

**Interconfronto internazionale in metodi
ecotossicologici sui rifiuti.**

Test di inibizione dello sviluppo algale

Dr. Gianpaolo Sabia

**Tutor: Dr.ssa Stefania Balzamo
Cotutor: Dr.ssa Daniela Conti**

Abstract

The algal bioassay, performed by using mono-cells algae, is a reliable index capable of providing for answers useful for the environmental monitoring activities, for the impact prevision of the civil sewage or for the estimation of the recovering degree as a consequence of a previous alteration.

Algae represent fundamental components of water ecosystems: in fact they are on the basis of the grazing organisms and producing oxygen, by means the photosynthetic process, contribute to the auto-clearing of rivers, lakes and coastal water that occurs through several oxidation processes.

The algal essay analyzes the toxic effect of a chemical substance that can cause a partial or global inhibition of the medium growth on different generations of an algal clone. The method is simply based on the comparison between the growth of an algal population in a normal medium (control), and the growth of an algal population of the same species located in a cultural medium with increasing toxic concentrations of the compound in analysis. The effect of the toxic species (growth inhibition) is evaluated on the basis of the growth of the not-toxic medium and is reported in terms of inhibition percentage of the growth. This parameter is to be used for calculating EC₅₀ defined, in general, as the molar concentration of an agonist, which produces 50% of the maximum possible response for that agonist.

The difficulty in performing some test typologies as well as standardising by International Bodies, has led to the research and the development of alternative methodologies that result in alternative and cheaper technologies. From this point of view, the Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution, has developed a rapid algal inhibition bioassay, the ALGATOXKIT.

The ALGATOXKIT makes use of microalgae which are immobilized, as algal beads in a special matrix in which they can survive for several months without losing their viability. The algae are activated on demand prior to performance of the toxicity test. This precludes the necessity of maintaining algal medium in an exponential growth phase as expected by classic method.

The parameter used to evaluate the algal growth inhibition is the algal suspension absorbance at 670 nm (peak of chlorophyll absorbance). The ALGATOXKIT makes use of a new type of

test vials, which are long cells with a 10 cm path length and can contain 25 mL algae toxicant volume. These cells can be used as tank for sample incubation too.

To test the ALGATOXKIT reliability and sensibility, the Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution, has proposed an international intercalibration exercise. Laboratories which have taken place to this exercise, 35 as a whole, have received the ALGATOXKIT, and the test has been realized by the use of $K_2Cr_2O_7$, as described in the manual. In this case, in the APAT laboratory has been executed the comparison between ALGATOXKIT and ISO 8692:2004 too. It has been performed trying to minimize the difference between the two applied methods: it has been used the same toxic concentrations and the samples have been prepared in the cells.

Cell density data have been treated to calculate the specific growth rate and the inhibition growth percentage. These values have been compared with another data set coming from a previous similar experiment conducted in APAT laboratories.

The use of cells as tanks where to prepare samples doesn't appear a reliable system for this bioassay. In fact the high pH variability, which has never been found earlier in similar experiments, is to indicate that the aeration is not enough good to ensure a right level of CO_2 in cells. More over, there is a plenty variation in the same sample replicates, as shown by the standard deviation calculated. This seems to be due to the cell position in the incubator and to the consequent light exposition difference.

Although ALGATOXKIT makes more rapid the sample readings at the spectrophotometer, the use of flasks seems preferable for sample preparation.

The EC50 calculation for ISO 2006 has resulted impossible to evaluate because the inhibition growth percentage has been too low, just 20%. For the ALGATOKIT, the EC50 value is 0,79. Also in this case it is to be underlined that anyway the maximum inhibition growth percentage achieved has been 55% and this means that the EC50 value calculated is not to be considered reliable.

EC50 value for $K_2Cr_2O_7$, as provided by ISO 8692:2004, is 1,19. It has been calculated in experiments conducted by international laboratories and are useful as comparison data to test the reliability of results coming from the application of ISO protocol.

It can be affirmed that the toxic concentration tested were thought just to realize ALGATOXKIT comparison more than evaluate a relation with other standardised methods.

Prefazione

Il saggio algale, eseguito con alghe verdi monocellulari, è un valido indice capace di fornire risposte utili nell'attività di monitoraggio ambientale, nella previsione dell'impatto sui recettori da parte degli scarichi idrici o ancora, nella stima del grado di recupero a seguito di una alterazione pregressa.

Le alghe rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici: esse sono alla base dell'alimentazione degli organismi consumatori e grazie all'ossigeno, prodotto mediante il processo fotosintetico, contribuiscono all'attività autopurificatrice dei corsi d'acqua, dei laghi e delle acque costiere che avviene attraverso vari processi di ossidazione.

Il saggio algale studia l'effetto tossico di una sostanza chimica che può causare una inibizione parziale o totale della crescita di una coltura sulle diverse generazioni di un clone algale. Il metodo si basa semplicemente sul confronto tra la crescita di una popolazione di alghe in un mezzo colturale normale, che funge da controllo, e quella di popolazioni della stessa specie poste in mezzo colturale con concentrazioni crescenti del composto tossico in esame. L'effetto del tossico (l'inibizione della crescita) viene valutato in riferimento alla crescita della coltura di controllo ed espresso come percentuale di inibizione della crescita stessa. Tale dato permette la stima del parametro EC50 definito in generale come la concentrazione mediana efficace in relazione alla quale si osserva un determinato effetto sul 50% della popolazione.

La difficoltà di effettuare alcune tipologie di test così come standardizzati da Organismi internazionali, ha spinto verso la ricerca e lo sviluppo di metodiche alternative più facilmente eseguibili e a costi minori. In tale ottica, presso l'Università del Belgio (Ghent), il Laboratorio per la Ricerca Biologica nell'Inquinamento Acquatico ha sviluppato un saggio rapido per la stima della inibizione della crescita algale, il saggio di tossicità ALGATOXKIT.

L'ALGATOXKIT utilizza microalghe che sono immobilizzate, sotto forma di "palline" ("algal beads") in una matrice particolare in cui possono sopravvivere per diversi mesi senza perdere la loro vitalità. Le alghe sono riattivate al momento dell'esecuzione della prova. Tale elemento preclude la necessità di mantenere in laboratorio colture algali in fase esponenziale di crescita così come previsto dalle metodiche classiche.

Il parametro utilizzato per la valutazione della inibizione della crescita algale è l'assorbanza della sospensione algale effettuata ad una densità ottica di 670 nm (picco di assorbimento della clorofilla). L'ALGATOXKIT fornisce quindi, per la lettura allo spettrofotometro, celle dal

percorso ottico di 10 cm dal volume complessivo di 25 ml, che vanno utilizzate anche come recipienti per l'incubazione dei campioni.

Al fine di testare la sensibilità e l'affidabilità dell'ALGATOXKIT, il Laboratorio per la Ricerca Biologica nell'Inquinamento Acquatico ha proposto un esercizio di Interconfronto Internazionale. I laboratori che hanno pertanto aderito a tale iniziativa, 35 in totale, hanno ricevuto l'ALGATOXKIT, e la prova di tossicità è stata eseguita, come stabilito e precisato nel protocollo dell'interconfronto, allestendo l'esercizio con il tossico di riferimento dicromato di potassio. Nel caso specifico presso i laboratori dell'APAT è stato effettuato il confronto dell'ALGATOXKIT anche con la metodica prevista dall'ISO 8692:2004. L'esperimento è stato eseguito cercando di minimizzare le differenze tra le due procedure: sono state usate le stesse concentrazioni di bicromato e i campioni sono stati preparati nelle celle.

I dati di densità cellulare ricavati sono stati elaborati per la determinazione del tasso di crescita specifico e l'inibizione percentuale della crescita. Tali valori sono stati raffrontati anche con una altra serie di valori ricavati da analisi analoghe effettuate presso gli stessi laboratori dell'APAT.

L'uso delle celle da spettrofotometria quali recipienti per l'allestimento dei campioni non appare un sistema particolarmente adatto per l'effettuazione del test. Le ampie variazioni di pH rilevate in entrambi i test, non riscontrate nel corso di esperimenti analoghi condotti in precedenza presso i laboratori APAT, indicano che l'aerazione delle culture non risulta ottimale. Inoltre nelle repliche dei campioni allestiti anno si sono riscontrati valori di densità algale molto variabili, come evidenziato dalle deviazioni standard delle medie delle concentrazioni delle sospensioni algali. Tale variabilità appare chiara specialmente nel raffronto con dati a disposizione dell'APAT ricavati da esperimenti analoghi.

Dalle osservazioni realizzate nel corso delle sperimentazioni, risulta verosimile attribuire la variabilità nelle repliche, al differente posizionamento delle celle in incubatore da cui deriverebbe una dissimile esposizione alla luce e quindi una differenziazione nella crescita algale.

Sebbene il sistema che prevede l'uso delle celle, velocizza i tempi della lettura della densità ottica allo spettrofotometro, per l'incubazione dei campioni risulta preferibile l'uso delle beute.

Per quanto riguarda il calcolo dell'EC₅₀, per la prova ISO 2006 non è stato possibile il calcolo visto che la massima inibizione della crescita algale riscontrata è stata pari al 20%.

Per l'ALGATOXKIT il valore di EC₅₀ calcolato è risultato pari a 0,79. Va detto che comunque tale dato non risulta particolarmente attendibile poiché per le concentrazioni di bicromato testate la massima inibizione della crescita algale è stata pari al 55%.

Nel protocollo ISO 8692:2004 in cui sono riportati con lo scopo di fornire ai laboratori che applicano la metodica, termini di paragone su cui poter saggiare la precisione dei risultati ottenuti, il valore di EC₅₀ per il bicromato di potassio è pari a 1,19.

Visto lo scopo dell'esercizio, appare plausibile che le concentrazioni suggerite per l'effettuazione del test siano state pensate più per saggiare la validità e ripetibilità del metodo ALGATOXKIT, che per effettuare un confronto con altre metodiche standardizzate.

Indice sommario

Prefazione

1 Introduzione

1.1 Cenni di ecotossicologia	1
1.2 Inquinamento e destino ambientale degli inquinanti	2
1.3 Destino ambientale degli inquinanti ed interazioni con il biota	3
1.4 Siti d'azione e metodologie di studio della ecotossicologia	6
1.5 Test di tossicità	8
1.6 Il saggio algale	12

2 Interconfronto internazionale della prova con “<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>” (già <i>Selenastrum capricornutum</i>) - Test di inibizione dello sviluppo algale a 72h con il dicromato di potassio, tossico di riferimento.	14
---	-----------

2.1 Test di inibizione dello sviluppo algale a 72h.	14
2.2 ALGATOXKIT	15
2.3 Organismi per i saggi	18
2.4 Modalità operative	19
2.5 Trattamento dei dati	20
2.6 Risultati	21
2.6.1 Inibizione della crescita algale	27

3 Discussione e conclusioni	29
------------------------------------	-----------

4 Allegato I e II	34
--------------------------	-----------

5 Bibliografia	37
-----------------------	-----------

1 Introduzione

1.1 Cenni di ecotossicologia

L'ecotossicologia è una disciplina che analizza la circolazione degli inquinanti, nei biotopi e nelle comunità biologiche, con la finalità di comprendere le conseguenze ambientali della loro azione sulla struttura e sul funzionamento dei sistemi ecologici naturali (Marchini S., 2005). A tale scopo, tale disciplina si avvale delle metodologie proprie della tossicologia e applica i principi dell'ecologia e della chimica ambientale per fornire inoltre, in ottica previsionale, una valutazione del rischio ambientale di nuove sostanze o situazioni di potenziale inquinamento.

Nella valutazione dei rischi, un esame tossicologico preliminare alle analisi chimiche, può dare indicazioni utili per incanalare gli studi ambientali nella giusta direzione, e, per la sua funzione di segnalazione precoce, consentire di individuare un rischio prima ancora che si siano resi palesi danni al biota (Baudo R., 2003).

Anche il monitoraggio degli inquinanti fa parte dei più importanti settori dell'ecotossicologia; esso si avvale dei bio-indicatori di accumulo e di indicatori biologici aventi una particolare sensibilità a determinati inquinanti degli ecosistemi terrestri o acquatici.

La tossicologia ambientale, permette di ricavare, dalle analisi condotte sulle varie matrici ambientali, informazioni realistiche ed affidabili relativamente all'effettivo potenziale tossico in quanto (Marchini S., 2005):

- risponde a tutte le sostanze presenti (conosciute e non) ed alle interazioni tra esse, a differenza delle analisi chimiche che danno informazioni solo sulle sostanze cercate e su quelle presenti in concentrazioni rilevabili analiticamente;
- ingloba il fenomeno della biodisponibilità (la mera presenza di un tossico non indica necessariamente un rischio per il biota);
- integra gli effetti complessivi di tutti i fattori biotici ed abiotici presenti e delle interazioni tra essi e le sostanze tossiche presenti;
- tiene conto della proprietà delle sostanze di bioaccumularsi nei tessuti degli organismi.
- mette in luce condizioni di tossicità non rese palesi dall'analisi chimica o ecologica oppure conferma la presenza di tossicità in un'acqua di qualità chimica/ecologica scarsa;
- segnala l'eventuale presenza di fonti puntiformi o diffuse di inquinamento non note;

- indica la tendenza verso una riduzione della tossicità, controllando così l'efficacia di un intervento di risanamento.

1.2 Inquinamento e destino ambientale degli inquinanti

Oggetto dell'indagine ecotossicologica sono, in particolare, le sostanze introdotte nell'ambiente per opera dell'uomo quali i contaminanti, gli inquinanti e gli xenobioti. Tali termini hanno un'accezione specifica che li distingue così come si evince dalle seguenti definizioni (Moriarty F., 1983):

- contaminante : una sostanza rilasciata dalle attività dell'uomo;
- contaminazione: la conseguenza di una azione umana capace di modificare le proprietà delle condizioni o la disponibilità e la qualità delle risorse in un determinato intervallo di spazio e di tempo. Nel caso di un contaminante l'effetto nocivo non è implicito ma può manifestarsi;
- inquinante: una sostanza che è presente nell'ambiente, almeno in parte, quale risultato delle attività umane e che ha un effetto deleterio sugli organismi viventi;
- inquinamento: quando si ha un danno misurabile a carico di un sistema biologico, allora la contaminazione ambientale diviene inquinamento;
- xenobiota: una sostanza estranea o un materiale che non è prodotto in natura e normalmente non è considerato un componente di uno specifico sistema biologico. Questo termine viene in genere applicato alle sostanze chimiche di sintesi.

In generale gli inquinanti possono essere distinti in inorganici ed organici (Fig. 1).

<u>Contaminanti inorganici</u>	<u>Contaminanti organici</u>
<i>Metalli volatili (As, Pb, Hg)</i>	<i>Volatili non alogenati</i>
<i>Metalli non volatili (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mg, Ni, Zn)</i>	<i>Volatili alogenati</i>
<i>Amianto</i>	<i>Semivolatili non alogenati</i>
<i>Materiali radioattivi</i>	<i>Semivolatili alogenati</i>
<i>Corrosivi inorganici (HCl, H₂SO₄, HNO₃)</i>	<i>Pesticidi</i>
<i>Cianuri inorganici</i>	<i>Policlorobifenili PCB</i>
	<i>Cianuri organici</i>

Figura 1

Appartenenti alla categoria dei contaminanti inorganici sono ad esempio i metalli, in generale difficilmente biodegradabili che dimostrano, per questo, lunghi tempi di ritenzione nei vari comparti ambientali.

Gli inquinanti inorganici, una volta immessi nell'ambiente, tendono ad associarsi a particelle solide (suolo o sedimenti), ed aumentano in tal modo il loro tempo di residenza. Tuttavia, in alcuni casi, componenti inorganici possono reagire con composti organici (come ad esempio il mercurio, che per metilazione diventa metilmercurio), e cambiare le proprie caratteristiche chimico fisiche risultando, in tal modo, più facilmente assimilabili per il biota.

La persistenza degli isotopi radioattivi è, invece, funzione del loro spontaneo decadimento a isotopi stabili, ed è quindi determinata dalle rispettive semivite, che variano da pochi secondi o giorni a migliaia o milioni di anni (Baudo R., 2003).

Con il termine di "composti organici" si indicano tutti quei composti che contengono carbonio (con l'eccezione del monossido e del biossido di carbonio). Esistono milioni di combinazioni di composti con il carbonio vista la capacità di formare legami stabili con se stesso, nonché con gli atomi di idrogeno, ossigeno e azoto. I composti con solo carbonio e idrogeno hanno una bassissima polarità. Con l'introduzione nella molecola di gruppi funzionali -OH, -CH=O o -NO₂, tali composti tendono ad acquistare una carica elettrica e diventano tanto più reattivi quanto più aumenta la loro polarità. Con la presenza di particolari gruppi funzionali, i composti organici aumentano la capacità di interagire con il metabolismo degli esseri viventi ed eventualmente di produrre effetti tossici (Baudo R., 2003).

1.3 Destino ambientale degli inquinanti ed interazioni con il biota

Le sostanze chimiche di origine antropogenica possono entrare nei vari comparti ambientali attraverso fonti puntiformi, quali uno scarico industriale o civile, o da fonti diffuse, quali il dilavamento e l'erosione di terreni agricoli trattati con pesticidi o la deriva aerea durante l'applicazione di pesticidi con erogatori spray (Colin B., 2001). Il comportamento, la distribuzione, il destino, la degradazione delle sostanze chimiche nell'ambiente dipendono sia dalle loro specifiche caratteristiche fisico-chimiche che da quelle del sistema ambientale ricevente (pH e potenziale di ossidoriduzione, temperatura, concentrazione dell'ossigeno), che determineranno in ultimo, le concentrazioni di sostanza cui i diversi organismi saranno esposti. In ambienti idrici ad esempio, il trasporto di contaminanti in forma disciolta darà

luogo a diluizione e diffusione delle sostanze nella colonna d'acqua, mentre l'adsorbimento su particolato farà sì che esse si leghino ai solidi sospesi ed alla frazione solida dei sedimenti. Questi ultimi, nel caso di contaminanti persistenti, andranno a costituire nel tempo, serbatoi di accumulo di queste sostanze ed al tempo stesso fonti durevoli di emissione nel corpo idrico.

Una volta immessi nell'ambiente, quindi, i vari prodotti chimici, in funzione delle interazioni con le componenti abiotiche e biotiche, e, attraverso reazioni chimiche, biochimiche, metaboliche, subiscono trasformazioni che ne modificano le proprietà chimico fisiche e questo comporta variazioni delle caratteristiche ecotossicologiche.

Nel valutare gli effetti di una sostanza potenzialmente tossica, particolarmente importante risulta essere la forma con cui l'agente chimico si presenta nel comparto ambientale in analisi ossia se allo stato liquido, solido o gassoso. Ciò infatti determina la via di esposizione e quindi la modalità di assunzione dell'inquinante da parte degli organismi che può essere per inalazione (vie respiratorie: gas, vapori, polveri), per ingestione (tratto gastro-intestinale: solidi e liquidi) o per via topica (superficie di contatto) (C.H. Walker *et al.*, 1996).

In generale, in un modello estremamente semplificato (Fig. 2), l'interazione di un inquinante con un organismo dipende da bilancio tra assunzione ed escrezione e, all'interno dell'organismo stesso, da meccanismi di movimento, interazione e biotrasformazione (Baudo R., 2003).

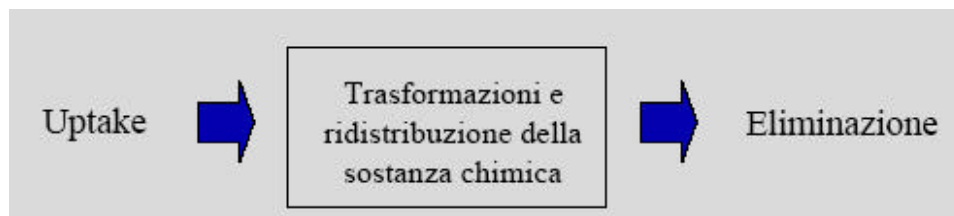


Figura 2- Modello di interazione inquinante-organismo

Si possono distinguere quattro tipi di siti:

1. siti dell'azione tossica: dove la forma tossica dell'inquinante interagisce con una macromolecola endogena (quale una proteina o il DNA) o una struttura (ad esempio la membrana), così da portare alla manifestazione di un effetto tossico.
2. siti del metabolismo: comprende il complesso di enzimi che metabolizzano il composto xenobiotico, solitamente riducendone la tossicità (detossificazione), ma in alcuni casi significativi al contrario attivando la tossicità di un composto inizialmente atossico, o potenziando quella di un composto inizialmente meno tossico di quanto siano i suoi metabolici.

3. siti di immagazzinamento: il composto viene conservato in forma inerte dal punto di vista tossicologico.
4. siti di escrezione: attraverso specifici meccanismi, il prodotto di partenza o i suoi metaboliti o coniugati viene eliminato dall'organismo (escrezione nell'urina o in altri fluidi come lacrime, saliva, latte, sudore, ecc.).

Per alcune sostanze, per le quali l'assorbimento supera l'escrezione, si osserva un bioaccumulo, nell'intero corpo o in particolari parti. Il bioaccumulo di una sostanza è espressione della sua tendenza a ripartirsi nel biota piuttosto che in altre matrici ambientali (come acqua o materia organica) e fa sì che essa, anche se presente nell'ambiente a basse dosi, possa raggiungere la concentrazione critica negli organi bersaglio.

Alcune sostanze tendono ad accumularsi in particolari siti/tessuti all'interno dell'organismo creando veri e propri depositi di tossico. Nel caso di sostanze lipofile la ripartizione tra acqua e grasso del biota è riconosciuto come principale meccanismo di accumulo nel tessuto adiposo, come è noto per i bifenili policlorurati (PCB) e i pesticidi organoclorurati (per esempio il DDT). Altro esempio di sostanza accumulabile è il piombo che va a sostituire il calcio nelle ossa (C.H. Walker *et al.*, 1996).

Attraverso il processo di accumulo la sostanza viene in parte sottratta alla distribuzione nel corpo, diminuendo la concentrazione al sito/organo bersaglio e quindi i potenziali effetti tossici, ma allo stesso tempo viene sottratta anche ai processi di eliminazione. Ne risulta una lunga permanenza di alte concentrazioni delle sostanze nell'organismo che nel tempo possono essere lentamente rilasciate dai siti di deposito. Durante periodi di stress (digiuno, gravidanza), la sostanza può essere smobilizzata con rapidità dal tessuto adiposo e raggiungere nel sangue concentrazioni tali da comportare effetti tossici che possono essere diretti, indiretti o ritardati (European Chemical Bureau, 2003).

Ulteriore complessità (e fattore di rischio) deriva dal fatto che i contaminanti possono essere trasferiti, attraverso la catena alimentare, da prede contaminate ai livelli trofici più alti fino ai predatori apicali e all'uomo (Baird C., 2001) si parla di avvelenamento secondario quando si verifica esposizione indiretta alla sostanza, per esempio nel caso di uccelli o mammiferi che si nutrono di pesci contaminati, e di biomagnificazione qualora la sostanza si accumuli in misura sempre maggiore lungo la catena trofica. Tale fenomeno diviene rilevante specialmente per le sostanze persistenti ed accumulabili (Colin B., 2001),

1.4 Siti d'azione e metodologie di studio della ecotossicologia

Affinché una sostanza possa produrre effetti tossici sul biota e quindi possa influenzarne metabolismo e fisiologia, essa deve risultare biodisponibile (presente in uno stato in cui può essere assorbita dall'organismo), e deve raggiungere una parte sensibile, per un sufficiente tempo di esposizione, con una concentrazione sufficientemente elevata.

L'interazione di una sostanza tossica col sito d'azione comporta effetti sui sistemi biologici, che possono essere valutati a diversi livelli di organizzazione, dalla cellula all'intero ecosistema ambientale (Marchini S., 2005).

L'importanza di una valutazione tossicologica a livello cellulare risiede nel fatto che idealmente una alterazione a questo livello scatena una serie di eventi tossici che culminano in una alterazione a livello di ecosistema. L'effetto si manifesterà a livelli superiori solo se i processi di regolazione e modificazione cellulare saranno tali che i meccanismi tossici superino i processi adattativi e quindi la capacità di risposta protettiva (che porta a fenomeni di compensazione e tolleranza).

Gli effetti che si valutano a livello cellulare sono essenzialmente alterazioni di tipo biochimico. L'induzione delle monoossigenasi dipendenti dal citocromo P450 (che sono coinvolte nel metabolismo degli xenobioti) può essere utilizzata come biomarcatore della contaminazione ambientale e servire come sistema di allarme precoce per l'esposizione a classi di sostanze (PCBs, PAHs) (McCarthy JF *et. al.*, 1990).

A livello del nucleo le sostanze chimiche possono manifestare la loro azione genotossica legandosi alle molecole di DNA (principalmente alle basi nucleotidiche) dando luogo alla formazione di addotti al DNA, che causano problemi ad esempio nella duplicazione. Un'altra importante risposta cellulare è la sintesi delle cosiddette "proteine stress", che si verifica rapidamente in seguito all'esposizione a diversi agenti disturbanti ambientali tra cui il calore, virus, l'esposizione a contaminanti chimici organici e metalli pesanti. Le "proteine stress" conferiscono resistenza e tolleranza agli organismi e il loro potenziale uso come strumento diagnostico tossicologico risiede nel fatto che il tipo di induzione è diverso a seconda del tipo di agente disturbante.

A livello del singolo organismo si considerano gli endpoint ecotossicologici che misurano effetti sulla fisiologia, morfologia/anatomia, comportamento, quali mortalità, inibizione del movimento, della crescita e della riproduzione, alterazioni istologiche o lesioni di organi,

effetti teratogeni, alterazioni comportamentali (della fototassi, nuoto, corteggiamento). Salve poche eccezioni, le linee guida per la conduzione dei test tossicologici fanno riferimento all'utilizzo di un numero limitato di individui appartenenti ad una singola specie, aventi caratteristiche uniformi (età, peso, dimensioni, ecc.) al fine di ridurre la variabilità degli effetti osservati e garantire la riproducibilità dei risultati (Marchini S., 2005).

A livello di popolazione si utilizzano indici di performance quali la densità di popolazione, la sua struttura per classi di età, il tasso intrinseco di crescita (r) ed il tasso intrinseco del turnover della biomassa (P/B). Per esempio, poiché gli stadi giovanili sono in genere più sensibili ad un insulto chimico, una variazione nella distribuzione delle classi di età verso una popolazione più vecchia può indicare una situazione di stress anche se in natura fluttuazioni nella dimensione della popolazione e struttura di età sono fisiologiche e sono anche influenzate da interazioni preda-predatore (Baudo R., 2001). Il tasso r dipende dalle caratteristiche degli organismi (tasso di nascita e mortalità, età alla riproduzione e numero di eventi riproduttivi) mentre il tasso P/B misura la produttività della popolazione, cioè il tasso a cui viene prodotta la biomassa, in relazione alla biomassa presente (Bacci E. *et al.* , 1998). La produzione di biomassa può essere un parametro ecologicamente più rilevante della produzione di un certo numero di individui, specie dal punto di vista del suo ruolo nella catene trofiche.

Agli effetti diretti sugli individui di una popolazione faranno seguito effetti indiretti sulla comunità da attribuire ad alterate interazioni tra specie (competizione, mutualismo, relazioni preda - predatore), che conducono ad alterazioni della sua struttura. Salendo a livello di comunità, un comune parametro utilizzato per indicare la salute dell'ecosistema è la sua struttura, intesa come diversità e distribuzione delle specie presenti, che viene misurata generalmente come numero delle specie presenti. Ad alterazioni della struttura della comunità possono far seguito effetti sulla rete trofica ed in ultima analisi alterazioni delle sue funzioni.

Ancora, a livello ultimo di ecosistema, i parametri misurati sono quelli che descrivono la struttura e la funzione sia nei comparti biotici che in quelli abiotici. La struttura può essere investigata nei suoi vari aspetti fisici, chimici, genetici e di informazione. Lo studio della funzione utilizza parametri di flusso, quali flusso di energia, di materia (elementi e composti chimici, nutrienti), e di informazione (tra comparti biotici, all'interno degli organismi, tra comparti biotici ed abiotici). Si investigano, tra l'altro, alterazioni nella produttività di materia organica dell'ecosistema, respirazione della comunità, rapporto produttività/biomassa, durata

di vita degli organismi, comparto abiotico (per esempio, ciclo dei nutrienti), catene trofiche, tasso di recupero (Bacci E. *et al.* , 1998).

Tutti i parametri summenzionati relativi ai diversi livelli di organizzazione biologica rappresentano endpoint ecotossicologici, che si misurano in sistemi sperimentali di complessità crescente per valutare gli effetti derivanti dall'esposizione a sostanze tossiche. A livello sperimentale sono stati sviluppati diversi sistemi modello (microcosmi, mesocosmi, corsi d'acqua artificiali) che simulano ecosistemi naturali o porzioni di essi per valutare gli effetti sugli ecosistemi.

1.5 Test di tossicità

La stima della tossicità di un agente chimico viene effettuata tramite l'allestimento di test di tossicità, in cui secondo piani sperimentali si prevede di sottoporre alcuni soggetti a dosi crescenti di una sostanza e di rilevare diversi end point (parametri che esprimono l'intensità dell'effetto), dai più immediati (mortalità), ad altri quali 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 verificano gli effetti di una certa dose (misurata come peso della dose) 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 (peso per unità di volume) nell'acqua o nel mezzo circostante (C.H. Walker *et al.*, 1996)

I test di tossicità permettono di determinare, sulla base del confronto statistico tra esposti e controlli, curve che descrivono la relazione causa-effetto in funzione della concentrazione dell'esposizione (riferita al mezzo di somministrazione) (Fig.3).

In particolare è possibile identificare una “soglia” (threshold) minima (A), al di sotto della quale non si osserva una mortalità statisticamente significativa, alla quale corrisponde una concentrazione NOEL (livello al quale non si osserva un effetto). La concentrazione LOEL è invece il livello minimo per il quale viene osservato un effetto statisticamente significativo. Con la sigla LC50 viene indicata la concentrazione mediana letale ossia la concentrazione in grado di provocare la morte del 50 % degli organismi esposti.

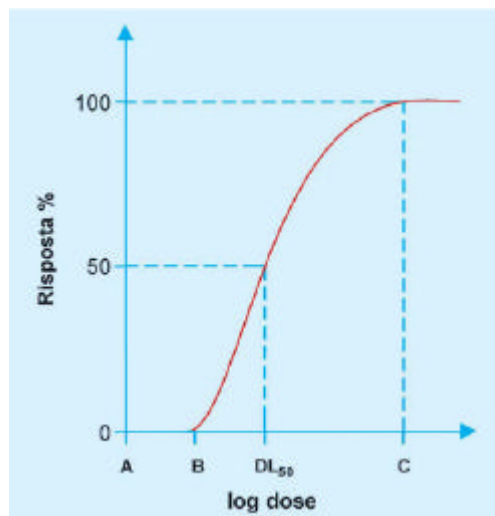


Figura 3- Grafico dose-risposta

Le seguenti quantità, conosciute collettivamente sotto il nome di *ED* o *EC* (Effective Doses o Effective Concentrations), sono frequentemente usate per descrivere i risultati di un test di tossicità (Baudo R., 2001):

- LD50: dose letale mediana, cioè la dose che uccide metà della popolazione saggiata;
- LC50: concentrazione letale mediana;
- ED50/EC50: dose/concentrazione mediana efficace, cioè la dose che produce un determinato effetto (non necessariamente la morte) sul 50% della popolazione;
- NOED/NOEC: No Observed Effect Dose/Concentration, cioè la dose che non produce effetti osservabili;
- LOED/LOEC: Lowest Observed Effect Dose/Concentration, cioè la dose minima che produce effetti osservabili.

In ecotossicologia le prove sperimentali possono essere basate sulla stima della tossicità acuta, subacuta o cronica (Colin B., 2001).

Per l'analisi della tossicità acuta si considerano 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. I test di tossicità

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

Con la stima della tossicità Subacuta (Subletale) si indagano invece, 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). Gli end point qui misurati sono la risposta dell'intero organismo (crescita, comportamento, patologia), oppure una risposta interna (biochimica, istologia, fisiologia).

La tossicità cronica, infine, riguarda gli effetti che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo > 50 % vita dell'organismo e 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.

Il risultato dei test di tossicità dipende da diversi fattori: nello schema sottostante (Tab. 1), sono descritte le variabili che influenzano i risultati dei test di tossicità e che occorre, quindi, valutare prima di esprimere un giudizio di tossicità, per non incorrere in errori di valutazione.

Fattori che influenzano i test di tossicità	Descrizione
Presenza di contaminanti sconosciuti	Non è detto che i contaminanti responsabili degli effetti tossici siano compresi tra quelli analizzati.
Eventuali interazioni tra sostanze	Fenomeni di sinergismo o di antagonismo, tra sostanze, che possono produrre effetti complessivi pari od inferiori alla somma degli effetti che produrrebbero le due o più sostanze, singolarmente.
Prodotti di degradazione (ammoniaca e solfuri)	Possono falsare i risultati essendo essi stessi tossici per alcuni organismi.
Caratteristiche fisiche della matrice del campione	Possono variare la biodisponibilità dei contaminanti. Campione acquoso: pH, salinità, temperatura. Campione di sedimento: granulometria, carbonio organico totale e contenuto di acqua

Tabella 1- Fattori che influenzano i test di tossicità

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 comportamento normale, essere appropriatamente alimentati, appartenere alla stessa specie ed alla stessa classe di età e presentare una bassa 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 di allevamento (temperatura, luce, rapporto organismi/volume del mezzo, tipo e quantità di alimentazione). 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 differenti. Infine, per garantire la sensibilità degli organismi rimanga inalterata generazione dopo generazione, è buona norma ripetere periodicamente il test con un tossico di riferimento. Un composto molto utilizzato è ad esempio il dicromato 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 (Baudo R., 2001).

I risultati dei test di tossicità sono in genere sufficientemente realistici, ma risultano 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). Si possono allora effettuare degli esperimenti più complessi, con esposizione contemporanea multispecie (più specie che convivono nello stesso sistema sperimentale, ad esempio microcosmi o canali artificiali; Gillett, 1989; Gearing, 1989). o, ancora, realizzare l'esposizione sul campo, utilizzando apposite enclosure (cioè delimitando fisicamente una parte dell'ecosistema, comprendente la comunità naturale del sito) e operando gli esperimenti in questi mesocosmi, nei quali le condizioni sono ancora parzialmente controllabili dallo sperimentatore. Il caso più complesso è quello in cui i test vengono

effettivamente condotti nell'ambiente allo studio, riducendo al minimo le manipolazioni (test in situ) e nei quali le condizioni rispecchiano quindi esattamente lo stato dell'ambiente.

Questo tipo di studi è quindi intermedio tra gli studi di laboratorio e l'esame estensivo dell'ambiente, realizzabile tramite il cosiddetto biomonitoraggio (Bacci E. *et al.* , 1998).

1.6 Il saggio algale

Il saggio algale, eseguito con alghe verdi monocellulari, è un valido indice capace di fornire risposte utili nell'attività di monitoraggio ambientale, nella previsione dell'impatto sui recettori da parte degli scarichi idrici o ancora nella stima del grado di recupero a seguito di una alterazione pregressa.

Le alghe rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici: esse sono alla base dell'alimentazione degli organismi consumatori e grazie all'ossigeno, prodotto mediante il processo fotosintetico, contribuiscono all'attività autopurificatrice dei corsi d'acqua, dei laghi e delle acque costiere che avviene attraverso vari processi di ossidazione.

L'ossigeno prodotto dalle alghe permette ai batteri di continuare a degradare le acque soggette ad inquinamento di origine organica che presentano, in genere, un basso contenuto di ossigeno disciolto proprio a causa dell'attività decompositiva dei batteri (C.H. Walker *et al.*, 1996).

La modificazione della comunità fitoplanctonica causata da effetti tossici può alterare la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema. Elevate concentrazioni di sostanze nutrienti (come sono i composti del fosforo e dell'azoto), in presenza di condizioni climatiche caratterizzate da un elevato irraggiamento solare e miti temperature, possono favorire crescite algali di notevole intensità tali da modificare gli ambienti acquatici alterandone profondamente le normali oscillazioni della concentrazione d'ossigeno disciolto e favorendo lo sviluppo di metaboliti tossici per numerose specie animali. L'eutrofizzazione risulta un fenomeno generalizzato, anche se gli effetti più evidenti si osservano nelle acque lacustri e nelle lagune costiere dove, in alcuni casi, essi assumono le dimensioni di vere e proprie crisi distrofiche.

Il saggio algale studia l'effetto tossico di una sostanza chimica che può causare una inibizione parziale o totale della crescita di una coltura sulle diverse generazioni di un clone algale. Il metodo si basa semplicemente sul confronto tra la crescita di una popolazione di alghe in un mezzo colturale normale, che funge da controllo, e quella di popolazioni della stessa specie

poste in mezzo colturale con concentrazioni crescenti del composto tossico in esame. L'effetto del tossico (l'inibizione della crescita) viene valutato in riferimento alla crescita della coltura di controllo ed espresso come percentuale di inibizione della crescita stessa. Tale dato viene poi utilizzato per il calcolo del parametro EC₅₀. Il saggio è un test cronico e oltre alla elevata sensibilità, ha il vantaggio di integrare la risposta di un gran numero di organismi (10^4 - 10^6 alghe/mL).

2 Interconfronto internazionale della prova con “*Pseudokirchneriella subcapitata*” (già *Selenastrum capricornutum*) - Test di inibizione dello sviluppo algale con il dicromato di potassio, tossico di riferimento.

2.1 Test di inibizione dello sviluppo algale.

Il saggio di inibizione algale, così come prescritto dalle metodiche standard, necessita della disponibilità di un clone algale in fase esponenziale di crescita. Questo comporta di dover mantenere in laboratorio una coltura di alghe, da rinnovare periodicamente, e garantire con estrema cura, opportune condizioni di temperatura, aerazione e asetticità.

La crescita di popolazioni di alghe monocellulari, poste nel mezzo di coltura liquido segue, di norma, una cinetica di 1° ordine:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

dove:

X = parametro che indica la crescita algale (biomassa, densità cellulare, ecc.);

μ = tasso specifico di crescita.

Il tasso specifico di crescita μ è influenzato da importanti fattori quali la luce, la temperatura, la disponibilità dei nutrienti e del biossido di carbonio (Baudo R., 2001).

Illuminazione: la crescita delle colture algali tende ad aumentare con l'intensità luminosa fino ad un livello di saturazione che dipende dalla specie algale, dalla temperatura, dalla disponibilità dei nutrienti e della CO₂. Nel saggio algale le condizioni d'illuminazione devono essere tali da consentire una crescita esponenziale.

Temperatura: la crescita delle colture algali tende ad aumentare con la temperatura fino a raggiungere quella ottimale oltre la quale la crescita decresce rapidamente. Le colture algali devono essere incubate (indicare T e grado di umidità) in camera termostata o frigotermostato a temperatura costante; va controllato l'incremento di temperatura dovuto alla sorgente luminosa.

Nutrienti: la crescita algale dipende dalle concentrazioni intracellulari dei nutrienti mentre non risulta legata alle concentrazioni degli stessi nutrienti nel mezzo. Nelle colture algali dove l'illuminazione e la disponibilità di CO₂ sono tali da non limitare la crescita algale, quest'ultima presenta un andamento esponenziale sino a quando vi sia una disponibilità bilanciata dei nutrienti nel mezzo di coltura. Dopo l'esaurimento di uno dei nutrienti (fosforo o azoto) nel mezzo di coltura la crescita algale continuerà grazie all'apporto delle riserve intracellulari ma tenderà via via a declinare man mano che la concentrazione intracellulare tenderà a ridursi.

CO₂ e controllo del pH: Le alghe monocellulari utilizzano come sorgente di carbonio prevalentemente la CO₂ presente nel mezzo acquoso. Nelle colture algali la densità cellulare può raggiungere rapidamente livelli elevati, con una richiesta di biossido di carbonio superiore alla diffusione del gas stesso nella fase liquida. In tali condizioni la richiesta di CO₂ in fase liquida determina il consumo del bicarbonato presente in soluzione, con spostamento del pH verso valori più alcalini, secondo la reazione seguente:



Tra le reazioni biochimiche che hanno luogo nelle colture algali anche l'utilizzazione di azoto inorganico è capace di alterare significativamente il pH del mezzo di coltura. Ad esempio l'assunzione di nitrato determina la produzione di ioni ossidrilici con incremento di pH:



Nel saggio algale le variazioni di pH devono essere ridotte al minimo. Risulta quindi sempre consigliabile assicurare il trasferimento del biossido di carbonio all'interno delle colture algali mediante agitazione continua o aereazione dell'ambiente di incubazione.

2.2 ALGATOXKIT

La difficoltà di effettuare alcune tipologie di test così come standardizzati da organismi internazionali, ha spinto verso la ricerca e sviluppo di metodiche alternative che risultassero più facilmente eseguibili e a costi minori. In tale ottica, presso l'Università del Belgio (Ghent), il Laboratorio per la Ricerca Biologica nell'Inquinamento Acquatico ha sviluppato un saggio rapido per la stima della inibizione della crescita algale, il saggio di tossicità ALGATOXKIT,

con il proposito di rispettare quanto definito dalle normative ISO 8692:2004 e dalle linee guida OECD 201.

Alcuni laboratori hanno, nell'ambito delle proprie strutture, eseguito test al fine di saggiare la sensibilità e ripetibilità dei risultati dell'ALGALTOXKIT nei confronti dei protocolli internazionali, con risultati incoraggianti (Vandenbroele M.C. *et.al.*, 2000) (Van der Wielen C.. *et.al.*, 2000).

Come già accaduto per i test Artoxkit M con *Artemia*, Rotoxkit F e Rotoxkit M con rotiferi d'acqua dolce e salata appartenenti al genere *Brachionus*, e ancora più recentemente con il test acuto Daphtoxkit F con *Daphnia magna* (Lucivjanska V *et al.*, 2000), che ha visto anche la partecipazione dell'APAT, il Laboratorio per la Ricerca Biologica nell'Inquinamento Acquatico ha proposto e organizzato un esercizio internazionale di calibrazione per l'ALGATOXKIT (Baudo *et al.*, 2004).

Tale esercizio di Interconfronto Internazionale ha avuto l'obiettivo di determinare la riproducibilità dell'ALGATOXKIT nei vari laboratori ed, inoltre, in via facoltativa, di comparare i risultati così ricavati con test classici di inibizione algale, quale ad esempio il protocollo EN ISO 8692:2004.

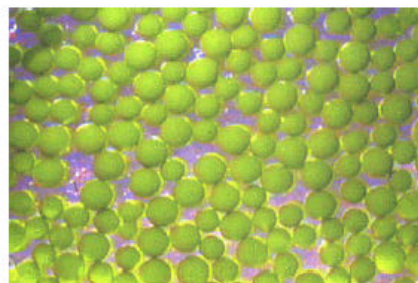
I laboratori che hanno pertanto aderito a tale iniziativa, 35 in totale, hanno ricevuto l'ALGATOXKIT, e la prova di tossicità è stata eseguita, come stabilito e precisato nel protocollo dell'interconfronto, allestendo l'esercizio con il dicromato di potassio, tossico di riferimento.



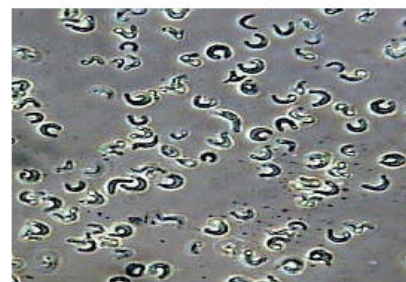
L'ALGATOXKIT contiene tutti i materiali, compresa la specie test *Pseudokirchneriella subcapitata* per condurre due accertamenti completi di inibizione algale, in accordo con i metodi standard accettati al livello internazionale.

L'ALGATOXKIT utilizza microalghe che sono immobilizzate, sotto forma di “palline” (“algal beads”) in una matrice particolare in cui possono sopravvivere per diversi mesi senza perdere la loro vitalità. Le alghe sono riattivate al momento dell'esecuzione della prova. Tale elemento preclude la necessità di mantenere in laboratorio colture algali in fase esponenziale di crescita così come previsto dalle metodiche classiche.

Il parametro utilizzato per la valutazione della inibizione della crescita algale è l'assorbanza della sospensione algale effettuata ad una densità ottica di 670 nm (picco di assorbimento della clorofilla). L'ALGATOXKIT fornisce quindi, per la lettura allo spettrofotometro, celle dal percorso ottico di 10 cm dal volume complessivo di 25 ml, che vanno utilizzate anche come recipienti per l'incubazione dei campioni.



Algal beads (2 mm)
> 1 million algal cells per bead



Algal cells

Complessivamente il kit comprende:

1. 1 manuale con le istruzioni operative dettagliate sulla modalità di esecuzione del test
2. 2 tubi contenenti le alghe in forma di palline.
3. 1 bottiglia di vetro con la soluzione necessaria per la riattivazione delle alghe.
4. 5 bottiglie contenenti soluzioni concentrate da usare per la preparazione del mezzo di coltura che risulta rispondente ai criteri previsti dalle linee guida OECD “Alga, growth inhibition test” e ISO/DIS 8692 “Water quality- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae”;
5. 2 celle per la calibrazione dello spettrofotometro e la lettura della densità ottica delle sospensioni algali. Il manuale fornisce anche una retta di regressione densità ottica/ numero di cellule per la lettura dell'assorbanza.
6. 2 set di celle per l'effettuazione del test.

Le concentrazioni di bicromato di potassio da testare sono state 1.0, 0.56, 0.32, 0.18, 0.1, mg/L. Secondo quanto previsto dalle procedure definite nell'ambito dell'esercizio di interconfronto, ciascun laboratorio deve inviare agli organizzatori il "Result Sheet" con tutti i dati delle misure giornaliere di densità ottica per ciascuna cuvette. Per i laboratori che hanno accettato di eseguire il saggio anche con una procedure differente dall'ALGATOXKIT lo stesso format va adattato e compilato con i dati delle misure giornaliere delle sospensioni algali per ciascuna cuvette (Allegati I e II).

Il trattamento dei dati ed il calcolo dell'EC₅₀ a 72h sarà effettuato dagli organizzatori.

2.3 Organismi per i saggi

L'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (o *Selenastrum capricornutum*) che ha la forma di mezza luna (40 a 70 µm³), appartiene alla famiglia delle *Chlorophyceae* ed è ubiquitaria in molte acque dolci. Quest'alga può essere facilmente coltivata in laboratorio ed è facilmente reperibile in commercio. Inoltre la crescita è piuttosto rapida (si può misurare accuratamente già dopo 72 ore di incubazione) e la specie è moderatamente sensibile alle sostanze tossiche. A differenza di altre alghe che hanno una struttura molto complessa adatta a formare colonie o catene, queste specie non possiedono strutture complesse. Per tutti questi motivi si prestano molto bene ad essere impiegate in test di tossicità.



2.4 Modalità operative

Qui di seguito si riporta uno schema che consente di mettere a confronto le due procedure adottate palesandone differenze e analogie operative (Tab.2).

Tabella 2- Confronto procedure ALGATOXKIT e ISO 8692:2004

Procedura prevista dall'ALGATOXKIT	Procedura ISO 8698:2004
	Preparazione del terreno di coltura algale Mantenimento clone algale in laboratorio: rinnovo periodico ogni 3-4 giorni Trattamento algale (24h prima del test): Prelievo di una aliquota dalla coltura algale in fase di crescita esponenziale da sottoporre a lavaggio e filtrazione (Precoltura)
Preparazione del terreno di coltura algale: uso soluzioni concentrate del kit Deimmobilizzazione alghe¹	
Preparazione Inoculo algale per il test: Conta delle cellule riattivate allo spettrofotometro e diluizione sospensione affinché il numero iniziale di cellule sia dell'ordine 10^4 cell/mL Preparazione delle concentrazioni di dicromato Trasferimento delle diluizioni alghe-tossico nelle celle: allestimento tre repliche per il controllo e per ogni concentrazione Misurazione pH Posizionamento delle cuvette nell'armadio termosatato: lux 6000-10000 a 23 ± 2 °C Lettura a 24, 48, 72 h Misurazione pH	Preparazione Inoculo algale per il test: Conta delle cellule dalla precoltura al contaparticelle e diluizione sospensione affinché il numero iniziale di cellule sia dell'ordine 10^4 cell/mL Preparazione delle concentrazioni di dicromato Trasferimento delle diluizioni alghe-tossico nelle celle²: Allestimento di 6 controlli e 3 repliche per ogni concentrazione (come previsto dalla ISO) Misurazione pH Posizionamento delle cuvette nell'armadio termosatato: lux 6000-10000 a 23 ± 2 °C Lettura a 24, 48, 72 h Misurazione pH
Criteri di validità del test La densità cellulare del controllo deve aumentare di almeno 67 volte al termine del test (72 ore). Il pH del controllo non deve variare più di 1,5 unità al termine del test.	Criteri di validità del test La densità cellulare del controllo deve aumentare di almeno 67 volte al termine del test (72 ore). Il pH del controllo non deve variare più di 1,5 unità al termine del test. Il coefficiente di variazione dei tassi di crescita specificidelle repliche del controllo non deve superare il 5%.

¹ Una volta deimmobilizzate le alghe, la prima lettura allo spettrofotometro (0h) va effettuata entro 30 minuti.

² La metodica ISO 8692:2004 prevede l'uso delle beute per l'allestimento dei campioni. Nel caso specifico, al fine di minimizzare le differenze tra le procedure applicate, anche per i campioni ISO, sia i 6 controlli che le varie diluizioni seriali sono stati preparati nelle cuvette.

Una volta preparate, le cuvette sono state messe in termostato in ordine random. Inoltre, come prescritto dal manuale, si è posta attenzione nel non incubare le varie repliche del controllo o delle diluizioni in posizioni adiacenti per compensare possibili piccole variazioni tra i campioni dovute alla posizione nel termostato e imputabili a piccole differenze della intensità luminosa. Giornalmente i campioni sono stati agitati per favorirne l'aerazione.

Per il conteggio delle sospensioni algali è stato utilizzato per la metodica ISO 8692:2004 il contatore di particelle mentre per l'ALGATOXKIT lo spettrofotometro. In questo caso è stato necessario effettuare la taratura dello spettrofotometro e ricavare una propria retta di regressione Assorbanza/ Numero di cellule : $Abs = 8,7531 \cdot 10^{-7} \cdot conc + 0,00476$ con $R^2 = 0,99928$.

2.5 Trattamento dei dati

Il protocollo ISO 8692:2004 suggerisce di esprimere i risultati secondo le seguenti modalità:

1. Tabulare le misure di densità cellulare o altri parametri ad essa correlati quali l'assorbanza rispetto le concentrazioni testate e i tempi di durata della prova
2. Tracciare la curva di crescita per ogni concentrazione e per il controllo, come grafico del logaritmo della concentrazione media di cellule in funzione del tempo. In questo modo se la curva risulta lineare la crescita algale ha andamento esponenziale, mentre una curva livellata implica che le colture hanno raggiunto la fase stazionaria.
3. Elaborare i dati e valutare per ogni singolo campione allestito, il tasso specifico di crescita m e l'inibizione percentuale I% secondo le seguenti formule:

$m = \frac{\ln C_f - \ln C_i}{T_f - T_i}$	$I\% = \frac{m_c - m_i}{m_c} * 100$
Ove: C _f = Concentrazione cellulare finale C _i = Concentrazione cellulare iniziale T _f -T _i = Tempo di durata della prova	Ove: m _c = tasso specifico del Controllo m _i = tasso specifico della diluizione di campione testata

I dati ottenuti (Abs, concentrazione algale) sono stati utilizzati per calcolare il valore di EC50.

I valori sono stati riportati su un grafico ponendo sull'asse delle ascisse le concentrazioni testate (mg/L, ln, ecc) e sull'asse delle ordinate il valore corrispondente all'effetto causato da ogni concentrazione testata (Inibizione %, Probit, ecc.). Dalla retta di regressione ottenuta si possono ottenere molte informazioni (es. se l'intervallo di concentrazioni scelto è adatto oppure no, se la correlazione tra dose ed effetto è buona oppure no, ecc.).

Di norma, dal calcolo dell'EC50 è bene scartare le concentrazioni che hanno dato una inibizione della crescita inferiore al 10% e superiore al 90% perché tali valori sono quelli che statisticamente comportano una maggiore imprecisione nella determinazione dei dati (ai limiti estremi, infatti, la retta di regressione non è più lineare come si desidera "idealmente" ottenere). I campioni che alla massima dose testabile, presentano un'inibizione della crescita inferiore o uguale al 10% possono essere considerati negativi.

2.6 Risultati

Vengono qui di seguito riportati i risultati dei due test effettuati. In particolare sono presentati i valori di densità algale dopo le letture e le successive elaborazioni: il calcolo del tasso di crescita e della percentuale di inibizione della crescita (Tab.3, 4). Sono poi riportati i grafici (Fig.4, 5).

Viene inoltre presentata una tabella al fine di evidenziare come per entrambi i test siano stati rispettati i criteri di validità previsti dai relativi protocolli (Tab. 5).

Tabella 3- Valori per l'esperimento effettuato secondo le modalità ISO 8692:2004

Sample	Replicate	Algal Density (cells x 10 ³ /ml)				μ	μ	% Inhibition
		Initial	24 h	48 h	72 h	final test value	mean value	
Controllo	I	10,40	42,30	242,10	890,20	1,48	1,48	
	II	10,40	41,00	229,70	848,60	1,47		
	III	10,40	37,00	239,90	908,70	1,49		
	IV	10,40	34,60	273,90	882,60	1,48		
	V	10,40	37,10	231,00	857,30	1,47		
	VI	10,40	40,20	228,50	836,00	1,46		
1 mg/L	I	10,40	31,70	112,00	367,50	1,19	1,19	19,60
	II	10,40	37,90	113,90	378,40	1,20		
	III	10,40	34,90	103,80	348,90	1,17		
0,56 mg/L	I	10,40	46,70	186,50	541,30	1,32	1,33	10,20
	II	10,40	36,50	206,10	555,20	1,33		
	III	10,40	43,20	n.d.	568,10	1,33		
0,32 mg/L	I	10,40	38,50	289,30	708,90	1,41	1,41	4,50
	II	10,40	50,90	304,60	708,40	1,41		
	III	10,40	46,90	299,70	729,10	1,42		
0,18 mg/L	I	10,40	43,90	264,20	876,30	1,48	1,46	1,00
	II	10,40	42,20	282,80	830,80	1,46		
	III	10,40	41,70	202,40	794,00	1,45		
0,1 mg/L	I	10,40	37,60	270,60	878,50	1,48	1,49	0,00
	II	10,40	37,50	262,30	899,70	1,49		
	III	10,40	35,00	221,00	985,20	1,52		

n.d.: non determinato

Tabella 4- Valori per l'esperimento ALGATOXKIT

Sample	Replicate	Optical density at 670 nm				Algal density ABS= $8,7531 \cdot 10^{-7} + 0.00476$ R2=0,99928				μ	μ % Inhibition
		Initial	24 h	48 h	72 h	Initial	24 h	48 h	72 h	final test value	mean value
Controllo	I	0,01	0,05	0,38	1,16	4,96	48,60	423,90	1321,52	1,86	1,85
	II	0,01	0,05	0,35	1,13	4,16	56,83	389,85	1284,96	1,91	
	III	0,01	0,05	0,35	1,09	6,21	54,65	398,30	1238,69	1,76	
1 mg/L	I	0,01	0,03	0,05	0,08	7,59	25,75	48,03	84,02	0,80	0,83 55,25
	II	0,01	0,03	0,05	0,08	6,21	31,58	51,68	85,96	0,88	
	III	0,01	0,04	0,05	0,09	8,61	38,77	53,86	95,21	0,80	
0,56 mg/L	I	0,01	0,03	0,04	0,14	7,81	28,49	43,69	158,73	1,00	1,00 46,02
	II	0,01	0,03	0,05	0,12	6,67	24,04	45,97	128,34	0,99	
	III	0,01	0,03	0,07	0,12	6,67	30,21	74,31	134,06	1,00	
0,32 mg/L	I	0,02	0,03	0,09	0,44	13,98	33,98	95,33	495,18	1,19	1,26 31,72
	II	0,01	0,04	0,10	0,48	9,19	40,03	107,21	542,03	1,36	
	III	0,01	0,03	0,07	0,39	10,90	33,86	74,31	440,58	1,23	
0,18 mg/L	I	0,02	0,05	0,15	0,65	12,84	48,94	167,99	739,44	1,35	1,42 23,04
	II	0,01	0,04	0,15	0,60	11,24	41,97	162,85	680,72	1,37	
	III	0,01	0,04	0,12	0,63	7,01	38,20	129,14	718,53	1,54	
0,1 mg/L	I	0,01	0,04	0,27	0,69	8,73	39,23	303,60	784,45	1,50	1,55 15,81
	II	0,02	0,05	0,28	1,10	17,07	48,83	313,19	1248,75	1,43	
	III	0,01	0,04	0,29	1,02	6,44	44,14	324,50	1162,72	1,73	

Figura 4- Grafici dei valori densità algale e tasso specifico di crescita per ISO 8692:2004

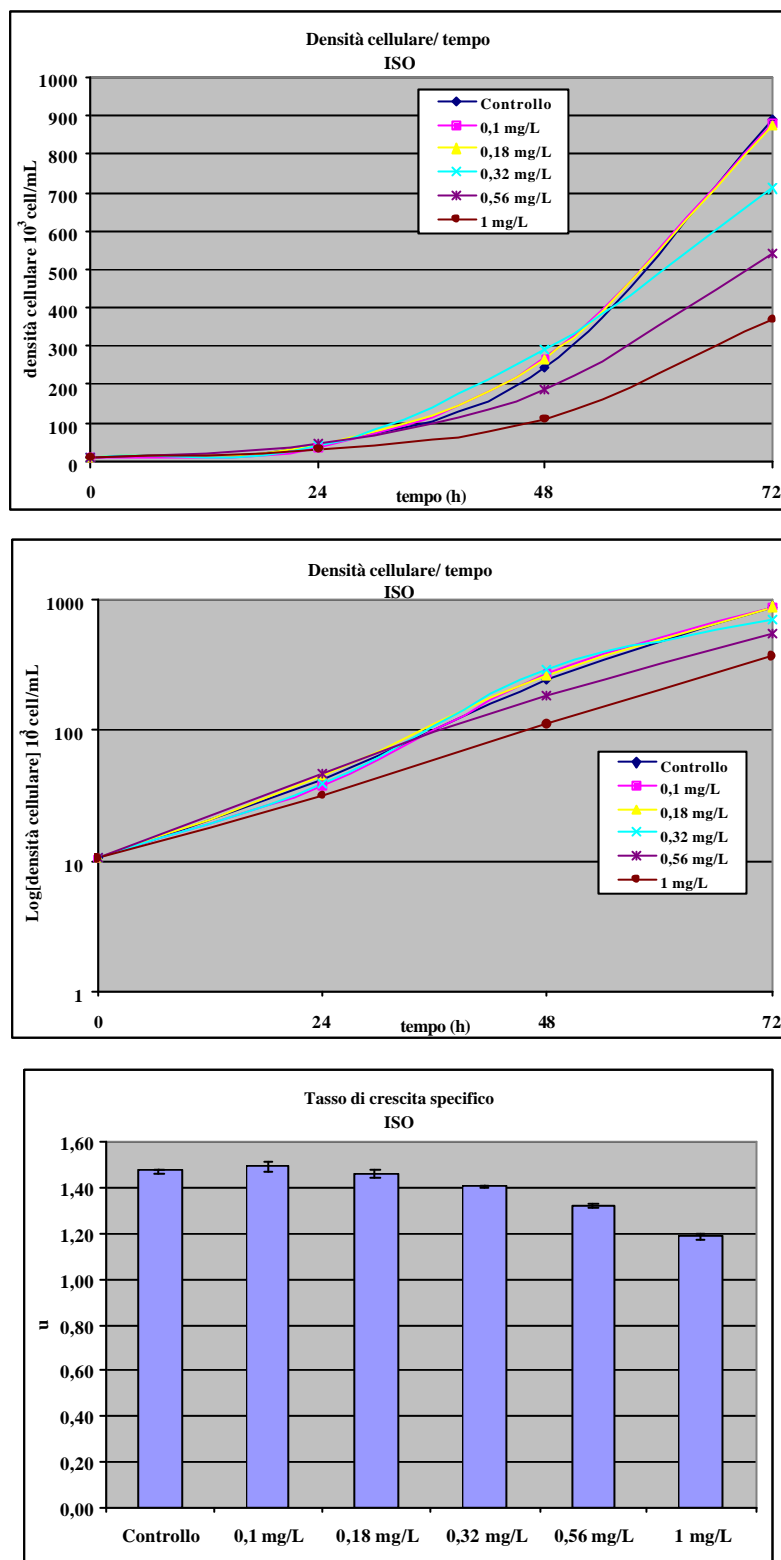


Figura 5- Grafici dei valori densità algale e tasso specifico di crescita ALGATOXKIT

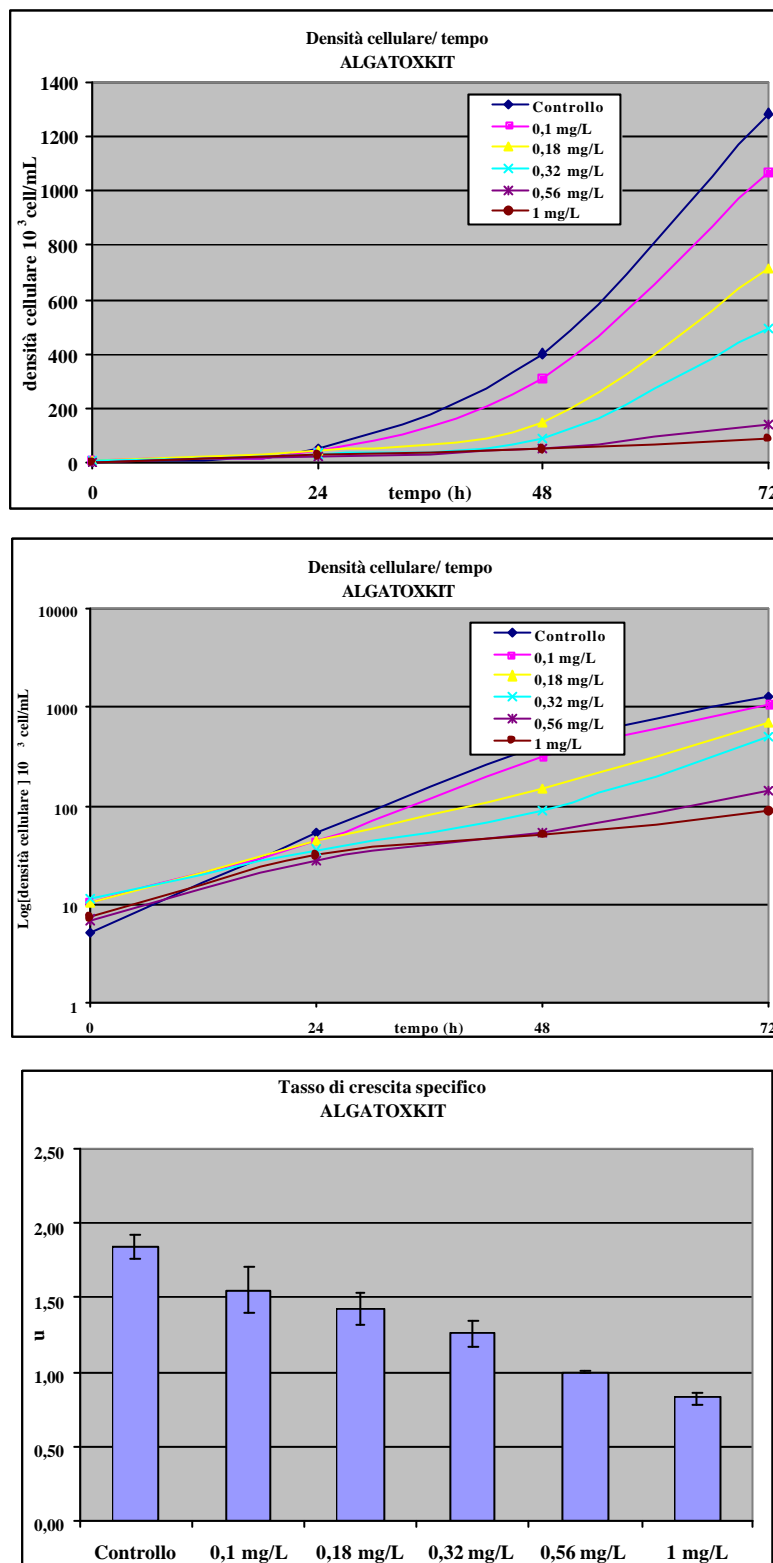


Tabella 5- Criteri di validità per i test ALGATOXKIT e ISO 8692:2004

Sample ISO	Replicate	Algal Density (cells x 10 ³ /ml)				μ				72 h increase		pH 0h	pH 24h	pH media 24h	?
		Initial	24 h	48 h	72 h	final test value	mean value	dev.st	cv%		media			media 24h	
Controllo	I	10,40	42,30	242,10	890,20	1,48	1,48	0,01	0,72	85,60	83,71	8,30	9,64	9,66	1,36
	II	10,40	41,00	229,70	848,60	1,47					81,60			9,60	
	III	10,40	37,00	239,90	908,70	1,49					87,38			9,66	
	IV	10,40	34,60	273,90	882,60	1,48					84,87			9,69	
	V	10,40	37,10	231,00	857,30	1,47					82,43			9,68	
	VI	10,40	40,20	228,50	836,00	1,46					80,38			9,66	

Sample ALGATOX KIT	Replicate	Optical density at 670 nm				Algal density ABS= 8,7531 10 ⁻⁷ +0,00476 (cells x 10 ³ /ml)				μ		72 h increase		pH 0h	pH 24h	pH media 24h	?
		Initial	24 h	48 h	72 h	Initial	24 h	48 h	72 h	final test value	mean value		media			media 24h	
Controllo	I	0,01	0,05	0,38	1,16	4,96	48,60	423,90	1321,52	1,86	1,85	266,53	258,28	8,00	9,39	9,35	1,35
	II	0,01	0,05	0,35	1,13	4,16	56,83	389,85	1284,96	1,91		308,99			9,37		
	III	0,01	0,05	0,35	1,09	6,21	54,65	398,30	1238,69	1,76		199,31			9,30		

2.6.1 Inibizione della crescita algale

Di seguito vengono messi a confronto i valori di inibizione ottenuti per i due test effettuati (Tab. 6) (Fig.6). Le due serie di dati sono state trattate statisticamente ed in particolare è stato effettuato un t- test e una analisi della correlazione (Tab. 7).

Per il test ALGATOXKIT viene poi mostrata l'equazione della retta ottenuta tramite interpolazione lineare del grafico in cui viene riportata l'inibizione percentuale rispetto il logaritmo delle concentrazioni testate. Tale equazione è stata poi usata per il calcolo dell'EC50 (Tab.8).

Tabella 6- Valori di inibizione della crescita algale per i test ALGATOXKIT e ISO 8692:2004

Sample	ISO % Inhibition	ALGATOXKIT % Inhibition
0,1 mg/L	0,00	15,81
0,18 mg/L	1,00	23,04
0,32 mg/L	4,50	31,72
0,56 mg/L	10,20	46,02
1 mg/L	19,60	55,25

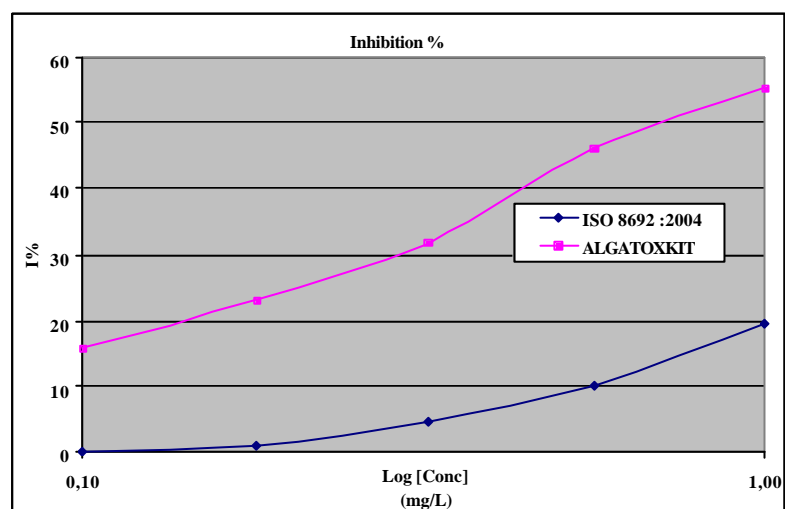
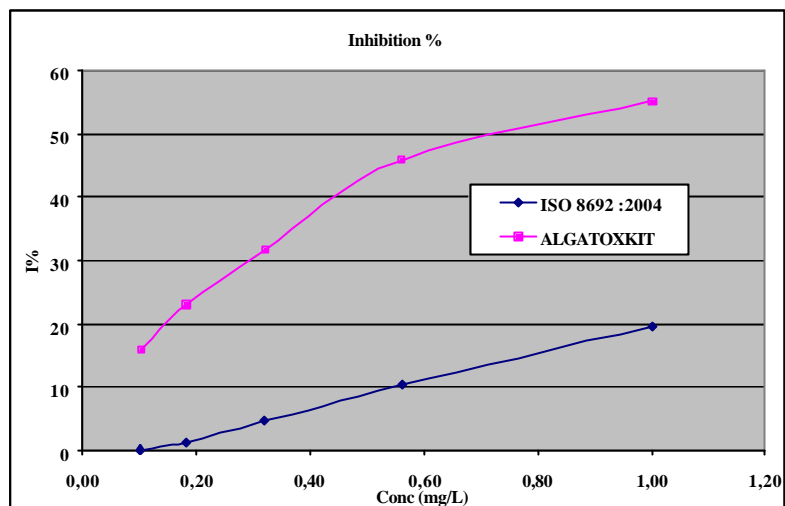
Tabella 7 Correlazione e t-test per ALGATOXKIT e ISO 8692:2004

Correlazione I%		
0,972964335		
t-test		
Test di normalità:	Passato	(P = 0.4401)
Gruppi	Media	Std Dev
ISO	7.06	8.07
ALGATOXKIT	34.37	16.21
Difference	-27.3	
t = -3.37 con 8.00 gradi di libertà (P = 0.0098)		
Le differenze dei valori medi dei due gruppi sono statisticamente significative.		

Tabella 8- Linea di tendenza lineare e EC50 per ALGATOXKIT

Linea di tendenza lineare	$y = 43,148x + 15,728$
EC50	0,794289422

Figura 6- Inibizione percentuale per i test ALGATOXKIT e ISO 8692:2004



3 Discussione e conclusioni

Entrambi gli esperimenti hanno soddisfatto i parametri di validità prescritti dalle metodiche (Tab. 5).

Come si evince dall'analisi statistica e quindi dal t-test effettuato, la differenza tra i valori medi dei due gruppi risulta statisticamente significativa anche se i due set di dati sono positivamente correlati come dimostra il valore del coefficiente di correlazione $r = 0.96$ (Tab.7). La differenza che si riscontra tra i due test sembrerebbe derivare dalla diversa sensibilità del clone algale tra l'allevamento e il kit.

Nella interpretazione dei risultati, sono stati presi in considerazione anche dati ricavati nel corso di un analogo esperimento effettuato nel settembre 2005 presso i laboratori dell'APAT. In tale prova le letture della densità cellulare sono state effettuate tramite il contatore di particelle. La Tabella 9, riportata di seguito, mette i 3 set di dati a confronto.

L'uso delle celle quali recipienti per l'allestimento dei campioni non appare un sistema particolarmente adatto per l'effettuazione del test. Le ampie variazioni di pH, non riscontrate nel corso di precedenti esperimenti analoghi, indicano che l'aerazione delle culture non risulta ottimale. Come detto in precedenza le alghe monocellulari utilizzano come sorgente di carbonio prevalentemente la CO_2 presente nel mezzo acquoso e in condizioni di assenza di una buona aerazione e quindi di opportuni livelli di CO_2 si ha un consumo del bicarbonato presente in soluzione, con spostamento del pH verso valori più alcalini, secondo la reazione:



Un altro elemento che va opportunamente segnalato è costituito dalla ampia variabilità riscontrata nelle repliche e del controllo e dei vari campioni per entrambe le tipologie di letture. Come si evince dalla tabella 10 sotto riportata, in cui vengono mostrate le deviazioni standard delle medie della densità algale a 72h ottenute per le tre serie di dati messi a confronto, la variabilità dei dati risulta essere maggiore per la serie ISO 2006 e l'ALGATOXKIT in raffronto alla serie ISO 2005 (Fig.7).

Dalle osservazioni realizzate nel corso delle sperimentazioni, risulta verosimile attribuire la variabilità nelle repliche, al differente posizionamento delle celle in incubatore da cui deriverebbe una dissimile, seppur minima, variazione nell'esposizione alla luce e quindi una differenziazione nella crescita algale.

Tabella 9-Valori del tasso di crescita e inibizione algale per la prova ISO 2006, ISO 2005 e ALGATOXKIT

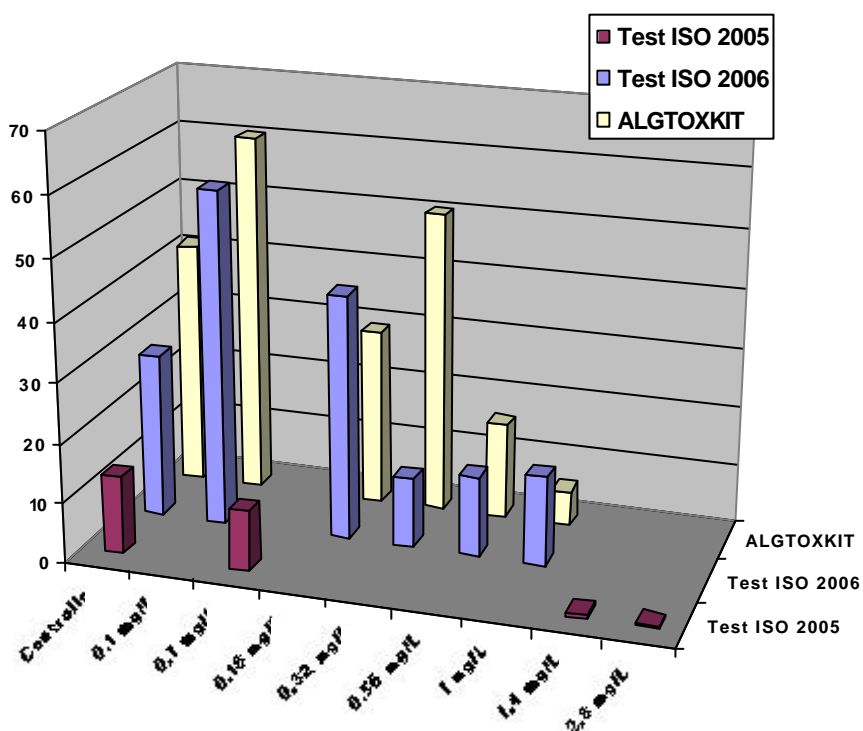
Sample Prova ISO 2006	μ % Inhibition					Sample Prova ISO 2005	μ % Inhibition					Sample ALGA TOX KIT	μ % Inhibition				
		final test value	mean value	dev.st			final test value	mean value	dev.st			final test value	mean value	dev.st			
Controllo	I	1,48	1,48	0,01		Controllo	I	1,60	1,64	0,03		Controllo	I	1,86	1,85	0,07	
	II	1,47			II		1,62			II	1,91						
	III	1,49			III		1,64			III	1,76						
	IV	1,48			IV		1,65										
	V	1,47			V		1,68										
	VI	1,46			VI		1,67										
1 mg/L	I	1,19	1,19	0,01	20	2,8 mg/L	I	0,20	0,13	0,09	92	1 mg/L	I	0,80	0,83	0,04	55
	II	1,20			II		0,03			II	0,88						
	III	1,17			III		0,16			III	0,80						
0,56 mg/L	I	1,32	1,33	0,01	10	1,4 mg/L	I	0,69	0,66	0,03	60	0,56 mg/L	I	1,00	1,00	0,01	46
	II	1,33			II		0,63			II	0,99						
	III	1,33			III		0,67			III	1,00						
0,32 mg/L	I	1,41	1,41	0,01	5	0,7 mg/L	I	1,44	1,40	0,05	15	0,32 mg/L	I	1,19	1,26	0,09	32
	II	1,41			II		1,40			II	1,36						
	III	1,42			III		1,34			III	1,23						
0,18 mg/L	I	1,48	1,46	0,02	1							0,18 mg/L	I	1,35	1,42	0,11	23
	II	1,46									II		1,37				
	III	1,45									III		1,54				
0,1 mg/L	I	1,48	1,49	0,02	0							0,1 mg/L	I	1,50	1,55	0,16	16
	II	1,49									II		1,43				
	III	1,52									III		1,73				

Sebbene il sistema che prevede l'uso delle celle, velocizza i tempi della lettura della densità ottica allo spettrofotometro, l'uso delle beute per l'incubazione dei campioni risulta preferibile.

Tabella 10- Dati di densità cellulare e relative deviazioni standard per le tre prove

ISO 2006	media	dev.st	ISO 2005	Media	dev.st	ALGATOXKIT	media	dev.st
Controllo	870,57	27,70	Controllo	141,28	12,92	Controllo	1281,72	41,51
0,1 mg/L	921,13	56,49				0,1 mg/L	1065,31	60,83
0,7 mg/L			0,7 mg/L	67,93	9,92			
0,18 mg/L	833,70	41,23				0,18 mg/L	712,90	29,76
0,32 mg/L	715,47	11,81				0,32 mg/L	492,60	50,77
0,56 mg/L	554,87	13,40				0,56 mg/L	140,38	16,15
1 mg/L	364,93	14,92				1 mg/L	88,40	5,98
1,4 mg/L			1,4 mg/L	7,46	0,70			
2,8 mg/L			2,8 mg/L	1,53	0,38			

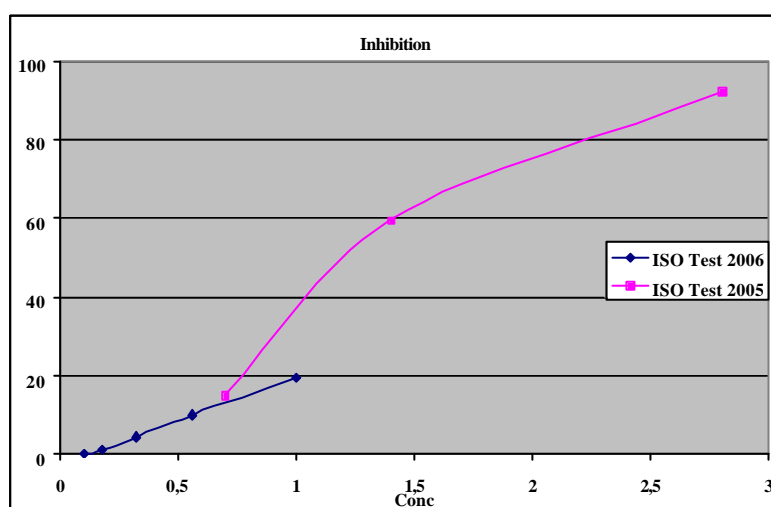
Figura 7



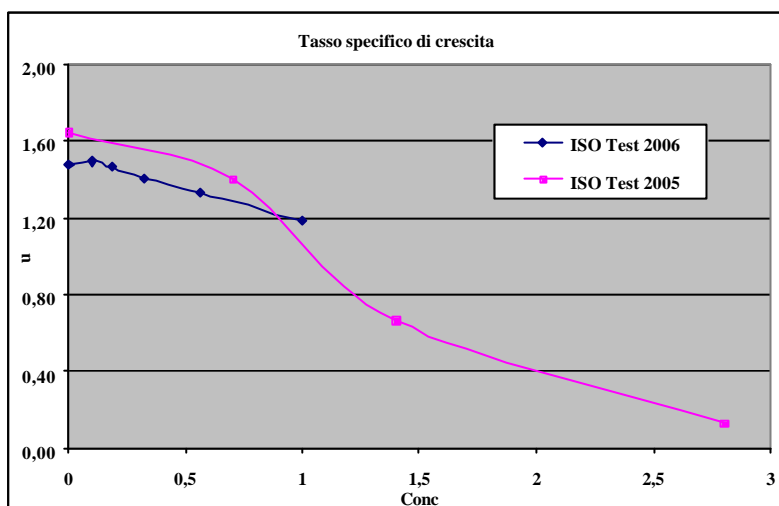
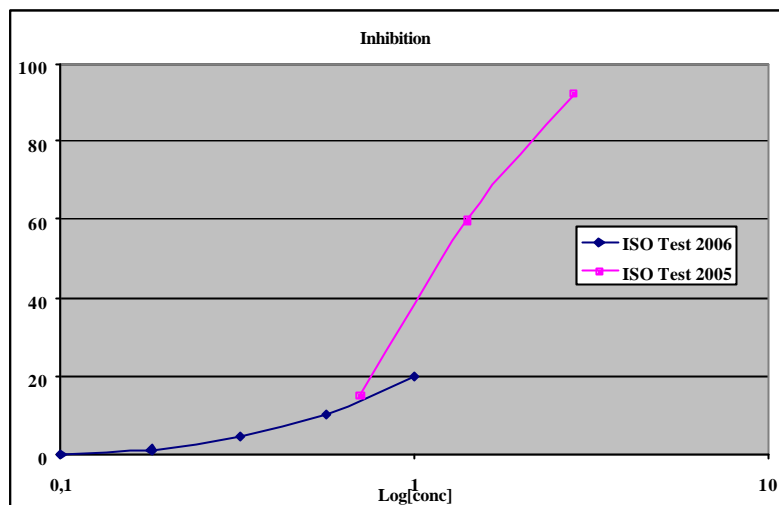
Per la prova ISO 2006, la massima inibizione delle crescita algale riscontrata è stata pari al 20%, valore troppo basso per estrapolare l'EC50, sicuramente superiore alla dose massima di bicromato utilizzata (1 mg/L). Tale osservazione è supportata anche dalla lettura dei dati forniti nel protocollo ISO 8692:2004 che riporta per l'EC50, ottenuto nell'ambito di test eseguiti con $K_2Cr_2O_7$, i seguenti valori: EC50= 1,19; Standard deviation= 0,27; Coefficiente di variazione%= 23. Tali dati sono riportati nell'ISO con lo scopo di fornire, ai laboratori che applicano la metodica, termini di paragone su cui poter saggiare la precisione dei risultati ottenuti³.

Dall'analisi dei dati in tabella 9, mettendo a confronto i risultati ISO 2006- ISO2005, si evince che le due serie di dati seguono lo stesso andamento (Fig.8). Questo ribadisce che in ogni modo la procedura è stata eseguita correttamente.

Figura 8- Confronto andamento inibizione algale e tasso di crescita specifico ISO 2005 e ISO 2006



³ Tali valori sono il frutto del test con bicromato di potassio di 9 laboratori internazionali effettuati nel 1980 e 1981 con lo scopo di valutare la sensibilità degli organismi e assicurarsi che essa rimanga inalterata generazione dopo generazione.



Per l'ALGATOXKIT il valore di EC₅₀ calcolato pari a 0,79, appare non coerente con i valori riportati nell'ISO 8692:2004. Anche in questo caso va ribadito che però l'inibizione massima della crescita algale è stata pari al 55%: ne deriva che il valore di EC₅₀ calcolato non è molto attendibile.

Visto lo scopo dell'esercizio, appare plausibile che le concentrazioni suggerite per l'effettuazione del test siano state pensate più per saggiare la validità e ripetibilità del metodo ALGATOXKIT, che per effettuare un confronto con altre metodiche standardizzate.

4 Allegati I e II

Allegato I- “Result sheet” per ISO 8692:2004

INTERNATIONAL ALGALTOXKIT INTERCALIBRATION EXERCISE
<p><u>ALGAL BIOASSAY ON POTASSIUM DICHROMATE PERFORMED WITH A TEST PROCEDURE DIFFERENT FROM THE ALGALTOXKIT</u></p> <p>Name of participant : Daniela Conti – Paolo Sabia</p> <p>Company, Laboratory, Organisation : APAT - AMB LAB</p> <p>Email : conti@apat.it</p>
<p>1. Name of test method : Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae (ISO 8692:2004)</p> <p>2. Name of algal species used : Pseudokirchneriella subcapitata (Selenastrum capricornutum). SAG 6181 (Göttingen)</p> <p>3. Type of test containers used : Erlenmeyers Microplates Other (specify) : Long cells of Algaltoxkit (10 cm, 25 ml volume)</p> <p>4. Number of replicates per test dilution : 3 + 6 controls</p> <p>5. Method of determination of the algal densities in the test containers : Microscopic counting <u>Particle counter</u> Coulter Counter Z1 double threshold Fluorescence Other (specify) :</p> <p>6. Algal density in the test containers at the start of the test : $10,4 \times 10^3$ cells/ml</p> <p>7. Incubation temperature : 22 °C</p> <p>8. Intensity of illumination at the surface of the test containers : 8000 lux</p> <p>9. pH of the algal growth medium at the start of the test : 8,3</p> <p>10. pH of the algal suspension in the controls at the end of the test : 9,64- 9,60- 9,66- 9,69-9,68- 9,66</p> <p>11. Data treatment method : see result sheet.</p> <p>12. 72h EC50 value (with confidence limits): . mg/l $K_2Cr_2O_7$: NOT DEFINABLE</p> <p>13. <u>Personal remarks</u> In order to compare our results with those of Algaltoxkit assays, the same concentrations of potassium dichromate (1 – 0,56 – 0,32 – 0,18 – 0,001 mg/L) were used. The percentage inhibition obtained at the end of the test (72 h) were the following: 1 mg/L 20%; 0,56 mg/L 10%; 0,32 mg/L 5%; 0,18 mg/L 1%; 0,001 mg/L 0%. With these data the determination of 72hEC50 is impossible.</p>

RESULT SHEET

Participant: Daniela Conti - Paolo Sabia **Company:** APAT

Name of test method: Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae

Name of algal species used : Pseudokirchneriella subcapitata (Selenastrum capricornutum).

Method of determination of the algal density: Coulter Counter Z1 double threshold

Sample	Replicate	Algal Density (cells x 10 ³ /ml)						% Inhibition
		Initial	24 h	48 h	72 h	μ final test value	μ mean value	
Controllo	I	10,4	42,3	242,1	890,2	1,48	1,48	
	II	10,4	41,0	229,7	848,6	1,47		
	III	10,4	37,0	239,9	908,7	1,49		
	IV	10,4	34,6	273,9	882,6	1,48		
	V	10,4	37,1	231,0	857,3	1,47		
	VI	10,4	40,2	228,5	836,0	1,46		
1 mg/L	I	10,4	31,7	112	367,5	1,19	1,19	20
	II	10,4	37,9	113,9	378,4	1,20		
	III	10,4	34,9	103,8	348,9	1,17		
0,56 mg/L	I	10,4	46,7	186,5	541,3	1,32	1,33	10
	II	10,4	36,5	206,1	555,2	1,33		
	III	10,4	43,2	n.d.	568,1	1,33		
0,32 mg/L	I	10,4	38,5	289,3	708,9	1,41	1,41	5
	II	10,4	50,9	304,6	708,4	1,41		
	III	10,4	46,9	299,7	729,1	1,42		
0,18 mg/L	I	10,4	43,9	264,2	876,3	1,48	1,46	1
	II	10,4	42,2	282,8	830,8	1,46		
	III	10,4	41,7	202,4	794,0	1,45		
0,1 mg/L	I	10,4	37,6	270,6	878,5	1,48	1,49	0,0
	II	10,4	37,5	262,3	899,7	1,49		
	III	10,4	35,0	221,0	985,2	1,52		

n.d.: not determined

Allegato II- “Result sheet” per l’ALGATOXKIT

INTERNATIONAL INTERCALIBRATION EXERCISE

ON THE ALGALTOXKIT MICROBIOTEST

RESULTS SHEET

Name of operator :

Dilution series tested : concentration 1 : **1.0 mg/l**

Company, laboratory, organisation :

concentration 2 : **0.56 mg/l**

email :

concentration 3 : **0.32 mg/l**

concentration 4 : **0.18 mg/l**

Date of performance of test :

concentration 5 : **0.1 mg/l**

Toxicant tested : **K₂Cr₂O₇**

OPTICAL DENSITY AT 670 nm							
Exposure time	Replicate	Control	C5	C4	C3	C2	C1
0h	1	0,0091	0,0124	0,016	0,017	0,0116	0,0114
	2	0,0084	0,0197	0,0146	0,0128	0,0106	0,0102
	3	0,0102	0,0104	0,0109	0,0143	0,0106	0,0123
	Mean	0,00923	0,0142	0,0138	0,0147	0,0109	0,0113
	CV%	9,82	34,56	19,05	14,48	5,28	9,33
24h	1	0,0473	0,0391	0,0476	0,0345	0,0297	0,0273
	2	0,0545	0,0475	0,0415	0,0398	0,0258	0,0324
	3	0,0526	0,0434	0,0382	0,0344	0,0312	0,0387
	Mean	0,051	0,0433	0,0424	0,0362	0,0289	0,0328
	CV%	7,25	9,7	11,24	8,52	9,64	17,41
48h	1	0,3758	0,2705	0,1518	0,0882	0,043	0,0468
	2	0,346	0,2789	0,1473	0,0986	0,045	0,05
	3	0,3534	0,2888	0,1178	0,0698	0,0698	0,0519
	Mean	0,3584	0,2794	0,139	0,0855	0,0526	0,0496
	CV%	4,33	3,28	13,29	17,05	28,38	5,12
72h	1	1,1615	0,6914	0,652	0,4382	0,1437	0,0783
	2	1,1295	1,0978	0,6006	0,4792	0,1171	0,08
	3	1,089	1,0225	0,6337	0,3904	0,1221	0,0881
	Mean	1,1267	0,9372	0,6288	0,436	0,1276	0,0821
	CV%	3,22	23,07	4,14	10,2	11,07	6,38

5 Bibliografia

Bacci E, Vighi M. Tossicologia classica, ambientale ed ecotossicologia: metodi strategie, obiettivi. In: Vighi M, Bacci E (Ed.). *Ecotossicologia*. Torino: UTET; 1998.

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

Baudo R., Sbalchiero A. and Beltrami M. 2004. Test di Tossicità acuta con *Daphnia magna* (Acute toxicity test with *Daphnia magna*) *Biologi Italiani*, 6, 62-69.

C.H. Walker, S.P.Hopkin, R.M. Sibly , D:B Peakall. Principles of ecotoxicology. Taylor & Francis 1996

Colin Baird. *Chimica Ambientale* Zanichelli (2001)

Daniel M., Sharpe A. Driver J. Knight A.W., Keenan P.O., Walmsley R.M., Robinson A., Zhang T. and Rawson D. 2004. Results of a technology demonstration project to compare rapid aquatic toxicity screening tests in the analysis of industrial effluents. *J.Environ.Monit.* 6, 855-865.

European Commission. *Technical Guidance Document (TGD) on risk assessment of chemical substances following European regulations and directives*. Ispra, Italy: European Chemical Bureau (ECB); April 2003.

International standard_ISO 8692:2004 Water quality -Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae

Lucivjanska V., Lucivjanska M. and Cizek V. 2000. Sensitivity comparison of the ISO *Daphnia* and algal test procedures with Toxkit microbiotests. In : *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. G. Persoone, C.Janssen and W. De Coen (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers. p. 243- 246.

McCarthy JF, Shugart LR. *Biomarker of environmental contamination*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 457.

Moriarty F. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. London: Academic Press, Inc.; 1983.

Persoone G., Blaise C., Snell T., Janssen C. and Van Steertegem M. 1993. Cystbased toxicity tests. II. Report on an international intercalibration exercise with three cost-effective Toxkits. *Zeitschr. für Angew. Zool.* 1, 17-36.

Silvia Marchini, *Ann Ist Super Sanità* 2005;41(3):371-379 Ecotossicologia e qualità delle acque
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Vandenbroele M.C., Heijerick D.G., Vangheluwe M.L. and Janssen C.R. 2000. Comparison of the conventional algal assay and the Algatoxkit F microbiotest for toxicity evaluation of sediment pore waters. In : *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. G. Persoone, C.Janssen and W. De Coen (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers. p.261-268.

Van der Wielen C. and Halleux I. 2000. Shifting from the conventional ISO 8692 algal growth inhibition test to the Algatoxkit F microbiotest In : *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. G. Persoone, C.Janssen and W. De Coen (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers. p.269- 272.