

**CENNI DI ECOTOSSICOLOGIA E TEST DI TOSSICITÀ ACUTA CON *DAPHNIA*
MAGNA ESEGUITO CON IL KIT**

Maria Cecilia La Marca

Tutor: Dr.ssa Stefania Balzamo

Con la collaborazione del Dr. Alfonso Sbalchiero

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
2. EFFETTO ED ESPOSIZIONE	2
3. IL DESTINO DEGLI INQUINANTI	4
3.1 Il destino degli inquinanti nell'ambiente	4
3.1.1 Localizzazione	5
3.1.2 Persistenza	5
3.1.3 Bioconcentrazione e bioaccumulo	5
3.1.4 Biodisponibilità	6
3.2 Interazioni tra inquinanti	6
3.3 Il destino degli inquinanti all'interno degli organismi	7
3.3.1 Processi di uptake	8
3.3.2 Immagazzinamento	9
3.3.3 Metabolismo	10
3.3.4 Escrezione	11
4. EFFETTI DEGLI INQUINANTI A LIVELLO DEGLI ORGANISMI	12
4.1 Misura della tossicità	13
4.2 Stima della tossicità	14
4.3 Prove sperimentali	17
4.3.1 Test di tossicità con organismi acquatici	19
4.3.1.1 Test statici	20
4.3.1.2 Test semi-statici	21
4.3.1.3 Test a flusso continuo	21
5. TEST DI TOSSICITÀ ACUTA CON “ <i>Daphnia magna</i> ” con l'uso del kit	23
5.1 Introduzione	23

5.2 Ecologia	23
5.3 Scopo della prova	25
5.4 Principio del metodo	25
5.5 Uso del kit. Procedura operativa	26
5.5.1 Preparazione dell'acqua ISO Standard	26
5.5.2 Conservazione dell'acqua ISO Standard	26
5.5.3 Pre-areazione dell' ISO Standard	26
5.6 Schiusa degli <i>ephippi</i>	28
5.6.1 Procedimento per la schiusa	28
5.7 Prova per il controllo interno dell'acqua pura adoperata	30
5.7.1 Procedimento	30
5.8 Accettabilità della prova	31
5.9 Prova con il bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$)	32
5.9.1 Procedimento	32
5.10 Riempimento della piastra multipozzetto	33
5.10.1 Procedimento	34
5.11 Trasferimento	34
5.11.1 Procedimento	34
5.12 Incubazione della piastra multipozzetto	36
5.12.1 Procedimento	36
5.13 Registrazione dei risultati	37
5.13.1 Procedimento	37
5.14 Validità della prova	37
5.15 Stima dell' EC_{50}	38
5.15.1 Procedimento	38
6. CONCLUSIONI	40
BIBLIOGRAFIA	41
ALLEGATO 1	44

1. INTRODUZIONE

L'Ecotossicologia è una disciplina relativamente recente, così chiamata nel 1969 da Truhaut¹ e nata come filiazione della Tossicologia (in particolare della Tossicologia umana), dalla quale ha derivato principi, concetti e, almeno in una prima fase, metodi, coniugati però con l'Ecologia².

Letteralmente, la Tossicologia è la “scienza dei veleni”; l'Ecologia è “lo studio scientifico delle interazioni che determinano la distribuzione e l'abbondanza degli organismi”: l'Ecotossicologia è dunque la scienza dei veleni per l'ambiente. In un'accezione più estesa, l'Ecotossicologia può comunque comprendere anche i fattori fisici (calore, radiazioni), chimici e biologici che sono potenzialmente fattori inquinanti³.

Più in dettaglio, alcuni Autori⁴ riservano questo termine allo studio degli effetti tossici dei prodotti chimici distribuiti nell'ambiente su popolazioni di organismi viventi non umani o sugli ecosistemi, mentre gli studi che prendono in considerazione specificatamente gli effetti dei prodotti chimici presenti nell'ambiente sugli esseri umani più propriamente rientrerebbero nel campo di applicazione della Tossicologia Ambientale.

Infine, l'Ecotossicologia applicata descrive i metodi utilizzati per verificare se e quanto un determinato veleno può interferire con l'ambiente, e quali sono le soluzioni per evitare, alleviare o porre rimedio agli eventuali danni arrecati.

¹ Truhaut, 1977, 1: 151-173

² Moriarty, 1983

³ Ramade, 1977

⁴ Walker *et al.*, 1996

2. EFFETTO ED ESPOSIZIONE

Si definisce:

Veleno: qualsiasi sostanza che, tramite interazioni fisico-chimiche con tessuti viventi, può causare danni e/o morte dell'organismo.

Ne consegue che:

Tutte le sostanze sono veleni potenziali, perché tutte possono produrre danni agli organismi in conseguenza di un' esposizione eccessiva.

Già Paracelso, infatti, riconosceva che: ***Dosis sola facit veleno..... È solo la quantità che fa di una sostanza un veleno.***

Ad esempio, è risaputo che 1-2 cucchiaini di arsenico possono essere letali per un uomo. Ma anche 300g del comune sale da cucina, o meno di 1 kg di zucchero, ingeriti tutti in una volta, sono sufficienti a determinarne la morte.

Un altro concetto base è l'**esposizione** che è definita come funzione della quantità (o concentrazione) della sostanza, della sua forma, del tipo di somministrazione e del tempo di interazione con l'organismo.

Più precisamente, un'**esposizione eccessiva** produce un effetto avverso, mentre un'**esposizione tollerabile** non produce alcun effetto avverso.

Tuttavia, per la stessa sostanza, e a parità di esposizione, l'effetto può essere diverso per organismi diversi.

In particolare, un **effetto avverso** è rappresentato da qualsiasi cambiamento anormale, indesiderabile, o dannoso, in un organismo esposto ad una sostanza potenzialmente tossica.

L'effetto avverso estremo comporta la morte dell'organismo, mentre effetti avversi meno severi comprendono un'alterazione del consumo di cibo, del peso corporeo o di alcuni organi, cambiamenti patologici visibili, od anche un'alterazione dei livelli enzimatici.

Un cambiamento statisticamente significativo dallo stato "normale" non configura però necessariamente un effetto avverso; per diventare tale, l'effetto deve alterare una proprietà importante ed essere posto in relazione allo stato complessivo di salute dell'organismo esposto.

Si può dunque definire, più in generale, l'**effetto dannoso** quale causa di danni funzionali o anatomici, cambiamenti irreversibili dell'omeostasi, o quale responsabile dell'aumentata

suscettibilità ad altre sostanze o allo stress biologico, comprese le malattie infettive (l'entità del danno è influenzata dallo stato di salute dell'organismo).

3. IL DESTINO DEGLI INQUINANTI

3.1 Il destino degli inquinanti nell'ambiente

I diversi tipi di “veleni per l'ambiente” (contaminanti e inquinanti) costituiscono un pericolo solo se e quando arrivano ad interessare gli organismi viventi e cioè se, nell'ambiente dove questi organismi vivono, sono presenti in una concentrazione sufficientemente elevata ed in una forma biodisponibile (tale cioè da poter influenzare metabolismo e fisiologia degli organismi)⁵.

Il destino degli inquinanti in un ecosistema contaminato è controllato da quattro fattori principali:

1. localizzazione
2. persistenza
3. bioconcentrazione e bioaccumulo
4. biodisponibilità

3.1.1 Localizzazione

Nei diversi comparti ambientali spesso operano particolari meccanismi che determinano la localizzazione preferenziale degli inquinanti in specifici recettori: tra gli organismi viventi, un inquinante potrebbe essere selettivamente localizzato in vegetali piuttosto che in animali, o viceversa. All'interno di un organismo, l'inquinante potrebbe poi avere una particolare affinità per un particolare organo o tessuto; persino all'interno delle cellule, in funzione del metabolismo e della biochimica cellulare, difficilmente la concentrazione dell'inquinante è costante ovunque, ma al contrario le sue proprietà chimico-fisiche possono determinare una localizzazione preferenziale nel citoplasma oppure in particolari strutture cellulari. Gli organismi, anzi, possono rispondere all'esposizione a specifici inquinanti con la segregazione di questi in determinati comparti, utilizzando cioè meccanismi di detossificazione. Ad esempio, l'epitelio del tubo digerente di molti invertebrati contiene granuli ricchi in metalli che in sostanza sequestrano questi inquinanti; risulta pertanto impedita la successiva azione dannosa.

⁵ Baudo, 2003, 77-86

3.1.2 Persistenza

Gli inquinanti inorganici, ed in particolare i metalli, non sono biodegradabili e quindi tendono ad essere ritenuti nell'ambiente (inquinanti persistenti). Tuttavia, in alcuni casi, come per il mercurio, è possibile che avvengano trasformazioni da una forma chimica inorganica ad una organica (metilazione), con variazione delle caratteristiche chimiche e tossicologiche.

In generale, una volta immessi nell'ambiente, questi inquinanti tendono ad associarsi alle particelle solide (suolo o sedimenti) ed in questa forma hanno lunghi tempi di residenza: ci vogliono cioè diversi anni prima che possano essere rimossi da questo comparto per essere trasferiti ad altri comparti.

Fanno eccezione gli isotopi radioattivi che, per il loro spontaneo decadimento a isotopi stabili, hanno una persistenza nell'ambiente determinata dalle rispettive semivite. Pertanto, all'interno di uno scarico proveniente da una centrale nucleare, ci saranno sia isotopi poco persistenti (che hanno semivite dell'ordine di secondi-giorni), ma anche isotopi estremamente persistenti (quelli con semivite dell'ordine di migliaia o milioni di anni).

3.1.3 Bioconcentrazione e bioaccumulo

Nei processi di dispersione nell'ambiente, gli inquinanti tendono solitamente ad essere trasferiti lungo gradienti di concentrazione (nella fase fluida, aria o acqua) e ad essere ripartiti tra più fasi (liquida e solida, ad esempio) in funzione della maggiore o minore affinità con le rispettive fasi.

Tra gli inquinanti inorganici, alcuni hanno però la caratteristica di poter essere trasferiti preferenzialmente dai comparti abiotici a quelli biotici, così da determinare un progressivo arricchimento negli organismi rispetto al mezzo in cui vivono e che agisce da fonte per gli inquinanti. Questa tendenza viene riflessa nel fattore di bioconcentrazione (BCF, Biological Concentration Factor), cioè il rapporto tra la concentrazione di un inquinante in un organismo e quella dello stesso inquinante nell'ambiente in cui vive. Per un organismo terrestre, si farà quindi riferimento alla concentrazione nel suolo; per un organismo acquatico, a quella nell'acqua o nei sedimenti.

Se il BCF è superiore a 1, si ha così un bioaccumulo dell'inquinante nell'organismo (che indica un bilancio positivo nei processi opposti di assunzione ed escrezione di quell'inquinante). Per quel composto chimico, e per quello specifico organismo, devono cioè esistere particolari processi biochimici che favoriscono l'assunzione e la ritenzione del

composto. Ad esempio, gli animali con uno scheletro calcareo, come una conchiglia, ovviamente hanno bisogno di accumulare calcio per costruire tale scheletro ed infatti hanno evoluto sistemi altamente efficienti di assimilazione di questo elemento. Ma anche piombo e stronzio, per la loro somiglianza “chimica” con il calcio, possono seguire gli stessi percorsi metabolici e quindi essere anch’essi bioaccumulati, pur non essendo necessari alla costruzione della conchiglia.

3.1.4 Biodisponibilità

In generale, un inquinante tende ad essere assimilato non in maniera proporzionale alla sua quantità, ma alla frazione del totale presente che è effettivamente disponibile per l’organismo. Tale biodisponibilità può essere notevolmente diversa per i differenti inquinanti e addirittura per le diverse forme con cui uno stesso inquinante può essere presente nell’ambiente (nel già citato esempio del mercurio, la forma inorganica è decisamente meno biodisponibile delle sue forme metilate). Anche i fattori ambientali concorrono a modificare la biodisponibilità degli inquinanti: pH e potenziale di ossidoriduzione, temperatura, concentrazione dell’ossigeno sono infatti determinanti nel modificare la solubilità dei metalli e la ripartizione tra forme ioniche o complessate.

La valutazione dell’effettiva biodisponibilità di un inquinante è pertanto estremamente complicata, poiché può variare grandemente anche all’interno di uno stesso comparto ambientale: nel suolo o nell’acqua, in funzione delle condizioni prevalenti, un inquinante sarà ripartito nelle varie “specie” possibili. Ma questa ripartizione non necessariamente riflette quella alla quale un organismo sarà poi effettivamente esposto: all’interfaccia tra l’ambiente esterno e le superfici dell’organismo che regolano gli scambi solitamente si ha un microambiente dove le condizioni sono differenti (si pensi all’epitelio degli organi respiratori o digerenti) e, di conseguenza, si possono spostare gli equilibri tra le diverse specie chimiche dell’inquinante.

3.2 Interazioni tra inquinanti

Localizzazione, persistenza, bioaccumulo e biodisponibilità di ciascun composto chimico non sono unicamente funzione della sua concentrazione e delle sue caratteristiche chimiche, ma dipendono anche dalla contemporanea presenza di altre sostanze, sia naturali che contaminanti, con le quali il composto chimico può interagire. Ad esempio, la presenza di H₂S

può portare alla precipitazione di solfuri di alcuni metalli, con netta diminuzione della biodisponibilità di tali elementi ed un aumento del loro tempo di residenza; la contemporanea presenza di due diversi metalli, che competono per gli stessi percorsi metabolici, può modificare il bioaccumulo di entrambi; ma anche la maggiore o minore disponibilità dei nutrienti può condizionare questo processo, perché comporta una variazione della frazione energetica che l'organismo può dedicare ai meccanismi di detossificazione piuttosto che alle funzioni vitali.

3.3 Il destino degli inquinanti all'interno degli organismi

Per ciascun inquinante, i percorsi metabolici possono variare negli organismi appartenenti a specie diverse, risultando in una tossicità di tipo selettivo.

In generale, tuttavia, in un modello estremamente semplificato l'interazione di un inquinante con un organismo dipende dal bilancio tra assunzione ed escrezione e, all'interno dell'organismo stesso, da meccanismi di movimento, interazione e biotrasformazione (**Figura 1**).

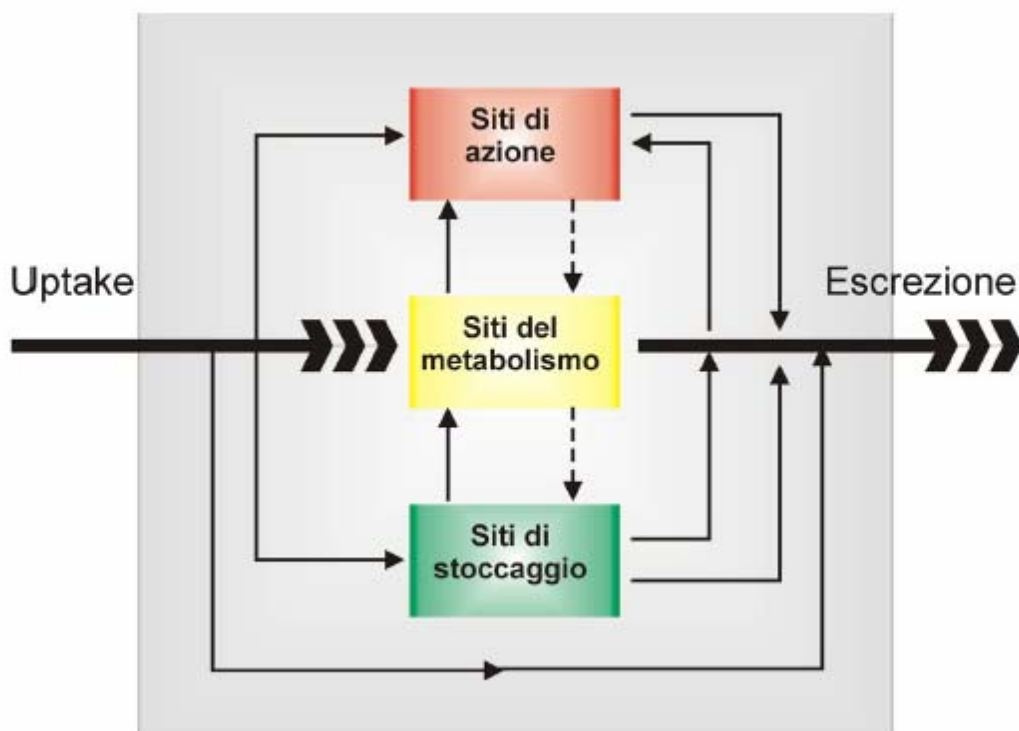


Figura 1. Modello generale del destino di un inquinante (xenobiotico) lipofilo all'interno di un organismo vivente.

Dal punto di vista funzionale, il modello può essere suddiviso in una componente tossicocinetica ed una tossicodinamica. La prima comprende i processi di assunzione, distribuzione e metabolismo, che nel complesso determinano la quantità del composto xenobiotico (o di un suo metabolita) che raggiungerà il sito di azione.

La componente tossicodinamica consiste invece nell'insieme delle interazioni molecolari che avvengono tra tossico e sito d'azione e determina dunque la natura e l'intensità dell'effetto tossico.

Anche se i due processi vengono studiati separatamente, l'effettiva azione sull'organismo dipende ovviamente da entrambi, ed infatti uno xenobiotico può risultare particolarmente tossico se si verifica l'una o l'altra (o entrambe) di queste condizioni:

- la componente tossicocinetica fa sì che una rilevante proporzione della forma attiva (originale o risultante dalle biotrasformazioni) raggiunga il sito di azione;
- la componente tossicodinamica fa sì che una rilevante proporzione dello xenobiotico che raggiunge il sito di azione interagisca producendo una risposta tossica.

3.3.1 Processi di uptake

Un inquinante xenobiotico può essere assorbito da un organismo attraverso vari percorsi metabolici, (tratto alimentare, epidermide, branchie, polmoni, per gli organismi animali; foglie e radici per gli organismi vegetali).

Il trasporto dipende dalla diffusione passiva attraverso le barriere naturali che delimitano l'organismo e separano il suo ambiente interno da quello esterno in cui vive (la cuticola di piante ed insetti, l'epidermide dei vertebrati o la membrana che riveste il canale alimentare, i polmoni o la trachea).

Nel caso di composti lipofili, ci può essere anche un trasporto di massa, a livello del tubo digerente, associato all'assorbimento dei grassi.

Il processo di diffusione passiva è condizionato dalla solubilità del composto perché in primo luogo le molecole devono avere una certa affinità con le barriere che devono essere attraversate e queste solitamente hanno un carattere lipofilo. Tuttavia, l'interno dell'organismo è costituito da un mezzo acquoso (sangue e linfa nei vertebrati, emolinfa negli insetti, ...) e quindi il composto deve avere anche una certa idrofilicità. Perché si abbia un passaggio complessivo con una ragionevole efficienza, ci deve dunque essere una certa affinità sia per

l'acqua che per i lipidi. Il bilancio tra queste due proprietà viene espresso dal **coefficiente di ripartizione** tra ottanolo ed acqua (K_{ow}).

Un altro fattore importante è il carattere acido o basico degli inquinanti. In questo caso, il pH del mezzo condiziona l'equilibrio tra le forme neutre o con carica elettrica della molecola. Solitamente, solo le forme neutre (che hanno un ragionevole bilancio tra solubilità nei grassi e nell'acqua) e di dimensioni relativamente modeste (peso molecolare inferiore a 800 dalton) possono velocemente attraversare la barriera lipofila. Quindi l'uptake degli acidi deboli è favorito ai bassi pH e quelle delle basi deboli da alti pH. Gli erbicidi, ad esempio, sono acidi deboli (es.: 2,4D, MCPA) e quindi possono penetrare più facilmente la cuticola delle piante se il mezzo ambientale ha un pH acido. Nel canale alimentare dei mammiferi, gli acidi deboli tendono ad essere assorbiti nello stomaco ($pH = 1 - 2$), le basi deboli nel duodeno, dove il pH è molto più alto.

3.3.2 Immagazzinamento

I composti xenobiotici possono essere accumulati preferenzialmente in posizioni dove non sono più in grado di interagire con i siti di azione, e quindi non sono più soggetti al metabolismo.

In questo caso, sono particolarmente importanti i comparti lipofili, quali i depositi di grassi, ma anche le micelle lipoproteiche e le membrane cellulari dove non esistono siti di azione o enzimi che possano metabolizzare quello specifico xenobiotico.

Va però sottolineato che non esiste una regola generale: una membrana cellulare inerte per un composto può al contrario contenere un sito d'azione o un enzima detossificante per un altro composto.

Molti composti xenobiotici lipofili possono essere immagazzinati nei depositi di grasso, mentre alcuni tendono a legarsi a proteine (ad esempio, il rodenticida warfarin si lega all'albumina del siero).

Nei vertebrati i depositi di grasso sono soggetti a notevoli variazioni nel tempo: quando la disponibilità di cibo è abbondante, i depositi di grasso possono aumentare fino al 20 % o più del peso corporeo di un organismo. Ma quando c'è scarsità di cibo, o subentra una malattia, oppure durante la deposizione delle uova o le migrazioni, i depositi di grasso vengono consumati per fornire energia all'organismo. La rapida mobilitazione dei grassi comporta

allora anche il rapido rilascio nel sangue degli inquinanti conservati in questi depositi, che possono così raggiungere i siti di azione o del metabolismo.

In funzione di questi processi, a breve termine l'accumulo degli inquinanti lipofili può dunque minimizzare i loro effetti tossici, ma nel lungo periodo il rilascio di questi agenti chimici dai siti di immagazzinamento può indurre effetti tossici.

Considerando l'importanza dell'immagazzinamento dei composti lipofili nei grassi, l'analisi chimica dei depositi in vertebrati acquatici e terrestri, per accertare se e in che misura gli inquinanti vengono così conservati, è diventato dunque uno strumento molto importante per stimare il potenziale pericolo per il biota.

3.3.3 Metabolismo

Il metabolismo enzimatico della maggior parte degli inquinanti xenobiotici lipofili prevede due fasi successive⁶:

Reazioni Fase 1: sono catalizzate dalla famiglia del citocromo P450 e da altri enzimi del reticolo endoplasmatico liscio (ossidazioni, riduzioni, idrolisi, dealchilazioni, deaminazioni, dealogenazioni, formazioni e rottura di anelli)

Reazioni Fase 2: reazioni di coniugazione - formazione di legami covalenti delle sostanze assorbite o dei loro prodotti nelle reazioni di Fase 1 con composti quali glutatione, acido glucuronico o aminoacidi. I coniugati, solitamente più solubili in acqua delle sostanze di partenza, sono più facilmente escreti nella bile. Alcuni possono essere separati nei loro componenti dai batteri nell'intestino ed essere riassorbiti.

In alcuni casi, la biotrasformazione delle sostanze può ridurre la loro tossicità: un caso di detossificazione è rappresentato dal cadmio, che induce la sintesi di metallotioneine (proteine che legano i metalli), aumentando la tolleranza a questo tossico (ma, a lungo andare, l'accumulo nei reni causa comunque una nefrotossicità).

In altri casi (ad esempio agenti arilanti, alchilanti, o metalli) la biotrasformazione può invece portare ad alterazioni strutturali o delle proteine che aumentano la tossicità, fino a vere e proprie biotossificazioni: gli idrocarburi policiclici aromatici vengono convertiti in derivati arilanti, che interagiscono con DNA e proteine, causando mutazioni, cancro, teratogenesi,

⁶ Timbrell, 1992

sensibilizzazione del sistema immunitario, morte cellulare; le arilammine, trasformate in arilidrossilammine, convertono l'emoglobina in metaemoglobina, incapace di trasportare l'ossigeno; i nitrati, assunti tramite la dieta, nell'intestino vengono ridotti (da batteri) in nitriti e in presenza di sostanze contenenti amminogruppi, in nitrosammine; gli stessi nitriti possono anche convertire l'emoglobina in metaemoglobina (questa reazione spiega la cosiddetta "sindrome del bambino blu": mescolando latte in polvere con acqua troppo ricca in nitrati, si formano nitriti e metaemoglobina ed i tessuti vengono privati dell'ossigeno).

3.3.4 Escrezione

Le vie d'escrezione dei composti xenobiotici, dei loro metaboliti e coniugati sono state studiate in modo approfondito nei vertebrati, mentre le risultano incomplete le conoscenze di questo processo negli invertebrati. Tra questi, i più studiati sono stati gli insetti. Pertanto, qui di seguito, si accennerà soprattutto ai processi che avvengono nei vertebrati, con qualche riferimento agli invertebrati.

Molti vertebrati acquatici possono eliminare i composti xenobiotici lipofili semplicemente per diffusione nell'acqua circostante, nel caso dei pesci attraverso le branchie, nel caso degli anfibi come le rane attraverso l'epidermide.

Gli uccelli acquatici, al contrario, non hanno membrane permeabili in contatto con l'acqua, ed infatti pelle e penne sembra non siano permeabili agli inquinanti. Anche per i mammiferi acquatici (balene, delfini, foche) l'epidermide sembra essere relativamente impermeabile a questi composti.

Nei vertebrati ed invertebrati terrestri l'effettiva eliminazione dei composti xenobiotici lipofili dipende dalla loro conversione in metaboliti e coniugati solubili in acqua, che possono essere escreti. In misura limitata, alcuni composti altamente lipofili possono essere secreti nel latte dei mammiferi, oppure trasferiti nelle uova di uccelli, rettili ed invertebrati. Per i vertebrati, la maggior parte dell'escrezione avviene comunque tramite bile e/o urine.

4. EFFETTI DEGLI INQUINANTI A LIVELLO DEGLI ORGANISMI

La produzione di un effetto tossico passa attraverso tre fasi: una fase chimica, o di esposizione; una fase tossicocinetica, di trasformazione, e una fase tossicodinamica (Figura 2).

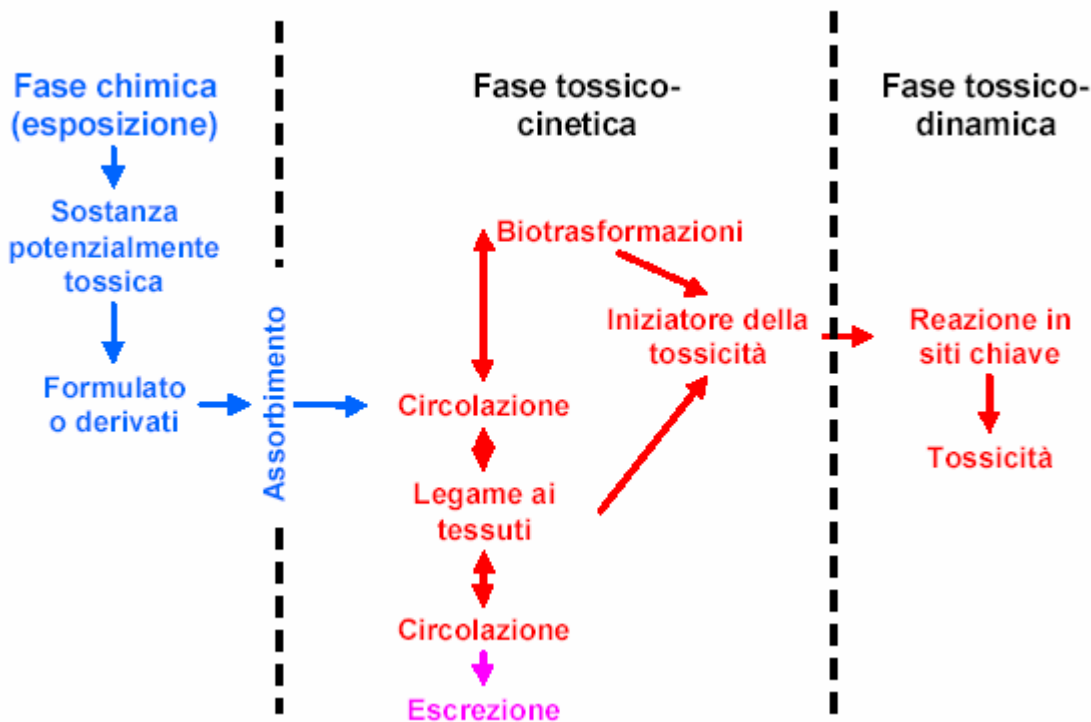


Figura 2. Fasi nella produzione di tossicità.

I principi della tossicocinetica possono essere utilizzati per capire e prevedere il comportamento degli inquinanti organici all'interno degli organismi.

Nella fase tossicodinamica gli iniziatori della tossicità (che possono essere i tossici di partenza o i loro metaboliti) interagiscono in siti chiave e danno inizio ai processi che si manifestano con gli effetti tossici veri e propri⁷.

Se il sito chiave è:

- un particolare organo, si può avere un'alterazione della funzionalità, potenzialmente culminante con la morte;

⁷ Baudo, 2003, 107-109

- il DNA, una mutazione in una cellula somatica può degenerare in un tumore; in una cellula germinale produrre effetti teratogeni;
- il sistema immunitario, la riduzione delle difese può portare ad asma, riniti, congiuntiviti, anemia emolitica, dermatiti da contatto, ...

4.1 Misura della tossicità

La funzione principale dell'Ecotossicologia è quella di stabilire delle norme che, complessivamente, garantiscano che l'eventuale rilascio nell'ambiente di un veleno non comporti un danno, o quanto meno un danno osservabile e irreversibile⁸.

Nella pratica, ciò si traduce in norme sulle fonti, sull'ambiente recettore, sugli organismi:

- | | |
|--------------------|---|
| a) sulle fonti | <p>restrizioni nell'autorizzazione alle emissioni (possono essere immesse nell'ambiente solo sostanze per le quali non sono stati riscontrati effetti avversi);</p> <p>limitazioni nelle quantità immesse (per sostanze per le quali è possibile stimare una soglia di non effetto)</p> |
| b) sull'ambiente | <p>quantità massime consentite nei vari comparti ambientali (aria, acqua, suolo, ...), tenendo conto delle eventuali trasformazioni in sottoprodotti, per evitare cambiamenti indesiderati (qualitativi, quantitativi, economici, estetici, ...)</p> |
| c) sugli organismi | <p>limiti di esposizione, quantità massime di residui in determinate componenti (in particolare, della catena alimentare umana)</p> |

Cronologicamente, l'Ecotossicologia ha dapprima osservato che la diffusione dei veleni nell'ambiente poteva comportare effetti avversi (mortalità delle specie vegetali ed animali di interesse economico, se non effetti diretti sull'uomo); successivamente, ha sviluppato gli opportuni strumenti per investigare le cause della tossicità osservata ed eventualmente per porvi rimedio.

Attualmente, lo studio dei veleni ambientali viene utilizzato per:

⁸ Sartori, 1998, 5:246-250

- la **previsione** dei possibili effetti indesiderati sull'ambiente dovuti all'immissione di una singola sostanza (commercializzazione di nuovi prodotti) o di una miscela di sostanze, almeno in parte potenzialmente tossiche (effluenti);
- la **verifica** degli effetti indesiderati che sono avvenuti o avvengono nell'ambiente a causa dell'immissione di una singola sostanza o di una miscela di sostanze, almeno in parte potenzialmente tossiche, tenendo conto delle interazioni fisiche, chimiche e biologiche con le diverse componenti, biotiche ed abiotiche, dell'ambiente stesso.

4.2 Stima della tossicità

Definendo:

- **Tossicità:** potenziale intrinseco di una sostanza di causare un danno sistemico a organismi viventi

e

- **Tossico:** agente che produce effetti avversi in un sistema biologico, danneggiando strutture e/o funzioni

mediante prove sperimentali (test di tossicità su organismi, popolazioni, comunità, ecosistema), oppure per via indiretta, applicando opportuni strumenti teorici (QSAR, modelli) è possibile stimare la severità degli effetti avversi, indotti dall'esposizione ad agenti tossici, e la frequenza con la quale si manifestano tali effetti

Avendo stabilito che una causa, l'esposizione, può determinare un effetto, è necessario precisare *come* la causa determini un effetto. È necessario cioè definire in termini quantitativi questa relazione.

Va innanzi tutto precisato che un'associazione statisticamente significativa tra esposizione (causa) e risultato (effetto) non stabilisce necessariamente una relazione causa – effetto.

Assumendo che il test programmato sia realizzato opportunamente, si incontra qui per la prima volta una differenza sostanziale tra Tossicologia ed Ecotossicologia. Nella prima, basata essenzialmente su animali, e sull'uomo solo in casi particolari (esposizioni accidentali, ricerche su volontari ma, purtroppo, in qualche caso anche su soggetti inconsapevoli), la causa viene quantizzata con la dose:

Dose: quantità della sostanza (fornita con l'esposizione) per unità di massa *corporea* (mg/kg)

Nell'Ecotossicologia Acquatica, è invece più utilizzata la concentrazione:

Concentrazione: quantità della sostanza (fornita con l'esposizione) per unità di massa *del veicolo* (mg/L, mg/kg)

Tradizionalmente, i primi studi hanno preso in considerazione solitamente gli effetti estremi, in grado cioè di provocare la morte di soggetti esposti. Il piano sperimentale prevede in questo caso di sottoporre alcuni soggetti a dosi crescenti di una sostanza e di contare, per ogni dose e per controlli non esposti, il numero dei morti.

La relazione causa – effetto assume allora la forma rappresentata in **Figura 3**, dove si può distinguere, in particolare, la dose mediana letale. Sulla base di un campione finito di soggetti, questo tipo di rappresentazione permette di interpolare la dose in grado di provocare la morte del 50 % degli organismi esposti (LD_{50} , *Lethal Dose*); per inferenza, si assume che questa dose sarebbe in grado di provocare la stessa percentuale di morti *nella popolazione* di soggetti.

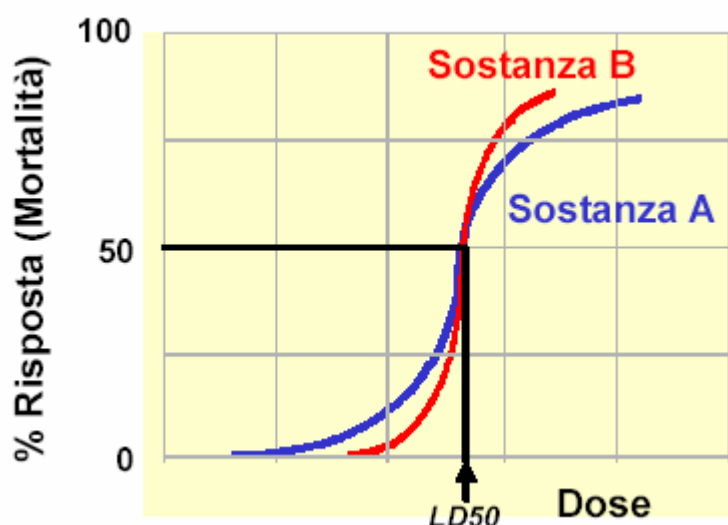


Figura 3. Relazione dose-mortalità

Per gli organismi acquatici, invece, la via principale di esposizione è solitamente rappresentata dal mezzo acquoso; pertanto, nell'Ecotossicologia Acquatica si ottengono curve dello stesso tipo (**Figura 4**), ma sostanzialmente diverse in quanto descrivono la relazione causa – effetto in funzione della concentrazione dell'esposizione (riferita al mezzo di somministrazione), invece che alla dose (riferita al soggetto che la riceve). Si calcolano cioè le LC_{50} (*Lethal*

Concentration, concentrazione letale per il 50% dei soggetti esposti) o le LCn volute (concentrazione letale per n% degli organismi esposti).

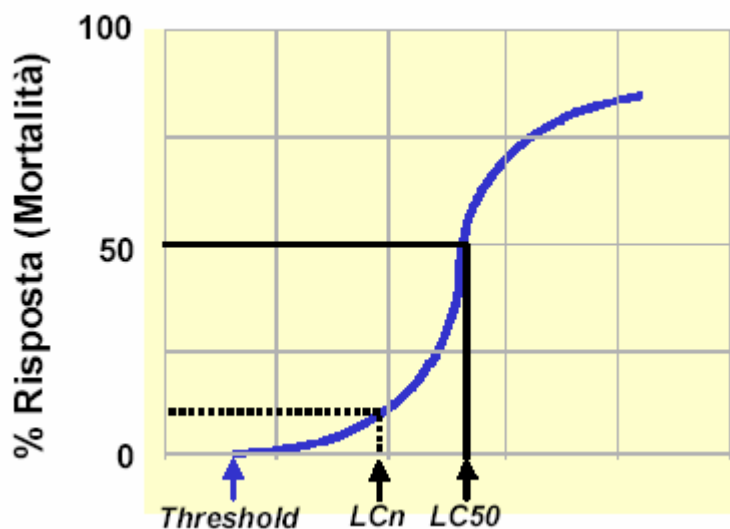


Figura 4. Relazione concentrazione-mortalità

Più recentemente c'è stata una tendenza a misurare anche altri effetti, quali la riduzione del numero di uova deposte o di giovani nati, la diminuzione della crescita corporea (biomassa o lunghezza del corpo) e il malfunzionamento di alcuni processi fisiologici (respirazione o sintesi di enzimi). Con gli animali terrestri di solito si prendono in considerazione gli effetti di una certa dose (ED_{50} , *Effective Dose*, cioè la dose mediana efficace in grado di produrre un determinato effetto, diverso dalla morte, sul 50% della popolazione) che viene somministrata per via orale o attraverso la pelle oppure iniettata. Per gli organismi acquatici (o immersi in un mezzo che può essere contaminato) si valutano gli effetti di una determinata concentrazione (EC_{50} , *Effective Concentration*, cioè la concentrazione mediana efficace che produce un determinato effetto, diverso dalla morte, sul 50% della popolazione) nell'acqua o nel mezzo circostante⁹.

Sulla base del confronto statistico tra esposti e controlli, è possibile identificare una “soglia” (threshold) minima, al di sotto della quale non si osserva una mortalità statisticamente significativa, cioè ci sarà un livello dove non si osserva un effetto (NOEL: *No Observed Effect*

⁹ ANPA, RTI CTN_AIM 4/2001, pp. 22-23

Level) ed un livello dove si osserva invece il primo effetto statisticamente significativo (LOEL: *Lowest Observed Effect Level*).

4.3 Prove sperimentali

Le prove sperimentali possono essere basate sulla stima della tossicità¹⁰:

Acuta: effetti avversi che si manifestano in un breve tempo (non superiore ad un terzo del tempo medio tra nascita e raggiungimento della maturità sessuale e durante il quale l'organismo può essere mantenuto in buone condizioni in assenza di alimentazione) dopo la somministrazione di una singola dose di una sostanza

Subacuta (Subletale): effetti avversi che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo ≤ 10 % vita dell'organismo (e durante il quale gli organismi vengono alimentati)

Cronica: effetti avversi che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo > 50 % vita dell'organismo

I test di tossicità acuta prevedono la misura di una risposta individuale (mortalità, metabolismo, germinazione, produzione primaria, produzione secondaria, uptake, escrezione...).

Una tossicità subletale misura la risposta dell'intero organismo (crescita, comportamento, patologia...), oppure una risposta interna (biochimica, istologia, fisiologia...).

La tossicità cronica prende in considerazione la risposta di popolazioni (parametri demografici), di comunità (interazioni tra specie), o dell'intero ecosistema (interazioni totali).

In tutti i casi, la tossicità osservata solitamente è funzione di specie, età, sesso, alimentazione, condizioni dell'organismo, caratteristiche fisico-chimiche del mezzo.

Per l'esecuzione dei test, è possibile operare in laboratorio, cioè in condizioni controllate dall'operatore, utilizzando una singola specie o più specie diverse, in esperimenti indipendenti.

L'esposizione può essere statica (il mezzo contenente la sostanza viene preparato all'inizio dell'esperimento e non più modificato fino al termine dell'esperimento stesso), semi-statica (il mezzo viene periodicamente rinnovato), continua (il mezzo viene rinnovato di continuo).

In ogni caso, per esigenze di standardizzazione dei test, è previsto che gli organismi utilizzati siano il più possibile omogenei non solo per l'esecuzione di un singolo test, ma anche nei test effettuati in tempi diversi. In particolare, gli organismi devono essere sani, avere un

¹⁰ ECETOC, 1993

comportamento normale, essere appropriatamente alimentati, appartenere sicuramente alla stessa specie ed alla stessa classe di età e presentare una bassa o nulla mortalità nei controlli. Per rispettare queste condizioni, difficilmente potranno essere utilizzati organismi indigeni, raccolti di volta in volta, ma sarà invece preferito l'impiego di organismi provenienti da allevamenti in condizioni controllate per quanto riguarda: provenienza degli organismi capostipiti, composizione del mezzo di allevamento, condizioni dell'allevamento (temperatura, luce, rapporto organismi/volume del mezzo, tipo e quantità dell'alimentazione, ecc.). Tutte queste condizioni sono prescritte nei test standardizzati e devono essere seguite alla lettera, per garantire la confrontabilità dei risultati ottenuti in tempi diversi dallo stesso laboratorio o da laboratori differenti¹¹.

Infine, per garantire che la sensibilità degli organismi rimanga inalterata generazione dopo generazione, è buona norma ripetere periodicamente il test con un tossico di riferimento. Ad esempio un composto molto utilizzato è il bicromato di potassio: dopo aver stimato la sensibilità dell'organismo al cromo ed aver calcolato l'EC₅₀ con i relativi limiti di variabilità, ad ogni test successivo con il tossico di riferimento deve essere rispettata la condizione che il nuovo EC₅₀ sia statisticamente congruente con i precedenti.

Per quanto riguarda la scelta della specie degli organismi da utilizzare nei test, questa dipende innanzitutto dallo scopo:

1. previsione degli effetti ambientali dell'immissione di un tossico o di più tossici in combinazione (ad esempio, test su effluenti);
2. confronto della tossicità di contaminanti diversi o di quella di uno stesso tossico per organismi diversi e/o in differenti condizioni sperimentali (caratterizzazione di sostanze);
3. predisposizione di regolamentazioni (limiti alle emissioni).

Particolarmente critica risulta la scelta della (o delle) specie, che può essere effettuata sulla base di differenti criteri:

- tra specie indigene dell'ambiente da proteggere, in funzione di rilevanza ecologica (specie chiave nella catena alimentare), importanza economica, facilità di uso (disponibile e/o allevabile)
- tra specie particolari, in funzione della sensibilità ai tossici, della disponibilità di laboratorio, della standardizzazione delle metodologie.

¹¹ Persone, 1993, 1:51-65

Questi test permettono di determinare una relazione causa – effetto, ma non sono in genere sufficientemente realistici, in quanto i risultati ottenuti sono validi solo per le condizioni sperimentali utilizzate e non consentono di estendere le conclusioni ad altre specie o a sistemi naturali complessi (in quanto non possono tener conto delle interazioni complesse tra biota e ambiente).

In ognuno dei test di tossicità sperimentale è infine possibile (e, spesso, desiderabile) rilevare diversi **end points** (parametri che esprimono l'intensità dell'effetto), dai più immediati (mortalità, immobilizzazione), ai più informativi, in termini di spiegazione del meccanismo di azione del tossico (effetti sulla riproduzione, sulla crescita degli individui ...).

4.3.1 Test di tossicità con organismi acquatici

Per gli organismi acquatici l'assunzione diretta dal mezzo acquoso è solitamente una importante via di esposizione, ma per gli animali anche l'assunzione attraverso il cibo può avere un ruolo determinante, specialmente per particolari categorie di inquinanti¹².

L'approccio sperimentale deve ovviamente tener conto di entrambi i fattori, eventualmente escludendone uno, ad esempio conducendo i test in condizioni di alimentazione sospesa.

Anche in questo caso, però, si incontrano notevoli difficoltà per mantenere costante la concentrazione del o dei tossici durante il periodo di esposizione. Infatti, i composti chimici possono essere “persi” dall'acqua per volatilizzazione, degradazione o adsorbimento (sulle particelle sospese, sulle pareti, ecc.), oppure per adsorbimento e metabolismo degli stessi organismi utilizzati nei test.

Se la velocità di perdita è relativamente lenta, i test possono essere condotti utilizzando sistemi statici o semi-statici. Nei primi, l'acqua non viene mai sostituita per tutta la durata del test; nei secondi, l'acqua viene invece rimpiazzata ad intervalli prefissati (ovviamente, ripristinando le concentrazioni desiderate del prodotto chimico da testare).

Sistemi più adeguati, ma per questo più complessi e costosi, prevedono infine che la soluzione venga continuamente sostituita (*continuous-flow* o *flow-trough*), mantenendo costante la concentrazione ed eliminando o riducendo le possibili interazioni con feci, alghe, muco, ecc. Grazie a questi dispositivi, l'esposizione può dunque essere prolungata fino a che nei tessuti dei soggetti esposti si raggiunga lo stato stazionario.

¹² Cairns, 1990, 24(2):154-161

Come già visto, infatti, l'effetto tossico di un composto chimico dipende dalla concentrazione raggiunta in particolare nei tessuti dove si trovano i siti di azione. A sua volta, la concentrazione interna è funzione della concentrazione del mezzo esterno e della durata dell'esposizione (e pertanto la concentrazione mediana letale LC_{50} deve essere sempre riferita al periodo di esposizione: LC_{50} 24h, 48h, 96h, ecc.).

In genere, i valori di LC_{50} tendono a diminuire con l'aumentare dell'esposizione, fino a quando raggiungono la Dose Mediana Letale Soglia (DMLS). Da questo punto in poi, un aumento dell'esposizione non modifica la mortalità e si può ragionevolmente supporre che sia stato raggiunto lo **stato stazionario** e cioè la concentrazione nei tessuti non aumenti più nel tempo.

Tipicamente, un test di tossicità prevede che venga effettuata prima una prova che consenta di identificare il campo di concentrazioni tossiche, utilizzando pochi organismi per gruppo e con una scansione logaritmica delle concentrazioni in un vasto campo. Successivamente, il test vero e proprio viene effettuato con un numero statisticamente rappresentativo di organismi e selezionando le concentrazioni in modo da ottenere mortalità che comprendano il 50 %, ma che coprano sia il campo superiore (mortalità > 50 %) che inferiore (mortalità < 50 %). Se l'esposizione prevede tempi diversi, verranno quindi calcolate le concentrazioni mediane letali per più periodi.

Allo stesso modo, è però possibile verificare anche effetti diversi dalla mortalità.

In funzione delle modalità di azione del tossico da testare e del tipo di organismo, è particolarmente importante stabilire il periodo di esposizione appropriato.

In generale, per verificare eventuali effetti sugli organismi acquatici i tossici devono essere presenti nel mezzo acquoso in cui vivono, oppure vengono appositamente dosati in tale mezzo.

L'esposizione può dunque avvenire in sistemi statici, semi-statici con rinnovo, oppure a flusso continuo.

4.3.1.1 Test statici

In questo caso, gli organismi vengono introdotti nel campione naturale da testare, o nelle soluzioni appositamente preparate del tossico, e in tale mezzo vengono mantenuti per tutto il tempo del test.

Vantaggi:

- test semplice e poco costoso
- richiesta di volumi relativamente ridotti del campione
- periodi di tempo limitati

Svantaggi:

- il contenuto di ossigeno, ad esempio, può diminuire per la domanda chimica di ossigeno (consumo dovuto alla reazione con i composti disciolti presenti nel campione o con i metaboliti prodotti dagli organismi) e per la domanda biochimica di ossigeno (respirazione degli stessi organismi utilizzati nel test o consumo da parte della flora batterica)
- i tossici possono inoltre essere persi per volatilizzazione, se volatili, per degradazione e trasformazione in sottoprodotti oppure essere adsorbiti sulle pareti del recipiente utilizzato per il test

In sostanza, quindi, i risultati vengono riferiti alla concentrazione *nominale* del tossico, quella cioè dell'inizio del test e non a quella effettiva, a meno che non si determini effettivamente per via analitica almeno ad inizio e fine del test. In quest'ultimo caso, se viene rilevata una variazione della concentrazione, l'esposizione andrà riferita ad una concentrazione intermedia tra quella iniziale e finale.

4.3.1.2 Test semi-statici, con rinnovo

In questo tipo di test il mezzo nel quale vengono esposti gli organismi è rinnovato a periodi di tempo prefissati, ovviamente utilizzando ogni volta un mezzo con le stesse caratteristiche. Il rinnovo può essere effettuato sostituendo completamente o parzialmente la soluzione nei recipienti, oppure semplicemente trasferendo gli organismi in un nuovo recipiente contenente la stessa soluzione di partenza.

Vantaggi:

- riduzione del rischio di trasformazione del mezzo (perdita di ossigeno, degradazione, volatilizzazione ed adsorbimento)
- eliminazione degli effetti indesiderati del digiuno (al momento del rinnovo, è possibile alimentare gli organismi consentendo quindi una esposizione più lunga rispetto ai test statici)

Svantaggi:

- uso di quantitativi maggiori del campione
- rischio di variazione dell'attività del tossico durante la fase statica del test.

4.3.1.3 Test a flusso continuo

In questo caso il mezzo da testare è continuamente rimpiazzato nei recipienti mediante una pompa (eventualmente abbinata ad un sistema di diluizione, se i diversi recipienti devono essere alimentati con concentrazioni scalari). Il test può dunque essere condotto anche sul campo, prelevando in continuo l'acqua del corpo idrico da testare.

Vantaggi:

- condizioni più realistiche
- riduzione del rischio di trasformazione del mezzo (perdita di ossigeno, degradazione, volatilizzazione ed adsorbimento)

Svantaggi:

- costi elevati
- grandi volumi del mezzo
- rilevazione in continuo o ad intervalli ravvicinati dei principali parametri chimico-fisici (temperatura, pH, ossigeno disciolto, concentrazione del tossico, ecc.).

I test di tossicità acuta sono effettuati con organismi d'acqua dolce (crostacei: *Ceriodaphnia dubia*, *Daphia magna*, *Daphnia pulex*; pesci: *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinas fontinalis*) e marini (misidacei: *Mysidopsis bahia*, *Holmesimysis costata* e *Artemia salina*; pesci: *Notropis leedsi*, *Cyprinodon variegatus*, *Menida menidia*, *M. beryllina*, and *M. peninsulae*).

5. TEST DI TOSSICITÀ ACUTA CON “*Daphnia magna*” con l’uso del kit

5.1 Introduzione

Il test con *Daphnia magna*, previsto dal D. Lgs. 152/99 e successiva modifica D. Lgs. 258/2000 – Allegato 5: limiti di emissione degli scarichi idrici, 1) Scarichi in corpi idrici superficiali, Tabella 3 “Valori limiti di emissione in acque superficiali e in fognatura – Punto 51 “Saggio di tossicità acuta”, può essere eseguito sia con organismi provenienti da allevamento (ISO 6341/98) sia con l’uso del “kit”.

Nel laboratorio di Ecotossicologia dell’APAT tale test è eseguito con l’uso del “kit”.

5.2 Ecologia

Daphnia magna (**Figura 5**) è presente, principalmente, nei laghi dell’America Nord Occidentale che hanno una durezza (come CaCO_3) superiore a 150 mg/L.

In Olanda *Daphnia magna* è stata trovata in stagni, poco profondi, con fondali fangosi ricchi di materia organica e con una bassa domanda di ossigeno (3 – 4 mg/L).

Le popolazioni di *Daphnia* sono generalmente contenute durante l’inverno mentre, agli inizi della primavera, quando la temperatura dell’acqua raggiunge i 6°C – 12°C, possono raggiungere densità demografiche di 200 – 500 individui/L¹³. Le popolazioni degli stagni diminuiscono durante i mesi estivi. In autunno ci può essere una nuova vitalità della popolazione seguita, durante l’inverno, da un nuovo declino.

Nella maggior parte dell’anno, le popolazioni di *daphnia* sono costituite interamente da femmine, i maschi sono abbondanti durante la primavera o l’autunno: in queste due stagioni la prole di *daphnia* è costituita principalmente (circa il 56%) da maschi¹⁴.

I maschi si distinguono dalle femmine per una corporatura più piccola, per antennule più grandi e per avere un addome modificato e propaggini delle zampette munite da un grosso gancio utilizzato per afferrare la femmina.

¹³ Pennak, 1989

¹⁴ Barker e Hebert, 1986, 64: 1137-1143

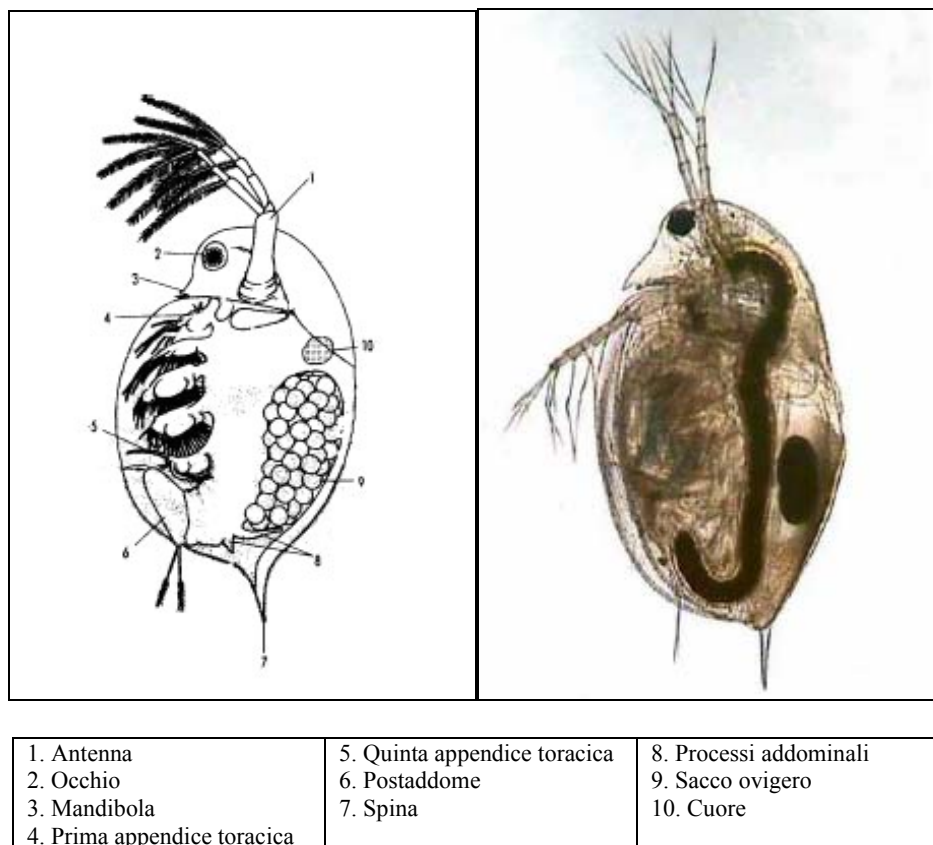


Figura 5. Schema e fotografia di una *daphnia* (x 4)

La produzione dei maschi sembra essere indotta principalmente dalla diminuzione del cibo. Ciò può indurre la comparsa di uova di origine sessuale (embrioni) che vengono emesse nella muta seguente: in questo caso la progenie prende il nome di *ephippio*. Sembra che lo spostamento verso la produzione dei maschi e quindi, la produzione dell'uovo sessuale, sia da mettere in relazione con il rapporto metabolico del genitore. Di ciò, può essere responsabile qualsiasi fattore che tende ad abbassare il metabolismo.

*Ruvinsky et al.*¹⁵ ritengono che il genoma dell'animale abbia sviluppato due programmi basati su una identica serie di cromosomi. La programmazione della femmina è sotto il controllo di una ampia serie di condizioni mentre, la programmazione del maschio è controllata da specifici stimoli ecologici. Le uova da cui si sviluppano i maschi e le femmine hanno una identica serie di cromosomi. La determinazione del sesso è basata su cambiamenti della

¹⁵ Ruvinsky, 1986, 57:15-22

struttura della cromatina, infatti ogni qualvolta la madre riceve uno specifico segnale che indica condizioni di adattamento estreme inizia la riproduzione sessuale.

Gli *ephippi* sono molto piccoli (2-3 mm), pesano pochissimo, possono essere essiccati e conservati per lunghi periodi il che li rende facilmente trasportabili. Possono essere spediti, in busta, come dei semi. Al loro arrivo possono essere incubati, per alcuni giorni, in acqua ad una temperatura adeguata¹⁶.

La *daphnia* è preda di molti predatori ed ha sviluppato difese di comportamento e morfologiche antipredatorie da rendere difficile la loro cattura e il loro consumo.

Daphnia ha trovato un buon alimento nelle alghe che hanno un elevato contenuto di proteine e carboidrati, però il cibo preferito è costituito da batteri.

Il tipo di alimento e la sua abbondanza influiscono sul tasso riproduttivo e sulla sensibilità verso i tossici^{17, 18}.

Il ciclo biologico di *daphnia*, dal rilascio dell'uovo fino alla morte dell'adulto è molto variabile e dipende dalle specie e dalle condizioni ambientali. In generale la durata aumenta con il diminuire della temperatura per l'abbassamento della sua attività metabolica. La durata media è di circa 40 giorni a 25°C e di 56 giorni a 20°C.

5.3 Scopo della prova

Il presente protocollo descrive un metodo per determinare la tossicità acuta con *Daphnia magna* di: a) sostanze chimiche che, negli stati di prova, sono solubili oppure che sono in sospensione o dispersione stabile; b) effluenti industriali o di scarichi, trattati o non trattati, dopo decantazione, filtrazione o centrifugazione; c) acque superficiali o freatiche.

5.4 Principio del metodo

Determinazione della concentrazione iniziale che in 24h, in condizioni definite (o standard) dalla presente norma internazionale, immobilizza il 50% delle *Daphnie magna* esposte.

La prova è eseguita in una o due fasi: una prova preliminare e una prova definitiva.

¹⁶ Shwartz e Hebert, 1987, 17: 373-379

¹⁷ Ganf, 1983, 34:755-773

¹⁸ Hadas *et al.*, 1983, 102:163-169

5.5 Uso del kit. Procedura operativa

5.5.1 Preparazione dell'acqua ISO Standard

Materiali: 1 matraccio da 2000 mL

1 set di ISO Medium (quattro flaconcini di sali concentrati contenuti nel kit)

- a) riempire, parzialmente, un matraccio da 2000 mL con circa 1000 mL di acqua pura (acqua deionizzata, MilliQ, bidistillata ...);
- b) stappare il flaconcino numero 1 (NaHCO_3) e versare il contenuto nello stesso matraccio;
- c) ripetere questa operazione con il flaconcino 2 (CaCl_2), il flaconcino 3 (MgSO_4) e il flaconcino 4 (KCl), rispettando la sequenza. Chiudere, quindi, il matraccio ed agitare bene per omogeneizzare (**Figura 6**).

5.5.2 Conservazione dell'ISO Standard

Se la prova è effettuata il giorno stesso della preparazione dell'acqua ISO Standard la soluzione può essere messa in frigorifero ($4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) al buio.

Attenzione: prima dell'uso stabilizzare l'acqua ISO Standard alla temperatura di $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

5.5.3 Pre-areazione dell' ISO Standard

L'acqua ISO Standard deve essere areata per almeno 15 minuti prima di essere utilizzata, per la schiusa degli *ephippi* e per la preparazione dell'acqua di diluizione del tossico di riferimento $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

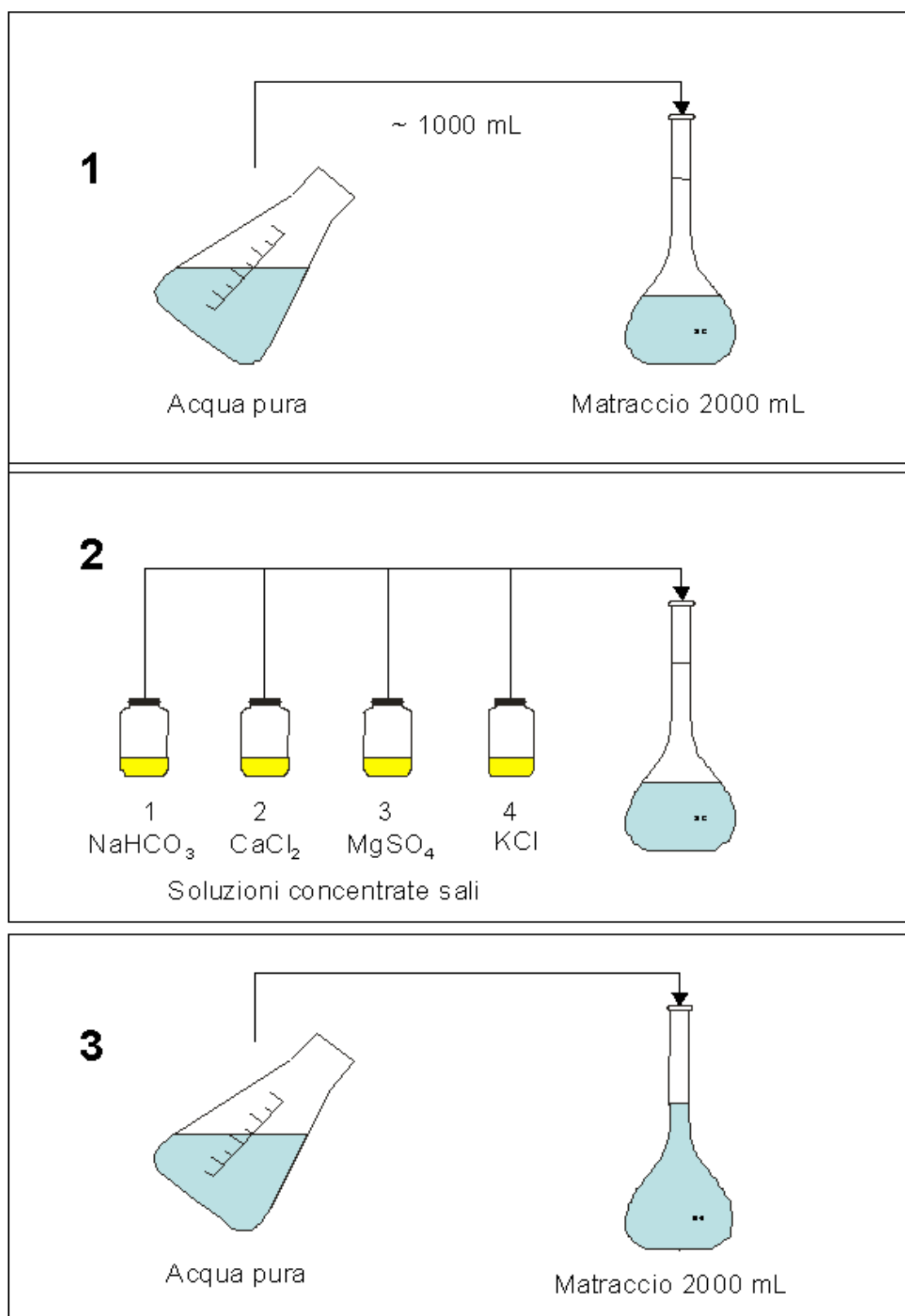


Figura 6. Preparazione dell'acqua ISO Standard

5.6 Schiusa degli *ephippi*

La schiusa degli *ephippi* deve iniziare tre giorni prima dell'allestimento della prova di tossicità, in un volume di acqua ISO Standard di 50 mL.

5.6.1 Procedimento per la schiusa

Per la schiusa degli *ephippi* bisogna (**Figura 7**):

- a) areare l'acqua ISO Standard, come indicato in precedenza;
- b) trasferire, dopo areazione, 50 mL di acqua ISO Standard in una piastra di Petri (Ø 10 cm). Attendere che la temperatura si stabilizzi a $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- c) versare quindi il contenuto della fiala, con gli *ephippi*, nel microsetaccio (che è contenuto nel kit); assicurarsi che tutti gli *ephippi* siano trasferiti dalla fiala, in cui sono contenuti, alla piastra di Petri (ci si può aiutare aggiungendo piccole dosi di acqua del rubinetto);
- d) risciacquare accuratamente gli *ephippi*, contenuti nel microsetaccio, sotto un filo d'acqua del rubinetto per eliminare tutte le tracce del liquido di mantenimento;
- e) rovesciare, quindi, il setaccio con gli *ephippi* sciacquati nella piastra di Petri lavandolo con 50 mL di acqua ISO Standard, precedentemente stabilizzata alla temperatura di $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per aiutare il distacco degli stessi.
- f) coprire la piastra di Petri, con il proprio coperchio, ed incubare per 72h alla temperatura di $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. L'illuminazione continua sarà compresa tra 6000 – 8000 lux (l'intensità luminosa sarà misurata sulla superficie dell'acqua contenuta nella piastra).

Nota: la maggiore schiusa si avrà tra le 72h – 80h di incubazione. I neonati non devono, prima dell'inizio della prova, avere più di 24h di vita; gli organismi dovranno, comunque, essere raccolti entro le 90h dall'inizio della prova.

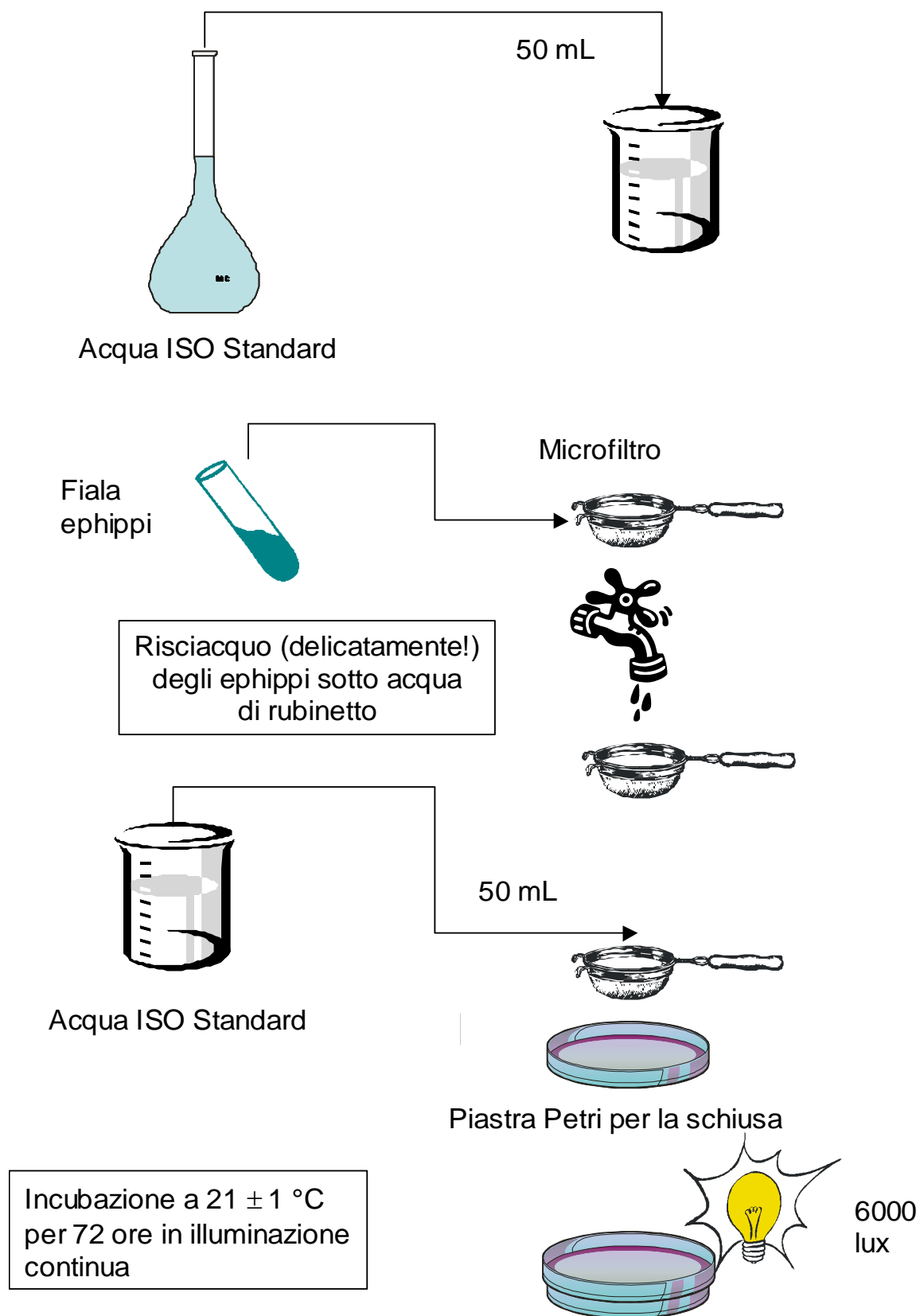


Figura 7. Schiusa degli ephippi

Nota: questo protocollo non prevede pre-alimentazione degli organismi neonati e la prova si svolge in 24h. Si ricorda che, al contrario, i neonati di *Daphnia magna* provenienti dagli allevamenti nascono in un ambiente in cui è presente del cibo per cui prima di essere prelevati per la prova hanno l'opportunità di alimentarsi. Questo cibo garantisce a loro una "riserva energetica" e previene la mortalità per fame (che pregiudicherebbe i risultati della prova) in una prova a 48h, senza nutrimento.

Per tale motivo, anche l'esecuzione di una prova di tossicità acuta a 48h con neonati provenienti da *ephippi* prevede la pre-alimentazione: due ore prima della prova viene somministrata una sospensione di microalghe *Spirulina* (sono contenute nel kit).

5.7 Prova per il controllo, interno, dell'acqua pura adoperata (Prova n° 1)

5.7.1 Procedimento

Ogni piastra multipozzetto è fornita di 4 pozzetti per il controllo e di 4 pozzetti per ogni concentrazione del tossico (**Figura 8**).

I multipozzetti del kit sono, inoltre, provvisti sul lato sinistro di una colonna di "pozzetti per il risciacquo". Si procede quindi nel seguente modo:

- a) si estrae dal frigorifero l'acqua ISO Standard e dopo averla areata (come descritto al punto 5.1.3), si preleva una aliquota di 120 mL che deve, prima di essere adoperata, essere stabilizzata a $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. L'ISO Standard non utilizzata va riposta in frigorifero, al buio.
- b) si trasferiscono 10 mL di acqua ISO Standard in ognuno dei pozzetti della Fila X (pozzetti di Risciacquo A, B, C e D) e in ogni pozzetto della Fila 1 (pozzetti di Risciacquo A, B, C e D);
- c) si trasferiscono almeno 20 neonati nei pozzetti di risciacquo della Fila X e della Fila 1;
- d) si prelevano 5 neonati dai rispettivi pozzetti della Fila X (A, B, C e D) e dalla Fila 1 (A, B, C e D).

Nota: nel protocollo che accompagna il DaphtoxKit, la Fila 1 è normalmente adoperata per la più bassa concentrazione del tossico. Nel nostro caso è, invece, utilizzata come replica dei controlli.

- e) si mette ad incubare, la piastra, come descritto nel paragrafo 5.12.

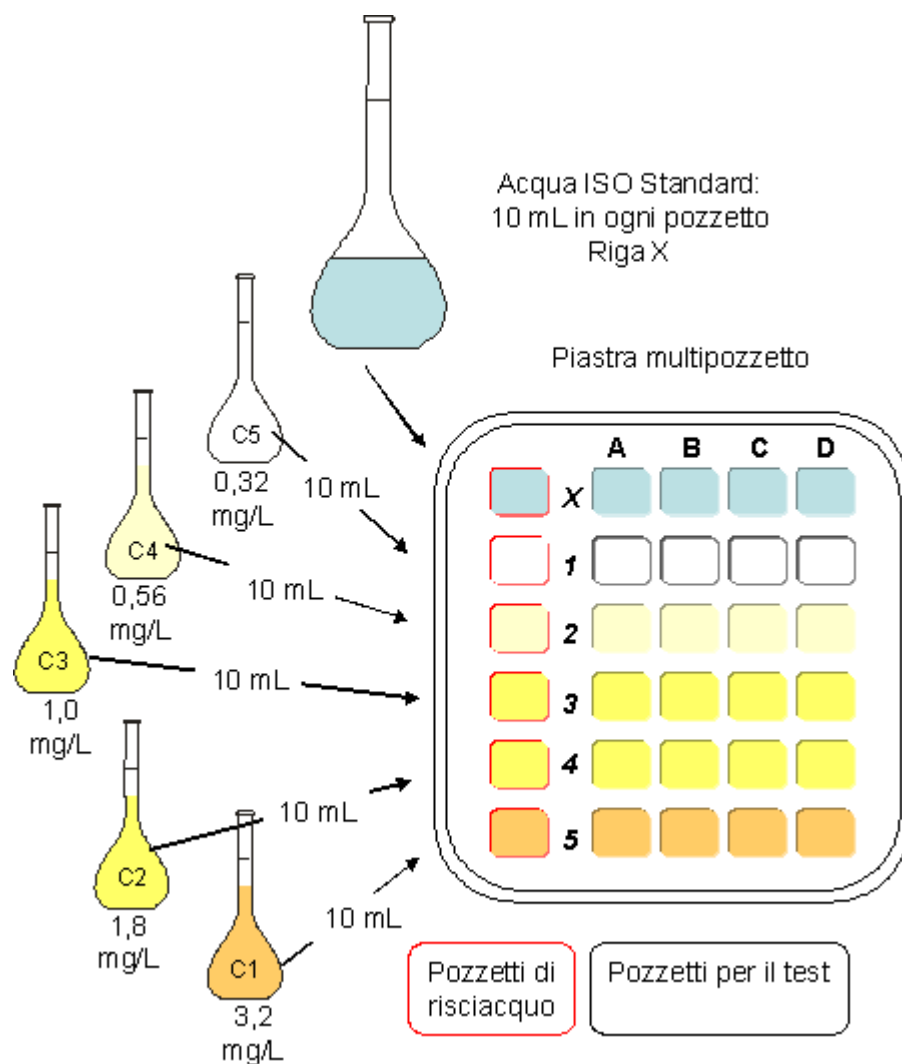


Figura 8. Riempimento della piastra multipozzetto.

5.8 Accettabilità della prova di controllo

Dopo 24h dall'inizio della prova, al buio, alla temperatura di $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ la percentuale di immobili non deve essere superiore al 10% del totale degli organismi messi a prova. Per la lettura della prova e per l'interpretazione dei dati, vedere il paragrafo 5.13.

Se la percentuale di immobili è $> 10\%$ l'acqua utilizzata per la preparazione dell'acqua ISO Standard NON è adatta e dovrà essere cambiata.

5.9 Prova con il bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$)

Si devono preparare una serie di diluizioni che vanno da 3.2 mg/L a 0.32 mg/L di $K_2Cr_2O_7$ (**Figura 9**).

Materiali: matraccio tarato da 1000 mL
 matracci da 100 mL
 2 pipette graduate
 1 pesata da 100 mg/L di bicromato di potassio

5.9.1 Procedimento

- a) Prendere 1 matraccio da 1000 mL e 6 matracci da 100 mL. Etichettare il matraccio da 1000 mL come “**Stock 1**”, il primo matraccio da 100 mL come “**Start 10 mg/L**” e gli altri come **C1**, **C2**, **C3**, **C4** e **C5**.
- b) Versare 500 mL di acqua pura nel matraccio “**Stock 1**” e rovesciare la pesata di bicromato di potassio, risciacquare il contenitore della pesata, sempre con acqua pura, agitare per sciogliere il bicromato; portare, quindi, a volume fino a 1000 mL con acqua pura agitando, di tanto in tanto. Trasferire 10 mL della soluzione “**Stock 1**” nel matraccio contrassegnato “**Start 10 mg/L**” portando a volume (100 mL) con acqua ISO Standard, agitando (la concentrazione del tossico è pari a 10 mg/L di bicromato di potassio). Riporre la “**Stock 1**” in frigorifero alla temperatura di circa $4^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, al buio.
- c) Trasferire i seguenti volumi della soluzione del tossico “**Start 10 mg/L**” negli altri matracci, da 100 mL, precedentemente preparati.

- A) 32 mL nel matraccio **C1** -----→ 3,2 mg/L di bicromato di potassio
- B) 18 mL nel matraccio **C2** -----→ 1,8 mg/L di bicromato di potassio
- C) 10 mL nel matraccio **C3** -----→ 1,0 mg/L di bicromato di potassio
- D) 5,6 mL nel matraccio **C4** -----→ 0,56 mg/L di bicromato di potassio
- E) 3,2 mL nel matraccio **C5** -----→ 0,32 mg/L di bicromato di potassio

Aggiungere in ciascun matraccio acqua ISO Standard fino alla gradazione di 100 mL, chiudere i matracci e agitarli per omogeneizzare le soluzioni.

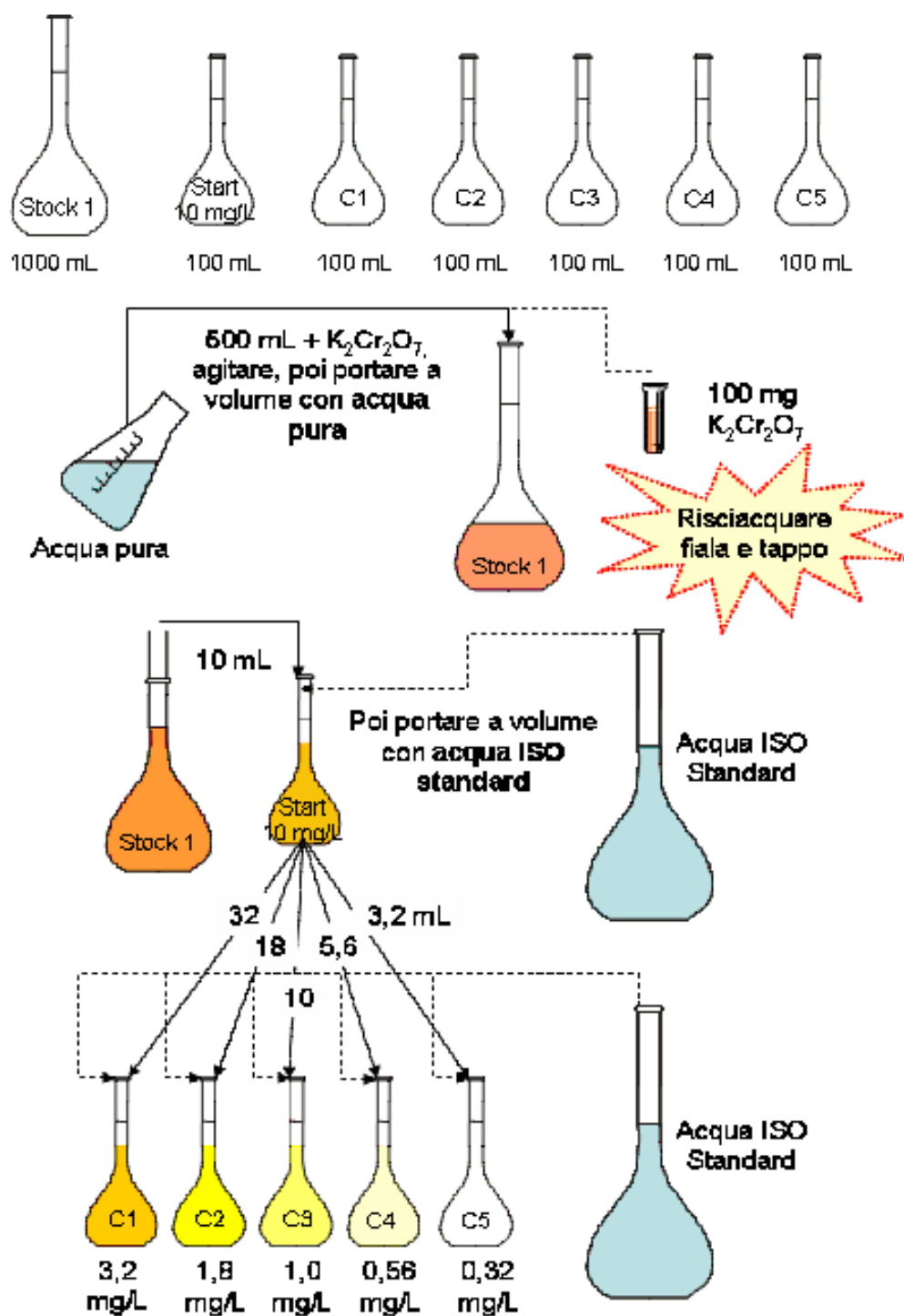


Figura 9. Preparazione del $K_2Cr_2O_7$

5.10 - Riempimento della piastra multipozzetto

Per una valutazione statisticamente accettabile degli effetti, ogni concentrazione da saggiare e il controllo negativo devono essere analizzati in 4 repliche. Ogni piastra multipozzetto è

fornita di 4 pozzetti per il controllo negativo e di 4 pozzetti per ogni concentrazione di tossico (vedere Figura 8).

I pozzetti presenti sul lato sinistro, come in precedenza detto, sono “pozzetti di risciacquo” il cui compito è di minimizzare la diluizione del tossico durante il trasferimento degli organismi dalla piastra di Petri al multipozzetto.

I pozzetti di ogni colonna sono indicati come **A**, **B**, **C** e **D** e le File sono indicate come **X** (controlli), **1**, **2**, **3**, **4** e **5** per le cinque diluizioni del tossico, **in sequenza inversa rispetto alle concentrazioni dei matracci**.

5.10.1 Procedimento

Trasferire 10 mL di acqua ISO Standard in ogni pozzetto della Fila X (controllo) e 10 mL della rispettiva diluizione di tossico in ogni pozzetto della corrispondente Fila, in sequenza crescente della concentrazione di tossico (partendo, quindi, dalla più diluita, matraccio **C5**, fino alla più concentrata, matraccio **C1**. (vedere Figura 8)

5.11 - Trasferimento dei neonati nei pozzetti

Il trasferimento dei neonati di *daphnia* nei pozzetti è effettuato con l'aiuto di una micropipetta. A causa delle dimensioni dei piccoli di *daphnia*, questo trasferimento si effettua normalmente con l'aiuto di stereomicroscopio per dissezione a basso ingrandimento (per esempio, 10x) o con altro mezzo che possa creare un contrasto tra le *daphnie* puntiformi, bianche, e la fonte di luce (**Figura 10**).

Il trasferimento dei neonati è effettuato in due tempi:

- a) trasferimento dei neonati dalla piastra di Petri ai pozzetti di risciacquo della piastra multipozzetto (prima colonna a sinistra);
- b) trasferimento dei neonati dai pozzetti di risciacquo ai 4 pozzetti di prova della Fila corrispondente.

5.11.1 Procedimento

A) mettere la piastra di Petri con i neonati sul portaoggetti dello stereomicroscopio per dissezione o su altro mezzo che può creare contrasto;

B) trasferire almeno 20 neonati (vivi) in ogni pozzetto di risciacquo nella sequenza: **Fila X** (controllo), **Fila 1**, **Fila 2**, **Fila 3**, **Fila 4** e **Fila 5** (in ordine di aumento delle concentrazioni del tossico);

C) spostare la minor quantità possibile di liquido dalla piastra di Petri ai pozzetti e, dopo ogni trasferimento, risciacquare accuratamente la micropipetta con un po' di acqua ISO Standard che dovrà essere preparata prima in un beaker;

D) mettere la piastra sul portaoggetti, del microscopio e trasferire esattamente 5 neonati da ogni pozzetto di risciacquo, nei 4 pozzetti di ogni Fila corrispondente.

Questo trasferimento sarà effettuato nella sequenza d'incremento della concentrazione da saggiare.

Nota importante: galleggiamento, in superficie, degli organismi della prova

I *daphnidi* possono essere intrappolati dal fenomeno della “tensione superficiale” del liquido. Se ciò accade, possono essere incapaci di liberarsi e possono morire.

Per evitare “il galleggiamento in superficie” che può danneggiare seriamente il risultato dell'analisi biologica, è molto importante, durante il trasferimento dei neonati nei pozzetti, mettere la punta della micropipetta nel liquido e non appoggiare gli organismi sulla superficie dello stesso.

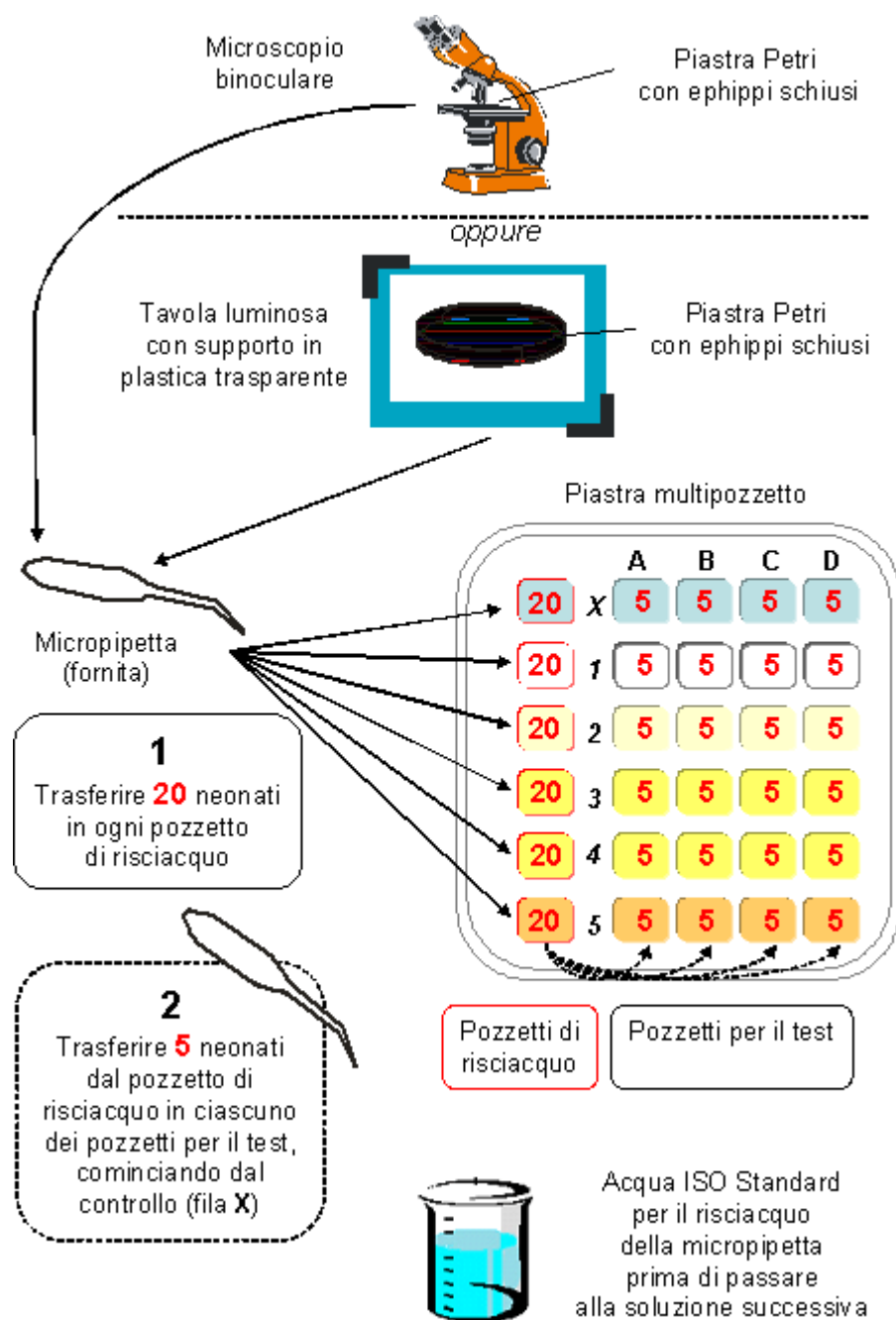


Figura 10. Riempimento della piastra multipozzetto

5.12 Incubazione del multipozzetto

5.12.1 Procedimento

Dopo aver trasportato le *daphnie* si mette una striscia di parafilm sul multipozzetto e si chiude con il coperchio. Il multipozzetto si mette quindi ad incubare a $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, al buio.

5.13 Registrazione dei risultati

5.13.1 Procedimento:

Dopo 24 ore d'incubazione, si può procedere all'osservazione della piastra multipozzetto con l'aiuto del microscopio o semplicemente sul supporto trasparente della tavola luminosa.

A questo punto sul foglio dei risultati si registra il numero di neonati immobili in ciascun pozzetto e per ogni concentrazione di tossico e si calcola il numero totale degli immobili, la media delle repliche e la percentuale d'effetto (**Figura 11**).

NB. Sono considerati immobili se giacciono sul fondo e non riprendono a nuotare entro 15 secondi dalla stimolazione, effettuata picchiando leggermente sulla piastra multipozzetto con la punta del dito.

Immobili = totale dei morti + i non morti ma che giacciono sul fondo e non sono più in grado di nuotare.

Esposti (n° in ogni pozzetto ad inizio prova)					Risultati (n° immobili dopo 24h)					Totale immobili (n° %)	
Pozzetti	A	B	C	D	Pozzetti	A	B	C	D		
Fila X (acqua ISO Standard)					Fila X						
Fila 1 (0,32 mg/L bicromato)					Fila 1						
Fila 2 (0,56 mg/L bicromato)					Fila 2						
Fila 3 (1,00 mg/L bicromato)					Fila 3						
Fila 4 (1,8 mg/L bicromato)					Fila 4						
Fila 5 (3,2 mg/L bicromato)					Fila 5						

Figura 11. Foglio dei risultati.

5.14 Validità della prova

Il test viene considerato valido se:

- la percentuale di immobili nel controllo negativo è $\leq 10\%$;
- il valore di EC_{50} stimato è compreso tra 0,6 e 2,1 mg/L di $K_2Cr_2O_7$ (anche graficamente dal modulo semilogaritmico oppure tramite altro di calcolo).

5.15 Stima dell'EC₅₀

Tra i procedimenti usati per calcolare la concentrazione che produce l'effetto del 50 % (EC₅₀), il più semplice si avvale del “metodo di interpolazione grafica” che consiste nel riportare su di un grafico con scala semilogaritmica l'effetto percentuale (asse x) e le corrispondenti concentrazioni usate nella serie di diluizioni del tossico (asse y). Unendo i punti si ottiene una linea spezzata sulla quale si fa intersecare la verticale “50% d'effetto”; da questo punto d'intersezione, tracciando la retta orizzontale sull'asse y, si ottiene il valore dell'EC₅₀ (**Figura 12**).

Sebbene questo metodo risulti semplice e fornisca valori di EC₅₀ attendibili, ha a sua volta lo svantaggio di non dare intervalli di confidenza. Per ovviare a questo limite si può ricorrere al “metodo Probit” facendo uso di software quale, ad esempio, quello fornito dall'EPA (EPA Probit Analysis Program version 1.5) e del quale viene riportato un esempio di foglio di calcolo in **Allegato 1**.

TOXKIT

Modulo di Interpolazione grafica

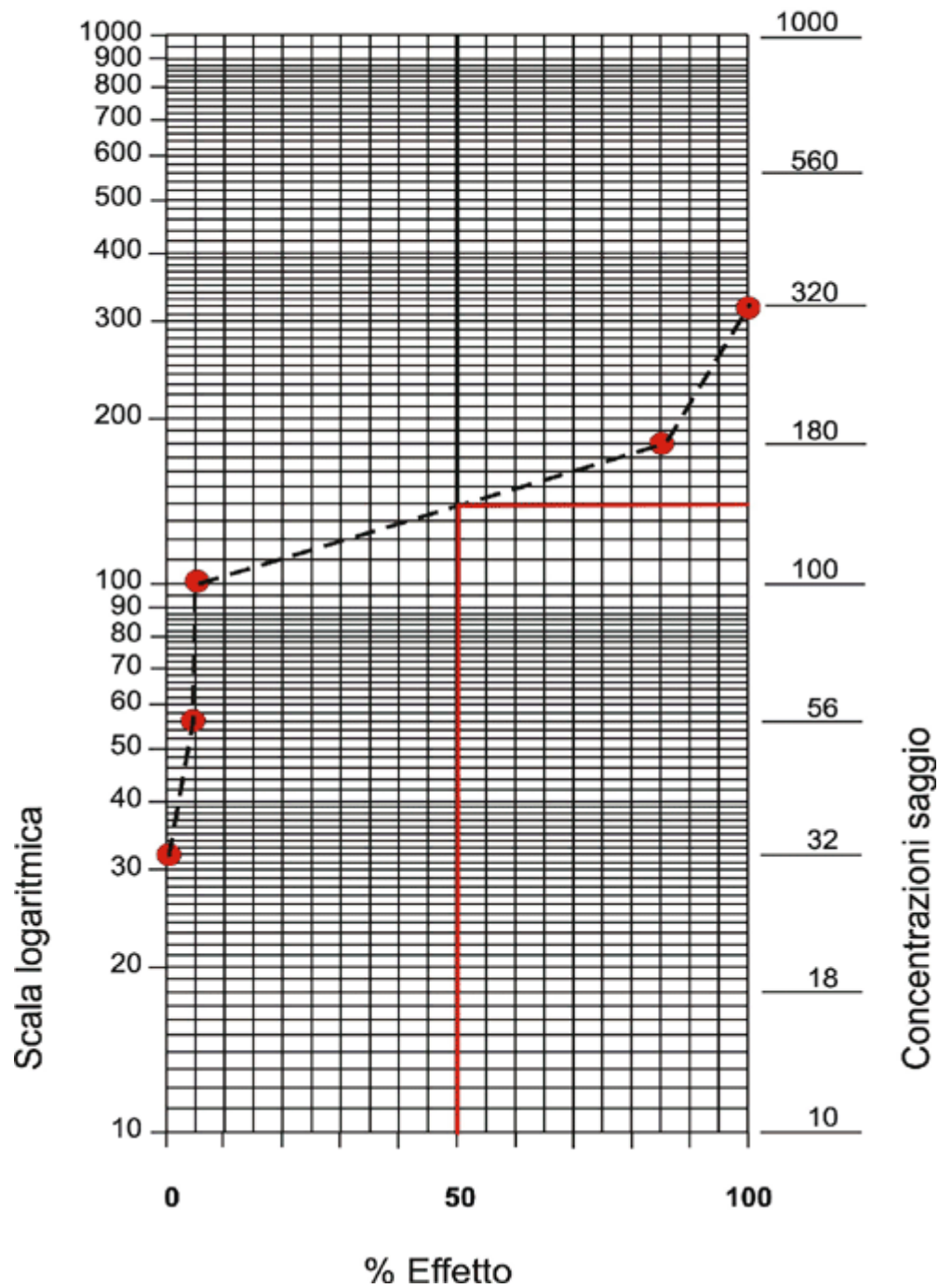


Figura 12. Metodo di interpolazione grafica per il calcolo dell' EC_{50} .

6. CONCLUSIONI

Il Decreto legislativo 152/99 considera il test di tossicità acuta con *Daphnia magna* una procedura obbligatoria per l'analisi delle acque superficiali e fognarie come riportato nell'estratto della seguente tabella¹⁹:

Tabella 3. Valori limiti di emissione in acque superficiali e in fognatura.

Numero parametro	Sostanze	unità di misura	Scarico in acque superficiali	Scarico in rete fognatura
51	Saggio di tossicità acuta (5)		Il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 50% del totale	il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 80% del totale

*“5. Il saggio di tossicità è obbligatorio. Oltre al saggio su *Daphnia magna*, possono essere eseguiti saggi di tossicità acuta su *Ceriodaphnia dubia*, *Selenastrum capricornutum*, batteri bioluminescenti o organismi quali *Artemia salina*, per scarichi di acqua salata o altri organismi tra quelli che saranno indicati ai sensi del punto 4 del presente allegato. In caso di esecuzione di più test di tossicità si consideri il risultato peggiore. Il risultato positivo della prova di tossicità non determina l'applicazione diretta delle sanzioni di cui al Titolo V, determina altresì l'obbligo di approfondimento delle indagini analitiche, la ricerca delle cause di tossicità e la loro rimozione.”*

Nel Laboratorio di Ecotossicologia dell'APAT il test, eseguito con il kit, ha fornito risultati equiparabili a quelli ottenuti con *Daphnia magna* di allevamento (II Interconfronto Nazionale con *Daphnia magna*, APAT 2004). Rispetto a quest'ultimo, l'uso del kit presenta il vantaggio tecnico di fornire organismi pronti, che non necessitano di alimentazione (per il test di tossicità acuta) e del controllo dei parametri chimico-fisici dell'acqua di allevamento (durezza, pH ecc.). Tale caratteristica, all'apparenza banale, è di grande rilevanza per la validità del test, visto che gli organismi di allevamento possono essere suscettibili di variabilità che, data la riproduzione partenogenetica, può portare, gli stessi, anche alla deriva genetica.

Possiamo quindi affermare che il kit rappresenta uno strumento valido ed affidabile per i test di tossicità acuta ed è allo stesso tempo uno strumento più economico dell'allevamento in quanto non richiede la quotidiana presenza del personale di laboratorio ed abbrevia notevolmente i tempi necessari per ottenere *daphnie* pronte per il test.

¹⁹ D.lgs. 152/99, All. 5, Tab. 3, n°51 e nota n°5

BIBLIOGRAFIA

Baudo R., 2003, Principi di ecotossicologia. CNR-Istituto per lo studio degli ecosistemi, Università di Sassari, pp. 286., p.9-10.

Baudo R., Sbalchiero A., Beltrami M., II° Interconfronto con *Daphnia magna*, APAT 2004.

Bengtson, B.E. 1972. A simple principle for dosing apparatus in aquatic systems. Arch. Hydrobiol. 70:413-415.

Bishop, W.E., R.D. Cardwell, and B.B. Heidolph, eds. 1983. Aquatic toxicology and hazard assessment. Proceedings of the sixth annual symposium on aquatic toxicology. ASTM STP 802, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Buikema, A.L. 1983. Inter- and intralaboratory variation in conducting static acute toxicity tests with *Daphnia magna* exposed to effluents and reference toxicants. American Petroleum Institute, API Publ. 4362, Washington, D.C.

Buikema, A.L. and J. Cairns, Jr., eds. 1980. Aquatic invertebrate bioassays. ASTM STP 715, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Cairns, J. Jr., K.L. Dickson, and A.W. Maki, eds. 1978. Estimating the hazard of chemical substances to aquatic life. ASTM STP 657, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Cairns, J., Jr. and D.I. Mount. 1990. Aquatic toxicology. Environ. Sci. Technol. 24(2):154-161.

Colombo, A., Bonfanti, P., Urani, C., Bernardini, G., Vismara, C., Presutti, C. e Camatini, M. 1993. Biological models for toxicology research. Proceedings International Congress on Health Effects of Hazardous Waste, Atlanta, 39-45. Academic Press, New York.

Decreto Legislativo 11 maggio 1999, n. 152, “Testo aggiornato del D. Lgs 152/99 recante: “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” a seguito delle disposizioni correttive ed integrative di cui al decreto legislativo 18 agosto 2000, n. 258”, *G.U.* n. 246 del 20 ottobre 2000 - Supplemento Ordinario n. 172.

Eaton, J.G., R.R Parrish, and A.C. Hendricks, eds. 1980. Aquatic toxicology. Proceedings of the third annual symposium on aquatic toxicology. ASTM STP 707, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

ECETOC. 1993a. *Environmental Hazard Assesment of Substances*: 89 pp.

ECETOC. 1993b. *Aquatic Toxicity Data Evaluation*. ECETOC: 64 pp.

EPA/600/4-90/027F, october 2002, “Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms” (Fifth Edition), pp. 81-85.

Finney, D.J. 1964. Statistical method in biological assay. 2nd ed. Hafner Publ. Company, New York, New York. 668 pp.

ISO 6341/98, Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Acute toxicity test.

Kenaga, E.E. 1982. Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 1(4):347-348.

Mayer, F.L. and J.L. Hamelink, eds. 1977. Aquatic toxicology and hazard evaluation. Proceedings of the first annual symposium. ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Moriarty, F. 1983. *Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems*. Academic Press: 289 pp.

Pearson, J.G., R.B. Foster, and W.B. Bishop, eds. 1982. Aquatic toxicology. Proceedings of the fifth annual symposium on aquatic toxicology. ASTM STP 766, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Persoon, G. e Janssen, C. R. 1993. Freshwater invertebrate toxicity test. *Handbook of Ecotoxicology*, 1, 51-65.

Ramade, F. 1977. *Écotoxicologie*. Masson: 205 pp.

Sartori, F. *Bioindicatori Ambientali*, Fondazione Lombardia per l'Ambiente, 1998, 5:246-250.

Stephan, C.E. 1977. Methods for calculating an LC50. In: F.L. Mayer and J.L. Hamelink, eds., Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania. pp. 65-84.

Stephan, C.E. 1982. Increasing the usefulness of acute toxicity tests. In: J.G. Pearson, R.B. Foster, and W.E. Bishop, eds., Aquatic Toxicity and Hazard Assessment. ASTM STP 766, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania. pp. 69-81.

Timbrell, J.A. 1992. *Principles of Biochemical Toxicology*. Taylor & Francis, London, 2nd Edition: 416 pp.

Truhaut, R. 1977. *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. Ecotoxicol. Environ. Safety, 1: 151-173.

Walker, C.H., S.P. Hopkin, R.M. Sibly and D.B. Peakall. 1996. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, London: 321 pp.

ALLEGATO 1

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES Version 1.5

Daphnia magna

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted Proportion Responding
0.3200	20	0	0.0000	0.0000	0.0011
0.5600	20	1	0.0500	0.0500	0.0504
1.0000	20	9	0.4500	0.4500	0.4379
1.8000	20	18	0.9000	0.9000	0.9113
3.2000	20	20	1.0000	1.0000	0.9976

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 0.113

Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815

Mu = 0.026514

Sigma = 0.169600

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits	
Intercept	4.843668	0.205066	(4.441739,	5.245597)
Slope	5.896214	1.076585	(3.786107,	8.006320)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

Daphnia magna

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.429	0.250	0.564
LC/EC 5.00	0.559	0.373	0.695
LC/EC 10.00	0.644	0.460	0.780
LC/EC 15.00	0.709	0.529	0.845
LC/EC 50.00	1.063	0.900	1.256
LC/EC 85.00	1.593	1.336	2.142
LC/EC 90.00	1.753	1.448	2.462
LC/EC 95.00	2.021	1.625	3.037
LC/EC 99.00	2.637	2.002	4.539

Daphnia magna

PLOT OF ADJUSTED PROBITS AND PREDICTED REGRESSION LINE

