2	499,7	461,1
3	*	265,3
4	*	523,7
5	*	*
6	*	424,8
7	473,0	491,7
8	441,5	*
9	307,4	540,9
10	448,8	*
11	208,2	*
12	*	*
13	390,2	454,4
14	602,9	524,8
15	174,6	506,0
16	381,3	333,2

\* Dati non presentati o non accettati

mediante l'analisi della varianza (ANOVA a 1 criterio di classificazione). Da questo esame sono stati esclusi i due dati di  $24hEC_{50}$  che per diverse motivazioni sono da considerare con cautela (laboratorio n. 3 e n. 9). Ciò premesso, i risultati dell'analisi della varianza sono riportati in Tab. 5.2. La varianza tra i laboratori supera quella interna ai medesimi ( $P < 0,00$ ) e i valori medi di  $24hEC_{50}$  sono pertanto significativamente diversi. Sono state poi quantificate queste due componenti della varianza dei risultati.

Tenendo presente che i valori medi sono significativamente diversi e che il numero di repliche per laboratorio non è costante pur differendo di poco, è stato possibile stimare la deviazione standard tra i gruppi che è risultata pari a 57,2 cui corrisponde un coefficiente di variazione del 12,2%. Similmente, dalla varianza entro i gruppi è stata

calcolata una deviazione standard di 45,6 alla quale corrisponde un coefficiente di variazione del 9,7%. Questi due coefficienti ci forniscono una stima della precisione del saggio con *Daphnia magna* tra laboratori e all'interno dei medesimi, rispettivamente.

Si tratta di risultati molto buoni la cui qualità può essere ulteriormente apprezzata considerando due dati tratti dalla letteratura ed ottenuti da saggi di intercalibrazione per i quali è stato usato il cromo come tossico di confronto; il primo ha verificato un coefficiente di variazione del 23% ed il secondo del 39% rispettivamente su 3 e 47 laboratori (Buikema e Cabridene, in Dorn e Coll., 1987). Si conferma dunque la necessità di una metodologia dettagliata e della sua corretta applicazione a tutto vantaggio della precisione del saggio che può così raggiungere livelli molto soddisfacenti.

Ancora una osservazione, infine, circa un tema di crescente attualità e cioè il genotipo degli organismi di saggio. In base alle informazioni fornite dai partecipanti sull'origine degli organismi impiegati, si è potuto accertare che due sono le fonti originarie, ovvero lo I.R.C.H.A. francese per gli organismi usati e distribuiti da I.R.S.A. di Brugherio (MI) e la McGill University canadese per gli organismi usati e distribuiti da Istituto di Idrobiologia di Pallanza (NO). In accordo con le indagini di Baird e Coll. (1991), i primi dovrebbero appartenere al genotipo A o A1 mentre per i secondi non sono disponibili ulteriori informazioni. Confrontando i dati di tossicità ripartiti nei due gruppi di appartenenza, si osserva che le loro medie sono significativamente diverse ( $P = 0,045$ ) e pari rispettivamente a 433,6 e 492,5  $\mu g$  Cr/L con una maggiore sensibilità a favore delle dafnie di origine I.R.C.H.A. E' evidente che tale analisi presuppone che le due fonti citate identifichino altrettanti genotipi; in caso contrario si tratterebbe solo di casualità alla quale, peraltro, non sembra abbiano contribuito altre possibili fonti di variazione quali la natura dell'acqua di allevamento o le modeste differenze di durezza del

**Tab. 5.2**  
Analisi della varianza dei risultati tossicologici del secondo saggio di intercalibrazione

Fonte di variazione	SSq	GL	Sq medio	F	P
Tra gruppi	89234,56	8	11154,32	5,364	0,0021
Entro gruppi	33269,92	16	2079,37		
Totale	122504,48	24			



mezzo di saggio. Al di là di queste considerazioni, la problematica sollevata in merito alla scelta del genotipo non sembra prossima a conclusione in quanto la graduatoria della sensibilità dei genotipi sinora studiati varia al variare del tossico studiato (Baird e Coll., 1991). La standardizzazione delle condizioni sperimentali e di quelle di allevamento dell'organismo, che non sono assolutamente da disgiungere da un corretto approccio metodologico, restano pertanto gli obiettivi prioritari da conseguire.

## 5.4 Bibliografia

Baird D.J., Barber I., Bradley M., Soares A.M.V.M. and Calow P., 1991. A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. Environ. Saf.*, 21: 257-265.

Dorn P.B., Rodgers J.H., Jop K.M., Raia J.C. and Dickson K.L., 1987. Hexavalent chromium as a reference toxicant in effluent toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6: 435-444.

## ALLEGATO

### 5.A LABORATORI PARTECIPANTI AL TEST DI INTERCALIBRAZIONE

- 1) Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione, USSL 75/11 - Milano (R. Azzoni)
- 2) Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione, USSL 77 - Pavia (A. Berri, M.A. Pasini)
- 3) Servizio Multizonale di Prevenzione, USL 2- Massa (B. Borghini)
- 4) Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione, USSL 12 - Genova (E. Carlini)
- 5) Laboratorio di Sanità Pubblica, USSL 68 - Asti (M. Cirio, S. Benedetti)
- 6) Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione, USSL 11 - Pordenone (N. De Marco)
- 7) Stazione Sperimentale Agraria Forestale - San Michele all'Adige (G. Flaim)
- 8) Servizio Multizonale di Prevenzione, USL 23 - Arezzo (C. Francalanci)
- 9) Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione, USSL 35 - Ravenna (S. Giaquinta)
- 10) Istituto di Ecologia, Università - Parma (J. Gorbi)
- 11) Istituto Italiano di Idrobiologia, CNR - Pallanza (M. Manca)
- 12) Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione, USSL 19 - La Spezia (F. Palmieri)
- 13) ENICHEM, Laboratorio Centrale - Ravenna (A. Savioli)
- 14) Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione, USSL 9 - Reggio Emilia (R. Spaggiari, P. Manzini)
- 15) Laboratorio di Sanità Pubblica, USSL 40 - Ivrea (L. Tartaglino)
- 16) Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR - Bruzzerio (L. Viganò)

Amodei M. e Azzoni R.

Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione, USSL  
75/III - Milano

## Riassunto

*Daphnia magna* è stata eccezionalmente utilizzata per il controllo giornaliero di eventuali manipolazioni dolose delle acque potabili.

L'affidabilità del sistema d'allarme è stata verificata mediante la ricerca della 24hEC<sub>50</sub> di parathion, cianuro ed arsenico, ed il confronto di queste con concentrazioni cautelative calcolate secondo uno scenario arbitrario.

Vengono discussi i risultati della sperimentazione tossicologica propriamente detta; il saggio *Daphnia magna* non sembra utilizzabile per salvaguardare la popolazione umana dall'esposizione acuta a tossici contenuti nell'acqua potabile.

## Summary

A daily survey using *Daphnia magna* have been exceptionally planned in order to prevent drinking water poisoning.

To assess alarm system reliability, parathion, cyanide and arsenic 24hEC<sub>50</sub> were determined and compared with water guideline values elicited from arbitrary assumption.

Toxicity testing data were discussed; *Daphnia magna* bioassay seems to be useless in protecting man from toxic acute exposures.

## 6.1 Introduzione

In occasione dello scoppio della "Guerra del Golfo", la Prefettura di Milano richiese l'attivazione di un sistema di controllo giornaliero per la rilevazione di eventuali manipolazioni dolose delle acque potabili cittadine.

Essendo il P.M.I.P. impossibilitato ad effettuare analisi tossicologiche meglio mirate, si decise di procedere al controllo delle acque potabili utilizzando l'organismo di saggio *Daphnia magna*.

Immediatamente si pose il problema di verificare se un invertebrato come *Daphnia magna* possieda sistemi enzimatici passibili di essere danneggiati quanto quelli dei Mammiferi e, soprattutto, se il metodo abbia una sensibilità tale da consentirne l'utilizzo come sistema di salvaguardia per la vita umana.

L'ipotesi di manipolazione dolosa delle centrali acquedottistiche, infatti, prevede come obiettivo l'uomo che utilizza l'acqua a scopo alimentare e, presumibilmente, comporta l'uso di sostanze particolarmente tossiche e di rapida azione. Fra le sostanze più note si annoverano il cianuro, l'arsenico, i pesticidi organofosforici e la tossina botulinica per la quale -pur essendo la più tossica per l'uomo- non è stato possibile effettuare alcuna sperimentazione a causa delle norme di sicurezza che ne escludono la movimentazione e la commercializzazione.

Questa nota descrive sia l'esperienza condotta sulle acque potabili cittadine sia quella relativa alla ricerca di 24hEC<sub>50</sub> per sostanze pure.

## 6.2 Materiali e metodi

Per il controllo giornaliero delle acque potabili è stata utilizzata l'esposizione per 24 ore di 10 neonati in 50 mL di acqua tal quale; in caso di presenza di cloro libero, l'acqua veniva trattata con carbone attivo fino a scomparsa della reazione colorimetrica.

Per l'allevamento dell'organismo test e per la conduzione dei saggi in condizioni standard si è fatto riferimento alla metodologia proposta dall'Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR (cfr. Cap. 2).

I test di tossicità acuta in 24 ore sono stati condotti in condizioni statiche alla temperatura di 20 ± 2 °C e con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.



Per ogni concentrazione e per il controllo sono state utilizzate quattro repliche, ciascuna costituita da 50 mL di soluzione e 5 organismi di età inferiore alle 24 ore.

Come acqua di diluizione è stata utilizzata un'acqua sintetica avente le seguenti caratteristiche: durezza = 140-160 mg CaCO<sub>3</sub>/L; alcalinità = 110-120 mg CaCO<sub>3</sub>/L; pH = 7,8-8,4.

Altri parametri come pH, ossigeno disciolto e temperatura sono stati misurati estemporaneamente nelle soluzioni test all'inizio e alla fine di ogni sperimentazione e sono risultati sempre nella norma.

Il riscontro analitico delle concentrazioni nominali di tossico è stato effettuato sulle soluzioni madri e su almeno una replica per ogni concentrazione utilizzata.

I risultati della sperimentazione tossicologica sono stati elaborati mediante l'analisi dei Probits utilizzando un programma di calcolo computerizzato (Puddu, 1989). Nei controlli non sono mai state registrate mortalità inattese o altre anomalie.

### 6.2.1 Parathion

Gli insetticidi organofosforici sono sostanze anticolinesterasiche poiché inattivano gli enzimi colinesterasici fosforilandone il sito attivo con un meccanismo di tipo competitivo (Cima e Ferrari, 1971). Essi sono pertanto dei potenziatori dell'acetilcolina ed interferiscono nel normale meccanismo di trasmissione dell'impulso nervoso a livello delle sinapsi colinergiche.

Colinesterasi ed esteri colinici sono presenti sia nei Vertebrati che negli Invertebrati (Metcalf, 1955): è presumibile, quindi, che i composti organofosforici possano risultare tossici anche per i Crostacei.

Per le prove tossicologiche è stato utilizzato O,O-dietil O-4-nitrofenil fosforotioato, n. CAS 56-38-2 (parathion), commercializzato dalla Prodotti Gianni con un grado di purezza superiore al 98%.

Il parathion viene lentamente idrolizzato in soluzione acquosa con formazione di 4-nitrofenolo e di acido O,O-dietil fosforotionico ( $t_{1/2} = 120$  giorni a 25 °C); poiché la reazione è accelerata in presenza di alcali, si è ritenuto necessario calcolare la percentuale di idrolisi nelle condizioni operative adottate (pH medio = 8) secondo l'equazione:  $K = 0,047 [\text{OH}^-] + 4 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  a 25 °C (Metcalf, 1955).

Solo lo 0,6% della sostanza iniziale viene idrolizzato in 24 h ( $t_{1/2} = 119$  giorni a 25 °C); tale

valore è stato considerato ampiamente accettabile e cautelativo anche nelle condizioni di temperatura adottate per la conduzione dei saggi.

Sono stati condotti quattro esperimenti in tempi diversi, distribuiti in un periodo di circa due mesi; l'ambito di concentrazione in cui si è operato è compreso tra 0,4 e 10,7 µg/L.

Per ogni saggio è stato utilizzato un numero di concentrazioni compreso tra 9 e 15, in progressione geometrica e con un rapporto tra le diluizioni di 1,25.

Per garantire una completa solubilizzazione nelle soluzioni acquose, il parathion è stato inizialmente disciolto in un piccolo volume di acetone, corrispondente a 9 µg/L nella massima concentrazione utilizzata; una prova effettuata in parallelo ai saggi ha permesso di escludere tossicità acuta in 24h di tale solvente alle concentrazioni risultanti dall'impiego.

Per ogni saggio è stata ricavata la 24hEC<sub>50</sub> ed il relativo intervallo fiduciale, P=0,05 (Tab. 6.1).

Tab. 6.1  
Tossicità acuta del parathion

24hEC <sub>50</sub> (µg/L)	Limiti fiduciali (P=0,05)
3,1	2,8 - 3,4
4,2	3,9 - 4,8
3,3	3,0 - 3,6
2,1	1,9 - 2,3
media 3,2	1,8 - 4,6

Le rette concentrazione/effetto ottenute nelle quattro sperimentazioni possono considerarsi graficamente parallele; è stata calcolata la EC<sub>50</sub> 24h media, risultata pari a 3,2 µg/L con un intervallo fiduciale di 1,8-4,6 µg/L (P=0,05).

Tale valore medio di 24hEC<sub>50</sub> è risultato circa 100 volte inferiore a quello misurato per il bicromato di potassio (espresso come cromo), composto segnalato dalla letteratura come sostanza di riferimento per il controllo del materiale biologico utilizzato (Afnor, 1974; ISO, 1982); il parathion deve pertanto essere ritenuto una sostanza molto tossica per l'ambiente acquatico.

### 6.2.2 Cianuro

L'avvelenamento da cianuri si realizza con una fulminea azione sui chemiorecettori dell'arco aortico e del seno carotideo, che svolgono un importante ruolo nella regolazione della pressione arteriosa e della respirazione (Rocha e Silva,

1974).

A livello cellulare l'azione tossica si esplica con il blocco della catena respiratoria: il cianuro, infatti, inibisce la citocromo ossidasi, in particolare il citocromo  $a_3$  (Karlson, 1971).

Per le prove tossicologiche è stato utilizzato cianuro di potassio di purezza analitica; al fine di garantire una buona stabilità del KCN, la soluzione madre è stata preparata sciogliendo il sale in acqua milli Q e NaOH (pH 10): le soluzioni da saggiare presentavano un pH compreso fra 8,1 e 8,5.

I cianuri alcalini e alcalino-terrosi sono solubili, ma a pH inferiore a 9 liberano acido cianidrico (Charlot, 1963); per limitare al massimo la perdita di cianuro durante l'esposizione, i saggi sono stati condotti in provettoni a chiusura ermetica e completamente riempiti.

Sono stati condotti cinque esperimenti in circa quaranta giorni operando in un ambito di concentrazione compreso tra 49,9 e 1708,6  $\mu\text{g CN/L}$ .

Per ogni saggio è stato utilizzato un numero di concentrazioni compreso tra 6 e 11 in progressione geometrica e con un rapporto tra le diluizioni compreso tra 1,25 e 2.

Per ogni saggio è stata ricavata la  $24\text{hEC}_{50}$  ed il relativo intervallo fiduciale,  $P=0,05$  (Tab. 6.2); le rette concentrazione/effetto non sembrano poter essere considerate parallele, almeno graficamente.

Tab. 6.2

Tossicità acuta dello ione cianuro

$24\text{hEC}_{50}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	Limiti fiduciali ( $P=0,05$ )
430,0	333,6 - 558,3
639,0	563,9 - 720,7
492,9	404,1 - 610,4
353,9	304,0 - 410,5
666,8	590,8 - 747,9
media 516,5	349,8 - 683,2

La  $24\text{hEC}_{50}$  media è risultata pari a 516,5  $\mu\text{g CN/L}$  con un intervallo fiduciale di 349,8-683,2  $\mu\text{g/L}$  ( $P=0,05$ ); questo valore medio risulta dello stesso ordine di grandezza di quello misurato per il bicromato di potassio nel test di intercalibrazione (IRSA-CNR, 1990), 388,7  $\mu\text{g Cr/L}$  (Marchetti e Viganò, 1990).

Viste le difficoltà di mantenimento del cianuro in soluzione acquosa a cielo libero, eventuali prove tossicologiche su acque usate nelle quali si

sospetti la presenza di questa molecola vanno predisposte in tempi e modo molto accurati.

### 6.2.3 Arsenico

Tutti i composti dell'arsenico sono tossici ma mentre quelli organici sono per lo più responsabili di intossicazioni iatrogene, a quelli inorganici va imputata la maggior parte delle intossicazioni accidentali o intenzionali.

L'azione tossica viene espletata dalla forma trivalente: con questo stato di ossidazione, sia in forma organica che inorganica, gli arsenicali sono in grado di interagire con i gruppi -SH di enzimi a gruppi sulfidrilici -indispensabili al metabolismo cellulare- bloccandone le specifiche funzioni (Cima e Ferrari, 1971).

Per le prove tossicologiche è stata perciò utilizzata anidride arseniosa di purezza analitica. Al fine di facilitare la solubilizzazione del composto in acqua, esso è stato inizialmente disciolto in un piccolo volume di NaOH al 20%; dopo correzione con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  la soluzione madre presentava pH=8.

Sono stati condotti quattro esperimenti in circa quindici giorni, operando in un ambito di concentrazione compreso tra 2,1 e 12,0  $\text{mg As}_2\text{O}_3/\text{L}$ .

Per ogni saggio è stato utilizzato un numero di concentrazioni compreso tra 5 e 9 in progressione geometrica, con un rapporto tra le diluizioni di 1,25.

Le quattro  $24\text{hEC}_{50}$  (esprese come  $\text{As}^{3+}$ ) ed i relativi intervalli fiduciali ( $P=0,05$ ) sono riportate in tabella 6.3.

Tab. 6.3

Tossicità acuta dello ione arsenioso

$24\text{hEC}_{50}$ (mg/L)	Limiti fiduciali ( $P=0,05$ )
4,5	4,2 - 4,8
4,4	4,2 - 4,7
4,5	4,2 - 4,8
4,2	3,9 - 4,5
media 4,4	4,2 - 4,6

Anche in questo caso le rette concentrazione/effetto ottenute nelle quattro sperimentazioni possono considerarsi graficamente parallele; la  $24\text{hEC}_{50}$  media è risultata pari a 4,4  $\text{mg As}^{3+}/\text{L}$  con un intervallo fiduciale di 4,2-4,6  $\text{mg/L}$  ( $P=0,05$ ).

Questo valore, circa 10 volte superiore a quello misurato per il cromo e 1300 volte superiore a



quello misurato per il parathion, sembra porre l'arsenico in una posizione di relativa minore pericolosità per l'ambiente acquatico.

### 6.3 Discussione dei risultati

La derivazione di valori guida per le sostanze tossiche presenti nelle acque potabili parte dall'assunto che il consumo giornaliero di acqua pro capite sia di due litri (World Health Organisation, 1984). Per verificare l'efficacia dell'utilizzazione di *Daphnia magna* come organismo di saggio nel controllo di manipolazioni dolose delle acque destinate al consumo alimentare si è viceversa ritenuto idoneo individuare uno scenario del tipo:

- A: uomo del peso di 70 kg che assume 0,5 L d'acqua in dose unica
- B: uomo del peso di 70 kg che assume 2 L d'acqua in un giorno
- C: bambino del peso di 15 kg che assume 0,5 L d'acqua in dose unica
- D: bambino del peso di 15 kg che assume 2 L d'acqua in un giorno.

Utilizzando le dosi fatali riportate in letteratura per ognuna delle sostanze precedentemente citate, sono state ricavate le ipotetiche concentrazioni letali da ottenere nell'acqua distribuita dall'aquedotto (Dreisbach e Robertson, 1990).

Affinché il metodo presenti un'utilità pratica è necessario che sia in grado di evidenziare anche concentrazioni sensibilmente inferiori a quelle letali: applicando a queste ultime un fattore di protezione 100 (popolazione adulta) o 1000 (popolazione infantile per la quale sono risultate sconosciute le dosi fatali), sono state individuate le concentrazioni con le quali condurre i primi saggi con *Daphnia magna*; solo successivamente è stata ricercata la 24hEC<sub>50</sub>.

Queste informazioni sono riassunte in tabella 6.4.

Le prove condotte giornalmente sulle acque delle centrali cittadine hanno generalmente dato esito favorevole all'utilizzo dell'acqua; nei campioni trattati con carbone attivo per eliminare la presenza di cloro libero non si sono verificati decessi.

Molto raramente, ed in modo non ripetitivo, si sono registrate percentuali di mortalità fino al 50% degli organismi esposti, fatto che andrà indagato per fugare anche il più lontano sospetto della presenza estemporanea di molecole indesiderabili nelle acque cittadine.

Dalle esperienze di ricerca della EC<sub>50</sub> 24h sono emersi alcuni spunti di riflessione da valutare con attenzione per migliorare la qualità del lavoro tossicologico svolto in laboratorio.

La riproducibilità dei test, in termini di coefficiente di variazione fra le 24hEC<sub>50</sub>, si è rivelata

Tab. 6.4  
Verifica del sistema d'allarme contro le intossicazioni acute

		Parathion	CN	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Dose fatale uomo (mg/Kg)		1,714	1	1,714
Dose fatale bambino (mg/Kg)		0,1		
Concentrazione letale uomo (mg/L)	{ A	240	140	240
	{ B	60	35	60
Concentrazione letale bambino (mg/L)	{ C	3	30	51,4
	{ D	0,75	7,5	12,8
Concentrazione cautelativa (mg/L)	{ A	2,4	1,4	2,4
	{ B	0,6	0,35	0,6
	{ C	0,03	0,03*	0,05*
	{ D	0,075	0,075*	0,01*
EC <sub>50</sub> 24h (mg/L) <i>Daphnia magna</i>		0,0032	0,516	5,8

A, B, C, e D = scenari adottati

\* = fattore di protezione 1000

bassa per il parathion e il cianuro, e buona per l'arsenico.

Il coefficiente di variazione è risultato:

parathion:	27,6 %
cianuro:	26,0 %
arsenico:	2,9 %

Questi valori, cui va aggiunto il valore del 5,9% ottenuto per il cromo in altra sperimentazione, se da un lato potrebbero segnalare un vizio di fondo nella conduzione dei saggi, dall'altro potrebbero essere giustificati dalle differenti caratteristiche fisico-chimiche dei composti utilizzati.

Sembra, infatti, che il tipo di composto esaminato influenzi in una certa misura la variabilità dei risultati, almeno nei confronti fra differenti laboratori. Il coefficiente di variazione maggiore si può registrare quando i composti selezionati per i test circolari hanno le seguenti caratteristiche: a) bassa o nulla solubilità in acqua, b) elevata tossicità, c) elevato peso molecolare, d) più di un atomo di cloro, e) punto di ebollizione alto (Cowgill, 1987).

Il fatto che le rette concentrazione/effetto ottenute mediante l'analisi dei Probits non sempre potessero essere considerate graficamente parallele ha determinato, inoltre, non poche incertezze nella valutazione dei risultati.

## 6.4 Conclusioni

La sperimentazione tossicologica p.d. ha dato i seguenti risultati (tra parentesi sono indicati i limiti fiduciali per  $P=0,05$ ):

- Parathion 24hEC<sub>50</sub>: 3,2 µg/L (1,8-4,6 µg/L)
- CN<sup>-</sup> 24hEC<sub>50</sub>: 516,5 µg/L (349,8-683,2 µg/L)
- As<sup>3+</sup> 24hEC<sub>50</sub>: 4,4 mg/L (4,2-4,6 mg/L)

Come immaginabile, il saggio *Daphnia magna* -predisposto per studi di tossicologia ambientale- non sembra attendibile come allarme contro l'esposizione acuta della popolazione umana a tossici contenuti nell'acqua potabile.

Esso, infatti, da un lato può rilevare sostanze nocive agli organismi acquatici in concentrazioni inefficaci per scatenare manifestazioni acute nell'uomo, come nel caso del parathion; dall'altro lato, come nel caso dell'arsenico, ha una sensibilità troppo bassa per fungere da allarme. Nel caso del cianuro, infine, la 24hEC<sub>50</sub> può essere ritenuta utile per uno solo degli scenari individuati, proteggendo la sola popolazione adulta che assume 0,5 litri d'acqua in dose unica.

## 6.5 Bibliografia

- Association Française de Normalisation, 1974. Essais des eaux - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Crustacés, Cladocère). AFNOR, Norme expérimentale T 90-301.
- Cima L. e Ferrari M., 1971. Tossicologia degli insetticidi (con particolare riguardo a quelli di più largo impiego nella regione veneta). CEDAM, Padova.
- Charlot G., 1963. L'analyse qualitative et les réactions en solution. Masson et C<sup>ie</sup> éditeurs, Paris.
- Cowgill U.M., 1987. Critical analysis of factors affecting the sensitivity of zooplankton and the reproducibility of toxicity test results. *Wat. Res.*, 21: 1453-1462.
- Dreisbach R.H. and Robertson W.O., 1990. Handbook of poisoning: prevention, diagnosis and treatment. Prentice-Hall Publ., London.
- International Organisation of Standardisation, 1982. Water quality: Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 6341.
- Karlson P., 1971. Biochimica. Manfredi Editore, Milano.
- Marchetti R. e Viganò L., 1990. Risultati dell'intercalibrazione sul saggio di tossicità con *Daphnia magna* del 5 marzo 1990. *Relazione non pubblicata*.
- Metcalf R.L., 1955. Organic Insecticides. Interscience Publ., New York.
- Puddu A., 1989. Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante l'analisi dei Probits. *Not. Metodi Anal. Acque IRSA*, 9 (2): 19-37.
- Rocha e Silva M., 1974. Fondamenti di farmacologia e loro applicazioni terapeutiche. Tamburini Editore, Milano.
- World Health Organisation, 1984. Guidelines for drinking water quality. Vol 1. WHO, Genève.



## DETERMINAZIONE DEGLI EFFETTI TOSSICI SU *DAPHNIA MAGNA* DI ELUATI OTTENUTI DA RIFIUTI SPECIALI, TOSSICI E NOCIVI

F. Moroni, M. Rozzi, R. Spaggiari, C. Lazzaretti e R. Messori

Presidio Multizonale di Prevenzione, USSL 9 - Reggio Emilia

### Riassunto

Nel comprensorio delle ceramiche, tra le provincie di Modena e Reggio Emilia, nella vallata del fiume Secchia, si genera oltre il 60% della produzione nazionale di piastrelle con enormi problemi nello smaltimento dei rifiuti.

Lo studio, preliminare, è stato condotto per valutare l'eventuale effetto tossico di eluati, ottenuti dai vari rifiuti ceramici con tecniche di estrazione diverse, sull'indicatore biologico *Daphnia magna*, come complemento alle indagini tradizionali chimiche, previste dalla normativa in materia di rifiuti (DPR 915/82).

Si è proceduto alla determinazione della dose di non effetto dei reattivi utilizzati nelle prove di cessione dei metalli tossici, determinando quantità e tempi di contatto per soluzioni a diversa concentrazione di acido acetico in acqua artificiale.

Individuate le procedure idonee alla conduzione del test si sono effettuate le prove di cessione su un campione di fango ceramico tossico e nocivo e su rottami di piastrelle cotte considerati dalla normativa inerti.

Sugli eluati ottenuti con le diverse tecniche di estrazione sono stati condotti i test di tossicità acuta ed i test di tossicità cronica (28 giorni) utilizzando *Daphnia magna*.

### Summary

In the Ceramics District, between Modena and Reggio Emilia, in the valley of the river Secchia, is produced above 60% of the national production of tiles, with huge problems for the rejecting of waste materials.

This preliminary study was conducted to evaluate the toxicity of extracts, resulting from different procedures of extraction of tile wastes, on *Daphnia magna*, such as complement of traditional chemical analyses provided by law for waste material (DPR 915/82).

The NOEC was evaluated for the reagents used in the extraction procedures of the toxic metals, determining quantity and times of contact for different concentration of test 0.5 N acetic acid in the synthetic water.

After the suitable procedure to conduct the test was individuated, the extraction procedure were done with a sample of ceramic toxic and harmful sludge and with scrap-tiles defined "inert waste material" by law.

Acute tests and 28-day life-cycle chronic tests were made for each extract with the test organism.

## 7.1 Introduzione

In seguito al progressivo sviluppo della società tecnologica e col crescere del livello medio di vita sono enormemente aumentati, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, i problemi di raccolta, trasporto e smaltimento dei rifiuti. In particolare, è diventato sempre più problematico lo smaltimento degli stessi in quanto comporta implicazioni igienico-sanitarie ed ecologiche.

Nel 1982 è stata emanata la normativa sullo smaltimento dei rifiuti (DPR 915/82) che prevede la valutazione del potenziale effetto tossico di un rifiuto classificandolo sia in base ai processi produttivi che lo generano, che alla concentrazione delle sostanze ivi contenute, elencate nell'allegato dello stesso DPR.

In particolare la norma per lo smaltimento in discarica prevede discipline diverse in relazione alla classificazione del rifiuto in urbano, speciale, tossico-nocivo.

Le disposizioni del Comitato Interministeriale (C.I.) del 1984 prevedono, limitatamente ai rifiuti tossici e nocivi che contengono metalli, la possibilità di un loro smaltimento in discariche di seconda categoria tipo B purché l'eluato, proveniente da determinate prove di cessione, rispetti la tabella A allegata alla legge 319/76 (Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento). La preoccupazione del legislatore è quindi rivolta al potenziale impatto che queste tipologie di rifiuto possono esercitare sulle acque superficiali e profonde.

Un approccio utile per definire il grado di tossicità di tali eluati potrebbe essere quello di un uso appropriato dei test biologici di tossicità, che potrebbero fornire indicazioni complementari all'analisi chimica.

Le indagini tossicologiche che ricorrono ai test biologici hanno fornito metodologie che, per la sensibilità delle specie impiegate, la praticità di applicazione e l'adeguato livello di standardizzazione, sono entrate nell'uso comune costituendo un valido supporto all'analisi chimica per il controllo e la prevenzione del rischio ambientale (OCDE, 1987).

Alla luce di queste considerazioni e di esempi di letteratura è stato condotto uno studio sulla tossicità di eluati di rifiuti attraverso l'adozione di test biologici con l'organismo planctonico *Daphnia magna* (Crustacea: Cladoceri).

## 7.2 Obiettivi del lavoro

Nella vallata del fiume Secchia, tra le provincie

di Modena e Reggio Emilia, esiste il comprensorio delle ceramiche dove si genera oltre il 60% della produzione nazionale di piastrelle, creando enormi problematiche ambientali anche nello smaltimento dei rifiuti.

L'obiettivo di questo studio preliminare è quello di valutare l'effetto tossico degli eluati, ottenuti da rifiuti ceramici con tecniche di estrazione diverse, sull'indicatore biologico *Daphnia magna* come complemento alle indagini chimiche previste dalla normativa in materia di rifiuti. Le prove di cessione sono state effettuate su un campione di fango ceramico classificato come tossico e nocivo e su rottami di ceramiche cotte ritenuti secondo la normativa un rifiuto inerte.

Non esistendo indicazioni per l'applicazione di saggi biologici sugli eluati ricavati dai test di cessione, lo studio è stato progettato a partire dal confronto di alcune metodiche adottate nei test chimici di cessione sui rifiuti (IRSA, 1986; EPA, 1980) e su sedimenti contaminati (Borgmann e Coll., 1989; Daniels e Coll., 1989; Fred Lee, 1976; Lee e Coll., 1987; Malins, 1989; Moore e Coll., 1984; Munawar e Coll., 1989; Reynoldson e Coll., 1989; Sloterdijk e Coll., 1989) cercando di individuare tra queste la più idonea per ottenere eluati da sottoporre ai test biologici con *Daphnia magna*.

## 7.3 Materiali e metodi

### 7.3.1 Trattamento dei campioni

I rifiuti utilizzati erano costituiti da un campione di fango ceramico derivante da processi di depurazione e da un campione di rottami di ceramiche cotte (piastrelle).

Entrambi i campioni sono stati sottoposti ad un trattamento di macinatura ed omogeneizzazione, al fine di ottenere una granulometria del campione di dimensioni tali da aumentare il contatto con la porzione liquida e facilitare il rilascio di contaminanti durante la cessione.

I rifiuti sono stati essiccati in stufa a 105 °C per 24 h.

### 7.3.2 Test di cessione e preparazione degli eluati

Gli eluati sono stati ottenuti sottoponendo i rifiuti a diverse modalità di estrazione che sono servite per simulare l'effetto lisciviante delle acque meteoriche su rifiuti posti in discarica. Secondo la legislazione italiana, se il rifiuto viene collocato in discarica di tipo 2 B, atta ad accogliere i

rifiuti speciali e tossici e nocivi di cui alla delibera C.I. 1984, viene impiegato come agente estraente una soluzione acquosa di acido acetico, mentre se il rifiuto è compreso nella tipologia prevista dalla delibera C.I. 1986 (fonderie, acciaierie e marmi) viene utilizzata una soluzione acquosa satura di  $\text{CO}_2$ .

Le diverse procedure di estrazione, riportate in tabella 7.1, si differenziano per:

- rapporto rifiuto e acqua di diluizione (rapporto R:A);
- agente estraente;
- pH di estrazione;
- tempo e modalità di contatto.

La quantità di rifiuto utilizzata in ogni tipo di estrazione è stata opportunamente scelta tenendo conto dei rapporti R:A previsti nei diversi metodi e del volume finale di fase liquida necessario per i test di tossicità a breve e lungo termine.

Le acque di diluizione impiegate sono state scelte al fine di individuare fra le soluzioni a chimismo diverso, quella che consentisse una estrazione migliore, ma nello stesso tempo non comportasse causa di mortalità per *Daphnia magna* indipendentemente dalla reale tossicità dell'eluato.

Le acque saggiate sono state le seguenti:

- acqua distillata: secondo i metodi ufficiali per le analisi chimiche è utilizzata come acqua standard di diluizione nei test di cessione dei rifiuti; quest'acqua però non rappresenta il medium più idoneo alla sopravvivenza degli organismi della specie *Daphnia magna* e può costituire una delle fonti che potrebbero viziare il risulta-

to dei test di tossicità;

- acqua artificiale (Tab. 7.2): acqua sintetica di diluizione utilizzata per i test biologici di tossicità acuta; quest'acqua potrebbe sostituire l'acqua distillata nei test di cessione di rifiuti in quanto non produce effetti negativi nel saggio di tossicità con *Daphnia magna*;
- acqua allevamento: acqua di sorgente (pH =  $7,5 \pm 1$ , durezza = 150-180 mg/L di  $\text{CaCO}_3$ ) impiegata nel nostro laboratorio per il mantenimento degli allevamenti di *Daphnia magna*; quest'acqua è stata saggiata in quanto potrebbe costituire il medium più idoneo nel caso di allestimento di test di tossicità a lungo termine (Cowgill e Coll., 1986).

Tab. 7.2

Formula per la preparazione dell'acqua artificiale usata come acqua di diluizione (Marchetti e Viganò, 1990)

$\text{NaHCO}_3$	192 mg	} per litro di acqua distillata
$\text{CaSO}_4$	183 mg	
$\text{MgSO}_4$	53 mg	
KCl	10 mg	
Areare per 24 h, per il raggiungimento del 100% di saturazione di ossigeno disciolto, lasciare stabilizzare, quindi aggiustare il pH a $7,5 \pm 1$ , la durezza a 140-160 mg/L di $\text{CaCO}_3$		

I tempi di agitazione delle miscele di rifiuto e di acqua sono stati definiti secondo le metodiche consultate. Per ciascuna estrazione è stato utilizzato uno strumento con pale a rotazione continua

Tab. 7.1

Sommario dei trattamenti e delle procedure usate per ottenere i diversi eluati (\*cfr. Tab. 7.2)

Procedura	Rapporto R:A	Acqua di diluizione	Agente estraente	Tempo di agitazione
A	1:4	Artificiale*		1 h
B	1:4	Allevamento		1 h
C	1:20	Artificiale*		6 h
D	1:20	Allevamento		6 h
E	1:20	Distillata	$\text{CO}_2$	6 h
F	1:20	Artificiale*	$\text{CO}_2$	6 h
G	1:20	Allevamento	$\text{CO}_2$	6 h
H	1:20	Distillata	0,5 N Ac. Acetico	24 h
I	1:20	Artificiale*	0,5 N Ac. Acetico	24 h
L	1:20	Allevamento	0,5 N Ac. Acetico	24 h



(120 rpm) immerse in beakers contenenti i campioni. Questo meccanismo è in grado di impartire alla miscela solido-liquido un'agitazione tale da assicurare il continuo rinnovamento della superficie di contatto.

La soluzione acquosa satura di CO<sub>2</sub> impiegata nelle procedure E, F e G è stata ottenuta facendo gorgogliare nelle diverse acque anidride carbonica per almeno 15 minuti a temperatura ambiente.

Meritano un discorso più approfondito le procedure di estrazione H, I e L in cui è stato impiegato l'acido acetico 0,5 N come agente estraente.

In lavori precedenti, nei quali erano stati studiati eluati di sedimenti lacustri contaminati da metalli pesanti ottenuti con estrazioni all'acido acetico nelle quantità previste dalla metodica IRSA (1986), si era riscontrata la loro non idoneità, a causa della elevata conducibilità e della concentrazione di acido acetico, ai saggi biologici con *Daphnia magna* (Zanetti e Coll., 1990).

Per tali ragioni sono stati effettuati i test di tossicità acuta con soluzioni di acido acetico 0,5 N in acqua artificiale al fine di definirne la IC<sub>50</sub> e la NOEC (concentrazione di acido che non produce effetto sugli organismi saggiati).

In base al valore della concentrazione di non effetto da noi rilevata è stata definita la quantità di acido acetico da utilizzare come estraente nelle cessioni (mL di acido acetico per grammo di rifiuto).

Per l'allestimento dei test di cessione con acido acetico si è operato inizialmente miscelando una quantità di rifiuto con un volume di acqua di diluizione in un rapporto iniziale R:A pari a 1:19; si è provveduto quindi, agitando per 24 h, al controllo ed al mantenimento del pH a valori di  $5 \pm 0,2$ , aggiungendo acido acetico 0,5 N in quantità tale da non superare la dose calcolata di non effetto in ragione di 2 mL per grammo di rifiuto.

Le estrazioni in acido acetico per il fango hanno richiesto il quantitativo massimo di acido per mantenere il pH ai valori di  $5 \pm 0,2$ . L'esaurimento della quantità massima è avvenuto nell'arco delle prime 4 h dall'inizio della cessione e, al termine delle 24 h, il valore del pH rilevato era compatibile con la sopravvivenza di *Daphnia magna* e pertanto non è stato necessario apportare correzioni.

Per i rottami non si è esaurito il quantitativo massimo di acido acetico a disposizione in quanto il pH rimaneva stabile a valori di  $5 \pm 0,2$ . Al termine delle 24 h si è provveduto alla correzione del pH con NaOH 6N. Questa operazione ha comportato la precipitazione, anche rilevante, di alcuni metalli e quindi l'alterazione dell'eluato ottenuto con

l'estrazione.

Al termine di ogni estrazione si è provveduto alla separazione della fase liquida dalla fase solida mediante centrifugazione e successiva filtrazione del surnatante su filtro da  $0,45 \mu\text{m}$ ; gli eluati così ottenuti sono stati conservati al buio a  $-18^\circ\text{C}$  in attesa del loro utilizzo per i saggi biologici.

### 7.3.3 Determinazioni chimico-fisiche

Sia sui fanghi che sui rottami si è determinato il contenuto dei metalli mediante mineralizzazione con acqua regia, senza attacco della porzione silicea (Tab. 7.3). La misurazione della concentrazione dei metalli è stata effettuata anche sugli eluati filtrati e sulle acque di diluizione (Tab. 7.4) attraverso spettrometria ad assorbimento atomico con la fiamma e con il fornello di grafite.

## 7.4 Test di tossicità

### 7.4.1 Condizioni sperimentali generali

I test di tossicità acuti e cronici sono stati allestiti con organismi di età  $12\text{h} \pm 12\text{h}$ , ottenuti partenogeneticamente da madri precedentemente isolate dalle vasche di allevamento e acclimatate per circa 10 giorni alle condizioni standardizzate utilizzate per i test (Gorbi, 1987): temperatura termostata a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperiodo di 18 h di luce e di 6 h di buio.

### 7.4.2 Test di tossicità acuta

I test di tossicità acuta sono stati condotti sulla soluzione di acido acetico 0,5 N e sugli eluati ottenuti con le diverse estrazioni.

I test sono stati organizzati in due fasi distinte costituite dal "test preliminare" e dal "test definitivo", condotte nelle medesime condizioni sperimentali.

Sulla base dei risultati del test preliminare a 24 h sono stati individuati gli intervalli per i test definitivi con cui poter determinare la concentrazione o la percentuale di eluato che provoca l'immobilizzazione del 50% degli organismi saggiati, calcolata secondo il metodo statistico di Litchfield e Wilcoxon (1949).

Per ciascun test sono stati saggiati 10 organismi, mantenendo costante il rapporto tra organismo e volume a disposizione pari a 1:10 mL, per una durata di 24 h senza alimentazione. Quando si è protratto il test fino a 48 h, non sono state rinnovate le soluzioni contenenti gli organismi.

Tab. 7.3

Determinazioni chimiche sul contenuto di metalli nel fango di ceramiche e nei rottami di ceramiche cotte utilizzati per le estrazioni (\*valori superiori ai limiti del DPR 915/82)

Determinazione	Fango di ceramica mg/Kg d.w.	Rottami di ceramiche cotte mg/Kg d.w.
Na	22080	2892
K	3795	1446
Ca	12570	10604
Mg	8450	3253
Pb	8280*	1241
Cu	59	10
Zn	690	624
Cr <sup>3+</sup>	40	23
Cr <sup>6+</sup>	<3	<3
Cd	<5	<5
B	1600	692
Fe	16840	8073

Tab. 7.4

Caratterizzazione delle acque di diluizione utilizzate per le estrazioni (le concentrazioni dei metalli sono espresse in  $\mu\text{g/L}$ )

Acqua di diluizione	pH	Conducibilità $\mu\text{S/cm}$	Mn	Pb	Cu	Zn	Cr	Cd	B	Fe
Distillata	6,5	7,7	<30	<3	<20	<0,5	<0,1	<50	<100	
Artificiale	8,2	566	<30	<3	<80	<20	<0,5	<0,1	50	<100
Allevamento	8,2	245	<30	<3	<80	<20	<0,5	<0,1	320	<100

#### 7.4.3 Test di tossicità acuta su acido acetico 0,5 N

Come soluzione diluente è stata utilizzata l'acqua artificiale e per ciascuna concentrazione saggiata si è effettuata, prima dell'immissione degli organismi, la correzione del pH a valori tra 6,8-7 con aggiunta di NaOH 6 N.

La NOEC è stata determinata dall'estrapolazione della retta di tossicità fino alla concentrazione a cui corrispondeva mortalità di 0,02% (Giesy e Graney, 1989).

#### 7.4.4 Test di tossicità acuta su eluati

I test sono stati condotti utilizzando acqua artificiale o di allevamento in armonia con l'acqua impiegata per le cessioni. Dove era stata utilizzata acqua distillata per la cessione, nel test di tossicità è stata utilizzata acqua artificiale.

I test di controllo consistevano in:

- organismi esposti all'acqua distillata, artificiale e allevamento;
- organismi esposti ad acqua artificiale, allevamento e distillata nelle quali è stata aggiunta la quantità di acido acetico corrispondente a quella presente nella più elevata percentuale di estratto saggiato. In tali controlli il pH delle soluzioni saggiate è stato corretto con NaOH 6 N, riportandolo ai valori rilevati per le percentuali di eluati saggiati.

La percentuale di mortalità nei controlli è stata ritenuta accettabile, ai fini della validità del test, se non eccedeva il valore del 10%.

Per evidenziare sensibilità diverse degli organismi al variare delle acque utilizzate, è stata calcolata la  $IC_{50}$  del bicromato di potassio, sostanza di riferimento a tossicità nota, usando come acque di diluizione l'acqua artificiale e l'acqua di allevamento.

Tab. 7.5

pH, conducibilità e concentrazioni (mg/L) dei metalli ricercati degli eluati ottenuti dalle estrazioni con il fango della ceramica (\*valori superiori ai limiti di legge 319/76)

Procedura di estrazione	pH	Conducibilità $\mu\text{S/cm}$	Mn	Cu	Zn	Cr	Cd	B	Fe
Acqua distillata									
E	7,8	506	0,421	<0,08	0,143	<0,08	<0,02	14,9*	<0,05
H	7,0	2910	5,703*	<0,08	1,983*	<0,08	<0,02	10,1*	<0,05
Acqua artificiale									
A	8,2	630	0,051	<0,08	0,025	<0,08	<0,02	9,3*	0,22
C	8,0	468	<0,03	<0,08	<0,02	<0,08	<0,02	11,4*	0,14
F	7,7	673	0,152	<0,08	0,049	<0,08	<0,02	18,7*	<0,05
I	7,1	3010	5,504*	<0,08	1,540*	<0,08	<0,02	10,1*	<0,05
Acqua allevamento									
B	8,1	518	0,041	<0,08	<0,02	<0,08	<0,02	12,7*	0,09
D	7,9	344	0,039	<0,08	<0,02	<0,08	<0,02	9,5*	<0,05
G	7,4	706	0,396	<0,08	0,239	<0,08	<0,02	11,5*	0,06
L	7,0	2940	5,622*	<0,08	2,565*	<0,08	<0,02	18,9*	<0,05

- A, B = estrazioni con R:A = 1:4 senza agente estraente  
 C, D = estrazioni con R:A = 1:20 senza agente estraente  
 E, F, G = estrazioni con R:A = 1:20 con  $\text{CO}_2$   
 H, I, L = estrazioni con R:A = 1:20 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$

Tab. 7.6

pH, conducibilità e concentrazioni (mg/L) dei metalli ricercati degli eluati ottenuti dalle estrazioni con i rottami di ceramiche cotte (\*valori superiori ai limiti di legge 319/76)

Procedura di estrazione	pH	Conducibilità $\mu\text{S/cm}$	Mn	Cu	Zn	Cr	Cd	B	Fe
Acqua distillata									
E	7,4	86,8	0,085	<0,08	<0,02	<0,08	<0,02	0,140	<0,05
H	5,4	120	0,319	<0,08	1,190*	<0,08	<0,02		1,39
H 1	6,7	132	0,170	<0,08	0,328	<0,08	<0,02	0,625	0,27
Acqua artificiale									
A	8,6	564	<0,03	<0,08	<0,02	<0,08	<0,02	0,135	<0,05
C	8,4	519	<0,03	<0,08	<0,02	<0,08	<0,02	0,135	0,09
F	7,4	525	0,11	<0,08	0,100	<0,08	<0,02	0,135	<0,05
I	5,5	603	0,240	<0,08	0,474	<0,08	<0,02		0,29
I 1	6,5	638	0,243	<0,08	0,454	<0,08	<0,02	0,580	0,10
Acqua allevamento									
B	8,3	412	<0,03	<0,08	<0,02	<0,08	<0,02	0,250	<0,05
D	7,9	341	0,040	<0,08	<0,02	<0,08	<0,02	0,290	0,06
G	7,2	364	0,051	<0,08	<0,02	<0,08	<0,02	0,495	<0,05
L	5,5	399	0,124	<0,08	0,264	<0,08	<0,02		0,22
L 1	6,6	430	0,125	<0,08	0,247	<0,08	<0,02	0,770	0,13

- A, B = estrazioni con R:A = 1:4 senza agente estraente  
 C, D = estrazioni con R:A = 1:20 senza agente estraente  
 E, F, G = estrazioni con R:A = 1:20 con  $\text{CO}_2$   
 H, I, L = estrazioni con R:A = 1:20 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$   
 H 1, I 1, L 1 = estrazioni con R:A = 1:20 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dopo la correzione del pH



### 7.4.5 Test di tossicità cronica

I test di tossicità cronica sono stati condotti su tutti gli eluati ottenuti da cessioni in acqua artificiale (A, C, F) e acqua di allevamento (B, D, G). Sono stati allestiti contemporaneamente i controlli sia con acqua artificiale che con acqua di allevamento.

Non sono stati effettuati i test cronici sugli eluati con acqua distillata in quanto si è ritenuto che tale solvente potesse costituire una causa di mortalità non controllabile che poteva viziare i risultati dei test a lungo termine. Per la stessa ragione non si sono effettuati i test di tossicità cronica neppure sugli eluati con acido acetico.

Gli esperimenti sono stati condotti simultaneamente sugli eluati dei fanghi ceramici e dei rottami di piastrelle. Per ciascuna prova si sono utilizzati un numero di organismi, di età  $12h \pm 12h$ , non inferiore a 8 mantenuti singolarmente per 28 giorni in beakers contenenti un volume da saggiare di 50 mL.

Gli organismi sono stati allevati somministran-

do a giorni alterni (3 volte alla settimana) una quantità algale di *Selenastrum capricornutum* e di *Saccharomyces cerevisiae*, entrambi ad una concentrazione di 300.000 cellule per mL (Marchetti e Viganò, 1990) e provvedendo anche al rinnovo dell'eluato saggiato.

Durante i 28 giorni sono stati effettuati dei controlli giornalieri su:

- mortalità;
- età alla prima deposizione di uova, considerata inizio dell'attività riproduttiva degli organismi;
- frequenza e regolarità della produzione di uova;
- conteggio e rimozione dei neonati per ciascun individuo;
- conteggio e rimozione di eventuali piccoli morti e uova abortive per ciascun individuo.

Dai dati ottenuti, è stato possibile calcolare per ciascun eluato e per ciascun rifiuto i seguenti valori:

- età media all'inizio della riproduzione;
- numero medio di neonati per dafnia per giorno (n° totale di neonati per dafnia/gg di sopravvivenza);
- numero medio di uova abortive per dafnia per giorno (n° totale di uova abortive + n° totale di neonati morti per dafnia/gg di sopravvivenza).

Le differenze significative tra gli eluati per ciascun rifiuto, nel numero medio di neonati e di uova abortive per dafnia per giorno e nell'età media alla riproduzione, è stata saggiata mediante l'analisi della varianza. Nel caso di significatività dei valori di F è stato utilizzato il test di Scheffé (Morrison, 1976) per testare quali valori differissero significativamente dagli altri rispetto ad un errore di I tipo ( $\alpha$ ).

## 7.5 Risultati e discussione

### 7.5.1 Analisi dei metalli negli eluati

Sia per il fango che per i rottami la concentrazione dei metalli negli eluati è risultata superiore nelle estrazioni con acido acetico rispetto a quelle in cui si è impiegato  $\text{CO}_2$  o nessun agente estraente (Tab. 7.5, 7.6 e 7.7).

### 7.5.2 Test di tossicità con acido acetico

I valori di  $\text{IC}_{50}$  dei test di tossicità acuta con acido acetico 0,5 N (Tab. 7.8) sono in accordo con i dati ritrovati in letteratura (McKee e Wolf, 1971).

Dai valori di NOEC calcolati si è potuto definire

Tab. 7.7  
Concentrazioni del piombo ( $\mu\text{g/L}$ ) negli eluati ottenuti dalle estrazioni con il fango della ceramica e coi rottami delle ceramiche cotte

Procedura di estrazione	Fango di ceramica	Rottami di ceramiche cotte
Acqua distillata		
E	37	3
H	10200*	36
H 1		18
Acqua artificiale		
A	93	3
C	84	3
F	370*	4
I	8100*	22
I 1		15
Acqua di allevamento		
B	30	2
D	30	2
G	349*	3
L	10500*	30
L 1		15

A, B = estrazioni con R:A = 1:4 senza agente estraente  
 C, D = estrazioni con R:A = 1:20 senza agente estraente  
 E, F, G = estrazioni con R:A = 1:20 con  $\text{CO}_2$   
 H, I, L = estrazioni con R:A = 1:20 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$   
 H 1, I 1, L 1 = estrazioni con R:A = 1:20 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dopo la correzione del pH

che la quantità massima di acido acetico che non produce effetto sugli organismi di *Daphnia magna* per un'esposizione di 24 h è di 2,62 mL per grammo di rifiuto e per un'esposizione di 48 h è di 2,74 mL per grammo di rifiuto.

Queste quantità calcolate sono inferiori rispetto alla quantità prevista dalla metodica IRSA che utilizza un massimo di 4 mL di acido per gr di campione.

Una cessione con acido acetico secondo le metodiche IRSA, che richieda l'impiego di tutto il quantitativo massimo di acido a disposizione, comporta un eluato che contiene una concentrazione di acido acetico (in forma indissociata o di acetato) che potrebbe risultare tossica alla dafnia.

Per operare in sicurezza si è convenuto di utilizzare un quantitativo massimo di 2 mL di acido per grammo di rifiuto.

### 7.5.3 Test di tossicità acuta con eluati

E' stata rilevata l'assenza di immobilità, sia a 24 h che a 48 h dall'inizio dei test, per tutti gli eluati ottenuti dai rottami di ceramiche cotte.

Gli eluati A, B, C, D, E, F, provenienti dalle estrazioni del fango, senza l'utilizzo di agenti estrattivi o con CO<sub>2</sub>, non sono risultati tossici agli organismi, indifferentemente dall'acqua di diluizione impiegata.

La presenza di tossicità è stata invece riscontrata per gli eluati ottenuti dal fango con le estrazioni in acido acetico (Tab. 7.9). La percentuale di eluato che provoca l'immobilizzazione del 50% degli organismi saggiati a 24 h e a 48 h non è risultata significativamente diversa per gli eluati provenienti dalle estrazioni H e I (acqua distillata e acqua artificiale entrambe con acido acetico).

La percentuale di eluato tossica per il 50% degli organismi a 24 h è risultata significativamente più bassa per gli eluati ottenuti nella procedura L (acqua di allevamento con acido acetico).

Nei risultati con il test con il bicromato di potassio (Tab. 7.10) non si è riscontrata una maggiore sensibilità degli organismi in presenza di acqua di allevamento e per tali ragioni si è ritenuto che la immobilità superiore osservata per gli eluati in acqua di allevamento con acido acetico potesse essere imputabile alla quantità di metalli, rilasciati dal fango in tali condizioni, superiore rispetto agli altri estratti (Tab. 7.5), in particolare per lo Zn e per il B.

Le risposte di tossicità, rilevate con i test di tossicità acuta, sono in accordo con ciò che ci si attendeva in base alla classificazione dei rifiuti e ai

Tab. 7.8

Valori della IC<sub>50</sub> e della NOEC (mg/L) calcolate per organismi (età 12±12 h) saggiati in test di tossicità acuta con acido acetico 0,5 N

Valori	Tempo di esposizione	
	24 h	48 h
IC <sub>50</sub>	5575 s = 355 N = 6 CV% = 6,4	5308 s = 375 n = 6 CV% = 7,1
NOEC	3925 s = 669 n = 6 CV% = 17	4117 s = 545 n = 6 CV% = 13,2

Tab. 7.9

% di eluato che immobilizza il 50% degli organismi saggiati (% eluato di immobilizzazione mediana e intervalli fiduciali al 95% ottenuti nel test definitivo di tossicità acuta a 24h e a 48h con gli eluati provenienti dalle estrazioni con acido acetico con il fango della ceramica)

Procedura di estrazione		Test a 24 h	Test a 48 h
H	% di eluato int. fid.	34 31-37	28 21-37
I	% di eluato int. fid.	42,5 32,9-54,8	21 16,3-27,1
L	% di eluato int. fid.	20,5 14-30	

H = estrazione con acqua distillata e CH<sub>3</sub>COOH  
 I = estrazione con acqua artificiale e CH<sub>3</sub>COOH  
 L = estrazione con acqua allevamento e CH<sub>3</sub>COOH

Tab. 7.10

Valori di IC<sub>50</sub> (mg/L di Cr) ed intervalli fiduciali al 95% dei test definitivi di tossicità acuta con K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> con l'acqua artificiale e con l'acqua di allevamento

Acqua di diluizione	24 h IC <sub>50</sub> 95% intervallo fiduciale
Acqua artificiale	0,500 0,446-0,561
Acqua allevamento	0,420 0,389-0,454

risultati delle analisi chimiche degli eluati, confermando l'ipotesi di un utilizzo di *Daphnia magna* in saggi biologici su eluati di rifiuti a complemento alle analisi chimiche.

Le differenze tra le risposte dei test di controllo con l'acqua distillata, artificiale e di allevamento (Tab. 7.11), sottolineano però la necessità di porre attenzione alla scelta dell'acqua di diluizione per le estrazioni i cui eluati vengano successivamente utilizzati per i saggi biologici. L'individuazione dell'acqua di diluizione rappresenta un passo delicato nella standardizzazione dei saggi su eluati sia per garantire la ripetibilità dei risultati che per prevedere delle interazioni fra le sostanze in soluzione negli eluati.

#### 7.5.4 Test di tossicità cronica

Al momento dello scongelamento degli eluati utilizzati per i rinnovi del medium durante i test, sono stati osservati dei precipitati insolubili che rimanevano tali anche a temperatura ambiente.

Pertanto i risultati ottenuti non rispecchiano presumibilmente la reale tossicità degli eluati originari, sono da ritenersi assolutamente preliminari e possono però essere considerati di riferimento per lavori successivi.

Sono state effettuate le osservazioni per i seguenti valori:

##### a) Sopravvivenza

Ad eccezione del valore dell'eluato A per i rottami di ceramiche, non si sono riscontrate variazioni considerevoli delle percentuali di mor-

Tab. 7.11  
Mortalità (%) rilevata a 24h e 48h nei test di controllo in diverse condizioni

Condizione	% di mortalità	
	a 24h	a 48h
Acqua distillata	60	90
Acqua artificiale	0	0
Acqua allevamento	0	0
Acqua distillata con acido acetico	100	
Acqua artificiale con acido acetico	0	0
Acqua allevamento con acido acetico	0	0

talità al variare delle condizioni di estrazione dei rifiuti (Tab. 7.12).

##### b) Età media alla prima deposizione

Per ogni tipo di rifiuto e per ogni eluato è stata determinata l'età media alla prima deposizione degli organismi saggiati (Tab. 7.13 e 7.14).

Per i rottami, l'analisi della varianza ad un fattore ha rilevato differenze significative solo tra gli eluati in acqua artificiale. Confrontando i valori

Tab. 7.12  
Sopravvivenza a 28 giorni nei vari eluati del fango di ceramiche e dei rottami di ceramiche cotte

Trattamenti		Fango di ceram.	Rottami di cer. cotte
<b>Controlli</b>			
Artificiale	n° individui	10	10
	n° sopravvissuti	10	10
	% sopravvissuti	100	100
Allevamento	n° individui	10	10
	n° sopravvissuti	10	10
	% sopravvissuti	100	100
<b>Procedure di estrazione</b>			
A	n° individui	10	9
	n° sopravvissuti	8	7
	% sopravvissuti	80	77,8
B	n° individui	9	10
	n° sopravvissuti	9	10
	% sopravvissuti	100	100
C	n° individui	8	10
	n° sopravvissuti	8	10
	% sopravvissuti	100	100
D	n° individui	9	10
	n° sopravvissuti	9	9
	% sopravvissuti	100	90
F	n° individui	10	8
	n° sopravvissuti	9	8
	% sopravvissuti	90	100
G	n° individui	10	10
	n° sopravvissuti	10	10
	% sopravvissuti	100	100

A, B = estrazioni con R:A = 1:4 senza agente estraente in acqua artificiale e di allevamento

C, D = estrazioni con R:A = 1:20 senza agente estraente in acqua artificiale e di allevamento

F, G = estrazioni con R:A = 1:20 con CO<sub>2</sub> in acqua artificiale e di allevamento



per l'acqua artificiale con il test di Scheffé è risultato che l'età media alla prima deposizione nell'eluato con CO<sub>2</sub> è significativamente più alta rispetto all'eluato senza CO<sub>2</sub> con lo stesso rapporto R:A pari ad 1:20 ( $\alpha=0,05$ ) (Tab. 7.13).

Per il fango, l'analisi della varianza ed il test di Scheffé hanno rilevato che l'età media alla prima deposizione nei controlli ed in particolare nell'acqua di allevamento, è statisticamente più alta rispetto ai valori rilevati negli eluati con un rapporto R:A pari ad 1:4 ed 1:20 (Tab. 7.14).

### c) Attività riproduttiva

Per questo parametro, si sono ottenuti i risultati più contrastanti, probabilmente viziati dalla precipitazione dei sali avvenuta durante la conservazione dei campioni, in modo particolare per il

fango.

Per i rottami, è emerso che il tasso di produzione di neonati per gli organismi allevati negli eluati I ed L (estrazione con acqua artificiale ed acqua di allevamento con CO<sub>2</sub>) è statisticamente inferiore ( $\alpha=0,05$ ) rispetto a quello rilevato per gli organismi allevati negli altri eluati (A, B, C, D) (Tab. 7.15).

Questo risultato sembrerebbe in accordo con i valori chimici in quanto le estrazioni con la CO<sub>2</sub> hanno favorito un maggior rilascio di metalli dal rifiuto (Tab. 7.6). E' da rilevare che il tasso di produzione nel controllo in acqua artificiale risulta superiore rispetto a tutti gli altri valori (Tab. 7.15).

Per i rottami, i valori più alti nella produzione di uova abortive si sono avuti per gli organismi

Tab. 7.13

Età media alla prima deposizione degli organismi allevati nei controlli e negli eluati ottenuti con diverse procedure di estrazione dei rottami di ceramiche rotte

(lettere minuscole differenti indicano valori significativamente diversi tra gli eluati; lettere maiuscole indicano valori statisticamente diversi tra le acque; \* $\alpha=0,05$ )

ACQUA DI DILUIZIONE		TRATTAMENTI				Totali
		Controlli	Rapporto R:A 1:4	Rapporto R:A 1:20	Rapporto R:A 1:20 -CO <sub>2</sub>	
Acqua artificiale	età media	6,8 ab	6,7 ab	6,1 a	7,2 b*	6,7 A
	dev. st.	1,1	0,7	0,3	0,9	
	n° indiv.	10	9	10	8	
Acqua allevamento	età media	7,2 a	6,4 a	6,6 a	6,2 a	6,6 A
	dev. st.	0,9	0,5	1,3	0,4	
	n° indiv.	10	10	10	10	
Totale	età media	7,0 a	6,5 a	6,3 a	6,7 a	

Tab. 7.14

Età media alla prima deposizione degli organismi allevati nei controlli e negli eluati ottenuti con diverse procedure di estrazione del fango di ceramica

(lettere minuscole differenti indicano valori significativamente diversi tra gli eluati; lettere maiuscole indicano valori statisticamente diversi tra le acque; \* $\alpha=0,06$ ; \*\* $\alpha=0,05$ )

ACQUA DI DILUIZIONE		TRATTAMENTI				Totali
		Controlli	Rapporto R:A 1:4	Rapporto R:A 1:20	Rapporto R:A 1:20 -CO <sub>2</sub>	
Acqua artificiale	età media	6,8 ab	6,4 a	6,1 a	6,1 a	6,4 A
	dev. st.	1,1	0,5	0,3	0,3	
	n° indiv.	10	10	9	10	
Acqua allevamento	età media	7,2 a	6,2 b	6,2 b	6,7 ab	6,6 A
	dev. st.	0,9	0,4	0,4	0,9	
	n° indiv.	10	9	9	10	
Totale	età media	7 a**	6,3 b	6,2 b	6,4 ab	

allevati in eluati di estrazioni avvenute con CO<sub>2</sub>. In particolare, l'analisi della varianza ad un fattore e il test di Scheffé hanno evidenziato che la produzione di aborti per gli organismi allevati nell'eluato con acqua artificiale e CO<sub>2</sub> è statisticamente superiore al valore rilevato per il controllo con acqua artificiale (Tab. 7.16).

La produzione di uova abortive nei controlli e negli eluati delle estrazioni con il fango è stata invece pressoché nulla.

Anche per il fango il tasso di produzione dei neonati è risultato statisticamente inferiore per gli organismi allevati negli eluati con CO<sub>2</sub> rispetto ai valori rilevati per gli altri eluati. In particolare però, il tasso di produzione nel controllo con acqua di allevamento è inferiore rispetto a tutti gli altri

valori rilevati per questo parametro per il fango (Tab. 7.17). Le ragioni per cui i valori rilevati per il controllo in acqua di allevamento sono inferiori rispetto ai valori rilevati per gli eluati che avrebbero dovuto presentare una certa tossicità non sono state individuate, nonostante la standardizzazione delle metodiche di alimentazione e del materiale biologico utilizzato. Si fa osservare che tale evenienza è già stata osservata in letteratura e sembra essere correlata alla presenza di basse concentrazioni di sostanze tossiche che possono agire da stimolo (Viganò, 1990).

I risultati così riassunti hanno rilevato una certa tossicità, non riscontrata a breve termine, negli eluati ottenuti da estrazioni con CO<sub>2</sub> che ha determinato un ritardo nell'inizio dell'attività ri-

Tab. 7.15

Tasso di produzione di neonati (n° medio di neonati per dafnia per giorno) degli organismi allevati nei controlli e negli eluati ottenuti con diverse procedure di estrazione dei rottami di ceramiche cotte (lettere minuscole differenti indicano valori significativamente diversi tra gli eluati; lettere maiuscole indicano valori statisticamente diversi tra le acque; \* $\alpha = 0,05$ )

ACQUA DI DILUIZIONE		TRATTAMENTI				Totali
		Controlli	Rapporto R:A 1:4	Rapporto R:A 1:20	Rapporto R:A 1:20 -CO <sub>2</sub>	
Acqua artificiale	neonati	6,08 a	5,67 a	5,29 a	1,52 b*	4,78 A
	dev. st.	1,09	2,56	1,29	0,63	
	n° indiv.	10	9	10	10	
Acqua allevamento	neonati	4,73 a	5,73 a	5,70 a	0,67 b*	4,21 A
	dev. st.	0,59	1,27	2,30	0,27	
	n° indiv.	10	10	10	10	
Totale	neonati	5,41 a	5,70 a	5,50 a	1,04 b*	

Tab. 7.16

Tasso di produzione di uova abortive (n° medio di uova abortive + n° medio di neonati morti per dafnia per giorno) degli organismi allevati nei controlli e negli eluati ottenuti con diverse procedure di estrazione dei rottami di ceramiche cotte (lettere minuscole differenti indicano valori significativamente diversi tra gli eluati; lettere maiuscole indicano valori statisticamente diversi tra le acque; \* $\alpha = 0,05$ )

ACQUA DI DILUIZIONE		TRATTAMENTI				Totali
		Controlli	Rapporto R:A 1:4	Rapporto R:A 1:20	Rapporto R:A 1:20 -CO <sub>2</sub>	
Acqua artificiale	uova ab.	0,05 a	0,13 ab	0,17 ab	0,28 b*	0,15 A
	dev. st.	0,05	0,24	0,13	0,19	
	n° indiv.	10	9	10	8	
Acqua allevamento	uova ab.	0,03 a	0,17 a	0,12 a	0,17 a	0,12 A
	dev. st.	0,05	0,25	0,11	0,15	
	n° indiv.	10	10	10	10	
Totale	uova ab.	0,94 a	0,16 ab	0,15 ab	0,22 b*	

Tab. 7.17

Tasso di produzione di neonati (n° medio di neonati per dafnia per giorno) degli organismi allevati nei controlli e negli eluati ottenuti con diverse procedure di estrazione del fango di ceramica (lettere minuscole differenti indicano valori significativamente diversi tra gli eluati; lettere maiuscole indicano valori statisticamente diversi tra le acque; \*\* $\alpha = 0,05$ ; \* $\alpha = 0,08$ )

ACQUA DI DILUIZIONE		TRATTAMENTI				Totali
		Controlli	Rapporto R:A 1:4	Rapporto R:A 1:20	Rapporto R:A 1:20 -CO <sub>2</sub>	
Acqua artificiale	neonati	6,08 a	6,99 ab	7,71 b*	7,40 ab	7,01 A
	dev. st.	1,09	1,44	1,12	1,28	
	n° indiv.	10	10	8	10	
Acqua allevamento	neonati	4,73 a	8,18 b**	7,85 b**	5,02 a	6,36 A
	dev. st.	0,59	0,92	1,07	0,54	
	n° indiv.	10	9	9	10	
Totale	neonati	5,41 a	7,55 b**	7,78 b**	6,21 a	

produttiva e una diminuzione nelle capacità riproduttive (minore produzione di neonati e impossibilità allo sviluppo delle uova con aumento del numero di uova abortive) degli organismi esposti per lungo periodo in particolare agli estratti dei rottami.

Si è ipotizzato che l'assenza di tossicità a lungo termine degli eluati del fango rispetto ai controlli e rispetto a quella riscontrata per gli eluati dei rottami sia imputabile alla precipitazione dei metalli causata dalla "non corretta" conservazione del campione. Infatti, anche se la congelazione del campione per la successiva analisi chimica è una prassi consolidata nel laboratorio chimico in quanto non comporta alterazioni nel campione dal momento che quest'ultimo scongelato viene nuovamente sottoposto a mineralizzazione e solubilizzazione in ambiente acido prima dell'analisi, nelle prove tossicologiche considerato che queste ultime operazioni non sono possibili, non può costituire il metodo di conservazione più idoneo.

La formazione di precipitati insolubili è stata probabilmente più rilevante per il fango in quanto i relativi eluati presentavano concentrazioni di metallo molto superiori rispetto a quelle riscontrate negli eluati delle piastrelle cotte. Durante la conservazione a -18 °C sono state quindi favorite condizioni di soprassaturazione che hanno facilitato la formazione di precipitati poco solubili (Saini e Liberti, 1980).

## 7.6 Conclusioni

L'aspetto più rilevante da un punto di vista dell'impatto ambientale non è tanto il contenuto totale di metalli in un rifiuto ma la quantità di

questi che viene rilasciata e che può quindi creare problemi di inquinamento delle acque superficiali e sotterranee. Diventa a tale proposito interessante ed auspicabile l'utilizzo di test biologici a breve e a lungo termine che possano costituire uno strumento complementare all'analisi chimica utilizzabile per lo smaltimento dei rifiuti.

Nel lavoro condotto, da ritenersi preliminare ma propositivo ai fini di una metodologia, sono emerse alcune problematiche nell'applicazione del saggio biologico con *Daphnia magna* su eluati di rifiuti.

Pertanto per l'applicazione del saggio biologico con *Daphnia magna* a fianco delle tradizionali e previste analisi chimiche per gli eluati di rifiuti, ci sembra importante sottolineare le difficoltà che abbiamo incontrato:

- l'eluato di un rifiuto può presentare caratteristiche di per sé non idonee per il saggio biologico che possono differire al variare della composizione del rifiuto e delle condizioni di estrazione;
- necessità di apportare modifiche all'eluato per renderlo compatibile col saggio biologico: la correzione, ad esempio, del pH può comportare delle alterazioni nel campione (precipitazione del soluto), che possono indurre la diminuzione della reale tossicità;
- agenti estraenti: sono previsti dalle metodiche ufficiali per i test chimici di cessione, ma possono risultare tossici a *Daphnia magna*. E' indispensabile quindi conoscere la tossicità a breve e a lungo termine delle sostanze estraenti per stabilirne le quantità di non effetto per *Daphnia magna* da utilizzare nelle estrazioni;
- acqua di diluizione per i test di cessione: dai



nostri risultati è emersa la necessità di utilizzare l'acqua artificiale come acqua di diluizione in sostituzione dell'acqua distillata, prevista dalle metodiche ufficiali di cessione. Le motivazioni di tale considerazione possono essere ricondotte alla impossibilità di allestire test di controllo in acqua distillata per i noti problemi di pressione osmotica e alla possibilità di garantire una ripetibilità dei risultati utilizzando un'acqua standard come medium. Riteniamo però che sia opportuno verificare se la capacità di estrazione delle due acque nei confronti di un dato rifiuto è correlabile;

- conservazione del campione: questo problema si pone soprattutto nel caso di allestimento dei test a lungo termine. Dalla esperienza acquisita si può affermare che la conservazione a -18 °C di eluati particolarmente ricchi di sali può determinare alterazioni nella composizione dei campioni tali da inficiare i risultati dei test biologici.

## 7.7 Bibliografia

- Adema D.M.M., 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59: 125-134.
- Borgmann U. and Munawar M., 1989. A new standardized sediment bioassay protocol using the amphipod *Hyaletta azteca* (Saussure). *Hydrobiologia*, 188/189: 425-531.
- Cowgill U.M., Hemmel H.W., Hopkins D.L., Applegath S.L. and Takahashi I.T., 1986. The influence of water on reproductive success and chemical composition of laboratory reared populations of *Daphnia magna*. *Water Research*, 20: 317-323.
- Daniels S.A., Munawar M. and Mayfield C.I., 1989. An improved elutriation technique for the bioassessment of sediment contaminants. *Hydrobiologia*, 188/189: 619-631.
- EPA, 1980. Toxicity of leachates. U.S.EPA/600/2-80-057 Municipal Environmental Research Laboratory. Cincinnati, Ohio 45268.
- Fred Lee G., 1976. Dredged material research problems and progress. *Environmental Science & Technology*, 10: 334-338.
- GIesy J.P. and Graney R.L., 1989. Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiologia*, 188/189: 21-60.
- Gorbi G., 1987. Utilizzazione di *Daphnia magna* in tossicologia ambientale. In: Atti del Corso di formazione "Utilizzazione di *Daphnia magna* in tossicologia ambientale", C.I.S.B.A., Reggio Emilia.
- Klapwijk S.P., Bolier G. and Van Der Does, 1989. The application of algal growth potential tests (AGP) to the canals and lakes of western Netherland. *Hydrobiologia*, 188/189: 189-199.
- IRSA, 1986. Appendice II. Testi di cessione. In: "Metodi Analitici per i Fanghi", *Quad. Ist. Ric. Acque*, 64 (3), *Parametri chimico-fisici*.
- Lee C.R., Peddicort R.K., Folsom B.L. and Skogerboe J.G., 1987. The use of bioassay and associated tests in dredged material and disposal management. *Hydrobiologia*, 149: 81-86.
- Litchfield J.T. e Wilcoxon F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effects experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 96: 99-113.
- Malins D.C., 1989. The use of environmental assays for impact assessment. *Hydrobiologia*, 188/189: 87-91
- Marchetti R. e Viganò L., 1990. Misura degli effetti tossici acuti con *Daphnia magna*: proposte per una metodologia standard. *Relazione non pubblicata*.
- Mckee J.E. and Wolf H.W., 1971. Water quality criteria. *The Resource Agency of California State Water Resources Control Board*, Publication 3-A: 124-125.
- Moore J.W. and Ramamoorthy S., 1984. Heavy metals. Applied monitoring and impact assessment. *Springer-Verlag New York Inc*.
- Morrison D.F., 1976. Metodi di analisi statistica multivariata. *Casa ed. Ambrosiana*: 28-37.
- Munawar M., Munawar I.F., Mayfield C.D. and McCarthy L.H., 1989. Probing ecosystem health: a multi-disciplinary and multi-trophic assay strategy. *Hydrobiologia*, 188/189: 93-113.
- OCDE, 1987. Utilisation des tests biologiques pour l'évaluation et le controle de la pollution de l'eau. Monographies sur l'environnement. N° 11. OECD W.5502K/5882t8360.
- Reynoldson T.B. and Zarull M.A., 1989. The biological assessment of contaminated sediments - the Detroit River example. *Hydrobiologia*, 188/189: 463-476.
- Saini G. e Liberti A., 1980. Chimica analitica. *UTET*.
- Sloterdijk H., Champoux L., Jarry V., Couillard Y. and Ross P., 1989. Bioassay responses of micro-organisms to sediment elutriates from the St. Lawrence River (Lake St. Louis). *Hydrobiologia*, 188/189: 317-334.
- Viganò L., 1990. Tossicità cronica di effluenti di scarico su *Daphnia magna*: ricerca della diluizione di non effetto. *Acqua Aria*, 2: 145-148.
- Zanetti M., Loro R., Siligardi M., Moroni F. e Turin P., 1990. Il Lago Cadore - Studi limnologici. *Provincia di Belluno, Ass.to Agricoltura, Caccia e Pesca*.

N. De Marco\*, E. Barabas\*, M. Lucchese\*, R. Loro\*\* e M. Zanetti\*\*

\*Presidio Multizonale di Prevenzione, USSL 11 - Pordenone

\*\*Bioprogram s.c.r.l. - Oderzo

## Riassunto

Sono stati saggiati 13 sedimenti fluviali derivanti dai bacini del Sile e del Livenza (Veneto/Friuli-Venezia Giulia) con *Daphnia magna* mediante test acuti e test a lungo termine. I sedimenti sono stati caratterizzati per il contenuto organico e il contenuto di alcuni metalli. I corsi d'acqua da cui i sedimenti provengono sono stati monitorati attraverso Indici Biotici (E.B.I. e CB<sub>2</sub>) nello stesso periodo in cui sono stati prelevati i campioni per le analisi ecotossicologiche. I risultati ottenuti hanno permesso di trovare delle correlazioni fra due metodi biologici applicati per la valutazione dello stato di qualità delle acque superficiali.

## Summary

Thirteen river sediments from Sile's and Livenza's basins (Regione Veneto/Friuli-Venezia Giulia) have been submitted to acute and long term *Daphnia magna* tests. Sediments were characterized for their organic matter and metallic content. The river were monitored by means of E.B.I. and CB<sub>2</sub> Biotic Index at the time of sampling for ecotoxicological analysis. Results made possible a correlation between the biological tests (E.B.I. and CB<sub>2</sub>) and *Daphnia magna* tests.

## 8.1 Introduzione

L'ecosistema "fiume" è stato oggetto di studio in tutte le sue componenti. E' ormai superato il concetto di concentrazione chimica di una sostanza inquinante presente nell'acqua per la valutazione dello stato di salute di un corpo idrico. Attualmente l'approccio chimico-fisico viene pressoché routinariamente affiancato dall'approccio biologico. Una metodica che quasi tutte le provincie italiane utilizzano per la classificazione biologica delle acque superficiali è l'E.B.I. (Extended Biotic Index) (Woodiwiss, 1978), modificato e standardizzato da Ghetti nel 1986, per adattarlo alle diverse realtà ambientali italiane. E' importante studiare, infatti, l'effetto che eventuali sostanze tossiche eterogenee (sversate abitualmente o casualmente) producono sulla "struttura" delle comunità biologiche di un corpo idrico; è altrettanto importante verificare gli effetti funzionali su una comunità biologica di un determinato ecosistema fluviale. Per dare una valutazione delle condizioni di stress di un determinato ambiente, sono stati condotti dei test cronici con *Daphnia magna* (Straus) su sedimenti fluviali, monitorati in periodo di magra e di morbida, nello stesso anno con i metodi E.B.I. e CB<sub>2</sub>.

I test acuti e cronici con *Daphnia magna* (Straus) (Cladocera: Crustacea) sono già stati usati con successo su sedimenti (Buikema e Coll., 1980; Voyer and Heltshe, 1984; Wentzel e Coll., 1977; Brannon e Coll., 1980). Le stesse prove tossicologiche (Butler, 1978) sono state usate da noi su sedimenti fluviali dove parallelamente sono stati applicati altri metodi di valutazione biologica. Infine, si è cercato di rilevare una eventuale corrispondenza di vari metodi biologici.

## 8.2 Materiali e metodi

### 8.2.1 Campionamento

I sedimenti da saggiare sono stati campionati in concomitanza al mappaggio biologico (metodo E.B.I.) condotto per la realizzazione della Carta Ittica della Provincia di Treviso (Loro e Coll., 1990) e si riferiscono ad alcuni punti appartenenti al bacino del Sile e al bacino del Livenza (fiume situato a confine tra la regione Veneto e Friuli-





Venezia Giulia) (Figg. 8.1 e 8.2), scelti in base alla loro rappresentatività rispetto alla zonazione spaziale (Vannote e Coll., 1980) dei corsi d'acqua. I sedimenti sono stati prelevati con benna Ekman e conservati a 4 °C prima dell'utilizzo. Si è scelto come controllo un sedimento di un corso d'acqua, Rio Castellana, per il quale le analisi chimiche e fisiche non avevano evidenziato presenza degli inquinanti saggiati routinariamente e presentava caratteristiche di contenuto organico simili agli altri campioni testati (Tab. 8.1). In laboratorio i sedimenti sono stati essiccati a 55-60 °C per 24 ore, omogeneizzati e setacciati, per rimuovere le particelle più grossolane. La granulometria finale era di 80 mesh. Trenta grammi di campione sono stati addizionati a 270 mL di acqua milliQ in beute di vetro della capacità di 300 mL. L'acqua milliQ era stata precedentemente saturata con CO<sub>2</sub> mantenendo il pH (di estrazione) a un valore di 5,5 come da metodo (delibera C.I., 1984). Le beute sono state poste in agitatore meccanico rotante per 6 ore: si è quindi prelevato il surnatante per i test dopo decantazione. Su una aliquo-

Tab. 8.1

Tipologia: Caratterizzazione dei sedimenti C.O.D., NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Corpo idrico	Codice	C.O.D. g/kg	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> g/kg
Bacino: Fiume Livenza			
Livenza	15	60,09	0,34
	34	24,35	0,40
Resteggia	14	43,90	0,27
	20	59,09	0,42
Monticano	24	21,54	0,35
	33	50,58	0,28
Lia	28	87,61	0,38
	29	102,77	0,48
Bacino: Fiume Sile			
Sile	41	56,50	0,39
	43	79,96	0,39
	45	78,13	0,42
	46	122,59	0,67
	49 a	70,85	0,27
	49 b	38,05	0,42
	Bianco	67,47	0,48

ta del campione liquido è stata condotta la ricerca di alcuni metalli, che solitamente si ritrovano nelle aree considerate, con ICP-AES (Perkin Elmer ICP 5500 equipaggiato con Data System 10 e Stampante PR 100).

### 8.2.2 Test di tossicità acuta con *Daphnia magna*

Su una aliquota del surnatante limpido, dopo estrazione del sedimento, sono stati effettuati i test acuti secondo le modalità indicate da Marchetti e Viganò nel 1990.

### 8.2.3 Test di fertilità con *Daphnia magna*

E' stata saggiata la fertilità di *Daphnia magna* mediante test a 7 giorni, secondo metodo Nebeker, 1988, utilizzando dafnie di 7 giorni, prodotte da femmine in fase di riproduzione partenogenetica allevate singolarmente in condizioni standardizzate, rispondenti alle metodiche indicate da Marchetti e Viganò, 1990. Per i test sono state utilizzate cinque dafnie per becker di 250 mL, contenenti 200 mL di campione non rinnovato giornalmente. I saggi sono stati condotti alla temperatura di 20±2 °C e con fotoperiodo di 16 ore di luce; si è provveduto quotidianamente alla somministrazione di cibo costituito da una sospensione di alga verde (*Selenastrum capricornutum* Printz) e lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) in quantità di 300.000 cell/mL ciascuno. Si è provveduto ad una leggera aerazione del mezzo. Il valore di pH non ha mai superato i 9,2 (Havas and Hutchinson, 1982) e l'ossigeno disciolto il 100% di saturazione. Giornalmente è stata controllata la sopravvivenza degli organismi e sono stati contati e rimossi i neonati. I dati così ottenuti hanno consentito il calcolo del tasso di fertilità totale (T.F.T.) usato per la stima degli effetti sulla fertilità.

### 8.2.4 Calcolo dell'E.B.I. e del Coefficiente di Attitudine Biogena

L'analisi del macrobenthos è stata condotta per il calcolo dell'E.B.I. e del Coefficiente di Attitudine Biogena (Verneaux e Tuffery, 1977; Verneaux e Coll., 1978) in un periodo di morbida (marzo) e magra (dicembre) idrologica. I dati fanno parte della Carta Ittica della Provincia di Treviso (Loro e Coll., 1990) e in questo contesto sono utilizzati solo a scopo comparativo.

### 8.3 Risultati e discussione

In tabella 8.2 sono rappresentati i valori dei test acuti. I test acuti non hanno evidenziato per nessun campione effetti tossici acuti. Nella tabella 8.3 è rappresentato il numero di dafnidi prodotti in totale, la percentuale di madri sopravvissute a fine test e i valori di T.F.T. Solo nel caso del campione 20 c'è stato un effetto sulla fertilità. Nei campioni 43 e 15 il numero totale di neonati prodotti, inferiore rispetto al controllo, è da attribuirsi alla elevata mortalità nel gruppo di organismi; infatti il T.F.T. ha presentato in questi campioni valori prossimi al controllo. Un'alta mortalità delle madri tuttavia deve essere considerata di per sé un effetto tossico. In generale sembra che vi sia una stimolazione delle attività riproduttive. Nella tabella 8.4 sono rappresentate le concentrazioni di metalli nei campioni dopo estrazione, prima della conduzione dei test acuti e a lungo termine. Nella tabella 8.5 sono indicate le MATC

Tab. 8.2

Tipologia: Test acuti, percentuale di immobilizzazioni. Metodologia: *Daphnia magna* - 24 ore

Corpo idrico	Codice	Camp. tal quale 100%	Diluiz. 1-1 50%	Diluiz. 1-1 50%
Bacino: Fiume Livenza				
Livenza	15	NE	NE	NE
	34	NE	NE	NE
Resteggia	14	NE	20	NE
	20	NE	NE	NE
Monticano	24	NE	NE	NE
	33	NE	NE	NE
Lia	28	NE	NE	NE
	29	NE	NE	NE
Bacino: Fiume Sile				
Sile	41	NE	20	NE
	43	NE	NE	NE
	45	NE	NE	NE
	46	NE	NE	NE
	49 a	NE	NE	20
	49 b	NE	NE	NE
Bianco	NE	NE	NE	NE

NE = Nessun Effetto

e le NOEC riscontrate in letteratura per alcuni metalli (Viganò, 1987). Il confronto fra i valori della tabella 8.5 e le concentrazioni dei metalli in tabella 8.4 sembra indicare che gli effetti osservati sulla sopravvivenza e la fertilità in *Daphnia magna* non siano da attribuire alla presenza di quantità tossiche di metalli (Biesinger e Coll., 1986; Baudouin e Scoppa, 1973; Bertram, 1981;

Tab. 8.3

Tipologia: Test di fertilità su sedimenti fluviali. Metodologia: *Daphnia magna* a 7 giorni

Corpo idrico	Codice	Dafnie vive a fine test %	Dafnidi prodotti n.	Tasso di Fertilità Totale T.F.T.
Bacino: Fiume Livenza				
Livenza	15	20	63	21,03
	34	80	132	26,70
Resteggia	14	100	139	27,80
	20	80	87	17,40
Monticano	24	80	125	28,10
	33	100	154	30,80
Lia	28	100	133	26,60
	29	100	186	37,20
Bacino: Fiume Sile				
Sile	41	100	110	22,00
	43	0	88	27,20
	45	100	163	32,60
	46	100	183	43,54
	49 a	80	99	22,30
	49 b	80	158	39,00
Bianco	100	113	22,60	

Tab. 8.5

Concentrazioni Massime Accettabili (MATC) e Concentrazione di Non Effetto (NOEC) riportate in letteratura per alcuni metalli. Concentrazioni espresse in mg/L. (Viganò, 1987)

Elemento	<i>Daphnia magna</i>	
	MATC	NOEC
Cadmio	.0014-.0019	.00035-.0026
Cromo VI	.019	.0094
Piombo	.030	.018
Rame	.0025-.060	.016
Zinco	.074	.014

Tab. 8.4

Tipologia: Determinazione di alcuni metalli nel surnatante limpido. Metodologia: ICP-AES

Corpo idrico	Cod.	Cr mg/L	Cu mg/L	Fe mg/L	Mg mg/L	Mn mg/L	Zn mg/L	Cd mg/L	Pb mg/L
<b>Bacino: Fiume Livenza</b>									
Livenza	15	ND	0,011	0,020	11,1	0,025	ND	ND	ND
	34	ND	ND	ND	11,8	ND	ND	ND	ND
Resteggia	14	ND	0,011	0,020	13,4	0,010	0,010	ND	ND
	20	ND	0,026	ND	17,3	0,062	ND	ND	ND
Monticano	24	ND	0,014	ND	9,5	0,329	0,022	ND	ND
	33	ND	0,025	ND	19,7	0,133	ND	ND	ND
Lia	28	ND	0,036	0,130	17,9	0,013	ND	ND	ND
	29	ND	0,029	0,030	15,6	0,017	ND	ND	ND
<b>Bacino: Fiume Sile</b>									
Sile	41	ND	0,015	ND	14,1	ND	ND	ND	ND
	43	ND	ND	ND	20,0	ND	ND	ND	ND
	45	ND	0,018	0,020	15,4	ND	ND	ND	ND
	46	ND	0,017	0,020	21,4	ND	ND	ND	ND
	49 a	ND	0,018	ND	20,1	ND	ND	ND	ND
	49 b	ND	0,015	ND	14,8	ND	ND	ND	ND
Bianco		ND	ND	ND	23,8	0,100	0,100	ND	ND
ND*		<.010	<.010	<.020	<.2	<.010	<.010	<.0010	<.005

\* ND = Non Determinabile

Tab. 8.6

Tipologia: Qualità biologica delle acque correnti. Metodologia: mediante indice biotico, E.B.I.

Corpo idrico	Codice	Numero Unità Sistematiche		E.B.I.		Classe Qualità	
		Mar.	Dic.	Mar.	Dic.	Mar.	Dic.
<b>Bacino: Fiume Livenza</b>							
Livenza	15	17	19	8	8	II	II
	34	29	20	11	8-9	I	II
Resteggia	14	23	22	10	10	I	I
	20	5	4	2-3	4	V	IV
Monticano	24	14	16	7	8-7	III	II-III
	33	22	14	9	6	II	III
Lia	28	11	10	7-6	5-6	III	IV-III
	29	19	14	8	6	II	III
<b>Bacino: Fiume Sile</b>							
Sile	41	15	15	7-8	7-8	II-III	II-III
	43	25	18	9-10	7	II-I	III
	45	24	19	9	8	II	II
	46	18	18	7	7	III	III
	49	16	14	6	7	III	III



Taylor, 1981b; Sayrs, 1975; Winner and Farrell, 1976). Si è osservata invece, per il solo campione 20, unico della serie per il quale si è rilevata una situazione di elevato inquinamento (Classe di Qualità V e IV e CB<sub>2</sub> 1,0 e 1,5)\* (Tab. 8.6, Tab. 8.7) una significativa corrispondenza con il rispettivo valore di T.F.T.. Nel campione 43 in cui c'è una maggiore variabilità stagionale di E.B.I. e CB<sub>2</sub> si è riscontrato un significativo aumento nel valore di T.F.T. Questo potrebbe essere messo in relazione ad un maggior apporto di nutrienti dal bacino idrografico.

## 8.4 Conclusioni

I test cronici con *Daphnia magna* sugli estratti di sedimento sembrano essere un mezzo idoneo per lo studio della tossicità dei sedimenti fluviali (Giesy e Coll., 1988). L'analisi degli effetti sulla fertilità e sulla sopravvivenza consentono l'individuazione di situazioni di stress non rilevabili con i test acuti sugli estratti. Da questa indagine, ancora da approfondire, sembra emergere una possibile corrispondenza fra gli effetti osservati sulla fertilità con test ecotossicologici e le indicazioni degli Indici Biotici E.B.I. e CB<sub>2</sub>.

\* Le Classi di Qualità (da I a V) e i valori di CB<sub>2</sub> (1-10) definiscono in senso decrescente condizioni progressivamente più deteriorate per un dato ambiente.

### Ringraziamenti

Si ringrazia il p.i. Dino De Franceschi e la sig.a Anita Zanin per l'elaborazione grafica di questo manoscritto.

Tab. 8.7

Tipologia: Calcolo dei coefficienti di attitudine biogena. Metodologia: CB<sub>2</sub> - Verneaux

Corpo idrico	Codice	Numero Unità Sistematiche		E.B.I.		CB <sub>2</sub>	
		Mar.	Dic.	Mar.	Dic.	Mar.	Dic.
<b>Bacino: Fiume Livenza</b>							
Livenza	15	11	17	9	13	5,0	4,5
	34	20	16	16	11	5,5	3,5
Resteggia	14	17	19	16	16	5,5	6,5
	20	3	3	3	3	1,0	1,5
Monticano	24	12	9	10	7	4,0	3,5
	33	18	13	14	11	5,5	4,0
Lia	28	9	9	7	5	2,5	3,0
	29	16	11	11	6	4,5	4,0
<b>Bacino: Fiume Sile</b>							
Sile	41	14	14	11	11	4,0	4,0
	43	19	13	13	11	4,5	7,5
	45	19	18	18	13	6,0	4,5
	46	12	13	9	12	3,5	4,0
	49	13	11	9	10	3,5	3,5

## 8.5 Bibliografia

- Baudouin M.F. and Scoppa P., 1973. The influence of environmental factors on the toxicity of heavy metals to aquatic organisms. *Ispira, Ann. Rep.*
- Bertram P.E., 1981. Population responses of *Daphnia* to long-term exposure to cadmium. *Diss. Abstr. Int.*, 41, 4008B.
- Biesinger K.E. and Coll., 1986. Effects of metal salt mixtures on *Daphnia magna* reproduction. *Ecotox. Environ. Safety*, 11: 9-14.
- Brannon J.M. and Coll., 1980. Long term release of heavy metals from sediments. In: Baker R.A. (ed.) "Contaminants and Sediments, vol. 2, Analysis, Chemistry, Biology". *Ann Arbor Science Publisher*, Ann Arbor, MI: 221-266.
- Buikema A.L. and Coll., 1980. *Daphnia* toxicity tests. In: Buikema A.L. and Cairns J. Jr. (eds.) "Aquatic Invertebrate Bioassays", STP 715. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, P.A.: 48-69.
- Butler G.C. (Ed.), 1978. Principles of ecotoxicology. SCOPE Report 12, *Wiley*, New York.
- Ghetti P.F., 1986. I macroinvertebrati nell'analisi di qualità dei corsi d'acqua. Manuale di applicazione. *Prov. Auton. di Trento, Staz. Sperim. Agr. Forest., Serv. Protez. Amb.*, Trento.
- Giesy J.P. and Coll., 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit River sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*: 483-498.
- Havas M. and Hutchinson T.C., 1982. Aquatic invertebrates from the Smoking Hills, N.W.T.: effect of pH and metals on mortality. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 890-903.
- Loro L. e Coll., 1990. Carta Ittica - Carta di Qualità delle Acque. *Provincia di Treviso*.
- Marchetti R. e Viganò L., 1990. Misura degli effetti acuti con *Daphnia magna*. Proposte per una metodologia standard. *Relazione non pubblicata*.
- Nebeker A.V. and Coll., 1988. Chronic effects of contaminated sediment on *Daphnia magna* and *Chironomus tentans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 574-581.
- Sayrs R.L. Jr., 1975. Lethal and sublethal effects of cadmium on *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *M.S. Thesis, Univ. Tennessee*, Knoxville.
- Taylor D., 1981b. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. Vol. 5, Cadmium. *Brixham Lab. Rep. BL/A/1900*.
- Vannote R.L. and Coll., 1980. The river continuum concept. *J. Fish. Res. Board Can.*, 3: 130-137.
- Verneaux J. et Tuffery G., 1967. Une methode zoologique pratique de determination de la qualité biologique des eaux courantes. Indices Biotiques. *Ann. Sci. Univ. Besançon, Zool.*, 3: 79-89.
- Verneaux et Coll., 1978. Note preliminaire a la proposition de nouvelles methodes de determination de la qualité des eaux courantes (I.Q.B.G.). *Centre Hydrobiol. Univ. Besançon et Lab. Hydroécol. CT-GREF*.
- Viganò L., 1987. Metalli e non metalli tossici totali: esame del limite della legge 319/76 con *Daphnia magna*. *Ingegneria Ambientale*, 16: 341-345.
- Voyer R.A. and Heltshe J.F., 1984. Factor interactions and aquatic toxicity testing. *Water Res.*, 18: 441-447.
- Wentzel R.A. and Coll., 1977. Sublethal effects of heavy metals contaminated sediment on midge larvae (*Chironomus tentans*). *Hydrobiologia*, 56: 153-156.
- Winner R.W. and Farrell M.P., 1976. Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33: 1685-1691.
- Woodiwiss F.S., 1978. Second Technical Seminar - Background information. *Commission of the European Communities*.

# APPLICAZIONE DEL SAGGIO DI TOSSICITA' CON *DAPHNIA MAGNA* SUGLI EFFLUENTI DEI DEPURATORI CIVILI DELLA PROVINCIA DI PAVIA

A. Berri e G. Guarnaschelli

Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione, U.O.  
Fisica e Tutela dell'Ambiente, USSL 77 - Pavia

## Riassunto

Vengono esaminati, utilizzando il test di tossicità con *Daphnia magna*, proposto dall'IRSA, gli effluenti di 84 impianti di depurazione civili della provincia di Pavia.

Dall'analisi dei dati ottenuti possono essere fatte alcune ipotesi sull'accettabilità degli scarichi, in funzione delle indicazioni operative che potrebbero essere assunte in sede di modifica legislativa.

Dalla sperimentazione condotta emerge che il metodo per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna* proposto dall'IRSA, risulta una metodica chiara ed affidabile, di agevole applicazione sia nell'allevamento degli organismi, sia nella conduzione del saggio.

## Summary

The effluents from 84 civil treatment plants in Pavia province are examined using the IRSA-proposed *Daphnia magna* toxicity test.

On the basis of the analysis of the data several hypotheses concerning the acceptability of discharges can be made with reference to operating indications that could be introduced in the form of legislative modifications.

The tests performed show that the method for determining acute toxic effects using *Daphnia magna* as proposed by IRSA is straightforward and reliable, as well as easy to apply as regards both breeding the organisms and performing the actual testing.

## 9.1 Introduzione

Il parametro "saggio di tossicità", così come compare nella Tabella A della legge 319/76, non ha mai avuto una vastissima applicazione: ciò nonostante esso riveste un ruolo di fondamentale importanza nella definizione dei limiti previsti per gli scarichi in acque di superficie (Viganò e Coll., 1987). Le due considerazioni fondamentali a favore del saggio di tossicità possono essere, in sintesi, così riassunte:

- a) il controllo effettuato per mezzo di limiti chimici non potrà mai ritenersi completo, essendo impossibile, con tale approccio, assicurare un'esauriente copertura analitica e una corretta interpretazione dei dati ottenuti nei confronti di tutti gli inquinanti potenzialmente individuabili, compresi quelli per i quali non è previsto un limite allo scarico e che appartengono alla vasta schiera dei sintetizzati ex novo;
- b) il saggio di tossicità permette di rilevare l'azione congiunta di più composti tossici presenti contemporaneamente nello scarico; mentre è impossibile rilevare tale circostanza per altra via.

In opposizione a queste considerazioni favorevoli, occorre riconoscere che l'applicazione del saggio di tossicità è stata finora compromessa e di fatto vanificata dai seguenti ostacoli:

- a) il personale presente negli ex-laboratori provinciali, ora laboratori delle USL, deputati al controllo degli scarichi, era costituito quasi esclusivamente da operatori di formazione chimica, poco inclini pertanto ad utilizzare saggi biologici;
- b) l'applicazione del saggio di tossicità con *Salmo gairdneri* Rich, oltre a richiedere spazi notevoli e apparecchiature di un certo costo, creava difficoltà nel reperimento e nella stabulazione degli organismi test;
- c) il campione di acqua di scarico da prelevare per l'attuazione del saggio era, come previsto dalla metodica, di alcune decine di litri; ciò risultava ovviamente poco agevole, anche perché i punti di scarico non sono sempre facilmente raggiungibili.

L'infittirsi dell'attenzione scientifica sia na-



zionale che internazionale nei confronti dei saggi di tossicità, con lo sviluppo di diverse metodiche e normative (CEE, ISO, OECD, ASTM, EPA, etc.), e l'accresciuto interesse per le metodiche a carattere biologico da parte degli operatori preposti al controllo, fanno ritenere che in futuro il saggio di tossicità incontrerà più vasta accoglienza. Il successo del saggio potrà ulteriormente essere consolidato se, grazie all'impegno profuso dall'IRSA, l'organismo previsto per il saggio legale verrà sostituito, passando cioè dalla trota, difficile da stabulare e da utilizzare, alla *Daphnia*, di più semplice impiego e facile da allevare.

Sulla scorta di queste considerazioni, abbiamo incluso tra i diversi parametri del programma di lavoro "Indagine sulla funzionalità degli impianti di depurazione civile della provincia di Pavia" anche il saggio di tossicità con *Daphnia magna* come proposto dall'IRSA.

Congiuntamente a tale saggio, sono pure state eseguite, su tutti gli effluenti di impianti di depurazione civile in funzione nella provincia di Pavia: le determinazioni del COD globale dell'effluente, la determinazione del COD del surnatante, la determinazione di nitriti, nitrati e ammoniaca, della carica fecale e inoltre l'osservazione microscopica del fango in vasca di ossidazione. A completamento dell'indagine sono stati pure raccolti i dati riguardanti lo schema essenziale del processo depurativo.

Nella presente relazione verranno esposti esclusivamente i risultati relativi al saggio di tossicità o ad esso attinenti, e verranno tralasciate altre considerazioni scaturite dall'indagine, relative al livello di efficienza e funzionalità depurativa presenti nel territorio indagato.

## 9.2 Materiali e metodi

### 9.2.1 Campionamento

Uno degli scopi dell'indagine era quello di realizzare in un tempo breve (5 mesi), e con risorse limitate, un quadro completo dello stato di fatto in materia di depurazione delle acque in provincia di Pavia. Perciò si è rinunciato al campionamento del liquame in ingresso all'impianto, che avrebbe di fatto raddoppiato la mole di lavoro e prodotto dati poco attendibili, in quanto tutti i nostri campionamenti non potevano essere che istantanei. Il prelievo istantaneo del liquame in uscita, viceversa, non induce in grossi errori, poiché l'impianto si comporta come un elemento sufficientemente equalizzatore. Ad ogni impianto

sono stati effettuati diversi tipi di campionamento, funzionali alle diverse determinazioni da eseguire.

Un litro di effluente in bottiglia di vetro era prelevato per la determinazione del COD del surnatante (senza agitazione) e del COD globale (dopo risospensione); sul surnatante (prima dell'agitazione) veniva pure prelevata l'aliquota necessaria per la determinazione dei coliformi fecali, dei nitrati e dell'ammoniaca.

Dal momento che i nitriti sono una specie chimica destinata a variare nel tempo in presenza di eventuali tracce di fango biologico, la loro determinazione era eseguita su un campione (20 mL in una provetta) filtrato presso l'impianto con un filtro da siringa con porosità di  $0,45 \mu\text{m}$ . Era infine prelevata dalla vasca di ossidazione e posta in una bottiglia di vetro da 200 mL un'aliquota (50 mL) di fango biologico: su tale campione era effettuata l'osservazione microscopica del fango e l'osservazione microscopica del fiocco e della microfauna.

### 9.2.2 Metodiche analitiche

Le metodiche analitiche per le determinazioni di N-nitroso, N-nitrico, ammoniaca e COD sono quelle ufficiali di riferimento. La determinazione dei coliformi fecali è stata effettuata per filtrazione su membrana di campioni diluiti (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) con successiva conta delle colonie dopo incubazione per 24 ore a  $44^\circ\text{C}$  su terreno m F.C. Broth.

Il saggio di tossicità con *Daphnia magna* è stato eseguito secondo la metodica proposta dall'IRSA (Marchetti e Viganò, 1990). Al fine di verificare la qualità dell'allevamento (qualità dell'acqua e qualità dell'alimentazione e della stabulazione) sono stati effettuati alcuni saggi di prova utilizzando una sostanza pura di riferimento. È stato scelto, quale sostanza di riferimento, il bicromato di potassio, sia perché esso è stato proposto dall'IRSA per il test di intercalibrazione, sia perché esistono in letteratura numerosi dati sperimentali relativi a questo composto.

Il programma di calcolo utilizzato per l'elaborazione dei risultati del saggio di tossicità è quello proposto dall'IRSA (Puddu, 1989). I valori di  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  e i limiti fiduciali inferiore e superiore dell' $EC_{50}$  sono espressi come  $\mu\text{g/L}$  di cromo. I risultati ottenuti dalle diverse repliche in tempi diversi sono riassunti in Tab. 9.1.

Oltre al saggio di tossicità così come indicato nella proposta IRSA, che prevede lo svolgimento

Tab. 9.1

Valori di tossicità ottenuti con diversi saggi condotti con bicromato di potassio (le concentrazioni di tossico sono espresse come  $\mu\text{g/L}$  di Cromo, il tempo di esposizione era di 24 ore)

Replica	Data	EC <sub>1</sub>	EC <sub>50</sub>	Limite fiduciale EC <sub>50</sub> (95%)	
				infer.	super.
1	11/04/90	164	460	403	558
2	19/04/90	90	539	439	862
3	19/11/90	234	452	415	498
4	29/11/90	265	532	484	611
5	5/12/90	251	398	371	426

del test per un periodo di 24 ore diluendo lo scarico con acqua standard, in rapporto 1:1, è stata anche valutata la possibilità di operare sull'effluente non diluito e di protrarre la durata del test a 48 ore. Il fatto di prolungare la durata del tempo di esposizione ai tossici aumenta, com'è prevedibile, la sensibilità del saggio di tossicità. Infatti, se il nostro valore medio di EC<sub>50</sub> del bicromato di potassio per 24 ore di contatto è di 476  $\mu\text{g/L}$  espresso come cromo, prolungando l'esposizione a 48 ore, questo valore (48hEC<sub>50</sub>) si abbassa al valore medio di 261  $\mu\text{g/L}$  di cromo. Protrarre la durata del saggio, per quanto ci è stato dato di osservare, non compromette l'integrità dell'organismo test.

Infatti, sono stati attuati numerosi saggi di controllo, esponendo i dafnidi in acqua standard sia durante lo svolgimento dei saggi con bicromato sia durante lo svolgimento del lavoro vero e proprio: è emerso che, tanto con permanenza a digiuno per 24 ore, quanto prolungando tale periodo a 48 ore, la percentuale di mortalità degli individui utilizzati come controllo si manteneva sempre inferiore allo 0,5%.

Il saggio di tossicità sugli effluenti dei depuratori civili della provincia di Pavia è stato quindi svolto, per ottenere la massima quantità di informazioni, esponendo l'organismo test allo scarico tal quale con osservazione dell'immobilità a 24 e 48 ore, e inoltre diluendo lo scarico in rapporto 1:1 con acqua standard, sempre con osservazione degli immobili a 24 e 48 ore.

### 9.3 Risultati della ricerca

Nell'ambito della ricerca da noi condotta sono stati censiti 96 impianti di depurazione biologica a fanghi attivi. Le tipologie impiantistiche pre-

senti sono molto varie: la maggioranza degli impianti è di dimensioni medio-piccole e prevede l'aereazione prolungata, consentendo pertanto la nitrificazione. Altri impianti di grosse dimensioni prevedono solo la rimozione del carbonio organico; altri, in numero modesto, sono stati progettati per essere anche denitrificanti e dispongono quindi del comparto di pre-denitrificazione a ossica; sono pure rappresentati, anche se in misura limitata, impianti a biomassa adesa costituiti esclusivamente da biosidichi.

Alcuni di questi impianti, all'epoca dell'indagine, non erano in esercizio a causa di avarie tecniche più o meno gravi, per tale ragione la parte sperimentale del lavoro ha riguardato solo quelli funzionanti, che sono risultati così ridotti al numero di 84. Al fine di rendere più sintetica l'esposizione dei dati, vengono di seguito confrontati i risultati ottenuti per ogni singolo parametro con i valori limite previsti nella Tabella A della legge 319/76.

**COD:** il limite di 160 mg/L di O<sub>2</sub> previsto per il COD è superato in 10 casi (12%), se si effettua la misura sull'effluente globale, includendo quindi anche il fango che fuoriesce dal sedimentatore secondario; il numero dei casi si riduce a 4 (5%), se la misura del COD viene effettuata sull'effluente dopo sedimentazione in bottiglia. Il fatto di differenziare queste due misurazioni di COD ha permesso di porre in evidenza, sia per impianti che superavano il limite ammesso, sia per impianti che invece non superavano mai tale limite, che molto spesso un cattivo funzionamento del sedimentatore secondario oppure dei fenomeni persistenti di bulking compromettono gravemente il rendimento complessivo di un impianto di depurazione.

**Nitriti:** il limite dei nitriti nell'effluente è fissato in 0,6 mg/L espressi come N-nitroso. I casi in cui questo limite è stato superato ammontano a 21 (25%). In genere il superamento del limite dei nitriti è associato a valori di COD medi, cioè compresi tra 80 e 40 mg/L di O<sub>2</sub>: in tali condizioni si può ipotizzare che il processo di nitrificazione o è iniziale o risulta comunque instabile, per cui è possibile una presenza di nitriti nell'effluente.

**Nitrati:** il limite di N-nitrico, fissato in 20 mg/L, è superato in 11 casi (13%), e tuttavia si tratta di impianti funzionanti al meglio delle loro possibilità: i loro valori di COD sono sempre inferiori a 40 mg/L di O<sub>2</sub>. Il superamento del limite di



N-nitrico è dovuto alla notevole presenza di azoto nell'influente e, per rientrare nei limiti di legge, la quota parte di questo nutriente che viene sottratta all'affluente tramite l'incorporazione nella biomassa del fango attivo non risulta dunque sufficiente.

**Ammoniaca:** il valore limite di ammoniaca di 15 mg/L è superato in 20 casi (24%). In alcuni di questi casi si tratta di impianti progettati per la sola rimozione del carbonio organico: l'età del fango è quindi bassa, e tali impianti non sono perciò in grado di rimuovere concentrazioni di ammoniaca superiori a quelle che possono essere incorporate nella biomassa dei fanghi biologici. In altri casi il superamento del limite è dovuto ad impianti sovraccarichi o scarsamente efficienti: ciò è confermato dalla frequente presenza negli stessi impianti di valori di COD superiori a 80 mg/L di O<sub>2</sub>.

**Coliformi fecali:** il limite fissato per i coliformi fecali è di 120 ufc/mL, seguito dalla nota «tale limite si applica quando, a discrezione dell'Autorità competente per il loro controllo, lo richiedano gli usi concomitanti del corpo idrico recettore». Con queste premesse è evidente che non si tratta di un limite imperativo o frequentemente imposto, tanto che è raro che questo parametro venga determinato sulle acque di scarico. Prendendo comunque come riferimento il limite di 120 ufc/mL di coliformi fecali, ben 68 casi (81%) risultano superiori al limite. Risultano inferiori soltanto 16 effluenti (19%): si tratta di impianti che funzionano decisamente bene, con valori di COD molto bassi, inferiori ai 30 mg/L di O<sub>2</sub>. A questo proposito occorre dire tuttavia che valori molto bassi di COD non consentono automaticamente di rientrare nei limiti, e dunque, come si è potuto osservare, una bassa concentrazione di sostanza organica nell'effluente è condizione essenziale, ma non sufficiente per avere una presenza di coliformi fecali inferiore a 120 ufc/mL. Il valore medio di coliformi fecali riscontrato, considerando tutti i casi esaminati, è di 35.000 ufc/mL: questo solo numero basta a farci capire quanto questo parametro vari di diversi ordini di grandezza, se, da un impianto ben funzionante si passa a considerarne uno scarsamente efficiente.

**Saggio di tossicità:** com'è precisato nel metodo IRSA, l'adozione del saggio con *Daphnia magna* apporterà minime modifiche alle indicazioni operative che compaiono nella legge: «Il campione

diluito 1:1 con acqua standard deve permettere la motilità di almeno il 50% degli animali usati per il saggio per un periodo di 24 ore a 20 °C di temperatura».

Applicando questo limite al saggio di tossicità, si è potuto osservare che solo gli effluenti seguenti, provenienti da due impianti, hanno mostrato una motilità inferiore:

**A) Motilità 40%:** si tratta di un refluo proveniente da un impianto solo parzialmente realizzato, attualmente costituito da un sedimentatore primario e da un digestore fanghi anaerobico. Il liquame, non eccessivamente concentrato (COD 106 mg/L, ammoniaca 3,2 mg/L), proviene in buona parte da un'area industriale.

**B) Motilità 40%:** si tratta di un refluo proveniente da un impianto assolutamente non funzionante (COD 271 mg/L, ammoniaca 36 mg/L), con bacino d'utenza misto civile e industriale (piccoli insediamenti). Protraendo il saggio a 48 ore si aggiungono altri due casi C, B ai primi due.

**C) Motilità 10%:** si tratta di un refluo proveniente da un impianto all'apparenza ben funzionante (COD 46 mg/L, ammoniaca 12 mg/L), in cui l'unico dato anomalo è la concentrazione dei nitriti, equivalente a 5,25 mg/L. Il bacino d'utenza di questo impianto è prettamente civile.

**D) Motilità 0%:** si tratta di un impianto sovraccarico e non funzionante (COD 700 mg/L, ammoniaca 10 mg/L). Il suo bacino d'utenza è prevalentemente civile. Ponendo invece il limite di accettabilità anziché sul campione diluito 1:1, sul campione tal quale, si è osservato che, per esposizioni a 24 ore, sono confermati essere fuori dal limite con motilità inferiore al 50% i casi A, B, D, mentre il caso C mostra una motilità del 90%. Ai casi A, B, D si vanno inoltre ad aggiungere, in queste condizioni, altri 3 casi E, F, G.

**E) Motilità 0%:** si tratta di un refluo di un impianto nitrificante e denitrificante in apparenza di sufficiente qualità (COD 60 mg/L, ammoniaca 4,4 mg/L), in cui l'unico parametro chimico fuori dal limite sono i nitriti con 1,1 mg/L. Il bacino d'utenza è costituito da una stazione termale con acque salso-bromo-iodiche.

**F) Motilità 40%:** si tratta di un refluo proveniente da un biodisco. Il bacino d'utenza è misto, civile e industriale, e le caratteristiche chimiche salienti dell'effluente sono: COD 140 mg/L e ammoniaca 45 mg/L.

**G) Motilità 40%:** si tratta di un refluo con le seguenti caratteristiche: COD 150 mg/L e ammoniaca 20 mg/L; nitriti e nitrati non dosabili. Protraendo il saggio di tossicità con liquame non



diluito a 48 ore (nelle condizioni quindi più restrittive), viene confermata una motilità inferiore al 50% per i casi A, B, C, D, E, F, G e tre nuovi casi H, I, L vanno ad aggiungersi ai precedenti.

H) **Motilità 20%:** si tratta di un refluo di un impianto scarsamente efficiente (COD 130 mg/L, ammoniaca 24,5 mg/L, nitriti e nitrati nei limiti). Il bacino d'utenza è prevalentemente civile.

I) **Motilità 10%:** si tratta come sopra del refluo di un impianto scarsamente efficiente (COD 140 mg/L, ammoniaca 20 mg/L, nitriti e nitrati inferiori ai limiti).

L) **Motilità 20%:** si tratta del refluo di un impianto nitrificante e denitrificante con funzionamento molto efficiente (COD 65 mg/L, nitriti non dosabili, nitrati 1,08 mg/L e ammoniaca 0,03 mg/L). Il bacino d'utenza è misto, con un pesante apporto industriale; il refluo produttivo subisce un trattamento chimico-fisico prima di essere inviato al depuratore biologico.

In tabella 9.2 vengono riportati in forma aggregata i dati fin qui esposti: da essi risulta evidente come, protraendo il saggio a 48 ore e operando sul refluo tal quale, si può individuare un maggior numero di effluenti in grado di determinare una motilità degli organismi test inferiore al 50%. In tabella 9.3 sono riportati per esteso i risultati ottenuti con i 10 effluenti (casi A-L), in cui in almeno una delle modalità di conduzione del test si sia verificata una motilità degli organismi inferiore al 50%. In tabella 9.4 sono riportati i risultati della tossicità nelle diverse modalità di conduzione del saggio per tutti i reflui che non hanno in alcun caso determinato una motilità inferiore al 50%.

Nel caso invece che, oltre alla sostituzione dell'organismo usato per il saggio, fossero riformulate anche le condizioni operative indicate dalla legge, come ad esempio nel modo seguente: «il campione tal quale deve permettere la motilità di almeno il 90% degli animali usati per il saggio per un periodo di 24 ore a 20 °C di temperatura», il limite verrebbe superato dagli effluenti di ben 14 impianti su un totale di 84 esaminati (16%). Protraendo il tempo di esposizione a 48 ore e mantenendo sempre la soglia di motilità al 90%, gli effluenti con una tossicità superiore a questo limite sarebbero 19 (23%). Come ultima informazione occorre dire che un numeroso gruppo di reflui da noi esaminato (65 casi) non ha determinato alcuna immobilità, nemmeno nelle condizioni più restrittive per lo svolgimento del saggio (relative cioè al campione tal quale per un'esposi-

Tab. 9.2

Casi in cui si verifica una motilità inferiore al 50% degli organismi esposti nelle diverse modalità di conduzione del saggio

Modalità del saggio	Casi	N° casi
dil. 1:1 per 24 ore	A, B	2
dil. 1:1 per 48 ore	A, B, C, D	4
tal quale per 24 ore	A, B, D, E, F, G	6
tal quale per 48 ore	A, B, C, D, E, F, G, H, I, L	10

Tab. 9.3

Rappresentazione per esteso dei risultati ottenuti per i dieci reflui (casi A-L), in cui in almeno una delle modalità di conduzione del saggio si sia verificata una motilità degli organismi inferiore al 50%

Casi	Modalità del saggio (motilità %)			
	dil 1:1 24h	dil 1:1 48h	t.q. 24h	t.q. 48h
A	40	35	0	0
B	40	0	0	0
C	100	10	90	10
D	60	0	50	0
E	100	80	0	0
F	100	100	40	20
G	100	100	40	0
H	80	80	50	20
I	100	100	80	10
L	100	70	70	20

Tab. 9.4

Esposizione dei risultati di tossicità ottenuti nelle diverse modalità di conduzione del saggio per i reflui che non hanno mai determinato una motilità inferiore al 50%

Casi	Modalità del saggio (motilità %)			
	dil 1:1 24h	dil 1:1 48h	t.q. 24h	t.q. 48h
M	80	80	70	70
N	100	70	90	60
O	100	100	90	90
P	100	100	100	70
Q	100	100	90	90
R	100	100	100	90
S	100	100	100	90
T	100	100	100	80
U	100	100	100	60

zione di 48 ore). Sono compresi in quest'ultimo gruppo reflui provenienti da impianti ben funzionanti, ma altresì reflui di qualità scadente, che presentano valori di COD anche superiori a 160 mg/L, nitriti superiori a 5 mg/L, nitrati superiori a 70 mg/L e ammoniaca superiore a 60 mg/L. Da ciò si può dedurre che nessuno, da solo, dei parametri chimici da noi determinato è correlabile in modo diretto e univoco con il risultato del saggio di tossicità. Forse il dato più correlabile con la tossicità può essere la presenza nel refluo di scarichi di origine industriale. Il saggio di tossicità appare quindi come un risultato autonomo, frutto di molteplici interazioni, impossibile da valutare per altra via.

#### 9.4 Conclusioni

Dall'indagine sperimentale da noi condotta è emerso che il 12% degli impianti esaminati supera il valore ammissibile per il COD, ma questa percentuale scende al 5% se il valore del COD è determinato sul surnatante; i valori limite per i nitriti, nitrati e ammoniaca sono invece superati rispettivamente nel 25%, 13% e 24% dei casi. Soltanto il 42% degli impianti esaminati rientra nei limiti per tutti questi quattro parametri; mentre il restante 58% supera, per uno o più parametri, i valori limite fissati. Il valore limite fissato per la contaminazione microbiologica da coliformi fecali, il quale peraltro non è tassativo, è superato nell'81% dei casi e, se si include anche questo parametro con gli altri già considerati, la percentuale di impianti con tutti i parametri dell'effluente inferiori ai limiti si riduce al 10%.

Se i risultati del saggio di tossicità venissero interpretati in modo analogo a quanto è già contenuto attualmente nella legge 319/76, sostituendo soltanto l'organismo test trota con l'organismo test *Daphnia magna*, sarebbero da considerare non rispondenti soltanto due (2,4%) reflui esaminati nella nostra indagine; se poi il tempo di durata del saggio fosse, in sede normativa, protratto a 48 ore, i reflui non rispondenti ammonterebbero a quattro (4,8%); se il saggio fosse previsto sul campione non diluito a 24 o a 48 ore, gli effluenti non rispondenti diventerebbero rispettivamente 6 (7%) e 10 (12%); se infine l'effetto osservato non fosse la motilità del 50% ma la motilità del 90%, per un tempo di esposizione di 24 o di 48 ore, i reflui non rispondenti diventerebbero rispettivamente 14 (16%) e 19 (23%).

Alla luce di quanto osservato, e tenuto conto che il saggio di tossicità dovrà essere applicato

principalmente agli scarichi degli insediamenti industriali, che presumibilmente potrebbero essere più problematici, appare equilibrato attenersi alle indicazioni operative della legge vigente. Ciò non esclude che si possa condurre il saggio anche in condizioni operative più restrittive, evitando cioè la diluizione e prolungando i tempi della prova, così da ricavarne le massime informazioni. Con le attuali norme per la conduzione del saggio proposte dall'IRSA si dispone di una metodica affidabile, ampiamente sperimentata, chiara e dettagliata, sia nell'allevamento degli organismi, sia nello svolgimento del saggio. La maggior parte dei limiti che finora hanno gravemente compromesso la diffusione del saggio di tossicità sono stati rimossi; non resta ora che attendere di poter valutare il ruolo che questo parametro, finora negletto, sarà in grado di svolgere nel determinare un miglior livello di protezione delle acque di superficie.

#### 9.5 Bibliografia

Marchetti R. e Viganò L., 1990. Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna*.  
*Relazione non pubblicata.*

Puddu A., 1989. Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei Probits.  
*Notiziario Metodi Analitici per le Acque*, 9 (2): 19-37.

Viganò L., Marchetti R. e Puddu A., 1987. Saggio di tossicità. In: Atti del Convegno "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque, dieci anni di esperienza".  
*Quad. Ist. Ric. Acque*, 75: 513-524.

Amodei M.	PMIP, USSL 75/III	Milano
Andreatta A.	Università	Venezia
Anversa A.	Regione Lombardia	Milano
Ardemagni A.	Università	Milano
Arlati G.	Regione Lombardia	Milano
Armitano A.	PMIP, USSL 1	Torino
Azzoni R.	PMIP, USSL 75/III	Milano
Baldaccini G.N.	PMIP, USSL 3 Versilia	Viareggio
Baldassarre L.	AGSM	Verona
Balestrini R.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Barbaro A.	PMIP, USSL 30	Siena
Bartoli N.	EM, LMI Centro Ricerche	Fornaci di Barga (LU)
Baudo R.	CNR, Istituto Italiano di Idrobiologia	Verbania (NO)
Beati P.	PMIP, USSL 51	Cremona
Beccai G.	PMIP, USSL 3	Varese
Benedetti P.	Consorzio Acquedotto Basso Ferrarese	Codigoro (FE)
Berardi D.	PMIP, USSL 2	Piacenza
Berri A.	PMIP, USSL 77	Pavia
Bianco P.A.	CNR, CS Miglioramento Coltivazioni Agrarie	Milano
Biggio M.C.	Centro Ricerca Acque	Pavia
Blundo M.C.	CNR, IRSA	Roma
Bogani M.	Provincia	Milano
Bonalberti L.	PMIP, USSL 31	Ferrara
Borghini B.	PMIP, USSL 2	Massa
Borgi E.	Azienda Acquedotto	Moncalieri (TO)
Bovolenta M.	PMIP, USSL 31	Ferrara
Brink E.	G. Brink & C.	Milano
Brugnara M.	Coop. Ecologica Trentina	Trento
Buttino I.	CNR, Ist. Talassografico	Taranto
Cadonici R.	S.I.D.I. Srl	Parma
Calvi A.	TS	Milano
Camerini G.		Bastida Pancarana (PV)
Cameroni L.	Cons. Prov. del Magentino	Milano
Camusso M.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Cannavà C.	PMIP, USSL	Vicenza
Cardente R.	Instrumatic	Pero (MI)
Cardinaletti M.	SO.GE:I:VE. SpA	Venezia
Carlini E.	PMIP, USSL 12	Genova
Casarini P.	PMIP, USSL 77	Pavia
Cavalieri M.	Acea	Roma
Ceol A.	PMIP, USSL	Aosta
Chierici S.	Regione Lombardia	Milano
Colombo S.	Via D'Azeglio 13	Monza (MI)
Consolaro S.	PMIP, USSL 25	Verona
Corsini A.	PMIP, USSL 8	Pistoia
Cozzi R.	G. Brink & C.	Milano
Dal Lago A.	Ecologia Applicata	Milano
Dal Miglio A.	PMIP, USSL 41	Brescia
De Bernardi R.	CNR, Istituto Italiano di Idrobiologia	Verbania (NO)
De Frè A.	Università	Milano
De Marco N.	PMIP, USSL	Pordenone
De Paolis A.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Del Greco D.	PMIP, USSL	Parma
Di Iorio C.	Agip SpA	S. Donato (MI)
Egeste R.	Enel DCO	Piacenza
Facchini S.		Piacenza
Fagetti G.	PMIP, USSL 31	Ferrara
Falzetti S.	Chemilab Studio Associato	Chiavari (GE)
Falzoni R.	PMIP, USSL 9	Reggio Emilia
Fantuzzi M.	PMIP, USSL 9	Reggio Emilia
Felicori M.	PMIP, USSL 28	Bologna
Ferrari A.	PMIP, USSL	Milano
Ferrari M.	PMIP, USSL 16	Modena
Ferrari M.C.	Laboratorio Chimico Provinciale	Trento
Ferrari P.	PMIP, USSL	Milano Brescia
Ferraro M.	Agip SpA	S. Donato (MI)
Ferrè P.	PMIP, USSL 72	Magenta (MI)
Filosofo T.		Thiene (VI)
Fontana G.	PMIP, USSL 2	Piacenza
Fontani N.	AGAC	Reggio Emilia
Fornasiero M.G.	PMIP, USSL 6	S. Daniele del Friuli (UD)
Foschi A.	PMIP, USSL 75/III	Milano
Francalanci C.	PMIP, USSL 23	Arezzo
Galassi L.	PMIP, USSL 47	Mantova
Galiano S.	PMIP, USSL 12	Genova



Gallus M.	A.A.ID	Milano
Garizio M.	Azienda Acquedotto	Moncalieri (TO)
Garofalo E.	CISE	Milano
Gasparo D.	Scrl ECOTHEMA	Trieste
Gentile S.	T.S.T SpA	Galliate (NO)
Geppi G.		Milano
Gorbi G.	Università	Parma
Gozio E.	PMIP, USSL 51	Cremona
Guzzella L.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
La Noce T.	CNR, IRSA	Roma
Leoncini F.	3M Italia SpA	Ferrania (SV)
Longhi A.	Politecnico	Milano
Lulli G.	ACEA	Roma
Mafessoni V.	PMIP, USSL 22	Sondrio
Maierna M.	PMIP, USSL	Oggiono (CO)
Manfredi E.	Università	Parma
Mantarro C.C.	Ordine dei Chimici	Roma
Manzini P.	CISBA	Reggio Emilia
Manzoni O.	Laboratorio Chimico Provinciale	Trento
Marchetti R.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Margini C.	PMIP, USSL 75/III	Milano
Marri S.	PMIP, USSL 23	Imola (BO)
Martella G.	PMIP, USSL 11	Pescara
Martin M.	PMIP, USSL	Pordenone
Massoni E.	PMIP, USSL	Genova
Mazziotti C.		Milano
Mei G.	EM, LMI Centro Ricerche	Fornaci di Barga (LU)
Merloni R.	PMIP, USSL 39	Cesena (FO)
Miana P.	ASPIV, Acquedotto	Venezia
Mignacca A.	PMIP, USSL 40	Pinerolo (TO)
Minelli L.	ACOSER	Sasso Marconi (BO)
Mingazzini M.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Minuto A.	PMIP, USSL 31	Ferrara
Molinari M.	Istituto per l'ambiente	Milano
Monicelli F.	PMIP, USSL	Varese
Morelli A.	ACEA	Roma
Morgagni E.	PMIP, USSL 35	Ravenna
Moroni F.	Indeco	Parma
Morosi A.	PMIP, USSL 3	Perugia
Olori L.	Istituto Superiore Sanità	Roma
Pagliaretta G.	Eco Control Lab.	Porto S. Giorgio (AP)
Passino R.	CNR, IRSA	Roma
Pedrelli C.	PMIP, USSL 4	Parma
Pereira A.	Istituto per l'Ambiente	Milano
Perini V.	Aquaprogram	Vicenza
Peroni A.	Agip SpA	S. Donato (MI)
Piccioli B.	RBM	Colleterto Giacosa (TO)
Porta C.	Politecnico	Milano
Previtali L.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Ramponi S.		Pioltello (MI)
Ranzani M.	Azienda pro Sangone	Torino
Remondi L.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Riggio L.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Roati C.	PMIP, USSL 76	Conzano (AL)
Rodari E.	CCR Euratom	Ispra (VA)
Romairone V.	CNR Ist. Corrosione Marina Metalli	Genova
Rongoroni P.	Università	Milano
Rossi D.	CCR EURATOM	Ispra (VA)
Rossi M.C.	Istituto Professionale	Mantova
Rossini P.	Università	Segrate (MI)
Saccani M.	AGAC	REggio Emilia
Salviati S.	St. Aquaprogram	Vicenza
Sanfilippo F.C.	Fondazione Damanhur	Baldissero Canavese (TO)
Sarcilla A.	PMIP, USSL 29	Bergamo
Sarno L.E.	A.M.S.A.	Milano
Scaglia E.	Ecologia Applicata Srl	Milano
Scotto S.	Università	Bergamo
Silvestri S.	Istituto Agrario	S. Michele all'Adige (TN)
Simonetto R.	S.A.R. snl	Verona
Simoni F.	PMIP, USSL 6	Lucca
Spaggiari R.	PMIP, USSL 9	Reggio Emilia
Tartaglino L.	PMIP, USSL 40	Ivrea (TO)
Tosini L.	Ecologia Applicata	Milano
Trovarelli L.	AGIP SpA	S. Donato (MI)
Truffi L.	PMIP, USSL 12	Genova
Vaini F.A.		Milano
Valsecchi S.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Venturi L.	PMIP, USSL 19	Vignola (MO)
Verniani M.R.	PMIP, USSL 31	Ferrara
Veronesi Y.	PMIP, USSL 9	Reggio Emilia
Vicardi C.	Azienda Municipale Srevizi Ambientali	Milano
Viganò L.	CNR, IRSA	Brugherio (MI)
Volpi Ghirardini A.	Università	Venezia
Zorzi G.	Istituto Agrario	S. Michele all'Adige (TN)







Supplemento al n. 10 anno XX del periodico mensile "La Provincia di Reggio Emilia"  
Spedizione in abbonamento postale - gruppo III, 70%  
Autorizzazione Tribunale di Reggio Emilia n. 175 del 25.1.1965