

METODI ECOTOSSICOLOGICI CON ALGHE, CROSTACEI E PESCI

**TEST DI TOSSICITÀ ACUTA CON TOSSICO DI RIFERIMENTO E MESSA A
PUNTO DEL TEST DEL MICRONUCLEO SU CELLULE BRANCHIALI DI
*DICENTRARCHUS LABRAX***

Dr. Alessandro Criscoli

Tutor: Dr.ssa Stefania Balzamo

INDICE

1. INTRODUZIONE	
1.1 Cenni di ecotossicologia	pag. 3
1.1.1 Inquinamento negli ambienti acquatici	pag. 4
1.2 Misura della tossicità in acqua	pag. 6
1.3 Fattori in grado di modificare l'azione tossica di una sostanza	pag. 7
1.3.1 Fattori biotici	pag. 7
1.3.2 Fattori abiotici	pag. 8
1.4 Descrizione dei principali test ecotossicologici	pag. 9
1.4.1 Test di tossicità acuta	pag. 10
1.4.2 Test di tossicità cronica	pag. 11
1.4.3 Test del micronucleo	pag. 12
2. METODOLOGIA	
2.1 Sostanze utilizzate nei test ecotossicologici	pag. 14
2.1.1 Sodio dodecil solfato (SDS)	pag. 14
2.1.2 Ciclofosfamide	pag. 14
2.2 Biologia di <i>Dicentrarchus labrax</i>	pag. 15
2.3 Mantenimento di <i>Dicentrarchus labrax</i> nelle vasche di allevamento	pag. 17
2.4 Test <i>preliminare</i> (48 h) di tossicità <i>acuta</i> con SDS	pag. 19
2.5 Test <i>definitivo</i> (48 h) di tossicità <i>acuta</i> con SDS	pag. 23
2.6 Test di <i>genotossicità</i> (72 h) con ciclofosfamide	pag. 27
3. RISULTATI	
3.1 Test <i>preliminare</i> (48 h) di tossicità <i>acuta</i> con SDS	pag. 32
3.2 Test <i>definitivo</i> (48 h) di tossicità <i>acuta</i> con SDS	pag. 33
3.3 Messa a punto del test del micronucleo sulle cellule branchiali	pag. 35
4. CONCLUSIONI	pag. 37

5.	BIBLIOGRAFIA	pag. 38
6.	ALLEGATO 1	pag. 41
7.	ALLEGATO 2	pag. 42

INTRODUZIONE

1.1 Cenni di ecotossicologia

L'ecotossicologia è la scienza che studia gli effetti nocivi che determinate sostanze provocano all'ambiente e, in particolare, agli organismi viventi. Questi composti generalmente sono classificati in due categorie:

- 1) “macroinquinanti”, sostanze normalmente presenti sul nostro pianeta, ma che diventano tossiche per gli organismi quando, soprattutto a causa delle attività umane, superano una determinata concentrazione soglia (es. nutrienti come nitrati, fosfati ed elementi indispensabili a basse concentrazioni per gli organismi come sodio, potassio, calcio);
- 2) “microinquinanti”, elementi o composti presenti normalmente a concentrazioni molto basse. I metalli pesanti e gli idrocarburi alifatici e aromatici rappresentano un esempio di “microinquinanti” naturali la cui disponibilità viene alterata dalle attività antropiche di estrazione di questi composti dal comparto in cui si trovano (litosfera)¹.

Un gruppo di sostanze ad elevata tossicità per gli esseri viventi è rappresentato dalle molecole di sintesi (composti xenobiotici) prodotte essenzialmente dalle attività antropiche di tipo industriale (es. pesticidi) e che risultano dannose già a concentrazioni molto basse in quanto “estrane” agli organismi.

Per adeguarsi alle direttive europee l'Italia, il 3 febbraio 1997, ha emanato il decreto legislativo n. 52² che definiva come *pericolosi* “quelle sostanze e preparati che in caso di diffusione nell'ambiente possano arrecare danno immediato o differito nel tempo ad una o più delle componenti ambientali di un ecosistema”. In base a questa definizione sono molti i prodotti chimici che possono essere classificati come potenzialmente tossici se concentrazioni e dosi risultano sufficientemente elevate. Le interazioni di tali sostanze con le componenti biotiche e l'ambiente abiotico provocano gravi danni a diverse specie come è stato più volte documentato nel recente passato³ (es. le popolazioni di molti uccelli predatori sono state quasi completamente sterminate dall'azione di insetticidi come il DDT che, per la loro capacità di accumularsi lungo la catena alimentare, hanno interferito con il processo di formazione delle uova rendendole così più fragili) andando a modificare, se non a stravolgere quelli che sono i delicati equilibri di un ecosistema.

¹ Rapporto APAT – 32/2005, p. 13.

² Art 2.2, D. Lgs. 3/2/1997, n. 52.

³ Odum – 1988, p. 125.

1.1.1 Inquinamento negli ambienti acquatici

L'inquinamento è definito come l'immissione o il prelievo nell'ambiente di materia e/o energia tali da provocare un'alterazione persistente e a volte irreversibile delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche dell'ecosistema⁴. Questo processo può essere anche di origine naturale (es. eruzioni vulcaniche, alluvioni ecc.), ma è generalmente causato dalle attività antropiche che rappresentano una minaccia sempre più grande per gli ambienti acquatici e le rispettive componenti biotiche.

Le fonti principali di inquinamento sono costituite dall'immissione nelle acque superficiali o sotterranee di reflui urbani, agricoli ed industriali. Le sostanze riversate in questi ambienti possono essere di natura organica (es. solventi, idrocarburi, pesticidi) ed inorganica (es. metalli pesanti) e possono produrre effetti più o meno gravi in funzione della loro concentrazione, attività chimica e capacità di interazione con le funzioni biologiche degli organismi.

Altre gravi forme di alterazione di un ecosistema acquatico sono: l'inquinamento termico, causato dagli scarichi a temperature elevate delle centrali termoelettriche, e l'inquinamento legato alle precipitazioni atmosferiche (deposizioni secche e umide) che talvolta possono arrecare danni molto gravi all'intero ecosistema acquatico (es. acidificazione dei laghi del Nord Europa).

Gli ambienti marini, soprattutto lungo la fascia costiera, risentono direttamente o indirettamente delle attività antropiche giungendo così a contatto con ogni tipologia di inquinante⁵. Una forma di inquinamento particolarmente diffusa nelle acque marine costiere, dove la popolazione umana è abbondante e gli scarichi a mare non sono adeguatamente trattati, è rappresentata dal fenomeno dell'eutrofizzazione provocato dal massiccio apporto di nutrienti (nitrati e fosfati). Questo fenomeno causa a sua volta lo sviluppo abnorme di determinate forme algali (alghe verdi, come *Ulva spp.*, *Enteromorpha spp.*, diatomee o fitoflagellati) con il conseguente stravolgimento degli equilibri ecosistemici e la scomparsa di molte specie. Inoltre, nelle zone poco profonde in cui il ricambio idrico è scarso (es. lagune) e in presenza di temperature elevate (generalmente durante il periodo estivo) che limitano l'interscambio acqua-atmosfera di O₂, per la sopraggiunta impossibilità di degradare in modo completamente aerobico la grande quantità di materia organica prodotta dagli organismi appartenenti a tale sistema, si innescano dei processi di degradazione anaerobica che producono metano e acido solfidrico e provocano la morte di tutti gli organismi presenti (distrofia del sistema).

⁴ Della Croce et al. – 1997, p. 240.

⁵ Rapporto APAT – 32/2005, p. 14.

Una grave forma di inquinamento per l'ambiente marino è rappresentata dagli sversamenti accidentali o deliberati (es. lavaggio delle cisterne delle petroliere) in mare di petrolio. I primi, in particolar modo, costituiscono eventi catastrofici per gli ecosistemi marini coinvolti danneggiando sia la componente animale che quella vegetale. La comunità bentonica risulta quella più colpita in quanto la frazione più pesante del petrolio e/o la miscela formata da petrolio e disperdente, quando questa sostanza viene usata, si depositano sui fondali marini ricoprendo quindi ogni forma di vita presente. Il danno risulta di grave entità e piuttosto prolungato nel tempo poiché questa frazione viene degradata molto lentamente dall'azione batterica. Anche la componente planctonica non è immune dagli effetti tossici provocati dagli sversamenti di petrolio. Infatti, studi condotti sul fitoplancton hanno evidenziato fenomeni di interferenza degli idrocarburi con i processi di crescita, respirazione e fotosintesi. Per quanto riguarda lo zooplancton, invece, è stato rilevato come gli organismi più sensibili alla tossicità degli idrocarburi siano le larve che accusano problemi di sviluppo. Nei pesci (necton), da studi condotti in seguito all'incidente della petroliera Amoco Cadiz in Bretagna, sono state riscontrate, anche a distanze di mesi dall'incidente, elevate concentrazioni di idrocarburi a livello branchiale e negli ovari. Un incidente petrolifero si ripercuote negativamente anche sugli uccelli marini che perdono l'impermeabilità del loro piumaggio e subiscono, inoltre, gravi danni dall'ingestione diretta degli idrocarburi⁶.

Per affrontare adeguatamente i problemi posti dall'inquinamento degli ambienti acquatici la comunità europea ha emanato la Direttiva Quadro 2000/60/CE del 23 ottobre 2000 sulla tutela delle acque che prevede, tra l'altro, la riduzione e la progressiva eliminazione dell'inquinamento provocato da scarichi, emissioni e perdite di "singoli inquinanti o gruppi di inquinanti che presentano un rischio significativo per l'ambiente o attraverso di esso, compresi i rischi per le acque utilizzate per la produzione di acqua potabile".

Questa Direttiva, inoltre, presenta due elementi fondamentali:

1. introduce il concetto di "stato ecologico" che esprime la qualità della struttura e del funzionamento degli ecosistemi acquatici. Lo "stato ecologico" di un corpo idrico è classificato in funzione di tre gruppi di elementi qualitativi (biologici, idromorfologici e fisico-chimici);
2. individua le sostanze prioritarie (P) che sono definite come composti che mostrano un rischio significativo per l'ambiente acquatico o tramite esso. Tra queste sostanze

⁶ Della Croce et al. – 1997, p. 274.

sono, inoltre, state individuate alcune, definite sostanze pericolose prioritarie (PP), che possiedono le caratteristiche di persistenza e bioaccumulabilità.

“Nel nostro ordinamento le sostanze pericolose ai fini della tutela delle acque superficiali dall’inquinamento sono quelle elencate nelle tabelle 3/A e 5 dell’Allegato 5 al Decreto Legislativo 11 maggio 1999 n. 152 e successive modifiche”⁷.

Attualmente studi approfonditi di tipo tossicologico ed ecotossicologico sono stati condotti solo per alcuni inquinanti e mancano sufficienti informazioni sulla cancerogenicità, teratogenicità e genotossicità in vivo di molti composti chimici ad alto volume di produzione.

1.2 Misura della tossicità in acqua

Il problema di individuare e valutare in modo quantitativo la presenza di composti tossici in ambienti acquatici è stato posto soltanto negli ultimi decenni. Per quanto riguarda l’Italia risale, infatti, alla normativa di legge (319/76), poi abrogata dal recente Decreto Legislativo n. 152 del 11/05/1999, la prescrizione del saggio di tossicità con i pesci per determinare l’acceptabilità degli scarichi nei corpi idrici superficiali.

Le principali motivazioni che hanno permesso l’entrata in vigore dei saggi di tossicità con organismi acquatici e che attualmente li rendono particolarmente utili possono essere ricondotte ai seguenti fattori:

- 1) determinazione della risposta biologica degli organismi acquatici a sostanze chimiche di sintesi (es. insetticidi, diserbanti ecc.);
- 2) acquisizione di nuovi dati di tossicità, cioè la necessità di disporre di dati tossicologici relativi alle sostanze prodotte dalle attività antropiche e valutare gli effetti e gli eventuali danni biologici nel tempo che il loro impiego può procurare agli ecosistemi;
- 3) stima delle potenziali interazioni tra le componenti tossiche del campione in esame e le caratteristiche chimico-fisiche naturali (es. grado di ossigenazione, temperatura, pH, salinità ecc.) dell’ambiente idrico;
- 4) impiego ottimale dei prodotti testati e individuazione della dose innocua per gli organismi in esame⁸.

La misura della tossicità in ambiente acquatico si effettua introducendo nel liquido in esame (una soluzione nota di una sostanza o un campione prelevato nell’ambiente naturale) un dato numero di organismi (generalmente pesci, ma anche invertebrati o alghe) e

⁷ Rapporto APAT – 32/2005, p. 15.

⁸ Marchetti – 1993, p. 773.

verificando se e quanto le risposte si differenziano da quelle ottenute da organismi di controllo immessi in un ambiente sicuramente privo di sostanze tossiche (bianco).

La *tossicità* è l'effetto negativo provocato da uno o più composti sull'organismo o su un sistema biologico. L'*effetto* si misura mediante la porzione di organismi che risponde al tossico rispetto al totale dei trattati (*% di incidenza*). Per *tempo di esposizione* si intende il periodo durante il quale gli organismi utilizzati per il saggio restano a contatto con il tossico. Il *livello di esposizione* corrisponde alla concentrazione del tossico in acqua.

La quantificazione del potenziale tossico di una sostanza nei sistemi acquatici è un'operazione fondamentale per valutare il pericolo correlato all'immissione della sostanza stessa nell'ambiente. Gli animali acquatici generalmente sono esposti ad un tossico in modo indiretto (contaminazione dell'acqua) per cui è nota la concentrazione di tossico in acqua piuttosto che la dose assunta dall'organismo. Per questo motivo si utilizza la relazione concentrazione/effetto che si fonda su alcune assunzioni:

- 1) si suppone che la sostanza impiegata per il test sia la causa dell'effetto osservato, occorre perciò controllare se durante l'esperimento si siano verificate trasformazioni chimiche della sostanza in esame;
- 2) si suppone che il manifestarsi della risposta osservata e la sua intensità siano funzione della concentrazione del tossico nell'acqua in cui vengono introdotti gli animali per i test.

L'individuazione della concentrazione alla quale il tossico è capace di produrre danni in animali posti in condizioni controllate comporta la replica dell'esperimento con diverse concentrazioni del tossico (mantenendo costante il tempo di esposizione) e l'osservazione, al termine del tempo stabilito, della risposta biologica in funzione delle concentrazioni utilizzate. Con questo criterio si può ricavare la **LC₅₀**, la concentrazione che provoca la morte del 50% degli organismi utilizzati per l'esperimento⁹.

1.3 Fattori in grado di modificare la tossicità di una sostanza

Nella conduzione di un test di tossicità con organismi acquatici bisogna tener conto di alcuni fattori, sia di natura biotica che abiotica, che possono influire sui risultati.

1.3.1 Fattori biotici

La scelta della specie (vedi par. 1.4) può incidere in modo determinante sulla misura della tossicità. Generalmente, per un dato tossico, si può parlare di specie sensibili (specie in cui

⁹ Marchetti – 1993, pp. 775-776.

l'attività tossica si manifesta con l'esposizione a basse concentrazioni) e specie tolleranti (specie nelle quali gli effetti compaiono solo con esposizioni ad alte concentrazioni della sostanza tossica). Una volta selezionata la specie sulla quale effettuare il test, si deve tener conto di altri fattori biologici che possono influenzarlo quali:

- 1) *acclimatazione alla sostanza tossica*. L'esposizione a concentrazioni subletali della sostanza da esaminare può, infatti, rendere gli animali più sensibili o più tolleranti alla sua azione. È necessario, quindi, verificare che gli animali selezionati non siano stati esposti in precedenza al tossico;
- 2) *stato nutrizionale* (vedi par. 1.4), la sensibilità agli agenti tossici può essere influenzata dal tipo di dieta cui sono sottoposti gli animali;
- 3) *stadio di sviluppo*. Gli stadi embrionali, larvali e giovanili mostrano, soprattutto nei test *acuti* (vedi par. 1.4 e 1.4.1), una maggiore sensibilità all'azione del tossico rispetto alla fase adulta.

1.3.2 Fattori abiotici

I fattori abiotici da considerare quando si esegue un saggio di tossicità sono legati alle caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua impiegata nei test:

- 1) *temperatura e ossigeno disciolto*. Variazioni di temperatura possono modificare la tossicità di una determinata sostanza nei confronti di una specie sia nei test *acuti* che in quelli *cronici* (vedi par. 1.4), anche se occorrono differenze marcate di temperatura (es. 10° C) per ottenere effetti misurabili. Anche le variazioni nella concentrazione di O₂ disciolto portano a cambiamenti contenuti nella tossicità di una sostanza;
- 2) *solidi sospesi e sostanze complessanti*. I solidi in sospensione possono contribuire ad abbassare la concentrazione della soluzione togliendo dalla soluzione quantità notevoli di sostanza tossica, mentre le sostanze complessanti agiscono sulla natura chimica del tossico che rimane in soluzione, ma in forma meno attiva;
- 3) *durezza* (acque dolci), *salinità* (acque marine). La variazione di questi fattori provoca effetti molto marcati nella tossicità degli ioni metallici e di altri prodotti chimici (es. la salinità altera la tossicità dei disperdenti del petrolio);
- 4) *pH*. Questo fattore può modificare in modo importante i test di tossicità poiché, in funzione della natura acida o basica e della loro costante di dissociazione, le

molecole organiche possono trasformarsi da indissociate a dissociate e viceversa. Complessi di ioni metallici possono formarsi o scindersi al variare del pH¹⁰.

1.4 Descrizione dei principali test ecotossicologici

I test ecotossicologici attualmente sono uno strumento importante per valutare la presenza di sostanze tossiche per gli ecosistemi acquatici. Il recente Decreto Legislativo n. 152 (11/05/1999) rende obbligatoria l'esecuzione del test di tossicità prevedendo l'impiego di diversi organismi indicatori ("privilegiando le specie autoctone o quelle per cui esistono protocolli standardizzati") per determinare lo stato di qualità delle acque e degli scarichi e definire gli effetti che alcuni composti chimici e altri fattori hanno sulle popolazioni che vivono in ambienti inquinati¹¹.

Il test di tossicità intende di solito evidenziare la risposta biologica in termini di sopravvivenza degli organismi sottoposti all'azione del tossico, pur non ignorando gli eventuali effetti "subletali" (vedi test del *micronucleo*) provocati dalla sostanza testata che possono fornire utili informazioni per tutelare la vita acquatica.

I fattori che influenzano un test di tossicità possono essere molteplici (vedi par. 1.3), ma l'alimentazione, se il test è condotto su animali, e la "stabilità" del tossico durante il periodo di esposizione sono quelli che più ne determinano lo svolgimento.

Gli animali acquatici, infatti, assumono le sostanze tossiche sia direttamente dal mezzo acquoso (es. attraverso l'epitelio branchiale) che attraverso l'assunzione di cibo che può avere un ruolo fondamentale per alcuni inquinanti. In questo caso per semplificare l'interpretazione dei risultati si preferisce escludere l'alimentazione dal test.

La concentrazione del tossico può ridursi (per effetto di volatilizzazione, degradazione, adsorbimento ecc.) in funzione delle sue proprietà chimiche. Se la velocità di perdita della sostanza da testare è relativamente lenta, i test possono essere condotti utilizzando sistemi *statici* o *semi-statici*.

Nei test *statici* la soluzione viene mantenuta per tutta la durata del test. Solitamente la durata è molto limitata (vedi test *acuti*) in quanto l'alimentazione resta sospesa (per evitare che il tossico possa essere assunto anche tramite cibo).

Nei test *semi-statici* la soluzione è, invece, rinnovata ad intervalli di tempo prefissati. Il rinnovo viene generalmente effettuato trasferendo gli organismi in un nuovo recipiente contenente la soluzione alla stessa concentrazione di partenza (diminuendo così i rischi di trasformazione chimica della sostanza). Al momento del rinnovo è possibile procedere

¹⁰ Marchetti – 1993, pp. 774, 798-800.

¹¹ Della Croce et al. – 1997, p. 286.

all'alimentazione degli organismi che permette il prolungamento del test oltre i limiti consentiti da un semplice test statico¹².

Nel caso in cui la sostanza da testare sia particolarmente instabile è preferibile ricorrere ai test a *flusso continuo* (la soluzione viene continuamente rimpiazzata nei recipienti per mezzo di una pompa) che offrono condizioni più realistiche in quanto gli organismi risultano esposti alle concentrazioni di tossico effettivamente preparate.

I test di tossicità possono essere classificati, in funzione del *tempo di esposizione*, in test *acuti* (breve durata) o *cronici* (lunga durata). Nessun test *cronico* può essere di tipo *statico*.

1.4.1 Test di tossicità acuta

I test di tossicità *acuta* hanno una durata pari o inferiore a 96 h e sono condotti per verificare la presunta tossicità di effluenti o sostanze tossiche a rapida azione. I test *acuti* possono essere di tipo *statico* (senza ricambio della soluzione) o *semi-statico* (con rinnovo della soluzione in tempi prefissati). Un test di tossicità acuta è generalmente preceduto da un test *preliminare* in cui si individua il campo di concentrazioni tossiche (almeno 5 in serie geometrica con un fattore non superiore a 2.2) da utilizzare poi nel test *definitivo*.

La mortalità in questo tipo di test è la principale risposta riscontrabile negli organismi trattati ed è registrata ad intervalli regolari (es. 24, 48, 72 e 96 h). Dalla conta del numero di morti per concentrazione di tossico si arriva, attraverso elaborazioni grafiche e statistiche (metodo di interpolazione grafica, PROBIT e TSK) a definire la **LC₅₀**, la concentrazione che provoca la morte del 50% degli organismi. I pesci (almeno 7 per i recipienti controllo e per quelli dove viene testata la sostanza) sono considerati morti se non c'è nessun movimento visibile (es. respirazione assente) e se il tocco del peduncolo caudale non provoca reazione¹³.

Un test di tossicità *acuta* si ritiene valido se vengono rispettate le seguenti condizioni dettate dalle linee guida OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 203 "Fish Acute Toxicity Test":

- 1) la mortalità nei controlli (o bianchi) non deve superare il 10 % alla fine del test;
- 2) devono essere mantenute condizioni costanti lungo tutta la durata del test utilizzando, se necessario, sistemi *semi-statici* o a *flusso continuo*;
- 3) la concentrazione di ossigeno disciolto nel mezzo acquoso durante il test deve essere pari almeno al 60% del valore della saturazione dell'aria. A tale scopo può

¹² Baudo – 2003, pp. 135-137.

¹³ OECD – 1992, p. 4.

essere utilizzata l'aerazione che deve, però, impedire la perdita significativa del tossico da testare;

- 4) la concentrazione della sostanza tossica che viene testata deve essere mantenuta almeno a 80% del valore della concentrazione iniziale del test. Se la deviazione da questo valore supera il 20% i risultati ottenuti si dovranno riferire alla concentrazione effettivamente misurata¹⁴.

In un test di tossicità acuta devono essere misurati quotidianamente, inoltre, anche parametri come temperatura e pH.

1.4.2 Test di tossicità cronica

I test *cronici* rappresentano uno strumento essenziale per valutare il potenziale tossico delle sostanze. Essi hanno una durata in media di due settimane e, come detto in precedenza, non possono essere di tipo *statico*. Lo scopo di questi esperimenti è determinare la concentrazione minima in grado di provocare l'insorgere di un determinato effetto dannoso negli organismi esposti (LOEC *lowest observed effect concentration*), la concentrazione minima letale e la concentrazione massima di non effetto (NOEC *no observed effect concentration*). In questo tipo di test si possono, quindi, osservare non soltanto effetti letali (riconoscibili come per il test *acuto*), ma anche altri effetti (es. un differente comportamento di nuoto o una diversa reazione agli stimoli esterni) che li distinguono in modo inequivocabile dagli organismi del controllo. Le concentrazioni scelte per il test devono permettere di determinare sia le due concentrazioni minime che causano effetti tossici (letali e di altra tipologia) sia la concentrazione massima di non effetto.

Un test di tossicità *cronica* si ritiene valido se vengono rispettate le seguenti condizioni dettate dalle linee guida OECD 204 "Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study":

- 1) la mortalità nei controlli (o bianchi) non deve superare il 10 % alla fine del test;
- 2) la concentrazione di ossigeno disciolto nel mezzo acquoso durante il test deve essere pari almeno al 60% del valore della saturazione dell'aria. A tale scopo può essere utilizzata l'aerazione che deve, però, impedire la perdita significativa del tossico da testare;
- 3) la concentrazione della sostanza tossica che viene testata deve essere mantenuta almeno a 80% del valore della concentrazione iniziale del test. Se la deviazione da

¹⁴ OECD – 1992, pp. 1-2.

questo valore supera il 20% i risultati ottenuti si dovranno riferire alla concentrazione effettivamente misurata¹⁵.

In un test di tossicità cronica i pesci devono avere un peso complessivo di 10 g per litro di recipiente (sia controllo che test) e l'alimentazione può essere fornita più volte al giorno (in tal caso la quantità di cibo somministrata non dovrebbe superare la quantità ingerita immediatamente dai pesci) o 1 volta al giorno (in questo caso dovrebbe corrispondere al 2% del peso secco registrato all'inizio del test). Le misure di pH, temperatura e ossigeno disciolto dovrebbero, invece, essere effettuate almeno due volte a settimana. Inoltre è preferibile registrare quotidianamente gli effetti (mortalità, anomalie nel nuoto e nel comportamento ecc.) provocati dalla sostanza testata.

1.4.3 Test del micronucleo

I micronuclei sono corpi extranucleari di piccole dimensioni di aspetto ovale o rotondeggiante visibili nel citoplasma delle cellule accanto al nucleo principale. Essi possono contenere frammenti acentrici o interi cromosomi che non vengono inclusi nel nucleo principale durante l'anafase e che si formano in seguito a:

- 1) rotture cromatidiche o cromosomiche che generano frammenti acentrici;
- 2) formazione di cromosomi con più centromeri;
- 3) danno a carico della struttura del cinetocoro;
- 4) danni a carico del fuso mitotico.

La quantificazione dei micronuclei costituisce, quindi, un valido strumento di valutazione del danno al DNA a livello cromosomico poiché questi corpi rappresentano l'espressione di eventi di rottura e perdita cromosomica.

Il test del micronucleo è stato applicato a una varietà di tipi cellulari e di specie appartenenti all'ambiente acquatico: pesci, anfibi, molluschi bivalvi e crostacei. I trattamenti con agenti genotossici hanno mostrato anche in queste specie meccanismi di danno cromosomico comuni a quelli di organismi superiori. Nei pesci l'esposizione delle cellule a diverse sostanze genotossiche ha provocato un aumento della frequenza di micronuclei normalmente riscontrata¹⁶.

Il test del micronucleo, inoltre, non implica l'allestimento di colture cellulari, è indipendente dal numero di cromosomi della specie, non presenta eccessive difficoltà di riconoscimento al microscopio ed è di facile e rapida soluzione. Per questi motivi rappresenta il test più estesamente utilizzato sulle specie acquatiche ed è stato proposto

¹⁵ OECD – 1984, p. 3.

¹⁶ Rapporto APAT – 32/2005, pp. 28-31.

come biomarcatore rapido e a basso costo della contaminazione da agenti genotossici in studi che utilizzano gli organismi acquatici come bioindicatori.

Nei teleostei i micronuclei sono preferibilmente analizzati negli eritrociti del sangue periferico perché sono molto numerosi (da 20000 a 3000000/ml a seconda della specie) e conservano il nucleo anche negli stadi maturi. Numerosi studi hanno, infatti, dimostrato che queste cellule presentano un'elevata incidenza di micronuclei dopo esposizione a diversi inquinanti ambientali.

L'analisi dei micronuclei nei pesci è stata eseguita utilizzando anche tessuti differenti quali branchie, reni e fegato. Tra questi, le cellule isolate dalle branchie hanno evidenziato una maggiore sensibilità agli effetti genotossici rispetto sia alle cellule renali che alle cellule del sangue periferico poiché si dividono molto rapidamente e sono direttamente esposte agli agenti tossici (Al Sabti and Metcalfe, 1995).

Negli eritrociti di pesce, accanto ai micronuclei sono state descritte anche altre anomalie del nucleo (NA, nuclear abnormalities) classificate da Carrasco et al. (1990):

- 1) nuclei "*blebbed*" (presentano una protuberanza relativamente piccola della membrana nucleare che contiene eucromatina);
- 2) nuclei "*notched*" (dentellati);
- 3) nuclei "*lobed*" (presentano protuberanze più grandi dei nuclei *blebbed* e possono avere diversi lobi);
- 4) "*binuclei*" (cellule che possiedono due nuclei).

Queste anomalie si sono dimostrate buoni indicatori di danno genotossico (Bombail et al., 2001, Pacheco and Santos, 1998; Ayyalon F. and Garcia-Vazquez, 2000) sebbene il loro meccanismo di formazione non sia ancora stato compreso (Cavas and Gozukara, 2003).

METODOLOGIA

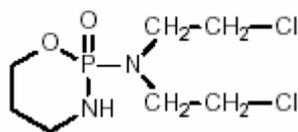
2.1 Sostanze utilizzate nei test ecotossicologici

I test ecotossicologici condotti nel presente studio sono stati eseguiti utilizzando il *sodio dodecil solfato* (SDS) per quanto riguarda il test di tossicità acuta a 48 h e la *ciclofosfamide* per il test del micronucleo a 72 h. Una descrizione sintetica delle due sostanze e del loro potenziale tossico è di seguito fornita.

2.1.1 Sodio dodecil solfato (SDS)

Il *Sodio dodecil solfato*, o Sodio laurilsolfato, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, è un detergente anionico, in grado di emulsionare i grassi e abbassare la tensione superficiale di soluzioni acquose. È preparato mediante la solfatazione di lauril alcool, seguita da neutralizzazione con sodio carbonato. Per le sue proprietà tensioattive viene utilizzato come detergente, in particolare nell'industria tessile, nella separazione elettroforetica di proteine e lipidi e nella determinazione del peso molecolare delle proteine. È commercializzato sotto forma di cristalli, scaglie o polveri di colore bianco o crema che, sciolti in acqua (1 g/10 ml), formano una soluzione opalescente. Nel presente studio il *SDS* è stato adottato quale tossico di riferimento allo scopo di testare la sensibilità di *Dicentrarchus labrax*¹⁷.

2.1.2 Ciclofosfamide



La *ciclofosfamide* () è un agente alchilante del DNA appartenente alla famiglia delle mostarde azotate. L'alchilazione del DNA, sfavorendo tra le altre cose l'accoppiamento guanina-citosina, ne compromette la biosintesi e la funzionalità. La *ciclofosfamide*, come altri agenti alchilanti, è una sostanza multifunzionale poiché possiede diversi siti reattivi in virtù dei quali può reagire con due differenti centri nucleofili del DNA. Se i due siti si trovano sui due filamenti polinucleotidici opposti si crea un legame crociato tra le eliche (*cross-link interstrand*). Questi *cross-link interstrand* impediscono la separazione dei filamenti del DNA impedendo, quindi, la replicazione e la trascrizione.

La *ciclofosfamide* richiede un'attivazione metabolica, per mezzo di ossidasi epatiche, prima di poter espletare la sua azione tossica (vedi fig. 1).

¹⁷ Gelli et al. – 2005, p. 6.

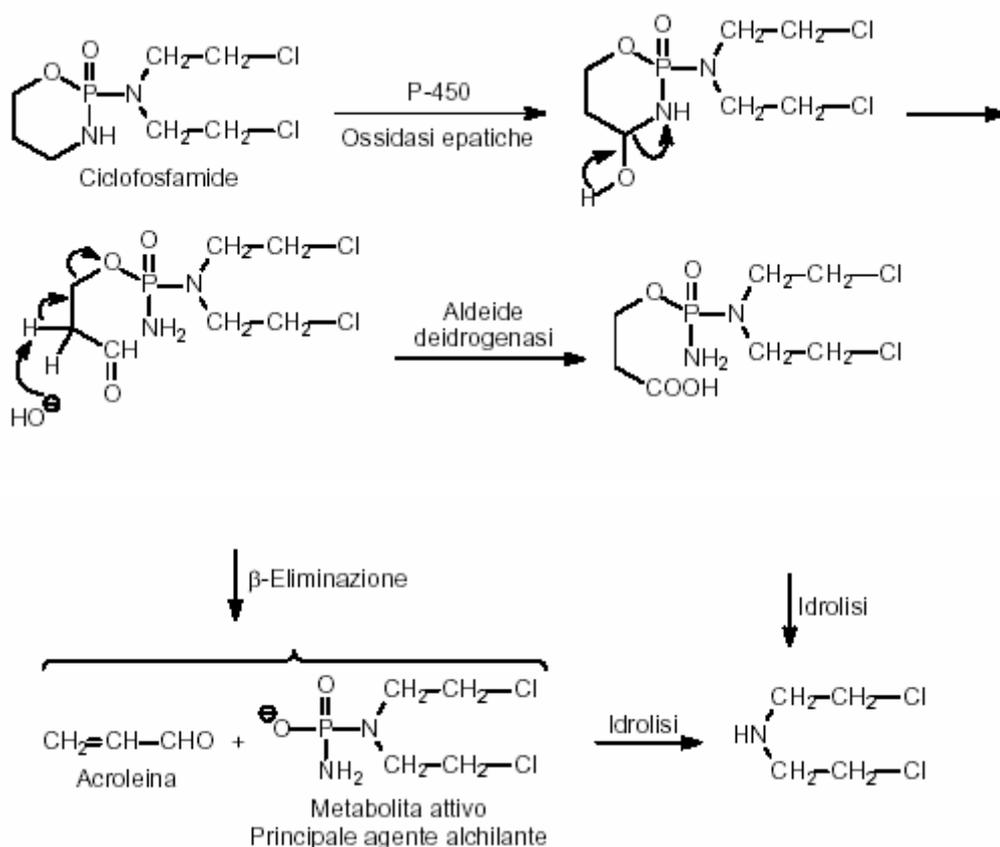


Figura 1 – Attivazione metabolica della ciclofosfamida

In questo studio la *ciclofosfamida* è stata utilizzata per indurre micronuclei nelle cellule di *Dicentrarchus labrax*.

2.2 Biologia di *Dicentrarchus labrax*

In base al Decreto Legislativo n.152 del 1999, che prescrive l'utilizzo di specie autoctone per l'esecuzione dei saggi di tossicità, è stata scelta, come specie bersaglio dei test di tossicità eseguiti in laboratorio, *Dicentrarchus labrax* (famiglia Serranidae) poiché per essa esistono dei protocolli standardizzati relativamente alla riproduzione in condizioni controllate ed al mantenimento in laboratorio delle fasi larvali e giovanili.

La spigola, o branzino, vive in acque costiere (fino a circa 100 m di profondità) su fondali di vario tipo. È una specie estremamente tollerante agli sbalzi di temperatura (euriterma) e di salinità (eurialina, spesso la si osserva nelle acque salmastre delle lagune e delle foci dei fiumi). *Dicentrarchus labrax* (fig. 2) si trova nel Mediterraneo, nel Mar Nero e nell'Atlantico orientale dalle coste norvegesi fino a quelle africane del Marocco.

Questa specie può raggiungere dimensioni notevoli (1 metro di lunghezza e oltre 10 kg di peso). La forma del corpo è slanciata, il muso è appuntito e la bocca è grande e obliqua, munita di denti pluriseriati con la mandibola prominente. Gli opercoli possiedono due

spine, mentre l'orlo inferiore del preopercolo è munito di alcuni robusti dentelli. La spigola possiede una pinna dorsale divisa in due porzioni distinte, di cui la prima è sostenuta da robusti raggi spiniformi. Le scaglie sono di tipo ctenoide lungo il corpo e di tipo cicloide sul capo nello spazio interorbitario. La colorazione è grigio-verdastra sul dorso, bianca sul ventre, con una macchia nera sull'opercolo¹⁸. I giovani presentano macchie nere (cromatofori) sparse sul dorso e sui fianchi.

La spigola è un predatore le cui abitudini alimentari variano in funzione della taglia. I giovani passano da una dieta mesoplanctonica ad una costituita principalmente da organismi macroplanctonici e macrobentonici. Gli adulti si nutrono, invece, soprattutto di pesci (es. banchi di clupeidi).

Nel Mar Mediterraneo si riproduce durante i mesi invernali (gennaio-marzo) con gli adulti che si radunano in gruppi numerosi. Le uova, fecondate da più maschi, sono galleggianti e sferiche (diametro 1.1 – 1.2 mm). Alla schiusa la larva è lunga circa 3 – 4 mm. I giovanili, al contrario degli adulti, hanno abitudini gregarie e si spostano sotto costa migrando dal mare verso le zone salmastre lagunari (arrivando talvolta persino alle acque dolci) dove si accrescono e vi permangono spesso fino al raggiungimento della maturità sessuale (tra il secondo ed il terzo anno di vita per i maschi e tra il terzo ed il quinto per le femmine).

La spigola viene pescata con tremagli, lenze e, raramente, con reti strascico. Questa specie, molto pregiata, è oggetto di allevamento intensivo (vasche e gabbie) ed estensivo (lagune e valli) in acque marine e salmastre, anche a salinità molto bassa.

Negli impianti di produzione, grazie all'impiego di mangimi e all'opportunità di allevare i pesci con regimi termici ottimali, è possibile ottenere spigole di taglia commerciale (intorno ai 350 grammi) in 20-24 mesi, a partire dalla schiusa delle uova. I tempi necessari per giungere alla schiusa delle larve mutano al variare della temperatura dell'acqua: tra 13° e 20°C i tempi di incubazione richiedono da 70 a 45 ore di embriogenesi. La larva di spigola viene alimentata con prede vive (rotiferi ed artemie) sino al 30 – 35° giorno di età, quando piccole quantità di mangime in polvere sono somministrate per integrare la dieta ad artemie. Il periodo di adattamento al mangime artificiale dura, di solito, fino al 60° giorno di età circa in corrispondenza del completamento della metamorfosi delle larve e rappresenta la fase più critica dell'allevamento larvale.

¹⁸ Tibaldi – 1995, p. 121.



Figura 2 – *Dicentrarchus labrax*.

2.3 Mantenimento di *Dicentrarchus labrax* nelle vasche di allevamento

Gli esemplari di *D. labrax* sono stati prelevati dall'impianto di piscicoltura di Civitavecchia. Trasportati in laboratorio, sono stati posti in due acquari, ciascuno del volume unitario di 120 L, operanti in ciclo chiuso in grado di garantire un ricambio idrico completo ogni ora, provvisti di un sistema di filtrazione meccanica e biologica (fig. 3). Gli acquari si trovano in una stanza termostatica nella quale la temperatura è regolata a 20 ± 1 °C. L'acqua in cui sono stati mantenuti gli organismi (acqua potabile dechlorata + miscela di Sali Instant Ocean) è stata, come suggerito da protocollo, utilizzata anche per i test. La salinità dell'acqua di allevamento è stata regolata al 33 ± 1 ‰ (sciogliendo 825 g di miscela di Sali Instant Ocean in 25 L di acqua deionizzata).

Un campione di avannotti di spigola, all'arrivo in laboratorio, è stato misurato, mediante carta millimetrata numerata, per verificare la lunghezza totale (LT) media del lotto di organismi che è risultata essere pari a 2.81 ± 0.06 cm. Gli organismi sono stati, quindi, sottoposti ad un periodo di acclimatazione della durata di 7 giorni (paragrafo 10 modificato delle linee guida OECD 2003) alle seguenti condizioni ambientali:

Fotoperiodo	12 ore di luce e 12 ore di buio
Illuminazione	500 – 1000 lux
Temperatura	20 ± 1 °C
Ossigeno	Almeno 80% del valore di saturazione dell'aria

I parametri chimico-fisici (temperatura, ossigeno disciolto, salinità e pH) sono stati misurati quotidianamente, mentre ogni 48 h sono state rilevate le concentrazioni di nitriti e nitrati nell'acqua di allevamento e sono state eseguite le operazioni di sifonaggio, per eliminare i residui organici, e di ricambio parziale di acqua.

L'alimentazione è stata somministrata 2 volte al giorno (2 h prima di effettuare il ricambio d'acqua nei giorni in cui si eseguiva tale operazione) fino a 24 h prima dell'inizio del test (2% in peso secco relativamente all'iniziale peso dell'animale).

Al termine del periodo di acclimatazione, è stata registrata una mortalità compresa tra il 5 ed il 10%. Prima di procedere all'esecuzione del test si è prolungato di altri 7 giorni, come richiesto dal protocollo operativo OECD n° 203 per un tale valore di mortalità, il periodo di acclimatazione del nostro lotto di organismi.



Figura 3 – Acquario per il mantenimento in laboratorio di *Dicentrarchus labrax*.

2.4 Test *preliminare* di tossicità *acuta* (48 h) con SDS

Il primo test di tossicità acuta svolto nei laboratori APAT (Servizio di Metrologia Ambientale) è stato il test *preliminare* con il tossico di riferimento SDS. Questo test è servito per stabilire le concentrazioni di SDS da utilizzare poi nel test definitivo.

Qui di seguito sono descritte le operazioni svolte per la realizzazione del test *preliminare* di tossicità *acuta* (48 h) con SDS.

PROTOCOLLO OPERATIVO

Condizioni per l'esecuzione del test (16/05/2005)

Camere di saggio	Becker in Pyrex da 3L
Tossico di riferimento	Sodio dodecil solfato (SDS)
N° totale di pesci	126
Alimentazione	Assente
Ossigeno	> 60 % del valore di saturazione dell'aria
Taglia media degli organismi	3.5 ± 0.5 cm

Le condizioni di fotoperiodo e temperatura sono le stesse del mantenimento degli organismi in laboratorio.

Prima dell'inizio del test sono state rilevate le lunghezze totali (LT) medie ed i pesi medi di un campione pari **al 16% circa del totale dei pesci** utilizzati (20 pesci) nel seguente modo:

- 1) determinazione del peso: ogni pesce è stato preso singolarmente con un retino dal becker, asciugato con della carta assorbente per eliminare l'acqua in eccesso e poi pesato con una bilancia di precisione con due cifre decimali dopo i grammi;
- 2) misurazione della lunghezza totale: il pesce è stato posto sopra un foglio di carta millimetrata plastificata.

La lunghezza totale media è risultata 3.62 ± 0.07 cm, mentre il peso totale medio è risultato pari a 0.35 ± 0.04 g.

Le soluzioni del tossico SDS sono state preparate alle concentrazioni di 20 – 10 – 5 – 2.5 e 1.25 mg/L nel seguente modo:

- 1) preparazione della soluzione madre (pesati 500 mg di SDS e sciolti in 0.5 L di acqua di allevamento);
- 2) 20 mg/L 40 ml di soluzione madre (SM) in 2L di acqua di allevamento;
- 3) 10 mg/L 20 ml di SM in 2L di acqua di allevamento;

- 4) 5 mg/L 10 ml di SM in 2L di acqua di allevamento;
- 5) 2.5 mg/L 5 ml di SM in 2L di acqua di allevamento;
- 6) 1.25 mg/L 2.5 ml di SM in 2L di acqua di allevamento.

Ogni contenitore (in tutto 18) è stato preparato e siglato come segue:

B	B	B
SDS 20	SDS 20	SDS 20
SDS 10	SDS 10	SDS 10
SDS 5	SDS 5	SDS 5
SDS 2.5	SDS 2.5	SDS 2.5
SDS 1.25	SDS 1.25	SDS 1.25

B sta per bianco e gli altri contenitori sono stati siglati con il nome del tossico ed il valore della sua concentrazione. Per il bianco e per ogni concentrazione di tossico sono state eseguite 3 repliche.

Test *preliminare* (48 h) di tossicità *acuta* con SDS

Effettuati i suddetti preparativi si è passati all'esecuzione vera e propria del test che sarà di seguito descritto.

1. Ogni contenitore è stato riempito (2L per becker) con acqua di allevamento.
2. Il tossico di riferimento SDS è stato immesso nelle camere di saggio alle diverse concentrazioni sopra indicate.

3. È stato controllato che l'acqua di allevamento immessa nelle camere di saggio avesse un tenore di ossigeno disciolto superiore al 60 % e che la temperatura fosse 20 ± 1 °C.
4. Sono stati introdotti, con distribuzione casuale, gli organismi nelle camere di saggio (7 organismi per contenitore).
5. È stata introdotta l'aerazione nei becker attraverso dei tubi, con delle pietre porose, collegati ad una pompa.
6. Le camere di saggio sono state parzialmente coperte per mezzo di parafilm lasciando un'apertura in corrispondenza del beccuccio dei contenitori (fig. 4).
7. Al termine del test (18/05/2005) è stato registrato il numero di animali morti sul modulo RM.AMB.MET (allegato 1). I pesci sono stati considerati morti secondo quanto riportato al paragrafo 19 delle linee guida OECD 203 (vedi par 1.4.1).
8. Sono state definite le concentrazioni del tossico di riferimento SDS da utilizzare nel test *definitivo*.

Il test è stato condotto in assenza di alimentazione, evitando qualsiasi disturbo esterno per gli animali. Al termine di questo test sono state misurate nuovamente le lunghezze totali medie e i pesi medi dei pesci impiegati nell'esperimento utilizzando un campione di 20 esemplari.



Figura 4 – Test *preliminare* di tossicità acuta (48 h) con il tossico SDS. A sinistra ci sono i contenitori con i bianchi (B), mentre a destra ci sono i contenitori con concentrazione 1.25 mg/L di SDS.

2.5 Test *definitivo* di tossicità *acuta* (48 h) con SDS

Attraverso il precedente test preliminare sono state stabilite le concentrazioni da utilizzare in questo saggio di tossicità.

Qui di seguito sono descritte le operazioni svolte per la realizzazione del test *definitivo* di tossicità *acuta* (48 h) con SDS.

PROTOCOLLO OPERATIVO

Condizioni per l'esecuzione del test (18/05/2005)

Camere di saggio	Becker in Pyrex da 3L
Tossico di riferimento	Sodio dodecil solfato (SDS)
N° totale di pesci	126
Alimentazione	Assente
Ossigeno	> 60 % del valore di saturazione dell'aria
Taglia media degli organismi	3.5 ± 0.5 cm

Le condizioni di fotoperiodo e temperatura sono le stesse del mantenimento degli organismi in laboratorio.

I risultati del test *preliminare* hanno permesso di individuare le concentrazioni alle quali preparare le soluzioni del tossico SDS nel test *definitivo* (7.5 – 6 – 5 – 4 e 2.5 mg/L). Le modalità di preparazione delle soluzioni sono di seguito descritte:

- 1) preparazione della soluzione madre (pesati 500 mg di SDS e sciolti in 0.5 L di acqua di allevamento). La soluzione madre di SDS va preparata ogni volta, non può cioè essere utilizzata la soluzione preparata precedentemente;
- 2) 7.5 mg/L 15 ml di soluzione madre (SM) in 2L di acqua di allevamento;
- 3) 6 mg/L 12 ml di SM in 2L di acqua di allevamento;
- 4) 5 mg/L 10 ml di SM in 2L di acqua di allevamento;
- 5) 4 mg/L 8 ml di SM in 2L di acqua di allevamento;
- 6) 2.5 mg/L 5 ml di SM in 2L di acqua di allevamento.

Ogni contenitore (in tutto 18) è stato preparato e siglato come segue:

B	B	B
SDS 7.5	SDS 7.5	SDS 7.5
SDS 6	SDS 6	SDS 6
SDS 5	SDS 5	SDS 5
SDS 4	SDS 4	SDS 4
SDS 2.5	SDS 2.5	SDS 2.5

B sta per bianco e gli altri contenitori sono stati siglati con il nome del tossico ed il valore della sua concentrazione. Per il bianco e per ogni concentrazione di tossico sono state eseguite 3 repliche.

Test definitivo (48 h) di tossicità *acuta* con SDS

Effettuati i suddetti preparativi si è passati all'esecuzione vera e propria del test che sarà di seguito descritto.

1. Ogni contenitore è stato riempito (2L per becker) con acqua di allevamento.
2. Il tossico di riferimento SDS è stato immesso nelle camere di saggio alle diverse concentrazioni sopra indicate.
3. È stato controllato che l'acqua di allevamento immessa nelle camere di saggio avesse un tenore di ossigeno disciolto superiore al 60 % e che la temperatura fosse 20 ± 1 °C.
4. Sono stati introdotti, con distribuzione casuale, gli organismi nelle camere di saggio (7 organismi per contenitore).

5. È stata introdotta l'aerazione nei becker attraverso dei tubi, con delle pietre porose, collegati ad una pompa.
6. Le camere di saggio sono state parzialmente coperte per mezzo di parafilm lasciando un'apertura in corrispondenza del beccuccio dei contenitori (fig. 5).
7. Al termine del test (20/05/2005) è stato registrato il numero di animali morti sul modulo RM.AMB.MET (allegato 1). I pesci sono stati considerati morti secondo quanto riportato al paragrafo 19 delle linee guida OECD 203 (vedi par. 1.4.1).

Al termine di questo test sono stati utilizzati i metodi di interpolazione grafica, PROBIT e TSK (Trimmed Spearman - Karber) per calcolare la LC_{50} (la concentrazione che provoca la morte del 50 % degli organismi) a 48 h.

Il metodo di interpolazione grafica, poiché si basa sull'unione dei dati (posti sotto forma logaritmica) con una linea, lascia ampio spazio di incertezza nella stima della LC_{50} .

Il PROBIT (probability units) è uno dei metodi più utilizzati in ecotossicologia. Consiste nella trasformazione delle ordinate in "probability units", operazione attraverso la quale le curve di tossicità diventano rette (le ascisse, in cui sono riportate le concentrazioni, subiscono una trasformazione logaritmica)¹⁹. Il PROBIT permette così di calcolare la regressione esistente tra la concentrazione e la risposta all'azione del tossico. Lo svantaggio di questa tecnica di trattamento dei dati consiste, però, nel non permettere di considerare i valori 0 e 100 % di risposta, perciò devono essere presenti almeno due misure di concentrazione alle quali questa percentuale sia compresa tra 0 e 100 %.

Il TSK (Trimmed Spearman Karber) è un metodo statistico non parametrico usato per calcolare il valore della LC_{50} . Per stimare la LC_{50} attraverso il metodo TSK è sufficiente che vi siano due valori percentuali di mortalità: uno deve essere superiore o uguale al 50 %, mentre l'altro deve essere inferiore o uguale al 50 %. Non è, quindi, possibile utilizzare il suddetto metodo nei casi in cui tutti i valori di mortalità siano inferiori o superiori al 50 %.

¹⁹ Marchetti – 1993, p. 779.



Figura 5 – Test *definitivo* di tossicità acuta (48 h) con il tossico SDS. Si possono notare i contenitori con concentrazione 2.5 mg/L di SDS.

2.6 Test di genotossicità (72 h) con ciclofosfamide

Il test è stato realizzato con lo scopo di sviluppare un nuovo protocollo per l'analisi dei micronuclei in cellule epiteliali branchiali di specie ittiche (nel nostro caso *D. labrax*) e valutare meglio, quindi, gli effetti genotossici degli inquinanti dell'ecosistema acquatico. Si è preferito analizzare questo tipo di cellule per la loro maggiore sensibilità agli agenti genotossici in quanto sono più direttamente esposte alle sostanze tossiche e possiedono indici di divisione mitotica più elevati²⁰. A tal proposito, alcuni studi²¹ hanno, inoltre, evidenziato che nelle cellule branchiali le frequenze di micronuclei (esprese come numero di micronuclei su mille cellule) aumentano in funzione del tempo di esposizione e della concentrazione del tossico.

La ciclofosfamide (CF, vedi par. 2.1.2), alle concentrazioni di 2, 4 e 10 mg/L con tempo di esposizione di 48 e 72 h, è stata scelta come la sostanza ad azione genotossica da testare in questo saggio. Al termine del test sono state stimate le frequenze (esprese in ‰) di comparsa dei micronuclei e delle altre anomalie del nucleo. I dati finora disponibili si riferiscono al controllo (CON) e alla concentrazione 2 mg/L dopo 72 h di esposizione all'agente genotossico. Sono stati eseguiti dei t-test per verificare se l'esposizione alla ciclofosfamide (2 mg/L) potesse indurre un aumento significativo nella frequenza di comparsa dei micronuclei e delle altre anomalie nucleari rispetto a quanto osservato nel controllo.

Qui di seguito sono descritte le operazioni svolte per la realizzazione del test di genotossicità (72 h) con ciclofosfamide.

PROTOCOLLO OPERATIVO

Condizioni per l'esecuzione del test (07/06/2005)

Camere di saggio	Becker in Pyrex da 3L
Tossico di riferimento	Ciclofosfamide (CF)
N° totale di pesci	40
Alimentazione	Assente per gli animali che sono stati esposti al tossico per 48h. Gli organismi esposti per 72 h, invece, sono stati alimentati dopo 48 h di esposizione alla ciclofosfamide.
Ossigeno	> 60 % del valore di saturazione dell'aria.

²⁰ Cavas et al. – 2004, p. 570.

²¹ Cavas e Gozukara – 2003, p. 84.

Le condizioni di fotoperiodo e temperatura sono le stesse del mantenimento degli organismi in laboratorio.

Le soluzioni del tossico CF sono state preparate alle concentrazioni di 10 – 4 e 2 mg/L nel seguente modo:

- 1) preparazione della soluzione madre (SM) alla concentrazione di 500 mg/L (pesati 500 mg di CF e sciolti in 1 L di acqua distillata sterile);
- 2) 10 mg/L 40 ml di SM in 2L di acqua di allevamento;
- 3) 4 mg/L 16 ml di SM in 2L di acqua di allevamento;
- 4) 2 mg/L 8 ml di SM in 2L di acqua di allevamento;

Ogni contenitore è stato preparato e siglato come segue:

CON 48 h	CON 72 h
2 48 h	2 72 h
4 48 h	4 72 h
10 48 h	10 72 h

CON sta per controllo e gli altri contenitori sono stati siglati con la concentrazione del tossico ed il tempo di esposizione ad esso.

Prima di iniziare il test sono stati misurati temperatura, salinità, O₂ disciolto, pH e concentrazione di nitriti della vasca di allevamento da cui è stata prelevata l'acqua da immettere nelle camere di saggio.

Test di genotossicità con ciclofosfamide

1° GIORNO

Effettuati i suddetti preparativi si è passati all'esecuzione vera e propria del test che sarà di seguito descritto.

Il test è iniziato alle ore 11.00 del 07/06/2005

1. Ogni contenitore è stato riempito (2L per becker) con acqua di allevamento.

2. Il tossico di riferimento CF è stato immesso nelle camere di saggio alle diverse concentrazioni sopra indicate.
3. Sono stati introdotti, con distribuzione casuale, gli organismi nelle camere di saggio (5 organismi per contenitore).
4. Ogni contenitore è stato coperto con del parafilm lasciando una piccola apertura necessaria all'introduzione delle pipette monouso utilizzate per l'aerazione.
5. Avvio dell'aerazione.

2° GIORNO

Dopo 24 h dall'inizio del test sono stati misurati nelle camere di saggio i seguenti parametri: temperatura, salinità, pH, O₂ (%) utilizzando il foglio di registrazione RPC.AMB.MET (modulo registrazione dei parametri chimici).

I valori cui si è fatto riferimento sono i seguenti:

Temperatura	20 ± 1 °C
Salinità	30 ± 1 ‰
pH	7.5 – 8.5
Ossigeno disciolto (%)	> 60

3° GIORNO

Dopo 48 h dall'inizio del test sono stati misurati in ogni camera di saggio i suddetti parametri utilizzando il foglio di registrazione RPC.AMB.MET (allegato 2).

Dopo 48 h dall'inizio del test sono state, quindi, eseguite le seguenti operazioni:

1. predisposizione per i prelievi delle branchie dai branzini nelle seguenti camere di saggio: CON/48 h; 2/48 h; 4/48 h; 10/48 h.
2. preparazione di 20 provette eppendorf siglate come segue:

CON/48/1.....	CON/48/5
2/48/1.....	2/48/5
4/48/1.....	4/48/5
10/48/1.....	10/48/5
3. riempimento delle provette con il fissativo di Carnoy (3:1 metanolo : acido acetico).
4. prelievo delle branchie (3 o 4 per ciascun pesce) e posizionamento nelle provette eppendorf corrispondenti.
5. preparazione dei vetrini (vedi procedimento descritto sotto).

6. alimentazione degli animali delle camere di saggio a 72 h.
7. preparazione di nuove camere di saggio (1 per il controllo e 3 con le nuove soluzioni) nelle quali si sono poi trasferiti gli animali esposti alla ciclofosfamide per 72 h.

4° GIORNO

Dopo 72 h dall'inizio del test sono state, quindi, eseguite le seguenti operazioni:

1. predisposizione per i prelievi delle branchie dai branzini nelle seguenti camere di saggio: CON/72 h; 2/72 h; 4/72 h; 10/72 h.
2. preparazione di 20 provette eppendorf siglate come segue:

CON/72/1.....	CON/72/5
2/72/1.....	2/72/5
4/72/1.....	4/72/5
10/72/1.....	10/72/5
3. riempimento delle provette con il fissativo di Carnoy (3:1 metanolo : acido acetico).
4. prelievo delle branchie (3 o 4 per ciascun pesce) e posizionamento nelle provette eppendorf corrispondenti.
5. preparazione dei vetrini (vedi procedimento descritto sotto).

I vetrini sono stati preparati con le seguenti modalità:

1. Gli archi branchiali sono stati dapprima prelevati dai pesci (3 o 4 per ciascuno) e immersi nel fissativo di Carnoy e poi sono stati trasferiti per 15 minuti in una soluzione di acido acetico al 20 % per la macerazione del tessuto.
2. Dopo il trattamento con acido acetico, gli archi branchiali sono stati posti su un vetrino copri oggetto pulito e sgrassato posizionato a sua volta sotto un microscopio binoculare.
3. È stata aggiunta una goccia di acqua distillata sopra l'arco branchiale posizionato sul vetrino.
4. Le cellule epiteliali dell'arco branchiale, utilizzando pinzette o forbici, sono state raschiate e distribuite nel modo più uniforme possibile sulla superficie del vetrino eliminando frammenti cellulari e filamenti in eccesso.
5. I vetrini sono stati fatti dapprima asciugare all'aria e poi sono stati immersi in alcool metilico assoluto per 10 minuti.

6. A questo punto, i vetrini sono stati idratati con acqua distillata e quindi immersi in una soluzione di colorante Giemsa al 5 % (5 ml di Giemsa + 95 ml di acqua distillata) per 30 minuti.
7. Conclusa la fase di colorazione, i vetrini sono stati fatti asciugare all'aria.
8. Una volta asciugati, su ciascun vetrino è stato montato il copri oggetto utilizzando il montante a base di cilene Eukitt.

Come si può notare da questo schema descrittivo, il procedimento di preparazione dei vetrini è alquanto lungo e complesso.

RISULTATI

3.1 Test *preliminare* di tossicità *acuta* (48 h) con SDS

Questo test ci ha permesso di individuare le concentrazioni da utilizzare nel test *definitivo* che sono risultate le seguenti: 7.5 – 6 – 5 – 4 e 2.5 mg/L. A questi valori si è giunti constatando che alle concentrazioni di 20, 10 e 5mg/L è stato registrato il 100 % di mortalità, mentre alle concentrazioni più basse (2.5 e 1.25 mg/L) non sono stati segnalati animali morti. Si è dovuto, quindi, utilizzare un intervallo di concentrazioni più ristretto per rendere il test *definitivo* uno strumento efficace per valutare la tossicità della sostanza SDS sulla specie *D. labrax*.

Al termine del test sono state eseguite misure di lunghezza e peso su un campione di 20 esemplari per determinare la taglia media (3.31 ± 0.06 cm) ed il peso medio (0.25 ± 0.02 g) degli animali dopo l'esecuzione del test. I valori registrati sono inferiori a quelli annotati prima dello svolgimento del saggio di tossicità (tabella 1). Se da un lato la diminuzione del peso medio è la logica conseguenza dell'assenza di alimentazione degli animali durante il test, dall'altro la riduzione della taglia media è un risultato che possiamo definire non corretto poiché i pesci continuano a crescere durante la loro vita, anche se fattori di stress (es. esposizione ad una sostanza tossica) possono rallentarne la crescita. Questo errore è sicuramente imputabile all'esiguità del campione da cui sono state rilevate le misure di lunghezza (20 esemplari).

Tabella 1 – Dati di lunghezza e peso calcolati su un campione di 20 esemplari di branzino.

Test <i>preliminare</i> (48 h) con SDS	Lunghezza media (cm)	Peso medio (g)
Prima del test	3.62 ± 0.07	0.35 ± 0.04
Dopo il test	3.31 ± 0.06	0.25 ± 0.02

3.2 Test *definitivo* di tossicità *acuta* (48 h) con SDS

Il test definitivo con SDS ha permesso di verificare la sensibilità della specie *D. labrax* al tossico utilizzato. È stata calcolata la LC_{50} (la concentrazione alla quale si raggiunge il 50 % di mortalità degli organismi) utilizzando il metodo di interpolazione grafica (figura 6) e il metodo TSK. Non è stato possibile avvalersi del PROBIT poiché non è stato soddisfatto il requisito necessario per l'applicazione di questo metodo, cioè la presenza di almeno due concentrazioni con percentuali di mortalità diverse da 0 o 100 % (tabella 2).

Tabella 2 – Numero e percentuale di organismi morti per valore di concentrazione.

Concentrazione (mg/L)	N° pesci esposti	N° pesci morti	Mortalità (%)
0.00 (Bianco)	21	0	0
1.25	21	0	0
2.50	21	0	0
5.00	21	7	33
6.00	21	21	100
7.50	21	21	100

Metodo di interpolazione grafica

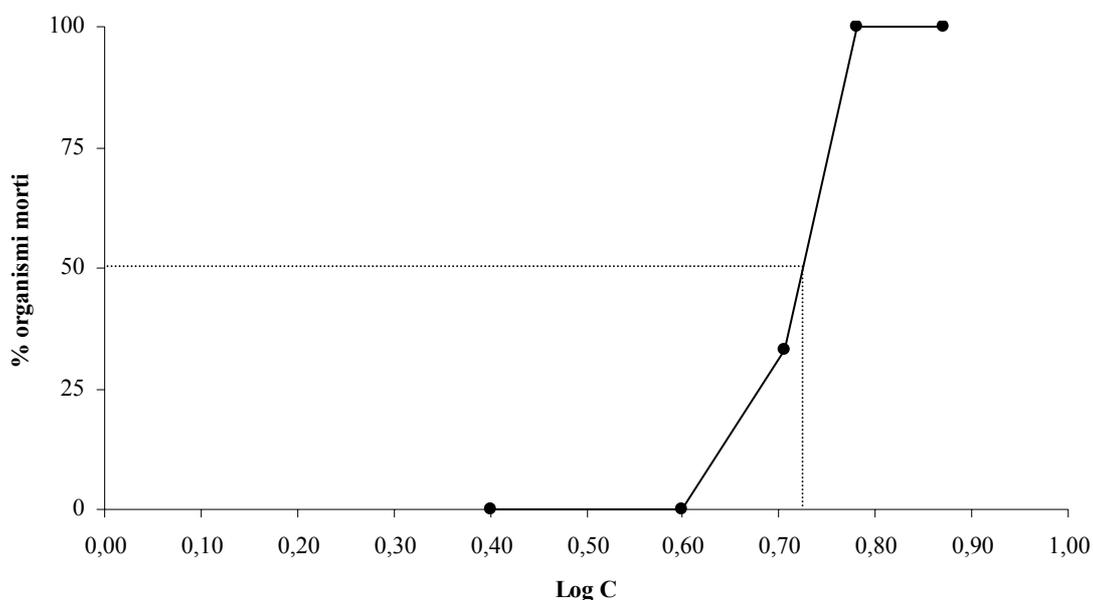


Figura 6 – Metodo di interpolazione grafica per calcolare la LC_{50} .

La LC_{50} stimata attraverso il metodo di interpolazione grafica è risultata pari a 5.14 mg/L, mentre quella calcolata mediante il metodo TSK è risultata 4.73 mg/L (tabella 3). I valori, quindi, calcolati con questi due differenti metodi hanno fornito risultati concordi tra loro.

Tabella 3 – Valori stimati di LC_{50} (mg/L) in funzione del metodo utilizzato.

Metodo utilizzato per la stima di LC_{50}	Valore di LC_{50} (mg/L)
Interpolazione grafica	5.14
TSK (Trimmed Spearman Karber)	4.73

3.3 Messa a punto del test del micronucleo sulle cellule branchiali

I risultati sinora disponibili si riferiscono al controllo 72 h e alla concentrazione di 2 mg/L di ciclofosfamide (CF). Per ciascun pesce sono state osservate 2000 cellule dell'epitelio branchiale ed è stato registrato il numero di cellule che possedeva micronuclei, cellule micronucleate (cellule contenenti più micronuclei) e cellule binucleate. Inoltre, su un secondo campione di 2000 cellule sono state rilevate anche le altre anomalie nucleari (cellule “*blebbed*”, “*notched*” e “*lobed*”) (tabella 4).

I dati così ottenuti sono stati utilizzati per stimare le frequenze con cui compaiono queste alterazioni (tabella 5).

Tabella 4 – Risultati del test del micronucleo sulle cellule dell'epitelio branchiale di *D. labrax*.

MN TEST SU CELLULE BRANCHIALI							ESPOSIZIONE A CF PER 72 h					
TRATTAMENTO	PESCE	CN	CMN	MN	CBN	CTOT	CN	CBL	CNT	CLB	ANTOT	CTOT
CONTROLLO	1	1852	4	4	144	2000	1986	5	7	2	14	2000
	2	1849	4	4	147	2000	1987	7	5	1	13	2000
	3	1845	4	4	151	2000	1997	1	1	1	3	2000
	4	1874	4	4	122	2000	1988	3	5	4	12	2000
	5	1820	4	4	176	2000	1988	6	5	1	12	2000
CF 2 MG/L	1	1829	11	11	160	2000	1984	6	5	5	16	2000
	2	1842	8	11	150	2000	1980	9	5	6	20	2000
	3	1830	8	8	162	2000	1981	6	11	2	19	2000
	4	1823	9	10	169	2000	1986	8	5	1	14	2000
	5	1845	7	8	148	2000	1982	10	5	3	18	2000

CN = cellule normali; CMN = cellule micronucleate; MN = micronuclei; CBN = cellule binucleate; CTOT = cellule totali; CBL = cellule con nucleo “blebbed” (vescicolato); CNT = cellule con nucleo “notched” (dentellato); CLB = cellule con nucleo “lobed” (lobato); ANTOT = anomalie nucleari totali.

Tabella 5 – Frequenze di comparsa dei micronuclei e delle altre anomalie nucleari.

TRATTAMENTO	PESCE	FCMN	FMN	FCBN	FCBL	FCNT	FCLB	FANTOT
CONTROLLO	1	2	2	72	2,5	3,5	1	7
	2	2	2	73,5	3,5	2,5	0,5	6,5
	3	2	2	75,5	0,5	0,5	0,5	1,5
	4	2	2	61	1,5	2,5	2	6
	5	2	2	88	3	2,5	0,5	6
	Media	2	2	74,00	2,20	2,30	0,90	5,4
	ST	0	0	9,64	1,20	1,10	0,65	2,22
	STM	0	0	4,31	0,54	0,49	0,29	0,99
CV%	0	0	13,02	54,73	47,63	72,44	41,10	
CF 2 MG/L	1	5,5	5,5	80	3	2,5	2,5	8
	2	4	5,5	75	4,5	2,5	3	10
	3	4	4	81	3	5,5	1	9,5
	4	4,5	5	84,5	4	2,5	0,5	7
	5	3,5	4	74	5	2,5	1,5	9
	Media	4,30	4,80	78,90	3,90	3,10	1,70	8,70
	ST	0,76	0,76	4,36	0,89	1,34	1,04	1,20
	STM	0,34	0,34	1,95	0,40	0,60	0,46	0,54
CV%	17,63	15,80	5,53	22,93	43,28	60,99	13,84	

FCMN = frequenza di cellule micronucleate; FMN = frequenza di micronuclei; CBN = frequenza di cellule binucleate; FCBL = frequenza di cellule con nucleo “blebbed” (vescicolato); FCNT = frequenza di cellule con nucleo “notched” (dentellato); FCLB = frequenza di cellule con nucleo “lobed” (lobato); FANTOT = totale delle frequenze di anomalie nucleari.

I t-test hanno dimostrato che la ciclofosfamide, anche alla concentrazione più bassa utilizzata nel saggio di tossicità (2 mg/L), è capace di indurre dopo 72 h un aumento significativo nella frequenza di comparsa dei micronuclei ($p = 0.000035$) e di cellule micronucleate ($p = 0.00014$). Per quanto riguarda le altre anomalie nucleari, invece, non è stata trovata alcuna differenza significativa tra il controllo e gli organismi esposti alla CF a concentrazione 2 mg/L.

CONCLUSIONI

Il test di tossicità acuta con SDS ha fornito per la stima di LC_{50} due risultati 5.14 e 4.73 mg/L, ottenuti rispettivamente con i metodi di interpolazione grafica e TSK, concordi tra loro ed inferiori a quelli registrati (7 mg/L con il metodo di interpolazione grafica e 7.07 mg/L con il TSK) nel precedente esperimento eseguito con questo tossico²². Il grado di salinità più elevato adottato in questo saggio (33 ± 1 ‰ contro il 20 ± 1 ‰ del precedente esperimento) può aver incrementato il potenziale tossico di questa sostanza²³ e spiegare quindi la differenza piuttosto marcata tra i valori di LC_{50} registrati nei due test.

I risultati del test di genotossicità con ciclofosfamide (CF) hanno permesso di evidenziare come dopo 72 h anche basse concentrazioni (2 mg/L) di questo tossico possono indurre un aumento significativo di micronuclei e cellule micronucleate nell'epitelio branchiale di *Dicentrarchus labrax* come indicato dal t-test (vedi par. 3.3). Questi risultati confermano quanto osservato²⁴ in un esperimento condotto sul pesce *Oreochromis niloticus* in cui una concentrazione di 2 mg/L di CF dopo 72 h induceva la formazione statisticamente significativa di micronuclei. Dal confronto dei risultati ottenuti nei due test emerge che *D. labrax* è meno sensibile, almeno alla concentrazione di 2 mg/L, di *O. niloticus* all'azione tossica della ciclofosfamide (4.80 ± 0.34 ‰ è la frequenza media di micronuclei rilevata nel branzino contro una frequenza di 9.84 ± 0.69 ‰ del ciclode africano).

Per avere un quadro più completo sull'azione genotossica della ciclofosfamide sulle cellule dell'epitelio branchiale sarà necessario comunque esaminare i valori di frequenza delle anomalie nucleari (micronuclei, cellule micronucleate ecc.) ottenuti per un tempo di esposizione di 48 h e quelli ricavati per un tempo di esposizione di 72 h, ma alle concentrazioni più elevate utilizzate durante il test (4 e 10 mg/L).

In tutti i test eseguiti, l'aerazione è stata introdotta attraverso dei tubi, con delle pietre porose (test con SDS) o con delle pipette monouso (test con CF), collegati ad una pompa. Si è dovuto ricorrere a questi sistemi per aerare le soluzioni poiché la concentrazione di ossigeno disciolto scendeva troppo rapidamente nei contenitori e non era quindi possibile mantenere la concentrazione minima di O_2 richiesta dal protocollo OECD n. 203 ($O_2 > 60$ %) per i test.

²² Cadoni – 2005, p. 32.

²³ Lindgren et al. – 2001, pp. 6-7.

²⁴ Cavas e Gozukara – 2003, p. 85.

BIBLIOGRAFIA

Al-Sabti K., Metcalfe C. D., 1995 – Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343: 121 – 135.

Ayllon F., Garcia-Vazquez E., 2000 – Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research* 467: 177-186.

Baudo R., 2003 – Principi di ecotossicologia. CNR-Istituto per lo studio degli ecosistemi, Università di Sassari, pp. 286.

Bombail V., Aw D., Gordon E., Batty J., 2001 – Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnelus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44: 283 – 292.

Cadoni F., 2005 – Valutazione della tossicità dei prodotti disperdenti del petrolio. Tesi stage APAT, pp. 58.

Carrasco K. R., Tilbury K. L., Myers M. S., 1990 – An assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal Fish Aquatic Science* 47: 2123 – 2136.

Cavas T., Garanko N., Arkhipchuk V., 2005 – Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill, and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology* 43: 569 – 574.

Cavas T., Gozukara S.E., 2003 – Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research* 538: 81-91.

Decreto legislativo 3 febbraio 1997, n. 52 – “Attuazione della direttiva 92/32/CEE concernente classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose”.

Decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152 – “Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/Cee concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/Cee relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole”

Della Croce N., Cattaneo Vietti R., Danovaro R., 1997 – Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero, UTET, pp. 239 – 306.

DIRETTIVA 2000/60/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque.

Gelli F., Palazzi D., Pregnolato L., Venturini F. (ARPA-Fe); Savorelli F. (ICRAM); Modugno S. (Università di Ferrara); Floris B. (ASL 8-Cagliari); Roncarati A. (Università di Camerino); Conti D. (APAT), 2004 – Idoneità del branzino (*Dicentrarchus labrax*) e della carpa (*Cyprinus carpio*) allo svolgimento di test ecotossicologici (tossico di riferimento: sodio laurilsolfato), pp. 6 – 10. In Progetto Nazionale di Monitoraggio Acque Superficiali – Rapporto ARPA EMILIA-ROMAGNA: Sostanze prioritarie: i pesci (*Dicentrarchus labrax*, *Cyprinus carpio*) quali organismi bersaglio in test ecotossicologici, di bioconcentrazione e in saggi finalizzati a valutazioni di genotossicità.

http://farmacia.unich.it/chimfarm/didattica/cf2c/CTF_149-175.pdf, 15/6/2005

Lindgren C., Lager H., Fejes J., 2001 – Oil spill dispersants. Risk assessment for Swedish waters, IVL Report Swedish Environmental Research Institute, pp. 22.

Marchetti, R., 1993 – Ecologia applicata. Società Italiana di Ecologia, Città Studi Edizioni, pp. 773 – 818.

Odum E. P., 1988 – Basi di ecologia, Piccin, p. 125.

OECD n° 204, 1984 – Fish, prolonged toxicity test: 14-day study. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, Adopted by the Council on 4th April 1984, pp. 9.

OECD n° 203, 1992 – Fish acute toxicity test. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, Adopted by the Council on 17th July 1992, pp. 9.

Pacheco M., Santos M. A., 1998 – Induction of liver EROD erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide PAHs in *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology Environmental Safety*: 71 – 76.

Rapporto APAT, 32/2005 – Valutazione della genotossicità di inquinanti in ambienti acquatici: messa a punto di metodi per l'esecuzione del test del micronucleo in eritrociti di specie ittiche. Manuali e linee guida, pp. 69.

Tibaldi E., 1995 – Pesci e mammiferi marini. Gulliver, pp. 120 – 121.

ALLEGATO 2

 APAT	Registrazione parametri chimici Test: _____	RPC.AMB.MET
--------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------	--------------------

Laboratorio _____ Addetto alle prove: _____ Data inizio: _____

Campione	Parametri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	salinità														
	pH														
	O ₂ (% ASV)														
	T (°C)														
	nitrati (mg/l)														
	salinità														
	pH														
	O ₂ (% ASV)														
	T (°C)														
	nitrati (mg/l)														
	salinità														
	pH														
	O ₂ (% ASV)														
	T (°C)														
	nitrati (mg/l)														
	salinità														
	pH														
	O ₂ (% ASV)														
	T (°C)														
	nitrati (mg/l)														
	salinità														
	pH														
	O ₂ (% ASV)														
	T (°C)														
	nitrati (mg/l)														