



APAT

Agenzia per la Protezione
dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici

Messa a punto dei protocolli per valutare tossicità e bioaccumulabilità

Informazioni legali

L'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici o le persone che agiscono per conto dell'Agenzia stessa non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

APAT - Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.apat.it

© APAT, Rapporti 25/2002

ISBN 88-448-0069-1

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

APAT

Grafica di copertina: Franco Iozzoli, APAT

Coordinamento tipografico

APAT

Impaginazione e stampa

I.G.E.R. srl - Viale C. T. Odescalchi, 67/A - 00147 Roma

Stampato su carta TCF

Finito di stampare novembre 2002

AUTORI

Il rapporto rientra nelle attività programmate dal Dipartimento Stato dell'Ambiente, Controlli e Sistemi Informativi dell'ANPA, ora APAT, per il triennio 1999-2001 ed è stato affidato al Centro Tematico Nazionale Acque Interne e Marino Costiere (CTN-AIM).

Lo studio è stato svolto congiuntamente dall'Istituto di Ricerca Sulle Acque, CNR-IRSA, nel ruolo di Istituzione principale di Riferimento del CTN AIM, e dalle Università di Genova e dell'Insubria.

Il documento è stato redatto da:

Attilio Arillo, Dipartimento per lo studio del territorio e delle sue risorse, Università degli studi di Genova

Silvana Galassi, Dipartimento di scienze chimiche, fisiche e matematiche, Università degli studi dell'Insubria

Licia Guzzella, Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR, Brugherio, Milano

Sara Valsecchi, Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR, Brugherio, Milano

Luigi Viganò, Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR, Brugherio, Milano

Revisione di:

Romano Pagnotta, Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR, Brugherio, Milano



*Dal 6 ottobre 2002 l'Agenda Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (ANPA) e i Servizi Tecnici della Presidenza del Consiglio – Servizi Geologico, Idrografico e Mareografico nazionali – sono confluiti nell'**Agenda per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT)**.*

***APAT** proseguirà nello svolgimento, sotto l'indirizzo e la vigilanza del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, di tutte le funzioni tecnico-scientifiche affidatele concernenti il monitoraggio e il controllo nei settori di protezione dell'ambiente la difesa del suolo e delle acque, la prevenzione del rischio tecnologico e la conservazione della natura.*

*Nei settori di propria competenza, **APAT** continuerà a rappresentare quindi un punto di riferimento per attività di collaborazione, consulenza, assistenza, servizio e supporto alle altre pubbliche Amministrazioni, definite con apposite convenzioni.*

Nel quadro di un ormai consolidato network ambientale, sarà sempre cura dell'Agenda porre in essere tutti gli adempimenti necessari all'integrazione del Sistema informativo nell'ottica della rete SINAnet, nel quale possano confluire sia il Sistema Cartografico Nazionale, che i Sistemi Informativi Regionali Ambientali (SIRA).

*Gli obiettivi, le priorità e le risorse di **APAT** saranno definite da un programma triennale di attività, aggiornato annualmente, in attuazione delle direttive impartite dal Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio.*

*Gli organi dell'Agenda sono costituiti dal Direttore Generale (coadiuvato da un Comitato con funzioni consultive) e dal Collegio dei Revisori, e la sua struttura è articolata in Dipartimenti e Servizi interdipartimentali. Una novità è rappresentata dall'istituzione presso **APAT** di un Consiglio Federale, presieduto dal Direttore Generale e formato dai legali rappresentanti delle Agenzie Regionali e Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA e APPA), con la partecipazione di un rappresentante della Conferenza Stato Regioni.*

*La correttezza dei dati e dei rilevamenti tecnici forniti dagli esperti dell'Agenda, caratteristiche che distinguevano le pubblicazioni istituzionali realizzate in precedenza dall'ANPA, pur cambiando veste e denominazione, si perfezionano e si aggiornano con **APAT**, in un percorso contrassegnato dall'autorevolezza e dalla trasparenza dell'informazione in campo ambientale.*

Il Direttore Generale
Giorgio Cesari

Presentazione

La necessità di impostare con un approccio integrato le attività di monitoraggio e controllo per la tutela qualitativa e quantitativa delle acque e di considerare i corpi idrici come sistemi complessi costituiti sia da componenti abiotici, acqua e sedimenti, sia da componenti biotici (gli ecosistemi acquatici e terrestri ad essi associati), è alla base delle nuove leggi quadro che regolano questa materia. : il decreto legislativo 152/99 e la direttiva quadro 2000/600/CE. Queste norme prevedono che la valutazione dello stato ambientale delle diverse tipologie di acque si basi non solo sulle analisi chimiche e fisiche delle acque, ma anche sulla risposta di prove mirate a valutare la tossicità e bioaccumulabilità degli inquinanti pericolosi. Le prove prescritte riguardano tutte le componenti del corpo idrico e il biota a diversi livelli trofici: macroinvertebrati, alghe, pesci, molluschi.

Saggi di tossicità sono anche obbligatori nel controllo degli scarichi.

A fronte di queste esigenze normative si deve constatare che i test di tossicità e di bioaccumulo non costituiscono sempre una pratica diffusa nelle strutture tecniche dedicate ai controlli e al monitoraggio ma spesso richiedono ancora approfondimenti e soprattutto devono essere standardizzati per qualificare i risultati delle prove.

Affrontare queste esigenze, è un compito fondamentale dell'APAT che è stabilito dalla legge istitutiva delle agenzie ambientali ed è ulteriormente ribadito dalla legislazione in materia. In questo senso il rapporto presenta alcuni primi risultati di un programma d'attività che vedrà fortemente impegnate l'APAT, le agenzie ambientali regionali e le istituzioni di ricerca.

Il rapporto presenta lo stato dell'arte dei metodi per la valutazione della tossicità e bioaccumulabilità di inquinanti associati ai sedimenti con organismi di acqua dolce, analizza lo stato di sviluppo di alcuni specifici metodi, affronta alcuni punti essenziali delle procedure analitiche relative ad operazioni di concentrazione considerando gli aspetti strumentali e di trattamento dei dati.

Sommario - Summary

Documento diviso in due sezioni: la prima tratta i metodi per la valutazione della tossicità e bioaccumulabilità di inquinanti associati ai sedimenti con organismi di acqua dolce (*Ceriodaphnia dubia*, *Oncorhynchus mykiss* e *Lombriculus variegatus*), la seconda parte formula, a seguito di un'analisi della letteratura e di sperimentazione di laboratorio, una proposta di metodo per la concentrazione di inquinanti da campioni acquosi da sottoporre a test di tossicità.

Di ciascun metodo proposto vengono fornite indicazioni sugli aspetti generali e sulle procedure per la loro esecuzione.

Summary

Methodology for the valuation of toxicity and bio-accumulation of pollutants. This document describes the methodology with organisms as *Ceriodaphnia dubia*, *Oncorhynchus mykiss* e *Lombriculus variegatus*.

Indice

1.	PREMESSA	1
	PARTE I	3
2.	METODI PER VALUTARE TOSSICITA' E BIOACCUMULABILITA' DI INQUINANTI ASSOCIATI AI SEDIMENTI CON ORGANISMI D'ACQUA DOLCE	5
3.	METODO PER TEST DI TOSSICITA' CRONICA (7 GIORNI) SU SEDIMENTO CON <i>CERIODAPHNIA DUBIA</i>	9
3.1	Riassunto	9
3.2	Generalità sul metodo	9
3.3	Conduzione del saggio	10
3.4	Procedura di saggio	12
3.5	Validità del saggio	13
3.6	Analisi dei risultati	14
4.	METODO PER TEST DI TOSSICITA' A BREVE TERMINE (7 GIORNI) SU SEDIMENTO CON TROTA IRIDEA (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>)	15
4.1	Riassunto	15
4.2	Generalità sul metodo	15
4.3	Conduzione del saggio	16
4.4	Procedura di saggio	18
4.5	Validità del saggio	21
4.6	Analisi dei risultati	21
4.7	Appendice A1 – Schiusa delle uova in laboratorio	22
5	PROPOSTA DI METODO PER LA VALUTAZIONE DEL BIOACCUMULO CON <i>LUMBRICULUS VARIEGATUS</i> DI SOSTANZE ASSOCIATE AL SEDIMENTO	25
5.1	Generalità sul metodo	25
5.2	Procedura	25
5.3	Accettabilità del saggio	27
5.4	Espressione dei risultati	28
5.5	Appendice – Allevamento di <i>Lumbriculus variegatus</i>	30
	PARTE II	33
6.	PRECONCENTRAZIONE DI CAMPIONI DI ACQUA SUPERFICIALE PER I SAGGI ECOTOSSICOLOGICI	35
6.1	Stato dell'arte	35
6.2	Metodi di estrazione utilizzati a scopo analitico	36
6.3	Metodi di estrazione utilizzati per i saggi ecotossicologici	39
6.4	Scelta della tecnica di estrazione per i saggi	40
6.5	Risultati delle prove sperimentali	40

6.6	Considerazioni conclusive	42
7.	PROPOSTA DI METODO PER LA CONCENTRAZIONE DELLE ACQUE PER I SAGGI TOSSICOLOGICI PREVISTI DAL D. Lgs n. 152/99	43
7.1	Introduzione	43
7.2	Principio del metodo	43
7.3	Campo di applicazione	43
7.4	Interferenze e cause di errore	44
7.5	Campionamento e conservazione del campione	44
7.6	Apparecchiature necessarie	44
7.7	Reattivi	44
7.8	Procedimento	45
7.9	Calcoli	46
7.10	Precisione e validazione del metodo	46
8.	BIBLIOGRAFIA	47

1. Premessa

Il presente report è redatto nell'ambito delle attività affidate da ANPA, ora APAT, al Centro Tematico Nazionale Acque Interne e Marino Costiere (CTN-AIM).

Il report è stato strutturato in due parti: la prima parte tratta i metodi per valutare la tossicità e la bioaccumulabilità di inquinanti associati ai sedimenti con organismi di acqua dolce (*Ceriodaphnia dubia*, *Oncorhynchus mykiss* e *Lombriculus variegatus*), la seconda formula, a seguito di una analisi di letteratura e di sperimentazioni di laboratorio, una proposta di metodo per la concentrazione di inquinanti da campioni acquosi da sottoporre successivamente a test di tossicità.

Di ciascun metodo proposto vengono fornite indicazioni sugli aspetti generali e sulle procedure per la loro esecuzione.



PARTE PRIMA

PARTE PRIMA

2. Metodi per valutare tossicità e bioaccumulabilità di inquinanti associati ai sedimenti con organismi d'acqua dolce

A cura di: Luigi Viganò, Attilio Arillo, Sara Valsecchi

Dalla fine degli anni 70 ed in relazione alle possibilità di dispersione dei sedimenti rimossi dalle aree portuali o dai canali navigabili, il problema sedimenti ha acquistato, a partire dall'esperienza statunitense, dimensione internazionale (USACOE, 1977). Tuttavia, è soprattutto dagli anni 80 in poi che un crescente numero di studi è stato dedicato al rischio tossicologico generato da questo comparto chiave delle acque superficiali. A partire da quegli anni è iniziata, ad esempio, una più ampia documentazione in merito all'estensione e all'entità del problema della contaminazione dei sedimenti. Da questa è risultato a più riprese che numerose aree costiere, molti fiumi e laghi hanno sedimenti contaminati da numerosi tipi di inquinanti (Alden e Young, 1982; Chapman et al., 1987; Munawar e Thomas, 1989; Reynoldson e Zarull, 1989). Molti tra questi sono stati immessi anni addietro, ma molti altri entrano tuttora e quotidianamente nell'ambiente acquatico, sia direttamente dagli effluenti di scarico di origine urbana e industriale che indirettamente dal dilavamento dei terreni agricoli o da sorgenti anche molto lontane attraverso il trasporto atmosferico. Una stima recente effettuata per il territorio statunitense ha valutato che i sedimenti del 10% delle acque superficiali sono contaminati a livelli tali da poter essere letali per la fauna ittica residente o danneggiare la salute di chi ne consumi le carni (USEPA, 1988). Mentre per una frazione approssimativamente equivalente di laghi, fiumi e acque costiere, i diversi stati hanno dovuto emanare dei limiti al consumo della fauna ittica.

Storicamente la valutazione della qualità di un sedimento si è limitata ad una caratterizzazione di tipo chimico. Comunemente questa ha dimostrato la presenza di metalli, di composti aromatici polinucleari, di composti cloro-organici e di alcuni pesticidi. Tuttavia al di là dei risultati dell'analisi chimica è stato presto chiaro che sono necessari dei metodi che valutino il significato ambientale dei livelli di contaminanti riscontrati. La concentrazione degli inquinanti, infatti, non è necessariamente un indicatore di danno biologico, poichè la frazione degli inquinanti che è biologicamente disponibile può variare grandemente, da una quota minima incapace di danno, anche a lungo termine, ad una massima capace eventualmente di effetti acuti letali. Fattori di tipo fisico, ma soprattutto chimico ed anche biologico, interagiscono nel determinare l'entità della frazione biodisponibile dei contaminanti di un sedimento. Si pensi, ad esempio, ai processi di rimescolamento e risospensione del materiale sedimentato che possono rimobilizzare gli inquinanti (Karickhoff e Morris, 1985; Zoumis et al., 2001), od anche al ruolo dei solfuri volatili nel determinare biodisponibilità e tossicità di molti metalli (Di Toro et al., 1990). Alcuni autori hanno anche sottolineato l'importanza che ha la nicchia di una data specie nel governare il rapporto con la matrice sedimento e quindi nel determinare la principale via di esposizione ai contaminanti presenti, se per ingestione, se per assorbimento attraverso i tessuti branchiali, piuttosto che per entrambi i processi (Harkey et al., 1994a; Viganò et al., 1995; Ingersoll et al., 2000). Questo tipo di fattori possono determinare grandemente il risultato finale della condizione espositiva, oltre, naturalmente, alla sensibilità propria della specie di organismo in esame (Knezowich et al., 1987).

Di fatto, l'incompletezza pressochè inevitabile di una caratterizzazione di tipo chimico, l'incapacità di prevedere le interazioni tra i molteplici inquinanti presenti, e una limitata conoscenza della relazione tra concentrazione e biodisponibilità, sono in sintesi gli aspetti chiave

che, da un lato, hanno ridimensionato il ruolo della caratterizzazione di tipo chimico e, dall'altro, hanno contribuito alla promozione e allo sviluppo dei saggi di tossicità sul sedimento, essendo questi ultimi gli strumenti più diretti e integrati per valutarne la pericolosità (Burton, 1991; Adams et al., 1992; Ingersoll et al., 1995; O'Connor e Paul, 2000). A tale riguardo è interessante citare i risultati ottenuti da Sibley et al. (1999) i quali hanno trovato concordanza tra saggi condotti su sedimenti in laboratorio e saggi condotti in campo nelle aree di campionamento dei medesimi sedimenti, confermando, se mai fosse ancora necessario, la rappresentatività del saggio di laboratorio e più in generale della risposta tossicologica.

In ogni caso, il processo di crescita dei metodi di saggio sui sedimenti, che è stato comunque necessario, ha potuto giovare del notevole bagaglio informativo già acquisito con i saggi su campioni acquosi, il che ha avuto l'evidente risultato di abbreviarne fortemente i tempi di sviluppo. A cominciare da alcune prime esperienze di saggio (si veda ad es. Prater e Anderson, 1977), molti sono gli organismi e gli approcci sperimentali che in questi ultimi anni sono stati considerati dai diversi autori. Una delle prime pubblicazioni che abbia affrontato organicamente il tema metodologico, che cioè illustrasse l'intera procedura, a partire dall'allevamento dell'organismo fino alla conduzione del test di tossicità su sedimenti d'acqua dolce, è stata quella di Nebeker et al. (1984). È stato però necessario attendere i primi anni 90 affinché alcuni metodi di saggio diventassero metodi standard ufficiali ASTM. A questi primi metodi, basati sull'impiego di anfipodi e chironomidi, ne sono seguiti altri ancora, dedicati a saggi su campioni di sedimento *in toto* con cladoceri del genere *Daphnia* e *Ceriodaphnia* e un efemerottero della specie *Hexagenia limbata*. Tanto i saggi con anfipodi (es *Hyalella azteca*) quanto quelli con cladoceri e ditteri, sono stati applicati con successo in vari tipi di studi sia su sedimenti *in toto* che su acqua interstiziale, come pure su elutriato. A questo proposito si può aprire una breve parentesi in merito all'opportunità di utilizzare l'uno o l'altro di tali componenti del comparto sedimento, ricordando che, almeno per quanto riguarda gli inquinanti con natura lipofila, la biodisponibilità è meglio valutabile saggiando un sedimento tal quale piuttosto che l'acqua interstiziale o un estratto acquoso (Harkey et al., 1994b). Anche per questo motivo il saggio sul campione tal quale produce, in genere, effetti tossici maggiori che non le sue frazioni acquose, sebbene l'esposizione alla sola acqua interstiziale possa, al contrario, esasperare la condizione espositiva della sperimentazione (Ankley et al., 1991; Sasson-Brickson e Burton, 1991). È infine da sottolineare che l'esposizione di organismi con nicchie più strettamente bentoniche alla sola matrice acquosa del sedimento è di per sé una condizione di stress ed è pertanto da evitare, almeno per le specie aventi tali caratteristiche.

Data la varietà relativamente ampia di specie utilizzabili, altrettanto ampia è necessariamente la varietà della durata dei saggi. Si va, pertanto, da alcuni minuti per i saggi con batteri luminescenti, ad alcuni giorni per i saggi con alghe, anfipodi e cladoceri, sino anche a diverse settimane per alcuni test di bioaccumulo con pesci ed oligocheti. La varietà di metodi e specie è scaturita, da un lato, dalla disponibilità di numerosi metodi per campioni acquosi che in parte erano adattabili alla nuova matrice, e dall'altro lato, dalla necessità di considerare le risposte sia di organismi strettamente bentonici che non bentonici, occupanti nicchie in vario grado complementari. In tal senso uno dei progetti forse più importanti che abbia posto a confronto organismi e soluzioni espositive in varie combinazioni e per moltissimi campioni è stato il progetto Assessment and Remediation of Contaminated Sediments (ARCS) (Fox e Tuchman, 1996). Questo progetto è stato condotto nei bacini dei Grandi Laghi nord americani ed ha riscontrato, ad esempio, come più organismi siano necessari per ottenere informazioni sia sulla tossicità che sul suo livello. In genere, batterie di saggi che utilizzino poche specie selezionate e che vengano applicate con frequenza, sembrano essere la soluzione più realistica ed efficace. Gli autori sottolineano anche l'interessante correlazione tra specie bentoniche e non bentoniche, come pure l'opportunità che le batterie di saggio comprendano or-

ganismi sia dell'uno che dell'altro tipo (Burton et al., 1996). Tra i vari, questo aspetto è tuttora da tenere presente, anche a fronte di evoluzioni metodologiche che si pongono in termini più restrittivi come la pubblicazione di metodi EPA dedicati a chironomidi, anfipodi, e più recentemente oligocheti (USEPA, 1994).

La varietà metodologica apporta generalmente un prezioso contributo in termini di parametri misurabili. In aree fortemente contaminate, quelle che la letteratura scientifica ha spesso reso famose (Black River, Puget Sound, etc), molti test possono dare risposte sostanzialmente concordi, e quindi uno qualunque dei metodi può essere utile strumento di indagine. I problemi viceversa aumentano e con essi le difficoltà interpretative con quelle aree moderatamente contaminate, che di fatto sono anche le più numerose, per le quali il disegno sperimentale, la scelta degli organismi test e soprattutto i parametri da indagare determinano fortemente il successo dell'indagine. In genere l'applicazione di approcci multispecifici ed integrati si rivela risolutiva, sottolineando l'importanza di applicare saggi che comprendano valutazioni di parametri subletali, meglio se misurati in organismi con diverso rapporto nutrizionale col sedimento (Burton e Scott, 1992; Burton et al., 1996; Viganò et al., 1999; 2002). La possibilità di utilizzare tra questi parametri anche alcuni tipi di biomarker, ad esempio di natura enzimatica, è una soluzione sperimentale di sicuro interesse (Viganò et al., 1995; Ingersoll et al., 1998; Viganò, 2000). Analogamente a quanto più volte documentato per i saggi su campioni acquosi, la mortalità degli organismi saggiati è infatti un evento relativamente raro in prove su campioni naturali, tanto più in seguito ad esposizioni a breve termine. Questa condizione, che è stata ed è tuttora una fonte molto comune di risultati falsamente negativi, può essere affrontata utilizzando saggi sensibili sia per durata, che per specie di organismi impiegati, che per parametri misurati (Sibley et al., 1997; Ingersoll et al., 1998).

Le recenti normative dedicate alla tutela del patrimonio idrico, e tra queste certamente il d.lgs n.152/99, hanno fatto propri due aspetti sostanziali, e cioè che i sedimenti possono essere sorgente di rischio per l'ecosistema acquatico (ma non solo) e che la valutazione di questo rischio non può limitarsi alla misura degli inquinanti che i sedimenti contengono. Sono cioè necessarie valutazioni di effetti diretti e indiretti, e tra queste saggi di tossicità e di bioaccumulo con organismi acquatici. In questa prima parte del rapporto vengono presentati dei metodi basati sull'impiego di tre diversi organismi, e cioè *Ceriodaphnia dubia*, trota iridea e *Lumbriculus variegatus*. Questi organismi identificano tre diverse relazioni con i contaminanti del sedimento, e ben si prestano a fornire, pertanto, preziose informazioni complementari. I dati ottenibili sono tanto più interessanti poiché relativi anche ad effetti cronici e subletali, e cioè ad alterazioni che come abbiamo già ricordato sono ampiamente rappresentative delle più comuni condizioni ambientali. L'oligocheta, in particolare, è proposto per condurre saggi più a lungo termine quali quelli richiesti per valutare la bioaccumulabilità degli inquinanti del sedimento. Esso si presta meglio di altre specie, è facile da manipolare e da allevare, tollera un grande intervallo di caratteristiche chimico-fisiche dei sedimenti, e soprattutto è poco sensibile ai contaminanti e sopravvive a lunghi periodi di esposizione senza aggiunta di cibo.

3. Metodo per test di tossicità cronica (7 giorni) su sedimento con ceriodaphnia dubia

A cura di Viganò L.

3.1 Riassunto

Viene descritto un metodo idoneo alla valutazione degli effetti tossici cronici che il sedimento di un corpo idrico superficiale può esercitare su organismi acquatici. Secondo questa procedura il campione di sedimento viene utilizzato tal quale e ad esso vengono esposti degli esemplari del crostaceo d'acqua dolce *Ceriodaphnia dubia* per un periodo di 7 giorni. Gli effetti dovuti alla contaminazione del sedimento sono evidenziabili attraverso una eventuale riduzione della sopravvivenza, dell'attività riproduttiva o dell'accrescimento del crostaceo.

3.2 Generalità sul metodo

Viene proposto un metodo per condurre dei test di tossicità su campioni di sedimento utilizzando *C. dubia* come organismo test. Sia *C. dubia* che altre specie di grande importanza ecotossicologica come *Daphnia magna* e *D. pulex*, appartengono alla famiglia dei Daphniidae. Questa è comunemente inclusa tra le famiglie di Cladoceri che comprendono specie più tipicamente planctoniche (Margaritora, 1983). Di fatto *C. dubia* vive nell'orizzonte più esterno del corpo idrico, quello occupato dalla vegetazione litorale, ed in un saggio sul sedimento *in toto*, quale è quello proposto in questa nota, questo crostaceo si comporta di fatto come un organismo epibentico (ASTM, 1994). Durante il saggio, è facile osservare *C. dubia* sulla superficie del sedimento e pertanto essa viene ad essere esposta tanto alla frazione solubile dei contaminanti, quella cioè che diffonde con l'acqua interstiziale, quanto alla frazione legata degli stessi poichè il crostaceo ingerisce attivamente le particelle di sedimento che, tra l'altro, sono facilmente visibili nel tubo digerente grazie alla relativa trasparenza del carapace. Nonostante queste peculiarità, il saggio con *C. dubia* non può considerarsi sostitutivo di quello con altre specie acquatiche la cui nicchia è strettamente bentica. Tuttavia, la possibilità di condurre diversi tipi di saggio con un'unica specie di organismo, e più precisamente questo tipo di saggio sul sedimento *in toto* e quello, ad esempio, su di un suo estratto organico, rende questa proposta metodologica con *C. dubia* di sicuro interesse applicativo. Non dimentichiamo, inoltre, che questo tipo di saggio è stato recentemente validato in due campagne condotte sui sedimenti dell'intera asta del fiume Po (Viganò, 2000; Viganò et al., 2002). La struttura di questo metodo è molto simile a quella descritta in documenti precedenti per un altro tipo di saggio parimenti della durata di 7 giorni e utilizzabile per la ricerca di effetti tossici di tipo cronico causati da effluenti di scarico e da acque superficiali (Viganò, 1998). Anzi, il parallelo più appropriato è proprio con il saggio su campioni di acque superficiali, ed in tal senso, è auspicabile che l'operatore abbia già esperienza su questo tipo di prove. Il saggio sul sedimento *in toto* consiste nell' esporre singolarmente 10 neonati di ceriodafnia ad altrettante aliquote del campione di sedimento. Al termine dei 7 giorni di esposizione, alcuni parametri quali la sopravvivenza, l'attività riproduttiva e l'accrescimento degli organismi vengono confrontati con un gruppo di controllo i cui individui sono stati mantenuti in analoghe condizioni sperimentali ma esposti ad un sedimento inerte.

Questo gruppo di controllo andrebbe affiancato, possibilmente, da un secondo gruppo di controllo il cui sedimento sia stato adeguato nel contenuto di carbonio organico a quello del campione in esame. Tuttavia, una soluzione a questo aspetto come a quello più generale della formulazione di un sedimento artificiale, non è affatto semplice, e proprio per la varietà di fattori che vi concorrono, non è ancora adeguatamente standardizzata né soprattutto di impiego diffuso. L'uso di un sedimento raccolto nel corpo idrico indagato ma da un'area non contaminata può essere più pratico e informativo. In ogni caso, i risultati ottenuti vanno interpretati nel complesso dei dati sperimentali tenendo ben presente che, oltre ad aspetti pu-

ramente quantitativi, anche la fonte del carbonio organico e quindi i suoi attributi qualitativi possono avere effetti molto evidenti (Lacey et al., 1999; Viganò, 2000).

3.3 Conduzione del saggio

3.3.1 Materiali e strumentazione

Per la conduzione del saggio di tossicità è necessario:

- un minimo di 40 contenitori del tipo beaker in vetro borosilicato con volume utile di 30 mL;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro con un temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
- dispositivo per il controllo della temperatura delle soluzioni da saggiare nell'ambito di $25 \pm 1^\circ\text{C}$ per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- microscopio binoculare da dissezione, provvisto di illuminazione laterale, micrometro oculare e micrometro obbiettivo;
- fonte di aria compressa a bassa pressione, con cannule in vetro o pipette pasteur per far gorgogliare aria nelle soluzioni da aerare. L'uso di un piccolo compressore del tipo usato in acquariologia costituisce una soluzione adeguata. Attenzione agli impianti centralizzati di aria compressa che spesso veicolano anche vapori di oli o altri inquinanti.

3.3.2 Organismi per il saggio

La specie da utilizzare per questo saggio di tossicità è il Cladocero Daphniidae *Ceriodaphnia dubia*. L'organismo viene allevato in laboratorio secondo una procedura standardizzata. Questa procedura è ampiamente descritta in appendice al "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *C. dubia*" (Viganò, 1996) al quale si rinvia per maggiori dettagli. In quel documento viene anche descritta la preparazione della coltura algale che, analogamente a tutti gli altri metodi con cladoceri, è impiegata per nutrire gli organismi.

Per l'allestimento del saggio si utilizzano i neonati prodotti da femmine mantenute in condizioni di allevamento standardizzate e che soddisfano i relativi criteri di qualità secondo quanto descritto nel metodo citato. I neonati appartenenti alla terza schiusa o ad una delle successive, sono quelli impiegati per allestire il saggio. Devono essere utilizzati neonati di età inferiore alla 24 h e preferibilmente con differenze di età limitate a poche ore, e ciò a vantaggio della contemporaneità degli eventi di schiusa e più in generale della interpretabilità dei risultati. Differenze comprese in un arco di 8-12 ore sono facilmente ottenibili. Se i neonati non fossero utilizzati entro 2-3 ore dall'isolamento dai recipienti in cui sono nati, è opportuno fornire loro del cibo, lo stesso utilizzato nel test e nella coltura degli organismi.

3.3.3 Acqua di diluizione

Se il saggio non ha obiettivi peculiari o fortemente finalizzati alle caratteristiche del sito indagato, vale la regola generale di utilizzare per il test lo stesso tipo di acqua usato per l'allevamento. Come già illustrato in precedenti documenti, l'acqua da utilizzare sia per l'allevamento che per il saggio, e cioè per una sperimentazione che possiamo definire standard, è un'acqua di tipo semisintetico.

Idealmente, l'uso di un'acqua completamente sintetica sarebbe la soluzione da preferire in

quanto maggiormente standardizzabile. Tuttavia, è stato osservato che le acque sintetiche, e cioè quelle preparate a partire da acqua distillata o deionizzata per aggiunta di sali di grado reagente, spesso non danno risultati soddisfacenti sia nell'allevamento che nei saggi, soprattutto se questi prevedono esposizioni di tipo cronico. Pertanto, l'uso di un mezzo semi-sintetico sembra essere ancora la soluzione da preferire.

Il modo più semplice di ottenere i volumi di acqua semisintetica necessari alle prove consiste nell'utilizzare come mezzo di partenza un'acqua minerale (meglio se oligominerale) scelta tra quelle disponibili in commercio. Questa viene corretta nei suoi costituenti maggiori aggiungendo i sali necessari ad ottenere le seguenti caratteristiche finali: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg CaCO₃/L, alcalinità 110-120 mg CaCO₃/L, Ca/Mg >1 e prossimo a 4, Na/K >1 e prossimo a 10.

3.3.4 Illuminazione

L'illuminazione da garantire nel corso della prova è la stessa alla quale gli organismi sono mantenuti nell'allevamento. L'intensità luminosa al piano di lavoro è accettabile se è nell'ambito di 500 – 1000 lux ed è fornita da lampade fluorescenti ad ampio spettro (indice di resa cromatica ≥ 90). Il fotoperiodo, anch'esso uguale a quello impostato per l'allevamento, è di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

3.3.5 Temperatura

E' essenziale ai fini della conduzione ottimale del saggio, e in particolare del controllo della tempistica e quindi dell'osservazione degli eventi di schiusa, che la temperatura dei contenitori di saggio sia mantenuta nell'ambito dei 25 ± 1°C per tutta la durata della prova.

3.3.6 Alimentazione

La dieta consigliata per la conduzione del saggio è indicata in precedenti pubblicazioni come dieta semplificata (Viganò, 1996; 1998). La componente di base di questa dieta è l'alga verde unicellulare *Selenastrum capricornutum*, recentemente riclassificata, sorprendentemente, con due successive denominazioni, delle quali la più nota è forse *Raphidocelis subcapitata*. La densità di cellule algali che deve essere garantita giornalmente è di 300.000 cell/mL. Oltre all'alga viene somministrata una sospensione di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*), anch'esso in ragione di 300.000 cell/mL. La dieta è completata da una soluzione di tre vitamine che devono essere dosate nel mezzo di coltura di *C. dubia* alle concentrazioni di 75 ng/L, 1 ng/L e 0,75 ng/L, rispettivamente di vitamina B₁, B₁₂ e H.

Il test su sedimento è articolato, vitamine a parte, su una dieta meno saturante, a densità crescente, e con una opportuna integrazione esterna all'ambiente strettamente di saggio. Per questo tipo di test, infatti, è prevista sia la somministrazione di cibo all'interno dei contenitori di saggio che la somministrazione di cibo in altri contenitori, accessori ai precedenti, che per comodità definiremo di alimentazione esterna. Questa particolarità è dovuta sostanzialmente al fatto che il campione di sedimento, a cui ogni singolo individuo è esposto, non viene rinnovato per tutta la durata del saggio, e pur tuttavia è necessario rinnovare l'acqua sovrastante al sedimento stesso e procedere alla conta e rimozione dei neonati prodotti. Ciò obbliga al trasferimento di ogni singolo individuo in un contenitore accessorio a quello di saggio per il tempo necessario a svolgere queste operazioni, terminate le quali viene reintrodotta nel beaker originale, quello contenente il campione di sedimento. In questo breve arco di tempo si provvede ad una alimentazione integrativa esterna. Questa integrazione esterna risponde anche alla necessità di evitare un eccessivo arricchimento in termini di materiale organico del sedimento

saggiato, poiché permette di limitare le quantità di cibo somministrate nel beaker del sedimento. La Tabella 1 riassume il piano di somministrazione della dieta nel corso del saggio.

All'avvio del saggio, l'acqua sovrastante il sedimento deve contenere una concentrazione di alghe e lievito pari a 150.000 cell/mL che vengono aggiunte in termini di pochi ml delle rispettive sospensioni concentrate direttamente ai beaker di saggio nei 20 mL di mezzo semi-sintetico.

Alle 24 h ore di esposizione, vengono aggiunti in 2 mL di acqua Milli-Q® (o di qualità equivalente) i quantitativi di sospensioni madre necessari ad ottenere nei beaker 200.000 cell/mL, sempre da intendersi per ciascuno degli organismi unicellulari che compongono la dieta.

Al secondo giorno, in concomitanza con il rinnovo del mezzo, questo dovrà contenere dosi di cibo tali da assicurare 200.000 cell/mL, mentre per l'alimentazione esterna il dosaggio della dieta deve garantire 300.000 cell/mL nei 15 mL di mezzo in cui gli organismi rimangono per un paio d'ore.

Al terzo giorno il mezzo non viene rinnovato, e la dieta, somministrata in quantità tali da garantire 200.000 cell/mL nei 20 mL del mezzo di saggio, viene nuovamente distribuita in volumi complessivi di 2 mL per beaker utilizzando ancora l'acqua Milli-Q® come veicolo. Quest'ultima è utile a compensare le perdite dovute all'evaporazione.

Al quarto, quinto e sesto giorno di saggio, è necessario rinnovare il mezzo quotidianamente, dosando la dieta alla concentrazione di 250.000 cell/mL. L'alimentazione esterna stabilita per la durata di 2 ore è sempre a 300.000 cell/mL.

Non dimenticando che la concentrazione di vitamine nel mezzo è costante per tutta la durata del saggio e che deve essere garantita mediante aggiunte quotidiane, al fine di contenere la manualità, conviene allestire più praticamente un'unica sospensione contenente alga, lievito e vitamine nel volume complessivo necessario o al rinnovo dell'intero mezzo o alle sole aggiunte in Milli-Q®, dosando quindi in un'unica somministrazione i tre ingredienti della dieta.

Tabella 1: - Schema di saggio a 7 giorni con *C. dubia* su campioni di sedimento talquale

	t zero	1°giorno	2°giorno	3°giorno	4°giorno	5°giorno	6°giorno	7° giorno
Alimentaz. nel beaker di saggio	150.000 cell/mL	200.000 cell/mL in Milli-Q	200.000 cell/mL	200.000 cell/mL in Milli-Q	250.000 cell/mL	250.000 cell/ML	250.000 cell/mL	
			+		+	+	+	Fine saggio
Alimentaz. esterna (2 h)	-	-	300.000 cell/mL	-	300.000 cell/mL	300.000 cell/mL	300.000 cell/mL	

3.3.7 Ossigeno disciolto

La concentrazione di ossigeno disciolto deve mantenersi a valori pari o superiori al 40% del valore di saturazione. In caso contrario è opportuno aerare il mezzo prima dei ricambi previsti, al contrario non è sostanzialmente praticabile l'aerazione dei contenitori di saggio, in presenza cioè sia del sedimento che degli organismi.

3.4 Procedura di saggio

contaminazione indagata, vale il criterio generale di allestire il saggio il più rapidamente possibile, tanto più quando sia sconosciuta la natura dei tossici presenti. Durante tale periodo il campione deve essere conservato a 4°C in contenitori privi di spazio di testa.

Tenendo presente che durante il periodo di conservazione i campioni tendono a sedimentare, è opportuno ricordare che al momento dell'allestimento il campione deve essere il più possibile omogeneo, ed inoltre privo di detriti grossolani, quali rami, foglie, ciottoli, che potrebbero ostacolare o rendere disomogenea la distribuzione del sedimento ai singoli contenitori di saggio. Anche i macroinvertebrati eventualmente raccolti con il campione andrebbero rimossi onde evitare fenomeni di predazione o altre possibili interferenze a discapito di *C. dubia*.

In pratica, il giorno antecedente l'avvio del saggio, il sedimento omogenato viene rapidamente distribuito in aliquote di 5 mL a ciascuno dei dieci beaker che saranno altrettante repliche di ogni serie espositiva. Di fatto, dieci contenitori e quindi dieci organismi per ogni sedimento. Si aggiungono, evitando turbolenze, 20 mL di mezzo semisintetico, assicurando in tal modo un rapporto 1:4 tra sedimento e mezzo, e si lasciano i contenitori in quiete sino all'introduzione dei neonati di *C. dubia*. Procedura analoga è adottata anche per il substrato di controllo, un substrato inerte come una sabbia fine di natura silicea avente granulometria di 0,5 – 1 mm. Il mattino seguente si aggiunge il cibo alla densità prevista e si distribuiscono i neonati di *C. dubia* ai contenitori di saggio procedendo secondo una sequenza casuale.

Come riassunto in Tabella 1, il primo cambio del mezzo verrà effettuato al secondo giorno del saggio. La rimozione del mezzo è facilmente ottenibile per aspirazione, utilizzando, ad esempio, delle pipette a stantuffo o provviste di propipetta in gomma. E' chiaro che la rimozione del mezzo non potrà essere completa, pena la rimozione del sedimento stesso. E' tuttavia facile garantire il rinnovo di almeno 15 mL di mezzo senza perturbare il microhabitat. Con gli stessi accessori è possibile reintrodurre il mezzo fresco evitando la risospensione del sedimento. I trasferimenti dei crostacei ai beaker di alimentazione esterna che contengono 15 mL di mezzo e cibo freschi, devono essere effettuati con molta cautela, minimizzando lo stress da manipolazione ed assicurandosi che i contenitori siano a loro volta a 25°C, e naturalmente per le due ore previste dal protocollo come tempo indicativo di alimentazione esterna. In occasione del rinnovo del mezzo possono essere effettuate le misurazioni di ossigeno disciolto, pH e temperatura etc.

Giornalmente si osservano gli organismi, si registrano gli eventuali decessi e si rimuovono, contandoli, i neonati prodotti. Si ricorda a questo proposito che una prima schiusa è prevista per il 4° giorno, una seconda indifferentemente al 5° o al 6° giorno, mentre la terza è osservabile al 7° ed ultimo giorno della sperimentazione.

Durante l'osservazione quotidiana è certamente utile individuare e rimuovere le exuvie, controllando in tal modo l'effettivo avvicinarsi degli eventi riproduttivi e di accrescimento. Ottenuta la terza schiusa dagli organismi di controllo, il saggio può essere considerato concluso e si può procedere pertanto alla misurazione della lunghezza dei singoli individui. La lunghezza è misurata al microscopio, dall'apice dell'elmetto sino alla base della spina caudale del carapace, che peraltro, in *C. dubia*, è molto meno pronunciata rispetto ad altri Cladoceri.

3.5 Validità del saggio

Al termine dei 7 giorni di sperimentazione i risultati del saggio sono da considerare accettabili se è sopravvissuto almeno l'80% degli individui di controllo, e se questi hanno prodotto un numero cumulativo medio di neonati pari o superiore a 15 per ciascuna femmina. Inoltre il tenore di ossigeno disciolto non deve essere mai sceso al di sotto del 40% del valore di saturazione.

3.6 Analisi dei risultati

L'analisi del tipo di risultati ottenibili da questo saggio su campioni di sedimento è del tutto analoga a quella dei saggi a 7 giorni condotti su campioni non diluiti di acque superficiali o effluenti di scarico. Come discusso in altri documenti (Viganò, 1998), l'analisi del caso più semplice consisterebbe nel confrontare la risposta media degli organismi esposti con quella di un gruppo di controllo verificando un'ipotesi di differenza nulla (H_0). Il confronto è comunemente basato sul test t la cui applicabilità richiede che i due campioni abbiano distribuzione normale e varianze non significativamente dissimili. Se invece si devono confrontare più gruppi espositivi con quello di controllo, il test di Dunnett o di Bonferroni sono i metodi da utilizzare, assolute naturalmente le condizioni di applicabilità dei vari metodi, e premesso che ANOVA abbia dato risultato positivo. Il test di Tukey può essere utile se si è interessati anche a confronti incrociati tra tutti i trattamenti e quando non vi siano andamenti noti nei livelli di contaminazione.

Pur potendo evidenziare la presenza di tossici a concentrazioni tali da produrre effetti acuti o comunque mortalità, tuttavia, la struttura del saggio realizzato su dieci repliche di singoli individui non consente un esame statistico dei dati di mortalità. Se si sospetta che il sedimento in esame possa essere causa di mortalità e si desidera offrire un supporto statistico a questo tipo di informazione è opportuno allestire, preventivamente, 3-4 repliche contenenti ciascuna 10 organismi, e naturalmente acqua e sedimento in volumi complessivi equivalenti. La conduzione della prova può essere arrestata alle 48 h di esposizione ed in tal caso si può ovviare alla somministrazione di cibo. Viceversa, se si prevede di protrarre il saggio sino allo scadere dei 7 giorni, l'impianto sperimentale deve essere integralmente e puntualmente adeguato alla nuova scala di lavoro. Le percentuali di sopravvivenza via via ottenute saranno infine analizzati secondo il test di Fisher.

4. Metodo per test di tossicità a breve termine (7 giorni) su sedimento con trota iridea (*oncorhynchus mykiss*)

A cura di Attilio Arillo e Luigi Viganò

4.1 Riassunto

Il metodo descritto in questa nota affronta, unico nel suo genere, la possibilità di applicare una risposta squisitamente subletale quale è l'induzione di un'attività enzimatica di biotrasformazione all'indagine del rischio tossicologico causato da sedimenti contaminati. Quest'attività enzimatica viene determinata nell'avannotto di trota iridea che per alcuni giorni dopo la schiusa è provvisto di un grosso sacco vitellino, è incapace di nuotare ed è pertanto bentonico. L'esposizione di questo stadio larvale di trota iridea dura solo 7 giorni e le dimensioni dell'organismo permettono una struttura sperimentale di dimensioni contenute e di facile gestione per molti laboratori. L'impostazione sperimentale permette, inoltre, l'esame degli eventuali effetti sulla sopravvivenza.

4.2 Generalità sul metodo

La seguente proposta di metodo descrive come esporre una specie ittica notoriamente sensibile quale è trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) ad un campione di sedimento tal quale saggiandone i possibili effetti letali ma soprattutto quelli di natura subletale. Questo saggio ha sostanziali caratteristiche di unicità in quanto utilizza non tanto una specie ittica, soluzione sperimentale più volte affrontata in letteratura, quanto il suo stadio larvale che, essendo inidoneo al nuoto, è forzatamente bentonico e quindi esposto direttamente ai contaminanti del sedimento. Inoltre, in tale stadio larvale viene misurato un biomarker tra i più sensibili attualmente a disposizione delle indagini ambientali, e cioè l'attività enzimatica etossiresorufina-O-deetilasi (EROD), e questo è certamente un aspetto peculiare. Si tratta di un'attività citocromo P-450 dipendente, e più precisamente di una monoossigenasi a funzione mista (MFO), materialmente localizzabile a livello del reticolo endoplasmico liscio delle cellule di molti organi del pesce. EROD appartiene al grande gruppo delle attività di biotrasformazione, e cioè a quegli enzimi che, all'interno degli organismi viventi, presiedono alle trasformazioni dei composti xenobiotici (ma non solo) in altri composti generalmente più solubili in acqua e pertanto più facilmente escreti. Vi è infine un'ulteriore caratteristica di questo saggio che merita di essere sottolineata, e cioè, che esso è in grado di fornire risultati indipendenti dalle proprietà nutrizionali del sedimento. Al contrario, l'interferenza tra le proprietà tossiche e nutrizionali di un sedimento è elemento comune forse a tutti gli altri saggi su sedimento *in toto* descritti in letteratura. Questa interazione è verosimilmente responsabile di numerosi falsi negativi, piuttosto difficili da interpretare.

La possibilità di utilizzare una monoossigenasi come indicatore di esposizione, recente o in atto, a xenobiotici, e dunque come indicatore di rischio tossicologico, risiede nel fatto che lo stesso xenobiotico induce a livello cellulare la sintesi della monoossigenasi che ne catalizza la trasformazione. Dal momento che la sintesi è proporzionale alla quantità di xenobiotico presente, misurare, come in questo caso, l'attività EROD equivale ad una stima indiretta della concentrazione di xenobiotico alla quale l'organismo è esposto. Le attività di biotrasformazione sono normalmente maggiori nel fegato, ma sono presenti anche in altri organi come intestino, rene e branchie, i quali pertanto possono contribuire al livello di attività misurabile sull'intero corpo dell'avannotto, come è proposto in questo metodo di saggio. Misurare l'attività EROD nell'intero avannotto è una semplificazione imposta dalle modeste dimensioni dello stadio larvale, viceversa, infatti, sarebbe necessario isolare dall'avannotto singoli organi o tessuti complicando notevolmente l'applicabilità del metodo.

L'uso delle attività di biotrasformazione in indagini ambientali è stato validato in moltissimi

studi condotti soprattutto nell'ultimo decennio e prevalentemente sulla fauna ittica. Diversi di questi studi sono stati condotti in campo, e hanno confrontato l'attività monoossigenasica epatica in pesci esposti o catturati in aree a contaminazione nota (o sospetta) con quella di esemplari a loro volta esposti o residenti in aree non inquinate, riscontrando, nei primi, livelli di attività generalmente superiori (Lindstrom-Seppa e Oikari, 1989; De Flora et al., 1993; Viganò et al., 1998a; Kirby et al., 1999). Molti studi sono stati condotti anche in laboratorio, utilizzando in varie combinazioni, sia singoli xenobiotici che loro miscele, come pure acque superficiali, effluenti di scarico ed anche sedimenti (Melancon et al., 1989; Holm et al., 1993; Viganò et al., 1995; Parrot et al., 1995; Viganò et al., 1998b). Nella larga maggioranza dei casi, è stato possibile osservare un incremento dose-dipendente, e nello specifico dell'attività EROD è stato documentato come essa venga indotta da inquinanti che dal punto di vista ambientale sono tra i più temibili. I composti aromatici polinucleari (PAH), i bifenili policlorurati (PCB) e polibromati (PBB), i naftaleni policlorurati (PCN), le diossine (PCDD), i furani (PCDF), sono alcuni esempi di tali tipi di inquinanti, e tra questi in particolare quelli aventi strutture planari.

Il metodo descritto in questo documento è stato applicato con diverse soluzioni sperimentali in vari studi, l'ultimo dei quali ha interessato l'intera asta del fiume Po (Viganò et al., 2002).

4.3 Conduzione del saggio

4.3.1 Materiali e strumentazione

Per condurre questo saggio sono necessari oltre alla normale strumentazione di laboratorio

- un minimo di 8 contenitori del tipo cristallizzatori in vetro borosilicato con volume utile di 1 L;
- vaschette con prevalente sviluppo orizzontale aventi volume utile di 10 - 15 L per la schiusa delle uova;
- dispositivo per il controllo della temperatura nell'ambito di $12 \pm 1^\circ\text{C}$ per tutta la durata della sperimentazione sia delle soluzioni di saggio che delle vasche di schiusa;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- fonte di aria compressa a bassa pressione, con cannule in vetro o pipette pasteur per far gorgogliare aria nelle soluzioni di saggio. Attenzione agli impianti centralizzati di aria compressa che generalmente veicolano anche vapori di oli o altri inquinanti;
- contenitore tipo Dewar per azoto liquido con volume utile di almeno 10 L, meglio se provvisto di accessori per la conservazione ordinata dei campioni al suo interno;
- contenitore tipo Dewar per azoto liquido con volume utile di 0,5 L per il congelamento dei campioni biologici a fine saggio;
- congelatore a -80°C per la conservazione, più a lungo termine, dei campioni biologici già frazionati;
- serie completa di pipette automatiche, da 10 a 10.000 μL ;
- fiale a fondo conico da 1 - 1,5 mL idonee al congelamento anche in azoto liquido ed alla conservazione delle frazioni dei campioni;
- due omogenizzatori tipo Potter-Elvehjem con pistone in Teflon® e cilindro in vetro; uno più piccolo (capacità di circa 10 mL), l'altro, più grande, con capacità di circa 50 mL;
- centrifuga refrigerata idonea a raggiungere 12.000 g;

- ultracentrifuga refrigerata capace di raggiungere 105.000 g;
- spettrofotometro doppio raggio, corredato di cuvette monouso;
- spettrofluorimetro idoneo a seguire una cinetica di reazione in cuvetta, corredato di cuvette di quarzo;
- pHmetro con elettrodo coassiale idoneo alla misura in piccoli volumi di liquido;
- bagno termostato idoneo a temperature comprese tra 20 e 50°C;
- agitatori tipo Vortex.

4.3.2 Acqua di diluizione

In generale, vale la regola di utilizzare per il test lo stesso tipo di acqua usato per la schiusa delle uova. Dal momento che entrambe le fasi della sperimentazione possono essere svolte in condizioni semistatiche, i volumi di acqua necessari complessivamente sono limitati e prevedibili. Pertanto, come già illustrato in precedenti documenti (Viganò, 1996), sia per la schiusa che per il saggio possono essere utilizzate soluzioni che in funzione degli obiettivi potranno offrire un grado di standardizzazione crescente. E' cioè possibile ricorrere a mezzi semi-sintetici ma anche completamente sintetici.

Nel primo caso l'acqua di base può essere individuata in un'acqua di rete, di falda ed eventualmente in un corpo idrico superficiale o ancora in un'acqua minerale tra quelle reperibili in commercio. Nel caso l'acqua di rete sia clorata è certamente preferibile evitarne l'uso, dal momento che tanto il cloro residuo che i prodotti della clorazione sono tossici per gli organismi acquatici. Attenzione, in generale, anche alle concentrazioni di taluni metalli quali zinco, piombo, rame, che possono essere presenti in quantità elevate.

Al fine di guidare la scelta di sorgenti alternative ad un'acqua di rete o di altra provenienza non idonea, in Tabella 2 sono elencati i valori guida di alcuni indicatori di tipo chimico, utili ai fini di un giudizio di accettabilità. Per altri possibili contaminanti si faccia riferimento ai minimi valori noti di non effetto o ai rispettivi criteri di qualità per la vita acquatica. In ogni caso, è lecito attendersi che acque che consentono con successo l'allevamento in laboratorio di altre specie di organismi, come ad esempio le dafnie, possano essere un soddisfacente punto di partenza anche per trota iridea.

Individuata l'acqua di base, gli aggiustamenti necessari possono andare dalla semplice diluizione con acqua deionizzata o Milli-Q® all'aggiunta di sali di grado reagente. Lo scopo finale è quello di ottenere un mezzo con le seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg CaCO₃/L, alcalinità 110-120 mg CaCO₃/L, Ca/Mg >1 e prossimo a 4, Na/K >1 e prossimo a 10.

Tabella 2: - Alcune caratteristiche di un'acqua di diluizione accettabile

Carbonio organico totale	< 2 mg/L	
Ammoniaca nonionizzata	< 5 µg/L	(*)
Cu	< 6 µg/L	
Pb	< 1 µg/L	(**)
Zn	< 30 µg/L	(**)
Solidi sospesi	< 5 mg/L	(**)
(*) meglio se non rilevabile		
(**) per acque a bassa durezza (≤ 60 mg CaCO ₃ /L)		

Nel secondo caso, quello cioè di un mezzo completamente sintetico, ad acqua deionizzata o Milli-Q® (o di qualità equivalenti) vengono aggiunti, nell'ordine, i seguenti sali: 10 mg KCl/L,

192 mg NaHCO_3/L , 53 mg MgSO_4/L e 183 mg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{L}$. Il mezzo ha le medesime caratteristiche finali sopra indicate. È consigliabile, soprattutto nel caso si utilizzi acqua deionizzata, preparare diversi giorni prima dell'uso la quantità di mezzo necessario alla sperimentazione, mantenendolo in aerazione moderata e continua. Ciò ne migliora ulteriormente la qualità.

Qualsiasi sia la soluzione adottata, le uova embrionate, una volta trasportate in laboratorio, dovranno essere immerse e mantenute fino alla schiusa nello stesso tipo di acqua che sarà poi usato per il saggio (vedi Appendice A1).

4.3.3 *Illuminazione*

Tanto gli eventi di schiusa che il saggio in senso stretto devono essere mantenuti in condizioni di illuminazione molto attenuata, sostanzialmente in semioscurità. Per eventuali brevi osservazioni è preferibile utilizzare fonti luminose a incandescenza e di modesta intensità.

4.3.4 *Temperatura*

Per una conduzione ottimale del saggio, e soprattutto per il controllo dei tempi di sviluppo e schiusa degli avannotti di trota, è importante che la temperatura sia mantenuta stabilmente ai livelli desiderati. Per questo saggio con trota iridea si consiglia di mantenere la temperatura nell'ambito dei $12 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.3.5 *Alimentazione*

Lo stadio larvale di trota iridea è provvisto di un vistoso sacco vitellino i cui materiali di riserva vengono utilizzati in un arco di tempo valutato in 180 - 220 gradi/giorno, che è per l'appunto, il tempo necessario al riassorbimento del sacco medesimo. Ciò significa che lo sfruttamento del materiale di riserva dipende dalla temperatura, ed in un modo tale che, ad una temperatura ad esempio di 13°C , gli avannotti sarebbero indipendenti da fonti alimentari esterne per circa 15 giorni, per un arco di tempo, cioè, ampiamente sufficiente al completamento del saggio od, eventualmente, ad un suo prolungamento, senza che sia necessario somministrare alcun tipo di cibo.

4.3.6 *Ossigeno disciolto*

Durante la sperimentazione l'ossigeno disciolto deve essere mantenuto a valori pari, ma preferibilmente superiori, al 60 % del valore di saturazione. L'aerazione con pipette pasteur applicata ai singoli contenitori di saggio soddisfa facilmente questa condizione.

4.4 **Procedura di saggio**

Il campione di sedimento deve essere utilizzato entro pochi giorni dal prelievo, e in tale periodo che si raccomanda il più breve possibile, il campione deve essere conservato al buio, refrigerato (4°C) ed in contenitori privi di spazio di testa. Dal momento che in tale periodo di quiete il campione tende a sedimentare, esso deve essere accuratamente omogenato e poi distribuito ai quattro contenitori che saranno altrettante repliche di saggio del campione in esame. La quantità da immettere in ogni contenitore è di 200 mL cui verranno aggiunti 800 mL di acqua standard o semisintetica, realizzando in tal modo il rapporto di 1:4 tra sedimento e mezzo sovrastante. L'acqua deve essere aggiunta con la cautela necessaria a minimizzare la

risospensione del sedimento stesso. In ogni caso i contenitori così allestiti vengono posti in aerazione moderata sino al giorno seguente, quando verranno introdotti gli avannotti di trota iridea. Per insufflare aria si usano cannule in vetro o pipette pasteur, mentre per semplificare sia le operazioni di immissione del mezzo che i successivi rinnovi dello stesso può essere conveniente posizionare nel sedimento il coperchio di una scatola petri o altro contenitore di foglia e dimensioni similari.

Per quanto riguarda il trattamento di controllo, si utilizza un substrato relativamente inerte quale potrebbe essere la sabbia silicea, accuratamente lavata, e con granulometria indicativamente di 1 - 2 mm. In questo tipo di saggio, data la completa autonomia nutrizionale degli avannotti, allestire ulteriori gruppi di controllo con sedimenti artificiali che simulino i livelli di carbonio e azoto presenti nei campioni reali, è di importanza secondaria.

All'avvio del saggio, in ognuna delle quattro repliche che compongono un trattamento espositivo, si introducono 40 avannotti di trota iridea di età ≤ 48 h, ottenuti secondo la procedura descritta in Appendice A1. La distribuzione ai recipienti deve essere casuale ed effettuata con tutte le precauzioni atte a minimizzare ogni possibile stress.

Allo scadere delle 48 h di esposizione si rinnova il mezzo per sifonamento e quotidianamente si registrano gli eventuali decessi. Terminata la fase espositiva, gli avannotti vengono raccolti in un retino, eventualmente ripuliti da particelle di sedimento, asciugati delicatamente con carta da filtro e congelati in azoto liquido, utilizzando quei contenitori di tipo Dewar con volume di 0,5 L. E' consigliabile congelare ogni lotto in sottogruppi composti solo da qualche individuo, riunendo poi tutti gli avannotti della stessa replica espositiva in un unico contenitore, fatto ad esempio con un foglio di alluminio, che a sua volta potrà essere conservato in azoto liquido. Ciò faciliterà una delle prime operazioni che dovranno essere effettuate nel corso della determinazione dell'attività EROD, e cioè la rimozione dei residui del sacco vitellino, il quale contiene composti in grado di inibire l'attività EROD. La conservazione dei campioni di avannotti in azoto liquido, e a questo scopo si userà il Dewar con circa 10 L di capacità, può essere protratta per varie settimane, sebbene anche in questo caso valga il suggerimento di processare i campioni il più presto possibile.

4.4.1 Estrazione dei microsomi

Ogni gruppo di avannotti, composto dagli individui di una medesima replica, viene pesato senza scongelare il campione. Sempre senza scongelare il materiale biologico, si rimuovono i sacchi vitellini, i quali potrebbero essere utilizzati, in una fase successiva, per la ricerca dei contaminanti assunti dall'avannotto durante la sperimentazione. Una volta rimosso il sacco vitellino, è possibile scongelare lentamente i piccoli pesci sminuzzandoli in una soluzione di TRIS-HCl (10 mM) e KCl (150 mM) corretta, se necessario, a pH 7,4 con HCl (tampone A). Questa operazione di sminuzzamento viene effettuata in un becker immerso in ghiaccio tritato. Si lavano ripetutamente i frammenti dei pesci col medesimo tampone (A) fino a quando non risulta più evidente la presenza di muco nel liquido di lavaggio.

Elemento comune a tutte le operazioni successive allo scongelamento è che le manipolazioni dei campioni devono essere effettuate, salvo diversa indicazione, a bassa temperatura, nell'intorno cioè dei 2 - 4°C, immergendo i becker contenenti i campioni in bagni con ghiaccio tritato.

Il campione viene successivamente lavato una volta in una soluzione di saccarosio (250 mM), EDTA-Na (1 mM) e TRIS-HCl (50 mM), sempre corretta a pH 7,4 (tampone B). I frammenti di pesci vengono risospesi in 40 mL di tampone B e omogenati. Per omogenare viene utilizzato un sistema Potter-Elvehjem in vetro e Teflon® dalla capacità di circa 50 mL. L'omogenato è poi centrifugato a 12.000 g per 20 min ed il surnatante viene trasferito, aspirandolo mediante una pipetta, in provette per ultracentrifuga e centrifugato a 105.000 g per 1 h. Il trasferimento

mediante aspirazione con pipetta si rende necessario in quanto occorre prestare la massima attenzione a scartare il liquido di interfaccia fra pellet e surnatante.

Nel caso si vogliano misurare anche attività enzimatiche citoplasmatiche, il surnatante risultato dell'ultracentrifugazione può essere raccolto e conservato a -80°C . Viceversa, l'unica frazione di interesse è il sedimentato microsomiale (pellet). Eliminato il surnatante, il pellet viene risospeso in tampone A e trasferito in un potter, di circa 10 mL di capacità, nel quale la risospensione viene accuratamente effettuata utilizzando manualmente il pestello di Teflon®. La sospensione viene quindi trasferita nelle provette da ultracentrifuga e centrifugata a 105.000 g per 50 minuti. Questa seconda ultracentrifugazione può essere omessa se il pellet della prima ultracentrifugazione fosse molto scarso. In ogni caso, il pellet ottenuto dalla prima o dalla seconda ultracentrifugazione è accuratamente risospeso (sempre utilizzando il potter da 10 mL) nel tampone destinato alla conservazione finale delle singole frazioni microsomiali. Questo tampone è una soluzione di TRIS-HCl (100 mM), KCl (150 mM), EDTA-Na (0,2 mM) e glicerolo (20%) corretta a pH 7,4. Il pellet microsomiale è risospeso nel tampone di conservazione secondo un rapporto indicativo di 0,5 mL per ogni grammo di tessuto originale. Facendo attenzione a risospendere i microsomi il più omogeneamente possibile, di ogni campione possono essere preparate varie aliquote conservabili singolarmente in cella a -80°C in fiale da 1 mL. Parte di queste saranno utilizzabili per la determinazione delle proteine e parte per la determinazione dell'attività EROD (cfr. Par. 3.2 e 3.3). Indicativamente, aliquote da 150 - 200 mL dovrebbero rispondere alla necessità di un contenuto minimo di analita necessario alla rilevabilità per entrambi questi metodi. Le frazioni così preparate sono conservabili per molte settimane, ma ancora una volta se ne consiglia l'impiego più rapido possibile.

4.4.2 Determinazione delle proteine microsomiali

Il contenuto proteico viene determinato mediante il metodo di Lowry et al. (1951). Secondo questa procedura ampiamente validata e riconosciuta nella letteratura scientifica, la determinazione è fatta in relazione ad uno standard di albumina di siero bovino. Utilizzando 2 - 4 mL di una soluzione di desossicolato di sodio (2 g in 100 mL di acqua distillata) si dissolve un'aliquota pari a circa 25 μL della frazione microsomiale da analizzare. Ad 1 mL di tale soluzione si aggiungono 0,9 mL di una soluzione ottenuta sciogliendo in 500 mL di NaOH 1N, 2 g di Na-K tartrato, 100 g di Na_2CO_3 e portando ad 1 L il volume finale con acqua distillata.

Il campione viene poi incubato a 50°C per 10 minuti, raffreddato a temperatura ambiente e successivamente addizionato con 0,1 mL di una soluzione ottenuta sciogliendo 2 g di Na-K tartrato, 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 10 mL di NaOH 1N e portando il volume finale a 100 mL con acqua distillata. Il campione viene vorticato e lasciato per 10 minuti a temperatura ambiente. Trascorso questo periodo, al campione si aggiungono 3 mL di una soluzione di Folin - Ciocalteu (1 volume di reattivo di Folin - Ciocalteu + 15 volumi d'acqua distillata). Dopo agitazione, il campione viene posto per 10 minuti a 50°C e successivamente letto allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 650 nm. È preferibile saggiare almeno due repliche di ciascun campione.

La lettura è riferita ad una curva di taratura realizzata a partire da una soluzione di albumina bovina pari a 100 mg/mL. Diluizioni scalari di tale soluzione vengono trattate in modo analogo ai campioni microsomiali e lette a 650 nm. La colorazione dei campioni è stabile per un massimo di 4 ore dalla preparazione degli stessi.

Altre procedure sono eventualmente utilizzabili per la determinazione del contenuto proteico, come ad esempio quella proposta da Bradford (1976) pure basata sul raffronto con uno standard di albumina bovina.

4.4.3 Determinazione dell'attività EROD

Il metodo di determinazione dell'attività EROD è quello sviluppato da Burke e Mayer (1974), sicuramente uno dei più ampiamente diffusi e affidabili, sia nella versione originale che in una delle sue diverse evoluzioni. Esso si basa sulla determinazione della resorufina, che è il prodotto della reazione del citocromo 1A1 microsomiale sul substrato prototipo etossiresorufina. Secondo questa procedura, l'etossiresorufina viene esposta all'azione dello specifico enzima presente nei microsomi di trota facendo avvenire la reazione in tampone TRIS-HCl contenente NADPH, coenzima necessario all'attività dell'EROD. Poiché la resorufina è un composto fluorescente, la determinazione di questa sostanza viene effettuata misurando allo spettrofluorimetro la comparsa della fluorescenza specifica della resorufina prodotta nel corso della reazione catalizzata dall'EROD. In pratica, si opera direttamente nella cuvetta dello spettrofluorimetro nella quale vengono aggiunti, nell'ordine, il tampone TRIS-HCl (concentrazione finale pari a 100 mM, pH 7,8), la sospensione microsomiale in quantità tale da garantire un livello di proteine pari ad almeno a 300 mg/mL, e l'etossiresorufina, solubilizzata poco prima dell'uso in DMSO, a dare la concentrazione finale di 2 μ M. In pochi minuti portare la temperatura della miscela a 25°C ed attivare la reazione mediante l'aggiunta di 10 mL di una soluzione 10 mM di NADPH (concentrazione finale 50 μ M). Inserire rapidamente la cuvetta nello spettrofluorimetro e seguire la cinetica di reazione per 3 - 4 min., utilizzando 530 nm e 585 nm, rispettivamente come lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione. Altri autori usano per lo stesso scopo le lunghezze d'onda di 510 nm e 586 nm. I valori vengono letti contro un bianco contenente tutti i componenti già menzionati tranne il NADPH.

Le quantità di resorufina prodotte sono determinate usando una retta di calibrazione preparata a partire da una soluzione standard di resorufina in etanolo. Di questa vengono preparate varie concentrazioni scalari in tampone TRIS-HCl, coprendo un intervallo compreso indicativamente tra 20 e 200 pmoli/mL. E' necessario preparare lo standard di resorufina al momento dell'uso e proteggerlo dalla luce, che viceversa lo degraderebbe completamente nell'arco di un paio d'ore a temperatura ambiente.

L'attività EROD è espressa come pmoli di resorufina prodotte al minuto per mg di proteine microsomiali. Nel caso degli avannotti sono stati osservati livelli di attività EROD compresi orientativamente tra 0,2 e 3,0 pmoli/min/mg proteine, determinati, rispettivamente, in organismi di controllo ed esposti ad un sedimento moderatamente contaminato quale quello campionato nel fiume Po a valle dell'immissione del fiume Lambro.

4.5 Validità del saggio

I risultati del saggio sono accettabili se la concentrazione di ossigeno disciolto nei diversi trattamenti si è mantenuta a valori pari o superiori al 60% del valore di saturazione. E parimenti se la mortalità degli organismi di controllo è inferiore al 10%.

4.6 Analisi dei risultati

Le quattro repliche allestite per ogni campione consentono di disporre di altrettante misurazioni di attività EROD per ciascun gruppo espositivo. L'analisi dei risultati può quindi essere ricondotta a quella del confronto delle medie tra uno o più trattamenti ed un controllo. Se il saggio comprende un gruppo di controllo ed un solo sedimento, il test *t* è sufficiente a stabilire se le attività medie dei due gruppi siano significativamente diverse, e cioè che l'ipotesi di differenza nulla (H_0) sia rifiutabile. Quando le medie da confrontare e quindi i trattamenti in

esame sono più di due è necessario procedere all'analisi della varianza (ANOVA) e all'applicazione di test di confronto tra le medie. Anche questi metodi di analisi richiedono distribuzioni normali dei dati e omogeneità della varianza. Se ANOVA conferma l'esistenza di differenze significative, i test di Dunnet, Williams e Tukey possono identificare quali sedimenti abbiano indotto incrementi significativi rispetto al controllo. La scelta di quale metodo applicare è guidata dall'esistenza nell'assetto sperimentale di livelli crescenti di contaminazione, piuttosto che dalla mancanza di una gerarchia di rischio nota, o ancora dall'opportunità di confrontare tutti i trattamenti tra loro. A sua volta, la significatività di eventuali decessi potrà essere valutata mediante il test di Fisher, che a sua volta permette di verificare un'ipotesi nulla e cioè che le percentuali di organismi deceduti non differiscano significativamente.

4.7 Appendice A1– Schiusa delle uova in laboratorio

In questo saggio su sedimento tal quale, l'organismo test è l'avannotto di trota iridea appena nato. Il modo più semplice di ottenere questo stadio del ciclo vitale di trota consiste nell'acquistare le uova fecondate presso allevamenti specializzati. Nelle trotecolture commerciali vengono mantenuti diversi ceppi di individui selezionati per riprodursi in momenti diversi dell'anno. Pertanto, fatto salvo forse uno o due mesi estivi, la disponibilità di uova e avannotti è da considerarsi pressochè continua.

Le uova di trota iridea possono essere trasportate. Lo stadio più facilmente trasportabile è quello di uovo embrionato, detto anche "uovo con occhio", poiché a questo stadio si intravedono per l'appunto gli occhi in formazione come due macchie scure. La trasportabilità è tale che le uova vengono confezionate addirittura senz'acqua in vassoi forellati di polistirolo. Al di sopra di questi si colloca generalmente un altro vassoio contenente del ghiaccio che sciogliendosi e gocciolando sulle uova sottostanti le mantiene umide e a bassa temperatura per le ore necessarie a raggiungere il laboratorio. Giunti a destinazione, ed in luce attenuata, si irrorano le uova per alcuni minuti con l'acqua del laboratorio prima di immergerle definitivamente nelle vaschette che le accoglieranno fino alla schiusa. La trasportabilità delle uova termina 4 – 5 giorni prima della schiusa. Anche per questo motivo è importante che tutti gli eventi riguardanti lo sviluppo delle uova siano noti, e cioè dal momento della fecondazione, ed eventualmente più a monte dall'identità dei riproduttori, sino alla schiusa in laboratorio. In ogni caso una trotecoltura professionale non avrà difficoltà a fornire tutte le informazioni necessarie, come pure ad organizzare il trasporto della quantità di uova richieste.

Le uova di trota iridea schiudono in un arco di tempo che è dipendente dalla temperatura dell'acqua ed è equivalente a 300 – 320 gradi/giorno. Ciò significa che le tappe dello sviluppo embrionale e la schiusa dipendono dalla temperatura a tal punto che nota quest'ultima esse divengono di fatto eventi prevedibili. Questo non significa, d'altro canto, che le uova possano essere incubate a una temperatura qualsiasi. Nel caso di trota iridea i dati di letteratura definiscono un ambito ottimale compreso tra 10 e 12°C e danno 14,6°C come limite massimo superiore, poiché a questa temperatura si osserverebbe già il 50% di mortalità. In ogni caso, questo valore è stato definito sperimentando sull'intero arco dello sviluppo embrionale, dalla fecondazione alla schiusa, ed inoltre, gli stessi ambiti ottimali possono essere differenti per i diversi ceppi di trota iridea.

In laboratorio, lo sviluppo delle uova embrionate è portato a completamento utilizzando delle vaschette a prevalente sviluppo orizzontale con volume utile di 10 – 15 L. La forma dei contenitori permette l'incubazione di diverse centinaia di uova che devono essere mantenute rigorosamente non sovrapposte, quindi in un unico strato, e non troppo addensate, per permettere le operazioni di pulizia. A questo proposito è opportuno ricordare che vi è un certo grado di mortalità naturale che dovrebbe aggirarsi sul 10- 20 %. Le uova morte assumono

rapidamente un colore biancastro e altrettanto rapidamente vengono attaccate da funghi che conferiscono loro un aspetto cotonoso. Le uova decedute devono essere immediatamente allontanate poiché l'organismo fungino rapidamente si propaga anche alle uova vive circostanti causando la morte degli embrioni. La forma dei contenitori favorisce inoltre gli scambi gassosi e quindi la presenza di elevati livelli di ossigeno disciolto, la cui concentrazione deve essere sempre nell'intorno della saturazione. Ciò è ottenibile mantenendo il mezzo in aerazione continua con due e anche tre diffusori di aria compressa per ogni vaschetta. Durante l'incubazione, ogni 48 h, il mezzo viene rinnovato quasi completamente, evitando di esporre gli embrioni a stress termici e meccanici.

La schiusa delle uova non è contemporanea, neanche quando le uova provengono da un'unica femmina. Gli eventi di schiusa sono infatti distribuiti in un arco di tempo che ancora una volta dipende dalla temperatura dell'acqua ed è valutabile in almeno 50 gradi/giorno. Compatibilmente con le esigenze della sperimentazione si utilizzeranno avannotti nati da 24 massimo 48 h. Onde evitare che si mescolino individui nati in un arco di tempo maggiore, è opportuno isolare giornalmente i neonati dalle vasche di incubazione, soprattutto quando uova ottenute da più femmine presentassero eventi di schiusa eccessivamente distribuiti nel tempo. Durante i giorni delle schiuse il mezzo viene rinnovato quotidianamente e se necessario anche due volte al giorno, e con le stesse cautele già menzionate.

5. Proposta di metodo per la valutazione del bioaccumulo con *lumbriculus variegatus* di sostanze associate al sedimento

A cura di Sara Valsecchi

5.1 Generalità sul metodo

Nella stesura del metodo per la determinazione del bioaccumulo di sostanze associate ai sedimenti si sono tenuti in considerazione i protocolli disponibili per questo tipo di studi, (ASTM 1998, OECD 1999 e USEPA 1999), al fine di proporre una procedura che fornisca risultati significativi e confrontabili non solo in ambito italiano ma anche internazionale. Il metodo, seppur completo di tutte le informazioni necessarie per l'esecuzione del saggio e per l'allevamento degli organismi, è da considerarsi una proposta in quanto non è ancora stato sottoposto ad un esteso programma di validazione.

Il bioaccumulo di composti associati a sedimento è valutato mediante l'esposizione al sedimento per 28 giorni d'individui adulti dell'oligocheta *Lumbriculus variegatus*. La misura del contenuto di composti d'interesse negli organismi esposti e nel sedimento permette la determinazione del fattore di bioaccumulo.

Il tempo d'esposizione di 28 giorni è stato scelto per massimizzare l'esposizione dei composti associati al sedimento in quanto molte sostanze organiche apolari raggiungono lo stato stazionario della curva di bioaccumulo dopo 12 e 14 giorni d'esposizione (Egeler e coll. 1997, OECD 1999 e USEPA 1999), ma non permette di sostenere con certezza che si raggiunga la massima concentrazione nell'organismo.

In appendice sono riportate le condizioni per l'allevamento e il modo con cui determinare i controlli di qualità.

5.2 Procedura

5.2.1 Organismi per il saggio

Impiegare per il saggio organismi adulti (lunghezza 40-50mm, diametro 1-1,5 mm e peso fresco (p.f.) compreso tra 5 e 12 mg (Phipps e coll. 1993)) provenienti da culture sottoposte a controlli di qualità.

Il giorno precedente l'inizio del saggio isolare gli organismi dalla coltura trasferendo il substrato e un po' d'acqua in un beaker; roteando dolcemente il beaker gli organismi si riuniscono in ammassi che possono essere facilmente separati dal substrato. Per recuperare i singoli animali utilizzare invece una pipetta di 3-5 mm di diametro interno (d.i.). Pulire gli organismi isolati mediante risciacqui ripetuti con acqua di coltura e mantenerli in acqua termostatata fino al giorno successivo, accertandosi che l'ossigeno non scenda sotto 2,5 mg/L, altrimenti cambiare l'acqua o ripristinare l'ossigeno mancante inserendo un opportuno dispositivo d'aerazione.

Il giorno d'inizio del saggio separare gli organismi isolati in gruppi di peso appropriato per i controlli e le repliche allestite. Il peso degli oligocheti è determinato versando tutti gli organismi appartenenti ad un gruppo in una navicella pre-pesata cercando di eliminare più acqua possibile mediante una pipetta pasteur. Dopo la pesata aggiungere immediatamente gli organismi alla replica o al controllo appropriato e controllarne il comportamento.

La quantità totale di *L. variegatus* esposta in ogni replica dipende dalla sensibilità del metodo d'analisi utilizzato per la determinazione delle sostanze d'interesse. Si consiglia almeno 1 g (p.f.) per ogni replica.

5.2.2 Temperatura

È consigliato termostatare i contenitori utilizzati nel saggio alla stessa temperatura impiegata per l'allevamento degli organismi. Si può scegliere una temperatura diversa, che meglio simuli le condizioni ambientali. In questo caso è necessario acclimatare gli organismi, modificando gradualmente la temperatura (1°C ogni 2 ore), per evitare shock termici. Inoltre si deve determinare se le capacità di bioaccumulo degli organismi risultano alterate.

5.2.3 Illuminazione e fotoperiodo

I contenitori utilizzati nel saggio devono essere illuminati mediante lampade fluorescenti a largo spettro con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

5.2.4 Ossigeno disciolto

La concentrazione dell'ossigeno disciolto dell'acqua sovrastante il sedimento non deve scendere sotto 2,5 mg/L; se essa scende sotto questo valore è necessario utilizzare un dispositivo d'aerazione mediante gorgogliamento d'aria. È importante non perturbare la superficie del sedimento, per esempio appoggiando una piccola piastra Petri di vetro sul sedimento in corrispondenza del dispositivo di gorgogliamento.

5.2.5 Recipienti per il saggio

Si può utilizzare qualsiasi contenitore di vetro (beaker, cristallizzatori ecc..) capace di contenere l'appropriata quantità di sedimento e d'acqua sovrastante. Sono preferibili i contenitori con un basso rapporto altezza area superficiale per rendere disponibile agli organismi esposti la maggior quantità di sedimento.

5.2.6 Controlli e repliche

Il giorno precedente l'inizio del saggio preparare il sedimento e i controlli. Mescolare accuratamente il sedimento da saggiare e prelevarne un'aliquota per la misura dei livelli di concentrazione dei composti d'interesse secondo l'appropriato metodo d'estrazione ed analisi. Versare il sedimento ben miscelato nei recipienti e aggiungere con cautela l'acqua cercando di ridurre al minimo la risospensione di sedimento.

Per verificare che le condizioni del saggio non influenzino la sopravvivenza e/o le prestazioni degli organismi esposti allestire dei controlli costituiti come le repliche di sedimento (recipienti, volume substrato, volume e qualità acqua sovrastante ecc..) ma contenenti lo stesso substrato di coltura degli organismi. In questo caso, a differenza degli organismi esposti al sedimento che non ricevono cibo, alimentare gli animali seguendo le stesse procedure utilizzate durante l'allevamento.

Il sedimento saggiato potrebbe contenere oligocheti residenti che possono alterare il bioaccumulo di *L. variegatus* (Keitly e coll. 1988a e Keitly e coll. 1988b). Non eliminare questi organismi mediante setacciatura in quanto si potrebbero alterare le condizioni chimico-fisiche del sedimento e modificare la biodisponibilità delle sostanze d'interesse. Si consiglia, invece, di preparare dei contenitori con il solo sedimento per recuperare e quantificare questi organismi.

Il numero di repliche dei controlli e dei sedimenti dipende dalla precisione con cui si vogliono esprimere i risultati. In saggi di routine è consigliato un minimo di 3 repliche.

Quando tutti i controlli e tutte le repliche di sedimento saranno pronti iniziare immediatamente il rinnovo dell'acqua sovrastante.

5.2.7 Volume di sedimento

Il volume di sedimento (generalmente da 2 a 4 L) cui esporre gli organismi dipende dal suo contenuto in carbonio organico e dalla quantità d'organismi aggiunti. Il rapporto tra il carbonio organico totale (g) del sedimento e il peso degli organismi esposti (g p.f.) non deve essere inferiore a 7.5.

5.2.8 Acqua sovrastante il sedimento

E' consigliato utilizzare la stessa impiegata nell'allevamento degli organismi. Il volume dell'acqua sovrastante il sedimento deve essere uguale al volume di sedimento e deve essere rinnovata 2 volte al giorno in maniera continua (con pompe in automatico) o ad intermittenza ogni 12 ore (sifonandola ed aggiungendola mediante tubi di plastica, cercando di ridurre al minimo la risospensione di sedimento).

Per meglio simulare le condizioni naturali si può utilizzare acqua del corpo idrico da cui provengono i sedimenti. In questo caso è necessario, subito dopo aver isolato gli organismi per il saggio, acclimatarli con delle miscele di acqua di coltura e di acqua del corpo idrico prima di trasferirli definitivamente nell'acqua del corpo idrico (2 ore in una miscela 50:50 e poi altre 2 ore in una miscela 25:75).

Prelevare periodicamente (il giorno d'inizio, prima di aggiungere gli organismi al sedimento e il 7°, 14°, 21° e 28° giorno del saggio) un'aliquota dell'acqua di ogni controllo e replica per la determinazione del pH, della conducibilità, dell'alcalinità, della durezza e della concentrazione di ammonio (secondo metodi standardizzati per l'analisi delle acque).

5.2.9 Recupero degli organismi esposti

L'ultimo giorno del saggio (28°) recuperare degli organismi passando il sedimento su setacci in grado di trattenere gli oligocheti (luce netta 250 µm).

Si trasferiscono aliquote successive di sedimento nel setaccio mantenuto in una vaschetta contenente qualche centimetro d'acqua. Il movimento rotatorio del setaccio permette l'allontanamento del sedimento, che si accumula nella vaschetta, e la separazione degli organismi. Sciacquare ripetutamente e quindi recuperare gli organismi con l'aiuto di una pipetta (3-5 mm d.i.). Pulire gli organismi e mantenerli per 6 ore in 1 L d'acqua termostata, accertandosi che l'ossigeno non scenda sotto 2,5 mg/L, altrimenti cambiare l'acqua o ripristinare l'ossigeno mancante inserendo un opportuno dispositivo d'aerazione.

Dopo 6 ore gli organismi hanno evacuato la maggior parte del sedimento dal loro intestino. Pulirli, pesarli e sottoporli all'opportuno metodo d'estrazione ed analisi. Non prolungare oltre 6 ore il tempo d'espulsione del contenuto intestinale perché per alcuni composti può iniziare la fase d'eliminazione dei composti bioaccumulati (Mount e coll. 1999).

In Tabella 3 e Tabella 4 sono riportate le condizioni e uno schema di attività per la conduzione del saggio.

5.3 Accettabilità del saggio

Durante l'esecuzione del saggio i parametri monitorati (par. 3.2.5) non devono subire delle significative variazioni, in particolare: la temperatura a cui sono termostatati i recipienti del saggio non deve subire una variazione maggiore di $\pm 2^{\circ}\text{C}$, e la concentrazione dell'ossigeno disciolto nell'acqua sovrastante il sedimento non deve scendere sotto 2,5 mg/L; i parametri chimici determinati nell'acqua sovrastante il sedimento (pH, conducibilità, alcalinità, durezza e con-

centrazione di ammonio) non devono variare più del 50% dall'inizio alla fine del saggio. Verificare che gli organismi non evitino il sedimento ma si rifugino in esso, scavando tunnel o affossando la parte anteriore del corpo ed agitando con movimenti ondulatori la parte posteriore. Nessuna contaminazione da parte delle sostanze d'interesse deve risultare dall'analisi chimica degli organismi dei controlli. Inoltre una significativa diversità del peso medio e del contenuto lipidico degli organismi dei controlli alla fine del saggio rispetto ai valori medi di coltura indica che durante il saggio sono sopravvenute delle variazioni dei parametri chimico-fisici (es. della qualità dell'acqua, concentrazione dell'ossigeno disciolto, contaminazione atmosferica, ecc.) che compromettono l'affidabilità del risultato. *L. variegatus* dovrebbe riprodursi durante il saggio; una mancanza di riproduzione deve essere annotata e considerata quando s'interpretano i risultati (OECD 1999).

Nel caso in cui le condizioni sopra elencate non siano soddisfatte, il bioaccumulo è alterato e i risultati del saggio non sono attendibili.

5.4 Espressione dei risultati

5.4.1 Sedimento

La concentrazione nel sedimento dei composti d'interesse (c.d.i.) può essere espressa rispetto al peso secco oppure rispetto al contenuto in carbonio organico.

$$C_s = \text{mg c.d.i.} / \text{kg p.s. sedimento}$$

$$C_{s(\text{oc})} = C_s / (\text{kg carbonio organico} / \text{kg p.s. sedimento}) = \text{mg c.d.i.} / \text{kg carbonio organico}$$

5.4.2 *Lumbriculus variegatus*

La concentrazione negli organismi dei composti d'interesse può essere espressa rispetto al peso fresco, al peso secco o alla frazione lipidica degli organismi.

$$C_o = \text{mg c.d.i.} / \text{kg p.f. (o p.s.) organismo}$$

$$C_{o(l)} = C_o / (\text{kg lipidi} / \text{kg p.f. (o p.s.) organismo}) = \text{mg c.d.i.} / \text{kg lipidi}$$

5.4.3 Fattori di bioaccumulo

Il fattore di bioaccumulo dai sedimenti (BAF_s) a 28 giorni è espresso come il rapporto tra la concentrazione delle sostanze d'interesse negli organismi saggiati e nel sedimento. E' consigliabile esprimere entrambe le concentrazioni come peso secco.

$$\text{BAF}_s = C_o / C_s = \text{kg p.s. sedimento} / \text{kg p.s. (o p.f.) organismi}$$

Il fattore di bioaccumulo calcolato con la concentrazione negli organismi normalizzata rispetto al contenuto lipidico e con la concentrazione nel sedimento normalizzata rispetto al carbonio organico è definito BSAF.

$$\text{BSAF} = C_{o(l)} / C_{s(\text{oc})} = \text{kg carbonio organico} / \text{kg lipidi}$$

determinazioni analitiche o stimata dal coefficiente di ripartizione) si può determinare il fattore di bioaccumulo come il rapporto tra la concentrazione nell'organismo (di solito riferita al peso fresco) e quella nell'acqua (espressa come mg/L).

$$BAF = C_a / C_w \text{ L / kg}$$

Tabella 3: - Sintesi delle condizioni del saggio

1	Temperatura	la stessa temperatura utilizzata per l'allevamento o la temperatura del corpo idrico
2	Illuminazione	lampade fluorescenti a largo spettro
3	Fotoperiodo	16 ore di luce e 8 di buio
4	Aerazione	nessuna, purché l'ossigeno disciolto non discenda sotto i 2,5 mg/L
5	Recipienti	contenitori in vetro il cui volume dipende dal volume di sedimento saggiato
6	Repliche	per analisi di routine minimo 3 repliche per sedimento
7	Organismi per replica	adulti di <i>L. variegatus</i> , minimo 1g p.s
8	Sedimento	carbonio organico totale (g) del sedimento / organismi peso fresco (g) $\geq 7.5/1$
9	Acqua sovrastante	acqua per l'allevamento degli organismi o acqua del corpo idrico; lo stesso volume del sedimento sottostante; da rinnovare 2 volte al giorno (in modo continuo o ad intermittenza ogni 12 ore)

Tabella 3: - Sintesi delle condizioni del saggio

Giorno precedente l'inizio del saggio	<ul style="list-style-type: none"> - isolare gli organismi dalle culture e pulirli - allestire i sedimenti e i controlli - prelevare un'aliquota di sedimento per l'analisi chimica dei composti d'interesse
Giorno d'inizio	<ul style="list-style-type: none"> - effettuare le analisi chimiche dell'acqua e misurare la temperatura e l'ossigeno disciolto - pesare gli organismi - trasferire l'appropriato gruppo di organismi in ogni controllo e replica e osservare il comportamento degli organismi
Giorni successivi	<ul style="list-style-type: none"> - controllare ogni giorno la temperatura, l'ossigeno disciolto e il comportamento degli organismi - nutrire i controlli - 7°, 14° e 21° giorno effettuare le analisi chimiche dell'acqua
Giorno 28°	<ul style="list-style-type: none"> - effettuare le analisi chimiche dell'acqua, controllare la temperatura e l'ossigeno disciolto - recuperare, gli organismi esposti - mantenere per 6 ore gli organismi in 1L d'acqua - pulire, pesare gli organismi recuperati e sottoporli all'opportuno metodo di estrazione ed analisi

5.5 Appendice - allevamento di *lumbriculus variegatus*

5.1.1 Condizioni per l'allevamento

È possibile utilizzare diversi metodi per allevare quest'organismo (Phipps e coll. 1993, ASTM 1998, Brunson e coll. 1998, Leppanen and Kukkonen 1998, OECD 1999 e USEPA 1999,) purché siano soddisfatti i requisiti di qualità riportati nel paragrafo seguente. Di seguito è riportato un sunto delle condizioni più utilizzate.

5.5.1.1 Temperatura

L. variegatus si riproduce generalmente asessualmente in colture di laboratorio. La riproduzione di *L. variegatus* incrementa all'aumentare della temperatura, ma l'organismo non può essere allevato a temperature maggiori di 25°C. La temperatura consigliata per termostatare i recipienti o gli acquari utilizzati per l'allevamento è compresa tra 20 e 23 °C (tempo medio di duplicazione a 20°C 10-14 giorni (Phipps e coll. 1993)).

5.5.1.2 Illuminazione e fotoperiodo

In tutti i metodi considerati i recipienti o gli acquari utilizzati per l'allevamento sono illuminati mediante lampade fluorescenti a largo spettro con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

5.5.1.3 Aerazione

La concentrazione dell'ossigeno disciolto non deve scendere sotto 2,5 mg/L. In genere nei sistemi con il rinnovo continuo dell'acqua difficilmente l'ossigeno disciolto scende sotto tale valore; in caso contrario è consigliato utilizzare un opportuno dispositivo di aerazione (pietra porosa, pipetta pasteur ecc.).

5.5.1.3 Recipienti

Vasche di vetro per acquario o recipienti di vetro in grado di contenere il substrato e l'acqua sovrastante.

5.5.1.4 Substrato

L. variegatus è tollerante a molti tipi di substrati. Per la facilità con cui è possibile isolare i vermi, è raccomandato un substrato costituito da strisce di tovaglioli di carta trattata con acetone e ultrasonificata in acqua (ASTM 1998 e USEPA 1999). L'esperienza di laboratorio ha comunque dimostrato che *L. variegatus* può anche essere mantenuto in acquari o beaker con sabbia di fiume, lavata accuratamente in acqua corrente.

5.5.1.5 Acqua

L'acqua utilizzata per l'allevamento e la manipolazione (pulizia, condizionamento ecc.) degli organismi deve possedere caratteristiche chimico fisiche costanti nel tempo. Si può impiegare acqua di un corpo idrico non inquinato (lago, fiume ecc.) oppure acqua artificiale preparata in laboratorio.

Il metodo USEPA 1999 prevede una soluzione di acqua deionizzata composta da CaSO₄ 50

mg/L, CaCl₂ 50 mg/L, MgSO₄ 30 mg/L, NaHCO₃ 96 mg/L e KCl 4 mg/L (pH tra 7,8 – 8,2, durezza da 90 a 100 mgCaCO₃/L, l'alcalinità compresa tra 1,0 e 1,4 meq/L e conducibilità tra 330 e 360 µS/cm).

5.5.1.7 Alimentazione

Utilizzare qualsiasi mangime per novellame d'acqua coltura o per pesci tropicali d'acquario (es. Tetramin®). Prima della somministrazione disperdere il mangime (macinato con un frullatore o con un mortaio) in acqua per evitare che galleggi sulla superficie. La quantità di cibo dovrà essere accuratamente dosata per evitare che le colture diventino anaerobiche. Un degrado delle condizioni dell'acqua (cattivo odore, basso livello dell'ossigeno disciolto, ecc.) indica un eccesso di cibo; in questo caso aumentare il ricambio dell'acqua, incrementare l'aerazione o diminuire la dose di mangime.

5.5.2 Requisiti di qualità

Mensilmente, ma soprattutto prima di ogni saggio, è necessario verificare l'omogeneità e l'idoneità (determinazione della buona salute e delle capacità riproduttive) degli organismi allevati. I parametri da tenere controllati sono principalmente tre: il peso medio, il contenuto medio di lipidi e LC50 a 96ore di una sostanza di riferimento. Di seguito sono riportate le procedure più utilizzate per la misura di questi parametri e il risultato medio di un allevamento standard.

5.5.2.1 Peso medio

Il peso medio è determinato pesando tutti assieme, cercando di eliminare più acqua possibile mediante una pipetta pasteur, un numero significativo di animali (almeno 50).

Il peso medio (\pm deviazione standard) determinato con la procedura sopra riportata è risultato 7.0 ± 1.1 mg p.f. (n=21).

5.5.2.2 Contenuto lipidico

I diversi metodi utilizzati per la determinazione del contenuto lipidico in studi biologici e tossicologici (Roberts e coll. 1977, Herbes e Allen 1983, Oliver e Niimi 1983, Gardner e coll. 1985 e de Boer 1988) si basano sull'estrazione con metanolo-cloroformio secondo Bligh-Dyer (Bligh e Dyer 1959)

Si riporta la procedura ottimizzata per *L. variegatus*: tritare in un mortaio di ceramica circa 1 g p.f. di organismi con 10 ml di metanolo-cloroformio (1:1).; centrifugare per 10 min. a 5000 giri al min.; separare il liquido surnatante; aggiungervi 5 ml di acqua deionizzata e centrifugare di nuovo (10 min. a 5000 giri al min.) per rimuovere le proteine. Eliminare il surnatante e portare a secco a 105 °C il liquido rimanente in un recipiente a tara costante fino a peso costante.

Il contenuto lipidico medio (\pm deviazione standard) determinato con il metodo sopra riportato è risultato 1.05 ± 0.11 % p.f. (n=7).

5.5.2.3 Saggio di tossicità con sostanze di riferimento

Controllare la costanza e l'omogeneità degli organismi allevati mediante un saggio di tossicità acuto in acqua a 96 ore con una sostanza di riferimento (es. NaCl, KCl, CdCl₂, CuSO₄).

Condurre il saggio misurando l'immobilità degli organismi, alle stesse condizioni (temperatura, illuminazione, fotoperiodo, ossigeno disciolto, ecc.) indicate per il saggio di bioaccumulo, con almeno 5 concentrazioni oltre il controllo e utilizzando 10 organismi per replica. La EC50 media (\pm deviazione standard) a 96 ore per il KCl è risultata 654 ± 31 mg/L (n=11).

PARTE SECONDA

6. Preconcentrazione di campioni di acqua superficiale per i saggi ecotossicologici

A cura di Licia Guzzella e Silvana Galassi

6.1 Stato dell'arte

Il controllo della qualità delle acque superficiali per quanto riguarda il potenziale "rischio chimico" si basa principalmente sul controllo analitico di singoli composti o di classi di composti. Per questi inquinanti vengono fissati criteri di qualità su basi tossicologiche ed ecotossicologiche o limiti ispirati al principio precauzionale come nel caso dei pesticidi.

Sebbene questo approccio sia ancora ritenuto valido, fatto salvo il principio di un aggiornamento periodico dei criteri di qualità (IRSA, 1987), esso presenta alcune limitazioni che lo rendono non del tutto adeguato alla reale protezione degli organismi acquatici e all'uso potabile, generalmente considerati come i due usi più esigenti delle acque superficiali:

- solo per l'1% delle sostanze chimiche conosciute esistono criteri di qualità (WQC);
- alcuni WQC sono ancora in discussione in quanto basati su un numero insufficiente di dati tossicologici ed ecotossicologici;
- per alcune sostanze, soprattutto metalli, non è la concentrazione misurabile per via analitica ma quella realmente biodisponibile che dovrebbe essere considerata ai fini della valutazione del rischio. Tuttavia tale frazione varia in funzione delle caratteristiche del mezzo;
- nel caso degli inquinanti organici vengono per lo più trascurati i metaboliti e i composti di neoformazione;
- risulta praticamente impossibile considerare gli effetti additivi e sinergici delle miscele;
- alcune sostanze possono essere nocive anche a livelli che sfuggono all'indagine di tipo analitico e non è possibile quindi analizzare i composti ai livelli che corrispondono ai criteri di qualità.

Il monitoraggio biologico sulle comunità naturali e i saggi ecotossicologici su singoli campioni o campioni integrati possono rappresentare sia un metodo di indagine preliminare per la valutazione della qualità delle acque (Galassi e Benfenati, 2000) sia uno strumento complementare alle analisi "sostanza per sostanza". Il monitoraggio biologico, infatti, è in grado di rispondere al complesso dei potenziali fattori di stress presenti in un corpo idrico. La normativa per la tutela delle acque dall'inquinamento (d.lgs 152 del 1999) prevede che per la valutazione degli impatti antropici siano utilizzati l'Indice Biotico Esteso come analisi obbligatoria e saggi di tossicità su campioni acquosi concentrati come analisi supplementari.

Tuttavia, mentre l'utilizzo di saggi ecotossicologici acuti con *Daphnia magna* o con batterie di test per l'identificazione di scarichi tossici è pratica ormai consolidata ed introdotta in normative sia statunitensi che di diversi Paesi europei, le procedure di preconcentrazione con conseguente analisi ecotossicologica del campione acquoso concentrato è stata utilizzata finora solo a scopo di ricerca e non esistono procedure standardizzate. Le difficoltà nella scelta di una procedura standard riguardano soprattutto i seguenti aspetti:

- scelta della metodologia di isolamento dei soluti;
- scelta del rapporto di preconcentrazione da utilizzare nei test che condiziona il volume di campione da raccogliere;
- scelta del/dei test;
- interpretazione dei risultati.

Poiché i metodi di estrazione differiscono sostanzialmente per le specie inorganiche e quelle organiche una prima scelta andrà fatta nella direzione dell'isolamento dei metalli tossici, dei microinquinanti organici o di entrambe con sistemi in sequenza. Riteniamo che i microinquinanti organici vadano privilegiati in quanto i metalli ed eventuali altre forme ioniche possono essere abbastanza facilmente quantificate in matrice acquosa anche nel caso di miscele complesse. Per i microinquinanti organici, disciolti in acqua a basse concentrazioni, l'estra-

zione è necessaria sia per il dosaggio analitico sia per quello tossicologico. Lo stato dell'arte delle metodiche di estrazione di soluti da matrici acquose, tuttavia, è alquanto scoraggiante per quanto riguarda i composti organici: si ritiene (Castillo et al., 1999), infatti, che il 95% dei soluti polari non possa essere estratto con le procedure disponibili. Inoltre la scelta del metodo non può prescindere dal rapporto di preconcentrazione, che determina a sua volta il volume da estrarre. Molti sistemi di estrazione disponibili in commercio non garantiscono un recupero quantitativo di soluti da grossi volumi di matrice acquosa. La letteratura più recente in materia, tuttavia, consente di individuare alcune tecniche (Pichon et al., 1995) in grado di recuperare i composti aventi polarità intermedia ($\log K_{ow}$ da 1 a 5) e, nella presunzione che gli inquinanti organici più pericolosi appartengano a questa categoria, la scelta della procedura dovrebbe essere determinata dalla capacità di recupero e dalla riproducibilità di queste metodiche.

A proposito del secondo punto, e cioè quanto il campione debba essere preconcentrato, si deve fare riferimento alle conoscenze esistenti nel campo dell'ecotossicologia acquatica. È noto infatti che in funzione della natura dell'agente tossico il rapporto tra la concentrazione che determina un effetto acuto e cronico può variare da poche unità a decine, centinaia e anche valori molto più elevati nel caso di composti a lento accumulo. Poiché tuttavia per questi ultimi la pratica più accreditata è il biomonitoraggio mediante organismi accumulatori (Pesci e Molluschi) e l'analisi dei sedimenti, lo scopo della preconcentrazione dovrebbe puntare soprattutto alla determinazione degli inquinanti a polarità intermedia, che sono sufficientemente solubili in acqua da esplicare effetti tossici acuti o cronici. Trattandosi di tossici sconosciuti e di miscele il rapporto dovrà essere necessariamente arbitrario e basato su raffronti con tipologie di riferimento di acque della zona che si intende monitorare.

Il terzo punto riguarda la ricostruzione del mezzo acquoso per l'esecuzione del saggio e la scelta dell'organismo test. Sia che si usi un solvente o una matrice solida per preconcentrare il campione d'acqua superficiale, sarà necessario eliminare il solvente organico e trasferire i soluti nel mezzo previsto per gli organismi test. Questo passaggio è critico per il recupero quantitativo dei soluti più volatili dal momento che durante l'evaporazione del solvente anche i soluti a bassa tensione di vapore potrebbero co-evaporare. Per minimizzare le perdite si ritiene sufficiente operare in modo da non scendere a volumi di solvente inferiori a 0,5 ml e, in ogni caso, eseguire l'ultima parte della concentrazione in corrente di azoto o altro gas inerte. Per la scelta dell'organismo test faremo riferimento a quanto previsto dal d.lgs 152 e cioè alla *Daphnia magna* e ai batteri bioluminescenti, anche se quanto previsto per questi due saggi dovrebbe essere facilmente adattabile ad altri tipi di saggio biologico.

Normalmente nei saggi biologici è consentito utilizzare un minimo quantitativo di solvente (100 mg L⁻¹), purché lo stesso quantitativo venga aggiunto anche nei controlli (OCSE, Guideline 202).

Come è stato detto, le metodologie di preconcentrazione hanno avuto fino a questo momento finalità prevalentemente analitiche. Per questo si farà riferimento nella scelta della procedura da adottare tra quelle riportate in letteratura si utilizzerà il criterio dell'ottimizzazione del recupero di soluti aventi uno spettro piuttosto ampio di polarità. Altri criteri di scelta riguarderanno la riproducibilità del metodo, la relativa facilità di esecuzione e il contenimento dei costi sia per i materiali di consumo sia per le ore di lavoro.

6.2 Metodi di estrazione utilizzati a scopo analitico

6.2.1 Estrazioni con solvente

partiscono prevalentemente nei solventi apolari come n-esano, cicloesano, pentano, cloruro di metilene, tutti solventi che dimostrano una scarsissima miscibilità con l'acqua.

La necessità di dover utilizzare solventi di estrazione immiscibili con l'acqua è il limite principale di questa metodologia che risulta applicabile solo ai composti molto idrofobici come i pesticidi e i solventi clorurati estraibili rispettivamente con esano e pentano e agli idrocarburi policiclici aromatici e alle triazine, estraibili con cloruro di metilene. L'estrazione con n-esano è tuttora impiegata per l'analisi dei pesticidi clorurati e i PCB mentre le estrazioni con cloruro di metilene sono state abbandonate in molti laboratori sia per limitare il rischio di esposizione per gli operatori sia per gli alti costi di smaltimento del solvente recuperato dopo aver concentrato l'estratto.

6.2.2 Tecnica di estrazione con SPE

L'estrazione e la concentrazione dei composti organici dall'acqua sono procedure necessarie per raggiungere i livelli di sensibilità richiesti dalle analisi strumentali e per poter saggiare con i test di tossicità estratti concentrati dei campioni d'acqua in esame. Attualmente sono utilizzabili vari metodi di preconcentrazione basati su diversi principi chimico-fisici. Uno dei più usati è quello che prevede il recupero dei microinquinanti organici attraverso l'adsorbimento su di una matrice solida (SPE o Solid Phase Extraction): le sostanze organiche aderiscono alla fase adsorbente mentre la matrice acquosa non viene trattenuta. L'efficienza del processo dipende da molti fattori tra i quali i più importanti sono la struttura superficiale della fase solida, la sua composizione chimica e la presenza di siti attivi. Il desorbimento dei composti trattenuti può essere ottenuto con l'uso di un appropriato solvente o di una miscela di solventi (fase di eluizione). In questo modo i composti estratti vengono recuperati in funzione della loro affinità per il solvente di eluizione. E' possibile utilizzare in sequenza vari solventi a polarità crescente recuperando in estratti separati sostanze a differente polarità. Ad esempio:



Le colonne di estrazione possono essere riempite in laboratorio o acquistate in cartucce monouso. In quest'ultimo caso sono costituite da:

- un *housing* esterno generalmente in polipropilene ;
- il *materiale adsorbente* di varia natura e in quantità differente (50, 100, 200, 500 o 1.000 mg) a seconda delle esigenze estrattive;
- i *setti* per il contenimento del materiale adsorbente in vetro sintetizzato o in polietilene.

Esistono anche dischi di estrazione che vengono utilizzate in modo analogo alle membrane di filtrazione.

L'estrazione del campione in SPE è condotta con la seguente procedura:

- *lavaggio* delle colonnine con il solvente di eluizione;
- *attivazione* con appropriato solvente (metanolo, acqua od altro a seconda della tipologia dell'adsorbente);
- *passaggio* del campione d'acqua, previa rimozione dei residui di solvente con acqua MilliQ; il passaggio del campione può avvenire per spinta attraverso una siringa (solo per campioni di ridotto volume) o per filtrazione sotto vuoto;

- *essiccazione* della fase stazionaria della colonna mediante passaggio d'aria o di gas inerte;
- eluizione delle colonnine con il solvente adatto ai composti che si intendono estrarre;
- eventuale concentrazione dell'estratto e, se necessario, sostituzione del solvente di estrazione.

6.2.3 Tipologia degli adsorbenti

Le sostanze più comunemente utilizzate come adsorbenti solidi per l'estrazione di inquinanti organici sono:

- fasi apolari **C₁₈** o **C₈** costituite da catene idrocarburiche legate al gel di silice; tra le diverse catene idrocarburiche la più usata sia in analitica che per i saggi tossicologici è quella con il gruppo octadecilico legato al gel di silice (C18) che è in grado di trattenere soprattutto i composti apolari o debolmente polari; un ulteriore sviluppo delle tecniche di concentrazione ha permesso la realizzazione di una fase apolare **IC₁₈** trifunzionale in cui tutti e tre i siti della silice sono occupati dai gruppi funzionali a 18 atomi di carbonio; conducendo la concentrazione del campione dopo l'acidificazione a pH 2-3 è possibile estrarre sostanze sia polari che apolari;
- **Carbopack B** o **Carboglyph**, un tipo di carbone grafitizzato che presenta il vantaggio di essere in grado di trattenere sia i composti organici apolari che quelli polari; con tale tecnica, tramite un sistema di eluizione frazionato, i composti acidi possono essere separati da quelli basico-neutri e quindi analizzati separatamente;
- fasi apolari di polimeri **stirene-divinil benzene** (tipo LiChrolut EN) o di resine macroreticolari tipo **Amberlite XAD-2**, con capacità di adsorbire un ampio spettro di composti organici apolari e debolmente polari;
- fasi polari a base di **gruppi fenolici LC Phe** che permettono il facile adsorbimento di composti organici polari in matrice acquosa;
- fasi polari caratterizzate dal **gruppo amminopropilici -NH₂** legate alla silice che possono concentrare composti organici con gruppi funzionali acidi e basici o funzionare anche per l'adsorbimento con scambio cationico;
- fasi polari caratterizzate dal **gruppo cianopropilici -CN** legate alla silice che possono concentrare composti organici polari in applicazioni particolari;
- fasi ioniche con **gruppi sulfonilpropilici PRS** con capacità di scambio cationico e con gruppi **trimetilamminopropilici SAX** con capacità di scambio anionico per l'estrazione di sostanze basiche ed acide rispettivamente.

La scelta dell'adsorbente deve essere condotta favorendo la selettività delle fase nei confronti delle sostanze da analizzare. Nel caso dei saggi ecotossicologici in cui non sono noti a priori i composti ad azione tossica è utile condurre l'estrazione con colonnine in grado di concentrare un ampio spettro di composti.

6.2.4 Membrane SPE

Tra le tecniche innovative sviluppate per l'estrazione di campioni d'acqua di grandi dimensioni (> 10 litri) vi sono le membrane in cui la fase adsorbente è costituita da politetrafluoroetilene (PTFE) legato con la silice e altre resine in un sottile filtro di 0,5 mm di spessore (Barcelo et al., 1993)

6.2.5 Sistemi automatizzati di preconcentrazione

Per l'analisi di routine sono disponibili sistemi automatici di preconcentrazione del campione le operazioni da eseguire vengono programmate mediante computer ed eseguite con sistemi meccanici. Nei sistemi automatici il tempo di esecuzione e l'analisi di costi si riduce e si migliora la riproducibilità.

Esistono poi sistemi automatici di concentrazione che utilizzano pompe chiuse ermeticamente e collegate a colonne impaccate con fasi adsorbenti diverse (XAD, C₁₈). Queste tecniche danno la possibilità di preparare un campione integrato.

6.3 Metodi di estrazione utilizzati per i saggi ecotossicologici

Le applicazioni di queste procedure di estrazione e preconcentrazione a scopo analitico sono state numerosissime negli ultimi anni, quelle a scopo ecotossicologico sono state invece molto meno diffuse.

Passando in rassegna la letteratura è possibile individuare alcune applicazioni dei metodi di preconcentrazione descritti in precedenza e applicati alle acque naturali seguite da saggi di tossicità acuta con *Daphnia magna* e batteri bioluminescenti oppure da saggi di mutagenesi.

Kool et al. (1981) hanno proposto l'uso delle resine XAD per preconcentrare acque superficiali allo scopo di effettuare saggi di mutagenesi. Questa tecnica è stata applicata al Reno e alla Mosella (Sloof e van Keijil, 1982) e successivamente al Lambro e al Po (Galassi et al., 1988 e 1989) per i test di tossicità con *Daphnia magna*.

Nel campo della valutazione della qualità delle acque ai fini del rischio sanitario associato all'utilizzo di acqua superficiale ai fini potabili, i metodi di concentrazione delle acque sono stati applicati ai fini di eseguire test di mutagenesi a breve termine e in vitro. Tali saggi tra cui il test di Ames è quello più comunemente impiegato, sono stati largamente utilizzati in molti paesi per la valutazione della mutagenicità di campioni acquosi prima e dopo il trattamento di potabilizzazione (Dolara et al., 1981; Grimm-Kibalo et al., 1981; Alink, 1982; Athanasiou et al., 1983; Monarca et al., 1992). In tutti questi studi la tecnica di concentrazione applicata è stata quella che fa uso della concentrazione su resine di tipo Amberlite XAD a diversa polarità.

In anni più recenti studi condotti in Italia (Monarca et al., 1996; Guzzella and Sora, 1998) per la valutazione della qualità genotossicologica delle acque dei grandi laghi utilizzati a scopo potabile (laghi Maggiore, Como e Garda) hanno evidenziato la presenza di composti dotati di una attività mutagena particolarmente elevata nelle acque del lago di Como in estratti eseguiti utilizzando sia le resine XAD che in alternativa le C18, previa acidificazione a pH 2.

Le tecniche di concentrazione sono state adottate anche per la valutazione degli effetti tossici delle acque utilizzando i batteri bioluminescenti. Le ricerche condotte si riferiscono principalmente alla caratterizzazione di fiumi più che di corpi lacustri. Ad esempio in un ampio studio condotto sul fiume Reno (De Zwart and Folkerts, 1990) si fa uso ancora una volta della concentrazione su resine XAD.

In uno studio comparativo per verificare l'efficienza di estrazione dei microinquinanti organici dalle acque del fiume Lambro (Guzzella e Gronda, 1995 a e b) sono state adottate tre metodiche tra quelle più in uso che prevedono l'utilizzo di adsorbenti solidi quali: l'Octadecyl C₁₈, l'Amberlite XAD-2 e il carbone grafitizzato Carbopack B. Gli estratti concentrati degli eluati neutri ed acidi ottenuti con il Carbopack B sono stati saggati sia separatamente sia miscelati in proporzioni uguali per riprodurre la composizione originale del campione naturale e per evidenziare eventuali interazioni sinergiche o antagoniste tra le varie componenti della miscela.

La metodica con il Carbopack B si è rivelata la tecnica più efficace tra quelle sperimentate. Dal punto di vista tossicologico infatti gli estratti ottenuti con il Carbopack B hanno raggiunto livelli di tossicità comparabili o maggiori di quelli ottenuti con la C-18 o la XAD-2. Si ritiene, tuttavia, che tale metodica sia troppo complicata ed elaborata per essere adottata in applicazioni di routine all'acqua superficiale.

Alcuni di questi lavori hanno previsto anche la caratterizzazione analitica del campione. In questi studi (Hendriks, A.J. et al., 1994; Guzzella e Gronda, 1995, a, Guzzella e Sora, 1998) non è stato possibile in ogni caso determinare quali fossero gli agenti responsabili della tossicità osservata. Alcune classi di composti, tuttavia, sembrerebbero seguire lo stesso andamento della tossicità nel tempo e potrebbero essere considerati come "traccianti" dell'inquinamento agricolo, civile e/o industriale.

6.4 Scelta della tecnica di estrazione per i saggi

Si può ritenere che le procedure di preconcentrazione SPE siano da preferire all'estrazione con solvente per la concentrazione di grossi volumi d'acqua e per il recupero di microinquinanti debolmente polari. Le colonnine monouso, per la loro riproducibilità e facilità d'impiego, sembrano promettenti per preparare estratti da usare nei saggi ecotossicologici. La disponibilità di colonnine contenenti quantità variabili di fase stazionaria sembra favorire l'estrazione su colonna rispetto alle membrane di estrazione a capacità di carico fissa.

In base a quanto si deduce dalla letteratura esaminata, la fase stazionaria di stirene-divinilbenzene, confezionata in colonne monouso da diverse ditte, dovrebbe avere un comportamento simile alle resine di Amberlite che sono state molto usate in passato sotto la denominazione di resine XAD, per preparare estratti da studiare per test di tossicità e genotossicità. Resta il problema della calibrazione della procedura per il controllo delle acque superficiali italiane e di come valutare i risultati ottenuti. Si intende condurre una prova sperimentale del metodo, scegliendo fiumi e laghi caratterizzati da un diverso contenuto di carbonio organico e da differenti concentrazioni di sostanze tossiche. In base alle indagini sin qui eseguite sembra di poter dire che il Lambro e il Po a valle del Lambro possano essere considerati come tipici ambienti rispettivamente molto e moderatamente contaminati. Un riferimento pulito potrebbe essere, in base alle evidenze di ricerche in corso all'IRSA, il lago del Segrino.

Queste acque sono state individuate per la messa a punto della procedura di preconcentrazione in modo da verificare la linearità di recupero in funzione del volume e valutare, quindi, il massimo rapporto di concentrazione ottenibile con le procedure di estrazione con colonnine monouso.

6.5 Risultati delle prove sperimentali

I due problemi pratici più rilevanti per la messa a punto di un protocollo per lo sviluppo di una metodologia di preconcentrazione di campioni acquosi da risolvere sono stati: come recuperare quantitativamente tutti i tossici potenziali presenti nella matrice acquosa e quanto concentrarli rispetto al campione originale. Queste due problematiche non sono di poco rilievo e per la loro soluzione molta sperimentazione scientifica è stata condotta senza pervenire sinora a procedure di consenso generale e quindi "ufficiali".

Dopo un attento esame della letteratura esistente sulla base di quanto sopraesposto, è stata scelta una procedura che rappresenta un ragionevole compromesso tra facilità di esecuzione e ottimizzazione dei recuperi.

Si è proceduto successivamente a scegliere, sulla base di quanto disponibile in letteratura in

merito alla qualità delle acque superficiali, ad individuare diverse tipologie di corpi idrici a cui applicare la metodologia di preconcentrazione per il quale era stato redatto un protocollo di massima.

La raccolta e la preconcentrazione dei campioni d'acqua è stata eseguita dall'IRSA in due località, scelte congiuntamente, che sembravano rispondere a requisiti teorici di differente grado di contaminazione soprattutto a carico di microinquinanti organici. Le stazioni di campionamento prescelte sono state: il Lago di Segrino (campionamento eseguito al centro del lago il 29 marzo 2001) e il Po a valle dell'immissione del Lambro (campionamento eseguito il 25 giugno 2001 a circa 20 km dall'immissione del Lambro, in un tratto del Po dove i due fiumi risultavano completamente miscelati).

Il campione d'acqua (10 L) è stato filtrato con prefiltro in fibra di vetro e filtro da 0,2 µm in cellulosa rigenerata, concentrato su colonnine di Lichrolut EN da 200 mg, utilizzando sub-campioni da 2 L ciascuno. Per l'attivazione questa è stata condotta facendo passare goccia a goccia 5 mL di metanolo seguito da 5 mL di acetone ed un eguale volume di acqua Milli Q; il dispositivo di estrazione, sul quale sono montate le cartucce, è stato collegato ad una pompa a vuoto programmata a valori di pressione compresi tra 850 e 950 mbar, in questo modo si ottiene un flusso del campione compreso tra 8 e 10 mL/min; le cartucce sono state quindi essiccate completamente con un flusso d'aria creato dalla pompa a vuoto, il tempo richiesto varia con il numero di cartucce impiegate; le cartucce sono state eluite con due aliquote da 5 mL di acetone. Gli eluati in acetone ottenuti dalle singole cartucce sono stati riuniti e concentrati in flusso d'azoto alla pressione di 400-500 mbar in bagno termostato a 35 °C. Il volume finale, pari a circa 5 ml, è stato determinato con metodo gravimetrico.

Scelti, quindi i rapporti di concentrazione per l'esecuzione dei saggi acuti con *Daphnia magna* da parte dell'Università e con batteri bioluminescenti da parte dell'IRSA si è proceduto al trasferimento degli inquinanti preconcentrati nel mezzo di allevamento dell'organismo test e sono stati eseguiti i saggi di tossicità acuta a diversi rapporti di concentrazione: a partire da 80 x per *Daphnia magna* e a partire da 200 x per i batteri bioluminescenti.

Nel caso del test con *Daphnia* sono stati utilizzati 25 ml di acetone per preparare la soluzione madre (100 ml) nel mezzo di allevamento. Questa quantità, che corrisponde a 197 mg L⁻¹, è circa doppia di quella indicata nella procedura OCSE (1984) ma è stata ritenuta ugualmente compatibile poiché lo stesso quantitativo di acetone aggiunto nel mezzo utilizzato per i controlli non ha provocato alcuna mortalità a 48 ore. Va ricordato che il quantitativo di solvente indicato dalla procedura OCSE è lo stesso per tutti i solventi che includono composti, come il metanolo, più tossici dell'acetone per la *Daphnia*. I risultati dei due saggi ecotossicologici sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5: - Rapporti di preconcentrazione necessari per produrre la concentrazione di effetto al 50% degli organismi saggiati

Campione	<i>Daphnia magna</i> 48h ECF50	Batteri bioluminescenti 15min ECF50	30min ECF50
Segrino	>80	149	151
Po	9,2	73	77

I risultati evidenziano due situazioni di riferimento a differente tossicità, bassa quella del Segrino, media quella del Po. Per i batteri bioluminescenti non si evidenziano differenze significative tra i 15 e i 30 minuti di esposizione. La dafnia dimostra una maggiore sensibilità agli estratti di acque superficiali rispetto ai batteri, i quali, presentano il vantaggio di dare risposte in tempi molto più veloci e di richiedere un minor volume di estratto e, conseguentemente, di campione.

In una precedente ricerca eseguita nel tratto terminale del Po, che è generalmente meno inquinato di quello immediatamente a valle del Lambro, i massimi valori di tossicità per la *Daphnia magna* (24h ECF50) variavano nel corso dell'anno da un massimo di 14,1 x a un minimo di > 130 x (Galassi et al., 1992).

6.6 Considerazioni conclusive

In conclusione, si può ritenere che la procedura di preconcentrazione SPE sia da preferire all'estrazione con solvente per la concentrazione di grossi volumi d'acqua e per il recupero di microinquinanti debolmente polari. Le colonnine monouso, per la loro riproducibilità e facilità d'impiego, sembrano essere promettenti per preparare estratti da usare nei saggi ecotossicologici. La disponibilità di colonnine contenenti quantità variabili di fase stazionaria sembra favorire l'estrazione su colonna rispetto alle membrane di estrazione a capacità di carico fissa.

In base a quanto si deduce dalla letteratura esaminata, la fase stazionaria di stirene-divinilbenzene, confezionata in colonne monouso da diverse ditte sembra essere la soluzione migliore in quanto ha un comportamento simile alle resine di Amberlite che sono state usate in passato sotto la denominazione di resine XAD per preparare estratti da studiare per test di tossicità e di genotossicità.

La sperimentazione condotta sulle acque del Lago Segrino e sul fiume Po conferma l'applicabilità di questa tecnica per la concentrazione delle acque ai fini dell'esecuzione di saggi ecotossicologici.

In base a questi risultati e ai risultati di prove precedenti riportate in letteratura (Galassi et al., 1988; 1992) si ritiene che per attuare un ragionevole compromesso tra sensibilità e semplicità del metodo si debbano adottare rapporti di preconcentrazione a partire da 50 x nel caso del saggio acuto con *Daphnia magna* mentre rapporti maggiori possono essere utilizzati nel caso del saggio con batteri bioluminescenti dal momento che questo test richiede volumi di mezzo molto ridotti. Si propone quindi un metodo operativo per la concentrazione delle acque ai sensi del d.lgs. n. 152/99 e successive modifiche.

7. Proposta di metodo per la concentrazione delle acque per i saggi tossicologici previsti dal d.lgs n. 152/99

A cura di Licia Guzzella e Silvana Galassi

7.1 Introduzione

Il D.L. 152 del 1999 prevede all'art. 3.2.2.2 che analisi supplementari (non obbligatorie) vengano condotte per approfondire le cause di degrado di un corpo idrico mediante l'esecuzione di saggi biologici su campioni acquosi concentrati.

La preconcentrazione dei campioni acquosi rappresenta, del resto, un passaggio indispensabile per l'isolamento di alcune categorie di inquinanti organici particolarmente pericolosi, come pesticidi e sostanze tossiche di origine civile e industriale. Per questo motivo si è ritenuto opportuno proporre una metodologia di estrazione dei microinquinanti organici da matrici acquose che possa essere utilizzata per entrambi questi scopi. Il saggio biologico, infatti, rappresenta lo strumento olistico preliminare per "approfondire le cause di degrado di un corpo idrico", che possono essere definitivamente individuate solo in seguito ad indagine analitica. Si è voluto privilegiare in questa fase la componente dei microinquinanti organici in quanto si ritiene che altri inquinanti siano più facilmente individuabili con l'analisi diretta della matrice acquosa.

La metodologia proposta in seguito si basa sia su una rivisitazione critica della letteratura esistente sull'argomento sia sulla nostra esperienza diretta. Si è ritenuto opportuno, comunque, validare il metodo con una prova sperimentale che ha previsto la preconcentrazione di due tipologie di acque superficiali appartenenti al territorio nazionale: un campione di acqua lacustre, il lago del Segrino, che si trova all'interno di un'area protetta e un campione del tratto centrale del fiume Po, dopo la confluenza del Lambro, che, come è noto, raccoglie un notevole carico d'inquinamento civile, industriale ed agricolo.

Il metodo è risultato idoneo alla caratterizzazione ecotossicologica di queste due tipologie di campione acquoso. Si ritiene, tuttavia, che la sperimentazione dovrebbe essere ripetuta in diversi laboratori e su molteplici tipologie di acque superficiali per verificarne definitivamente la sua applicabilità alla situazione italiana.

Per questo motivo ogni suggerimento o indicazione da parte di chi utilizzerà la metodologia proposta potrà risultare di grande utilità.

7.2 Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la ecotossicità della componente relativa ai microinquinanti organici disciolti nelle acque. La tecnica di concentrazione adottata è quella della SPE e la fase stazionaria è di stirene-divinilbenzene, confezionata in colonne monouso. Questo sistema di estrazione è compatibile anche con le più comuni tecniche di analisi strumentale per il riconoscimento e la quantificazione dei microinquinanti organici in miscela.

7.3 Campo di applicazione

Il metodo può essere utilizzato per concentrare sostanze organiche a media e bassa solubilità da un mezzo acquoso e di valutarne gli effetti tossici acuti. Il metodo si applica a campioni d'acqua superficiale e sotterranea, ad acque destinate al consumo umano o a scarichi civili e/o industriali afferenti in acque dolci. Il sistema proposto non è in grado di recuperare quantitativamente le sostanze presenti in forma ionica.

Il metodo si applica inoltre alla sola frazione disciolta dei microinquinanti organici e prevede quindi la filtrazione del campione per acque contenenti materiale in sospensione.

7.4 Interferenze e cause di errore

Per l'esecuzione della procedura di concentrazione delle acque la principale causa di interferenza ed errore è rappresentata dal contenuto di sostanze organiche di origine naturale che possono competere con i siti attivi presenti sul substrato adsorbente della fase stazionaria saturandoli e quindi impedendo l'estrazione dei microinquinanti organici xenobiotici dalle acque.

Per l'esecuzione dei saggi di tossicità le possibili interferenze sono quelle già riportate nei Metodi IRSA n.8020 per la *Daphnia magna* (IRSA, 1995) e nel Notiziario IRSA per i batteri bioluminescenti (Guzzella, 1996).

7.5 Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dal capitolo 1030 "Metodi di campionamento" (IRSA, 1995). In particolare, per l'esecuzione della tecnica il volume di campione necessario per entrambe i saggi è di circa 10 L. Si consiglia di riempire sino all'orlo con il campione d'acqua un contenitore da 10 L in materiale chimicamente inerte (preferibilmente in vetro). Si consiglia di usare un tappo in vetro smerigliato o a vite con sottotappo in teflon. Tale procedura consente di evitare eventuali perdite di sostanze volatili presenti nel campione e di contaminarlo con il materiale rilasciato da materiale plastico.

Il campione così prelevato deve essere conservato al buio e alla temperatura di 4°C per non più di 72 ore. Per tempi maggiori non è possibile assicurare la totale conservabilità delle caratteristiche chimiche originali del campione ai fini del risultato del saggio tossicologico.

7.6 Apparecchiature necessarie

- Sistema di filtrazione da 15 o 30 cm di diametro in accordo con la torbidità del campione da sottoporre a filtrazione;
- Membrane di pre-filtrazione in fibra di vetro e di filtrazione da 0,2 µm in cellulosa rigenerata;
- Sistema di estrazione per cartucce con pompa per vuoto;
- Adsorbenti per l'estrazione SPE, costituiti da resine stirene-divinilbenzene con particelle delle dimensioni comprese tra 40 e 120 µm, su supporti in cartucce;
- Sistema per evaporazione sotto flusso d'azoto con bagno termostatico;
- Bilancia analitica ad almeno 4 cifre decimali;
- Normale vetreria da laboratorio di classe A;
- Siringhe in vetro da 50 ml;
- "Vials" in vetro da 1 ml con fondo conico tarati e tappo a vite con sottotappo in teflon;
- Camera fredda per la conservazione del campione d'acqua a 4°C.
- Tutti gli accessori destinati a venire in contatto con gli organismi dei test non devono rilasciare sostanze tossiche.

7.7 Reattivi

- Acetone e metanolo puri per pesticidi;
- Acqua Milli Q, esente da sostanze organiche.

7.8 Procedimento

7.8.1 Filtrazione e concentrazione del campione acquoso

Il campione se torbido deve essere sottoposto alla filtrazione per rimuovere il materiale particolato che andrebbe ad intasare le cartucce di estrazione dei microinquinanti organici. Si consiglia di utilizzare un sistema a membrana (pre-filtro in fibra di vetro e filtro in cellulosa rigenerata da 0,2 mm) da sottoporre a flusso di un gas inerte (es. azoto).

Per l'estrazione SPE, si consiglia di utilizzare un adsorbente costituito da resine stirene-divinilbenzene con particelle delle dimensioni comprese tra 40 e 120 µm, su supporti in cartucce. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto con un adeguato sistema di estrazione, secondo le modalità consigliate dal produttore, montando il supporto del materiale adsorbente su una beuta da vuoto o su un sistema multiplo per estrazione liquido-solido, disponibile in commercio.

Se si utilizzano cartucce a perdere da 200 mg di copolimero stirene-divinilbenzene (tipo Li-Chrolut EN) è consigliabile utilizzare una cartuccia ogni litro d'acqua. Per campioni molto sporchi (acque di scarico o acque superficiali con elevato BOD, COD o TOC) potrebbe essere necessario ridurre ulteriormente il volume del campione. Per ogni nuova tipologia di campione è opportuno, quindi, verificare che l'adsorbente non venga saturato. Questa prova può essere eseguita, passando due aliquote di campione (ad es. 1L e 500 ml) su due diverse cartucce e verificando che al raddoppio del volume corrisponda il raddoppio dell'effetto tossico misurato col saggio ecotossicologico oppure facendo ripassare lo stesso campione su un'altra cartuccia e verificando che l'estratto così ottenuto non determini tossicità sugli organismi del test.

Le colonnine vanno attivate utilizzando metanolo in quantità conforme ai grammi di adsorbente utilizzati (almeno 5 volte il volume del letto) e lavate con una eguale quantità di acetone ed acqua MilliQ. Successivamente il campione viene fatto passare, mantenendo un flusso adeguato alla quantità di adsorbente utilizzato (ad esempio: per 200 mg un flusso di circa 8-10 mL al minuto). Segue una fase di essiccamento sotto flusso d'aria della pompa a vuoto o in alternativa sotto flusso d'azoto. Ad essiccazione avvenuta delle colonnine, si passerà alla fase di eluizione. Per l'eluizione si utilizzerà un volume adeguato di acetone. Gli eluati in acetone ottenuti dalle singole cartucce dovranno essere riuniti e concentrati possibilmente in flusso d'azoto in bagno termostato a 35 °C. L'estratto finale, ad esempio circa 5 mL per un campione equivalente di 10L, permette di raggiungere un rapporto di concentrazione pari a 2000 X. Se non si intende utilizzare immediatamente l'estratto per i saggi ecotossicologici è possibile conservare l'estratto scambiandolo con un opportuno altro solvente (es. DMSO) e conservare il nuovo estratto a -20°C in frigo-congelatore. Prima di eseguire i saggi ecotossicologici è necessario verificare che la dose massima aggiunta di solvente non produca alcun effetto tossico sull'organismo test.

7.8.2 Preparazione dell'estratto per il test con *Daphnia magna*

L'estratto in acetone (equivalente ad almeno 5 L di campione acquoso per il saggio con la dafnia) viene ulteriormente concentrato ad un volume finale di 25 ml in un "vial" di vetro a fondo conico tarato. Tale volume viene trasferito completamente in un matraccio tarato da 100 mL riempito in precedenza con circa 80 mL di mezzo per l'esecuzione del saggio di tossicità con *Daphnia magna*. Dopo ripetuti lavaggi del "vial" con piccoli volumi di mezzo si porta definitivamente a volume (100 mL).

Da questa soluzione di partenza (50 x) vengono preparate le diluizioni successive in serie geometrica (25 x; 12,5 x). In base ai risultati del test eseguiti con la soluzione di partenza e

le prime due diluizioni si deciderà se proseguire con ulteriori diluizioni sempre in serie geometrica. La conduzione successiva del saggio è quella relativa al calcolo dell'EC50 riportato nei Metodi IRSA n.8020 per la *Daphnia magna* (IRSA, 1995).

In ogni caso, data la necessità di operare confronti nel tempo e nello spazio delle aree indagate, si consiglia di adottare intervalli di concentrazioni più ampi di quello esemplificato con fattori di concentrazione superiori, adeguando di conseguenza gli aspetti procedurali. Una serie di concentrazioni più ampia permette, infatti, di discriminare anche quelle situazioni caratterizzate da contaminazione intermedia o molto bassa che, viceversa, sarebbero tutte identificate da un risultato "> 50x", di limitato potere informativo. Se si opta per un disegno sperimentale ampliato, o si prevedono ripetizioni del saggio, piuttosto che approfondimenti successivi, l'estratto in DMSO è la soluzione da preferire in virtù della sua conservabilità e praticità d'uso.

7.8.3 Preparazione dell'estratto per il test con batteri bioluminescenti

L'estratto in acetone (equivalente ad almeno 2 L di campione acquoso per il saggio con i batteri) viene ulteriormente concentrato ad un volume finale di 20 ml in un "vial" di vetro a fondo conico tarato. Tale volume viene trasferito completamente in un cilindro da 5 mL, riempito in precedenza con 4 mL della soluzione salina al 2% di NaCl utilizzata per il saggio. Dopo ripetuti lavaggi del "vial" con piccoli volumi di soluzione salina si porta definitivamente a volume (5 mL).

Da questa soluzione di partenza (400 x) vengono preparate le diluizioni successive in serie geometrica (200 x; 100 x). Il numero delle diluizioni da adottare varia in funzione della tossicità presunta dell'estratto sino ad un massimo di nove. La conduzione successiva del saggio è quella relativa al saggio standard riportato nel Notiziario IRSA per i batteri bioluminescenti (Guzzella, 1996).

7.9 Calcoli

Il risultato viene espresso sotto forma di ECF50, cioè del fattore di concentrazione del campione che determina un effetto del 50% sulla popolazione considerata (immobilizzazione degli organismi per la dafnia o inibizione della luce emessa per i batteri bioluminescenti). Il calcolo dell'ECF50 si ottiene come per l'EC50 in accordo con quanto riportato nei Metodi IRSA n.8020 per la *Daphnia magna* (IRSA, 1995) e nel Notiziario IRSA per i batteri bioluminescenti (Guzzella, 1996).

7.10 Precisione e validazione del metodo

Per verificare la validità della tecnica di preconcentrazione delle acque è opportuno, per ogni nuova tipologia di campione, determinare se l'adsorbente viene saturato oppure no. Questa prova può essere eseguita passando due aliquote di campione (ad es. 1L e 500 ml) su due diverse cartucce e verificando che al raddoppio del volume corrisponda il raddoppio dell'effetto tossico misurato col saggio ecotossicologico prescelto.

Per i risultati dei saggi ecotossicologici considerati, la precisione del metodo adottato e la sua validazione seguono quanto riportato nei Metodi IRSA n.8020 per la *Daphnia magna* (IRSA, 1995) e nel Notiziario IRSA per i batteri bioluminescenti (Guzzella, 1996).

8. Bibliografia

Metodi per la valutazione tossicità e bioaccumulabilità di inquinanti associati ai sedimenti con organismi d'acqua dolce

Adams W.J., Kimerle R.A., Barnett J.W. (1992). *Sediment quality and aquatic life assessment*. *Enviro. Sci. Technol.* 26, 1864-1875.

Alden R.W., Young R.J. (1982). *Open ocean disposal of materials dredged from highly industrialized estuary: and evaluation of potential lethal effects*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 567-576.

Ankley G.T., Schubauer-Berigan M.K., Dierkes, J.R. (1991). *Predicting the toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fractions: pore water vs elutriate*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1359-1366.

Burton G.A. (1991). *Assessment of freshwater sediment toxicity*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1585-1627.

Burton G.A., Ingersoll C.G., Burnett L.C., Henry M., Hinman M.L., Klaine S.J., Landrum P.F., Ross P., Tuchman M. (1996). *A comparison of sediment toxicity test methods at three Great Lake areas of concern*. *J. Great Lakes Res.* 22, 495-511.

Burton G.A., Scott K.J. (1992). *Sediment toxicity evaluations, their niche in ecological assessments*. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2068-2075.

Chapman, P.M., Dexter R.N., Long E.R. (1987). *Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 37, 75-96.

Di Toro D.M., Mahony J.D., Hansen D.J., Scott K.J., Hichks M.B., Mays S.M., Redmond M.S. (1990). *Toxicity of cadmium in sediments: the role of acid volatile sulfide*. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1489-1504.

Fox R., Tuchman M. (1996). *The assessment and remediation of contaminated sediments (ARCS) program*. *J. Great Lakes Res.* 22, 493-494.

Harkey G.A., Landrum P.F., Klaine S.J. (1994). *Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in biosays*. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1315-1329.

Harkey G.A., Lydy M.J., Kukkonen J., Landrum P.F. (1994). *Feeding selectivity and assimilation of PAH and PCB in *Diporeia* spp.* *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1445-1455.

Ingersoll C.G., Ankley G.T., Benoit D.A., Brunson E.L., Burton G.A., Dwyer F.J., Hoke R.A., Landrum P.F., Norberg-King T.J., Winger P.V. (1995). *Toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants using freshwater invertebrates: a review of methods and applications*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1885-1894.

Ingersoll C.G., Brunson E.L., Dwyer F.J., Hardesty D.K., Kemble N.E. (1998). *Use of sublethal endpoints in sediment toxicity tests with the amphipod *Hyaella azteca**. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1508-1523.

Ingersoll C.G., Ivey C.D., Brunson E.L., Hardesty D.K., Kemble N.E. (2000). *Evaluation of toxicity: whole-sediment versus overlying-water exposures with amphipod Hyalella azteca*. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2906-2910.

Karickhoff S.W., Morris K.R. (1985). *Impact of tubificid oligochaetes on pollutant transport in bottom sediments*. Environ. Sci. Technol. 19, 51-56.

Knezowich J.P., Harrison F.L., Wilhelm R.G. (1987). *The bioavailability of sediment sorbed organic chemicals: a review*. Water, Air Soil Pollut. 32, 233-245.

Munawar M., Thomas R.L. (1989). *Sediment toxicity testing in two areas of concern of the Laurentian Great Lakes: Toronto (Ontario) and Toledo (Ohio) harbours*. Hydrobiologia 176/177, 397-409.

Nebeker A.V., Cairns M.A., Gakstatter J.H., Malueg K.W., Schuytema G.S., Krawczyk D.F. (1984). *Biological methods for determining toxicity of contaminated freshwater sediments to invertebrates*. Environ. Toxicol. Chem. 3, 617-630.

O'Connor T.P., Paul J.F. (2000). *Misfit between sediment toxicity and chemistry*. Mar. Poll. Bull. 40, 59-64.

Prater B.L., Anderson M.A. (1977). *A 96-hour sediment bioassay of Duluth and Superior Harbor basins (Minnesota) using Hexagenia limbata, Asellus communis, Daphnia magna and Pimephales promelas as test organisms*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 18, 159-169.

Reynoldson T.B., Zarull M.A. (1989). *The biological assessment of contaminated sediments – the Detroit River example*. Hydrobiologia 188/189, 463-476.

Sasson-Brickson G., Burton G.A. (1991). *In situ and laboratory sediment toxicity testing with Ceriodaphnia dubia*. Environ. Toxicol. Chem. 10, 201-207.

Sibley P.K., Benoit D.A., Ankley G.T. (1997). *The significance of growth in Chironomus tentans sediment toxicity tests: relationship to reproduction and demographic endpoints*. Environ. Toxicol. Chem. 16, 336-345.

Sibley P.K., Benoit D.A., Balcer M.D., Phipps G.L., West C.W., Hoke R.A., Ankley G.T. (1999). *In situ bioassay chamber for assessment of sediment toxicity and bioaccumulation using benthic invertebrates*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2325-2326.

US Army Corps of Engineers (1977). *Ecological evaluation of proposed discharge of dredged material into ocean waters*. Environmental Effects Laboratory, USACOE, US Environmental Protection Agency, Vicksburg, MS.

USEPA (1994). *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants with freshwater invertebrates*. First ed., US Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, EPA/600/R-94/024, Duluth, MN.

USEPA (1998). *The incidence and severity of sediment contamination in surface water of the United States*. US Environmental Protection Agency, EPA/823/R-97/006, 007, 008.

Viganò L, Barbiero G, Buffagni A, Mingazzini M, Pagnotta R. (1999). *Assessment of the alterations of the aquatic environment downstream from a polluted tributary of the River Po (Italy)*. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 2, 55-69.

Viganò L. (2000). *Assessment of the toxicity of River Po sediments with Ceriodaphnia dubia*. *Aquatic Toxicology* 47,191-202.

Viganò L., Arillo A., Buffagni A., Camusso M., Ciannarella R., Crosa G., Falugi C., Galassi S., Guzzella L., Lopez A., Mingazzini M., Pagnotta R., Patrolecco L., Tartari G., Valsecchi S. (2002). *Quality assessment of bed sediments of the Po River (Italy)*. *Water Research* (in stampa).

Viganò, L., A. Arillo, S. De Flora, J. Lazorchak (1995). *Evaluation of microsomal and cytosolic biomarkers in a seven-day larval trout sediment toxicity test*. *Aquatic Toxicology* 31, 189-202.

Zoumis T., Schmidt A., Grigorova L, Calmano W. (2001). *Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation*. *Sci. Total Environ.* 266, 195-202.

Metodo per test di tossicità cronica su sedimento con Ceriodaphnia Dubia

ASTM (1994). *Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates*. *American Society for Testing and Materials*, ASTM E 1383-94.

Lacey R., Watzin M.C., McIntosh A.W. (1999). *Sediment organic matter content as a confounding factor in toxicity tests with Chironomus tentans*. *Environ. Toxicol. Chem* 18, 231-236.

Margaritora F. (1983). Cladoceri (Crustacea: Cladocera). In *"Guide per il riconoscimento delle specie animali nelle acque interne italiane"*, n.22, CNR AQ/1/197, pp 169.

Viganò L. (1996). *Metodo per la valutazione della tossicità acuta con Ceriodaphnia dubia*. *Notiz. Metodi Anal. Acque IRSA – CNR*, giugno 1996, 9-19.

Viganò L. (1998). *Metodo per test di tossicità cronica (7 giorni) con Ceriodaphnia dubia*. *Notiz. Metodi Anal. Acque IRSA – CNR*, maggio 1998, 8-13.

Viganò L. (2000). *Assessment of the toxicity of River Po sediments with Ceriodaphnia dubia*. *Aquatic Toxicology* 47,191-202.

Viganò L., Arillo A., Buffagni A., Camusso M., Ciannarella R., Crosa G., Falugi C., Galassi S., Guzzella L., Lopez A., Mingazzini M., Pagnotta R., Patrolecco L., Tartari G., Valsecchi S. (2002). *Quality assessment of bed sediments of the Po River (Italy)*. *Water Research* (in stampa).

Metodo per test di tossicità a breve termine su sedimento con Trota Iridea (Oncorhynchus Mykiss)

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Burke M.D., Mayer, R.T. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism Disposition* 2, 583-588.

De Flora S., L. Viganò, F. D'Agostini, A. Camoirano, M. Bagnasco, C. Bennicelli, F. Melodia, A. Arillo (1993). Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed *in situ* to polluted river water. *Mutation Research* 319, 167-177.

Holm G., Norrgren L., Andersson T., Thuren A. (1993) Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in three-spine stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Aquatic Toxicology* 27, 33-50.

Kirby M.F., Matthiessen P., Neall P., Tylor T., Allchin C.R., Kelly C.A., Maxwell D.L., Thain J.E. (1999). Hepatic EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) as an indicator of contaminant exposure in English estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 38, 676-686.

Lindstrom-Seppa P., Oikari A. (1989). Biotransformation and other physiological responses of in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 18, 191-203.

Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 19, 265-275.

Melancon M.J., Turnquist K.A., Lech J.J. (1989). Relation of hepatic microsomal monooxygenase activity to tissue PCBs in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) injected with (¹⁴C)PCBs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 777-782.

Parrot J.L., Hodson P.V., Servos M.R., Huestis S.L., Dixon D.G. (1995). Relative potency of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans for inducing mixed function oxygenase activity in rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 1041-1050.

Viganò L, Arillo A, Melodia F, Arlati P, Monti C. (1998a). Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the River Po, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 404-411.

Viganò L. (1996). Metodo per la valutazione della tossicità acuta con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). *Notiz. Metodi Anal. Acque IRSA - CNR*, settembre 1996, 17-24.

Viganò L., Arillo A., Buffagni A., Camusso M., Ciannarella R., Crosa G., Falugi C., Galassi S., Guzzella L., Lopez A., Mingazzini M., Pagnotta R., Patrolecco L., Tartari G., Valsecchi S. (2002). Quality assessment of bed sediments of the Po River (Italy). *Water Research* (in stampa).

Viganò, L., A. Arillo, C. Falugi, F. Melodia (1998b). Histochemical and biochemical markers in trout larvae exposed to river sediments. *Chemosphere* 37, 2797-2807.

Viganò, L., A. Arillo, S. De Flora, J. Lazorchak (1995). Evaluation of microsomal and cytosolic biomarkers in a seven-day larval trout sediment toxicity test. *Aquatic Toxicology* 31, 189-202.

Proposta di metodo per la valutazione del bioaccumulo con *Lumbriculus Variegatus* di sostanze associate al sedimento

ASTM (1998). *Standard guide for determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates*. In: Annual Book of American Society of testing and Materials Standards Philadelphia, USA, E 1688-97a.

Bligh, E.G. e Dyer W.J. (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37, 911-917

Brunson E.L., Canfield T.J., Ingersoll C.J. e Kemble N.E. (1998). *Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.

De Boer J. (1988). *Chlorobiphenyls in bound and non-bound lipids of fishes: Comparison of different extraction methods*. *Chemosphere* 17, 1803-1810.

Egeler P., Rombke J., Meller M. Knacker T., Franke C., Studinger G. e Nagel R. (1997). *Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions*. *Chemosphere* 35, 835-852.

Folch J., Lees M. e Stanley G.H.S. (1957). *Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. *J.Biol.Chem.* 226, 497-509.

Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. e Parrish C.C. (1985). *Micromethods for lipids in aquatic invertebrates*. *Limnol.Oceanog.* 30,1099-1105.

Herbes S.E., Giesy J.P., Ankley G.T., Newsted J.L. e Adams R.J. (1983). *Lipid quantification of freshwater invertebrates:Method modification for microquantification*. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 40, 1315-1317.

Keitly T.J., White D.S. e Landrum P.F. (1988a). *Short-term lethality and sediment avoidance assays with endrin-contaminated sediment and two oligochaetes from Lake Michigan*. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.* 17, 95-101.

Keitly T.J., White D.S. e Landrum P.F. (1988b). *Sublethal responses to endrin in sediment by Limnodrilus hoffmeisteri (Tubificidae) and in mixed-culture with Stylodrilus heringianus (Lumbriculidae)*. *Aquat.Toxicol.* 13, 227-250.

Leppanen M.T. e Kukkonen J.V.K. (1998). *Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Muller)*. *Hydrobiol.* 377, 183-194.

Mount D.R., Dawson T.D. e Burkhard L.P. (1999). *Implication of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus*. *Environ.Toxicol.Chem.* 18,1244-1249.

OECD (1999). *OECD Draft Guideline Bioaccumulation: Sediment Test Using Benthic Oligochaetes*. OECD, Paris.

Oliver B.G. e Niimi A.J. (1983). Bioconcentration of chlorobenzenes from water by Rainbow trout: Correlations with partition coefficients and environmental residues. *Environ.Sci.technol.* 17, 287-291.

Phipps G.L., Ankley G.T., Benoit D.A. e Mattson V.R. (1993). *Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants.* *Environ.Toxicol.Chem.* 10, 1061-1072.

Roberts J.B., deFrietas A.W.S. e Gidney M.A.J. (1977). *Influence of lipid pool size on bioaccumulation of the insecticide Chlordane by Northern Redhorse suckers Moxostoma macrolepidotum.* *J.Fish.Res.Board Can.* 34, 89-97.

USEPA (1999). *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates.* EPA/600/R, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Preconcentrazione di campioni di acqua superficiale per i saggi ecotossicologici

Atti Convegno "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle Acque", Roma, 26-27 giugno 1986. Istituto di Ricerca sulle Acque, Quaderni, 75, 351-384 (1987).

Barcelo D., Durand G., Bouvot V. and Nielen M. 1993. *Use of Extracting disks for trace enrichment of various pesticides from river water and simulated samples followed by liquid chromatography-rapid scanning UV-Visible and thermospray -mass spectrometry detection.* *Env. Sci. Technol.* , 27, 271-277.

Castillo M., Alonso C. and Barcelo D. 1999. *Identification of polar, ionic, and highly water soluble organic pollutants in untreated industrial wastewaters.* *Env. Sci. Technol.* , 33, 1300-1306.

De Zwart D. and Folkerts A. 1990. *Monitoring the toxicity of organic compounds dissolved in Rhine water.* *Hydrobiol. Bull.* 24, 5-12.

Galassi S., Battaglia C. e Viganò L. 1988. *A toxicological Approach for detecting organic micropollutants in environmental samples.* *Chemosphere*, 17, 783-787.

Galassi S., Guzzella L. and Sora S. 1989. *Mutagenic potential of drinking water from surface supplies in Northern Italy.* *Env. Toxicol. Chemistry*, 8, 109-116.

Galassi S., Guzzella L., Mingazzini M., Viganò L., Capri S. and Sora S. 1992. *Toxicological and chemical characterization of organic micropollutants in river Po waters (Italy).* *Wat. Res.*,1, 19-27.

Galassi, S., Benfenati, S. *Fractionation and toxicity evaluation of waste waters.* *J.Chromatogr. A*, 889, 149-154 (2000).

Galassi, S., Boniardi N. e De Paolis A. 1990. *Metodi multiresidui per l'analisi di erbicidi nelle acque.* *Boll. Chim. Igien.*, 41, 405-413.

Guzzella L., Ferretti D., Zerbini I. and Monarca S. 1999. *Evaluation of genotoxicity of italian lakewater for human consumption: a case study in Lombardy*. *Toxicol. Environ. Chemistry*, 73, 81-92

Guzzella, L. and Sora S. 1998. *Mutagenic activity of lake water samples used as drinking water resources in Northern Italy*. *Wat. Res.*, 32-6, 1733-1742.

Guzzella, L. e Gronda A. 1995 (a) *La contaminazione da microinquinanti organici nelle acque del nodo Lambro-Po: risultati delle analisi chimiche*. *Acqua Aria*, 7, 641-652.

Guzzella, L. e Gronda A. 1995 (b). *La contaminazione da microinquinanti organici nelle acque del nodo Lambro-Po: risultati del test di tossicità con Vibrio fischeri*. *Acqua Aria*, 7, 743-750.

Kool H.L., van Keijil C.F., van Kranen H.I. and de Greef E. 1981. *The use of HAD-resins for detection of mutagenic activity in water*. *Chemosphere*, 10, 85-91.

Monarca, S., Dalmiglio A., Feretti D., Zanardini A., Benfenati E. e Nardi G.. 1996. *Ricerca di sostanze mutagene e tossiche in acque lacustri destinate a scopo potabile*. *Acqua Aria*, 4, 583-585.

Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) .1984. *Guideline 202 on "Daphnia sp., Acute Immobilisation Test "*. Part I

Pichon V., Chen L., Guenu S. and Hennion M.C. 1995. *Comparison of sorbents for solid-phase extraction of highly polar degradation products of atrazine (including ammeline, ammelide and cyanuric acid)*. *J. Chromatography A*, 711, 257-267.

Sloof W. and van Keijil C.F. 1982. *Monitoring the river Rhine and Meeuse in the Netherlands for mutagenic activity using the Ames test in combination with rat of fish liver homogenates*. *Aquat. Toxicol.* 2, 89-98.

Proposta di metodo per la concentrazione delle acque per i saggi tossicologici previsti dal D.Lgs 152/99

GUZZELLA L. (1996): *"Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti"*, *Notiz. Met. Anal. Acque*, giugno.

IRSA (1995): *"Metodi analitici per le acque"*, *Quad. Ist. Ric. Acque*, **100**, 342 pp.

