



APAT

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

Proposta di

**GUIDA TECNICA SU METODI DI ANALISI
PER IL SUOLO E I SITI CONTAMINATI**

**UTILIZZO DI INDICATORI
BIOLOGICI ED ECOTOSSICOLOGICI**

RTI CTN_TES 1/2004

APAT

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

Proposta di

GUIDA TECNICA SU METODI DI ANALISI PER IL SUOLO E I SITI CONTAMINATI

UTILIZZO DI INDICATORI BIOLOGICI ED ECOTOSSICOLOGICI

A cura di:

Pina Nappi (ARPA Piemonte)
Carlo Jacomini (APAT)

Realizzazione:

Anna Maria D’Agostino, Daniela Fantone, Pietro Giansanti, Bona Griselli, Pina Nappi, Agostino Profeta (ARPA Piemonte)
Pierangela Angelini, Carlo Jacomini, Alfonso Sbalchiero (APAT)
Giancarlo Sbrilli (ARPA Toscana)
Aldo Zullini (Università Milano-Bicocca, Dipartimento Biotecnologie Bioscienze)
Cristina Menta (Università degli Studi di Parma)

Coordinamento:

Renzo Barberis (Arpa Piemonte), **Antonio Pugliese** (APAT)

Responsabile di progetto APAT
Antonio Pugliese



Responsabile CTN TES
Renzo Barberis

Informazioni legali

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.

Informazioni aggiuntive sull'argomento sono disponibili nei siti Internet

- <http://www.sinanet.anpa.it>
- <http://www.arpa.piemonte.it/ctn>

Supervisione editoriale a cura di:
ARPA Piemonte

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Stampato in Italia

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

Via Vitaliano Brancati, 48
00144 Roma

Centro Tematico Nazionale – Territorio e Suolo

c/o ARPA Piemonte - Sede Centrale
Via della Rocca, 49
10123 Torino

INDICE

PREMESSA.....	5
1. INTRODUZIONE	5
2. STRUMENTI BIOLOGICI PER IDENTIFICARE LA QUALITÀ DEL SUOLO	8
3. ECOTOSSICOLOGIA AMBIENTALE	11
3.1 INDIVIDUAZIONE DELLE METODOLOGIE DA UTILIZZARE NELLE PROVE DI TOSSICITÀ	13
3.2 CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	16
3.3 DETERMINAZIONI SULLA MATRICE LIQUIDA	20
3.3.1 Preparazione dell'elutriato	20
3.3.2 Saggio di tossicità con <i>Vibrio fischeri</i>	24
3.3.3 Saggio di tossicità con <i>Daphnia magna</i>	31
3.3.4 Saggio di tossicità con <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>).....	40
3.3.5 Saggi su matrice liquida per suoli inquinati da composti poco solubili in acqua.....	58
3.4 DETERMINAZIONI SULLA MATRICE SOLIDA	63
3.4.1 Saggi su vegetali	63
3.4.1.1 Metodo per la misura dell'inibizione della crescita radicale	64
3.4.1.2 Saggio di germinazione e allungamento radicale	72
3.4.2 Saggi su animali	82
3.4.2.1 Saggio di riproduzione di <i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i>	83
3.4.2.2 Saggio di riproduzione di <i>Folsomia candida</i>	93
3.4.2.3 Saggio di tossicità cronica con <i>Heterocypris incongruens</i>	107
3.4.2.4 Saggio di tossicità/genotossicità con <i>Panagrellus redivivus</i>	112
3.5 SAGGI DI MUTAGENESI	121
3.5.1 Saggio di mutagenesi con <i>Salmonella typhimurium</i> - Saggio di Ames	121
3.5.2 SOS Chromotest.....	125
3.5.3 Mutatox.....	128
4. INDICI DI QUALITÀ AMBIENTALE	130
4.1 INDICI DI QUALITÀ AMBIENTALE CON I NEMATODI	132
4.1.1 Indici ecologici.....	136
4.2 BIOMONITORAGGIO DELLA PEDOFAUNA	139
GLOSSARIO E ABBREVIAZIONI	155
ALLEGATO I CTN NELL'AMBITO DELLA RETE SINANET	158

PREMESSA

Il Centro Tematico Nazionale “Territorio e Suolo”, già CTN “Suolo e Siti Contaminati”, nell’ambito delle attività inerenti l’approfondimento sulle conoscenze del suolo, ha rivolto una particolare attenzione agli indicatori biologici ed ecotossicologici.

Il suolo, infatti, nonostante il suo ruolo fondamentale dal punto di vista ambientale, non è stato oggetto di ricerche adeguate per quanto riguarda la sua popolazione biologica. Il biota edafico è ancora poco noto, a dispetto della sua importanza critica. Benché gli studi sulla biodiversità a livello mondiale abbiano evidenziato la carenza di studi sugli organismi edafici, esistono pochi ricercatori con esperienza sulla tassonomia o l’ecologia del suolo.

Dalla consapevolezza di una lacuna da colmare è stato effettuato uno studio specifico su questa tematica che ha riguardato innanzitutto una estesa rassegna bibliografica per verificare lo stato dell’arte sulla conoscenza e sull’utilizzo di indicatori e indici, biologici ed ecotossicologici, per la valutazione della qualità del suolo e dei siti contaminati.

Sulla base della rassegna bibliografica e dei contatti con le istituzioni che adottano le metodologie prescelte, anche su matrici diverse, sono state prese in considerazione alcune delle metodiche ritenute maggiormente idonee ed è stato avviata una attività di sperimentazione articolata in tre fasi: prove di tossicità sulla matrice liquida, prove sulla matrice solida e verifica della qualità dei suoli attraverso la ricerca di alcuni gruppi sistematici della pedofauna. Le attività sperimentali hanno coinvolto l’ARPA Piemonte (Dipartimento di Grugliasco e di Torino) e l’ARPA Toscana (Dipartimento di Piombino).

In questa proposta di Guida Tecnica vengono riportate le metodiche ritenute più valide sia dalle attività sperimentali condotte dal gruppo di lavoro sia da verifiche effettuate da altri ricercatori.

La Guida Tecnica si rivolge specificatamente a coloro che hanno il compito di valutare lo stato di salute del suolo. Essa si propone di fornire gli elementi conoscitivi di base indispensabili per definire e rendere organica la fase di campionamento (anche alla luce della necessità di armonizzare le attività di monitoraggio nazionali con quelle europee) e le varie fasi che compongono le metodologie analizzate. Tale impegno si realizza con la speranza di diffondere quanto più possibile le conoscenze così acquisite tra gli operatori del settore per effettuare una valutazione della qualità del suolo e dei siti contaminati basata su metodologie comuni per una comprensione univoca e uniforme.

1. INTRODUZIONE

Il suolo è un'entità vivente molto complessa, in grado di respirare, di assimilare elementi utili quali il carbonio e l'azoto, di degradare e mineralizzare i composti organici, di accumulare sostanze di riserva sotto forma di humus. Queste funzioni sono dovute all'innumerabile quantità di organismi micro e macroscopici che popolano il terreno e che intervengono attivamente con il loro metabolismo sulla composizione dello stesso, trasformandolo e rigenerandolo (Nappi, 2000).

L'energia entra in questo sistema principalmente tramite la degradazione della materia organica morta, ossia dei residui delle piante e degli animali. La fertilità di un suolo naturale dipende quindi in modo significativo dalla velocità di trasformazione della materia organica, mediata dalla flora batterica. Qualsiasi contaminazione del suolo, che inibisca o elimini i microrganismi in esso presenti o che modifichi la quantità e la qualità della materia organica, può portare un danneggiamento a breve o a lungo termine dell'intero ecosistema vegetazione-suolo (Pitea *et al.* 1998).

Ciononostante, al momento, i suoli sono tra gli habitat meno studiati. Il biota edafico è, tra le forme di vita del nostro pianeta, ancora una frontiera inesplorata, a dispetto della sua importanza critica. Infatti, migliaia di specie di microbi e di invertebrati popolano un singolo metro quadrato di suolo, organismi che ampiamente ignoriamo sia per identità sia per il loro contributo al sostentamento della biosfera. Benché gli studi sulla biodiversità a livello mondiale abbiano evidenziato la carenza di studi sugli organismi edafici, esistono pochi scienziati con esperienza sulla tassonomia o l'ecologia del suolo (Jacomini, 2000).

Da un punto di vista generale, le reti trofiche che si possono individuare nel suolo sono riconducibili a tre grosse categorie (Pokarzhevskii, 1996; Lavelle, 1997):

- le *micro-reti*, in cui interagiscono i microrganismi (batteri, alghe, lieviti e funghi) e gli animali più piccoli di 0,2 mm (protozoi, rotiferi, nematodi, tardigradi, ecc.), legate alla pellicola d'acqua nelle cavità del suolo, alla rizosfera e alla lettiera;
- le *meso-reti*, dove interagiscono tra loro i cosiddetti trasformatori della lettiera (mesofauna, animali compresi tra 2 e 0,2 mm), principalmente acari, collemboli, larve di ditteri e di coleotteri, enchitreidi, pseudoscorpioni, alcuni miriapodi, ecc., legati ai pori del suolo;
- le *macro-reti*, dove si rileva la presenza di organismi di dimensioni maggiori di 2 mm, e che tradizionalmente includono i cosiddetti "ingegneri del suolo", come termiti, formiche e lombrichi, ma in cui vanno inseriti anche molluschi, coleotteri, miriapodi, isopodi, e vertebrati quali le talpe, in grado di spostarsi liberamente nel suolo.

Ciascun organismo in questi tre sistemi è legato agli altri direttamente o indirettamente, ma per lo più ne è indipendente per quanto riguarda le risorse alimentari.

Le *micro-reti*, principalmente per quanto riguarda batteri, alghe e protozoi, svolgono un ruolo fondamentale a livello locale, partecipando alla formazione di associazioni di specie ed esercitando funzioni indispensabili, sebbene in un'area d'azione assai ristretta nell'ordine di qualche centimetro cubico. Il tempo di sviluppo di una sequenza successionale (tempo ecologico) è nell'ordine di giorni o mesi; il tempo di turnover biologico (vale a dire quello necessario ai flussi di nutrienti per ricolmare le riserve di nutrienti) varia da un giorno ad una settimana.

Le *meso-reti* hanno una funzione di regolazione e disseminazione delle micro-reti, di apertura e rivestimento dei microcanali di aerazione del suolo, di triturazione e digestione della materia organica in decomposizione (che aumenta la superficie attaccabile dalle micro-reti) e di formazione di complessi organici e organo-minerali che sequestrano alcune sostanze e ne mobilitano altre. L'ordine di grandezza spaziale varia da qualche centimetro a pochi metri; il tempo ecologico varia da una settimana a qualche mese, il tempo di turnover biologico da giorni a mesi.

Le *macro-reti* possono modificare in modo notevole anche ampi tratti di terreno (si pensi ad un termitaio), scavando cavità che permettono una circolazione dell'acqua, consumando e spostando in misura rilevante la sostanza organica in decomposizione e controllando in numero e qualità le sottostanti reti. Il tempo ecologico varia da qualche settimana a mesi, quello di turnover biologico impiega dei mesi, anche degli anni (Pokarzhevskii, 1996).

Riferimenti bibliografici

- Jacomini C., 2000. *Soil bioindicators: soil fauna in assessments and controls – introduction to an italian soil biomonitoring programme*. Seminario internazionale: Indicatori biologici ed ecotossicologici applicati al suolo e ai siti contaminati. Torino 19 maggio 2000.
- Lavelle P., 1997. *Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function*. Advances in Ecological Research, 27: 93-132.
- Nappi P., 2000. *L'utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici per valutare la qualità del suolo: stato dell'arte*. Seminario internazionale: Indicatori biologici ed ecotossicologici applicati al suolo e ai siti contaminati. Torino 19 maggio 2000.
- Pitea D., De Cesaris A.L. e Marchetti G., 1998. *Caratterizzazione con indicatori biologici*. In: Individuazione, caratterizzazione e campionamento di ammassi abusivi di rifiuti pericolosi. Ricerche e risultati. Fondazione Lombardia per l'Ambiente: 97-106
- Pokarzhevskii A.D., 1996. The problem of scale in bioindication of soil contamination. In: N.M. van Straalen & D.A. Krivolutsky (Eds.), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Kluwer Academic Publishers, NL. Pp. 111-121.

2. STRUMENTI BIOLOGICI PER IDENTIFICARE LA QUALITÀ DEL SUOLO

Lo sviluppo di tecniche utili alla conoscenza del suolo, per quanto riguarda i comparti ecotossicologico e biologico, è attività di ricerca relativamente recente. Soltanto negli ultimi anni, infatti, si è sancita con studi a livello mondiale l'importanza della biodiversità nell'ecologia dell'ecosistema suolo e, soltanto a metà degli anni '90, ricercatori a livello internazionale hanno proposto una caratterizzazione dei suoli basata sul biomonitoraggio.

Il monitoraggio biologico del suolo (definito anche con il termine di biomonitoraggio) è rivolto alla valutazione della qualità del suolo mediante l'utilizzo di organismi viventi. Questi ultimi possono essere utilizzati in laboratorio nelle prove di tossicità oppure osservati nel loro ambiente naturale e rappresentare indicatori delle condizioni ambientali (*bioassessment*).

La caratterizzazione chimica del suolo, infatti, non consente, da sola, di esprimere valutazioni relative al pericolo per gli organismi viventi; è necessario pertanto ricorrere agli strumenti biologici ed ecotossicologici per una valutazione complessiva. L'effetto biologico è legato alla frazione biodisponibile delle sostanze contaminanti che, a sua volta, dipende dalle sostanze chimiche presenti e dalle condizioni ambientali. Questa consapevolezza spinge alla necessità di utilizzare anche il monitoraggio biologico per una corretta valutazione del pericolo derivante dalla contaminazione del suolo.

In particolare si è delineata con chiarezza la necessità di individuare alcuni sistemi di indicatori in grado di esprimere criteri di qualità per la matrice suolo da utilizzare come standard nelle operazioni di bonifica o, più in generale, nella valutazione della qualità dei suoli sottoposti a rischio di contaminazione.

Gli organismi utilizzati come strumenti di indagine del biomonitoraggio devono presentare una specifica sensibilità verso determinati fattori di disturbo ambientale e vengono definiti nel complesso "biosensori".

Un biosensore, a seconda delle specifiche caratteristiche, può essere impiegato come bioindicatore o come bioaccumulatore.

Bioindicatore

Bioindicatore è un organismo vivente o una specifica comunità vegetale o animale che, in presenza di un inquinante o miscele di inquinanti, subisce variazioni rilevabili dello stato naturale. Tali variazioni possono portare alla modifica della struttura della comunità nonché alla morte dell'organismo. Un organismo può quindi essere considerato un buon bioindicatore qualora manifesti reazioni identificabili a differenti concentrazioni di dati inquinanti.

I principali sintomi o endpoint presi in considerazione sono generalmente i seguenti:

1. variazioni nella struttura della comunità;

2. modificazioni morfologiche;
3. variazioni della vitalità (modificazioni fisiologiche);
4. danni al patrimonio genico.

Più organismi insieme possono essere utilizzati quali bioindicatori, in particolare modo quando i fenomeni inquinanti determinano variazioni misurabili a livello di ecosistema o di comunità. È prassi ormai consolidata il valutare la tossicità di matrici complesse, quali quelle ambientali, mediante una batteria di bioindicatori, allo scopo di analizzare il più ampio spettro di effetti su organismi con risposte differenti ai vari composti presenti nelle matrici.

Un buon bioindicatore dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche:

- sensibilità agli inquinanti;
- ampia distribuzione nell'area di indagine;
- scarsa mobilità;
- lungo ciclo vitale;
- uniformità genetica.

Le attività di bioindicazione possono essere condotte su vari livelli d'integrazione biologica. Secondo van Gestel e van Brummelen (1996), il termine bioindicazione è riservato a tutte le attività a livello dell'organismo (intero organismo) o superiore (popolazioni, comunità, ecosistemi).

Si ricorda ancora una volta che un buon bioindicatore è tale quando esiste una relazione quantitativa tra la risposta biologica e le concentrazioni di esposizione ad un dato inquinante.

Bioaccumulatore

Bioaccumulatore è un organismo vegetale o animale in grado di accumulare nel tempo specifiche sostanze inquinanti in quantità proporzionali sia alle concentrazioni sia ai tempi di esposizione e la cui presenza può essere ricercata direttamente attraverso la determinazione analitica di tali organismi o di alcune loro parti. I bioaccumulatori sono quindi organismi in grado di sopravvivere alla presenza di un determinato contaminante, assimilato dalle matrici ambientali (aria, acqua, suolo), accumulandolo e permettendone una qualificazione e una quantificazione.

Un buon bioaccumulatore deve possedere i requisiti di seguito indicati:

- alta tolleranza agli inquinanti che sono oggetto della sperimentazione;
- capacità di accumulare indefinitamente;
- ampia distribuzione nell'area di studio;
- scarsa mobilità;
- lungo ciclo vitale.

Anche nel caso degli organismi bioaccumulatori è importante la definizione di una relazione biunivoca tra le concentrazioni degli inquinanti nell'ambiente e quelle all'interno del bioaccumulatore stesso. Gli organismi bioaccumulatori sono attualmente utilizzati in molte reti di sorveglianza allestite sul territorio europeo come nel caso del progetto GEMS (*Global Environment Monitoring*

System) nel quale sono utilizzate le proprietà accumulatrici di muschi e licheni per quanto riguarda i metalli pesanti. Altri organismi bioaccumulatori quali i mitili sono impiegati nei programmi di monitoraggio della qualità delle acque costiere marine, per la loro capacità di accumulare al loro interno metalli pesanti, sostanze organiche e microrganismi patogeni. Infine, anche insetti quali le api possono essere considerate dei bioaccumulatori e sono impiegate nella valutazione del fall-out dei metalli pesanti, prodotti fitosanitari e sostanze radioattive (Jacomini *et al.* 2000)

Riferimenti bibliografici

Jacomini C., Nappi P., Sbrilli G., Mancini L., 2000. *Indicatori e indici ecotossicologici e biologici applicati al suolo*. ANPA - Roma RTI CTN_SSC 3/2000.

Van Gestel C.A.M. e van Brummelen T.C., 1996. *Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms*. Ecotoxicology.

3. ECOTOSSICOLOGIA AMBIENTALE

L'ecotossicologia è la scienza che, utilizzando metodi e concetti propri della tossicologia, applica i principi dell'ecologia e della chimica ambientale allo studio degli effetti delle sostanze tossiche sugli ecosistemi. Inizialmente l'impiego di saggi biologici era rivolto unicamente alla definizione di ciò che era accaduto in passato, attualmente la prospettiva nella quale si inseriscono i saggi biologici include l'approccio predittivo, utilizzando le analisi come strumento previsionale per la valutazione del rischio ambientale.

Un saggio ecotossicologico è una prova che utilizza un sistema biologico come bersaglio. Essa richiede che un organismo vivente sia posto a contatto per un determinato tempo ad una sostanza in esame e che si valuti la risposta mostrata dall'organismo (Maffiotti *et al.* 1997).

Utilizzo di Bioindicatori

Uno dei principali problemi, nelle ricerche ecotossicologiche, è la valutazione, in termini quantitativi dell'effetto prodotto, dell'esposizione di comunità naturali ai contaminanti.

Per affrontare questo problema, la tossicologia ambientale moderna ha gradualmente sostituito gli studi di monitoraggio biologico basati sulla misura delle concentrazioni di inquinanti presenti negli organismi bioindicatori con un nuovo approccio basato sulla risposta evolutiva di organismi, popolazioni o comunità naturali agli stressori chimici dell'ambiente.

Le risposte degli organismi bioindicatori, prendono il nome di bioindicazioni e costituiscono un segnale integrato di un determinato livello di contaminazione per una determinata zona per cui indicano, per quella zona, un rischio tossicologico.

Pertanto, la bioindicazione viene definita come "un cambiamento della struttura o della funzione dei processi biochimici o cellulari che è indotto da un contaminante e può essere misurato". Tale cambiamento fornisce informazioni sia qualitative sia semiquantitative sulla natura del danno chimico arrecato e sul rapporto tra effetti e danni arrecati all'ambiente (Colborn *et al.*, 1993, NRC, 1989). Un concetto base, sul quale poggia questo nuovo approccio metodologico, è la possibilità di mettere in correlazione gli effetti di un agente inquinante e il relativo danno alla struttura dell'organizzazione (Bayne *et al.*, 1985).

La tossicità di un agente (o miscela) è generalmente sentita, in un primo momento, a livello biochimico e molecolare (cambiamento nelle attività enzimatiche, del DNA, ecc.) e solo successivamente a livello degli organuli cellulari, del tessuto, e infine dalla popolazione. In una ricerca ecotossicologica sono potenziali bioindicazioni di un danno chimico arrecato agli organismi,

anche le differenti risposte omeostatiche (McCarthy e Shugart, 1990, Depledge 1989, Fossi, 1991 e 1994).

La valutazione di un pericolo potenziale per una o più comunità è dato dalla valutazione comparata tra gli organismi bioindicatori presenti nella zona di contaminazione e quelli presenti in una zona di controllo.

Nella tabella che segue sono indicati, a titolo di esempio, alcune bioindicazioni per metalli pesanti e per altri agenti inquinanti organici, usati nella ricerca ecotossicologica. Queste forniscono differenti tipi di informazione: avvertono della presenza di un potenziale problema di una specifica categoria di contaminanti e danno un'indicazione sugli effetti ecologici possibili che si possono avere su una popolazione e comunità, per una esposizione a lungo termine.

Bioindicazioni per metalli pesanti e per altri agenti inquinanti organici, usati nella ricerca ecotossicologica

Contaminante	Bioindicazione	Avvertenza
<i>Metalli pesanti</i>		
Cu, Hg, Ag, Zn, Cd, Pb	Variazione del DNA	S
	Metallotionine	S D
	Porfirine	S D P
	Risposta immunitaria	S
	Reazioni multienzimatiche	S
<i>Composti organici</i>		
1) PAHs	Variazione del DNA	S D P
	Reazioni multienzimatiche	S D
	Risposta immunitaria	S
2) PCBs, DDT, HCB, TCDD		
	Reazioni multienzimatiche	S
	Porfirine	S
	Risposta immunitaria	S
	Variazione del DNA	S D
3) Organofosfati Carbammati	Attività esterasica del sangue	S D
	Attività esterasica del cervello	S D P

S = segnale di un potenziale problema

D = indicatore definitivo o tipo o classe di inquinante

P = indicatore preventivo di un effetto nocivo per una lunga esposizione

Biomonitoraggio

Per quanto attiene all'ecotossicologia, si considera biomonitoraggio un saggio ecotossicologico ripetuto nel tempo, con un protocollo definito, in cui l'attività di una sostanza chimica è misurata come un effetto avverso su alcune specie test (Hopkin, 1993).

Il ruolo del biomonitoraggio è quello di indicare la “salute” degli ecosistemi, soprattutto quelli in cui si sospetta che sia stata rilasciata una concentrazione biologicamente significativa di un inquinante. Hopkin identifica quattro possibili approcci per monitorare gli effetti dell'inquinamento sugli ecosistemi: 1) valutare l'impatto sulla struttura della comunità; 2) quantificare gli effetti sulla performance individuale; 3) misurare le concentrazioni dell'inquinante nei tessuti di specie sentinella; 4) rilevare la presenza di razze alterate geneticamente, resistenti agli inquinanti.

Il biomonitoraggio si avvale delle variazioni ecologiche indotte dalle alterazioni dell'ambiente; queste ultime si manifestano in modo più o meno evidente a tre diversi livelli:

- accumulo di sostanze inquinanti negli organismi;
- modificazioni morfologiche e strutturali degli organismi;
- modificazioni nella composizione delle comunità animali e vegetali.

Per gli aspetti microbiologici, si rimanda al volume dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante “Metodi di Analisi Microbiologica del Suolo” approvati e ufficializzati con Decreto n. 010175 dell'8 luglio 2002 dal Ministero delle politiche agricole e forestali.

Le metodiche tossicologiche sono utilizzate per la determinazione e la valutazione degli effetti tossici acuti e cronici esercitati da matrici ambientali contaminate, su organismi o gruppi ad esse esposte.

La tossicità viene di solito ricercata su matrici liquide che possono essere costituite da campioni di acque oppure da eluati o elutriati di matrici solide. L'utilizzo di organismi viventi in prove di tossicità è codificato in precise metodologie e protocolli applicativi che si rinvergono in normative tecniche nazionali ed internazionali.

3.1 INDIVIDUAZIONE DELLE METODOLOGIE DA UTILIZZARE NELLE PROVE DI TOSSICITÀ

La capacità del suolo di trattenere sostanze contaminanti varia notevolmente in funzione delle proprie caratteristiche (umidità, sostanza organica, contenuto in argilla, ecc.).

Le vie di esposizione degli organismi ai contaminanti presenti nel suolo sono rappresentate prevalentemente dal contatto con l'acqua interstiziale (pore water), dall'ingestione del suolo e della sostanza organica in esso presente, dalla respirazione dell'aria interstiziale.

Per gli organismi dotati di esoscheletro e protetti da una spessa cuticola, come gli artropodi, prevale l'assorbimento orale; per gli organismi privi di esoscheletro, come i lombrichi, prevale l'assorbimento dei contaminanti attraverso la superficie corporea mediato dall'acqua interstiziale. In quest'ultimo caso la tossicità dei contaminanti chimici presenti nel suolo è prevalentemente determinata dalla loro concentrazione nell'acqua interstiziale la quale, a sua

volta, dipende dall'equilibrio di ripartizione dei contaminanti tra la matrice solida e la componente acquosa del suolo (van Straalen e van Gestel, 1993).

I costituenti dei vari tipi di suolo possiedono una gran capacità di trattenere contaminanti ambientali, specialmente quelli costituiti da molecole apolari o da ioni bi-trivalenti carichi positivamente; in conseguenza di ciò il suolo si comporta come una trappola per gli inquinanti e la loro concentrazione è in genere più alta rispetto agli altri comparti ambientali.

Per permettere una stima dei rischi ecologici da dati residui, è necessario conoscere le concentrazioni limite nell'organismo, oltre le quali le funzioni fisiologiche sono irreversibilmente compromesse. La tossicità può essere misurata come LC₅₀ (50% di concentrazione letale, che rappresenta la concentrazione di una sostanza che provoca la mortalità del 50% degli organismi). Può anche essere valutata l'EC₅₀ (50% di concentrazione efficace), diversa dall'LC₅₀ in quanto l'effetto misurato potrebbe non essere la morte.

Nel considerare le prove ecotossicologiche per la valutazione dei contaminanti presenti nei suoli, le specie utilizzate dovrebbero essere selezionate sulla base della loro rappresentatività entro la comunità ecologica presente nel suolo. I criteri da utilizzarsi nel reperire tali specie dovrebbero tener presente la similarità tossicologiche tra specie tassonomicamente vicine. A tale riguardo uno studio condotto su quattro specie di lombrichi (Neuhauser *et al.*, 1986) suggerisce che le correlazioni tra le EC₅₀ delle specie siano assai elevate.

Le determinazioni sulla tossicità dei suoli possono essere condotte sia direttamente sulla matrice solida sia su campioni di estratto acquoso (elutriato). Su questi ultimi possono essere applicate le medesime metodiche di indagine tossicologica delle matrici acquose e, a tale proposito, è auspicabile che quanto prima le prove che coinvolgono gli elutriati, siano standardizzate e recepite nelle normative tecniche ufficiali.

Le prove di tossicità condotte direttamente sulla matrice solida risentono, a differenza delle normali prove di tossicità acquatica, delle interazioni tra il suolo e il componente tossico che esercitano effetti non trascurabili sulla biodisponibilità delle sostanze tossiche (Jacomini *et al.*, 2000).

Riferimenti bibliografici

- Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici, A. Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Stebbing A.R.D. e Widdows J., 1985. *The effects of stress and pollution on marine animals*. Prager Scientific.
- Colborn T., Vom Saal F. e Soto A.M., 1993. *Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans*. Environ. Health Perspec., 101 (5): 378-384.

- Decreto Ministero delle politiche agricole e forestali 8 luglio 2002, n. 156. *Approvazione e ufficializzazione dei Metodi di Analisi Microbiologica del Suolo (Decreto n. 010175)*. Supplemento Ordinario Gazz. Uff. n. 179 del 1° agosto 2002.
- Depledge M., 1989. *The rational basis for detection of the early effects of marine pollutants using physiological indicators*. *Ambio*, 18: 301-302.
- Fossi M.C., 1991. *L'utilizzo dei "Biomarkers" nella valutazione del rischio ambientale: metodologie ed applicazione*. *Inquinamento*, 12, 44-50.
- Fossi M.C., 1994. *Nondestructive biomarkers in ecotoxicology*. *Environ. Health Perspect.*, 102, (12): 49-54.
- Fossi M.C. e Leonzio C., 1994. *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, CRC Press, United States. pp. 345.
- Jacomini C., Nappi P., 2000. *Indicatori biologici ed ecotossicologici per valutare la qualità dei suoli: l'esperienza del Centro Tematico Nazionale ANPA/ARPA sul suolo e siti contaminati*. Convegno Nazionale di ecotossicologia. Torino 7 luglio 2000.
- Hopkin S.P., 1993. *In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems*. In: P. Calow (Ed.), *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 397-427.
- Maffiotti A. e Bona F., 1997. Introduzione all'ecotossicologia. In: F. Bona, A. Maffiotti e L. Volterra. *Analisi e recupero dei sedimenti marini. Quaderni di tecniche di protezione ambientale*. Pitagora Editrice Bologna. 139 pp.
- McCarthy F. e Shugart L. R., 1990. *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Pub., Chelsea USA.
- Neuhauser E.F., Durkin P.R., Malecki M.R., Anatra M., 1986. *Comparative toxicity of ten organic chemicals to four m species*. *Comp. Biochem. Physiol.* , 83C:197-200.
- NRC, 1989. *Biologic markers in reproductive toxicology*. National Academy Press. Washington, D.C.
- van Straalen N.M. e van Gestel C.A.M. 1993. Soil invertebrates and Microorganisms. In P. Calow (Ed.). *Handbook of ecotoxicology*. Blackwell Scientific Publications, pp.251-277.

3.2 CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Criteri Generali

I criteri generali proposti fanno riferimento al D.M. 25/10/1999, n. 471: Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del D.Lgs. 5 febbraio 1997, n. 22, e successive modificazioni e integrazioni.

Un campione di suolo è quella quantità di terra che si preleva allo scopo di raccogliere informazioni su un suolo, o su una porzione di esso. Il campione di suolo deve essere rappresentativo e deve essere in grado di contenere tutta l'informazione sul suolo di origine: deve essere la parte di un tutto. Questo presuppone che ci sia omogeneità nell'intero suolo. In presenza di disomogeneità o di eterogeneità, il numero di campioni deve essere tale da rappresentare tutte le parti che compongono il suolo stesso.

Nel caso si tratti di un sito potenzialmente inquinato, il campionamento deve garantire l'individuazione, tra tutte le possibili fonti presenti nel sito, di quelle che hanno effettivamente determinato la situazione di inquinamento. Particolare attenzione deve essere rivolta a definire quali attività svolte sul sito possono aver determinato incidenti, sversamenti, accumuli, perdite di sostanze inquinanti, ecc.

Prima di procedere al campionamento, occorre definire:

- ubicazione e tipologia delle indagini da svolgere e caratteristiche tecniche degli strumenti da utilizzare;
- piano di campionamento del suolo;
- profondità da raggiungere;
- il piano di analisi chimico-fisiche e biologiche e le metodiche analitiche;
- le metodologie di interpretazione e restituzione dei risultati.

Selezione dell'ubicazione dei punti di campionamento

L'ubicazione dei punti di campionamento deve essere stabilita in modo da corrispondere agli obiettivi indicati nei criteri generali.

In particolare, si possono presentare due principali strategie per selezionare l'ubicazione dei punti di sondaggio e prelievo:

1. la scelta è basata sulla caratterizzazione del sito e può essere mirata a verificare le ipotesi formulate sulla presenza di contaminanti o sulle caratteristiche ambientali del sito;
2. la scelta della localizzazione dei punti è effettuata sulla base di un criterio di tipo casuale o statistico, ad esempio campionamento sulla base di una griglia predefinita o casuale; questa scelta è da preferirsi ogni volta che le dimensioni dell'area o la scarsità di informazioni storiche e impiantistiche sul sito non permettano di ottenere una caratterizzazione soddisfacente e di prevedere la localizzazione delle più probabili fonti di contaminazione.

Data la particolare eterogeneità della matrice suolo, il campionamento e le analisi dovranno essere effettuate in modo da fornire un campione rappresentativo della reale concentrazione di una determinata sostanza nell'area e nel volume campionati, e l'evoluzione della concentrazione nel tempo.

Nel caso in cui si proceda con una disposizione a griglia, il lato di ogni maglia potrà variare da 25 a 100 m, secondo il tipo e le dimensioni del sito oggetto di indagine. I punti di indagine possono essere localizzati in corrispondenza dei nodi della griglia (ubicazione sistematica) oppure all'interno di ogni maglia in posizione opportuna (ubicazione sistematica casuale), oppure posizionati casualmente all'interno delle maglie della griglia a seconda dei dati conoscitivi ottenuti dalla fase di indagine preliminare o della situazione logistica (presenza di infrastrutture, ecc.).

Sulla base delle dimensioni del sito da investigare si possono fornire le seguenti indicazioni sul numero dei punti di campionamento:

<10.000 m ²	circa 5 punti
10.000 – 50.000 m ²	da 5 a 15 punti
50.000 – 250.000 m ²	da 15 a 60 punti
250.000 – 500.000 m ²	da 60 a 120 punti
>500.000 m ²	circa 2 punti ogni 10.000 m ²

Tali indicazioni devono però essere valutate in funzione della tipologia e delle caratteristiche del sito e della contaminazione.

La profondità del prelievo varia con la necessità di caratterizzare l'area, di individuare la profondità dell'inquinamento, ove presente, la variabilità orizzontale e verticale della possibile contaminazione e deve essere definita in fase di stesura del piano di investigazione iniziale o di dettaglio. In linea di massima si consiglia di eliminare la cotica erbosa, se presente, e i primi 2-4 centimetri di terreno e di prelevare il terreno sottostante fino ad una profondità di 30-40 cm. La tipologia dei prelievi potrà essere modificata e integrata sulla base delle osservazioni effettuate in sede di campionamento e dell'omogeneità idrogeologica degli strati attraversati.

Campioni del fondo naturale

I campioni prelevati da aree adiacenti il sito, nelle quali si abbia la certezza di assenza di contaminazione derivante dal sito e da altre attività antropiche, sono definiti campioni del fondo naturale. La profondità e il tipo di terreno da campionare dovrebbero corrispondere a quelli dei campioni raccolti nel sito.

Il numero dei campioni varia in funzione delle caratteristiche generali e idrogeologiche dell'area; in ogni caso, si consiglia un numero non inferiore a tre campioni prelevati nelle vicinanze del sito.

Modalità di prelievo, conservazione e trasporto dei campioni

La qualità dei risultati delle analisi può essere fortemente compromessa da una esecuzione non corretta delle fasi di campionamento, immagazzinamento, trasporto e conservazione dei campioni, occorre quindi che ognuna di queste fasi sia sottoposta ad un controllo di qualità mirato a garantire:

- l'assenza di contaminazione derivante dall'ambiente circostante o dagli strumenti impiegati per il campionamento e il prelievo;
- l'assenza di perdite di sostanze inquinanti sulle pareti dei campionatori o dei contenitori;
- la protezione del campione da contaminazione derivante da cessione dei contenitori;
- un'adeguata temperatura al momento del prelievo per evitare la dispersione delle sostanze volatili;
- un'adeguata temperatura di conservazione dei campioni;
- l'assenza di alterazioni biologiche nel corso dell'immagazzinamento e conservazione;
- l'assenza in qualunque fase di modificazioni chimico-fisiche delle sostanze;
- la pulizia degli strumenti e attrezzi usati per il campionamento, il prelievo, il trasporto e la conservazione.

La pulizia delle attrezzature deve essere eseguita con mezzi o solventi compatibili con i materiali e le sostanze di interesse, in modo da evitare fenomeni di contaminazione incrociata o perdita di rappresentatività del campione.

L'eventuale selezione e scarto di materiali non omogenei nella matrice da analizzare potrà avvenire solo in laboratorio, dopo aver accertato che il materiale da vagliare non contribuisca alla contaminazione.

La scelta del contenitore in cui riporre il campione va effettuata in funzione delle caratteristiche dell'inquinante, in modo da garantire la minore interazione tra le sostanze inquinanti e le pareti del contenitore. Nei casi di inquinanti organici sono da utilizzarsi contenitori in vetro o in teflon, a chiusura ermetica; per i campioni destinati alla ricerca di metalli possono essere impiegati anche contenitori in polietilene. I contenitori devono essere completamente riempiti di campione, sigillati, etichettati e inoltrati subito al laboratorio di analisi, insieme alle note di prelievo. Nel caso siano da determinare inquinanti facilmente degradabili e volatili e la consegna dei campioni ai laboratori di analisi non possa avvenire in tempi brevi, si dovrà procedere alla conservazione dei campioni stessi in ambiente refrigerato. In subordine, sarà da considerare l'aggiunta di sostanze conservanti, che non interferiscano con le analisi.

Preparazione del campione

Mescolare accuratamente il campione per ottenere una buona omogeneizzazione.

Determinazione della granulometria

Un'aliquota di campione deve essere sottoposta ad esame granulometrico. Per le prove di tossicità e le altre determinazioni riportate di seguito, occorre utilizzare soltanto un'aliquota di campione corrispondente alla frazione granulometrica inferiore o uguale a 2 mm.

Determinazione dell'umidità

Un'aliquota di campione corrispondente alla frazione granulometrica inferiore o uguale a 2 mm deve essere destinata alla determinazione dell'umidità.

La determinazione gravimetrica del contenuto di umidità si ottiene con la seguente procedura, ricavata dal metodo ufficiale del Ministero delle politiche agrarie e forestali:

- essiccare una capsula di quarzo in stufa termostata a $105^{\circ}\text{C} \pm 2$ per circa 2 ore;
- pesare la tara della capsula dopo raffreddamento in essiccatore;
- pesare circa 20 g di suolo setacciato nella capsula di quarzo;
- tenere per almeno 16 ore (consigliate 24) la capsula con il campione in stufa termostata a $105^{\circ}\text{C} \pm 2$;
- dopo raffreddamento in essiccatore pesare la capsula con precisione di 1 mg;
- esprimere i risultati in percentuale.

Riferimenti bibliografici

Decreto Ministeriale 25 ottobre 1999, n. 471. *Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del D.Lgs. 5 febbraio 1997, n. 22, e successive modificazioni e integrazioni.* Gazzetta Ufficiale 15 dicembre 1999, n. 293, S.O.

Metodi di analisi chimiche del suolo. 21 ottobre 1999. *Determinazione gravimetrica del contenuto di umidità.* Metodo ufficiale n.II.2. Supplemento Ordinario G. U. n. 248 del 21.10.1999.

3.3 DETERMINAZIONI SULLA MATRICE LIQUIDA

Le determinazioni per valutare la tossicità dei suoli possono essere condotte sia direttamente sulla matrice solida sia su campioni di estratto acquoso.

L'estratto acquoso dei suoli si ottiene mediante la preparazione dell'elutriato.

L'utilizzo dell'elutriato nasce dalle seguenti considerazioni:

- l'importanza della fase acquosa all'interno della matrice suolo nella produzione dell'effetto tossico;
- l'importanza della matrice acqua come sistema di trasporto delle sostanze tossiche presenti nel suolo verso gli altri comparti ambientali;
- la prevalente diffusione delle prove di tossicità su matrice acquosa nelle strutture adibite ai controlli ambientali in ambito nazionale.

3.3.1 Preparazione dell'elutriato

Le prove di tossicità su elutriato, ottenuto dal campione in esame mediante la procedura di seguito riportata, sono prevalentemente rivolte a evidenziare la presenza e la biodisponibilità di contaminanti inorganici e microinquinanti metallici idrosolubili. Si riporta uno schema di preparazione dell'elutriato utilizzando la metodica US-EPA (1991) parzialmente modificata per poterla adattare alla realtà italiana.

Preparare l'elutriato nel più breve tempo possibile dal momento del prelievo.

L'elutriato è preparato con acqua distillata. Allo scopo si esegue una diluizione del campione di sedimento con 3 parti di acqua distillata (diluizione 1:4 p/v). Se l'acqua viene completamente assorbita dalla matrice solida, e non è possibile procedere alla successiva separazione della componente liquida, è prevista l'aggiunta di ulteriori parti di acqua, tenendo presente che, incrementando la diluizione del campione, verrà ridotta la capacità di rilevare eventuali effetti tossici. È comunque opportuno non superare il rapporto 1:10 p/v. Il peso del materiale utilizzato per la preparazione dell'elutriato deve essere registrato.

Il campione è sottoposto ad agitazione continua mediante agitatore magnetico per 30 minuti.

Si lascia sedimentare il campione per 24 ore e, successivamente, si separa la fase liquida (elutriato) dalla matrice solida per aspirazione avendo cura di non riportare in sospensione il particolato superficiale. L'elutriato è pronto per le prove di laboratorio.

Se, dopo le 18-24 ore di decantazione, la fase liquida contiene ancora una quantità di particolato in sospensione, tale da ostacolare l'esecuzione delle prove di tossicità, è necessario procedere alla separazione della fase liquida mediante centrifugazione o filtrazione. Le operazioni di centrifugazione e filtrazione possono ridurre la tossicità del campione.

Preparazione dell'elutriato mediante sonicazione: le metodologie prevedono la sonicazione con sonotrodo (maggiore capacità di estrazione) o con bagno ad ultrasuoni. Il laboratorio che effettuerà l'estrazione utilizzerà l'apparecchiatura a disposizione, tenendo conto delle differenti rese.

Sonicazione mediante sonotrodo (Liu *et al.*, 1996).

- Pesare 3 g di sedimento filtrato in provette da centrifuga da 50 mL, prevedendo un numero di aliquote adeguato alla quantità di materiale necessario alla successiva esecuzione dei saggi;
 - aggiungere in ogni provette 0,3 mL di soluzione di sodio lignin-sulfonato al 5%;
 - aggiungere in ogni provetta 30 mL di acqua di acqua distillata;
 - agitare;
 - mediante processore ultrasonico (UP 200 S) sonicare ogni provetta per 2 minuti con sonotrodo S3 (caratteristiche: max immersione 90 mm, diametro 3 mm, max ampiezza 210 µm, max densità potenza sonora 460 W/cm) ad impulsi continui e potenza sonora al 70% (*amplitude* 70%);
 - separare il surnatante mediante centrifugazione a 4000 g per 10 minuti.
- Il surnatante è pronto per le prove di tossicità.

Sonicazione mediante bagno ad ultrasuoni (IRSA, 1990; US-EPA, 1991)

- Pesare circa 25 g (peso secco) di sedimento e disporre in beuta da 250 mL;
 - diluire 1:4 p/v con acqua distillata e coprire;
 - disporre nel bagno ad ultrasuoni e sonicare per 60 minuti;
 - controllare che la temperatura del bagno non superi i 50°C;
 - lasciare a riposo a temperatura ambiente per 24 ore;
 - sonicare per altri 60 minuti a temperatura non superiore a 50°C;
 - separare il surnatante mediante filtrazione o centrifugazione a 4000 g per 10 minuti.
- Il surnatante è pronto per le prove di tossicità.

Determinazione delle principali caratteristiche chimiche e chimico-fisiche degli elutriati

Profilo chimico dell'acqua da utilizzare per la preparazione dell'elutriato

L'acqua distillata utilizzata per la preparazione dell'elutriato deve essere sottoposta alle seguenti prove:

- pH
- cloruri e/o conducibilità
- colore

Sono consigliate, inoltre le seguenti determinazioni:

- durezza
- azoto ammoniacale
- azoto nitrico
- azoto nitroso
- fosfati

Profilo chimico dell'elutriato

L'elutriato deve essere sottoposto alle seguenti prove

- pH
- cloruri e/o conducibilità
- colore

Sono consigliate, inoltre le seguenti determinazioni:

- durezza
- azoto ammoniacale
- azoto nitrico
- azoto nitroso
- fosfati
- ossigeno disciolto (facoltativo)

In particolare:

- Determinazione del pH. Se il pH dell'elutriato risulta non compreso nell'intervallo di pH raccomandato dalla procedura della prova di tossicità è necessario condurre una prova di tossicità parallela con pH considerato compatibile con la sopravvivenza degli organismi utilizzati.
- Determinazione della salinità. Il contenuto salino dell'elutriato deve essere compreso entro i limiti di tollerabilità degli organismi utilizzati. Per elutriati contenenti salinità superiori a 1.000 mg/L è necessario utilizzare organismi adatti alla vita in ambienti salmastri o marini.
- Determinazione dell'ossigeno disciolto. Alcune prove di tossicità richiedono di aerare il campione al fine di assicurare una percentuale di ossigeno disciolto ottimale alla sopravvivenza degli organismi utilizzati.

Modalità di utilizzo dei saggi ecotossicologici

È corretto individuare una batteria di saggi ecotossicologici per verificare la tossicità ad ampio spettro.

Le prove da utilizzare dovrebbero essere prescelte tra i metodi ufficiali e accreditati in ambito nazionale o internazionale e riguardare almeno tre livelli trofici e i diversi livelli ecotossicologici.

Per la totalità dei saggi di tossicità gli endpoint misurati sono la concentrazione di effetto mediano EC_{50} e le Unità Tossiche UT (secondo il concetto di Sprague e Ramsay $100/EC_{50}$); per i saggi di tossicità cronica si potrà determinare anche la NOEC e le relative Unità Tossiche di tipo cronico UT_c ($100/NOEC$).

Poiché la determinazione della tossicità dell'elutriato è legata alla tossicità della matrice solida si ritiene opportuno proporre un sistema di calcolo in grado di riferire l'effetto tossico alla matrice solida originaria.

Tenendo presente che l'effetto tossico dipende, in definitiva, dalla concentrazione delle sostanze presenti in soluzione, il valore di EC_{50} o della NOEC potrà essere riferito alla concentrazione della sostanza solida secca ottenuta con la preparazione dell'elutriato; come unità di misura di riferimento potranno essere utilizzati valori espressi in g/L. Le Unità Tossiche acute

potranno essere espresse come $1/EC_{50}$ e le Unità Tossiche croniche potranno essere espresse come $1/NOEC$.

Riferimenti bibliografici

- IRSA, 1990. Metodi analitici per i fanghi. Vol. 3 Parametri chimico-fisici. *Quad. Ist. Ric. Acque*, n.64.
- Liu D., Aoyama, I., Okamura H., Dutka B.J. 1996. *Enhancement of Toxicant Release from Sediment by Sonication and Sodium Ligninsulfonate*. Environmental Toxicology and Water Quality, vol.11, 195-203.
- Sprague J.B., and Ramsay B.A. 1965. *Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon*. J.Fish Res. Board.Con. 22. 425-432.
- US-EPA, 1991. *Evaluation of Dredged Material Proposed for Ocean Disposal*, n. 503/8-91/001.
- Van Hoof P. & Hsieh J. L., 1996. *Extraction and cleanup of sediments for semivolatile organics following the internal standard method*. US-EPA, Standard Operating Procedure GLERL – NOAA – M-401 –01.

3.3.2 Saggio di tossicità con *Vibrio fischeri*

Principio del metodo

Viene valutata la tossicità acuta di un campione acquoso, tal quale o diluito, verificando, mediante luminometro, l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa da una popolazione monospecifica di cellule di batteri Gram-negativi appartenenti alla specie *Vibrio fischeri*, dopo un tempo di contatto di 15 e 30 minuti con il campione in esame, tal quale o diluito.

Il metodo consente la verifica della tossicità di campioni acquosi, esprimendo i risultati come inibizione percentuale (I%) e/o come concentrazione efficace ad indurre un'inibizione della bioluminescenza pari al 50% (EC₅₀).

Il metodo si applica a matrici acquose e ad estratti acquosi di matrici solide.

Materiali, reagenti e apparecchiature

- Luminometro con cella di misura termostata a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ e blocco termostatico a $15 \pm 1^\circ\text{C}$;
- congelatore a temperatura inferiore a -18°C ;
- micropipette (da 50 μL a 2.000 μL);
- pipette graduate tarate (1-2-5-10 mL);
- cuvette di misura, adatte al luminometro in uso, di materiale chimicamente inerte;
- cuvette di misura a doppia camera, adatte al luminometro in uso, di materiale chimicamente inerte;
- ceppo batterico: *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, disponibile commercialmente allo stato liofilo e congelato;
- soluzione ricostituente tale da garantire una concentrazione salina finale della sospensione batterica del 2% (sotto forma di NaCl);
- soluzione diluente/controllo: soluzione di NaCl al 2% in acqua distillata o ultrapura;
- pipette Pasteur;
- 3,5-diclorofenolo ($\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$);
- solfato di zinco eptaidrato ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$);
- cloruro di sodio (NaCl) di grado analitico;
- acqua distillata o ultrapura (acqua con una conducibilità inferiore a $1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Conservazione e preparazione del campione

Conservare il campione a $4^\circ\text{C} \pm 3$ per non più di 72 ore dal prelievo.

Effettuare la correzione osmotica del campione solubilizzando in un'aliquota di esso una quantità di NaCl pari al $2 \pm 0,2 \%$.

Procedimento

Riattivazione e preparazione della sospensione batterica

I ceppi batterici, preparati commercialmente, devono essere riattivati prima dell'uso, con la soluzione ricostituente (1 mL per i ceppi utilizzati con il sistema Microtox; 1,2 mL per i ceppi utilizzati con il sistema Lumistox).

Preparazione della sospensione batterica d'uso per il saggio preliminare e definitivo:

- ceppi batterici del sistema Microtox: la sospensione batterica riattivata deve essere diluita 1:5 con la soluzione diluente;
- ceppi batterici del sistema Lumistox: non sono necessarie ulteriori diluizioni.

La sospensione batterica deve essere utilizzata nell'intervallo temporale 15 minuti - 5 ore e conservata alla temperatura di 4 ± 3 °C.

Nota: I ceppi batterici ricostituiti possono essere ricongelati e utilizzati successivamente solo per l'esecuzione del saggio preliminare.

Determinazione dell'inibizione percentuale (I%) - saggio preliminare

Esecuzione del saggio

Al fine di conoscere l' I% indotta dal campione in esame ed il suo grado di tossicità lo si saggia al 100%, secondo il seguente schema:

- incubare la sospensione batterica per 15 minuti a 15 ± 1 °C;
- preparare una serie di cuvette con 1-3 mL di soluzione di controllo e delle due concentrazioni dei campioni in esame;
- preparare una cuvetta con la sostanza di riferimento (3,5-diclorofenolo alla concentrazione di 6 mg/L), per la validazione del saggio;
- incubare 15 minuti a 15 ± 1 °C;
- porre a contatto 50 µL di sospensione batterica con 1 mL della soluzione di controllo e di campione;
- incubare per 15 e/o 30 minuti a 15 ± 1 °C;
- effettuare la lettura della luminescenza emessa.

Determinazione dell'inibizione percentuale (I %)

La percentuale di inibizione della luminescenza (I %) viene calcolata secondo la formula:

$$I \% = \frac{I_b - I_c}{I_b} \times 100$$

Dove

I c = luminosità del campione

I b = luminosità della soluzione di controllo

Interpretazione dei dati

Se l'inibizione percentuale del campione tal quale è $\geq 50\%$ si procede alla esecuzione del saggio definitivo.

Determinazione dell' EC_{50} - saggio definitivo

Il saggio viene effettuato sul campione tal quale o diluito al 50% e almeno su tre diluizioni successive.

La soluzione di controllo e le differenti concentrazioni del campione devono essere saggate in duplicato, secondo il seguente schema:

- preparare nel blocco termostatico una serie di cuvette con 2,5-3 mL di soluzione di controllo e delle differenti concentrazioni dei campioni in esame;
- incubare per almeno 15 minuti a $15 \pm 1^\circ\text{C}$;
- predisporre due cuvette vuote per ciascuna soluzione da testare (soluzione di controllo e campione alle differenti concentrazioni) e trasferirvi 50 μL di sospensione batterica precedentemente preparata
- incubare per almeno 15 minuti a $15 \pm 1^\circ\text{C}$;
- sequenzialmente effettuare per ciascuna cuvetta la lettura della luminescenza emessa al tempo 0 (I_0) e porre immediatamente in contatto le sospensioni batteriche con 1 mL delle soluzioni da testare;
- dopo 15 e/o 30 minuti di incubazione a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ effettuare per ciascuna cuvetta la lettura della luminescenza emessa (I_t).

Calcolo della EC_{50}

- Calcolare il fattore di correzione (f_{kt}) usando la seguente equazione:

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0}$$

dove I_{kt} è uguale a I_t della soluzione di controllo ed I_0 è l'intensità luminosa prima dell'aggiunta della stessa soluzione.

- Calcolare la media dei fattori di correzione per le due repliche del controllo e correggere il valore di I_0 di ciascuna cuvetta usando la seguente formula:

$$I_{ct} = I_0 \cdot f_{kt}$$

- Calcolare l'inibizione percentuale (H_t) per ciascuna diluizione del campione come segue:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} \cdot 100$$

- Calcolare la media della inibizione percentuale delle repliche di ciascuna concentrazione.
- Trasformare i valori medi di inibizione percentuale (H_{tm}) in valori gamma (Γ_t) utilizzando la seguente formula:

$$\Gamma_t = \frac{H_{tm}}{100 - H_{tm}}$$

- tale calcolo non è effettuabile per valori di H_{tm} pari a 0% e 100%.
- Mettere in relazione i valori Γ_t con le concentrazioni di campione analizzate (ct) secondo l'equazione:

$$\log ct = b \log \Gamma_t + \log a$$

dove b rappresenta la pendenza della curva di tossicità e $\log a$ l'intercetta con l'asse delle ordinate.

I valori di EC_{50} con i relativi limiti di confidenza vengono calcolati con il metodo statistico dei minimi quadrati e corrispondono a valori di Γ_t pari a 1.

Espressione dei risultati

I risultati dei saggi possono essere espressi come valori di I% e/o EC_{50} .

Il parametro EC_{50} viene approssimato alla prima cifra decimale e il campo di prova risulta compreso tra 0,1 e 100,0.

Il parametro I% viene approssimato alla prima cifra decimale e il campo di prova risulta compreso tra 0,0 e 100,0.

Può essere espresso un giudizio di tossicità del campione come indicato nella tabella seguente:

Inibizione percentuale - I % (riferita al campione tal quale)	EC_{50}	Giudizio
< 20%		Assenza di tossicità acuta
≥ 20% < 50%		Debolmente tossico
≥ 50%	100-10	Tossico
> 50%	< 10-1	Molto tossico
> 50%	< 1	Estremamente tossico

Validazione dei saggi

Per ogni sospensione batterica, si procede alla validazione dei saggi mediante verifica dell'effetto di inibizione della bioluminescenza a 15 minuti, indotta da una soluzione di 3,5-diclorofenolo alla concentrazione finale in cuvetta di 6 mg/L.

Ogni saggio si ritiene validato quando a 15 minuti la percentuale di inibizione della bioluminescenza, indotta dalla soluzione di 3,5-diclorofenolo alla concentrazione di 6 mg/L, risulta $\geq 50 \%$

Il fattore di correzione f_{kt} deve essere compreso fra 0,7 e 1,4.

Le percentuali di inibizione fra le repliche non devono variare dal loro valore medio di ± 3 .

Le curve di regressione lineare sono considerate accettabili se presentano $r^2 > 0.9$.

Validazione lotti dei batteri bioluminescenti

Soluzione di riferimento di 3,5-diclorofenolo

Preparare una soluzione di 3,5-diclorofenolo alla concentrazione di 12 mg/L in una soluzione di NaCl al 2% in acqua distillata o ultrapura.

A partire da questa soluzione, allestire successive diluizioni ed effettuare la determinazione della EC_{50} con saggio definitivo.

Soluzione di riferimento di $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ espressa come Zn^{II}

Preparare una soluzione di $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ alla concentrazione di 10 mg/L, espresso come Zn^{II} in una soluzione di NaCl al 2% in acqua distillata o ultrapura.

A partire da questa soluzione, allestire successive diluizioni ed effettuare la determinazione della EC_{50} con saggio definitivo.

Criteri di validazione

Il valore di EC_{50} a 15 minuti deve essere inferiore a 6 mg/L 3,5-diclorofenolo.

Il valore di EC_{50} a 15 minuti deve essere inferiore a 3 mg/L Zn^{II} .

APPENDICE: Interferenza di colore e/o torbidità sulla bioluminescenza

Nel caso in cui la EC_{50} sia calcolata su campioni torbidi o colorati, è opportuno valutare l'interferenza del colore e/o della torbidità sulla bioluminescenza, mediante cuvetta a doppia camera e/o correzione strumentale automatica.

Se viene utilizzata la cuvetta a doppia camera, si procede secondo il seguente schema:

- utilizzare una diluizione del campione ($C_{\approx EC_{50}}$) prossima alla EC_{50} precedentemente determinata, mantenendola a $15 \pm 1^\circ C$;

- porre nella camera esterna 1 mL della soluzione di controllo;
- porre nella camera interna della cuvetta, mediante pipetta Pasteur, la sospensione batterica raggiungendo lo stesso livello della soluzione di controllo;
- incubare almeno 15 minuti a $15 \pm 1^\circ\text{C}$;
- mantenere la posizione della cuvetta invariata durante tutte le successive misurazioni;
- misurare la luminescenza emessa dai batteri (B_0);
- sostituire nella camera esterna la soluzione di controllo con 1 mL del campione da saggiare;
- misurare la luminescenza batterica (I_5) dopo 5 minuti dalla lettura di B_0 ;
- con una pipetta Pasteur sostituire nella camera esterna il campione con 1 mL di soluzione di controllo;
- dopo altri 5 minuti, effettuare la lettura della luminescenza batterica (B_{10});
- si considerano significative le inibizioni della luminescenza superiori al 10%, mentre inibizioni superiori al 50% impediscono una corretta elaborazione dei risultati.

Calcolo in accordo alla legge di Lambert-Beer:

- calcolare B_5 :

$$B_5 = \frac{B_0 - B_{10}}{2}$$

- calcolare la percentuale di inibizione della luminescenza ($I\%$) secondo la seguente formula.

$$I\% = \frac{B_5 - I_5}{B_5} \cdot 100$$

- procedere nel calcolo se l'inibizione della luminescenza ($I\%$) è compresa tra 10 e 50;
- calcolare l'assorbanza A_c alla concentrazione (C) di campione di cui si debba correggere il valore Γ ,

$$A_c = \frac{C}{C_{\approx EC50}} \cdot 3,1 \cdot \ln \frac{B_5}{I_5}$$

dove

$C_{\approx EC50}$ è la concentrazione saggiata del campione,

C è ogni concentrazione da correggere,

k è una costante empiricamente derivata ($k = 3,1$) applicabile sia per Microtox sia per Lumistox;

- calcolare la corrispondente trasmittanza (T_c) per ogni concentrazione C

$$\Gamma_c = \frac{1 - e^{-A_c}}{A_c}$$

- calcolare il valore Γ_c corretto per ogni concentrazione_[CJ1]

$$\Gamma_c = \Gamma_c (1 + \Gamma) - 1$$

dove:

Γ è il valore Γ_c non corretto per ciascuna concentrazione;

- ricalcolare i risultati del saggio utilizzando i valori di Γ_c corretti.

Riferimenti bibliografici

- Arpa Piemonte, 2000. *Valutazione della tossicità acuta con Vibrio fischeri*. Metodo interno.
- IRSA, 1996. *Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti*. IRSA-CNR, Notiziario dei metodi analitici. Roma. IRSA-CNR, ISSN: 0392-1425 1996 Pp.1-8.
- ISO 11348-1,1998. *Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) -- Part 1: Method using freshly prepared bacteria*.
- ISO 11348-2, 1998. *Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) -- Part 2: Method using liquid-dried bacteria*.
- ISO 11348-3, 1998. *Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria*.
- Microbics, 1989. *A Microtox™ manual. How to run toxicity tests using the Microtox™ Model 500*. Microbics Corp., Carlsbad, California. Pp.41.
- US-EPA, 1991. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving Waters to freshwater and marine organisms* (fourth edition). Environmental Monitoring Systems Laboratory. Cincinnati, Ohio. US-EPA-600/4-90-027.

3.3.3 Saggio di tossicità con *Daphnia magna*

Principio del metodo

Il metodo consente di determinare l'inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Viene valutata la concentrazione del campione che immobilizza il 50% degli organismi testati dopo 24 h ed eventualmente dopo 48 h (EC₅₀ 24 h; EC₅₀ 48 h).

Il metodo si applica a matrici acquose (effluenti industriali ed urbani, acque di superficie e sotterranee) e ad estratti acquosi di matrici solide (suoli, sedimenti).

Conservazione e preparazione del campione

- Il saggio di tossicità deve essere eseguito nel più breve tempo possibile, entro le 6 h che seguono il prelievamento. Se questi tempi non possono essere rispettati raffreddare il campione a $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$ dal momento del prelievo e analizzare il campione nelle 48 h seguenti;
- nel caso in cui il saggio non possa essere iniziato entro le 48 h dal prelievo il campione deve essere congelato e può essere testato nei due mesi successivi al campionamento;
- si preleva un'aliquota di circa 150 mL;
- nel caso siano presenti solidi galleggianti, si effettua una filtrazione dell'aliquota, mediante setaccio a maglie di 1 mm circa.

Materiali, reagenti e apparecchiature

- Cristallizzatori in vetro borosilicato;
- recipienti da 50 o 100 mL in vetro borosilicato o plastiche fluorurate;
- pipette graduate in vetro o in plastica "monouso" da 1, 2, 5, 10, 25 mL;
- pipette in vetro con diametro interno da 3 a 5 mm provvisti di tettarelle;
- cilindri in vetro da 50-250-500 mL;
- beute in vetro da 1-2-3 L;
- tubo in plastica;
- tappi in gomma per beute con due fori;
- reagenti chimici per la preparazione del mezzo di coltura per alghe e per l'acqua di allevamento/diluizione;
- termometro per la misurazione della temperatura ambientale;
- sistema di illuminazione tale da consentire al piano di lavoro una luminosità di circa 1.000 lux e 4.000 lux;
- sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito di $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- temporizzatore per la regolazione del fotoperiodo;
- luxmetro;
- pHmetro;
- ossimetro;
- setaccio a maglie di circa 1 mm per la separazione di materiale in sospensione nel campione;

- setacci con maglie di dimensioni idonee per la separazione di individui adulti e neonati;
- sistema di aerazione a bassa portata di pressione dotati di diffusori a pietre porose;
- sistema di conteggio di particelle: microscopio e camera di Bürker o contatore automatico di particelle.

Acqua di diluizione

I reattivi di qualità analitica nota, vanno disciolti in acqua idonea, che può essere: acqua sotterranea, acqua distillata o acqua deionizzata di purezza almeno equivalente e di conducibilità al massimo pari a 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Le acque naturali con pH e caratteristiche di durezza simili all'acqua di diluizione possono essere utilizzate per le colture.

Nel caso in cui si disponga di acque naturali con conducibilità seppur bassa, ma superiore ai 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ esse devono venire opportunamente diluite con acqua deionizzata al fine di soddisfare i requisiti richiesti di conducibilità.

Esempio di preparazione dell'acqua di diluizione.

Preparazione delle 4 soluzioni madre:

1. pesare 11,76 g di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e portare a volume di 1 L di acqua idonea;
2. pesare 4,93 g di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e portare a volume di 1 L di acqua idonea;
3. pesare 2,59 g di NaHCO_3 e portare a volume di 1 L di acqua idonea;
4. pesare 0,23 g di KCl e portare a volume di 1 L di acqua idonea.

Prelevare 25 mL da ciascuna delle 4 soluzioni madre e portare a volume totale di 1 L con acqua idonea.

Sottoporre l'acqua di diluizione ad aerazione per 24 ore circa o comunque fino a che il tenore di ossigeno disciolto abbia raggiunto la saturazione con l'aria ed il pH si sia stabilizzato.

Se necessario aggiustare il pH a $7,8 \pm 0,2$ con l'impiego di soluzioni di NaOH o HCl.

L'acqua di diluizione così preparata non deve essere più aerata prima dell'utilizzo e deve rispondere ai seguenti requisiti:

- pH $7,8 \pm 0,2$;
- durezza totale $250 \text{ mg/L} \pm 25 \text{ mg/L}$ (espressa come CaCO_3);
- rapporto molare Ca/Mg prossimo a 4:1;
- concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 7 mg/L.

Conservare a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ per 15 giorni.

Organismi per i saggi

Per i saggi vengono utilizzati neonati di *Daphnia magna* Straus, di età inferiore alle 24 ore (dafnidi), corrispondenti almeno alla terza generazione (neonati da madri di almeno 21 giorni). Prima dell'allestimento del saggio è necessario trasferire un numero adeguato di femmine partorienti (4-5 mm di lunghezza

corporea e riconoscibili per il colore aranciato delle uova presenti nella camera di incubazione) in recipienti contenenti acqua di diluizione o allevamento.

Utilizzo del kit

In alternativa ai dafnidi provenienti dall'allevamento, per il saggio di tossicità acuta si possono utilizzare giovani Daphnie provenienti da forme criptobiotiche *DaphtoxKit F magna* secondo quanto riportato in Appendice 2.

Procedimento

Saggio preliminare

Viene effettuato al fine di determinare la gamma di concentrazioni da utilizzare per l'espletamento del saggio definitivo.

Prova di controllo

Predisporre 2 contenitori con 50 mL di acqua di diluizione per ogni serie di campioni.

Esecuzione saggio

Predisporre 2 o 4 contenitori con 50 mL di campione tal quale contenenti ciascuno rispettivamente 10 o 5 dafnidi di età inferiore alle 24 h e, per ogni diluizione del campione, almeno un contenitore con 5 dafnidi in modo tale che il numero totale di *Daphnia magna* per recipiente di prova non sia maggiore di 20, e la densità di *Daphnia magna* per recipiente non sia maggiore di 5 organismi in 10 mL di soluzione. Iniziare dalla prova di controllo e proseguire dalla concentrazione minore alla maggiore. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie del liquido e rilasciando lentamente gli animali poiché è necessario ridurre al minimo il volume di liquido trasferito con le dafnie per evitare una diluizione significativa del campione in esame.

Esporre per circa 24 ore a circa 1.000 lux con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Letture del saggio

Al termine del periodo di esposizione si sottopongono i contenitori a leggera agitazione e si contano gli organismi immobili e mobili: sono ritenuti immobili quelli incapaci di effettuare spostamenti entro 15 sec., anche se riescono ancora a muovere le antenne. Il saggio deve essere ripetuto se nella prova di controllo gli organismi immobili risultano superiori al 10%.

Nel caso in cui sia stato fatto un saggio preliminare con almeno 20 dafnidi per concentrazione di campione testata, e siano soddisfatte le condizioni descritte per la validità dei risultati, è possibile utilizzare i risultati ottenuti per il calcolo della EC_{50}

Saggio definitivo

Quando nel saggio preliminare la percentuale di organismi immobili (I%) del campione tal quale è $\geq 50\%$ viene effettuato il saggio definitivo al fine di valutare la concentrazione che determina l'immobilizzazione del 50% degli

organismi testati dopo 24 h ed eventualmente dopo 48 h (EC_{50} 24 h; EC_{50} 48 h).

E' auspicabile che l'intervallo di concentrazioni scelto fornisca almeno tre percentuali di immobilizzazione comprese tra il 10% e 90%.

Esecuzione e lettura dei saggi

Per ciascuna concentrazione utilizzare un minimo di 20 dafnidi. Predisporre 4 contenitori con 50 mL per ciascuna concentrazione da testare e trasferirvi in ciascuno 5 dafnidi di età inferiore alle 24 h, con le modalità indicate in precedenza.

Per ciascuna serie di saggi effettuare un controllo predisponendo 4 contenitori con 50 mL di acqua di diluizione contenenti ciascuno 5 dafnidi. Leggere i saggi come descritto per il saggio preliminare.

Controllo ossigeno disciolto

Misurare la concentrazione di ossigeno disciolto (UNI EN 25814: 1994) nel recipiente corrispondente alla più debole concentrazione in cui si è osservata la massima inibizione (se necessario riunire in un unico recipiente le aliquote corrispondenti alla concentrazione da testare), operando con le precauzioni necessarie per non modificare la concentrazione di ossigeno disciolto.

Controllo della sensibilità di *Daphnia magna* al dicromato di potassio

Determinare almeno ogni tre mesi la EC_{50} 24 h del dicromato di potassio utilizzando l'acqua di diluizione per verificare la sensibilità di *Daphnia magna*, (esempio di concentrazioni da utilizzare: 3,2 mg/L; 2,7 mg/L; 2,3 mg/L; 1,6 mg/L; 1,0 mg/L; 0,4 mg/L).

La EC_{50} deve essere compresa tra 0,6 mg/L e 2,1 mg/L. Il valore ottenuto va menzionato nel rapporto di prova.

Stima, validazione ed espressione dei risultati

Calcolo della EC_{50}

Al termine del periodo di incubazione, conteggiare per ogni concentrazione il numero di organismi immobili in rapporto al numero totale di dafnie utilizzate. Calcolare la EC_{50} con il metodo statistico di analisi dei probits utilizzando il programma di calcolo Puddu, 1989.

Validità dei risultati

Per considerare validi i risultati, devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

- la percentuale di immobilizzazione delle dafnie nei controlli deve essere < 10%;
- la EC_{50} 24 h del bicromato di potassio deve essere compresa tra 0,6 mg/L e 2,1 mg/L.

Il tenore di ossigeno disciolto alla fine del saggio dovrebbe essere ≥ 2 mg/L; dal momento che il campo di applicazione è limitato alle matrici ambientali, valori inferiori di ossigeno disciolto possono essere essi stessi causa di tossicità per

l'ambiente e quindi vanno segnalati nel rapporto di prova, esprimendo comunque il valore di EC₅₀ ottenuto.

Espressione dei risultati

I risultati dei saggi vengono espressi come EC₅₀ 24 h o 48 h, approssimando i valori percentuali calcolati alla prima cifra decimale.

Campo di prova EC₅₀: valori compresi tra 100 e 0,1. (i valori di EC₅₀ inferiori a 0,1 vengono approssimati a 0,1).

Nella espressione del risultato del parametro EC₅₀ verranno dati come stima dell'incertezza di misura i limiti fiduciarci derivanti dall'analisi dei probits.

Nel rapporto di prova verranno indicati inoltre:

- l'origine e l'età degli allevamenti di *Daphnia magna* (riportare la data corrispondente alla schiusa degli efippi);
- eventuali trattamenti del campione quali filtrazione, congelamento ecc.;
- la sensibilità al bicromato di potassio espressa come EC₅₀ 24 h.

APPENDICE 1: Allevamento di *Daphnia magna*

Acqua di allevamento

Acque naturali con pH di $7,8 \pm 0,2$ e durezza di $250 \text{ mg/L} \pm 25 \text{ mg/L}$ (espressa come CaCO₃) possono essere utilizzate per la coltura.

In alternativa può essere utilizzata l'acqua di diluizione preparata come precedentemente descritto.

Conservare a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ per 15 giorni

Analisi chimiche sull'acqua di allevamento

Per verificare che l'acqua di allevamento risponda ai requisiti richiesti, viene effettuato preventivamente il controllo dei parametri chimici. Tale verifica dovrà venir effettuata ogni qualvolta si apportino dei cambiamenti nella composizione dell'acqua stessa o si evidenzino delle anomalie negli allevamenti.

Condizioni chimico-fisiche

L'allevamento di *Daphnia magna* deve essere mantenuto a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con illuminazione di 1.000 lux circa, con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, con insufflazione di aria mediante diffusori, tale da garantire una concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 7 mg/L.

Allestimento e mantenimento della coltura

È consigliabile allestire l'allevamento secondo le seguenti modalità:

- introdurre in cristallizzatori acqua di allevamento e *Daphnia magna* Straus in quantità tale da avere una densità di adulti non superiore a 100 individui/L;
- aerare e mantenere alle condizioni chimico fisiche citate;
- alimentare con l'alga verde unicellulare *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata* secondo la nuova nomenclatura) e con il lievito *Saccharomyces cerevisiae*. La somministrazione va effettuata in modo da garantire una quantità giornaliera di circa 300.000 cellule/mL

per ciascuno dei due alimenti. La somministrazione può aver luogo a giorni alterni: in questo caso i volumi delle sospensioni cellulari vanno raddoppiati. In caso di torbidità e/o colorazione verde dell'acqua di allevamento, percepibile visivamente, è consigliabile rinviare la somministrazione del cibo;

- l'acqua di allevamento deve essere cambiata due volte alla settimana e giornalmente integrata se necessario; misurare la quantità di ossigeno disciolto in occasione di ogni rinnovo;
- allestire un nuovo allevamento ogni 15 ÷ 20 giorni utilizzando dafnidi appartenenti alla terza generazione (utilizzare dafnidi da madri di almeno 21 giorni) o seguenti al fine di disporre di individui con adeguato contenuto lipidico. Indicare sul cristallizzatore la data di allestimento dell'allevamento;
- registrare sulla scheda relativa all'allevamento le seguenti indicazioni: data di allestimento delle colture, volume dell'acqua di allevamento, numero di individui, valore dell'ossigeno disciolto (bisettimanale), cambio dell'acqua di allevamento e quantità di cibo somministrato.

Coltura e preparazione della sospensione algale

La Cloroficea *Pseudokirchneriella subcapitata* viene allevata in un mezzo di coltura allestito nel seguente modo (Gorbi, 1987):

- preparare 8 soluzioni in acqua bidistillata o ultrapura secondo lo schema:

soluzione 1:	NaNO ₃	25,500	g/L
soluzione 2:	K ₂ HPO ₄	1,044	g/L
soluzione 3:	MgCl ₂	5,700	g/L
soluzione 4:	MgSO ₄ ·7H ₂ O	14,700	g/L
soluzione 5:	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,410	g/L
soluzione 6:	NaHCO ₃	15,000	g/L
soluzione 7:	FeCl ₃	96,000	mg/L
	Na ₂ EDTA·2 H ₂ O	300,000	mg/L
soluzione 8:	H ₃ BO ₃	185,520	mg/L
	Mn Cl ₂	264,260	mg/L
	Zn Cl ₂	32,710	mg/L
	Co Cl ₂	0,780	mg/L
	Cu Cl ₂	0,009	mg/L
	Na ₂ Mo O ₄ ·2 H ₂ O	7,260	mg/L

- filtrare le soluzioni con membrana da 0.2 o 0.45 µm in condizioni asettiche e conservarle a 4 ± 3°C al buio fino a 1 anno.
- prelevare in condizioni asettiche 2 mL delle soluzioni 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 0.2 mL della soluzione 8 e portare al volume finale di 1 L con acqua (di falda, di sorgente, bidistillata o MilliQ).
- inoculare una sospensione di *Pseudokirchneriella subcapitata* in modo da ottenere una densità iniziale di circa 200.000 cellule/mL;

- incubare a 20 ± 2 °C, con illuminazione di circa 4.000 lux, fotoperiodo di 16 ore di luce – 8 di buio e mantenere in agitazione mediante insufflazione di aria per circa 7 giorni;
- separare la biomassa algale dai residui del mezzo colturale mediante centrifugazione (circa 3.000 gpm per 5-10 minuti), scartare il surnatante e risospendere le alghe in acqua di allevamento con durezza ridotta a $30 \div 50$ mg/L di CaCO_3 (ottenuta per miscelazione con acqua bidistillata o ultrapura);
- effettuare una seconda centrifugazione, scartare il surnatante e raccogliere il sedimento algale risospendendo con acqua a durezza ridotta a $30 \div 50$ mg/L di CaCO_3 in modo da ottenere una densità dell'ordine di $10^7 \div 10^8$ cellule/mL;
- verificare la densità cellulare mediante conteggio alla camera di Bürker o con contatore automatico di particelle;
- conservare la sospensione algale al buio a 4 ± 3 °C per un mese.

Sospensione di lievito

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, reperibile in confezioni commercializzate per la panificazione, viene risospeso in acqua di durezza ridotta in modo da ottenere una densità dell'ordine di $10^7 \div 10^8$ cellule/mL.

La densità cellulare è verificata mediante conteggio alla camera di Bürker o contatore automatico di particelle.

Conservare la sospensione di lievito al buio a 4 ± 3 °C per un mese.

Verifica idoneità dell'allevamento di *Daphnia magna*

Tale verifica prevede l'esecuzione di due prove: il controllo dell'idoneità del mezzo di allevamento ed il controllo dell'effetto tossico con dicromato di potassio; effettuare con cadenza semestrale.

Verifica idoneità del mezzo di allevamento

- Introdurre 10 dafnidi di età inferiore alle 24 ore in 500 mL di acqua di allevamento;
- operare secondo le condizioni previste per l'allevamento (temperatura, illuminazione, alimentazione, aerazione e sostituzione del mezzo bisettimanale).
- prolungare il saggio per un periodo corrispondente a 3 schiuse (da 14 a 21 gg).;
- separare giornalmente i neonati e contarli;
- Il numero medio complessivo dei neonati per femmina al termine del saggio deve essere superiore a 20 e prossimo a 60;
- la mortalità relativa alle 10 dafnie utilizzate all'inizio del saggio non deve essere superiore al 20%.

Controllo dell'effetto tossico con bicromato di potassio

- Determinare la EC_{50} 24 h del dicromato di potassio utilizzando l'acqua di diluizione per verificare la sensibilità di *Daphnia magna*, (esempio di concentrazioni da utilizzare: 3,2 mg/L; 2,7 mg/L; 2,3 mg/L; 1,6 mg/L; 1,0 mg/L; 0,4 mg/L);

- calcolare l' EC₅₀ mediante il metodo di analisi dei probits. L'intervallo di accettabilità EC₅₀ 24h per il bicromato di potassio è compreso tra 0.6 ÷ 2.1 mg/L.

APPENDICE 2: Saggio di tossicità acuta con *Daphnia Magna* Strass con *DaphtoxKit F magna*

In alternativa ai daphnidi provenienti dall'allevamento, per il saggio di tossicità acuta si possono utilizzare giovani Daphnie provenienti da forme criptobiotiche *DaphtoxKit F magna* secondo quanto riportato di seguito

Schiusa degli efippi

Prendere una vial di efippi e versarla nel colino in dotazione con il kit; risciacquare diverse volte sotto acqua corrente (con getto non molto forte);

- trasferire gli efippi in una piastra Petri di diametro 100 mm con 50 mL di acqua standard areata aiutandosi, eventualmente, con una spruzzetta o una pipetta per far passare tutti gli efippi contenuti nella vial alla piastra;
- chiudere la piastra e mettere ad incubare a 6.000-8.000 lux di luce continua ed alla temperatura di 21 ± 1 °C;
- attendere la schiusa degli efippi per 72 – 90 ore non superando però questi tempi per l'allestimento del saggio.

Nota: registrare i valori di temperatura e di lux se monitorati durante la schiusa.

Allestimento del saggio

- Preparare la piastra monopozzetto in dotazione con il kit, costituita da 30 pozzetti da 10 mL ciascuno. La riga X è utilizzata per la repliche del controllo; le righe numerate da 1 a 5 sono usate per le diverse diluizioni del campione, partendo dal campione più diluito;
- riempire i 5 pozzetti della riga X, ciascuno con 10 mL di acqua standard e i 5 pozzetti delle righe numerate da 1 a 5, ciascuno con 10 mL delle diluizioni del campione, partendo dal più diluito fino al più concentrato;
- trasferire 20 daphnidi dalla piastra Petri in ciascuno dei pozzetti della prima colonna di sinistra, partendo dalla riga X (controllo) e proseguendo con le righe da 1 a 5; di seguito, si trasferiscono per ogni riga (partendo sempre dalla X) 5 daphnidi in ognuno dei 4 pozzetti rimasti, prelevandoli dal pozzetto di sinistra (per agevolare questa operazione si può collocare un foglio scuro, sotto la piastra, per aumentare il contrasto) evitando di trasferire liquido per non diluire il campione;
- al termine del trasferimento si registra l'ora e si colloca sopra la piastra multipozzetto il foglio di parafilm e il coperchio. Queste operazioni vanno compiute evitando brusche manovre che potrebbero imprigionare gli organismi sul foglio o sulla superficie dell'acqua;
- trasferire la piastra a 21 ± 1 °C.

Nota: registrare i valori di temperatura se monitorati durante la schiusa.

Riferimenti bibliografici

- CNR - I.R.S.A. 1994. *Quaderni*, 100. C.M. Blundo, L.Campanella. S.Capri, T. La Noce, A.Liberatori, R.Pagnotta e M.Pettine.
- Gorbi G., 1987. *Utilizzazione di Daphnia magna in tossicologia ambientale*. 7-36, Atti del corso di formazione. CISBA.
- ISO 5667-2, 1991. *Qualité de l'eau – Échantillonnage – Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage*.
- ISO 5725-2, 1994. *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée*.
- Puddu A., 1989. *Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei probits*. Metodi analitici per le acque. Notiziario CNR-IRSA 2:19-37.
- Sbalchiero A., Ruco D., 2002. *Daphnia magna* Straus: test di tossicità acuta secondo il protocollo ISO EN UNI 6341.
- UNI EN ISO 6341, 1999. *Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità della Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova della Tossicità acuta*.
- UNI EN 25814:1994. *Qualità dell'acqua. Determinazione dell'ossigeno disciolto. Metodo elettrochimico a sonda*.

3.3.4 Saggio di tossicità con *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*)

Principio del metodo

Il saggio algale permette di evidenziare l'effetto tossico cronico mediante l'inibizione di crescita della specie algale rispetto ad un controllo (UNI EN, 1993). Il metodo utilizza *Selenastrum capricornutum* Printz, recentemente rinominata *Pseudokirchneriella subcapitata*, un'alga verde monocellulare (Chlorophyceae) appartenente all'ordine Chlorococcales. Le cellule hanno un volume cellulare di 40-60 μm^3 , dimensioni di 6-7 μm , e risultano immobili per l'intero ciclo vitale.

Il sistema di mantenimento in coltura del clone algale e la preparazione dei terreni sono riportati in appendice.

Preparazione dell'inoculo algale

Il saggio algale prevede l'inoculo nei campioni da esaminare di una quantità standardizzata di sospensione algale a concentrazione nota e costante; è importante che ad ogni beuta che fa parte del piano di lavoro venga aggiunta la stessa quantità di alghe.

L'inoculo viene preparato a partire dalla coltura di mantenimento dove le alghe si trovano in fase esponenziale di crescita; a tal fine un'aliquota di sospensione algale di circa una settimana di età viene prelevata, lavata con soluzione di NaHCO_3 (per evitare di trascinare nelle beute del saggio quantità anche minime di terreno) e mantenuta 24 ore in incubazione nel liquido di lavaggio per permettere alle alghe di consumare le riserve di nutrienti intracellulari. Successivamente la sospensione viene sottoposta a conteggio cellulare e diluita opportunamente per raggiungere la densità necessaria per l'inoculo.

Soluzione per il lavaggio delle alghe

Preparare una soluzione di NaHCO_3 15 mg/L in acqua ultrapura, filtrare in condizioni asettiche su membrana da 0,45 μm e disporre in contenitore sterile. Tale soluzione può essere mantenuta per un tempo massimo di un mese a 4-6°C. In tal caso, la soluzione proveniente dal frigorifero, prima di essere utilizzata, deve essere riportata ad una temperatura di circa 20°C.

Lavaggio della sospensione algale

Prelevare in condizioni asettiche circa 10 mL della coltura algale in fase di crescita esponenziale, disporre in provetta da centrifuga sterile e tappata, centrifugare a 1500-2000 rpm (300-600 g) per 5 minuti. Aspirare il sovrantante con pipetta Pasteur sterile e risospendere le cellule algali nella soluzione di NaHCO_3 . Ripetere il lavaggio, risospendere di nuovo nella soluzione di bicarbonato e disporre per 24 ore nelle stesse condizioni ambientali della coltura di mantenimento.

Conteggio delle cellule algali della sospensione

Dopo 24 ore di incubazione determinare la concentrazione di cellule presenti nella sospensione algale mediante conteggio eseguibile con contaglobuli elettronico o camera di Burker (o camera di conta equivalente).

Diluizione della sospensione algale

Diluire la sospensione algale per ottenere un inoculo contenente $100 \cdot 10^3$ cellule/mL.

A tal fine, si riporta un esempio di calcolo per la diluizione.

$$\frac{\text{A} \quad \text{Volume totale inoculo (mL)}}{\text{C} \quad \text{Densità della sospensione algale (cellule/mL)}} \times \text{B} \quad \text{Densità inoculo } 10 \times 10^4 \text{ cellule/mL} = \text{D} \quad \text{Volume della sospensione algale da prelevare per l'inoculo (mL)}$$

Dove:

$$\text{A} \quad \text{Volume totale inoculo (mL)} = \text{E} \quad \text{n. beute previste per il saggio} \times \text{F} \quad 0,25 \text{ (volume inoculo) (mL)}$$

Il Volume della sospensione algale da prelevare per l'inoculo (D) deve essere portato, mediante aggiunta di acqua ultrapura, al pari del Volume totale dell'inoculo (A), a sua volta determinato dal prodotto tra il numero di beute da impiegare nel saggio (E) e il volume dell'inoculo (F).

Distribuzione dell'inoculo nelle beute del saggio

In ogni beuta del saggio aggiungere un inoculo costituito da 0,25 mL della sospensione algale con densità di $100 \cdot 10^3$ cellule/mL avendo cura di prelevare sempre lo stesso volume della sospensione mantenuta omogenea mediante periodica agitazione. Ogni beuta conterrà un volume finale di 25 mL, di conseguenza la densità algale di partenza all'inizio del saggio sarà di $1 \cdot 10^3$ cellule/mL.

Sistemi di misura della crescita algale

Crescita Algale alla 96^a ora e crescita algale alla 72^a ora

I parametri utilizzati per descrivere la crescita algale sono la misura della crescita algale alla 72^a o 96^a ora di incubazione. Sono indicati rispettivamente con CA (72h) e CA (96h), e rappresentano la misura della Massima Velocità di Crescita (MVC) in rapporto ad un periodo di 72 o 96 ore e ed esprimono la crescita algale come densità cellulare (numero di cellule $\cdot 10^3$ /mL).

Densità cellulare

La misura della crescita algale mediante il conteggio cellulare rappresenta un metodo semplice e sensibile; a tal fine è possibile utilizzare contaglobuli elettronici oppure il conteggio diretto mediante lettura microscopica.

Nel caso in cui la crescita algale venga determinata con sistemi diversi dal conteggio cellulare (fluorimetria, spettrofotometria), la densità cellulare può essere determinata indirettamente mediante l'uso di un Fattore di Conversione in Densità cellulare (FCD). Il fattore di conversione FCD deve essere calcolato mediante il sistema della regressione lineare tra conteggi cellulari e le altre misure strumentali.

Conteggio cellulare mediante contaglobuli

Disporre di una soluzione elettrolitica costituita da NaCl 1% filtrata su membrane da 0,22 μm (si suggerisce di prepararne 2 litri alla volta, utilizzando NaCl di grado analitico e acqua distillata; utilizzare la soluzione tramite un dispensatore di capacità adeguata con sistema di distribuzione regolabile). La conducibilità elettrica della soluzione è determinante per il corretto funzionamento del contaglobuli. La sospensione algale deve essere diluita con la soluzione di NaCl con un rapporto di almeno 1:5; sospensioni algali con densità elevata richiederanno diluizioni superiori (1:10, 1:50).

La sospensione diluita passa attraverso un foro di 100 μm di diametro; ogni cellula che attraversa il foro determina una caduta di potenziale proporzionale al volume di soluzione elettrolitica spostato; la caduta di potenziale viene evidenziata come segnale strumentale e registrata. Utilizzando contaglobuli dedicati all'ematologia, le cellule di *R. subcapitata* possono essere determinate nel canale dedicato ai leucociti; nei contaglobuli più versatili è opportuno impostare i parametri di lavoro dello strumento (amplificazione del segnale, discriminatore, corrente di fondo, finestra di lettura) nella combinazione più idonea alla determinazione delle cellule algali in questione.

Si ricorda che *R. subcapitata* può presentare una certa variabilità dimensionale, per cui è opportuno monitorare l'accuratezza della risposta del contaglobuli mediante taratura con soluzioni a densità algale nota e determinata con altra tecnica (ad esempio il conteggio al microscopio).

Conteggio cellulare mediante lettura microscopica

Il numero di cellule algali può essere determinato mediante l'osservazione microscopica.

È necessario disporre di camere per il conteggio microscopico che sono costituite da lastre di vetro rettangolari contenenti un alloggiamento sul quale è disegnato un fine reticolo di riferimento, sulla camera deve essere applicato un vetrino coprioggetti di spessore adeguato per sostenere la pressione di due linguette in metallo che hanno il compito di mantenerlo aderente al portaoggetti.

La perfetta aderenza del vetrino coprioggetti alla camera è indispensabile per la precisione del conteggio, condizionando le dimensioni della camera stessa.

Allo scopo possono essere utilizzate le camere di Burker o altre camere di conta equivalenti predisposte per il conteggio degli elementi figurati del sangue. Il reticolo della camera di Burker è costituito da 9 quadrati grandi, ognuno della superficie di 1 mm^2 , ognuno di questi quadrati è a sua volta suddiviso in 16 quadrati con superficie unitaria di $1/25 \text{ mm}^2$.

Per il conteggio delle cellule algali si depone una goccia della sospensione tra la camera ed il coprioggetti che vi deve aderire perfettamente. Dopo aver atteso circa un minuto, necessario alle alghe per depositarsi sulla camera, si esegue il conteggio al microscopio. A tal fine si conteggiano le cellule presenti in un quadrato grande delimitato dalla linea esterna delle tre linee ravvicinate; il numero di cellule conteggiate deve essere moltiplicato per 10 per ottenere il valore della densità algale espresso come numero di cellule $10^3/\text{mL}$.

Determinazioni più precise possono essere ottenute da un valore medio di cellule conteggiate su un numero maggiore di quadrati grandi.

Determinazione della clorofilla-a mediante fluorescenza

La determinazione della clorofilla presente nelle cellule algali è in grado di fornire una stima del numero di cellule e della biomassa prodotta.

La misura della clorofilla-a può essere eseguita sia in vitro sia in vivo, mediante misure spettrofotometriche o fluorimetriche; si ritiene opportuno segnalare il sistema di misura in vivo poiché risulta sensibile, veloce e non distruttivo rispetto alla coltura algale.

Utilizzare un fluorimetro con la lunghezza d'onda di eccitazione impostata a 430 nm e la lunghezza d'onda di lettura impostata a 663 nm. Eseguire la lettura del bianco con acqua distillata; agitare accuratamente la coltura algale e deporre circa 5 mL all'interno di una cuvetta da fluorimetria in vetro o plastica; eseguire rapidamente la lettura e registrare il dato strumentale. È importante tuttavia tenere presente che il rapporto tra clorofilla-a e massa cellulare può variare in relazione alla crescita algale in acque naturali con diversa composizione chimica, ed inoltre che sostanze chimiche presenti nel campione possono interferire nella determinazione fluorimetrica (US-EPA, 1978).

Analisi statistica dei dati

Espressione dei dati relativi alla crescita algale e numero di replicati

In riferimento a quanto riportato nei sistemi di misura di crescita algale, si ricorda che la crescita algale viene espressa come densità cellulare (numero di cellule $10^3/\text{mL}$).

Ogni diluizione utilizzata nel saggio di tossicità e i rispettivi controlli dovrebbero essere distribuiti su 5 repliche. Nei casi in cui, per motivi di spazio o per scarsa quantità di campione, è necessario diminuire il numero delle beute allora è possibile ridurre il numero delle repliche sino a 3. Il piano sperimentale basato su 3 replicati rappresenta la dotazione minima per un'elaborazione statistica dei dati.

Elaborazione dei dati

Per valutare la presenza di un effetto inibente o stimolante la crescita algale esercitato dal campione è necessario procedere come segue. Determinare dopo 72 o 96 ore di incubazione la crescita algale CA nelle beute che costituiscono il controllo (ovvero acqua ultrapura con aggiunta di nutrienti) e nelle beute contenenti le diluizioni del campione arricchite con nutrienti. Per ogni gruppo di repliche determinare i seguenti parametri statistici:

- valore medio (\bar{x});
- deviazione standard (s);
- devianza (D);
- varianza (V);
- coefficiente di Variazione (CV).

Confrontare il valore medio della CA ottenuto nelle beute contenenti il controllo con il valore medio della CA ottenuto nelle beute contenenti le varie diluizioni del campione mediante l'analisi statistica dei dati.

Analisi dei Probits (Probability units)

Preso in esame una risposta di tipo qualitativo per l'effetto tossico esercitato da una sostanza pura o da un'acqua di scarico, tracciando un grafico in cui vengono disposti nell'asse delle ascisse i logaritmi delle dosi e nell'asse delle ordinate la distribuzione differenziale della percentuale di effetto, si ottiene una distribuzione che tende alla distribuzione normale. La corrispondente distribuzione cumulativa tende alla curva a S italiana o curva sigmoide.

La curva sigmoide rappresenta la relazione caratteristica tra la dose e la frequenza di una risposta di tipo qualitativo.

Trasformando i valori percentuali di risposta in probit, la curva sigmoide "dose-% di risposta" viene trasformata in una retta.

L'analisi dei probits consiste nel calcolo della retta dose-risposta mediante il sistema della regressione lineare con un procedimento ripetitivo per approssimazioni successive. Calcolata la retta è possibile determinare da quest'ultima il valore della concentrazione efficace mediana (EC_{50}) ed i rispettivi limiti fiduciali.

Condizione irrinunciabile per l'analisi della relazione probits - log-dosi in termini di regressione lineare è la distribuzione normale delle percentuali di effetto; questa condizione viene verificata valutando la linearità dei probits mediante il saggio del χ^2 (chi quadro) con numero di gradi di libertà pari a quello delle osservazioni meno 2. Per confermare l'ipotesi di linearità il valore del χ^2 deve essere basso; se il valore ottenuto eccede il valore corrispondente ad un livello di probabilità prescelto (ad esempio 5%), l'ipotesi di linearità deve essere respinta.

Calcolo della EC₅₀ (Concentrazione Efficace mediana determinata alla 72^a-96^a ora)

La EC₅₀ evidenzia la concentrazione del campione, espressa in termini percentuali, che determina una crescita algale (CA registrata alla 72° o 96° ora di incubazione) ridotta del 50% rispetto alla crescita riscontrata nel controllo. L'IRSA fornisce un metodo di calcolo della EC₅₀ (96h), basato sul sistema dei Probit, eseguibile mediante personal computer ed in grado di fornire i limiti fiduciali e il valore del χ^2 (Puddu, 1989).

Il valore del χ^2 deve essere confrontato con le tabelle di distribuzione del χ^2 considerando un numero di gradi di libertà pari al numero di osservazioni meno 2 ed un livello di probabilità pari al 5%.

Calcolo della NOEC (No Observed Effect Concentration)

Relativamente al saggio algale, la NOEC rappresenta la più alta concentrazione alla quale non si osserva effetto inibitorio statisticamente significativo rispetto alla crescita misurata nel controllo. Per il calcolo della NOEC è consigliato l'utilizzo della Procedura di Dunnett (ARPAT-CEDIF, 1998).

Test di Dunnett

La procedura di Dunnett consiste in un metodo di comparazione multipla mediante il quale ogni media viene confrontata con la media del controllo: per ogni media viene valutata la differenza con il controllo.

- L'ipotesi nulla è che il valore di CA medio ottenuto nel campione sia uguale al valore medio ottenuto nel controllo;
- l'ipotesi alternativa è che il valore di CA medio ottenuto nel campione sia minore o maggiore del valore medio ottenuto nel controllo. Il valore CA (96h) del campione sarà minore in presenza di effetto tossico oppure sarà maggiore se il campione contiene, in origine, sostanze nutrienti capaci di produrre un effetto eutrofizzante;
- livello di significatività $p = 0,05$. Ovvero per $p = 0,05$ si prevede una possibilità su 20 che il risultato ottenuto sia errato, cioè che l'ipotesi nulla sia quella giusta (in altre parole è prevedibile un errore del 5%);
- determinazione della NOEC: il confronto viene fatto considerando le diluizioni via-via decrescenti. Nel caso di rifiuto dell'ipotesi nulla viene individuata la NOEC in corrispondenza della diluizione maggiore;

La procedura di Dunnett esegue una trasformazione dei dati in log ed effettua per ogni media e controllo il saggio di Dunnett (ARPAT-CEDIF, 1998).

Test t di Student

Il saggio "t" di Student viene utilizzato come il saggio di Dunnett per comparare ogni media con il controllo. La differenza sostanziale tra i due saggi consiste nel fatto che il riassunto utilizzato nel saggio "t" di Student tiene conto dei soli dati relativi alla coppia considerata, mentre il riassunto del saggio di Dunnett tiene conto, per ogni specifica coppia di dati, anche dei valori relativi a tutte le diluizioni presenti nel piano sperimentale.

Parametri chimico-fisici

Per l'esecuzione del saggio algale è necessario conoscere i seguenti parametri chimici da rilevare durante le fasi del prelievo o in laboratorio.

- pH;
- Salinità: determinabile direttamente come mg/L; oppure come Conducibilità ($\mu\text{S}/\text{cm}$) o come Cloruri (mg/L di Cl⁻);

Piano sperimentale

Il piano di lavoro è rivolto alla misura della crescita algale dopo 72 o 96 ore di incubazione; la crescita algale misurata nel campione viene confrontata con quella misurata in una soluzione di riferimento (controllo).

Per ogni campione viene predisposto un piano sperimentale con almeno 5 diluizioni ciascuna composta da 3 repliche, in tal caso vengono impiegate 18 beute (15 per le diluizioni del campione e 3 per il controllo). Il numero di repliche ed il numero di diluizioni hanno carattere indicativo e possono essere modificati tenendo presente la necessità di disporre almeno di un minimo di 5 diluizioni; ciascuna costituita da almeno 3 repliche. Tutte le operazioni devono essere eseguite sotto cappa a flusso laminare o comunque in ambiente asettico.

Preparazione del campione

Aggiungere, a 1000 mL di campione filtrato con membrana con pori di diametro 0,45 μm , 1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5 descritte in appendice. Agitare per capovolgimento.

Preparazione della soluzione di riferimento (controllo)

Aggiungere, a 1000 mL di acqua ultrapura filtrata con membrana da 0,45 μm , 1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5 descritte in appendice. Agitare per capovolgimento.

Campioni con elevate concentrazioni di nutrienti

La presenza di campioni con elevate concentrazioni di nutrienti (ad esempio effluenti di impianti di depurazione di tipo civile) rende consigliabile una riduzione della concentrazione del terreno del 50% rispetto alla coltura di mantenimento; allo scopo si dovranno aggiungere a 1000 mL di campione e della soluzione di riferimento 0,5 mL di ciascuna delle soluzioni di nutrienti.

Preparazione delle diluizioni del campione

Utilizzando la procedura prevista nel piano sperimentale, si vengono a costituire due soluzioni con composizione chimica simile al terreno di mantenimento con esclusione dell'EDTA. L'esclusione dell'EDTA risulta opportuna al fine di evitare la riduzione della tossicità esercitata da eventuali metalli tossici in soluzione. Utilizzare la soluzione di riferimento per la preparazione delle colture di controllo e per le diluizioni del campione.

Il campione deve essere diluito in una serie di almeno 5 diluizioni espresse in termini di concentrazione percentuale rispetto al campione tal quale (100%). A

tal fine, utilizzando un fattore di diluizione pari a 0,5, preparare le seguenti diluizioni: 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%.

Se il campione è conosciuto e presenta elevata tossicità, è opportuno utilizzare un intervallo di diluizioni più basso: 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,62%.

Se invece il campione è conosciuto e presenta bassa tossicità, è possibile utilizzare diluizioni più basse rispetto alle precedenti, ad esempio: 100%; 80%; 60%; 40%; 20%.

Se il campione è sconosciuto, ma sospettato di elevata tossicità, è necessario eseguire un saggio preliminare seguito dal saggio definitivo.

Saggio preliminare

Utilizzando un fattore di diluizione pari a 0,1 preparare le seguenti diluizioni: 100%; 10%; 1%; 0,1%; 0,01%. Considerato che la concentrazione del campione si riduce di un ordine di grandezza passando da una diluizione alla successiva, è ragionevole aspettarsi che la risposta all'effetto tossico si evidenzii e raggiunga la sua massima espressione all'interno di un intervallo di 2 o, al massimo, 3 diluizioni, da utilizzare nel saggio definitivo.

Saggio definitivo

Se il saggio preliminare ha indicato un intervallo di lavoro compreso entro due diluizioni occorre individuare una serie di cinque diluizioni, calcolate a partire dalla diluizione più bassa indicata dal saggio preliminare. Ad esempio se la diluizione più bassa indicata dal saggio preliminare è 10%, allora le diluizioni del saggio definitivo saranno 10%; 7,5%; 5%; 2,5%; 1,25%.

Se il saggio preliminare ha, invece, indicato un intervallo di lavoro compreso entro 3 diluizioni, occorre individuare una serie di cinque diluizioni, calcolate a partire dalla diluizione più bassa indicata dal saggio preliminare. Ad esempio, se la diluizione più bassa indicata dal saggio preliminare è 10%, le diluizioni del saggio definitivo saranno 10%; 5%; 1%; 0,5%; 0,1%.

Distribuzione delle diluizioni del campione e del controllo nelle beute

Diluire il campione arricchito con la soluzione di riferimento. Per ogni diluizione il volume finale da raggiungere, con l'acqua di riferimento, è di 100 mL. Per la misura dei volumi utilizzare cilindri graduati da 100 mL con tappo in vetro smerigliato.

Distribuire le diluizioni del campione e del controllo, mediante un cilindro da 25 mL, in sottoaliquote da 25 mL disposte in 3 beute da 100 mL, ciascuna sottoaliquota costituisce una replica.

Identificazione delle beute

Al termine della distribuzione nelle beute si ha un totale di 18 beute, le 15 beute contenenti le diluizioni del campione verranno contraddistinte con il valore della concentrazione percentuale, la sigla C e numerate da 1 a 3; le 4 beute

contenenti il controllo verranno denominate con la sigla K ed anch'esse numerate da 1 a 3.

Aggiunta dell'inoculo

Ad ogni beuta viene aggiunto l'inoculo algale. La sospensione algale dell'inoculo deve essere preparata 24 ore prima dell'inizio del saggio. La concentrazione iniziale di ciascuna coltura algale sarà di $1 \cdot 10^3$ cellule/mL.

Incubazione delle beute

Dopo aver aggiunto l'inoculo, le beute vengono chiuse con il foglio di alluminio che già le racchiudeva durante la sterilizzazione, la chiusura deve comunque permettere un sufficiente scambio di gas all'interno delle beute e non ostacolare l'illuminazione. Successivamente le beute vengono disposte in cella climatica o frigo-termostato a 20-25°C, sottoposte ad illuminazione continua con intensità luminosa non inferiore a 4300 lux e ad agitazione continua (in alternativa è possibile agitare le beute manualmente almeno per due volte il giorno).

Misura della crescita algale

Dopo 72 o 96 ore di incubazione, in ogni beuta verrà misurata la crescita algale mediante uno dei sistemi di misura riportati in precedenza. Il risultato rappresenta la crescita algale rilevata alla 72^a o 96^a ora: CA (72h) e CA (96h). Da ogni beuta si ottiene un valore di CA, da ogni gruppo di beute (3 repliche) si ottiene il valore medio della CA e gli altri parametri statistici previsti.

Micrometodo

La prova di crescita algale può essere eseguita su piastre in materiale plastico monouso da 24 pozzetti, ciascun pozzetto dovrà avere un volume minimo di 2,5 mL.

Ferme restando tutte le condizioni ambientali per l'esecuzione della prova dovranno essere apportate le seguenti modifiche:

- Concentrazione dell'inoculo algale: 1000×10^3 /mL;
- Concentrazione iniziale di ciascuna coltura algale: 10×10^3 cellule/mL;
- lettura della CA: dopo 72 ore dall'inizio della prova.

Criteria di validazione

La prova deve essere considerata valida se sono rispettate le seguenti condizioni:

1. dopo 72 ore di incubazione la densità cellulare iniziale nella soluzione di controllo deve aumentare di un fattore non inferiore a 16;
2. le densità cellulari delle repliche della soluzione di controllo non devono differire oltre il valore del 20%;
3. il pH non deve subire una variazione superiore a 1,5 unità durante la durata della prova.

Controllo di precisione, utilizzo delle carte di controllo

Il controllo di precisione si basa sulla valutazione della variabilità dei valori di EC_{50} (96h) prodotti con una sostanza di riferimento: il bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$).

A tal fine, a partire da una soluzione concentrata di bicromato di potassio pari a 1000 mg/L (353,5 mg/L come Cromo) preparare una soluzione di lavoro con concentrazione pari a 10 mg/L di bicromato di potassio (3,5 mg/L come Cromo).

Con cadenza mensile eseguire un saggio di tossicità con le seguenti concentrazioni di bicromato di potassio espresse come Cr: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 mg/L.

Utilizzare la carta di controllo (US-EPA, 1991) riportandovi, ogni volta che viene eseguito un saggio, i seguenti valori:

- valore della EC_{50} calcolato nel saggio;
- valore medio ponderale della EC_{50} calcolato utilizzando tutti i valori di EC_{50} (96h) ottenuti nei saggi precedenti compreso il valore ottenuto con l'ultimo saggio;
- i limiti superiore ed inferiore pari a due volte il valore della Deviazione Standard calcolata sul valore medio ponderale della EC_{50} .

In questo modo il valore medio e l'intervallo di accettabilità (ovvero l'intervallo di valori compresi tra ± 2 deviazioni standard) vengono ricalcolati con ogni risultato successivo. Con l'aggiunta dei nuovi valori l'intervallo di accettabilità tende a restringersi; ciò permette con relativa facilità di individuare eventuali valori aberranti (i quali ricadono al di fuori dei limiti inferiore e superiore dell'intervallo) e una eventuale tendenza a crescere o ridursi della sensibilità del metodo.

È opportuno tenere presente che i metodi di calcolo statistici utilizzati prevedono un livello di probabilità $p= 0,05$; ciò significa che è possibile prevedere un valore aberrante ogni 20 dati prodotti. In presenza di dato aberrante è necessario procedere all'individuazione di una eventuale causa di errore sistematico; se la causa viene individuata, il dato deve essere scartato e non utilizzato per il calcolo dei valori della carta di controllo. Allo stesso tempo, i saggi eseguiti contemporaneamente al saggio di controllo devono essere ripetuti.

Valutazione dei dati

I dati relativi alla misura della CA, opportunamente registrati nel foglio di lavoro ed elaborati statisticamente, così come riportato nel paragrafo "Analisi statistica dei dati", costituiscono la base per la loro successiva valutazione.

Risposta delle colture algali agli effetti biologici esercitati dal campione in esame

L'effetto biologico esercitato da un campione in esame nei confronti di una coltura algale può produrre tre tipi di risposte:

1. stimolazione della crescita algale;
2. inibizione della crescita algale;

3. stimolazione della crescita algale da parte delle alte diluizioni del campione e inibizione della crescita da parte delle basse diluizioni.

Stimolazione della crescita algale

Un campione è in grado di stimolare la crescita quando contiene una quantità di sostanze nutritive tale da determinare un incremento della crescita statisticamente significativo rispetto al controllo.

La significatività della differenza può essere valutata mediante il saggio t di Student.

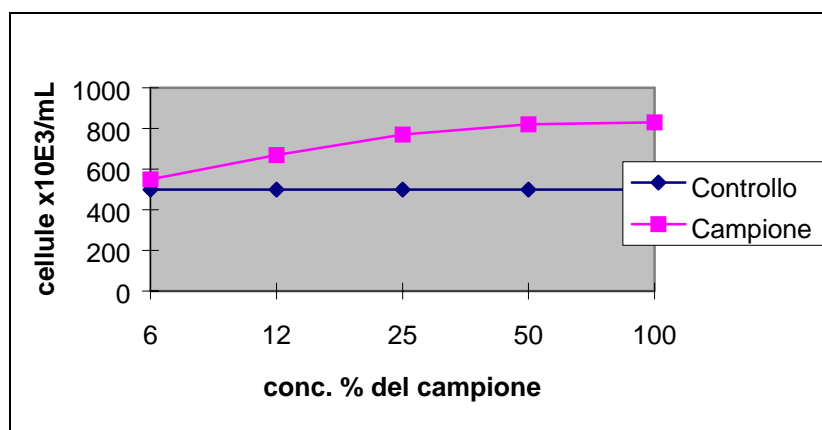
Per ognuna delle diluizioni del campione utilizzate nel saggio è possibile calcolare la percentuale di stimolazione (S%) (US-EPA, 1985).

$$S\% = \frac{T - C}{C} \times 100$$

Dove: T = CA della diluizione del campione e C = CA del controllo.

La presenza di un effetto stimolante la crescita algale (vedi figura) indica un possibile effetto eutrofizzante. Per una più accurata valutazione della concentrazione di nutrienti biodisponibili nel campione in esame è necessario eseguire con quest'ultima il saggio algale per la valutazione dello stato trofico (ARPAT-CEDIF, 1998).

Effetto stimolante la crescita algale



Inibizione della crescita algale

Un campione presenta effetto tossico quando inibisce la crescita algale in misura statisticamente significativa rispetto al controllo (vedi figura seguente).

Elevati livelli di tossicità riducono la crescita in tutte le diluizioni del campione utilizzate; bassi livelli di tossicità possono ridurre la crescita soltanto nelle diluizioni più basse.

Quando, entro l'intervallo di diluizioni utilizzate, viene registrata una crescita algale ridotta di oltre il 50% rispetto alla crescita rilevata nel controllo, è

necessario determinare il livello di tossicità mediante il calcolo del valore della EC₅₀ (V. Paragrafo "[Calcolo della EC50 \(Concentrazione Efficace mediana determinata alla 72 a-96 a ora\)](#)").

Al fine di rendere più facilmente comprensibile la misura della tossicità, è opportuno affiancare alla risposta in termini di EC₅₀ anche il valore delle Unità Tossiche (UT).

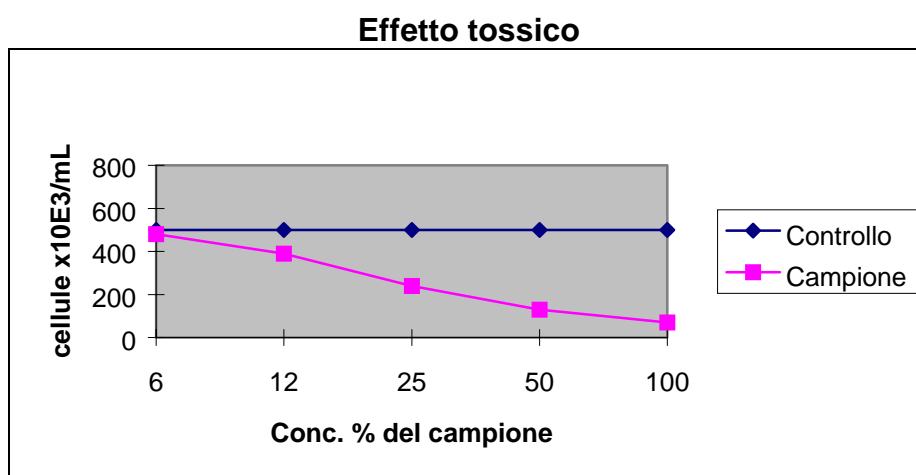
Per Unità Tossiche si intende il quoziente risultante dal seguente rapporto:

$$UT = 100/EC_{50}$$

Il valore delle UT tende ad aumentare con la tossicità del campione.

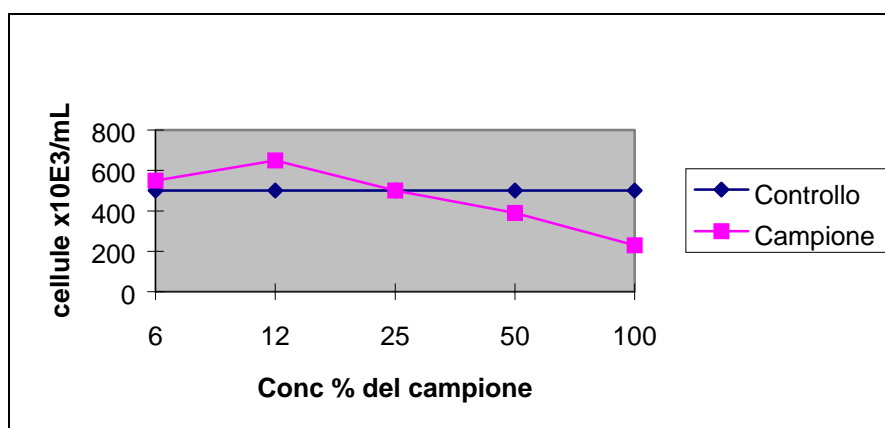
Oltre alla determinazione della EC₅₀ (96h), è opportuno considerare anche i valori della NOEC (*No Observed Effect Concentration*) determinati mediante le procedure indicate (V. paragrafo "[Calcolo della NOEC](#)").

In alcuni casi, in presenza di debole effetto tossico, il valore della EC₅₀ non risulta calcolabile, mentre è possibile esprimere l'effetto tossico mediante i valori della NOEC.



Alcuni campioni possono presentare debole effetto tossico congiuntamente alla presenza di elevate concentrazioni di sostanze nutrienti (vedi figura seguente). In tali condizioni l'effetto tossico, presente nelle diluizioni più basse, determina una riduzione della crescita rispetto al controllo mentre la sua scomparsa, nelle diluizioni più elevate, permette alle colture un incremento della crescita rispetto al controllo. In tali casi, per il calcolo della EC₅₀, e della NOEC è necessario utilizzare soltanto le diluizioni dove si evidenzia l'effetto tossico.

Effetto tossico e stimolante



APPENDICE: Terreno di coltura per il clone algale

Preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale

Allestire le seguenti soluzioni concentrate con acqua ultrapura (US-EPA, 1978; US-EPA, 1985):

Soluzione	Composti	Concentrazione	
soluzione 1:	NaNO ₃	12,750	g/ 500 mL
soluzione 2:	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,350	g/ 500 mL
soluzione 3:	K ₂ HPO ₄	0,522	g/ 500 mL
soluzione 4:	NaHCO ₃	7,500	g/ 500 mL
soluzione 5:	Soluzione dei nutrienti (°)		
	MgCl ₂ ·6 H ₂ O	6,082	g/ 500 mL
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	2,205	g/ 500 mL
	H ₃ BO ₃	92,760	mg/ 500 mL
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	207,810	mg/ 500 mL
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	80,000	mg/ 500 mL
	ZnCl ₂	1,635	mg/ 500 mL (*)
	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,714	mg/ 500 mL (*)
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,006	mg/ 500 mL (*)
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3,630	mg/ 500 mL (*)
	Na ₂ EDTA	150,000	mg/ 500 mL

(°) Raccogliere i singoli componenti di seguito riportati in una beuta contenente circa 100 mL di acqua ultrapura, sottoporre a costante agitazione e, infine, portare a 500 mL con acqua ultrapura

(*) Relativamente alle soluzioni di ZnCl₂, CoCl₂·6H₂O, CuCl₂·2H₂O e Na₂MoO₄, al fine di evitare un errore di pesata troppo elevato dovuto all'esiguo quantitativo richiesto, è necessario preparare una soluzione a concentrazione elevata da diluire per ottenere la concentrazione finale. Ad esempio, potrebbero essere utilizzate le seguenti soluzioni di partenza:

ZnCl₂ - pesare 326 mg e portare a 100 mL; prelevare 0,5 mL da portare a 500 mL

CoCl₂·6H₂O - pesare 286 mg e portare a 100 mL; prelevare 0,25 mL e portare a 500 mL

CuCl₂·2H₂O - pesare 120 mg e portare a 1000 mL; prelevare 0,050 mL e portare a 500 mL

Na₂MoO₄·2H₂O - pesare 726 mg e portare a 100 mL; prelevare 0,5 mL e portare a 500 mL

Filtrare le soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5 su membrana da 0,45 µm in condizioni asettiche, mediante filtri sterili e conservare al buio, a 4-6 °C, in contenitori sterili, per un tempo massimo di 3 mesi.

Aggiungere, in condizioni asettiche, preferibilmente sotto cappa a flusso laminare, 0,5 mL di ciascuna soluzione concentrata (soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5) a 450 mL di acqua ultrapura, portare a 500 mL, aggiustare il pH a $7,5 \pm 0,1$ usando HCl o NaOH 0,1N e filtrare su membrana da 0,45 µm. Il terreno deve essere conservato in contenitori sterili, al buio, a 4-6°C, per un tempo massimo di 1 mese.

Il terreno così preparato contiene gli elementi azoto e fosforo in quantità tale da costituire un rapporto N/P = 22,6. Con questo rapporto, la crescita algale risulta limitata dal fosforo.

Macronutrienti: concentrazione finale nel terreno di coltura, come sali e come elementi

Sali	Concentrazione mg/L	Elementi	Concentrazione mg/L
NaNO ₃	25,500	N	4,200
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14,700	Mg	2,904
K ₂ HPO ₄	1,044	Ca	1,202
NaHCO ₃	15,000	S	1,911
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	12,164	P	0,186
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	4,410	Na	11,001
		K	0,469
		C	2,143

Micronutrienti: concentrazione finale nel terreno di coltura, come sali e come elementi

Sali	Concentrazione µg/L	Elementi	Concentrazione µg/L
H ₃ BO ₃	185,520	B	32,460
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415,610	Mn	115,374
FeCl ₃ ·6H ₂ O	160,000	Fe	33,051
ZnCl ₂	3,271	Zn	1,570
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,428	Co	0,354
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,012	Cu	0,004
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,260	Mo	2,878
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	300,000		

Preparazione del terreno di mantenimento in fase solida

Aggiungere a caldo al terreno di mantenimento una quantità di agar corrispondente al 2%, portare ad ebollizione e agitare sino al raggiungimento della chiarificazione della soluzione, disporre in apposito contenitore in vetro pirex dotato di tappo a vite, sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Distribuire il terreno ancora caldo in capsule Petri in plastica sterile ed in tubi sterili da batteriologia con tappo a vite, mantenere a temperatura di 4-6°C, al buio, per un tempo massimo di 1 mese.

Preparazione del terreno per l'esecuzione del saggio di tossicità algale

Allestire le seguenti soluzioni concentrate con acqua ultrapura (US-EPA, 1978; US-EPA, 1985):

Soluzione	Composti	Concentrazione	
soluzione 1:	NaNO ₃	12,750	g/ 500 mL
soluzione 2:	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,350	g/ 500 m
soluzione 3:	K ₂ HPO ₄	0,522	g/ 500 mL
soluzione 4:	NaHCO ₃	7,500	g/ 500 mL
soluzione 5:	Soluzione dei nutrienti (°)		
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	6,082	g/ 500 mL
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,205	g/ 500 mL
	H ₃ BO ₃	92,760	mg/ 500 mL
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	207,810	mg/ 500 mL
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	80,000	mg/ 500 mL
	ZnCl ₂	1,635	mg/ 500 mL (*)
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	mg/ 500 mL (*)
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,006	mg/ 500 mL (*)
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3,630	mg/ 500 mL (*)

(°) raccogliere i singoli componenti di seguito riportati in una beuta contenente circa 100 mL di acqua ultrapura, sottoporre a costante agitazione e, infine, portare a 500 mL con acqua ultrapura;

(*) Vedere preparazione della soluzione 5 nella preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale.

Essendo le soluzioni 1, 2, 3 e 4 uguali a quelle riportate nella preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale, per la preparazione del terreno per il saggio di tossicità è possibile utilizzare quest'ultime.

Filtrare la soluzione 5 su membrana da 0.45 µm in condizioni asettiche, mediante filtri sterili e conservare al buio, a 4-6°C, in contenitori sterili, per un tempo massimo di 3 mesi.

Mantenimento del clone algale

Terreno di mantenimento

Utilizzare il terreno indicato nella preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale.

Vetreteria per le colture algali

La vetreria da utilizzare per il saggio algale deve essere in vetro borosilicato pirex e, prima dell'uso, deve essere sottoposta a particolari cicli di lavaggio rivolti ad una efficace eliminazione dei residui di sostanze nutrienti ed eventuali sostanze tossiche. L'uso di materiali in plastica monouso deve essere condizionato a prove sperimentali che permettano di verificare:

- una trasmissione dello spettro della luce incidente uguale al vetro;
- l'assenza di effetto inibente la crescita algale;
- l'assenza di effetto adesivo sulle cellule algali;
- l'assenza di effetto adsorbente rispetto a sostanze presenti in soluzione.

Soluzioni da preparare per il lavaggio della vetreria

1. acido solforico 4N (per la preparazione della soluzione H_2SO_4 4N miscelare ad otto parti di acqua distillata o deionizzata una parte di acido solforico 98% sotto agitazione e raffreddando);
2. acido cloridrico 4N (per la preparazione della soluzione HCl 4N miscelare a tre parti di acqua distillata o deionizzata una parte di acido cloridrico 37% sotto cappa aspirante e agitando);
3. carbonato di sodio 10% p/v;
4. acqua distillata o deionizzata.

Procedura per la preparazione della vetreria che viene a contatto con le colture algali

1. lavare con acqua corrente con sapone privo di fosforo (oppure lavare senza sapone) e risciacquare;
2. immergere in acido solforico 4N almeno per 2 ore;
3. lavare con acqua corrente;
4. immergere in acido cloridrico 4N almeno per 20 minuti;
5. lavare in acqua corrente;
6. lavare con soluzione di carbonato di sodio al 10%;
7. lavare per 5 volte in acqua distillata o deionizzata;
8. asciugare in stufa a $120^{\circ}C$;
9. confezionare la vetreria;
10. sterilizzare in autoclave a $121^{\circ}C$ per 15 minuti.

Procedura per la preparazione della vetreria non destinata al contatto con le colture algali

1. lavare con acqua corrente con sapone privo di fosforo (oppure lavare senza sapone) e risciacquare;
2. immergere in acido cloridrico 4N almeno per 20 minuti;
3. lavare in acqua corrente;
4. lavare con soluzione di carbonato di sodio al 10%;
5. lavare per 5 volte in acqua distillata o deionizzata;
6. asciugare in stufa a $120^{\circ}C$;
7. confezionare la vetreria;
8. sterilizzare in autoclave a $121^{\circ}C$ per 15 minuti.

Condizioni di incubazione

Le condizioni di incubazione sono le seguenti:

- temperatura 20-25°C;
 - illuminazione con lampade fluorescenti tipo “*cool white*” con intensità luminosa superiore a 4.300 lux e ritmo giorno-notte (ovvero 16 ore di luce alternate con 8 ore di buio);
 - eventuale oscillazione continua a 100 rpm.
- Il pH deve essere inferiore a 8,5 per garantire la disponibilità della CO₂.

Se la cella climatica o il frigoriferostato dove sono disposte le colture algali non presentano ricambi d'aria naturali, è consigliabile immettere aria mediante una pompa a membrana (del tipo utilizzato per gli acquari).

Per evitare un effetto limitante dovuto alla CO₂, è necessario garantire un'adeguata superficie di scambio tra il terreno di coltura e l'aria, perciò si raccomanda di agitare le colture algali e di non occupare un volume superiore al 20-30% rispetto al volume totale della beuta (25 mL di coltura in beuta da 125 mL).

Tale rapporto deve essere mantenuto quando questa viene agitata manualmente una volta al giorno; in condizione di agitazione continua, mediante piano oscillante o rotante, la percentuale di volume occupato dalla coltura può, invece, raggiungere il 50%.

Colture algali su terreno liquido

Allestire una prima coltura algale in terreno liquido, partendo dal ceppo conservato generalmente su terreno solido, trasferendo con ansa sterile parte della patina di alghe in beuta da 250 mL contenente una quantità idonea di terreno di coltura (50 mL). La coltura deve essere mantenuta in frigoriferostato o cella climatica garantendo, in assenza di piano oscillante o rotante, almeno una agitazione manuale al giorno.

Settimanalmente, le colture algali devono essere rinnovate, immettendo in condizioni asettiche 2 mL della coltura vecchia di una settimana in una nuova beuta contenente 50-75 mL di terreno; è buona regola mantenere la vecchia coltura per una ulteriore settimana in modo da avere sempre a disposizione due cloni algali. I trapianti ogni sette giorni garantiscono la disponibilità di cellule algali in fase esponenziale di crescita.

Colture algali su terreno agarizzato

È conveniente allestire colture algali su terreno agarizzato per assicurarsi una riserva di alghe vitali nei casi in cui sia necessario rinnovare le colture su terreno liquido compromesse da agenti biologici (batteri, funghi, protozoi ciliati e flagellati, altre specie di alghe) o da sostanze tossiche che casualmente possono contaminare la coltura madre. A tal fine, utilizzare il terreno di

mantenimento in fase solida preparato secondo la procedura indicata in precedenza.

A partire dalla vecchia coltura su terreno liquido, allestire inizialmente una coltura algale di isolamento su piastra incubando a 20-25°C e in condizione di illuminazione continua; successivamente, a partire da una colonia algale isolata, predisporre una coltura di mantenimento, per semina mediante ansa, su terreno disposto in tubo a becco di clarino. Incubare le colture di mantenimento alle stesse condizioni delle colture di isolamento per un tempo massimo di un mese, quindi rinnovare la coltura seminando su un nuovo tubo con terreno agarizzato.

È possibile conservare le colture di mantenimento anche in frigorifero, per un periodo non superiore ai sei mesi.

Qualora si debba prelevare una colonia dal terreno agarizzato, per ripristinare una coltura di mantenimento in fase liquida, è necessario incidere con un'ansa sterile un cilindro di agar attorno alla colonia; il cilindro di agar contenente la colonia deve essere asportato in condizioni asettiche e trasferito in beuta contenente il terreno liquido. Il terreno liquido deve essere incubato nelle normali condizioni di mantenimento.

Riferimenti bibliografici

- ARPAT CEDIF, 1998. *Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico*. Quaderni ricerca e formazione n. 8.
- EPA, 1994. *Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*. - Cincinnati, Ohio. EPA-600/491002.
- Puddu A., 1989. *Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei probits*. Metodi analitici per le acque. Notiziario CNR-IRSA 2:19-37.
- US-EPA, 1978. *The Selenastrum capricornutum PRINTZ algal assay bottle test: Experimental Design, Application, and Data Interpretation Protocol*. Office of Research and Development. Environmental Research Laboratory - Corvallis, Oregon. US-EPA-600/9-78-018.
- US-EPA, 1985. *Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*. Environmental Monitoring and Support Laboratory - Cincinnati, Ohio. US-EPA-600/4-85/014.
- US-EPA, 1991. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving Waters to freshwater and marine organisms (fourth edition)*. Environmental Monitoring Systems Laboratory. Cincinnati, OHIO. US-EPA-600/4-90-027.
- UNI EN, 1993. *Qualità dell'acqua. Prova di inibizione della crescita di alghe di acqua dolce con Scenedesmus subspicatus e Selenastrum capricornutum*. UNI EN 28692.

3.3.5 Saggi su matrice liquida per suoli inquinati da composti poco solubili in acqua

Da un'analisi della distribuzione e del destino ambientale dei microinquinanti organici, secondo i criteri formulati da Mackay (modello di fugacità, 1982,1991) e da Calamari (1993), si evidenzia che un grande numero di composti chimici apolari (liposolubili), dotati di un elevato coefficiente di ripartizione ottanolo / acqua (log Kow), si confinano stabilmente nei suoli.

L'entità di questo confinamento, la concentrazione e la biodisponibilità di composti organici non polari nei sedimenti è in relazione con la concentrazione del Carbonio Organico Totale (TOC) presente negli stessi e più recentemente vari autori hanno suggerito che la biodisponibilità dei metalli può essere messa in relazione con il contenuto in solfuri volatili disponibili (AVS) dei suoli.

Relativamente ai siti in cui si sospetta la presenza di composti apolari liposolubili sarebbe opportuno eseguire un'estrazione tramite solventi organici anche al fine di eseguire, oltre ai saggi ecotossicologici, anche saggi di mutagenesi.

Estrazione esano/acetone

I suoli possono essere inquinati da composti chimici scarsamente solubili in acqua.

In questi casi bisognerà utilizzare solventi in grado di portare in soluzione composti chimici scarsamente solubili in acqua. Viene proposto un metodo estrattivo che fa uso di una miscela di esano/acetone (in rapporto 1:1).

Trattamento del campione

Centrifugare il campione umido (2000 rpm per circa 20 min). Porre il campione umido centrifugato (50-100 g) in una capsula Petri in vetro, il cui fondo è stato rivestito da carta da filtro n°1 (Whatman o similare) e lasciato asciugare a temperatura ambiente per almeno 24 h in ambiente controllato.

Setacciare il campione secco (SSs) tramite setaccio (standard ISO) con maglia da 2 mm.

Raccogliere il campione secco con pezzatura < 2 mm.

Pesare 20-40 g di campione secco (Ps) in un ditale ed estrarre con 250 mL di miscela esano/acetone (1:1) in apparato Soxhlet per almeno 8 ore.

In parallelo all'estrazione del campione, va predisposto un "bianco" di procedura (ditale vuoto), allo scopo di verificare se vengono indotte tossicità non riconducibili al campione di sedimento dal trattamento estrattivo, dovute ad impurità dei reagenti, vetreria non ben trattata ecc.

La prova va condotta introducendo un ditale vuoto nell'apparato Soxhlet e seguendo le istruzioni:

- sottoporre l'estratto organico (SOE) ad evaporazione tramite apparecchio rotovapor onde allontanare il solvente (esano/acetone) sotto gradiente di pressione negativa e/o sotto corrente di N₂;
- asciugare il residuo sotto corrente di N₂;
- riprendere il residuo con 1-5 mL di dimetilsolfossido puro per analisi (Vx di DMSO) .

La quantità Ps e Vx di campione e di DMSO può variare a seconda della tossicità presunte.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- Centrifugare ed essiccare all'aria (a temperatura ambiente) allo scopo di ottenere un campione secco (SSs)
- Setacciare a 2 mm



ESTRAZIONE SOSTANZE ORGANICHE

Soil Organic Extraction (SOE)

- Pesare (Px) una congrua quantità di SSs in un ditale
- Estrarre con 250 mL di acetone/esano (1:1) in apparato Soxhlet (8 h)



- Sottoporre ad evaporazione tramite apparecchio rotovapor
- Asciugare l'estratto in corrente d'azoto
- Risospendere con un volume di 1-5 mL di dimetilsolfossido (DMSO) puro per analisi



ANALISI CARATTERIZZATIVA

Sulla sospensione eseguire la prova con *Vibrio fischeri* o con *Daphnia magna*, utilizzando il tradizionale protocollo analitico e aggiungendo al diluente salino o all'acqua di diluizione DMSO in acqua ultrapura

Espressione dei risultati

I risultati vanno espressi come mg SSs/L (campione secco per litro).

La concentrazione massima del campione (C_{max}) è espressa in g SSs/mL

$$C_{max} = (Px/Vx)$$

o anche espressa in g SSs/L

$$C_{max} = (Px/Vx) / 1000$$

Protocolli analitici

- Prova con Vibrio fischeri

La prova ecotossicologica di bioluminescenza con *Vibrio fischeri* va eseguita utilizzando quale mezzo diluente una soluzione salina (20 g/L di NaCl) contenente 1% di DMSO in tutta la filiera analitica (compreso il controllo).

Diluire l'estratto con una soluzione salina NaCl (20 g/L) con fattore di diluizione 100, tale che la concentrazione del DMSO sia pari all'1%(v/v).

La necessità di diluire ulteriormente il campione nasce dalla considerazione che il DMSO non presenta tossicità alla concentrazione pari all'1%(v/v).

Esempio di calcolo

$Px = 20 \text{ g SSs}$; $Vx = 5 \text{ mL}$

$C_{max} = (20 / 5) = 4,0 \text{ g SSs / mL DMSO puro per analisi}$

La concentrazione massima testabile (C_{tmax}) sarà 1/100 della concentrazione massima (C_{max}) cioè pari a:

$C_{tmax} = (4,0/100) = 0,04 \text{ g SSs/mL di soluzione salina salina (NaCl 2\%) al 1\% DMSO}$

(corrispondenti a 40 g SSs/L) ricavati diluendo 1 mL di concentrazione massima (C_{max}) con 99 mL di soluzione (NaCl 2% all'1%(v/v) con DMSO).

- Prova con Daphnia magna

La prova della *Daphnia magna* viene eseguita secondo quanto prescritto dalla norma n° 202 (OECD, 1984), la quale prevede che le sostanze poco solubili in

acqua possono essere meccanicamente disperse o, se necessario, possono essere usati solventi organici, emulsioni o disperdenti che abbiano una bassa tossicità nei confronti della *Daphnia*. In tal caso, la concentrazione di solvente organico non può eccedere i 100 mg/L (0,1 g/L).

Nell'allestimento delle dosi, la prova con *Daphnia* va eseguita sostituendo l'acqua di diluizione con una soluzione contenente 100 mg/L di DMSO in tutta la filiera analitica (compreso il Controllo), così come prescritto dalla norma OECD n° 202.

Esempio di calcolo

Considerando che la densità (ρ^{20}) del DMSO è pari a 1,101 g/mL, si può facilmente ricavare che per:

$$P_x = 20 \text{ g SSs} \quad V_x = 5 \text{ mL}$$
$$C_{\max} = (20 / 5) = 4,0 \text{ g SSs / mL DMSO puro per analisi}$$

$$\frac{\rho^{20}}{1} = \frac{0,1}{X}$$

$X \cong 0,09 \text{ mL}$ (volume di C_{\max} che portato a litro ottempera alla prescrizione della norma OECD n°202)

Quindi la concentrazione massima testabile (C_{tmax}) sarà pari a:

$$C_{\text{tmax}} = C_{\max} * 0,09 = 0,36 \text{ g SS/L}$$

Riferimenti bibliografici

- Calamari D., 1993. *Chemical exposure predictions* Lewis Publishers.
- Mac Kay D., 1991. *Handbook of Ecotoxicology* vol.2 Blackwell Scientific Publications 1982.
- OECD, 1984. *Guideline for Testing of Chemicals. Daphnia sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test*, n° 202 del 4 aprile 1984.
- Organic Solvent Solubilization of Sample, 1995. *In Manuale Microtox Acute Toxicity Basic Test Procedures*, Azur Environmental 19/6/1995.

3.4 DETERMINAZIONI SULLA MATRICE SOLIDA

Le prove di tossicità, condotte direttamente sulla matrice solida, risentono delle interazioni tra il suolo e la componente tossica, interazioni che esercitano effetti non trascurabili sulla biodisponibilità delle sostanze tossiche. D'altronde, le prove sulla matrice solida hanno il vantaggio di utilizzare la matrice *in toto* e non solo l'estratto acquoso, avvicinandosi in tal modo maggiormente alla situazione reale.

3.4.1 Saggi su vegetali

Per valutare la qualità dei suoli si possono utilizzare come bioindicatori i vegetali, comunemente più sensibili degli animali per rilevare le caratteristiche del suolo in una specifica area. L'utilizzo di piante come indicatori per valutare la salute e la qualità del suolo in una prospettiva agricola e geobotanica è stato oggetto di molti studi.

La presenza di piante può essere utilizzata per diagnosticare una particolare condizione del suolo, ad esempio la natura acida o basica del substrato (bioindicazione qualitativa), o può essere utilizzata per quantificare un particolare componente del suolo o contaminante (bioindicazione quantitativa). Il rilievo botanico dell'intera comunità vegetale può essere impiegato come una bioindicazione delle condizioni complessive del suolo (ANPA, 2001).

Viene effettuata di solito una distinzione tra biomonitoraggio passivo o attivo. Il biomonitoraggio è definito passivo quando si studia la presenza di vegetazione nativa o coltivata presente nell'area di studio, mentre il biomonitoraggio è attivo quando piante selezionate in base alla loro sensibilità alla contaminazione del suolo vengono utilizzate in saggi di laboratorio.

La scelta del metodo di biomonitoraggio dipende dallo scopo dell'indagine. Il biomonitoraggio passivo è utilizzato come metodo per analisi retrospettive sul suolo. Il biomonitoraggio attivo invece è una procedura molto più informativa in quanto utilizza piante selezionate che posseggono una specifica sensibilità per la crescita in condizioni standard e conosciute.

I saggi di tossicità su piante sono generalmente metodi veloci che richiedono un impegno economico molto contenuto. Molte piante si prestano in modo egregio al monitoraggio degli inquinanti nel suolo. I vantaggi sono molti, tra l'altro, come già detto, i costi estremamente limitati di gestione e di allestimento offrono la possibilità di evidenziare l'effetto contemporaneo di più agenti inquinanti.

Quest'ultimo aspetto riveste una notevole importanza in quanto evidenzia i danni causati da una reale situazione di inquinamento. Le piante utilizzate per questi tipi di saggi sono definite piante indicatrici in quanto rispondono con

sintomi evidenti all'azione di uno o più inquinanti. Le piante devono cioè possedere una bassa selettività all'assorbimento di sostanze tossiche e si distinguono dalle piante accumulatrici in quanto queste ultime accumulano nei propri tessuti gli inquinanti e quindi non possono essere utilizzate per un saggio diretto e veloce, ma necessitano dell'analisi chimica dei loro organi. Di seguito vengono presentati alcuni dei metodi più comunemente utilizzati.

3.4.1.1 Metodo per la misura dell'inibizione della crescita radicale

Principio del metodo

Il metodo si basa sulla stima della crescita radicale di semi fatti germinare in condizioni controllate. Dopo il periodo di crescita viene misurata la lunghezza radicale delle piante cresciute sul suolo oggetto del saggio in riferimento ad un controllo.

Il metodo (ISO 11269-I) dà risultati positivi se viene determinata una differenza statisticamente significativa tra le lunghezze radicali delle piantine appartenenti alle diverse tesi.

Materiali

- Piante

Il saggio va condotto impiegando semi nudi, particolarmente raccomandato l'orzo (*Hordeum vulgare* L.) della varietà "cv. Triumph". Possono essere utilizzate anche altre varietà, purché con seme nudo e con caratteristiche simili di germinazione e di crescita radicale.

- Vasi

Si consiglia di utilizzare vasi cilindrici con diametro approssimativo di 8 cm e altezza di 11 cm. I lati paralleli assicurano che le radici delle piantine non subiscano costrizioni e che non vengano a contatto con eventuali pareti coniche. Se necessario la base dei vasi potrà essere forata e ricoperta con carta da filtro.

Se riempiti all'altezza di 10 cm, i vasi conterranno approssimativamente 500 g di terreno asciutto all'aria.

- Mezzi di crescita

I mezzi di crescita sono costituiti da: suolo da saggiare, di cui è la nota la tossicità, e sabbia. La sabbia da impiegare sarà sabbia di quarzo industriale lavata o altra sabbia pura con la seguente granulometria: 10% > 0,6 mm; 80% tra 0,2 mm e 0,6; 10% < 0,2 mm.

Procedimento

Disegno sperimentale

Tutte le tesi, un terreno sabbioso di controllo, un suolo noto di buona qualità preferibilmente della stessa tessitura del suolo da saggiare e suolo non noto: le prove sono condotte con tre repliche. Il terreno sabbioso viene utilizzato come un controllo del metodo; mentre il risultato è rappresentato dalla differenza statisticamente significativa tra l'allungamento radicale nel suolo di controllo e nel suolo da valutare.

Se il metodo viene utilizzato per determinare l'effetto di contaminanti aggiunti, e il tipo di suolo non è quindi considerato un requisito essenziale, il suolo va scelto in modo che non mascheri o riduca l'effetto delle sostanze aggiunte.

Preparazione dei vasi

Seccare la sabbia industriale, il suolo da sottoporre ad analisi e il suolo a cui vengono aggiunti contaminanti ($30\pm 2^\circ\text{C}$) per 16 ore, e poi setacciarlo a 4 mm. Preparare il materiale per i diversi vasi: controllo, suolo contenente contaminanti aggiunti e suolo da testare.

Vasi controllo

Riempire tre vasi preventivamente pesati con sabbia quarzifera e assicurarsi che il materiale non sia in alcun modo compattato.

Suoli contenenti sostanze contaminanti aggiunte

Seccare e setacciare il suolo da utilizzare per la tesi controllo e con essa riempire i vasi preventivamente pesati, avendo cura di evitare la compattazione. Preparare un numero di vasi sufficiente per allestire tre repliche per ogni tesi compreso il controllo. Calcolare preventivamente le quantità di contaminanti da aggiungere, sia per il saggio preliminare che per quello finale.

Allestimento dei vasi contenenti il suolo da sottoporre ad analisi

Asciugare e setacciare il suolo. Riempire tre vasi preventivamente pesati e assicurarsi che il suolo non venga compattato. Allestire ulteriori tre vasi con miscele del suolo da sottoporre ad analisi e del suolo controllo che sarà stato preventivamente asciugato e setacciato o della sabbia industriale, questo allo scopo di preparare campioni diluiti contenenti diverse concentrazioni delle sostanze presenti nel suolo da sottoporre ad analisi.

Preparazione della semina

Durante questo saggio assicurarsi che il suolo sia sempre al 70% della capacità di ritenzione idrica (whc) mediante uno dei seguenti due metodi:

1. posizionare tre vasi per ogni tipo di suolo utilizzato in un sistema chiuso mantenendo la profondità dell'acqua tra i 5 e i 10 cm. Quando la superficie del suolo è umida, rimuovere il vaso, coprirlo con un vetrino da orologio e lasciarlo drenare su una rastrelliera per tutta la notte. Si ritiene che il suolo, in queste condizioni, abbia approssimativamente una capacità di ritenzione idrica (whc) del 100%. Pesare nuovamente i vasi e lasciare

- asciugare mediante evaporazione fino a che non venga raggiunto il 70% di whc, mantenere questa condizione per l'intera durata della prova;
2. determinare la quantità di acqua richiesta per ottenere il 70% di whc in accordo con il metodo ISO 11274 su un campione di suolo diverso da quello utilizzato per la prova. Aggiungere la quantità di acqua necessaria (dall'alto o dal fondo), avendo cura di minimizzare la compattazione sulla superficie del suolo, e mantenersi in queste condizioni per l'intera durata della prova.

Il metodo ISO 11274 fornisce indicazioni riguardanti procedure diverse per la determinazione delle caratteristiche di ritenzione idrica dei suoli ed è indicato quando vengono utilizzate sostanze chimiche solubili in acqua.

Preparazione dei semi

Far germinare i semi in capsule Petri, distribuendoli uniformemente su carta da filtro imbevuta con acqua distillata fino a che le radici non siano emerse, normalmente dalle 36 alle 48 h per l'orzo a 20°C e in assenza di luce. Quando le radici hanno una lunghezza minore di 2 mm, piantare sei semi avendo cura di posizionare l'apparato radicale verso il basso, all'incirca 10 mm sotto la superficie del mezzo di crescita.

Condizioni di crescita

Disporre i vasi in un locale climatizzato in cui possa essere impostato un ciclo giorno/notte. Pesare i vasi ogni giorno e aggiungere acqua deionizzata per mantenere il suolo al 70 % di whc, avendo cura di non compattare il suolo, e ricollocare i vasi secondo uno schema randomizzato.

Per l'orzo sono raccomandate le seguenti condizioni:

Condizione	Giorno	Notte
Durata (h)	12 a 16	8 a 12
Luminosità	25.000 lux	Tungsteno 45 W
Temperatura (°C)	20 ± 2	16 ± 2
Umidità (%)	60 ± 5	60 ± 5
Capacità idrica (% whc)	70 ± 5	70 ± 5

Per l'orzo viene indicato un tempo di crescita per la fine del saggio di 5 giorni.

Se è utilizzata una pianta diversa dall'orzo, devono essere effettuate alcune prove preliminari, impiegando sabbia come substrato, per la determinazione del massimo allungamento radicale ottenibile con le sole sostanze di riserva contenute nei semi. Assicurarsi che la lunghezza radicale non ecceda l'80% della profondità del suolo contenuto nei vasi mediante la scelta opportuna dei vasi e del tempo massimo da utilizzare per l'esecuzione della prova.

Trascorso il periodo di crescita stabilito, adagiare ogni vaso in un contenitore di forma appropriata contenente 5 cm di acqua e lavare il suolo in esso contenuto, facendolo fuoriuscire con molta cautela. Lavare le singole piante e misurare la

radice più lunga con una approssimazione di 0,5 mm. Se si ritiene opportuno, possono essere misurate anche le lunghezze dei germogli.

Espressione dei risultati

Misurare la lunghezza della radice più lunga per ogni pianta e calcolare la media nell'ambito di ogni tesi considerata.

Confrontare le lunghezze medie delle radici trattate con quelle dei vasi controllo. Valutare i risultati usando un test statistico adatto.

Possono essere utilizzati i seguenti metodi per l'analisi statistica: il test t-Student o il saggio t-Dunnett. Se il suolo è inquinato si otterrà una riduzione significativa della lunghezza radicale rispetto al suolo e alla sabbia utilizzati come riferimento. È stato calcolato che una differenza di 10 mm nella lunghezza media radicale (approssimativamente 10%) è significativa, ad un livello di confidenza 95%.

Effetto di agenti chimici sull'emergenza e crescita delle piante superiori

Principio del metodo

Questa parte del metodo (ISO 11269-II) si riferisce alla determinazione di possibili effetti di sostanze chimiche tossiche solide o liquide, incorporate al suolo, sull'emergenza e sui primi stadi di crescita e sviluppo di piante terrestri. Il metodo fornisce un'indicazione dei danni risultanti da inquinanti incorporati al suolo.

I semi delle piante scelte per l'esecuzione del saggio sono piantati in vasi contenenti il suolo cui è stato aggiunto l'inquinante da sottoporre ad analisi e nei vasi controllo. Le condizioni di mantenimento devono essere quelle specifiche per le specie vegetali utilizzate. L'emergenza e il peso (secco o fresco) dei germogli delle piante testate devono essere confrontati con quelli delle piante controllo.

Il metodo è anche utilizzabile per la determinazione della qualità del suolo mediante confronto con un suolo di qualità nota.

Materiali e apparecchiature

Per l'esecuzione del saggio sono utilizzate le seguenti apparecchiature: fitotroni, camere di crescita o serre. Il vaso da utilizzare come contenitore per le piante sarà di plastica non porosa o smaltato con \varnothing interno compreso tra gli 85-95 mm.

Piante

Dovranno essere selezionate un minimo di due specie da utilizzare per il saggio, una per ognuna delle categorie mostrate in tabella.

Categoria	Nome comune	Specie
1. Monocotiledoni	Segale	<i>Segale cereale</i> L.
	Loietto	<i>Lolium perenne</i> L.
	Riso	<i>Oryza sativa</i> L.
	Avena	<i>Avena sativa</i> L.
	Fruento	<i>Triticum aestivum</i> L.
	Orzo	<i>Hordeum vulgare</i> L.
	Sorgo	<i>Sorghum bicolor</i> Moench
	Granturco	<i>Zea mays</i> L.
2. Dicotiledoni	Senape bianca	<i>Sinapis alba</i>
	Colza	<i>Brassica napus</i> L.
	Ravanello	<i>Raphanus sativus</i> L.
	Rapa	<i>Brassica rapa</i> ssp. (DC) metzg
	Cavolo cinese	<i>Brassica campestris</i> L. var. <i>chinensis</i>
	Fieno greco del Birdsfoot	<i>Trifolium ornithopodioides</i> (L.)
	Lattuga	<i>Lactuca sativa</i> L.
	Crescione	<i>Lepidium sativum</i> L.
	Pomodoro	<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller
	Fagiolo	<i>Phaseolus aureus</i> Roxb.

Suolo di campo e suolo sterile^[CJ2]

Può essere utilizzato sia suolo di campo sia suolo sterile.

- Nel caso di *suolo di campo*, il terreno umido viene passato al setaccio, con maglia da 4-5 mm, per rimuovere i frammenti grossolani. Il contenuto in carbonio non deve eccedere l'1,5% (3% in contenuto organico). Le particelle più fini (minori di 0.02 mm) non devono essere superiori al 20% del peso secco.
Per raggiungere i limiti raccomandati di carbonio organico, nonché di particelle fini, è possibile aggiungere della sabbia. Il pH, determinato in accordo con ISO, dovrà essere compreso tra 5 e 7,5. Il suolo di campo deve essere conservato in accordo con il metodo ISO 10381- 6.
- Se si utilizza un *suolo sterile*, preparato appositamente per l'esecuzione del saggio, poiché questo comporta l'aggiunta di nutrienti, sarà necessario attendere un periodo sufficientemente lungo tra la preparazione e l'esecuzione del saggio, in modo che i nutrienti non interagiscano con l'inquinante in esame.

Si riportano di seguito i punti principali del metodo:

- *Trattamento del suolo*
Il suolo deve essere trattato nel più breve tempo possibile dal campionamento, operando a temperatura ambiente, setacciato a 2 mm allo scopo di rimuovere i frammenti più grossolani. In caso di difficoltà di setacciamento, come ad esempio in presenza di torba, si può procedere al setacciamento a 5 mm. Nel caso in cui il terreno sia troppo umido si procede ad asciugarlo in modo uniforme, agitandolo di frequente allo scopo di evitare che si asciughi in superficie.

- *Conservazione*

I campioni vanno conservati a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in sacchetti di plastica, legati in modo che ci sia un passaggio di aria; vanno evitate infatti, condizioni di anaerobiosi. È inoltre essenziale che il terreno non si congeli, e non si inumidisca durante la conservazione.

- *Esecuzione della prova*

Le concentrazioni utilizzate sono espresse in mg/kg di suolo secco.

Assicurarsi che ci sia una distribuzione uniforme delle sostanze aggiunte, evitare l'uso di tensioattivi.

È necessario dimostrare l'uniformità nelle condizioni di laboratorio mediante l'uso di una sostanza di riferimento, a questo scopo viene raccomandato l'uso di tricloroacetato di sodio.

Procedimento

Tutte le tesi devono essere ripetute per quattro volte.

Saggi preliminari

Mediante i saggi preliminari, viene individuato il *range* di concentrazioni dell'inquinante che influenza la qualità del suolo. L'inquinante è aggiunto al suolo alle seguenti concentrazioni: 0 (controllo), 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg, 1000 mg/kg di suolo secco.

Saggi finali

Le concentrazioni sono calcolate secondo una serie geometrica (preferibilmente con un fattore non superiore a 2) per avere una stima della concentrazione più bassa che induca una riduzione dell'emergenza e della crescita (LOEC). Non è necessario utilizzare concentrazioni superiori a 1000 mg/kg di suolo secco.

Una serie geometrica è una serie di quantità in cui ogni termine è ottenuto moltiplicando il precedente termine per un fattore costante definito come rapporto comune es. 1, 2, 4, 8, 16.

Preparazione dei vasi

Riempire i vasi con il suolo preparato e raggiungere la capacità di ritenzione idrica richiesta, espressa in percentuale, aggiungendo acqua deionizzata. Sistemare i vasi su contenitori individuali randomizzati.

Preparazione dei semi

Seminare 20 semi nudi di specie selezionate in modo uniforme. La semina è effettuata immediatamente dopo l'aggiunta dell'inquinante o al massimo 24 h dopo, senza che i semi vengano imbibiti.

Condizioni di crescita

Temperatura, umidità e luce sono specifiche della specie utilizzata. Dopo l'emergenza, si riducono le plantule ad un totale di 5 per ogni vaso, opportunamente spaziate, in modo che siano rappresentative della media delle piante germinate. Il saggio deve avere una durata di 14 - 21 giorni, prendendo come riferimento l'emergenza del 50% delle piantine del controllo.

Vengono raccomandate le seguenti procedure:

1. si possono utilizzare il fitotrone (apparato costituito da una serie di ambienti climatizzati in cui si riproducono artificialmente diversi climi e situazioni meteorologiche, per lo studio e la sperimentazione delle piante), le camere di crescita o la serra;
2. temperatura: impiegare la temperatura ottimale per le specie selezionate;
3. luminosità: 16 h/giorno. Utilizzare un minimo di 7.000 lux di intensità luminosa a lunghezze d'onda utili per la fotosintesi. Se si opera in serra sarà quindi necessario adottare sorgenti luminose artificiali in periodi di bassa intensità luminosa esterna;
4. umidità nel suolo: giornalmente correggere, se necessario, il contenuto di umidità nel suolo per mantenere una ritenzione idrica determinata per la specie (es. 80% per *Avena sativa* e 60% per *Brassica rapa*). Il controllo può essere effettuato mediante pesata giornaliera di vasi scelti a caso. Va evitato l'instaurarsi di condizioni anaerobiche, in caso contrario deve essere riportato nel *report* finale;
5. registrare: temperatura e umidità specialmente se si fa uso di una serra;
6. se vengono utilizzate sostanze volatili, va in ogni modo evitato l'inquinamento tra i gruppi di vasi che costituiscono le diverse tesi utilizzando più fitotroni o separazioni specializzate. Se questo non è possibile, tale condizione va riportata nel *report* finale.

Criteria di validità

Il saggio è valido se emergono almeno cinque plantule per vaso nella tesi di controllo.

Espressione dei risultati

Presentare i dati in forma tabulare, registrando il numero di piante fuoriuscite e il peso totale dei germogli per ogni replica.

Riportare il peso fresco, ottenuto su campioni pesati immediatamente dopo il taglio dei germogli sopra la superficie del suolo, o il peso secco degli stessi ottenuto dopo essiccazione in stufa a 70-80°C per 16 h.

È preferibile utilizzare i valori di sostanza secca.

Per ogni replica all'interno di ogni trattamento, si calcola la percentuale dell'emergenza e della biomassa prodotta totale e media rispetto ai valori ottenuti nella tesi di controllo.

Elaborare i risultati con un opportuno metodo di analisi statistica con il più alto grado di significatività.

L'emergenza è espressa come % di plantule fuoriuscite nelle tesi trattate rispetto alla tesi di controllo.

Gli effetti sulla crescita vanno espressi come differenza in peso della parte aerea delle piante trattate rispetto alle piante controllo.

Occorre indicare:

1. la concentrazione più alta (mg/kg di suolo secco) che non ha effetto alcuno sulla crescita/emergenza, (NOEC);
2. la concentrazione più bassa (mg/kg di suolo secco) che ha provocato una riduzione nei valori della crescita/emergenza (LOEC).

Ove possibile, è consigliabile la rappresentazione grafica dei risultati ottenuti sulla crescita.

Considerazioni conclusive

L'indubbio vantaggio dei saggi di fitotossicità esposti è che, una volta individuate le specie vegetali adatte, queste forniscono indicazioni in tempi brevi, 5 giorni per l'ISO 11269-I e 14 giorni per l'ISO 11269-II.

L'alternativa sarebbe quella dell'analisi dei terreni, che soprattutto in casi di sospetta presenza di particolari inquinanti, un esempio per tutti i composti policiclici aromatici (PAHs), richiede metodiche complesse e attrezzature molto costose.

Questi metodi al contrario, come già detto, sono di facile conduzione e soprattutto, se accompagnati da ulteriori osservazioni, come sopralluoghi sul sito di provenienza del suolo, analisi microscopiche nel caso delle radici, ecc., forniscono risultati anche sulla possibile sinergia tra le sostanze, quando la tossicità di un suolo è dovuta a più elementi inquinanti.

Riferimenti bibliografici

ANPA, 2001. *Le piante come indicatori ambientali*. RTI CTN_CON 1/2001: 108 pp. Disponibile dall'Internet <URL: <http://www.sinanet.anpa.it>>.

ISO 11269, parte I , 1993. *Metodo per la misura di inibizione della crescita delle radici*.

ISO 11269, parte II , 1995. *Effetto di agenti chimici sull'emergenza e crescita delle piante superiori*.

Rea E., 2000. *Test su piante: inibizione della crescita radicale e dell'accrescimento in piante superiori*. Corso ecotossicologia applicata. Milano 19-20 ottobre 2000.

3.4.1.2 Saggio di germinazione e allungamento radicale

Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo).

Principio del metodo

I criteri generali dell'Ecotossicologia raccomandano che i saggi di tossicità vengano eseguiti in batteria, includendo nella batteria anche specie vegetali, accanto ad animali.

In accordo con tale criterio, viene proposta una procedura di saggio per la rilevazione degli effetti cronici su tre specie, di cui due dicotiledoni (Cetriolo e Crescione) e una monocotiledone (Sorgo).

Il saggio (UNICHIM Metodo 1651 – 2003), della durata di 72 ore, consente di rilevare contemporaneamente l'effetto sulla germinazione e sull'allungamento radicale, espresso come Indice di Germinazione percentuale (IG%). Se la prova è effettuata con una scansione di concentrazioni possono essere inoltre calcolate la EC_{50} , altre EC_x ed il valore di NOEC e LOEC.

Il saggio è applicabile sia a matrici liquide che solide.

Il metodo descritto ha le seguenti caratteristiche:

- è stato sviluppato per verificare la tossicità di campioni liquidi (campioni ambientali; soluzioni di prodotti puri, estratti) e solidi (sedimenti, suoli, fanghi);
- è sensibile ad una vasta gamma di contaminanti organici ed inorganici;
- prevede un contatto minimo da parte del personale con i campioni testati;
- è economico e viene effettuato in breve tempo;
- gli organismi del saggio sono facilmente disponibili;
- non richiede una strumentazione dedicata;
- può essere effettuato da tecnici di laboratorio con un minimo addestramento.

Termini e definizioni

Campione

Materiale da sottoporre a prova

Controllo negativo

Matrice che non contiene sostanze inibitrici della germinazione e dell'allungamento radicale.

Controllo positivo

Matrice contenente una sostanza di riferimento di cui sia noto l'effetto tossico.

Germinazione

Emergenza dal seme delle prime strutture di crescita.

Apparato radicale

Il tratto comprende radice e ipocotile nel cetriolo, radice, ipocotile ed epicotile nel crescione, per il sorgo, che presenta germoglio e radice separati, è prevista la misura separata di entrambi (Figura 1). Per semplicità ed uniformità con la denominazione degli analoghi saggi proposti da altre organizzazioni (ASTM, OECD, EPA) queste strutture vengono genericamente indicate con il termine di “apparato radicale”.

Semi germinati

Numero di semi che al termine dell'esposizione presentano un apparato radicale visibile della lunghezza di 1 mm.

Allungamento radicale

Lunghezza (in mm) dell'apparato radicale emerso dal seme al termine dell'esposizione.

Indice di germinazione, IG

Prodotto della media dei semi germinati al termine della prova per la media dell'allungamento radicale.

Indice di germinazione percentuale, IG%

Rapporto tra l'indice di germinazione del campione (IG_{campione}) e l'indice di germinazione del controllo negativo ($IG_{\text{controllo}}$), moltiplicato per 100.

$$IG \% = \frac{IG_{\text{campione}}}{IG_{\text{controllo}}} \times 100$$

Sostanza di riferimento

Sostanza per la quale è stato valutato l'effetto inibitorio sulla germinazione e/o l'allungamento radicale, in termini di EC_{50} e che è utilizzata per la gestione di una carta di controllo. Può essere convenientemente usato come sostanza di riferimento il dicromato di potassio $K_2Cr_2O_7$.

Materiali, reagenti e apparecchiature

Organismi

- Semi di *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo);
- non utilizzare semi trattati con insetticidi e/o fungicidi;
- acquistare semi commercialmente distribuiti con germinazione garantita almeno del 90 % e utilizzarli prima della data di scadenza indicata;
- prima dell'esecuzione del saggio, versare un numero sufficiente di semi in una capsula Petri, richiudere la busta e conservarla al buio. I semi da utilizzare per il saggio devono essere scelti casualmente tra quelli nella capsula Petri, scartando quelli rotti o visibilmente danneggiati. Alla fine della semina, scartare i semi rimanenti (non riporli nella busta con gli altri semi rimanenti);
- i semi non devono essere imbibiti con acqua prima del saggio.

Acqua

Per la preparazione dei controlli negativi e positivi e delle soluzioni della sostanza da sottoporre alla prova, utilizzare acqua di qualità 2 o migliore, secondo UNI EN ISO 3696. Per i controlli positivi usare reagenti puri per analisi.

Materiali

- Capsule Petri monouso Ø 100 mm in policarbonato;
- filtri in carta Ø 90 mm (sono risultati idonei filtri Whatman N° 1)
- pinzette in acciaio inox a punte arrotondate;
- sacchetti di polietilene per refrigerazione alimenti da 23 x 32 cm;
- righello millimetrato;
- consigliato: cartoncino nero formato A4. L'apparato radicale (bianco) è più facilmente misurabile su uno sfondo nero.

Strumentazione

Termostato con regolazione della temperatura a $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ senza ventilazione né illuminazione.

Procedimento

I campioni di matrici solide (sedimenti, fanghi di depurazione e di attività produttive, suoli) non devono essere essiccati prima del saggio. Se necessario, setacciarli a umido (preferibilmente con un setaccio con maglie di 2 mm) e conservare i campioni setacciati a $-(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ per prevenire la degradazione microbica delle sostanze organiche eventualmente presenti (Rif. ISO 10381-6: 1993).

Il contenuto di acqua e la capacità di ritenzione idrica del materiale setacciato devono essere determinati prima del saggio (Rif. ISO 11274: 1998).

L'esecuzione del saggio prevede i seguenti passaggi:

- pesare direttamente in ciascuna delle 4 capsule Petri l'equivalente di 10 g di massa secca del campione ed aggiungere la quantità d'acqua ultrapura necessaria per raggiungere il 100 % di ritenzione idrica;
- aggiungere altri 5 mL di acqua ultrapura (oppure 5 mL della soluzione, alla concentrazione voluta, di un composto chimico, se viene effettuato un saggio con aggiunte);
- distribuire omogeneamente in ciascuna capsula Petri la sospensione risultante;
- sovrapporre con le pinzette il filtro;
- utilizzando le pinzette e scegliendo casualmente i semi, disporre 10 semi in ordine sparso sul filtro di ciascuna capsula Petri;
- chiudere le capsule Petri con il proprio coperchio (scrivendo con un pennarello indelebile data, nome della pianta e codice del campione sul coperchio stesso);
- disporre in pila le quattro repliche di ciascun campione/controllo e racchiudere ciascuna pila in un sacchetto di polietilene per alimenti (per evitare possibili contaminazioni incrociate da inquinanti volatili eventualmente presenti in uno dei campioni e minimizzare l'evaporazione);

- chiudere il sacchetto con l'apposito legaccio e riporre le capsule Petri per 72 ore in un termostato non ventilato, al buio ed a una temperatura di 25 ± 2 °C. Per evitare che, durante lo sviluppo dell'apparato radicale, i coperchi delle Petri vengano sollevati, con possibile aumentata evaporazione e conseguente essiccamento dei semi, porre un peso sulla capsula Petri superiore di ciascuna pila.

Controllo negativo

Per ciascuna specie preparare un controllo negativo predisponendo 4 capsule Petri contenenti ciascuna il filtro di carta e 5 ml di acqua ultrapura e procedere come per i campioni da sottoporre alla prova. Realizzare 3 carte di controllo per: 1) numero di semi germinati, 2) allungamento radicale, 3) indice di germinazione percentuale. Scartare l'intera busta di semi e ripetere la prova ogni volta che il risultato ottenuto per il controllo negativo eccede i limiti di fiducia al 95% per una o più delle carte di controllo. Inoltre, se necessario, utilizzare anche un controllo negativo con una adatta matrice solida con caratteristiche simili.

La Norma ASTM E 1598 – 94 prevede che possano essere impiegati: sabbia di quarzo lavata; perline di vetro; un suolo naturale di opportuna composizione; un suolo artificiale "standard". Il protocollo USEPA (1988; Meier *et al.*, 1997) prevede invece l'uso di sabbia silicea (20 mesh), che può essere utilizzata anche per preparare varie diluizioni (0, 25, 50, 75 e 100 %) del campione solido da testare. La bozza della Norma ISO/CD 17126 (2001) utilizza come mezzo di crescita sabbia quarzosa lavata fine (dimensioni 0,4 – 0,8 mm) coperta da altra sabbia più grossolana (0,7 – 1,2 mm o 0,8 – 1,4 mm). Infine, la bozza di una nuova Guideline OECD (2000) ripropone un protocollo (OECD, 1984) per la preparazione di un suolo artificiale composto da: 10 % torba di sfagno; 20 % argilla contenente non meno del 30 % di caolinite; 70 % sabbia quarzosa industriale: carbonato di calcio (0,3 – 1,0 %) per ottenere un pH iniziale di $6,0 \pm 0,5$. Anche per i sedimenti (USEPA, 1994) viene proposto di utilizzare un materiale artificiale, composto da 77 % di sabbia, 17 % di silt/argilla; 5 % di sostanza organica e 1 % di un opportuno tampone (carbonato di calcio o di calcio e magnesio).

Determinazioni

Il saggio deve essere effettuato utilizzando semi di tutte e tre le specie indicate: *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo).

Saggio di confronto

Si effettua quando i campioni possono essere sottoposti al saggio tal quali. Il relativo risultato viene espresso come Indice di Germinazione Percentuale relativo al controllo negativo. In questo caso non è possibile calcolare una EC_x.

Saggio preliminare

Si effettua quando è necessario calcolare una concentrazione efficace EC_x di una matrice ambientale, o di un composto chimico addizionato ad una matrice

ambientale, e il saggio di confronto non fornisce significative informazioni sull'intervallo di concentrazioni entro cui può cadere l'ECx. Preparare una scansione di concentrazioni della matrice solida effettuando diluizioni solido-solido; il campione viene mescolato nelle opportune proporzioni con una matrice solida, anch'essa naturale o prodotta artificialmente.

Saggio finale

Si effettua quando è richiesta la determinazione di una ECx. Il saggio va ripetuto seguendo la procedura indicata precedentemente ed utilizzando una scansione di concentrazioni che ricadono nel campo identificato dal saggio preliminare.

Durata del saggio

Per tutte le specie di piante, il tempo di incubazione è di $(72 \pm 0,5)$ ore.

la misurazione dell'allungamento radicale di tutti i semi deve essere effettuata entro 1 ora dal termine dell'incubazione. Nel caso in cui il numero complessivo di semi non consenta la misurazione entro questo tempo, si consiglia di congelare tutte le capsule Petri a $(-18 \pm 2)^\circ\text{C}$ ancora chiuse nei sacchetti e conservarle a questa temperatura fino al momento della misurazione. Estrarre dal congelatore uno solo dei sacchetti contenenti le 4 repliche, lasciarlo scongelare a temperatura ambiente e procedere alla misurazione dell'apparato radicale di tutti i semi prima di procedere nell'identico modo con un sacchetto successivo.

Misurazione

Alla fine del saggio, per ciascuna replica: conteggiare il numero di semi germinati (si considerano germinati i semi per i quali si abbia un allungamento radicale visibile di almeno 1 mm); per cetriolo e crescione, misurare con un righello millimetrato la lunghezza di tutta la plantula, dall'emergenza dal seme all'apice radicale (Figura 1), con l'approssimazione al millimetro più vicino (se necessario, utilizzando due pinzette per raddrizzare il tratto da misurare. Per il sorgo, misurare separatamente germoglio e radice (il germoglio tipicamente ha un diametro superiore e forma conica, mentre la radice è più filiforme).

Prendere nota di qualsiasi eventuale caratteristica insolita dei semi/radici (presenza di muffe, colorazioni anomale, ecc.).

Validità dei risultati

La germinazione dei semi nei controlli negativi deve essere $> 90\%$.

Germinazione ed allungamento radicale nel controllo devono essere compresi entro i limiti fiduciali definiti dalle rispettive carte di controllo delle medie e degli intervalli.

Il valore dell'EC₅₀ stimato per la sostanza di riferimento, per la stessa partita di semi, deve essere compreso entro i limiti fiduciali definiti nella relativa carta di controllo. Nel caso in cui queste condizioni non fossero rispettate, scartare l'intera busta di semi e ripetere la prova con una busta nuova.

Espressione dei risultati

Saggio di confronto

Al termine del saggio, per ciascun organismo utilizzato, procedere ai calcoli di seguito elencati.

Numero medio \bar{N}_c di semi germinati nelle 4 capsule del controllo negativo:

$$\bar{N}_c = \frac{(N_{c1} + N_{c2} + N_{c3} + N_{c4})}{4}$$

dove N_{ci} è il numero di semi germinati nella i-esima capsula Petri del controllo negativo.

Calcolare la lunghezza media \bar{L}_{c1} dell'allungamento radicale dei semi germinati nella capsula Petri N. 1 del controllo negativo:

$$\bar{L}_{c1} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{c1}} L_i}{N_{c1}}$$

dove:

N_{c1} è il numero di semi germinati nella capsula Petri N 1 del controllo negativo;

L_i è la lunghezza dell'allungamento radicale dell'i-esimo seme germinato nella capsula Petri N 1 del controllo negativo.

Calcolare analogamente le lunghezze medie delle capsule Petri N. 2, 3 e 4 del controllo negativo.

Calcolare la media $\bar{\bar{L}}_c$ delle medie dell'allungamento radicale delle 4 capsule Petri del controllo negativo:

$$\bar{\bar{L}}_c = \frac{(\bar{L}_{c1} + \bar{L}_{c2} + \bar{L}_{c3} + \bar{L}_{c4})}{4}$$

Calcolare l'Indice di Germinazione medio $\bar{\bar{IG}}_c$ del controllo negativo

$$\bar{\bar{IG}}_c = \frac{(IG_{c1} + IG_{c2} + IG_{c3} + IG_{c4})}{4}$$

dove l'Indice di Germinazione IG_{ci} per ciascuna capsula Petri i-esima del controllo negativo è pari a:

$$IG_{ci} = N_{ci} \cdot \bar{L}_{ci}$$

Trasformare i dati in percentuale per ottenere l'Indice di Germinazione % per ciascuna delle 4 capsule del controllo negativo secondo la seguente espressione:

$$IG\%_{ci} = \frac{IG_{ci}}{IG_c} 100$$

Calcolare i limiti di fiducia al 95 % per:

- numero medio di semi germinati nel controllo negativo;
- lunghezza media dell'apparato radicale;
- per il sorgo, anche per la lunghezza media del germoglio;
- Indice di Germinazione percentuale.

Ripetere i calcoli per il campione sottoposto alla prova per ottenere:

- numero medio di semi germinati \bar{N}_s ;
- l'allungamento radicale medio \bar{L}_{si} di ciascuna capsula Petri;
- la media \bar{L}_s delle medie dell'allungamento radicale;;
- l'Indice di Germinazione IG_{si} di ciascuna capsula Petri.

l'Indice di Germinazione %, rispetto al controllo negativo, di ciascuna capsula Petri del campione sottoposto al saggio:

$$IG\%_{si} = \frac{IG_{si}}{IG_c} 100$$

Calcolare i limiti di fiducia al 95 % per:

- numero medio di semi germinati nel campione sottoposto al saggio;
- lunghezza media dell'apparato radicale;
- per il sorgo, anche per la lunghezza media del germoglio;
- Indice di Germinazione percentuale.

Stabilire se il campione sottoposto alla prova presenta una biostimolazione (IG% campione > IG% controllo) od una inibizione (IG% campione < IG% controllo) statisticamente significative, utilizzando un opportuno metodo di valutazione statistico (da specificare nel rapporto di analisi).

Ripetere il confronto statistico per il numero di semi germinati e per l'allungamento radicale (per il sorgo, anche per la lunghezza del germoglio).

Saggio finale

Nel caso di valutazione di un campione tal quale, effettuare i calcoli indicati per il saggio di confronto.

Per una scansione delle concentrazioni, effettuare i calcoli indicati per il saggio di confronto per ciascuna delle concentrazioni sottoposte al saggio.

Calcolare l'ECx ed i relativi limiti di fiducia con un opportuno modello di calcolo, ad esempio probit, logit, ormesi, o altri, da indicare nel rapporto di analisi. Se richiesto, calcolare i valori NOEC e LOEC.

Presentazione dei risultati

Per ciascuno dei 3 semi utilizzati nella prova indicare i seguenti risultati.

Saggio di confronto

Indicare l'Indice di Germinazione percentuale, riferito al controllo negativo ed i relativi limiti di fiducia.

Indicare il valore medio dei semi germinati ed i relativi limiti di fiducia.

Indicare la lunghezza media dell'allungamento radicale dei semi germinati ed i relativi limiti di fiducia. Per il sorgo, indicare anche la lunghezza media del germoglio dei semi germinati e relativi limiti di fiducia.

Saggio finale

Per il campione tal quale, indicare i valori prescritti per il saggio di confronto.

Per una scansione delle concentrazioni, indicare i valori prescritti per il saggio di confronto per tutte le concentrazioni sottoposte al saggio.

Indicare il valore di EC_x, o i valori di EC_x se calcolati per diverse percentuali di effetto, e relativi limiti di fiducia.

Se richiesto, indicare i valori di NOEC e LOEC.

Interpretazione dei risultati

I valori di IG%, EC_x, NOEC e LOEC rappresentano dati tossicologici derivati da sperimentazioni di laboratorio realizzate in condizioni di riferimento definite. Tali valori danno indicazioni di rischi potenziali, ma non possono essere direttamente utilizzati per prevedere gli effetti nell'ambiente naturale. Quando si interpretano i valori di EC_x, NOEC e LOEC, occorre prendere in considerazione la forma delle curve di tossicità.

Rapporto del saggio

Il rapporto del saggio deve includere le informazioni seguenti:

- a) Il riferimento del presente metodo;
- b) Campione del saggio:
 - Campione ambientale:*
 - riferimento al verbale di prelievo;
 - temperatura e durata di conservazione;
 - eventuali trattamenti di filtrazione, centrifugazione, decantazione, congelamento e scongelamento.
 - Composto chimico:*
 - dati di identificazione chimica.
- c) Organismo utilizzato:
 - specie;
 - origine;
 - numero del lotto e scadenza del lotto.

d) Dettagli concernenti il saggio:

- data di inizio;
- concentrazioni sottoposte a saggio;
- eventuale solvente utilizzato;
- apparecchiatura per l'incubazione;
- temperatura.

e) Risultati:

Controllo negativo

- numero medio di semi germinati;
- allungamento radicale medio;
- indice di germinazione percentuale e relativi limiti di fiducia;

Controllo positivo

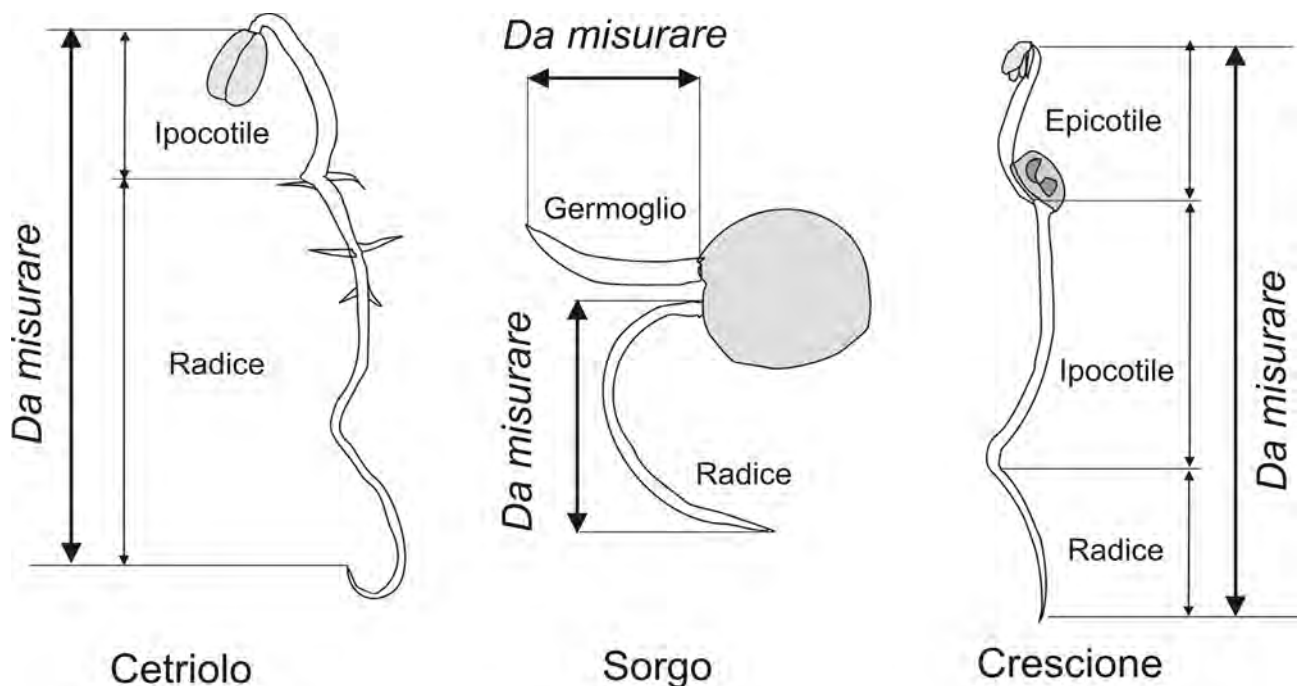
- valore di EC50 e relativi limiti di fiducia e specificazione del metodo di calcolo utilizzato;

Campione di prova

- numero medio di semi germinati;
- allungamento radicale medio;
- indice di germinazione percentuale e relativi limiti di fiducia;
- valori di ECx, se calcolati, con i relativi limiti di fiducia ed indicazione del metodo di calcolo utilizzato;
- se richiesto i valori NOEC e LOEC ed i relativi metodi di calcolo utilizzati.

f) Eventuali osservazioni su circostanze che possano aver avuto influenza sui risultati

Figura 1 - Schema dei semi germinati, con indicazione del tratto da misurare (per semplicità indicato come "apparato radicale")



Riferimenti bibliografici

- Committee Draft ISO/CD 17126. 2001. *Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Seedling emergence, screening test with lettuce (Lactuca sativa (L.))*. ISO/TC 190/SC 4 N 181.
- Food and Drug Administration, 1984. *Seed germination. Environmental assessment technical guide No. 11.06 (Draft)*. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Center for Veterinary Medicine, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.
- IRSA, 1983. *Analisi della fitotossicità della sostanza organica in decomposizione mediante bioassaggio Lepidium sativum*. In: *Metodi analitici per i fanghi. Parametri biochimici e biologici. Quaderni IRSA*, 64: 8.1-8.3.
- Meier J.R., Chang L.W., Jacobs S., Torsella J., Meckes M.C. and Smith M.K., 1997. *Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls*. *Env. Toxicol. Chem.*, 16: 928-938.
- OECD, 1984. *OECD Guideline for testing chemicals 207. Earthworm Acute Toxicity Test*. Adopted: 4 April 1984.
- OECD, 1984. *Terrestrial plants: Growth test*. OECD Guidelines for testing of chemicals, Paris: No. 208.
- OECD, 2000. *OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Proposal for a new guideline. Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/andrei)*. OECD Draft Document, January 2000.
- USEPA, 1988. *Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites*. Office of Research and Development, Corvallis, OR: EPA 600-3-88-029.
- USEPA, 1994. *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*. Office of Research and Development, Duluth, Minnesota 55804: EPA 600/R-94/024.
- USEPA, 1996. *Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test*. EPA 712-C-96-154. April 1996.

3.4.2 Saggi su animali

La fauna del suolo è un'importante componente degli ecosistemi edafici in quanto è coinvolta in numerosi aspetti della decomposizione della sostanza organica, contribuisce alla regolazione dell'attività microbica, del ciclo dei nutrienti e della struttura del suolo. La degradazione e l'inquinamento del suolo possono causare cambiamenti qualitativi e quantitativi della fauna del suolo, con conseguenze anche gravi sul funzionamento del suolo (Bruce *et al.*, 1997; Chauvat e Ponge, 2002; Gillet e Ponge, 2003). L'uso di bioindicatori può consentire di valutare tali cambiamenti. Van Straalen (1998), in una revisione inerente le comunità di microartropodi edafici, specifica come i bioindicatori giochino un ruolo fondamentale nei programmi di monitoraggio del suolo. La fauna edafica impiegata nel monitoraggio degli inquinanti include Nematodi, Enchitreidi, Oligocheti, Gasteropodi, Collemboli, Isopodi, Aracnidi (Cortet *et al.*, 2000). Nell'ambito di un singolo taxon, sono state individuate alcune specie come organismi nei saggi di ecotossicologia.

Riferimenti bibliografici

- Bruce, L.J., McCracken, D.I., Foster, G.N., Aitken, M.N., 1997. *The effects of cadmium and zinc-rich sewage sludge on epigeic Collembola populations*. Pedobiologia 41, 167-172.
- Chauvat, M., Ponge, J.F., 2002. *Colonization of heavy metal-polluted soils by collembola: preliminary experiments in compartmented boxes*. Appl. Soil Ecol. 21, 91-106.
- Cortet, J., Gomot de Vaullery, A., Poinsot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D., 2000. *The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects*. Eur. J. Soil Biol. 35 (3), 115-134.
- Gillet, S., Ponge, J.F., 2003. *Changes in species assemblages and diets of Collembola along a gradient of metal pollution*. Appl. Soil Ecol. 22, 127-138.
- Van Straalen, N.M., 1998. *Evaluation of bioindicator systems derived from soil arthropod communities*. Appl. Soil Ecol. 9, 429-437.

3.4.2.1 Saggio di riproduzione di *Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*

Principio del metodo

In questo saggio di laboratorio il campione in esame viene aggiunto ad un terreno artificiale dove vengono posti lombrichi adulti della specie *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) o *Eisenia andrei* (Andre, 1963). Dopo 4 settimane di esposizione sono determinati la mortalità e gli effetti sulla crescita su lombrichi adulti. Gli adulti sono rimossi dal suolo e gli effetti sulla riproduzione sono valutati dopo altre 4 settimane, contando la discendenza presente nel suolo. Il tasso di riproduzione dei lombrichi presenti nel terreno da testare è paragonato a quello del controllo.

Eisenia fetida/Eisenia andrei sono considerate specie rappresentative dei lombrichi, informazioni ambientali sull'ecologia dei lombrichi ed il loro uso nella sperimentazione ecotossicologica sono disponibili in bibliografia.

Attrezzature

Contenitori con capacità variabile tra 1 e 2 litri. I contenitori dovrebbero avere un'area di sezione trasversale di circa 200 cm² in modo che si raggiunga l'altezza di circa 5-6 cm di substrato umido quando si aggiungono una quantità equivalente a 500 - 600 g di sostanza secca (s.s). La copertura del contenitore deve essere tale da permettere lo scambio gassoso tra il substrato e l'atmosfera e l'accesso della luce, mentre dovrebbe prevenire la fuga dei lombrichi (per esempio utilizzando una copertura trasparente e forata). Se la quantità di substrato usato per il saggio è significativamente più di 500-600 g s.s. per contenitore, il numero di lombrichi deve esser aumentato in proporzione.

È richiesto un normale equipaggiamento di laboratorio, in particolare:

- bilance in grado di pesare singoli lombrichi e suolo;
- pHmetro;
- apparato per determinare il contenuto in acqua nel substrato (per esempio contenitore per essiccare);
- registratore di temperatura;
- misuratore di luce;
- equipaggiamento per miscelare o applicare;
- incubatrice o camera climatizzata.

Preparazione del suolo artificiale

Come bianco, viene utilizzato un suolo artificiale preparato secondo le Linee Guida 207 dell'OECD e costituito dai seguenti componenti (basati sulla massa secca):

Componente del suolo	Quantitativo, espresso sul % di massa secca
Torba di sfagno (essiccata), finemente macinata e senza residui visibili di piante	10
Argilla caolinica (essiccata), contenente non meno del 30 % di caolinite	20
Sabbia industriale quarzosa (essiccata), con predominanza di sabbia fine con più del 50 % della massa costituita da particelle di dimensioni comprese tra 0,05 e 0,2 mm (quantità dipendente dalla quantità di carbonato di calcio richiesto)	70
Carbonato di calcio (CaCO ₃ , polverizzato, grado analitico) per ottenere un pH iniziale di 6.0 ± 0.5	0,3-1,0

Nota: il pH è misurato in un campione mescolato in una soluzione di 1 mol/L di KCl. La quantità di CaCO₃ richiesta dipenderà dai componenti del substrato, incluso il cibo, e deve essere determinata misurando, immediatamente prima del saggio, sotto-campioni di suolo.

I costituenti secchi del suolo sono interamente mescolati (per esempio in un mixer da laboratorio a grande scala). Uno o due giorni prima dell'inizio del saggio, il suolo secco artificiale è inumidito mediante l'aggiunta di acqua deionizzata in modo da ottenere approssimativamente metà del contenuto finale in acqua, cioè dal 40% al 60% della massima capacità di ritenzione idrica (corrispondente a 50 ± 10% di umidità della massa secca). La massima capacità di ritenzione idrica del suolo artificiale è determinata in accordo con le procedure descritte nelle norme ISO 11274 (1992) .

All'inizio del saggio, il suolo pre-umidificato è diviso in porzioni corrispondenti al numero di concentrazioni da testare e di controlli usati per il saggio. Il contenuto di umidità è portato a 40-60% della massima capacità di ritenzione idrica aggiungendo la soluzione con la sostanza da testare e/o aggiungendo acqua distillata o deionizzata.

Il contenuto di umidità e il pH del suolo sono determinati all'inizio e alla fine del saggio. Queste determinazioni devono essere eseguite in un campione di controllo e in un campione di ogni concentrazione da testare. Il pH del suolo non deve essere modificato quando sono testate sostanze acide o basiche.

Selezione e preparazione degli animali per i saggi

Le specie usate nel saggio sono *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei*. Per iniziare il saggio sono necessari lombrichi adulti con età compresa tra 2 mesi e 1 anno e dotati di clitello. I lombrichi devono essere selezionati da un allevamento sincronizzato con età relativamente omogenea (Appendice 1_[CJ3]) e gli individui in un gruppo da utilizzare nel saggio non devono differire in età per più di 4 settimane.

I lombrichi selezionati devono essere acclimatati per 1-7 giorni al substrato che verrà usato per il saggio. Durante questo periodo, i lombrichi devono essere nutriti con lo stesso cibo che si utilizzerà durante il saggio.

Si preparano 10 lombrichi per ogni contenitore di controllo e di trattamento. I lombrichi vengono lavati e asciugati e in seguito posizionati su carta assorbente per un breve periodo, per permettere l'eliminazione dell'acqua in eccesso.

I gruppi di 10 lombrichi devono essere pesati individualmente prima di essere collocati nei contenitori per l'inizio del saggio. La massa umida dei singoli lombrichi deve essere tra 300 e 600 mg.

Procedimento

Allestimento dei contenitori e posa dei lombrichi

Vengono preparati almeno quattro contenitori per ogni concentrazione da esaminare e quattro per il controllo. Subito prima dell'inizio del saggio, si riempiono i contenitori per il saggio, mescolando il campione da esaminare con il substrato di base inumidito e poi si pongono sulla superficie i lombrichi pesati.

Si consiglia una quantità di 10 lombrichi in 500-600 g di massa secca di suolo (cioè 50-60 g di suolo per lombrico). Se si usano quantità maggiori di suolo, il carico di 50-60 g di suolo per lombrico dovrebbe essere mantenuto, incrementando il numero di lombrichi.

Per evitare errori sistematici nella distribuzione dei lombrichi nei contenitori, l'omogeneità della popolazione da testare deve essere determinata mediante pesata singola di 20 lombrichi, campionati con metodologia random dalla popolazione da cui verranno estratti quelli per il saggio. Avendo assicurato l'omogeneità, gruppi di lombrichi sono selezionati, pesati e assegnati ai contenitori per il saggio usando una procedura random.

I lombrichi in buono stato di salute, normalmente, si interrano subito sotto la superficie del substrato e, di conseguenza, quelli che rimangono in superficie dopo 15 minuti possono essere danneggiati e devono essere sostituiti. Se i lombrichi sono sostituiti, i nuovi lombrichi devono essere pesati in modo da considerare il peso totale di partenza del contenitore.

I contenitori sono coperti e posti nelle camere del saggio.

Condizioni del saggio

La temperatura del saggio è di $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Il saggio è effettuato con cicli controllati di luce/buio (preferibilmente, 16 ore di luce e 8 di buio) con illuminazione variabile tra 400 e 800 lux nell'area dei contenitori.

I contenitori non sono aerati durante il saggio. Aprirli una volta la settimana, per nutrire gli organismi, è considerato sufficiente per permettere gli scambi gassosi.

Il contenuto idrico del substrato di suolo nei contenitori è mantenuto costante durante il periodo del saggio, tramite pesate periodiche dei contenitori. L'acqua persa è rinnovata come necessario. Alla fine del saggio, il contenuto d'acqua non deve differire per più del 10 % da quello di partenza.

Nutrimiento

Si considera accettabile qualsiasi cibo di qualità idonea al mantenimento del peso dei lombrichi durante il saggio. L'esperienza ha mostrato che letame bovino essiccato e finemente macinato è un cibo idoneo. Si raccomanda di utilizzare letame procurato direttamente, poiché l'esperienza ha mostrato che il letame bovino usato come fertilizzante per il giardino e disponibile commercialmente può avere effetti negativi sui lombrichi.

Ogni partita fresca di cibo deve essere data ad un allevamento di lombrichi non utilizzato per il saggio, prima di essere usata in un saggio, per assicurare che il cibo sia di qualità adeguata. La crescita e la produzione di bozzoli non devono ridursi in paragone a quelle dei lombrichi tenuti in un substrato che non contiene la nuova partita di cibo.

Il cibo è fornito il giorno dopo aver aggiunto i lombrichi ai contenitori per il saggio. Circa 5 g di cibo secco finemente tritato sono sparsi sulla superficie del suolo di ogni contenitore e inumiditi con acqua potabile (da 5 a 6 mL per contenitore). Successivamente, il cibo è fornito una volta alla settimana durante le 4 settimane del periodo di saggio. Se il cibo avanza, la razione deve essere ridotta, in modo da evitare la crescita di funghi o di muffe. Gli adulti sono estratti dal suolo il ventottesimo giorno del saggio. Ulteriori 5 g di cibo sono poi forniti ad ogni contenitore. Durante le rimanenti 4 settimane di saggio, non viene somministrato altro nutrimento.

Durata del saggio e misure

Il ventottesimo giorno, i lombrichi adulti vivi sono osservati e contati; inoltre, sono registrati cambiamenti nel comportamento (per esempio incapacità di interrarsi nel suolo, immobilità contro la parete di vetro del contenitore) e nella morfologia (per esempio ferite aperte). Tutti i lombrichi adulti sono in seguito rimossi dai contenitori, contati e pesati.

Il suolo, privato dei lombrichi adulti ma contenente i bozzoli prodotti, è posto in incubazione per 4 ulteriori settimane con le stesse condizioni del saggio, eccetto per il fatto che il nutrimento viene somministrato solo una volta all'inizio di questa fase.

Al termine del saggio, si determina il numero di giovani prodotti al termine delle 8 settimane di durata (Appendice 2). Devono essere registrati anche tutti i segni di danno.

Validità del saggio

Perché un saggio venga considerato valido, i seguenti criteri dovrebbero essere soddisfatti nei controlli:

- ogni ripetizione (contenente 10 adulti) deve produrre ≥ 30 giovani entro la fine del saggio;
- il coefficiente di variazione di riproduzione deve essere $\leq 30\%$;
- la mortalità degli adulti nelle 4 settimane iniziali del saggio deve essere $\leq 10\%$.

Espressione dei risultati

Si determina la fecondità (cioè il numero di giovani prodotti). La media aritmetica (\bar{X}) e la varianza (s^2), sia per il trattamento, sia per il controllo di riproduzione, sono calcolate come segue:

$$[1] \quad \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^k X_i}{k}$$

$$[2] \quad s^2 = \frac{1}{k-1} \left[\sum_{i=1}^k X_i^2 - \frac{\left[\sum_{i=1}^k X_i \right]^2}{k} \right]$$

dove:

k = numero di repliche (contenitori) per trattamento o controllo;

x = numero di giovani per contenitore durante il periodo di durata dell'esperimento;

\bar{X} = media per trattamento;

s^2 = varianza per trattamento.

\bar{X} e s^2 sono usate per le procedure di Anova come anche il test t- di Student, il test di Dunnett o di Williams, come anche il calcolo degli intervalli di confidenza del 95% in accordo alla formula:

$$[3] \quad \bar{X} \pm t_{0,05;df} \frac{s}{\sqrt{k}}$$

dove:

\bar{X} = media per trattamento (equazione [1]),

s = deviazione standard per trattamento,

k = numero di repliche (contenitori) per trattamento o controllo,

$t_{0,05;df}$ = valore di t da tabella per 0,05 (ambivalente) e

gradi di libertà $df = k-1$.

Se è stata effettuata l'analisi della varianza, s e df dovrebbero essere rimpiazzati con la varianza comune stimata rispettivamente mediante ANOVA e i suoi gradi di libertà. Prima di analizzare i dati dei controlli, essi devono essere

testati per verificare che non siano significativamente differenti. Le equazioni 1, 2 e 3 sono solitamente calcolate con programmi statistici commerciali, usando i risultati “per contenitore” come repliche.

Il bisogno di ulteriori analisi statistiche e inferenze dipende da se i valori delle repliche sono normalmente distribuiti e omogenei relativamente alla loro varianza.

Stima del NOEC: le procedure di Kolmogoroff-Smirnov e di Bartlett sono usate rispettivamente per testare i dati di omogeneità e normalità della varianza. Con dati omogenei e normalmente distribuiti, devono essere effettuati t-test multipli come il saggio di Dunnett o quello di William ($\alpha = 0,05$, monovalente). Bisogna notare che, nel caso di replicazione differente, i valori tabulati del t devono essere corretti come suggerito da Dunnett e Williams. Talvolta, a causa di una grande variazione, i risultati non aumentano/diminuiscono in modo monotono. In questo caso il saggio di Dunnett non porta a valori ragionevoli di NOEC/LOEC ed è meglio preferire il saggio di Williams. Alternativamente, può essere usato un U-test multiplo, per esempio l'U-test di Bonferroni secondo Holm (1979).

Stima dell'EC_x: per calcolare ogni valore di EC_x, le medie per trattamento (\bar{x}) sono usate per l'analisi della regressione dopo che è stata ottenuta una funzione appropriata di dose-effetto. Un valore di regressione r^2 e/o l'inclinazione devono essere trovati con l'analisi della regressione prima della stima dell'EC_x tramite inserimento di un valore corrispondente all'x% della media del controllo nell'equazione ottenuta dall'analisi della regressione. I limiti di confidenza del 95% associati con un EC_x sono calcolati secondo Finney (1971).

Alternativamente, i risultati possono essere espressi come percentuale di inibizione relativa al controllo. In questo caso, la curva sigmoide normale (logistica) può spesso essere applicata ai risultati usando la procedura di regressione dei probit (Finney, 1971). Comunque, se è stata osservato l'effetto ormesi (biostimolazione), l'analisi dei probit deve essere sostituita da una logistica a 4 parametri o funzione di Weibull, corrispondente a una procedura di regressione non lineare.

Se si è applicato un test limite e i prerequisiti delle procedure parametriche del saggio (normalità, omogeneità) sono soddisfatte, può essere usato il test t di Student (pair wise). Nel caso che essi non si incontrino, è appropriata la procedura dell'U-test di Mann-Whitney.

APPENDICE 1: Allevamento di *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*

L'allevamento deve preferibilmente essere collocato in una camera climatica a $20^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$. A questa temperatura e fornendo cibo sufficiente, i lombrichi diventeranno maturi dopo 2 o 3 settimane.

Entrambe le specie possono essere allevate in un'ampia gamma di rifiuti animali. Il nutrimento raccomandato è una miscela 50:50 di letame di cavallo o di bovino e torba. Esso deve avere un pH da 6 a 7 (sistemato con carbonato di calcio), una bassa conduttività ionica (meno di 6 mg o 0,5 % di concentrazione salina) e non deve essere eccessivamente contaminato con ammoniaca o urina animale. Il substrato deve essere umido, ma non troppo. Sono adatti contenitori per il nutrimento da 10-50 l.

Per ottenere lombrichi di età e misura (massa) adatte, è meglio iniziare l'allevamento dai bozzoli (*cocoons*). Una volta che l'allevamento è stato avviato, viene mantenuto mettendo i lombrichi adulti in un contenitore di nutrimento con substrato fresco per 14-28 giorni, in modo da permettere la produzione di altri bozzoli. Gli adulti sono poi rimossi e i giovani prodotti dai bozzoli usati come base per i successivi allevamenti. I lombrichi sono nutriti con continuità con deiezioni animali e trasferiti in substrato fresco di volta in volta. I lombrichi fatti schiudere dai bozzoli sono usati per i saggi quando gli adulti hanno da 2 a 12 mesi.

I lombrichi possono essere considerati in salute se si muovono attraverso il substrato, non tentano di abbandonarlo e si riproducono in modo continuo. Un esaurimento del substrato è indicato da movimenti molto lenti dei lombrichi che presentano anche l'estremità posteriore del corpo gialla. In questo caso è necessario aggiungere substrato fresco e/o ridurre la densità di approvvigionamento.

APPENDICE 2: Tecniche per la conta di giovani lombrichi schiusi dai bozzoli

Contare a mano i lombrichi nel suolo porta via molto tempo. Si suggeriscono quindi 2 metodi alternativi:

1. I contenitori del saggio sono posti in un bagno d'acqua inizialmente a una temperatura di 40°C che viene innalzata fino a 60°C . Dopo circa 20 minuti i giovani lombrichi appaiono sulla superficie del suolo, da cui possono essere facilmente rimossi e contati.
2. Il suolo può essere lavato con un setaccio utilizzando il metodo sviluppato da van Gestel *et al.* avendo cura che la torba e il letame bovino siano ridotti a una polvere fine. Due setacci con maglie di 0.5 mm (diametro di 30 cm) sono impilati. Il contenuto di un contenitore per il

saggio è lavato attraverso i setacci con un getto potente di acqua corrente, lasciando i giovani lombrichi e i bozzoli per lo più nel setaccio superiore.

E' importante notare che l'intera superficie del setaccio superiore deve essere mantenuta umida durante questa operazione in modo che i giovani lombrichi galleggino su un film d'acqua al fine di evitare che essi cadano attraverso le maglie del setaccio. I risultati migliori si ottengono quando si usa un rubinetto a doccia.

Quando tutto il suolo è stato lavato attraverso i setacci, giovani e bozzoli possono essere risciacquati dal setaccio superiore dentro una ciotola. Il contenuto della ciotola è lasciato tranquillo per un breve periodo in modo da permettere ai bozzoli vuoti di galleggiare sulla superficie dell'acqua e a quelli pieni e ai giovani lombrichi di affondare verso il fondo. L'acqua rimanente può essere gettata via e i bozzoli e i giovani lombrichi possono essere trasferiti in una capsula Petri contenente un po' d'acqua. I lombrichi possono essere spostati per la conta usando un ago o un paio di pinzette.

L'efficienza del metodo usato per rimuovere i lombrichi (e i bozzoli se necessario) dal substrato di suolo deve sempre essere determinato. Se i giovani sono raccolti usando la tecnica della raccolta manuale è consigliabile ripetere due volte l'operazione su tutti i campioni.

Riferimenti bibliografici

- Bouché M.B., 1972. *Lombriciens de France, Ecologie et systématique*. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- Commissione delle Comunità Europee, 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN.
- Dunnett C.W., 1955. *A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control*. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- Dunnett C.W., 1964. *New tables for multiple comparisons with a control*. Biometrics 20, 482-491
- Edwards C.A., 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
- Edwards C.A. and Lofty J.R., 1996. *Biology of Earthworms*, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.
- Finney D.J., 1971. *Probit Analysis* (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press
- Greig-Smith P.W., Becker H., Edwards P.J. and Heimbach F. (eds.), 1992. *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept.
- Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee N.L. 133/95. *Tossicità per i Lombrichi*.

- Holm S., 1979. *A simple sequentially rejective multiple test procedure*. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- ISO (International Standard Organization), 1992. *Soil Quality –Determination of water retention characteristics – Laboratory methods*, No. 11274. ISO, Geneve.
- ISO (International Standard Organization),1993. *Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method*, No. 11465. ISO, Geneve.
- ISO (International Standard Organization), 1993. *Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)*. Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.
- ISO (International Standard Organization),1994. *Soil Quality - Determination of pH*, No. 10390. ISO, Geneve.
- ISO (International Standard Organization), 1996. *Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)*. Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.
- ISO (International Standard Organization), 1999. *Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)*. Part 3: Guidance on the determination effects in field situations, No.11268-3. ISO, Geneve
- Jaenicke J., 1982. '*Eisenia foetida*' is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.
- Kula C., 1996. *Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species Eisenia fetida/Eisenia andrei – comparison of two ringtests*. In: Riepert, F., Kula, C., 1996. Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesanst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.
- Miller R.G., Jr., 1986. *Beyond ANOVA, basics of applied statistics*. New York, NY: John Wiley & Sons.
- OECD, 1984. Guideline for testing chemicals 207. *Earthworm acute toxicity test*. Adopted: 4 April 1984.
- OECD, 2000. *Guideline for testing chemicals*. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia foetida/andrei*). January 2000.
- Oien N. and Stenerson J., 1984. *Esterases of earthworm - III. Electrophoresis reveals that Eisenia foetida (Savigny) is two species*. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 - 282.
- Römbke, J. and Moser Th., 1999. *Report on an International Ringtest with the Enchytraeid Reproduction Test*. UBA-Text 4/99, 223 pp.
- SETAC, 1998. *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.
- Sokal R.R. and Rohlf F.J., 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York

- US-EPA, 1996. *Ecological effects test guidelines. OPPTS Earthworm Subchronic Toxicity Test*. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7104). EPA712-C-96-167, April 1996.
- Van Ewijk P.H. and Hoekstra J.A., 1993. *Calculation of the EC₅₀ and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present*. *Ecotox. Environ. Safety* 25, 25-32.
- Van Gestel, C.A.M., van Dis W.A., van Breemen E.M and Sparenburg P.M., 1988. *Comparison of two methods for determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments*. *Pedobiologia* 32, 367 - 371.
- Williams D.A., 1972. *The comparison of several dose levels with a zero dose control*. *Biometrics* 28, 519-531.
- Williams D.A., 1971. *A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control*. *Biometrics* 27, 103-117.

3.4.2.2 Saggio di riproduzione di *Folsomia candida*

Principio del metodo

Il saggio consente di determinare gli effetti sulla riproduzione di *Folsomia candida* provocati da sostanze aggiunte al suolo artificiale in concentrazioni crescenti. Può essere impiegato per valutare e/o comparare gli effetti di trattamenti di rimediazione ed effetti subletali o non tossici di composti chimici.

Il metodo non è applicabile a sostanze volatili, sostanze per le quali H (costante di Henry) o il coefficiente del rapporto aria/acqua è maggiore di 1.

All'interno del gruppo dei collemboli, *Folsomia candida* (Willem, 1902) è la specie individuata per i saggi letali e sub-letali (ISO 11267:1999); Sandifer e Hopkin, 1987; Crommentuijn et al., 1993; Crommentuijn et al., 1995; Sandifer e Hopkin, 1996; Hopkin, 1997; Trublaevich e Semenova, 1997; Cortet et al., 2000; Fountain e Hopkin, 2001; van Gestel e Mol, 2003). *Onychiurus armatus* (Bengtsson et al., 1985; Tranvik et al., 1993), *Orchesella cincta* (Joosse e Buker, 1979; Joosse e Verhoef, 1983; Nottrot et al., 1987; van Straalen et al., 1987; van Straalen et al., 1989; Posthuma 1990; Posthuma et al., 1992), *Isotoma notabilis* (Tranvik et al., 1993), *Sinella communis* (Greenslade e Vaughan, 2003), *Tetrodontophora bielanensis* (Gräff et al., 1997) ed altre specie di collemboli (Chauvat e Ponge, 2002) vengono impiegate in saggi di laboratorio ma non raggiungono lo stesso livello di routine usato per *F. candida*.

Di seguito viene riportata la procedura del saggio di inibizione della riproduzione di *Folsomia candida*. Vengono quindi riportati alcuni dei principi del metodo ISO 11267:1999, preparato in accordo con la *Technical Committee ISO/TC 190, Soil Quality, Subcommittee SC 4, Biological methods*.

Animali impiegati nel saggio

I collemboli impiegati nel saggio, ottenuti da uova deposte da adulti maturi di *F. candida*, devono avere un'età compresa tra 10 e 12 giorni. Generalmente, nelle condizioni di controllo, i giovani compaiono dopo 28 giorni.

Preparazione del suolo artificiale

Il suolo impiegato nel saggio consiste di: suolo artificiale secco di base (definito suolo artificiale in accordo con la norma ISO 11268-1), sostanza da testare e acqua deionizzata.

Suolo artificiale base

Componenti	Quantitativo, espresso sul % di massa secca
Torba di sfagno, essiccata all'aria, finemente macinata e senza residui visibili di piante	10
Argilla caolinica, essiccata all'aria, contenente non meno del 30 % di caolinite	20

Sabbia industriale quarzosa, essiccata all'aria, con predominanza di sabbia fine (con più del 50 % della massa costituita da particelle di dimensioni comprese tra 0,05 mm a 0,2 mm)	70
--	----

È prevista l'aggiunta (generalmente 0,5-1 %) di carbonato di calcio (CaCO_3), polverizzato e di grado analitico riconosciuto, per portare il pH (con soluzione 1 mol/L di KCl) a $6,0 \pm 0,5$ all'inizio del saggio. Il pH deve essere determinato in accordo con il metodo ISO 10390.

Nota: la quantità di carbonato di calcio richiesta dipende dalle componenti del suolo artificiale e deve essere determinata immediatamente prima del saggio attraverso misurazione su subcampioni.

I costituenti secchi vengono aggiunti nelle corrette proporzioni e miscelati accuratamente attraverso un agitatore (da laboratorio a grande scala o da agitatore casalingo). Durante la miscelazione viene richiesta l'aggiunta di una quantità di acqua deionizzata. La miscela ottenuta è il suolo artificiale base. Se necessario, viene aggiunta ulteriore acqua per dare una consistenza friabile al suolo artificiale e non permettere ai collemboli di penetrare nelle cavità del suolo.

Generalmente, il contenuto di acqua deve essere compreso tra 40 e 60 % della massima capacità di ritenuta idrica, che viene determinata in accordo con le norme ISO 11274. Il contenuto di acqua e il pH devono essere misurati prima dell'inizio del saggio e alla fine, sia per il controllo che per ciascuna concentrazione testata.

Suolo artificiale di controllo (bianco)

Consiste in un suolo artificiale base con l'aggiunta di acqua deionizzata.

Sostanze di riferimento

Per garantire la qualità del procedimento, i saggi devono essere tarati regolarmente (una o due volte all'anno) con sostanze di riferimento. I composti Betanal plus (p.a._[CJ4] 160g/l Phenmedipham) e E 605 forte _[CJ5](p.a._[CJ6] 507,5 g/l Parathion) sono stati testati in ring test e raccomandati come sostanze di riferimento.

Attenzione: Quando vengono aggiunte queste sostanze, devono essere prese appropriate precauzioni per evitare l'ingestione e il contatto cutaneo.

Nota: Betanal plus: effetti sulla riproduzione ($\alpha = 0,05$) sono stati osservati a concentrazioni comprese tra 100 mg e 200 mg di prodotto per kg di suolo artificiale secco. E 605 forte: effetti sulla mortalità e riproduzione sono stati osservati a concentrazioni comprese rispettivamente tra 0,18 e 0,32 mg di prodotto e tra 0,1 e 0,18 mg di prodotto per kg di suolo artificiale secco.

Materiali e attrezzature

- Contenitori in vetro (con possibilità di chiusura) di circa 100 mL di capacità e diametro di circa 5 cm;

- strumentazione per la misura del pH e del contenuto in acqua del suolo artificiale;
- aspiratore per trasferire i collemboli;
- camera con temperatura costante a $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- sorgente di luce con intensità costante di 400÷800 lux alla superficie del suolo; ciclo luce/buio 12h:12h oppure 16h:8h.

Procedimento

Concentrazioni

a) NOEC

Per dare una stima del LOEC/NOEC sul tasso di riproduzione devono essere preparate almeno 5 concentrazioni, in una serie geometrica con un fattore non eccedente 2_[CJ7].

b) ECx

Per il calcolo dell'ECx devono essere preparate un numero maggiore di concentrazioni (12) e ciascuna concentrazione deve essere testata con almeno 2 repliche. La distanza tra le concentrazioni può variare (più piccola a basse concentrazioni e maggiore a concentrazioni più elevate).

Le concentrazioni della sostanza testata vengono espresse come massa di sostanza per massa secca di suolo artificiale (mg/kg).

Se nessun altro dato di tossicità è disponibile, le concentrazioni selezionate per individuare il LOEC/NOEC o ECx devono essere basate su risultati di saggi preliminari.

Aggiunta al suolo artificiale delle sostanze da testare

Sostanze solubili in acqua

Immediatamente prima di iniziare il saggio, la quantità di sostanza da testare deve essere sciolta nell'acqua richiesta per le repliche di ogni concentrazione e miscelata accuratamente con il suolo artificiale di base. Il suolo così contaminato può essere introdotto nei contenitori del saggio.

Sostanze insolubili in acqua ma solubili in solventi organici

Sciogliere la quantità di sostanza richiesta per ottenere la concentrazione desiderata in un solvente volatile (come acetone o esano) e miscelare accuratamente con la porzione di sabbia richiesta. Dopo aver evaporato il solvente sotto cappa aspirante, aggiungere gli altri componenti del suolo artificiale base (in proporzione alla quantità di sabbia utilizzata) e l'acqua, miscelare accuratamente e introdurre la miscela nei contenitori del saggio.

Attenzione: quando vengono trattati vapori di solventi pericolosi per inalazione o esplosione, devono essere prese appropriate precauzioni.

Nota: Per disperdere le sostanze con bassa solubilità acquosa possono essere utilizzati ultrasuoni, solventi organici, emulsionanti. Quando tali sostanze ausiliare vengono impiegate, tutte le concentrazioni testate e quella di controllo devono contenere lo stesso quantitativo minimo di sostanze ausiliarie.

Sostanze insolubili in acqua o in solventi organici

Per sostanze insolubili in un solvente volatile, preparare una miscela di 10 g di sabbia industriale fine e la quantità di sostanza richiesta nel saggio per ottenere la concentrazione desiderata. Aggiungere le rimanenti componenti del suolo artificiale di base (in proporzione alla quantità di sabbia utilizzata) e l'acqua deionizzata, miscelare accuratamente e introdurre la miscela nei contenitori del saggio.

Introduzione degli organismi

In ciascun contenitore vengono introdotti 10 collemboli di età compresa tra 10 e 12 giorni. Il prelievo dei collemboli dai contenitori di allevamento può essere effettuato con facilità utilizzando un aspiratore. Prima di essere trasferiti nei contenitori, gli individui devono essere contati e controllati, per evitare di introdurre individui già morti e quindi commettere errori sperimentali.

Contenitori di controllo

Preparare i contenitori per il controllo (bianco) con la stessa procedura dei contenitori contaminati, senza aggiungere la sostanza da testare. Se la preparazione del saggio richiede l'uso di sostanze ausiliarie, allestire contenitori addizionali di controllo. Trattare questi ultimi come quelli contenenti suolo contaminato.[CJ8]

Saggi preliminari (opzionali)

Quando è necessario determinare il range di concentrazioni da utilizzare nei saggi finali, effettuare un saggio acuto preliminare per determinare la mortalità dei collemboli, preparando quattro concentrazioni della sostanza da testare e una condizione di controllo (ad es. 0 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg e 1.000 mg/kg). Preparare i contenitori per il saggio come illustrato precedentemente, introdurre 10 individui di età compresa tra 10 e 12 giorni in ogni contenitore e disporre questi ultimi nella camera climatizzata con la sorgente luminosa come descritto in precedenza.

All'inizio del saggio, aggiungere circa 2 mg di lievito secco in granuli in ogni contenitore e chiudere il contenitore con un coperchio in plastica o in vetro o con parafilm. Periodicamente aprire i contenitori per qualche minuto per consentire l'aerazione e il rifornimento di cibo.

Trascorsi 14 giorni, contare i collemboli vivi in ciascun contenitore e determinare la percentuale di mortalità per ogni concentrazione. Osservare quindi i collemboli sopravvissuti e annotare eventuali sofferenze o anomalie. A causa della rapida degradazione del corpo dei collemboli morti, gli individui che non vengono rinvenuti nel contenitore devono essere conteggiati come morti durante il saggio.

Nota: Per ottenere informazioni ulteriori per la determinazione del range di concentrazioni da adottare nel saggio finale, la durata del saggio preliminare può essere estesa a 4 settimane. Ciò consente di supporre, attraverso una valutazione qualitativa, gli effetti delle concentrazioni testate sulla riproduzione.

Saggi finali

Le concentrazioni da utilizzare nei saggi finali vengono individuate in relazione ai risultati ottenuti dai saggi preliminari o da dati di tossicità. Le sostanze non devono essere testate a concentrazioni superiori a 1000 mg/kg di massa secca di suolo artificiale.

Per ogni concentrazione, miscelare le sostanze in esame con il suolo artificiale come descritto in precedenza e disporre in ogni contenitore del saggio (definito replica) circa 30 g di suolo artificiale secco. Evitare di comprimere il suolo per facilitare gli spostamenti dei collemboli nel contenitore. Per ciascuna concentrazione e per il controllo devono essere preparate 5 repliche.^[CJ9] Se l'approccio scelto è l'individuazione del valore di EC_x, preparare almeno 2 repliche per ciascuna concentrazione e 5 per il controllo. Per la misura del pH e dell'umidità del suolo artificiale, viene raccomandata la preparazione di contenitori addizionali per ciascuna concentrazione e per il controllo.

All'inizio del saggio e dopo un periodo di 14 giorni, aggiungere circa 2 mg di lievito secco in granuli a ciascun contenitore e coprire nuovamente il contenitore (con un coperchio in plastica o un disco in vetro o con parafilm). Aprire i contenitori per breve tempo due volte alla settimana per l'aerazione.

Determinare il contenuto in acqua e il pH (con soluzione 1 mol/L di KCl) del suolo artificiale all'inizio e alla fine del saggio. Quando vengono saggiate sostanze acide o basiche, il pH non deve essere corretto.

Dopo due settimane, controllare il contenuto in acqua ripesando i contenitori addizionali e compensare la perdita di acqua, se questa eccede il 2% del contenuto iniziale di acqua.

Determinazione dei collemboli sopravvissuti

Il saggio prevede il conteggio del numero di collemboli dopo 4 settimane dall'introduzione degli stessi nei ^[CJ10]contenitori dei saggi e nel controllo. La procedura prevede di versare il suolo artificiale di ogni replica in contenitori di 500-600 mL di capacità, aggiungere acqua e miscelare delicatamente la sospensione con una spatola. Attraverso questa operazione i collemboli, galleggiando sulla superficie dell'acqua, possono essere facilmente contati. Il saggio prevede di contare gli adulti e i giovani, quando presenti, attraverso una procedura illustrata nell'Appendice 2 e riportarne il numero.

Nota: possono essere impiegati altri metodi di estrazione dopo aver appurato la loro efficacia.

Calcolo ed espressione dei risultati

I dati devono essere presentati in forma tabulare, indicando il numero medio di adulti e giovani per ciascuna concentrazione. Ulteriori test statistici dipenderanno da:

- a) se è stato scelto l'approccio del NOEC o ECx;
- b) se i valori delle repliche sono normalmente distribuiti e hanno varianza omogenea.

Approccio NOEC

Per ogni concentrazione si deve procedere ad una analisi statistica della omogeneità e normalità dei risultati delle repliche, ad esempio utilizzando rispettivamente i test di Kolmogoroff-Smirnov e di Barlett. Con i dati distribuiti normalmente e omogenei, si deve quindi procedere ad un'analisi statistica appropriata, ad esempio con il test di Dunnett o di Williams ($\alpha = 0,05$, a una coda). Se le richieste non sono soddisfatte, si raccomanda di utilizzare metodi non parametrici (es. il test Mann & Whitney o il test U di Bonferroni).^[CJ11]

Approccio ECx

Per calcolare i valori di ECx, dopo aver ottenuto una funzione dose-risposta appropriata, vengono utilizzate nell'analisi della regressione le medie dei trattamenti. L'ECx desiderato viene ottenuto inserendo il valore della x (espresso come percentuale della media del controllo) nell'equazione ottenuta dalla regressione^[CJ12]. I limiti di confidenza possono essere ottenuti avvalendosi del teorema di Fieller.

Alternativamente, i risultati del trattamento possono essere espressi come percentuale dei risultati del controllo o come inibizione percentuale relativa al controllo.

Espressione dei risultati

Indicare i risultati ottenuti in milligrammi per chilogrammo (mg/kg) di suolo secco, evidenziando:

- la più bassa concentrazione saggiata con differenza significativa rispetto al controllo (LOEC);
- la concentrazione immediatamente precedente al LOEC (NOEC);

e, opzionale:

- la concentrazione alla quale la riproduzione è ridotta del 10% rispetto al controllo (EC10);
- la concentrazione alla quale la riproduzione è ridotta del 50% rispetto al controllo (EC50).

Nell'interpretazione dei dati ottenuti nei saggi devono essere considerate tutte le osservazioni effettuate.

Validità del saggio

Per considerare valido il saggio al suo termine, i contenitori di controllo devono avere i seguenti requisiti:

- la mortalità degli adulti non deve eccedere il 20 %;
- il tasso di riproduzione deve raggiungere un minimo di 100 individui (in stadi di sviluppo diversi) in ogni contenitore;
- il coefficiente di variazione della riproduzione nel controllo non deve eccedere il 30 %.

Rapporto del saggio

Nel rapporto del saggio devono essere indicati i riferimenti delle ISO seguite e i risultati ottenuti come illustrato in precedenza, provvedendo a fornire le seguenti informazioni:

- a) descrizione dettagliata della sostanza saggiata e informazioni sulle proprietà chimiche e fisiche, qualora siano utili per l'interpretazione dei risultati;
- b) descrizione completa del materiale biologico utilizzato (individui, età, condizioni di allevamento, rifornimento di cibo);
- c) metodo di preparazione del suolo artificiale impiegato nel saggio ed eventuali indicazioni delle sostanze ausiliarie utilizzate per sostanze a bassa/nulla solubilità in acqua;
- d) risultati ottenuti dai saggi con le sostanze di riferimento, quando effettuati;
- e) condizioni dettagliate in cui è stato effettuato il saggio;
- f) tabella riportante le percentuali di mortalità degli adulti di ciascuna concentrazione e del controllo;
- g) numero di adulti morti o scomparsi e numero di giovani per ogni contenitore alla fine del saggio;
- h) in relazione all'approccio statistico individuato, elencare la concentrazione più bassa che causa effetti (LOEC), la più alta concentrazione che non causa alcun effetto (NOEC), EC10 e EC50 per l'inibizione della riproduzione ed il metodo utilizzato per i calcoli (opzionale);
- i) descrizione di ogni patologia o altro sintomo, o cambiamenti riconoscibili nel comportamento degli organismi all'interno di ogni contenitore;
- j) contenuto in acqua e valore di pH del suolo artificiale all'inizio e alla fine del saggio nel suolo di controllo e in ogni concentrazione;
- k) ogni dettaglio operativo non specificato sopra o ogni fattore che può influenzare i risultati o consentirne una più corretta interpretazione.

APPENDICE 1: Tecniche di allevamento dei collemboli

1 - Metodo proposto nella ISO 11267:1999

Substrato di allevamento

Utilizzare gesso di Parigi (gesso per stucco, pH 6,4) e carbone attivo (carbone attivo polverizzato con pH tra 6 e 7), miscelati in rapporto 8:1 (eventualmente anche in rapporto di 9:1 o 10:1). In relazione al tipo di gesso, aggiungere 60÷100 g di acqua a 100 g di miscela. L'acqua aggiunta consente una elevata umidità del substrato mentre il carbone assorbe i gas prodotti dalle feci. Inoltre, essendo *F. candida* pressoché bianca, la colorazione nera di fondo facilita le osservazioni.

La presenza di umidità sulla superficie del substrato è essenziale per la sopravvivenza e la crescita dei collemboli. Il pH può essere facilmente determinato impiegando indicatori di pH posti direttamente sulla superficie umida.

Contenitori di allevamento

Utilizzare contenitori in plastica di volume pari a 400 mL. Riempire i contenitori con uno spessore di circa 1 cm di substrato di allevamento e aggiungere eventualmente acqua deionizzata fino alla saturazione. Il contenuto di umidità può essere mantenuto pressoché costante attraverso l'utilizzo di uno "stoppino" assorbente imbibito di acqua e inserito nel substrato o attraverso l'aggiunta diretta di acqua deionizzata con l'uso di una pipetta. Il substrato deve essere saturo ma senza la presenza di acqua sulla superficie.

Chiudere il contenitore di allevamento utilizzando un coperchio ed aerare periodicamente (in combinazione con l'aggiunta di cibo) togliendo il coperchio per breve tempo.

Se necessario, il coperchio può essere perforato per favorire l'aerazione.

Condizioni climatiche

Per il mantenimento dell'allevamento è consigliato allestire una camera con temperatura controllata di 20÷22 °C, 70÷80 % di umidità relativa e illuminazione costante di 400÷800 lux (o ciclo luce:buio di 16h:8h).

Cibo

Sia per l'allevamento che per i saggi, utilizzare lievito secco in granuli. Fornire cibo 1 o 2 volte alla settimana. Per evitare l'eccessivo sviluppo di funghi e muffe, fornire il cibo in piccole dosi e ad intervalli frequenti.

Trasferimento

Per ottenere nuovi allevamenti è sufficiente prelevare alcuni collemboli dagli allevamenti di partenza dopo circa 8 settimane e trasferirli in nuovi contenitori di allevamento attraverso l'uso di un aspiratore. Il trasferimento in nuovi contenitori solitamente induce la deposizione delle uova.

Organismi di età sincrona

Gli individui di età compresa tra 10 e 12 giorni che vengono utilizzati nei saggi si ottengono trasferendo gruppi di uova dai contenitori di allevamento ad un contenitore con suolo artificiale, utilizzando una piccola spatola o un pennellino fine (o un pelo di spazzola). Dopo 48 ore, rimuovere i gruppi di uova e alimentare gli individui ottenuti dalla schiusa.

Occorre evidenziare che i gruppi di uova possono essere facilmente raccolti quando vengono depositi su piccoli frammenti di substrato di allevamento o su vetrini appoggiati sulla superficie del substrato. Alternativamente, i giovani collemboli da impiegare nel saggio possono essere ottenuti ponendo alcuni adulti in piccoli contenitori con gesso di Parigi alla base e permettendo loro di deporre le uova per un periodo di 2 giorni. Dopo questo tempo, gli adulti devono essere rimossi dal contenitore. Trascorsi 12 giorni dalla comparsa delle prime neanidi, gli individui ottenuti dalla schiusa delle uova possono essere utilizzati nei saggi.

Per assicurare il successo della sincronizzazione, controllare i contenitori per la produzione delle uova prima di rimuovere gli adulti in quanto, spesso, gli adulti non rilasciano le uova immediatamente e in due giorni viene prodotto un numero di uova non sufficiente. In questo caso mantenere gli adulti nei contenitori di deposizione un giorno in più.

Evitare condizioni di sovraffollamento nei contenitori di allevamento. Come conseguenza, animali di età di 10-12 giorni possono essere di dimensioni troppo ridotte e incapaci di produrre un numero di uova sufficiente a soddisfare le richieste di validità del saggio.

Trasferimento dei collemboli nei contenitori del saggio

I collemboli vengono facilmente trasferiti dal substrato artificiale di allevamento al suolo artificiale del saggio attraverso un aspiratore automatico o un insufflatore manuale facilmente costruibile in laboratorio.

2 – Metodo di allevamento con l'uso di corteccia

Sul fondo di un contenitore in vetro disporre uno strato di circa 3-4 mm di carta bibula e, al di sopra di questo, alcuni frammenti di corteccia di platano^[CJ13], disposti gli uni sugli altri in quantità tale da ottenere uno spessore di circa 4-5 cm. La corteccia di platano deve essere raccolta in aree non inquinate, accuratamente lavata con acqua deionizzata e sterilizzata per alcuni minuti, allo scopo di eliminare eventuali sostanze residue, patogeni ed eventuali invertebrati (es. nematodi, acari). Inumidire la carta e la corteccia con acqua deionizzata fino ad ottenere una condizione di saturazione. Inserire quindi gli individui di *F. candida* e fornire loro cibo come illustrato in precedenza.

Dopo circa 8 settimane è possibile avviare un nuovo allevamento prelevando delicatamente alcuni frammenti di corteccia colonizzati da alcuni individui e con uova deposte e disporli in un nuovo contenitore preparato precedentemente. Chiudere il contenitore con cotone idrofobo o con un coperchio in plastica o in vetro. Fornire cibo e aerare il contenitore per 1-2 minuti^[CJ14] due volte alla settimana. Inumidire con acqua deionizzata ogni 3-4 giorni.

3 – Metodo di allevamento su suolo artificiale

Ottimi risultati nell'allevamento di *F. candida* si ottengono allevando gli animali direttamente sul suolo artificiale preparato secondo la procedura ISO 11267 e illustrato in precedenza.

In un contenitore in vetro o in plastica, disporre 2-3 cm di suolo artificiale preparato secondo la procedura illustrata in precedenza per il bianco, aggiungere acqua deionizzata e introdurre gli individui. Per facilitare il prelievo degli individui o delle uova per la sincronizzazione degli individui, disporre frammenti di vetrini portaoggetto sul suolo, tenuti sollevati dal suolo attraverso piccoli spessori di alcuni mm.

Dopo alcune settimane è possibile prelevare direttamente i frammenti dei vetrini e posizionarli in un nuovo contenitore o prelevare le uova deposte sugli stessi. Come illustrato in precedenza, chiudere il contenitore di allevamento con un coperchio e, ogni 3-4 giorni, aerarlo, inumidirne il contenuto e fornire cibo.

Alimentazione dei collemboli

Oltre al lievito secco in polvere, come previsto dall'ISO 11267, è possibile ottenere ottimi risultati di allevamento fornendo agli animali una miscela secca in polvere di avena, orzo, riso, mais, frumento. Buoni risultati si ottengono anche con l'uso di latte in polvere per uso umano.

Le tre metodiche di allevamento illustrate in precedenza sono risultate idonee oltre che per *F. candida* anche per altre specie di collemboli: *Sinella coeca*, *Heteromurus nitidus*, *H. tethrophthalmus*.

APPENDICE 2; Conteggio dei collemboli

Il saggio prevede il conteggio del numero di collemboli che galleggiano sulla superficie dell'acqua dopo che questa è stata aggiunta al suolo artificiale al termine del saggio. Quando i collemboli sono distribuiti uniformemente sulla superficie dell'acqua è possibile utilizzare un reticolo. L'aggregazione degli individui sulla superficie dell'acqua può essere evitata aggiungendo all'acqua una goccia di olio (di macchina da cucire).

Per contare gli animali è possibile effettuare una diapositiva della superficie dell'acqua e contare il numero di individui dalla proiezione della diapositiva.

Dettagli relativi alle lenti e all'illuminazione della macchina fotografica vengono riportati nella ISO 11267. Per favorire il contrasto tra la superficie dell'acqua e i collemboli, è possibile colorare l'acqua con inchiostro nero. L'errore medio del conteggio non deve essere superiore al 10%.

Per evitare errori nel conteggio tra individui vivi e morti, osservare gli individui attraverso uno stereomicroscopio.

APPENDICE 3: Determinazione degli effetti di suoli contaminati sulla riproduzione dei collemboli

Il metodo descritto nella ISO 11267 può essere adattato per comparare gli effetti sulla riproduzione di *Folsomia candida* di differenti tipi di suoli.

Principio

Vengono determinati gli effetti sulla mortalità e sulla riproduzione di individui sub-adulti di *F. candida* in suoli da testare e nel suolo di controllo. Se l'obiettivo è quello di valutare l'effetto di una contaminazione sospetta, il suolo utilizzato come controllo deve essere il più possibile simile in tutte le sue caratteristiche a quello da testare, eccetto la presenza del contaminante.

Strumentazione

Utilizzare le stesse strumentazioni illustrate in precedenza.

Procedimento

Preparazione del suolo da testare

Se è richiesto un suolo simile, devono essere determinate e riportate le seguenti caratteristiche:

- a. pH (in accordo con l'ISO 10390);
- b. capacità di scambio cationico (in accordo con l'ISO 11260)
- c. contenuto in sostanza organica (in accordo con l'ISO 10694)
- d. distribuzione delle dimensioni delle particelle (in accordo con l'ISO 11277)
- e. massa volumica apparente (in accordo con l'ISO 11272)
- f. contenuto in acqua (in accordo con l'ISO 11465)
- g. capacità di ritenuta idrica (in accordo con l'ISO 11274)
- h. biomassa microbica (in accordo con l'ISO 14240-1).

Fare almeno 5 repliche di ciascun suolo e del suolo di controllo.

Il suolo deve essere usato al 40-60 % della sua capacità di ritenuta idrica.

Determinare e riportare nel rapporto finale il pH e il contenuto di acqua dei suoli all'inizio e al termine del saggio.

Procedura del saggio

In ciascun contenitore aggiungere 10 individui di età compresa tra 10 e 12 giorni, disporre i contenitori nella camera climatizzata e procedere come illustrato in precedenza.

Espressione dei risultati

Per ciascun suolo determinare la percentuale di mortalità degli adulti e il numero di nuovi nati.

Confrontare le medie attraverso metodi statistici e test di significatività ($\alpha=0,05$) della differenza tra suolo contaminato e controllo.

Riferimenti bibliografici

- Bengtsson, G., Gunnarsson, T., Rundgren, S., 1985. *Influence of metals on reproduction, mortality and population growth in Onychiurus armatus (Collembola)*. J. Appl. Ecol. 22, 967-978.
- Crommentuijn, T., Brils, J., van Straalen, N.M., 1993. *Influence of cadmium on life-story characteristics of Folsomia candida (Willem) in an artificial soil substrate*. Ecotox. Environ. Saf. 26, 216-227.
- Crommentuijn, T., Doornekamp, A., van Gestel, C.A.M., 1997. *Bioavailability and ecological effects of cadmium on Folsomia candida (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter*. Appl. Soil Ecol. 5, 261-271.
- Crommentuijn, T., Stab, J.A., Doornekamp, A., Estoppey, O., van Gestel, C.A.M., 1995. *Comparative ecotoxicity of cadmium, chlorpyrifos and triphenyltin hydroxide for four clones of the parthenogenetic collembolan Folsomia candida in an artificial soil*. Funct. Ecol. 9, 734-742.
- Crouau, Y., Chenon, P., Gisclard, C., 1999. *The use of Folsomia candida (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants*. Appl. Soil Ecol. 12, 103-111.
- Fountain, M.T., Hopkin, S.P., 2001. *Continuous monitoring of Folsomia candida (Insecta: Collembola) in a metal exposure test*. Ecotox. Environ. Saf. 48, 275-286.
- Gilmore, S.K., Potter, D.A., 1993. *Potential role of Collembola as biotic mortality agents for entomopathogenic nematodes*. Pedobiologia 37, 30-8.
- Gräff, S., Berkus, M., Alberti, G., Köhler, H.R., 1997. *Metal accumulation strategies in saprophagous and phytophagous soil invertebrates: a quantitative comparison*. Biomet. 10, 45-53.
- Greenslade, P., Vaughan, G.T., 2003. *A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils*. Pedobiologia 47, 171-179.
- Hopkin, S.P., 1997. *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press.
- ISO 10390:1994, *Soil Quality – Determination of pH*.

- ISO 10694:1995, *Soil Quality* – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis).
- ISO 11260:1994, *Soil Quality* – Determination of effective cation exchange capacity and base saturation level using barium chloride solution.
- ISO 11267:1999, *Soil quality* – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants.
- ISO 11268-1:1993, *Soil Quality* – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.
- ISO 11272:1998, *Soil Quality* – Determination of dry bulk density.
- ISO 11274, *Soil Quality* – Determination of the water retention characteristic – Laboratory methods.
- ISO 11277: 1998, *Soil Quality* – Determination of particle size distribution in mineral soil material – Method by sieving and sedimentation.
- ISO 11465:1993, *Soil Quality* – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method.
- ISO 14240-1:1997, *Soil Quality* – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
- Joosse, N.G., Verhoef, S.C., 1983. *Lead tolerance in Collembola*. *Pedobiologia* 25, 11-18.
- Josse, N.G., Buker, J.P., 1979. *Uptake and excretion of lead by litter-dwelling collembola*. *Env.. Pol..* 18, 235-240.
- Nottrot, F., Joosse, E.N.G., van Straalen, N.M., 1987. *Sublethal effects of iron and manganese soil pollution on Orchesella cincta (Collembola)*. *Pedobiologia* 30, 45-53.
- OECD, 1984. *Earthworm, acute toxicity tests*. In OECD Guidelines for testing of chemicals section 2. Effects on biotic systems, OECD, Paris.
- Posthuma, L., 1990. *Genetic differentiation between populations of Orchesella cincta (Collembola) from heavy metal contaminated sites*. *J. Appl. Ecol.* 27., 609-622.
- Posthuma, L., Hogervorst, R.F., van Straalen, N.M., 1992. *Adaptation to soil pollution by cadmium excretion in natural population of Orchesella cincta (L.) (Collembola)*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22 (1), 146-156.
- Sandifer, R.D., Hopkin, S.P., 1987. *Effects of temperature on the relative toxicities of Cd, Cu, Pb and Zn to Folsomia candida (Collembola)*. *Ecotox. Environ. Saf.* 37, 125-130.
- Sandifer, R.D., Hopkin, S.P., 1996. *Effects of pH on the toxicity of cadmium, copper, lead and zinc to Folsomia candida Willem, 1902 (Collembola) in a standard laboratory test system*. *Chemosphere* 33 (12), 2475-2486.
- Smit, C.E., van Beelen, P., van Gestel, C.A.M., 1997. *Development of zinc bioavailability and toxicity for the springtail Folsomia candida in an experimentally contaminated field plot*. *Env. Poll.* 98 (1), 73-80.

- Tranvik, L., Bengtsson, G., Rundgren, S., 1993. *Relative abundance and resistance traits of two Collembola species under metal stress*. J. Appl. Ecol. 30, 43-52.
- Trublaevich, Z.N., Semenova, E.N., 1997. *Estimation of soil toxicity using a laboratory culture of springtails (Folsomia candida)*. Russian J. Ecol. 28, 335-338.
- Van Gestel, C. A. M., Mol, S., 2003. *The influence of soil characteristics on cadmium toxicity for Folsomia candida (Collembola: Isotomidae)*. Pedobiologia 47, 387-395.
- Van Straalen, N.M., Burghouts, T.B.A., Doornhof, M.J., Groot, G.M., Janssen, M.P.M., Josse, E.N.G., van Meerendonk, J.H., Theeuwen, J.P.J.J., Verhoef, H.A., Zoomer, H.R., 1987. *Efficiency of lead and cadmium excretion in populations of Orchesella cincta (Collembola) from various contaminated forest soils*. J. Appl. Ecol. 24, 953-968.
- Van Straalen, N.M., Schobben, J.H.M., de Goede, R.G.M., 1989. *Population consequences of cadmium toxicity in soil microarthropods*. Ecotox. Environ. Saf. 17 (2), 190-204.

3.4.2.3 Saggio di tossicità cronica con *Heterocypris incongruens*

Heterocypris è un genere cosmopolita che include circa 50 specie; nell'area circum Mediterranea ne sono state descritte più di 30 (Mc Kenzie, 1971, Martens *et al.*, 2002).

La specie *H. incongruens* in Italia è stata rinvenuta in risaie, pozze temporanee, bacini ed estuari di fiumi (Ghetti P.F. e Mc Kenzie K., 1981), è una tra le specie di Ostracodi che presenta la più alta diversità genetica (Rossi *et al.*, 1998).

Gli Ostracodi sono organismi bentici, si localizzano preferenzialmente nell'interfacies fra acqua e sedimento, di conseguenza risultano più sensibili, rispetto ad altri Crostacei, alla tossicità rilasciata dal substrato.

Principio del metodo

Il saggio prevede l'esposizione degli organismi alla matrice solida per 6 giorni e la valutazione della percentuale di mortalità (effetto acuto) e dell'inibizione della crescita (effetto cronico) rispetto ai risultati ottenuti con una matrice di riferimento.

Applicazione

Suoli, sedimenti, fanghi.

Materiali, reagenti, apparecchiature

- Piastre a 12 pozzetti, Ø 20 mm per espletamento del saggio;
- piastre multipozzetti con parete a fondo sottile (es. a 54 pozzetti a forma quadrata, lato 10 mm), per le letture dell'accrescimento;
- piastre Petri (Ø 5 cm) per la schiusa, trasferimento Ostracodi e lettura mortalità;
- matraccio da 1 L;
- parafilm;
- micropipette in vetro per il trasferimento degli organismi;
- microsetaccio a maglie di 100 µm per eliminare le particelle solide alla fine del saggio;
- incubatore a 25 °C;
- stereomicroscopio;
- sali di grado analitico: MgSO₄ ; NaHCO₃ ; KCL ; CaSO₄ ·2H₂O;
- acqua milliQ o equivalente;
- soluzione fissativa Lugol;
- scala graduata trasparente di almeno 1 cm, con suddivisioni di 50 µm;
- cellule algali per nutrimento (*Pseudokirchneriella subcapitata*);
- spirulina in polvere per il *pre-feeding* degli Ostracodi neonati;
- matrice di riferimento esente da contaminanti (suolo, sedimento).

Preparazione della Standard Freshwater (Weber, 1993)

Per la preparazione della Standard Freshwater (a durezza moderata) solubilizzare i seguenti sali di grado analitico in 1 L di acqua Milli-Q o equivalente:

MgSO ₄	60 mg
NaHCO ₃	96 mg
KCl	4 mg
CaSO ₄ ·2H ₂ O	60 mg

Aerare per 1 notte.

La soluzione deve rispondere ai seguenti requisiti: pH 7.4 - 7.8; durezza 80 – 100 (mg/L CaCO₃); alcalinità 60 – 70 (mg/L CaCO₃).

La Standard Freshwater viene utilizzata per la schiusa delle cisti e per la preparazione della sospensione algale da usare come cibo. Prima dell'uso è necessario aerarla almeno 15 minuti.

Organismi per i saggi

Il saggio viene effettuato utilizzando individui neonati ≤ 24 h. Tali individui possono derivare da allevamenti o da uova durature (cisti).

Schiusa cisti

Se vengono utilizzate le uova durature, per la schiusa è necessario incubare le uova in piastre Petri con Standard Freshwater a 25°C \pm 2 per 52 h in condizioni di illuminazione continua (3000-4000 lux). Dopo 48 h dall'inizio della schiusa si effettua un *pre-feeding* con Spirulina e si prosegue l'incubazione per altre 4 h. Le uova durature si conservano a 4°C.

Misura organismi prima dell'inizio del saggio

Prima dell'inizio del saggio è necessario separare almeno 10 organismi neonati e misurarne la lunghezza. Dalla Petri in cui è avvenuta la schiusa trasferire gli organismi in pozzetti per la lettura. Posizionare la scala graduata al di sotto del pozzetto e procedere alla misurazione degli organismi allo stereomicroscopio. Utilizzare per il trasferimento micropipette in vetro a pareti sottili.

Occorre ricordare che gli organismi presentano il fenomeno della "tigmotassia" e tendono ad aderire alle superfici solide. E' necessario utilizzare micropipette in vetro con pareti molto lisce, maneggiare gli organismi con cautela in quanto sono piuttosto fragili;

- aggiungere una goccia di soluzione fissativa Lugol al pozzetto in cui sono stati trasferiti gli organismi e attendere alcuni minuti fino a quando non risultano completamente immobili;
- effettuare le misurazioni. Al termine della schiusa gli organismi hanno una lunghezza di circa 200-250 μ m.

Preparazione della sospensione algale

Nei suoli e sedimenti è presente una certa percentuale di sostanza organica, tuttavia non è sufficiente per il nutrimento degli ostracodi durante i 6 giorni di incubazione. E' opportuno aggiungere quantità standardizzate di cellule algali ai pozzetti di incubazione.

Risospingere le cellule algali con Standard Freshwater alla concentrazione di $1,5 \times 10^7$ cellule/mL.

Procedimento

Per ogni campione e controllo (substrato di riferimento) effettuare da 4 a 6 repliche. Utilizzare piastre multipozzetto (diametro 20 mm).

- Introdurre in ogni pozzetto 1 ml di sospensione algale in Standard Freshwater alla concentrazione di $1,5 \times 10^7$ cellule/mL. Mescolare e lasciar sedimentare 45 minuti;
- trasferire 10 ostracodi in ogni pozzetto mediante un pipetta in vetro. Questa operazione va effettuata allo stereomicroscopio;
- in ogni pozzetto aggiungere 1 mL di sospensione algale in Standard Freshwater alla concentrazione di $1,5 \times 10^7$ cellule/mL;
- In ogni pozzetto aggiungere una quantità nota di substrato, tale da coprire uniformemente tutto il fondo (generalmente 500 mg; la quantità dipende dalla granulometria del substrato). E' importante mantenere uguali e costanti le quantità del campione e del controllo da testare. Il controllo (substrato di riferimento) deve avere una granulometria simile a quella del campione da analizzare;
- chiudere le piastre con parafilm e coprire con il coperchio;
- tenere le piastre in posizione orizzontale e agitarle gentilmente, per favorire la distribuzione omogenea della matrice sul fondo del pozzetto;
- incubare le piastre 6 giorni a $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ al buio. Agitarle delicatamente dopo 3 giorni al fine di risospendere le alghe: si è constatato, infatti, che l'agitazione dopo 3 giorni di incubazione favorisce sostanzialmente la crescita degli ostracodi durante il periodo del saggio;
- al termine del periodo di incubazione, poiché la matrice solida preclude una buona osservazione degli organismi, è necessario trasferirli in idonei pozzetti per la lettura del saggio.

Si possono seguire due procedure:

- 1) risospendere il contenuto di ciascun pozzetto e setacciarlo attraverso un microsetaccio a maglie di 100 μm , mediante ripetute operazioni. Sciacquare sotto l'acqua corrente per allontanare le particelle più fini e trasferire il contenuto del setaccio (ostracodi e particelle di maggiori dimensioni) in piastra Petri, sciacquando ulteriormente con Standard Freshwater. Assicurarsi di aver trasferito tutto il contenuto del microsetaccio, ripetere l'operazione per ogni pozzetto; procedere alla valutazione della mortalità (vedi lettura saggio) e trasferire con micropipetta in vetro gli ostracodi vivi in un unico pozzetto della piastra per le letture;
- 2) effettuare la valutazione della mortalità (vedi lettura saggio) direttamente nel pozzetto di espletamento del saggio; trasferire con micropipetta in vetro gli organismi vitali nel pozzetto della piastra di lettura.

Letture del saggio

Valutazione Mortalità

Osservare allo stereomicroscopio gli organismi per valutarne la mortalità: si considerano non vitali gli organismi che anche dopo sollecitazione non presentano alcun movimento, compreso quello delle antenne.

Registrare gli organismi morti/vivi.

Valutazione accrescimento

Gli organismi vitali, trasferiti nelle piastre di lettura, vengono immobilizzati mediante l'aggiunta di 1 goccia di Lugol in ciascun pozzetto; chiudere la piastra ed attendere qualche minuto che avvenga l'immobilizzazione degli organismi.

Registrarne la lunghezza (utilizzo scala graduata 50 µm).

Trattamento dei dati ed espressione dei risultati

- Registrare il numero degli ostracodi morti in ogni replica del campione e del controllo. Il numero è determinato sottraendo il numero degli organismi vivi dal numero totale di organismi introdotti in ogni pozzetto all'inizio del saggio (è necessario un controllo rigoroso della quantità degli organismi introdotti);
- calcolare la mortalità percentuale delle repliche del campione e della matrice di riferimento;
- calcolare la mortalità media percentuale (M%) del campione e della matrice di riferimento, la deviazione standard ed il coefficiente di variazione;
- calcolare la lunghezza media dei 10 ostracodi misurati all'inizio del saggio;
- calcolare la media delle lunghezze degli ostracodi vivi in ogni replica del campione e del controllo;
- calcolare la lunghezza media di tutte le repliche del campione e del controllo;
- calcolare l'incremento medio in lunghezza degli ostracodi del campione e del controllo secondo la seguente formula:

$$L_{\text{incremento}} = L_f - L_i$$

dove:

L_f è la lunghezza media alla fine del saggio

L_i è la lunghezza media all'inizio del saggio

- calcolare la percentuale di inibizione della crescita (IG%, Inhibition Growth%) degli ostracodi nel campione secondo la formula:

$$IG\% = 100 - (L_{\text{incremento_campione}} / L_{\text{incremento_controllo}}) \times 100$$

Criteri di validità

La mortalità percentuale del controllo deve essere $\leq 20\%$.

L'incremento della crescita nel controllo con la matrice di riferimento deve essere almeno di 400 μm .

Riferimenti bibliografici

Ghetti P.F., Mc e Kenzie K., 1981. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, 11 OSTRACODI pp. 83.

Martens K., Schwartz S. S., Meisch C., Blaustein L., 2002. Non-marine Ostracoda (Crustacea) of Mount Carmel (Israel), with taxonomic notes on the Eucypridinae and circum-Mediterranean *Heterocypris*. *Isr. J. Zool.*, 48: 53-70.

Mc Kenzie K.G., 1971. Entomostraca of Aldabra, with special reference to the genus *Heterocypris* (Crustacea: Ostracoda). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 260: 257-297.

OSTRACODTOXKIT FTM 6 days chronic (mortality/growth inhibition) toxicity test with the ostracod *Heterocypris incongruens*
<http://www.microbiotests.be/product.htm>.

Rossi V., Schön I., Butlin R. K., Menozzi P., 1998. Clonal genetic diversity. In: K. Martens (ed.), Sex and parthenogenesis, evolutionary ecology of reproductive modes in non-marine ostracods. Backhuys, Leiden, pp. 257-274.

Weber C. I., 1993. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organism*. EPA/600/4-90/0271
<http://www.epa.gov/ost/WET/atx.pdf>.

3.4.2.4 Saggio di tossicità/genotossicità con *Panagrellus redivivus*

Principio

Questo metodo intende valutare l'impatto dei contaminanti contenuti in fase solida (suolo, sedimenti, fanghi di depurazione, ecc.) sul nematode *Panagrellus redivivus*, molto sensibile negli screening di routine per la valutazione della contaminazione chimica acuta o cronica (McInnis, 1995).

Organismi per il saggio

Durante un periodo di 96 ore, che rappresenta la durata della prova, il nematode attraversa quattro stadi di crescita contraddistinti da caratteristiche fisiologiche e dimensionali ben note (Samoiloff *et al.*, 1980).

J2	250-350 micrometri
J3	350-550 micrometri
J4	550-750 micrometri
A (adulto)	750-2000 micrometri

In presenza di sostanze contaminanti ad effetto tossico, si assisterà all'arresto della crescita o alla morte dell'organismo. Mediante il monitoraggio di un numero definito di individui (circa 100) per un tempo di 96 ore, in presenza di concentrazioni diverse della matrice ambientale, è possibile valutare gli effetti letali e/o subletali. In particolare, il numero di individui morti fornisce un'indicazione sull'effetto letale (tossicità acuta), mentre il numero di organismi ai vari stadi di crescita (J2, J3, J4) consente di stimare gli effetti subletali (tossicità cronica).

La crescita del nematode dallo stadio J2 a J3 o J4 prevede l'espressione di un numero limitato di geni. Invece, la crescita dallo stadio J4 allo stadio adulto, richiede l'intervento di un numero cospicuo di geni. Molti mutageni conosciuti possono inibire selettivamente il passaggio da J4 ad adulto, e quest'inibizione di crescita può essere utilizzata come un'indicazione del potenziale mutagenetico/genotossico del campione (Samoiloff, 1990).

Materiali

- Provette da campionamento (2,5 mL con fondo piatto) e coperchi;
- portaprovette (10 provette per ognuno);
- micro pipette Pasteur;
- pipette ammorbidite al fondo con il calore in modo da ottenere l'estremità lunga e sottile;
- tappi di gomma;
- capsule Petri in vetro;
- mini setaccio;
- rete da 12 micron, Nitex 3 100% Nylon Polyammide;
- pipette;
- porta pipette;

- puntali Eppendorf.

Apparecchiature

- Microscopio per dissezione con potenza 10X;
- oculare per misure con ingrandimento di 10X21;
- griglia 100 x 1 mm²;
- autoclave;

Mezzi di coltura

Soluzione di colesterolo

Poiché il *Panagrellus* necessita di steroidi per la maturazione, viene utilizzata questa soluzione che provvede agli steroidi richiesti per tutti i mezzi di crescita.

Colesterolo	0,5 g
Etanolo	0,1 l

- Conservare a 4 °C.

Tampone M9

Questo tampone è un liquido non nutriente utilizzato per trasferire i nematodi, limitarne la crescita e provvedere alle condizioni standard

Sodio fosfato dibasico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6,00 g
Potassio fosfato monobasico KH_2PO_4	3,00 g
Cloruro di sodio NaCl	5,00 g
Solfato di magnesio MgSO_4	0,25 g
Acqua distillata	1,00 l

- Dissolvere tutti gli ingredienti;
- sterilizzare a 121 °C per 15 minuti;
- conservare a 4 °C.

M9Y Media

Sodio fosfato dibasico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6,00 g
Potassio fosfato monobasico KH_2PO_4	3,00 g
Cloruro di sodio NaCl	5,00 g
Solfato di magnesio MgSO_4	0,25 g
Lievito	0,05 g
Acqua distillata	1,00 l

- Dissolvere tutti gli ingredienti;
- sterilizzare a 121 °C per 15 minuti;
- aggiungere 1 mL di soluzione di colesterolo alla sospensione calda;
- conservare a 4 °C.

Capsule acqua-agar

Per conservare le colture stock e come base per le femmine prima di partorire i piccoli J2

Agar	15,0 g
Soluzione di colesterolo	1,0 mL
Acqua distillata	1,0 l

- Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti;
- aggiungere 1mL di soluzione di colesterolo all'agar caldo dopo l'autoclavaggio;
- conservare a 4 °C.

Lievito supplementare

Lievito di birra	0,05 g
Acqua distillata	0,1 l

- Conservare a 4 °C oppure congelare fino all'utilizzo.

Mezzo di coltura di massa

Farina non raffinata	250 g
Acqua distillata	250 mL

- Mescolare la miscela farina/acqua (1:1) in modo accurato;
- inserirla in barattoli da 1 litro (coperti con un foglio di alluminio) oppure in capsule Petri da 100 mm;
- sterilizzare a 121 °C per 15 minuti;
- conservare a 4 °C in un contenitore a chiusura ermetica.

Coltura di mantenimento

La coltura dei nematodi viene conservata in un contenitore da un litro con il mezzo di coltura di massa farina/acqua (1:1). All'inizio di una nuova coltura, si trasferisce una popolazione di nematodi dal tampone M9 o da M9Y media al mezzo di coltura di massa farina/acqua. Dopo 2 o 3 settimane si osserverà una popolazione di milioni di nematodi. La nuova coltura di massa dovrà essere preparata ogni 4-6 settimane.

Le colture che dovranno essere utilizzate per testare i campioni vengono poste su capsule Petri usando lo stesso mezzo di coltura di massa farina/acqua. All'inizio di una nuova coltura, si trasferisce una popolazione di nematodi in M9Y media o in tampone M9 (uno o due gocce) al centro della capsula Petri. In due o tre settimane si osserveranno i nematodi al di sotto del coperchio della capsula. Questi piccoli dovranno essere usati per ottenere i piccoli J2 per la prova. Occorre attivare nuove colture ogni settimana, per garantire un adeguato rifornimento di J2 in buona salute.

Le popolazioni delle colture stock di nematodi possono essere mantenute su capsule di agar-acqua. Queste colture devono essere alimentate ogni 2-3 giorni con due gocce di una sospensione di lievito per capsula. Nuove sottocolture

possono essere ottenute sommergendo le vecchie piastre con circa 10 mL di M9Y media e poi trasferendo 2-4 mL di questa mistura tampone più nematodi ad una nuova piastra acqua-agar.

Procedimento

Per i saggi in fase solida viene usato M9Y media in rapporto 1:1 con il campione da esaminare.

Per preparare il campione da esaminare, 10 g di suolo vengono miscelati accuratamente con 10 mL di M9Y media per 3 minuti a temperatura ambiente. Questa miscela viene centrifugata a 10.000 rpm per 20 minuti. Questa soluzione campione/M9Y è utilizzata per le prove di tossicità/genotossicità.

I saggi di tossicità sono eseguiti con nematodi J2. Innanzitutto è molto importante che prima di eseguire il saggio si ottenga un adeguato numero di nematodi J2 di età simile.

Il giorno prima del saggio si prepara una piastra con la prole. I nematodi adulti (femmine gravide) sono trasferite dalla coltura stock alla piastra con acqua-agar fresco. Le femmine gravide sono organismi larghi, grassi, con la parte centrale del corpo scura e granulare a causa delle uova, embrioni e animali J1 al loro interno.

Esistono tre metodi per trasferire le femmine gravide:

1. Le piastre stock acqua-agar possono essere sommerse con tampone M9 e singole femmine prelevate con micropipette e trasferite in una nuova capsula acqua-agar sommersa con tampone M9;
2. le femmine possono essere prelevate dalla superficie asciutta dell'agar e trasferite, utilizzando un ago manicato affilato;
3. viene utilizzato il tampone M9, posto sulla parte inferiore del coperchio della piastra coltura massa, per lavare le femmine su di un filtro di 12 micron. Le femmine dalla superficie del filtro sono poi sciacquate in nuova piastra acqua-agar sommersa con circa 5-10 mL di tampone M9.

In tutti i casi, dopo 12 ore (una notte circa) i nematodi adulti nel tampone M9 producono individui J2 su di una nuova piastra acqua-agar.

Ogni femmina produce 10-20 piccoli in 12 ore. Senza cibo i piccoli J2 non crescono.

Per selezionare i piccoli J2 che vengono utilizzati per il saggio, è opportuno rifiltrare la miscela vecchia di 12 ore di tampone M9 contenente i nematodi adulti e i J2 mediante un filtro da 12 micron. Questo filtro separerà gli adulti dai nuovi nematodi J2. Gli adulti potranno essere conservati e usati per l'avvio di una nuova coltura.

I piccoli J2 filtrati dalla piastra prole sono versati in una piastra Petri vuota per facilitare la manipolazione e l'osservazione al microscopio.

Questi piccoli J2 raccolti devono essere trasferiti nelle provette da 2,5 mL con il fondo piatto. Questo trasferimento richiede l'uso di micropipette.

Usando le micropipette, 10 piccoli J2 sono prelevati dalla piastra e posti in una provetta controllo. Per evitare che i nematodi si secchino, occorre prelevare una riga di 10 provette alla volta. Con la pratica 10 piccoli possono essere prelevati con meno di 5 microlitri di tampone M9. È molto importante non utilizzare un eccesso di tampone M9 per il trasferimento dei nematodi in quanto un volume in eccesso diluisce il campione da saggiare e se il volume della provetta controllo eccede i 0,5 mL, i nematodi muoiono per mancanza di ossigeno.

Ad ognuna delle 10 provette nella prima fila viene aggiunto 0,5 mL di un controllo negativo M9Y . In ogni provetta della fila seguente è aggiunto 0,6 mL del campione preparato. Così, ogni fila di 10 vaschette avrà un totale di 100 nematodi e un volume totale di campione di 5 mL.

Si coprono le provette e i nematodi vengono fatti crescere per un periodo di 96 ore ad una temperatura tra 19-25 °C.

Dopo il periodo di crescita di 96 ore, le provette sono riaperte e viene contato il numero di sopravvissuti e la lunghezza di ognuno.

Per misurare la lunghezza dei nematodi è necessario uno stereo-microscopio con un ingrandimento di 10 X e oculari regolabili 10X21 con una griglia di 100 x 1 mm².

Per registrare più facilmente la differente grandezza dei nematodi, ci si può concentrare su una taglia per volta, cominciando con gli adulti di 750 µm, poi con i J3 di 350 µm e poi in ultimo i J4.

I nematodi, se necessario, possono essere soppressi per facilitarne la misurazione. Dopo avere contato i sopravvissuti, la vaschetta può essere immersa parzialmente in acqua calda (60 °C) per circa 10 secondi, tutti i nematodi sopravvissuti saranno raddrizzati e uccisi. Ciò renderà più facile misurarne la differente lunghezza, ma comporta un aumento del tempo per completare il saggio. Con la pratica, i nematodi potranno essere misurati ancora vivi.

Calcoli

Sopravvivenza

La sopravvivenza è il rapporto percentuale tra i sopravvissuti nel campione e i sopravvissuti nel controllo:

$$\text{Sopravvivenza} = \% \frac{S_{\text{campione}}}{S_{\text{controllo}}}$$

S= numero di sopravvissuti

Si calcola il X^2 per determinare se la sopravvivenza è stata inibita significativamente dal materiale in esame. Un valore di X^2 maggiore di 5, indica una letalità significativa.

$$X^2 = \frac{(S^{\text{campione}} - S^{\text{controllo}})^2}{S^{\text{controllo}}}$$

S= numero di sopravvissuti

Maturazione

La maturazione è un'espressione del numero di organismi J4 che raggiungono lo stadio adulto. La formula seguente esprime l'inibizione della muta finale nella popolazione del campione in confronto alla popolazione del controllo:

$$\text{Maturazione} = \% \frac{A^{\text{campione}} / (J4^{\text{campione}} + A^{\text{campione}})}{A^{\text{controllo}} / (J4^{\text{controllo}} + A^{\text{controllo}})}$$

A= numero degli adulti

J4= numero dei giovani al quarto stadio

Si calcola il X^2 per determinare se la maturazione è stata significativamente inibita dal materiale da saggiare. Un valore di X^2 maggiore di 5, indica un effetto significativo sulla maturazione.

$$X^2 = \frac{(A^{\text{campione}} - A^{\text{controllo}})^2}{A^{\text{controllo}}}$$

Un terzo effetto tossico che può essere evidenziato è dato dalla diminuzione nella crescita dei nematodi. Questo sintomo può essere utilizzato come indicazione dell'effetto tossico cronico. Una muta incompleta J2 - J3, oppure J3 - J4, indica un effetto tossico nei confronti di una sostanza biochimica non essenziale, oppure sui processi fisiologici del nematode.

Crescita

Si verifica un'inibizione della crescita quando un significativo numero di organismi per il saggio non riesce a raggiungere lo stadio di J4 o di adulto (effetto cronico). La crescita di questa popolazione, in rapporto al controllo, può essere espressa come segue:

$$\text{Crescita} = \% \frac{(J4^{\text{campione}} + A^{\text{campione}}) / S^{\text{campione}}}{(J4^{\text{controllo}} + A^{\text{controllo}}) / S^{\text{controllo}}}$$

Si calcola il X^2 per determinare se c'è stata una significativa inibizione o stimolazione della crescita sul materiale da testare:

$$X^2 = \frac{[(J4^{\text{campione}} + A^{\text{campione}}) - (J4^{\text{controllo}} + A^{\text{controllo}})]^2}{(J4^{\text{controllo}} + A^{\text{controllo}})}$$

Stato di benessere

Lo stato di benessere rappresenta un valore riassuntivo in quanto, confrontando la crescita con la maturazione, indica complessivamente la qualità del campione da analizzare in rapporto alla popolazione di controllo. In questo calcolo le varie fasi hanno un peso specifico e in particolare, la sopravvivenza ha un valore di 4, la crescita di 2 e la maturazione di 1.

$$\text{Stato di benessere} = 100 \times \frac{(4 \times S^{\text{campione}}) + (2 \times G^{\text{campione}}) + M^{\text{campione}}}{7}$$

Considerazioni

Quando si estrae il suolo con M9Y, un'ulteriore sonicazione di 5 minuti della miscela suolo/M9Y, prima della centrifugazione, può procurare in alcuni campioni una maggiore tossicità.

Si raccomanda di ignorare o di ripetere il saggio se si osservano i seguenti risultati:

- meno del 90% della popolazione del controllo riesce a raggiungere lo stadio adulto;
- più del 10% della popolazione del controllo muore;
- si evidenzia una estesa crescita microbica nelle colture, dannosa per i nematodi.

Un'estesa crescita microbica o fungina nello stock delle colture M9Y può influire negativamente sui nematodi. Se si evidenzia, trasferire una quantità di nematodi in tampone M9 o in M9Y media posti in una capsula Petri in vetro, e coprire completamente i nematodi con una soluzione di perossido di idrogeno. Dopo 15 – 20 minuti, i nematodi saranno tutti morti, insieme ai batteri e ai funghi. Trasferire le femmine morte in una nuova piastra di coltura. Il perossido di idrogeno non influisce sui piccoli all'interno delle femmine gravide, e in pochi giorni sarà possibile ottenere una nuova coltura pura di nematodi.

I seguenti criteri sono indicativi delle condizioni di tossicità:

- una sopravvivenza inferiore al 90% del controllo indica la presenza di sostanze che agiscono su processi biochimici o fisiologici essenziali;
- una maturazione inferiore all'85% del controllo suggerisce la presenza di sostanze che inibiscono il normale funzionamento genetico dell'organismo
- un accrescimento in lunghezza inferiore al 90% del controllo indica la presenza di sostanze che agiscono su percorsi biochimici o fisiologici non essenziali;

- crescita maggiore del 103% del controllo indica la presenza di un eccesso di nutrimento nel campione.

Per classificare i campioni in base alla tossicità può essere utilizzato il seguente schema.

Sopravvivenza %	Punteggio	Maturazione %	Punteggio
89,9 – 80	1	89,9 – 75	1
79,9 – 60	3	74,9 – 60	3
59,9 – 30	7	59,9 – 40	5
29,9 – 10	10	39,9 – 25	7
		24,9 – 0	10

La diminuzione nella sopravvivenza indica che il campione saggiato influenza i processi biochimici e fisiologici del nematode.

La diminuzione nella maturazione indica un difetto del nematode a livello genetico. La muta da J4 ad adulto coinvolge l'attività più importante nella vita dell'organismo[CJ15].

Riferimenti bibliografici

McInnis R., 1995. *Nematode Toxicity Assay using Panagrellus redivivus*. National Water Research Institute. Burlington, Canada.

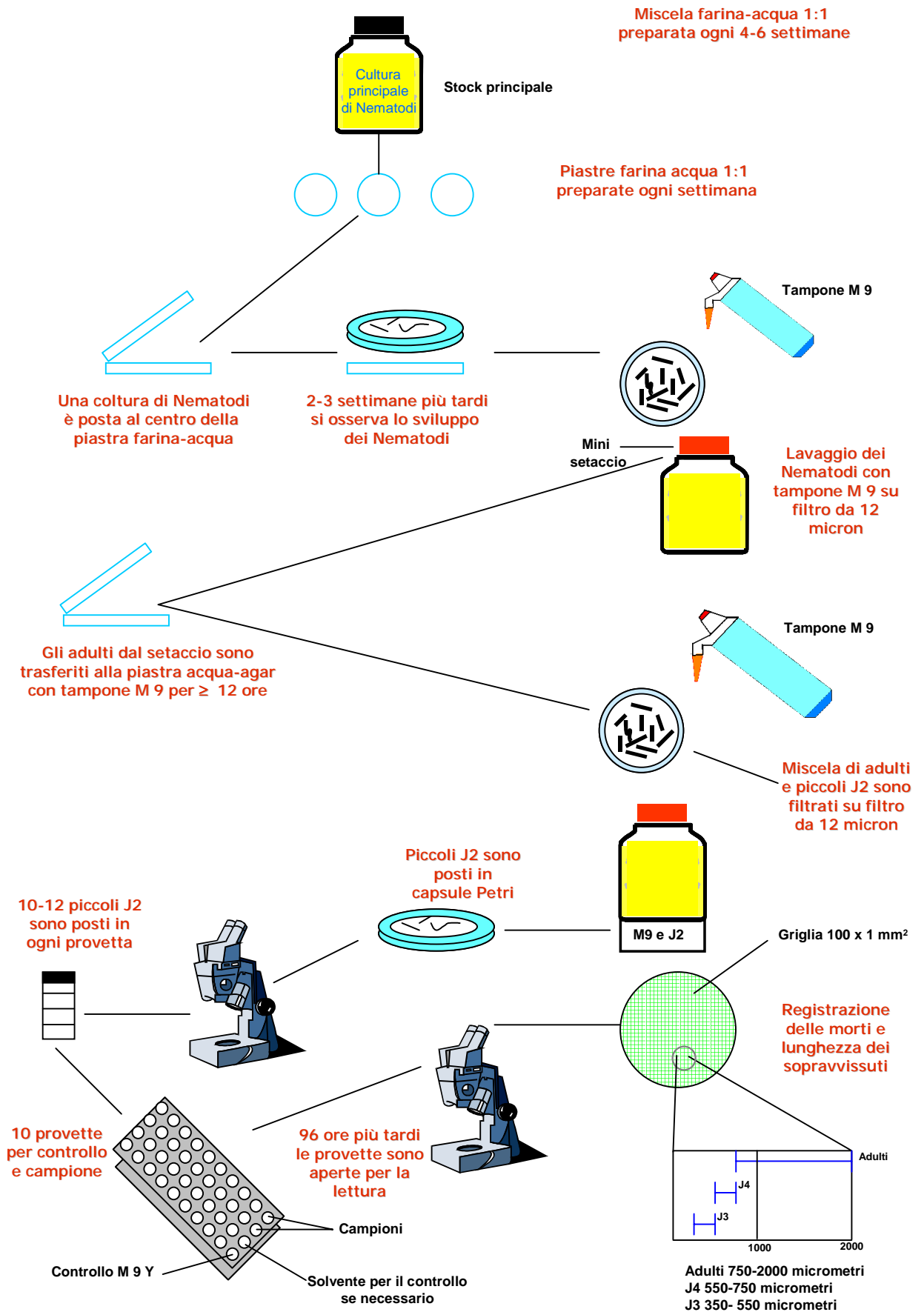
Radney Mc Innis 1998. *Toxicity/genotoxicity of solid phase samples using Panagrellus redivivus* National Water Research Institute Canada.

Samoiloff M.R., 1990. *The nematode Toxicity assay using Pangrellus redivivus*. Toxicity assessment: An International Journal 5 : 309 –318

Samoiloff M.R., 1987. *Nematodes as indicators of toxic environmental contaminants*. Pp. 433-439 In J. A. Veech and D. W. Dickson, eds. *Vistas on nematology: A commemoration of the 25th annual meeting of The Society of Nematologists*. Hyattsville, MD: Society of Nematologists

Samoiloff M.R. *et al.*, 1980. *A rapid simple long-term toxicity assay for aquatic contaminants using the nematode panagrellus redivivus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37: 1167-1174.

Schema



3.5 SAGGI DI MUTAGENESI

Nei saggi di mutagenesi l'effetto genotossico viene valutato in funzione delle alterazioni che sostanze mutagene inducono a livello genetico.

L'importanza dei saggi di mutagenesi è legata alla loro predittività nei confronti dei composti cancerogeni in grado di provocare imput mutazionali.

I principali saggi in vitro utilizzano come organismi test dei batteri, in grado di evidenziare composti chimici che inducono modificazioni genetiche attraverso danni primari al DNA cellulare.

Per la determinazione degli effetti mutageni dei contaminanti presenti nel suolo sono state considerate le seguenti prove.

3.5.1 Saggio di mutagenesi con *Salmonella typhimurium* - Saggio di Ames

Principio del metodo

Il saggio di Ames (Maron-Ames) è un metodo in vitro (OECD 471) per determinare la presenza di sostanze ad effetto cancerogeno e mutageno e si basa sulla retromutazione delle colonie batteriche.

Il saggio utilizza una serie di ceppi batterici di *Salmonella thyphimurium* LT2 modificati geneticamente e resi autotrofi nei confronti dell'istidina.

Il saggio di routine si avvale del ceppo TA 100 e TA 98 che, in conseguenza alle differenti modificazioni genetiche, permettono di evidenziare classi di composti chimici con meccanismi di azione diversificati.

In bibliografia si riportano i principali riferimenti del metodo.

Materiali di consumo e strumentazione

Terreni e reattivi

Terreno Minimo

Agar	15 g/Litro	
Glucosio	40 %	
VBS 50X	MgSO ₄ 7H ₂ O	10 g/L
	Ac.citrico monoidrato	100 g/L
	K ₂ HPO ₄	500 g/L
	NaNH ₄ HPO ₄ 4H ₂ O	175 g/L

Top Agar

Agar	6 g/L
NaCl	5 g/L

Nutrient Broth

Nutrient broth	8 g/L
NaCl	5 g/L

Biotina – Istidina soluzione 0,5 mM

Scaldare per sciogliere la soluzione e filtrare con filtri da siringa 0.22 µm. Aggiungere 10 mL di questa soluzione a 100 mL di top agar al momento dell'esecuzione del saggio.

Attivatore metabolico S9 MIX al 10% 0,5 mL/piastra

S9 (estratto microsomiale)	2 mL
Soluzione sali 0,4 M MgCl ₂ + 1,65 M KCl	0,4 mL
Tampone fosfato 0,2 M, pH 7,4	10 mL
0,1 M NADP	0,8 mL
1M glucosio-6-fosfato	0,1 mL
Acqua distillata sterile	6,7 mL

Tutto il materiale che viene utilizzato deve essere sterile e monouso (pipette, puntali, provette, piastre).

Per le varie fasi di esecuzione del saggio sono necessari una serie di strumenti atti a preservare sia la sterilità, sia le condizioni di sicurezza dell'operatore, oltre che funzionali alle normali operazioni analitiche quali:

- cappa chimica;
- cappa a flusso laminare verticale;
- autoclave;
- termostato a 37°C;
- sistema di distribuzione automatica di terreno in piastra;
- conta colonie automatico;
- bagnomaria;
- frigoriferi;
- congelatore -20°C;
- congelatore -80°C.

Procedimento

Preparazione campione

I campioni in esame dopo setacciatura a 2 mm sono sottoposti ad estrazione con una miscela acetone/esano 1:1 in Soxhlet.

Gli estratti sono stati quindi portati a secco e ridisciolti in DMSO in modo da ottenere una concentrazione dei campioni in esame pari a 6 g (solidi sospesi secchi)/mL

Ceppi batterici utilizzati

Per l'esecuzione del saggio si utilizzano i ceppi batterici (TA100 e TA 98) in fase di crescita esponenziale, ottenuta dopo incubazione a 37°C per 18-20 ore in mezzo colturale liquido (nutrient broth).

I ceppi batterici vengono mantenuti in soluzione di DMSO in congelatore a - 80°C e periodicamente ripristinati per mantenere la ceppoteca sempre in condizioni ottimali.

L'attivatore metabolico e le soluzioni di mutageni noti vengono conservate nel congelatore a - 80°C.

Saggio

Il saggio viene allestito sotto cappa a flusso laminare, predisponendo tre piastre di terreno minimo per ogni diluizione.

Alle differenti diluizioni in provetta vengono aggiunti 100 µL dei batteri corrispondenti, 2 mL di Top agar, al quale è stata aggiunta una soluzione 0,5 mM di biotina-istidina. Si incorpora il tutto su piastra.

Dopo solidificazione le piastre vengono incubate a 37°C per 48 ore.

Per ogni ceppo batterico viene allestito un controllo negativo, costituito dai soli batteri, allo scopo di valutare la retromutazione spontanea, e un controllo positivo, costituito da un mutageno con spettro d'azione noto, per valutare la capacità interattiva con i meccanismi genetici dei batteri.

Per ogni campione, inoltre, viene eseguito un saggio in presenza dell'attivatore metabolico S9 mix al 10% allo scopo di individuare anche i mutageni ad azione indiretta, cioè quelle sostanze che esplicano la loro azione attraverso la biotrasformazione in metaboliti ad opera di enzimi epatici.

Letture ed espressione dei risultati

La conta delle colonie retromutate avviene per mezzo di un contacolonie automatico opportunamente tarato o tramite conta manuale.

I batteri auxotrofi per l'istidina, in presenza di classi di composti chimici in grado di provocare delle alterazioni genetiche di tipo frameshift o per sostituzione di basi azotate, ripristinano una sequenza nucleotidica prossima all'allele selvatico, permettendo l'acquisizione delle funzioni catalitiche e di conseguenza la capacità di produrre istidina endogena.

Dopo la lettura delle piastre si valutano le medie delle singole diluizioni riportando i dati su una retta di regressione dose - risposta. In caso di risposta positiva al crescere della dose corrisponderà un incremento delle colonie retromutate.

Internazionalmente i dati vengono espressi come MR (rapporto di mutagenicità).

Si considera genotossico un campione che supera un valore di MR 1.

MR = (revertenti campione - rev. spontanei) / revertenti campione.

Riferimenti bibliografici

- Ames, Mc Cann, and Yamasaki, 1975. *Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian - microsome mutagenicity test.* Mutation Res. 31, 347-364.
- Kier, Brusik, Aauletta, Von Halle, Brown, Simmon, Dunkel, Mc Cann, Mortelmans, Prival, Rao and Ray, 1986. *The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay. A report of the U.S. US-EPA genetox program.* Mutation Res. 168, 69-240.
- Maron and Ames, 1983. *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.* Mutation Res. 113, 173-215.
- Mc Cann, Choi, Yamasaki, and Ames, 1975. *Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals.* Proc.Natl. Acad.Sci. USA 72, 5135-5139.

3.5.2 SOS Chromotest

Principio del metodo

Le lesioni al DNA attivano normalmente dei meccanismi di riparazione, indicati complessivamente come risposta SOS. Il SOS Chromotest fornisce una indicazione quantitativa dell'entità dell'attivazione di questi meccanismi.

Il saggio si basa sull'utilizzo di un microrganismo (*Escherichia coli* PQ 37) nel quale il promotore di uno dei principali geni (*Sfi A*) coinvolti nella risposta SOS è stato posto a monte del gene della β - galattosidasi.

Il livello di β - galattosidasi viene quindi dosato spettrofotometricamente. In parallelo viene monitorata l'attività della fosfatasi alcalina, che fornisce indicazioni sulla tossicità del campione in esame ed elimina la possibilità di fornire risultati falsi negativi.

Materiali di consumo e strumentazione

Terreni e reattivi

L-Medium

Triptone	10	g/L
Estratto di lievito	5	g/L
NaCl	10	g/L

LA-Medium

L-MEDIUM con aggiunta di 20 μ l /mL di ampicillina

B BUFFER (β galattosidasi)

Na ₂ HPO ₄	16.1	g/L
NaH ₂ PO ₄	5.5	g/L
KCl	0.75	g/L
MgSO ₄ x7 H ₂ O	0.25	g/L
SDS	1	g/L

Portare a pH 7;
aggiungere β mercaptoetanolo 2.7 mL/L.

P Buffer (fosfatasi alcalina)

Tris	121	g/L
SDS	1	g/L

Portare a pH 8.8.

Tampone fosfato	0.1 M	pH 7.7
ONPG	4 mg/L in tampone fosfato	(β galattosidasi)
PNPP	4 mg/L in P buffer	(fosfatasi alcalina)

Procedimento

Preparazione campione

I campioni in esame dopo setacciatura a 2 mm sono sottoposti a estrazione con una miscela acetone/esano 1:1 in Soxhlet.

Gli estratti sono quindi portati a secco e ridisciolti in DMSO in modo da ottenere una concentrazione dei campioni in esame pari a: 6 g (solidi sospesi secchi) /mL

Ceppi batterici utilizzati: *Escherichia coli* PQ 37

Saggio

E' un saggio quantitativo, che si basa sulla lettura spettrofotometrica dell'assorbanza di due enzimi, la β galattosidasi e la fosfatasi alcalina.

Si utilizza il ceppo di *Escherichia coli* in fase esponenziale (18-20 ore a 37°C in agitazione), sospeso in brodo LA-Medium.

Il giorno successivo 100 μ l della sospensione batterica vengono diluiti in 5 mL di LA- Medium ed incubati in agitazione per 2 ore, in modo da ottenere 2×10^8 batteri./mL ($A_{600} = 0.2$).

Per il saggio si utilizzano una serie di diluizioni scalari del campione in esame.

Si allestisce parallelamente un bianco, costituito dalle varie soluzioni utilizzate per il saggio più i batteri, ed un controllo positivo scelto fra i mutageni in grado di provocare una risposta SOS.

Al termine delle 2 ore, 1 mL della sospensione viene ulteriormente diluito in 9 mL di L-Medium.

Si distribuiscono 600 μ L della sospensione batterica nelle provette corrispondenti alle dosi dei campioni e standard. Si incuba per 2 ore a 37°C in agitazione.

Si divide l'aliquota di soluzione in due serie di provette che serviranno per la determinazione dei due enzimi in oggetto.

Si aggiungono i tamponi e i cromogeni necessari per la lettura spettrofotometrica dell'assorbanza dei due enzimi (circa 420 nm). La lettura deve avvenire nello spazio temporale che intercorre fra 10 e 90 minuti, effettuando due letture per enzima.

Letture ed espressione dei risultati

Letture allo spettrofotometro a 420 nm

Alla fine delle due letture si calcolano le Unità enzimatiche (UE)

$$UE = 1000 \times \Delta A_{420} / \Delta t$$

Si calcola il rapporto fra le due attività enzimatiche UE β galattosidasi/ UE fosfatasi alcalina.

Si calcola il fattore di induzione R dose/ R bianco.

Si determina la pendenza della regione lineare della curva dose-risposta (FI/nmol) dove FI = fattore di induzione.

Si considera positivo un campione che supera un FI di 2, con un incremento della linearità della retta al crescere della dose testata.

Riferimenti bibliografici

Miertus, Svorc, Sturdik, and Vojtekova, 1987. *Use of specific bacteria for the determination of mutagenic and carcinogenic compounds.* Anal.Chem.59, 504-508.

Mohn, 1981. *Bacterial system for carcinogenicity testing.* Mutation Research, 87, 191-210.

Nunoshiba, and Nishioka, 1991. *Rec-lac test for detecting SOS- inducing activity of environmental genotoxic substances.* Mutation Research, 254, 71-77.

Quillardett-Hoffnung, 1985. *The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures.* Mutation Research, 147, 65-78.

Quillardett-Hoffnung, 1988. *The screening, diagnosis and evaluation of genotoxic agents with batteries of bacterial saggios.* Mutation Research, 205, 107-118.

Roberfroid M. and Rosenkranz H.S., 1986. *Short-term assays using bacteria.* In: *long-term assays for carcinogenens: a critical appraisal.* IARC Sci. Publ. Lyon 83, 143-161.

3.5.3 Mutatox

Il saggio Mutatox (*Axzur Anviromental Manual Microtox "Mutatox Genotoxicity Organic Solvent Solution of Sample", 1995*) utilizza come microrganismo indicatore un mutante naturale "oscuro" del batterio luminescente (*Vibrio fischeri*, ceppo M169) che rileva la presenza di agenti genotossici che provocano una reversione del ceppo mutato. Questi organismi oscuri, messi a contatto con materiale genotossico, producono emissione di luce dopo un periodo di esposizione che va da 16 a 24 ore e i dati di sensibilità sono positivi se comparati con il saggio di Ames (Jarvis 1995).

Preparazione campione

I campioni in esame, dopo setacciatura a 2 mm, vengono sottoposti ad estrazione con una miscela acetone/esano 1:1 in Soxhlet.

Gli estratti sono quindi portati a secco e ridisciolti in DMSO, in modo da ottenere una concentrazione dei campioni in esame pari a 6 g (campione secco)/mL.

Il saggio preliminare viene eseguito quando sono ignoti gli effetti genotossici dei campioni. In questo saggio il campione viene saggiato alla massima concentrazione (100%), reidratando direttamente il mezzo colturale con il campione (*mutatox sample medium*). Si testano 4-5 diluizioni successive e si sceglie l'intervallo di concentrazioni entro cui il campione risponde. Per campioni tossici, si utilizzano dosi 1:10 a partire dall'ultima in cui si evidenzia un effetto tossico. Nel saggio definitivo, dopo avere individuato l'intervallo di concentrazione, si testano diluizioni più ravvicinate (es. 1:2). Ogni concentrazione va effettuata almeno in doppio.

Come controllo negativo, si utilizza il solvente di diluizione dei campioni (DMSO) in concentrazione inferiore al 2%, oppure la soluzione di S9.

Come controllo positivo si utilizzano il fenolo per campioni con tossici ad azione diretta e il benzo-a-pirene o i 2-ammino-antracene per campioni con tossici ad azione indiretta[CJ16].

Espressione dei risultati

Il saggio Mutatox si considera positivo se almeno due dosi rispondono con livelli di luminosità almeno di due volte superiore al controllo. In alcuni casi la risposta può essere dubbia, per esempio nel caso in cui il campione risponda per una sola dose, e quindi va ripetuta la prova.

I risultati del saggio sono espressi in unità di bioluminescenza in dipendenza della concentrazione saggiata. Il software di acquisizione dei dati permette la compilazione di tabelle per i diversi tipi di analisi.

Normalmente le unità di bioluminescenza del controllo sono comprese tra 0 e 5 per il mezzo colturale senza S9 e tra 10 e 20 per quello con S9.

Il risultato del saggio è generalmente di una curva dose-risposta a forma di campana, in cui l'attività mutagena aumenta con la dose in funzione della concentrazione e poi diminuisce a causa del prevalere dell'effetto tossico su quello mutageno. L'attività mutagena è espressa dal rapporto tra le unità di bioluminescenza del campione e quelle del controllo.

Riferimenti bibliografici

Jarvis, 1995. *A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenetic potential of contaminated dredged material*. US Army Corps of Engineers Technical Report D-95-1 April 1995.

Thomas Johnson B., 1992. *Potential Genotoxicity of Sediments from the Great Lakes*. Environmental Toxicology and Water Quality vol. 7, 373-390.

Thomas Johnson B. , 1991. *An evaluation of a genotoxicity assay with liver S9 for activation a luminescent bacteria for detection*. Environmental Toxicology and Chemistry vol.II, pp 473-480.

4. INDICI DI QUALITÀ AMBIENTALE

Il monitoraggio delle comunità di macroinvertebrati è usato ampiamente nei sistemi acquatici. Gli schemi sono basati sulle risposte della comunità al rilascio di nutrienti nelle acque dolci. I siti venivano valutati con un numero che rappresentava il “punteggio” che si assegnava a una data contaminazione (Reynoldson & Metcalfe-Smith, 1992; Metcalfe, 1989). Tali sistemi a punteggio sono adatti per valutare l’arricchimento organico, ma non sono applicabili per valutare l’impatto di diversi inquinanti, dato che le sensibilità relative dei diversi taxa possono variare.

Una seconda generazione di schemi si è concentrata su misure di ricchezza ed equilibrio nella distribuzione degli individui tra le specie, e ha portato allo sviluppo di indici di diversità come quelli di Shannon Wiener e di Simpson. Benché essi siano ancora usati nell’analisi dei monitoraggi, la loro utilità è stata ridimensionata, sia perché le conclusioni tratte in alcuni sistemi non sono sempre valide in altri, sia perché non sempre la diversità decresce con l’aumento della concentrazione dell’inquinante (Bengtsson & Rundgren, 1984, 1988; Hopkin, 1993).

Un sistema più recente per valutare lo schema delle comunità è il *River Invertebrate Prediction and Classification System* (RIVPACS), un modello con molte variabili per predire la fauna di un sito inalterato dalle caratteristiche note. Le comunità rilevate possono essere comparate con quelle calcolate dal modello, permettendo una valutazione dei potenziali effetti biotici dell’inquinamento (Wright *et al.*, 1989). Questo sistema permette di prevedere le abbondanze relative, i punteggi biotici e la presenza di specie e famiglie. Un analogo sistema proposto per il suolo (SIVPACS) non ha ancora trovato abbastanza fondi per essere portato avanti (Spurgeon *et al.*, 1996).

Rispetto ad altre matrici (aria, acqua), la ricerca e l’applicazione di strumenti biologici per identificare la qualità biologica del suolo mostrano ancora un notevole ritardo, imputabile soprattutto alle carenze conoscitive sugli ecosistemi edafici e sui loro singoli componenti. Ad oggi, si hanno esperienze sperimentali e applicative principalmente con riferimento ai bioindicatori, bioaccumulatori, saggi ecotossicologici; il monitoraggio delle comunità del suolo invece è in uno stadio di sviluppo iniziale.

A titolo di esempio è utile ricordare tra i bioindicatori i macroinvertebrati che si rinvencono nei corsi d’acqua dolci e i licheni epifiti. I primi sono utilizzati per la valutazione della qualità ambientale delle acque correnti mediante l’impiego dell’indice biotico esteso (IBE) (Ghetti, 1997), mentre i secondi sono utilizzati per la valutazione della qualità dell’aria previa determinazione dell’indice IAP (Index of Atmospheric Purity), indice che attualmente viene definito come BL (Indice di Biodiversità Lichenica) (Nimis, 1999, ANPA, 2001).

Riferimenti bibliografici

- ANPA, 2001. *I.B.L. Indice di Biodiversità Lichenica. Manuale ANPA*. ANPA, Roma, CTN_ACE. Manuali e Linee Guida 2/2001: 85 pp. Disponibile dall'Internet <URL: <http://www.sinanet.anpa.it>>.
- Bengtsson G. & Rundgren S., 1984. *Ground-living invertebrates in metal-polluted forest soils*. *Ambio* 13: 29-33.
- Bengtsson G. & Rundgren S., 1988. *The Gusum case: a brass mill and the distribution of soil Collembola*. *Can. J. Zool.* 66: 1518-1526.
- Ghetti P.F., 1997. *Indice Biotico Esteso (IBE) – I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque dolci*. Manuale di applicazione. Prov. Aut. Trento, Agenzia per la Protezione dell'Ambiente. Pp. 222.
- Hopkin S.P., 1993. *In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems*. In: P. Calow (Ed.), *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 397-427.
- Metcalf J.L., 1989. *Biological water quality assessment running waters based on macro-invertebrate communities: History and present status in Europe*. *Environ. Pollut.* 60: 101-139.
- Nimis P.L., 1999. *Linee guida per la bioindicazione degli effetti dell'inquinante tramite la biodiversità dei Licheni epifiti*. Atti del workshop: Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale. ANPA Serie 2. Pp 267-277.
- Reynoldson T.B. & Metcalfe-Smith J.L., 1992. *An overview of the assessment of aquatic ecosystem health using benthic invertebrates*. *J. Aquat. Ecosys. Health* 1: 295-308.
- Spurgeon D.J., Sandifer R.D. and Hopkin S.P., 1996. *The use of macroinvertebrates for population and community monitoring of metal contamination – Indicator taxa, effect parameters and the need for a soil invertebrate prediction and classification scheme (SIVPACS)*. In: N.M. van Straalen e D.A. Krivolutsky (Eds.), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Kluwer Academic Publishers, NL. Pp. 95-110.
- Wright J.F., Armitage P.D., & Furse M.T., 1989. *Prediction of invertebrate communities using stream measurements*. *Reg. Rivers Res. Manage.* 4: 147-155.

4.1 INDICI DI QUALITÀ AMBIENTALE CON I NEMATODI

I nematodi vivono in ogni centimetro cubo di suolo o di sedimento, si estraggono facilmente e perciò non è difficile disporre di un campione significativo per ogni tipo di ambiente, da quello più intatto a quello più inquinato. L'analisi nematologica richiede tuttavia una certa preparazione tecnica, facile da raggiungere, ed una capacità di riconoscimento delle forme che invece è molto impegnativa da acquisire a livello di genere o specie, ma non difficile a livello di riconoscimento dei gruppi tassonomici elevati (classi, sottoclassi, famiglie).

Prelievo del suolo

L'analisi nematologica di un ettaro di terreno richiede il prelievo (carotaggi), da alcune decine di punti diversi, di altrettanti piccoli campioni di suolo (solitamente fino a 10-15 cm di profondità) di poche decine di mL ciascuno. Tutto il materiale così raccolto va mescolato insieme (accuratamente) per alcuni minuti allo scopo di ottenere il campione rappresentativo dal quale estrarre i nematodi. Il suolo raccolto non va tenuto al sole, non deve seccare, ma deve essere conservato al fresco e trattato per l'estrazione dei nematodi quanto prima (entro pochi giorni dal prelievo sul campo).

Vi sono vari metodi di estrazione e di montaggio in vetrino. Le metodiche qui proposte sono forse le migliori quanto al rapporto efficienza/sforzo.

Estrazione dei nematodi

Estrazione con Ludox

Questo metodo è particolarmente indicato per estrarre i nematodi dai sedimenti d'acqua dolce (laghi, ruscelli e fiumi).

Disponendo di una soluzione di silice colloidale Ludox, è sufficiente raccogliere campioni anche piccoli (meno di 100 mL di sedimento) dai quali si otterranno nematodi con un minimo di detrito e di sporco. A seconda del tipo di substrato, si può decidere se procedere o no ad un'eliminazione preventiva della ghiaia e della sabbia grossolana con un sistema di decantazione simile a quello sopra descritto.

Successivamente si procede come segue:

1. centrifugare a 2000 giri il sedimento (in 2 tubi Eppendorf da 50 mL) per pochi secondi;
2. eliminare l'eccesso d'acqua su filtro (\varnothing 10 cm) da 35 μ m per recuperare eventuali nematodi;
3. aggiungere del Ludox al culotto fino a raggiungere i 45 mL;
4. pesare le Eppendorf a coppie uguagliando i pesi con soluzione di Ludox;
5. tappare e agitare bene per mescolare il sedimento col Ludox;
6. centrifugare per 6 minuti a 2000 giri/minuto;
7. versare il Ludox (con i nematodi) sullo stesso filtro del punto 2;

8. aggiungere nuovo Ludox al culotto, pesare, tappare e agitare fortemente;
9. centrifugare per la seconda volta come nel punto 6;
10. versare il Ludox (con i nematodi) sullo stesso filtro del punto 2;
11. sciacquare con acqua il contenuto del filtro da 35 μm ;
12. raccogliere con una spruzzetta i nematodi contenuti sul filtro da 35 μm ;
13. colorare con Rosa Bengala i pochi mL così ottenuti;
14. osservare al binocolare stereoscopico i nematodi in una Petri piccola (diametro 33 mm);
15. finita l'osservazione, aggiungere una piccola quantità di formalina (2-4 %) come conservante.

La silice colloidale da usare è il Ludox TM-50 di peso specifico 1,4 da diluire per abbassarlo a 1,14.

Estrazione col metodo Baermann (modificato)

Questo metodo è particolarmente indicato per estrarre i nematodi dal suolo.

1. collocare una reticella di plastica (con maglie di 5 mm o più) sopra un piatto;
2. collocare un fazzoletto di carta sulla reticella (in modo che non vi sporga oltre).
3. riempire il piatto con acqua;
4. collocare sulla carta uno strato di 2-3 mm di terra facendo attenzione a non sporcare l'acqua del piatto;
5. verificare che la reticella non si incurvi fino a toccare il fondo del piatto: se ciò avviene, collocare nell'acqua, nel centro del piatto, uno spessore di plastica o un sassolino pulito.
6. lasciare il piatto in luogo tranquillo per uno o due giorni;
7. dopo 24 ore aggiungere un po' d'acqua nel caso in cui la terra non risulti imbibita a sufficienza;
8. alla fine del processo i nematodi (e altra microfauna) si saranno portati sul fondo del piatto;
9. togliere la reticella con la carta e il suolo (eliminarli);
10. l'acqua nel piatto (che dovrebbe risultare perfettamente pulita) va rimescolata e quindi versata in un bicchiere;
11. lasciare sedimentare la microfauna per almeno 15 minuti;
12. decantare molto lentamente il contenuto del bicchiere, senza scosse e oscillazioni, in modo da eliminare la maggiore quantità d'acqua possibile;
13. alla fine devono rimanere pochi mL d'acqua, pieni di nematodi, che verranno posti in una piastra petri per l'osservazione al microscopio binocolare stereoscopico da dissezione (ca. 20 ingrandimenti).

Al termine dell'estrazione si vedranno molte decine di sottilissimi vermi microscopici, lunghi 0,5-2 mm, dai continui movimenti ad anguilla (Nematodi). Da non confondere con i nematodi sono invece eventuali vermi metamerici (Anellidi oligocheti) di regola visibili anche ad occhio nudo. Facendo attenzione si vedrà qualche Tardigrado lungo 0,3 mm, biancastro e trasparente, dotato di 4 paia di zampe non articolate. Altrettanto piccoli, ma privi di zampe e con movimenti a compasso, con allungamenti e raccorciamenti, sono i Rotiferi. Numerosi microscopici puntini che nuotano velocemente sono Protozoi ciliati.

Inclusione dei nematodi in glicerina

Se l'estrazione col Ludox, col metodo di Baermann, o con altri metodi alternativi, non ha dato un buon risultato (nematodi accompagnati da molto sporco o da detrito), si deve procedere con l'estrazione diretta (manuale) degli esemplari allo scopo di isolarli dal detrito (sabbia, limo, frammenti vegetali). A questo scopo il materiale con i nematodi viene posto in una capsula Petri dal fondo rigato. Gli esemplari vengono cercati tra il detrito e pazientemente raccolti uno per uno mediante uno spillo entomologico molto sottile (n° 00 oppure 000), un'arista di graminacea o un sopracciglio dell'occhio, debitamente immanicati. Ciò richiede molta abilità ed esercizio, ma con un allenamento di pochi giorni si possono raccogliere, con questa tecnica, anche cinque o sei esemplari al minuto.

I nematodi possono essere osservati direttamente su vetrino portaoggetti in una goccia d'acqua ricoperta dal vetrino coprioggetti, come preparato temporaneo. In tal caso l'osservazione al microscopio (da farsi ad almeno 400 ingrandimenti) va completata prima del prosciugamento del preparato.

Per una visione migliore degli esemplari e per osservazioni più dettagliate (da farsi anche a 1000 ingrandimenti con obiettivo ad olio di immersione) vanno predisposti preparati permanenti che richiedono l'immersione degli animali in glicerina. L'immersione diretta in questo liquido (che esercita una grande pressione osmotica) ha l'effetto di distorcere brutalmente gli esemplari rendendoli irricognoscibili.

Pertanto si deve procedere nel modo seguente:

1. trasferire i nematodi (in acqua, con o senza fissativo) estratti da un campione in una piccola capsula Petri (33-54 mm di diametro);
2. attendere circa 10 minuti affinché gli esemplari sedimentino;
3. decantare lentamente il contenuto della Petri in modo da eliminare quanta più acqua possibile,
4. riempire la Petri con acqua (con o senza fissativo) contenente circa il 2-3 % di glicerina;
5. riporre la Petri in termostato a circa 40°C e lasciarvela per almeno 3 giorni;
6. durante questo tempo l'acqua evapora lasciando i nematodi in una soluzione di glicerina via via più concentrata. La gradualità del processo evita la distorsione degli esemplari che, dopo 3 giorni, si trovano in glicerina quasi pura. In tale condizione si conservano intatti per anni;
7. si toglie la Petri dal termostato: i nematodi si trovano sul fondo imprigionati in un sottile film di glicerina. Pertanto occorre aggiungere altra glicerina in modo da riempirne il fondo con ca. 2 mm;
8. a questo punto, osservando con un microscopio binoculare stereoscopico a 15-30 ingrandimenti, è possibile estrarre gli esemplari mediante un sottile spillo entomologico immanicato;
9. trasferire gli esemplari entro una goccia di glicerina posta su un vetrino portaoggetti.

Preparazione dei vetrini

Con lo spillo immanicato si raccolgono i nematodi per disporli in una goccia di glicerina pulita posta su un vetrino. Il vetrino è stato preventivamente preparato apponendovi una cornice di paraffina. Per far ciò si riscalda sopra una piastra un tubetto di rame (o di ottone) immanicato, lungo 2-3 cm e col diametro (esterno) esattamente uguale al diametro di un vetrino coprioggetto (o al suo lato, se il coprioggetto è quadrato) e lo si posa per qualche secondo sopra un blocco di paraffina.

Subito dopo si "timbra" un vetrino portaoggetto in modo da lasciarvi una cornice rotonda di paraffina. Tale cornice non deve essere troppo esigua (perché poi lascerebbe fuoriuscire la glicerina) né troppo ricca di paraffina (perché ciò renderebbe il vetrino coprioggetto troppo sollevato, con problemi di messa fuoco nel momento in cui verrà usato l'obiettivo a immersione). Al centro della cornice va collocata una piccolissima goccia di glicerina pulita che dev'essere appena sufficiente per collocarvi da 1 a 20 nematodi. Si badi a disporre gli esemplari parallelamente tra loro, in modo che non si accavallino.

Infine si copre delicatamente la cornice (con la goccia degli esemplari nel mezzo) con un vetrino coprioggetto e si posa il tutto su di una piastra riscaldante. Il vetrino va tolto non appena la cornice di paraffina comincia a fondere (la glicerina non deve bollire): in questo modo si forma un bordo di paraffina largo alcuni millimetri racchiudente nel mezzo la glicerina con i nematodi. Dopo alcuni secondi la paraffina risolidifica cementando il coprioggetto al portaoggetto e il vetrino permanente è pronto per l'osservazione al microscopio. Per una buona osservazione al microscopio dei dettagli anatomici di questi animali, si raccomanda di usare una luce moderata, assolutamente *non* abbagliante.

Identificazione dei nematodi

Per l'identificazione dei nematodi si consiglia di consultare i seguenti saggi:

BONGERS T. (1988): *De Nematoden van Nederland. Stichting Uitgeverij Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging, nr.46, Utrecht*, pp.408.

E' il testo migliore per l'identificazione dei nematodi del suolo e d'acqua dolce. E' scritto in olandese, ma tutte le specie sono illustrate con misure, disegni e a volte anche con foto. Comprende pressoché tutte le specie trovate in Olanda e perciò quasi il 90% delle specie europee e praticamente tutte le famiglie e i generi trovati in Europa.

ZULLINI A. (1982): *Nematodi (Nematoda), Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, CNR AQ/1/190 n.17*, 117 pp.

Testo per l'identificazione delle specie dei più comuni nematodi d'acqua dolce italiani (alcuni dei quali vivono anche nel suolo). Inoltre serve per il riconoscimento delle sottoclassi e degli ordini (anche terrestri) in generale.

TARJAN A.C. et al.: Interactive diagnostic key to plant parasitic, freeliving and predacious nematodes. <http://nematode.unl.edu/key/nemakey.htm>

Chiave dicotomica illustrata interattiva reperibile gratuitamente in Internet. Richiede solo un po' di pazienza per la lentezza del caricamento delle immagini durante l'uso.

4.1.1 Indici ecologici

Gli indici ecologici di qualità ambientale realizzabili con i nematodi sono essenzialmente i due seguenti.

Percentuale di Secernentea (Zullini, 1976)

Questo indice viene utilizzato per valutare lo stato globale di inquinamento di un corso d'acqua. E' l'indice nematologico più semplice da usare, perché richiede solo il riconoscimento della classe (o sottoclasse) di appartenenza degli esemplari (vedi letteratura sopra citata). A questo scopo si procede alla conta dei nematodi del campione dividendoli nelle due classi (o sottoclassi):

- *Adenophorea* (= Chromadoria o Torquentia + Enoplia o Penetrantia)
- Secernentea

Si contano almeno 200 esemplari del campione (i Tylenchida, i Longidoridae e i Trichodoridae, in quanto parassiti delle piante, non vanno considerati) e si calcola la percentuale dei Secernentea sul totale. In condizioni naturali (senza inquinamento e senza un eccessivo apporto di materiale organico) tale valore non supera il 20%. Se la presenza dei Secernentea supera il 20%, il tratto di fiume in questione va ritenuto inquinato (nei casi di inquinamento estremo si arriva quasi al 100% di Secernentea).

Maturity index (Bongers, 1990)

Questo indice viene utilizzato per valutare lo stato globale di inquinamento del suolo o di un sedimento d'acqua dolce o del fondo marino. E' un indice nematologico non troppo difficile da usare, perché non richiede il riconoscimento delle specie o dei generi, ma solo delle famiglie (vedi letteratura sopra citata).

Ad ogni famiglia è stato assegnato un valore ecologico che va da 1 (famiglie tipiche di suoli o sedimenti inquinati) a 5 (famiglie tipiche di suoli o sedimenti intatti). I valori bassi (1 e 2) appartengono a nematodi *colonizzatori* (c), cioè opportunisti e capaci di invadere rapidamente habitat instabili, temporanei o inquinati. I valori alti (4 e 5) appartengono a nematodi *persistenti* (p), cioè a ciclo biologico lento e tipici di habitat stabili e non soggetti a stress o a eventi inquinanti. Pertanto la scala del Maturity Index viene espressa come gradiente di valori c-p.

In conclusione, i nematodi vengono così classificati:

- c-p 1 *enrichment opportunists* (indicatori di inquinamento organico);
- c-p 2 *general opportunists* (indicatori di altro tipo di inquinamento o di stress);
- c-p 3/5 *persisters* (indicatori di buona qualità del suolo).

Il punteggio c-p, famiglia per famiglia, viene dato dalla tabella seguente (da Bongers 1990, e successive modifiche: 1995 e 1999):

Achromadoridae	3	Ironidae	4
Actinolaimidae	5	Leptolaimidae	2
Alaimidae	4	Leptonchidae	4
Alloionematidae	1	Linhomoeidae	3
Anatonchidae	4	Microlaimidae	2
Aporcelaimidae	5	Monhysteridae	2
Aulolaimidae	3	Mononchidae	4
Bastianiidae	3	Myolaimidae	1
Bathyodontidae	4	Neodiplogasteridae	1
Belondiridae	5	Nordiidae	4
Bunonematidae	1	Nygolaimidae	5
Cephalobidae	2	Odontolaimidae	3
Choanolaimidae	4	Odontopharyngidae	1
Chromadoridae	3	Onchulidae	3
Chrysonematidae	5	Osstellidae	2
Cyatholaimidae	3	Panagrolaimidae	1
Desmodoridae	3	Plectidae	2
Desmoscolecidae	3	Prismatolaimidae	3
Diphtherophoridae	3	Qudsianematidae	4
Diplogasteridae	1	Rhabditidae	1
Diplogasteroididae	1	Rhabdolaimidae	3
Diplopeltidae	3	Teratocephalidae	3
Diploscapteridae	1	Thornenematidae	5
Discolaimidae	5	Tobrilidae	3
Dorylaimidae	4	Tripylidae	3
Ethmolaimidae	3	Tylopharyngidae	1
Halaphanolaimidae	3	Xyalidae	2
Hypodontolaimidae	3		

Nella tabella mancano le famiglie Longidoridae, Trichodoridae e quelle appartenenti all'ordine Tylenchida dato che, trattandosi di fitoparassiti, non vengono solitamente incluse nel calcolo del Maturity Index.

La procedura da seguire per il calcolo del MI è la seguente:

1. se il campione di suolo da esaminare è molto grande (centinaia di individui), mescolare il tutto e prelevare un sottocampione casuale;

2. contare i nematodi (almeno 200) di un campione (o sottocampione) di suolo assegnando ogni esemplare alla famiglia di appartenenza;
3. trasformare i valori assoluti così ottenuti in valori percentuali (frequenza di ogni famiglia) in modo che il 100% corrisponda ad 1;
4. moltiplicare il valore di frequenza della prima famiglia per il suo valore c-p (v. Tabella);
5. procedere allo stesso modo per tutte le altre famiglie trovate;
6. sommando i prodotti così ottenuti si ottiene il Maturity Index (MI).

$$\text{Maturity Index} = \text{MI} = \sum v(i) * f(i)$$

Dove $v(i)$ è il valore c-p della famiglia i -esima (vedi tabella) e $f(i)$ è la frequenza della famiglia i -esima nel campione studiato. Il MI di una comunità nematologica varia solitamente da circa 1 (situazioni con forte inquinamento eutrofizzante) a un massimo di circa 4 (situazioni stabili e tendenzialmente oligotrofiche).

Se, per esempio, l'analisi di un campione di suolo (possibilmente rappresentativo, cioè derivato da numerosi sottocampioni perfettamente mescolati) dà come risultato: 10% Rhabditidae, 10% Diplogasteridae, 30% Cephalobidae e 50% Qudsianematidae (famiglie con un c-p, rispettivamente, di 1, 1, 2, 4), allora il valore di MI sarà $0,10*1 + 0,10*1 + 0,30*2 + 0,50*4 = 2,80$. In questo caso si tratta di un valore che indica una qualità del suolo abbastanza soddisfacente.

Allorché si voglia studiare l'effetto di uno stress fisico o chimico (per es. inquinamento da metalli pesanti) a prescindere da eventuali effetti eutrofizzanti dovuti a pratiche agricole (concimazione) che potrebbero confondere i risultati, è utile escludere dal computo gli *enrichment opportunists* (indicatori di inquinamento organico) e cioè le famiglie di nematodi con valore di c-p uguale ad 1. In tal modo l'ambito considerato andrà da c-p 2 fino a c-p 5 e il risultato dell'indice di maturità sarà tanto più basso (cioè tanto più vicino a 2) quanto più forte sarà l'inquinamento inorganico. Tale forma del Maturity Index viene chiamata MI 2-5.

Riferimenti bibliografici

- Bongers T., 1990. *The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition*. Oecologia, 83: 14-19.
- Bongers T., De Goede R.G.N., Korthals G.W., Yeates G.W. 1995. *Proposed changes of p-c classification for nematodes*. Russian J. Nematology, 3: 61-62.
- Bongers T., 1999. *The Maturity Index, the evolution of nematode life history traits, adaptive radiation and c-p scaling*. Plant and Soil, 212: 13-22.
- Zullini A., 1976. *Nematodes as indicators of river pollution*. Nematol. medit., 4: 13-22.

Gli articoli relativi al MI sono reperibili al sito Internet:

http://www.dpw.wageningen-ur.nl/nema/MI_lit.htm

4.2 BIOMONITORAGGIO DELLA PEDOFAUNA

Premessa

La crescente consapevolezza dei problemi legati all'inquinamento dei suoli ha contribuito ad individuare lo studio della pedofauna come una necessità prioritaria nell'ambito dello sviluppo delle ricerche relative alla valutazione della qualità del territorio.

Gli strumenti maggiormente significativi per il monitoraggio di matrici differenti quali l'acqua e l'aria, si basano al momento su criteri che prendono in considerazione soprattutto la presenza di flora e fauna, come ad esempio per la qualità dell'aria la Biodiversità Lichenica (Nimis, 1999, ANPA, 2001) o le faunule muscinali (Parisi, 1999), o per la qualità dell'acqua l'Indice Biotico Esteso (IBE) (Ghetti, 1997). Il successo di questo tipo di approcci metodologici suggerisce che, anche per il suolo, lo studio delle biocenosi sia la giusta tematica verso la quale dirigere gli sforzi della ricerca.

La valutazione della qualità del suolo è considerato il principale indicatore della gestione sostenibile del territorio (Karlen *et al.*, 1997): il suolo, infatti, è lo specchio del metabolismo dell'ecosistema e integra al proprio interno i processi biogeochimici delle differenti componenti dello stesso (Dylis, 1964).

Tuttavia, come all'IBE è stato affiancato un indice più integrato quale l'Indice di Funzionalità Fluviale (IFF) (ANPA, 2000), così per una matrice complessa quale il suolo sarebbe auspicabile poter riunire in un unico indice lo stato e le funzioni dell'ecosistema. Purtroppo ciò non è ancora possibile, come espresso da alcuni ricercatori americani (Andreasen *et al.*, 2001), che hanno individuato dei criteri e redatto delle conclusioni per lo sviluppo di un Indice Terrestre di Integrità Ecologica (TIEI).

Gli stessi ricercatori prospettano un'estesa attività di ricerca per testare ancora gli indici esistenti, definire le scale di applicazione e la specificità a determinati siti e problemi, poiché gli indici applicabili su grande scala non risultano in genere indicativi per problemi specifici (Andreasen *et al.*, 2001), in quanto sono le risposte della fauna del suolo all'eterogeneità del paesaggio a determinare la scala ottimale per produrre adeguati modelli di biodiversità (Chust *et al.*, 2003).

Nel suolo, infatti, la fauna interagisce in vari modi con il substrato che la ospita. Esistono specie con un ciclo vitale che si svolge in maniera continuativa nel suolo, altre che vi risiedono solo in particolari momenti. Le reti trofiche edafiche sono sempre molto complesse, coinvolgendo numerosi gruppi e con abbondanze enormi di individui. Ne risulta che le zoocenosi del suolo possono essere utilizzate quali importanti descrittori della qualità dell'ambiente e, per poterle valutare, è necessario utilizzare metodologie che consentano di evidenziare il numero di specie presenti o le funzioni e i processi che esse svolgono.

Dal punto di vista metodologico, la divisione della fauna del suolo in relazione alle dimensioni e all'habitat assume un significato particolare (Górny e Grüm, 1993). Le suddivisioni comunemente accettate comprendono la microfauna (con organismi compresi tra 0,02 e 0,2 mm di diametro), la mesofauna (0,2-2,0 mm), la macrofauna (2-20 mm) e megafauna (>20mm) (Van der Drift, 1951). Ad esse corrispondono reti trofiche che hanno tempi di rigenerazione, spazi vitali e tassi vitali proporzionalmente differenti.

La fauna edafica può inoltre essere suddivisa in: *hyperedaphon*, che vive nella bassa vegetazione, ma talora si trova nell'ambiente edafico; *epiedaphon*, che vive sulla superficie del suolo (in genere nella lettiera); *hemiedaphon*, che vive a media profondità, fino agli strati superficiali del suolo; *euedaphon*, che vive negli strati profondi del suolo (Bullini *et al.*, 1998).

Una zoocenosi che sembra particolarmente idonea alla valutazione della qualità del suolo, è quella appartenente alle mesoreti, in quanto, rispetto ad altri gruppi (Gupta e Yeates, 1997), pone meno problemi 1) nella cosiddetta incertezza sistematica, cioè l'incompleta descrizione di molti taxa; 2) nell'incertezza spaziale, cioè l'assenza di modelli accurati di distribuzione degli organismi sul terreno; 3) nell'incertezza formativa, cioè nella difficoltà di un'elaborazione sufficientemente robusta di un indice, senza avere una completa conoscenza sistematica dei gruppi; 4) nell'incertezza geografica e pedologica, cioè nell'utilizzo di dati elaborati in altre nazioni o per altri tipi di suolo.

Inoltre, 1) il ruolo svolto dalla mesofauna nel ciclo della formazione e del rinnovamento del suolo, riveste sicuramente una grande importanza ecologica ed economica; 2) l'area coperta durante il loro ciclo vitale, non avendo vagilità eccessiva, è significativamente rappresentativa del sito in esame; 3) la loro storia naturale permette di conoscere le condizioni ecologiche del suolo; 4) molte specie sono state identificate come utili bioindicatori della qualità del suolo.

A conferma di ciò, i microartropodi hanno assunto sempre più spazio nei monitoraggi ambientali e l'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) sta già utilizzando la mesofauna tra i metodi di valutazione del suolo (ISO 11266:1994; ISO 11267:1999; ISO 11268-1:1993; ISO 11268-2:1998; ISO 16387:2004).

In generale, gli indici di qualità del suolo basati sugli invertebrati del suolo valutano la consistenza delle popolazioni presenti (ISO 11268-3:1999; RTI CTN_SSC 3/2000). Alcuni metodi, utilizzati prevalentemente dagli entomologi, prevedono di campionare con delle trappole a caduta la macrofauna che cammina sulla superficie del suolo (Brandmayr, 1980; Brandmayr, P. e Pizzolotto, R., 1988; Brandmayr e Ruffo, 1996; Brandmayr *et al.*, 1998, 2000; Pizzolotto e Brandmayr, 1998). Per questi metodi sarà presto prodotta una pubblicazione ad hoc.

Un approccio innovativo è stato proposto dall'Università di Parma nel 2001 con l'applicazione di un indice sintetico per la valutazione della qualità biologica del suolo (QBS-ar), che descrive il grado di sofferenza delle popolazioni di microartropodi, analizzando la funzionalità e il livello di adattamento delle forme presenti e senza prevedere le estenuanti conte degli individui o la classificazione a livello di specie estremamente faticosa e difficoltosa per i non esperti (Parisi, 2001; Parisi *et al.*, 2002; Parisi *et al.*, 2003; Gardi *et al.*, 2003; Parisi *et al.*, 2004).

Materiali e attrezzature

Campionamento e trasporto

- *Carotatore*. E' possibile utilizzare una vanga e una spatola di acciaio, con cui scavare perpendicolarmente alla superficie del suolo un cubo di 10 cm di lato (figura 1), oppure un carotatore di acciaio. (o altro metallo indeformabile). Ne esistono di diversi tipi (in genere a base quadrata o circolare) e può anche essere forgiato su misura, mantenendo le seguenti caratteristiche:
 - bordo inferiore tagliente;
 - pareti laterali senza rugosità o vernice;
 - indicatore della profondità raggiunta.Possibilmente il carotatore dovrebbe potersi aprire agevolmente per estrarre il campione senza sottoporlo ad ulteriori stress, o comunque avere un meccanismo che permetta la fuoriuscita della carota di suolo senza comprimere il campione.
- *Contenitori per il trasporto del campione in laboratorio*. Si possono usare dei sacchetti di plastica (del tipo usato per congelare gli alimenti), o recipienti rigidi a chiusura ermetica; nella stagione calda è consigliata una borsa termica.
- *Codifica del campione*. Carta pergamena, penna a china o matita; etichette adesive, pennarello indelebile.

Estrazione

- *Sistema Berlese-Tullgren modificato*. Metodo di estrazione dinamica, che sfrutta la reazione di fuga della fauna del suolo dalla luce e dall'essiccamento provocato da una modesta sorgente di calore quale una lampadina. Per la preparazione dell'estrattore si pone un imbuto sul portaimbuti. Sopra l'imbuto va posto un crivello o vaglio di metallo in modo da permettere il passaggio della mesofauna. Al di sopra viene collocata una lampada ad incandescenza di 40 Watt (a circa 20 cm dal campione) o da 25 W (a distanza di circa 10 cm).
In particolare i componenti del sistema sono:
 - *Imbuto*. Il diametro dipende dalla quantità di suolo prelevata. In generale, per campioni di circa 1 kg di massa, si consiglia un diametro di 20 - 30 cm. L'altezza e l'inclinazione dell'imbuto dovrebbero permettere agli animali e al terreno accidentalmente caduto di passare velocemente nel recipiente sottostante, senza

fermarsi sulle pareti. Si possono utilizzare dei coni o delle piramidi di metallo o plastica costruiti all'uopo (figura 2), avendo cura di sigillare bene le giunture, in modo da evitare perdite di materiale.

- *Vaglio*. un crivello o vaglio di metallo, con maglie da 2 mm.
- *Portaimbuti*. Si possono utilizzare sostegni singoli (treppiedi, vasi in plastica rovesciati con un'apertura laterale per manipolare e controllare i contenitori), o un'unica struttura (pannello di legno, struttura di metallo, ecc.), da fissare saldamente alla base.
- *Lampade*. Lampadine elettriche ad incandescenza, da 25 o da 40 Watt, con portalampada.
- *Liquido conservante*. soluzione di alcool etilico a 75°, non denaturato (possibilmente usare alcool bianco o decolorato tramite filtraggio con carbone attivo).
- glicerina al 5%
- *Spruzzette per alcool*. Dispenser per versare il liquido conservante.
- *Contenitori*. Recipiente tipo becher, beute in vetro, contenitori in pirex o plastica con chiusura ermetica, o tubi grandi a fondo piatto.
- Parafilm® . Pellicola per sigillare.
- *Conservazione del campione*. (per lo smistamento) Contenitori in materiale infrangibile (pirex, plastica), tipo "reagent bottles", con chiusura ermetica.
- *Codifica del campione*. Rettangoli di carta pergamena, penna a china o matita.

Smistamento

- *Beute*. In vetro, a fondo piatto.
- *Filtro*. Vaglio di piccole dimensioni, a maglia da 80 µm, con bordi alti o saldato su imbuto di plastica corti e larghi.
- *Imbuto* a bocca piccola, in plastica o vetro, per travasare il campione e la soluzione conservante.
- *Recipienti*. Crogiuoli in ceramica sufficientemente capienti, o capsule Petri
- *Microscopio*. Stereoscopio da dissezione, ad almeno 40 ingrandimenti, con illuminazione radente a lampada o a fibre ottiche.
- *Pinzette* a punte fini, del tipo da entomologia.
- *Aghi manicati*. Bacchette con spilli entomologici innestati ad un'estremità.
- *Pennellini*. Misura zero (talvolta è necessario togliere delle setole o accorciarle).
- *Pipette Pasteur*.
- *pennette* immanicate di beccaccia o di beccaccino.
- *Portaprovette*. Contenitori per provette delle dimensioni adeguate ai tubi usati.
- *Provette*. Tubetti in vetro, di varie misure (generalmente di piccole dimensioni, ma variabili secondo le necessità), con tappi a tenuta ermetica. Un tubo per ogni unità sistematica.
- *Etichettatura del campione*. Rettangoli di carta pergamena, forbici, penna a china o matita.

Identificazione

- *Microscopio*. Stereoscopio a trasmissione da 100 -500 ingrandimenti.
- *Vetrini*. Portaoggetti normali e scavati.
- *Acido lattico*. Soluzione di acido lattico e acido lattico diluito (3:1)
- *Salierine*. Piccoli recipienti in ceramica o vetro (vetri da orologio, capsule di Petri) anche di colore scuro.
- *Provette*. Tubetti in vetro, di varie misure (generalmente di piccole dimensioni, ma variabili secondo le necessità), con tappi a tenuta ermetica.
- *Portaprovette*. Contenitori per provette delle dimensioni adeguate ai tubi usati.
- *Parafilm®*. Pellicola per sigillare i tappi delle provette.
- *Conservante*. Soluzione di acqua distillata ed alcool etilico a 75°, non denaturato (bianco).
- *Spruzzette per alcool*. Dispenser per versare il liquido conservante.
- *Etichettatura del campione*. Rettangoli di carta pergamena, penna a china o matita.

Procedimento

Criteri per la raccolta dei campioni

La composizione delle comunità faunistiche del suolo varia naturalmente con le stagioni, ma può subire importanti variazioni anche a causa delle condizioni di temperatura, umidità ecc. Pertanto, è necessario fare in modo che la raccolta non avvenga in condizioni di secchezza eccessiva del suolo (in genere si suggerisce di non effettuare campionamenti con tenori di umidità relativa inferiori al 15%), o dopo forti precipitazioni.

Al fine di ottenere un campione rappresentativo della comunità di invertebrati presenti nell'area occorre osservare le seguenti precauzioni:

- selezionare come sito di prelievo un'area omogenea (dimensioni di circa 10 m x 10 m) e facilmente raggiungibile (per poter ripetere il campionamento in altra data);
- all'interno del sito di prelievo scegliere, compatibilmente con la morfologia del terreno, i punti in cui effettuare le diverse repliche dei prelievi in base a criteri oggettivi, in modo da limitare le incertezze insite nel campionamento stesso, quali la rappresentatività dell'area e della fauna campionata, la copertura vegetale omogenea, le caratteristiche del suolo;
- raccogliere i diversi campioni in un intervallo di tempo il più possibile limitato;
- trasportare con la massima cura i campioni raccolti in laboratorio cercando di modificare le loro condizioni il meno possibile (in particolare evitando sbalzi di temperatura, cali di umidità, urti);
- prelevare per ogni area almeno tre repliche (Casarini *et al.*, 2003), oppure calcolare il numero di repliche da effettuare in base alla formula:

$$N_s = \left(\frac{Z \cdot \sigma_p}{e} \right)^2$$

dove:

N_s = numero di campioni da prelevare

Z = valore della deviazione standard basato sul livello di confidenza desiderato

σ_p = deviazione standard della popolazione da campionare

e = errore accettato nella stima del valore medio del parametro di interesse.

Figura 1



Prelievo

Nelle aree da monitorare viene prelevato un campione di terreno di circa 1 kg, pari ad un cubo di 10 cm di lato. Per prelevare il campione di suolo, inserire il carotatore perpendicolarmente alla superficie del suolo, fino alla profondità di dieci centimetri. La porzione di suolo ("carota") sarà poi posta entro un contenitore (in genere, un sacchetto di plastica) opportunamente etichettato.

Nel caso in cui il suolo non si presenti troppo compatto e pietroso, può essere di aiuto porre un sacchetto all'interno del carotatore stesso, con il margine ripiegato verso l'esterno, in modo da farvi entrare direttamente la carota da trasferire in laboratorio.

Per il trasporto dei campioni in laboratorio, le carote prelevate devono essere inserite in un unico contenitore chiuso ed etichettato. Affinché la fauna presente mantenga la sua naturale vitalità, è necessario evitare agli organismi raccolti di ricevere urti e sbalzi di temperatura; ciò può essere fatto utilizzando borse termiche, ed evitando l'esposizione al calore dei campioni. Non deve in ogni caso intercorrere troppo tempo dal momento del prelievo al momento della disposizione sull'estrattore del campione.

Tutti i campioni vanno etichettati e codificati utilizzando carta pergamena, penna a china o matita, e sull'esterno dei contenitori vanno apposte le stesse codifiche tramite etichette adesive o pennarello indelebile. Tali codici dovranno essere segnati anche sull'apposita scheda di campo, corredata delle opportune indicazioni (autore della raccolta, i codici delle stazioni di prelievo, località, data e modalità di prelievo, caratteristiche ambientali del sito di prelievo quali la copertura vegetale, osservazioni pedologiche e naturalistiche di rilievo, note meteorologiche, riferimenti geografici, la data d'inizio e fine dell'estrazione in

laboratorio, ecc.), che servirà a fornire la prima descrizione del campione e dell'ambiente dove è stato prelevato.

Estrazione

L'estrattore va collocato in un luogo indisturbato, al riparo dalle vibrazioni (Kaczmarek, 1993).

Figura 2



Manipolando delicatamente, disporre il terreno sul vaglio. Durante questa operazione, è necessario collocare sotto l'imbuto un recipiente o un foglio bianco per raccogliere la porzione di terreno passata eventualmente attraverso le maglie del vaglio, dopodiché quanto caduto deve essere riversato sopra il campione rimasto sul setaccio.

Sopra il campione di suolo si può stendere una leggera rete di tulle, per evitare l'allontanamento degli organismi più vagili. Dopo alcune ore di acclimatamento, andrà accesa la lampada

Quasi tutti gli organismi che vivono nel suolo, infatti, sono lucifughi e prediligono ambienti umidi, perciò tendono a fuggire dalla luce e dal disseccamento provocati dalla lampada. L'effetto della luce e del calore spingerà gli animali a scendere in profondità nel suolo, fino a cadere dal vaglio nell'imbuto e da lì nel recipiente contenente una sufficiente quantità di liquido conservante. Al liquido conservante si può aggiungere della glicerina al 5% (nelle proporzioni di 3 parti di alcool e 1 di glicerina), che oltre a limitare l'evaporazione dell'etanolo, permette di abbassare la tensione superficiale e di far cadere sul fondo del contenitore anche gli organismi più leggeri, che altrimenti potrebbero perdersi aderendo alle pareti del contenitore.

I campioni devono essere lasciati nell'estrattore, con la lampada accesa ininterrottamente (giorno e notte), per un periodo di tempo che può variare da 7 a 10 giorni.

Per effettuare i travasi di liquido, sono consigliate delle spruzzette per alcool, mentre per sigillare i contenitori si può utilizzare della pellicola tipo Parafilm[®].

Se non si prevede l'immediata classificazione della fauna raccolta, è necessario utilizzare contenitori richiudibili tipo "reagent bottle" in vetro resistente, con un volume di almeno 50 - 100 cc di liquido conservante, in modo da permettere la conservazione della fauna estratta.

Ciascun contenitore deve riportare in maniera inequivocabile, su appositi cartellini di carta pergamena, scritti con penna a china o matita, almeno l'autore della raccolta, il codice del campione (che possa rimandare alla scheda di campionamento), la località e la data di prelievo.

Smistamento

Per lo svolgimento delle operazioni di smistamento e di identificazione, gli animali estratti dovranno essere posti in un recipiente (crogiuoli in ceramica sufficientemente capienti, o capsule Petri). Occorre quindi procedere all'identificazione delle unità sistematiche utilizzando un microscopio stereoscopico da dissezione, ad almeno 40 ingrandimenti, con illuminazione radente a lampada o a fibre ottiche.

Particolare attenzione andrà posta nel maneggiare gli animali, perché ogni piccolo danneggiamento potrebbe compromettere la successiva fase di identificazione e, poiché la mesofauna è di dimensioni ridotte, si corre facilmente il rischio di rovinare, perdere o mescolare individui che restano attaccati agli strumenti, contenitori ecc.

Per separare i residui di suolo e spostare gli individui nelle provette, opportunamente etichettate, si possono usare pinzette a punte molto fini del tipo da entomologia, pipette Pasteur (eventualmente montate tramite un tubetto collettore in gomma su una siringa, per facilitare la calibrazione della quantità di materiale da aspirare), pennellini di proporzioni adeguate alle dimensioni degli animali (talvolta è necessario togliere delle setole o accorciarle) e aghi manicati (che all'occorrenza possono essere piegati ad anello in punta). Alcuni ricercatori usano delle pennette immanicate di beccaccia o di beccaccino (l'alula o "pennetta del pittore").

Gli esemplari raccolti vanno conservati in provette (preferibilmente) in vetro o materiale plastico, generalmente di piccole dimensioni, con tappi a tenuta ermetica. Durante lo smistamento è buona norma tenere le provette ordinate per unità sistematica in portaprovette delle dimensioni adeguate al formato usato. Per permettere eventuali analisi quantitative (es calcolo del rapporto acari/collemboli, del rapporto acari oribatei/altri acari, stime di biodiversità, ecc.) e per il controllo di qualità, sarà interessante rilevare su apposite schede di smistamento il numero di individui presenti per ogni unità sistematica. Tali conte andrebbero fatte al microscopio, avendo l'accortezza di controllare tutta la strumentazione utilizzata per evitare perdite e mescolamenti di materiale da diverse repliche.

Per travasare il campione e la soluzione conservante, sempre con le dovute attenzioni, si può usare un filtro di piccole dimensioni, a maglia da 80 µm massimo, con bordi alti o fissato su imbuti di plastica corti e larghi e un imbuto in plastica o vetro.

Identificazione

La procedura descritta consente di applicare alcuni indici, per l'elaborazione dei quali non è necessario arrivare alla determinazione di specie o genere, per la quale comunque occorrono: un microscopio a trasmissione a 100-500 ingrandimenti, con vetrini portaoggetti, normali e scavati. Per preparare gli esemplari, soprattutto quelli con l'esoscheletro più ispessito, si può ricorrere ad una chiarificazione in stufa per alcune ore in soluzione di acido lattico o di acido lattico diluito (3:1) per gli individui più delicati.

Talvolta è utile avere a disposizione alcune salierine di colore scuro, per osservare allo stereoscopio da dissezione gli organismi trasparenti o bianchi (quali enchitreidi, dipluri, sinfili, pauropodi). Altrimenti si possono porre i recipienti trasparenti (vetrini di orologio, capsule Petri) su uno sfondo nero.

La fauna estratta e suddivisa per unità sistematiche sarà conservata entro provette, che andranno riempite quasi completamente di alcool etilico 75° e ben chiuse. Poiché è difficile impedire l'evaporazione del liquido, esse andranno inoltre sigillate con Parafilm®. È importante ricordare che deve essere utilizzata una provetta per ogni unità sistematica determinata, indipendentemente dal numero di individui trovati.

Ogni provetta sarà corredata da un'etichetta che riporterà:

1. codice del campione, coerentemente con la scheda di campo;
2. nome di chi ha effettuato la raccolta;
3. nome di chi ha identificato il taxon;
4. data e luogo di raccolta (possibilmente anche la copertura vegetale);
5. profondità del prelievo ed eventualmente altre note.

L'etichetta sarà costituita da una striscia di carta pergamena, scritta con inchiostro di china ed inserita, eventualmente arrotolata, all'interno della provetta prima di inserire i campioni (Zangheri, 1969).

Applicazione dell'Indice di Qualità Biologica del Suolo (QBS-ar)

Il QBS-ar è un indice che analizza e valuta la struttura della comunità dei microartropodi, per calcolare il grado di sofferenza del suolo proporzionalmente al grado di adattamento edafico delle forme biologiche che lo abitano.

Per calcolare l'Indice di qualità del suolo QBS-ar, occorre svolgere pertanto l'identificazione dei taxa maggiori e la determinazione delle forme biologiche dei gruppi più variabili di invertebrati. Per fare ciò va attribuito ad ogni forma biologica un punteggio numerico, denominato EMI (Indice Eco-Morfologico), che varia da 1 a 20 (Tabella 1).

Il punteggio massimo è assegnato agli esemplari che mostrano un adattamento maggiore alla vita edafica: riduzione o perdita degli occhi, riduzione degli arti, depigmentazione, perdita delle ali e degli organi di salto ecc.

Per alcuni gruppi sistematici, è indicato un solo valore di EMI, mentre vi sono gruppi in cui l'EMI può variare entro un certo intervallo, secondo i caratteri di adattamento alla vita edafica presenti (Tabella 2). Nel caso particolare dei collemboli, la tabella 3 riporta il dettaglio dei caratteri da analizzare. Se in un campione sono presenti forme biologiche diverse appartenenti allo stesso gruppo, andrà adottato il punteggio più elevato, corrispondente al massimo adattamento mostrato dal gruppo in questione in quella stazione.

La definizione del valore dell'indice QBS-ar per ogni replica si ottiene sommando gli EMI di tutti i gruppi presenti; tale valore può variare tra un minimo di 0 e un massimo di 349. In genere, valori pari o superiori a 200 sono da considerarsi indicatori di buona qualità del suolo, mentre quelli inferiori a 50 sono sicuramente sintomatici o di un errore metodologico o di una scarsa qualità del suolo esaminato. La maggior parte delle situazioni ambientali si concentra tra questi due valori, differenziandosi per la tipologia di suolo oltre che per l'uso del suolo.

Calcolo dell'indice QBS-ar per il sito di prelievo

Valori assai differenti del QBS-ar calcolato nelle diverse repliche di uno stesso sito possono evidenziare una disomogeneità ambientale non precedentemente rilevata, tale da suggerire un'indagine pedologica o tossicologica nei diversi punti di prelievo.

Il valore complessivo del QBS-ar nel sito in esame va calcolato sommando il valore massimo degli EMI di tutte le forme biologiche presenti nelle diverse repliche effettuate nell'area, come se si trattassero di EMI di un unico campione.

Ad es., se i risultati parziali sono:

<i>Replica</i>	1	2	3
Totale QBS-ar	191	145	142

Il valore della stazione di prelievo (nell'esempio citato: 226), non sarà dato dalla media aritmetica delle diverse repliche (159), ma da un calcolo effettuato come nella tabella seguente:

Esempio di calcolo dell'indice QBS-ar per il sito di prelievo

<i>Replica</i>	1	2	3	<i>Sito</i>
Unità Rilevate				
Acari	20	20	20	20
Araneidi	0	0	0	0
Opilioni	0	0	0	0
Palpigradi	0	0	0	0
Pseudoscorpioni	20	20	20	20
Isopodi	0	10	0	10
Chilopodi	20	10	10	20
Diplopodi	20	0	0	20
Paupodi	0	20	20	20
Sinfili	20	0	20	20
Proturi	20	20	20	20
Dipluri	20	0	0	20
Collemboli	20	20	20	20
Microcoryphia	0	0	0	0
Zygentomata	0	0	0	0
Dermatteri	0	0	0	0
Ortotteri	0	0	0	0
Embiotteri	0	0	0	0
Blattari	0	0	0	0
Psocotteri	0	0	0	0
Emitteri	0	0	0	0
Tisanotteri	0	0	1	1
Coleotteri (adulti)	10	0	0	10
Larve di coleottero	10	10	0	10
Imenotteri	1	5	1	5
Larve di dittero	10	10	10	10
Larve di altro ometabolo	0	0	0	0
altri ometaboli	0	0	0	0
Totale	191	145	142	226

Tabella 1: Punteggio degli Indici Ecomorfologici (EMI) attribuiti ai diversi gruppi della fauna del suolo (da: Parisi, 2001)

Gruppo	<i>Punteggio</i>
Acari	20
Araneidi*	1-5
Opilioni	10
Palpigradi	20
Pseudoscorpioni	20
Isopodi	10
Chilopodi*	10-20
Diplopodi*	10-20
Paupodi	20
Sinfili	20
Proturi	20
Dipluri	20
Collemboli**	1-20
Microcoryphia	10
Zygentomata	10
Dermatteri	1
Ortotteri*	1-20
Embiotteri	10
Blattari	5
Psocotteri	1
Emitteri*	1-10
Tisanotteri	1
Coleotteri (adulti)*	1-20
Coleotteri (larve)	10
Imenotteri*	1-5
Ditteri (larve)	10
Altri olometaboli (larve)	10
Altri olometaboli	1

*) : V. tabella 2

**) : V. tabella 3

Tabella 2: Dettaglio delle attribuzioni dei punteggi dell'Indice Eco-Morfologico ai gruppi elencati nella tabella 1 (da: Parisi, 2001)

Gruppo	EMI
Araneidi:	
forme > 5 mm	1
forme piccole e poco pigmentate	5
Chilopodi:	
forme > 5mm, con zampe ben sviluppate (non Geofilomorfi)	10
altre forme, Geofilomorfi	20
Diplopodi:	
forme > 5 mm	10
forme < 5mm	20
Ortotteri:	
in generale	1
fam. Grillidae	20
Emitteri:	
forme epigee	1
larve cicala	10
Coleotteri [§] :	
forme epigee	1
lunghezza < 2 mm	4
tegumenti sottili, colori testacei	5
microatterismo o atterismo	5
microftalmia o anoftalmia	5
Imenotteri:	
in generale	1
formicidi	5

[§]): Nel caso dei coleotteri, si assegna per ogni carattere presente il punteggio specificato; l'EMI dei coleotteri sarà dunque la somma dei valori calcolati (es. forme edafobie con tutti i caratteri sopraccitati: EMI 20; mancanti del microatterismo: EMI 15).

Tabella 3: calcolo degli EMI per i Collemboli (da: Parisi, 2001)

Carattere Punteggio	EMI
Forme epigee: appendici allungate, ben sviluppate, apparato visivo (macchia ocellare e occhi) ben sviluppato, dimensioni medie o grandi, presenza di livrea complessa	1
Forme epigee non legate alla vegetazione arborea, arbustiva o erbacea, con buon sviluppo delle appendici, con (eventualmente) forte sviluppo di setole o copertura fortemente protettiva di squame, apparato visivo ben sviluppato	2
Forme di piccola dimensione (ma non necessariamente), con medio sviluppo delle appendici, apparato visivo ben sviluppato, livrea modesta; forme generalmente limitate alla lettiera	4
Forme emiedafiche con apparato visivo ben sviluppato, appendici non allungate, livrea con colore	6
Forme emiedafiche con riduzione del numero degli ocelli, appendici poco sviluppate, talvolta con furca ridotta o assente, presenza di pigmentazione	8
Forme euedafiche con pigmentazione assente, riduzione o assenza di ocelli, furca presente, ma ridotta	10
Forme euedafiche depigmentate, prive di furca, con appendici tozze, presenza di pseudoculi, organo postantennale sviluppato, ma non necessariamente presente, strutture sensoriali apomorfiche	20

Riferimenti bibliografici

- Andreasen, J.K., O'Neill, R.V., Noss, R. e Slosser, N.C., 2001. *Considerations for the development of a terrestrial index of ecological integrity*. Ecological Indicators 1 (1): 21-35.
- Angelini P., S. Fenoglio, M. Isaia, C. Jacomini, M. Migliorini, A. Morisi, 2002. *Tecniche di biomonitoraggio della qualità del suolo*. ARPA Piemonte – CEDAP. Pp. 106.
- ANPA, 2001. I.B.L. *Indice di Biodiversità Lichenica*. Manuale ANPA. ANPA, Roma, CTN_ACE. Manuali e Linee Guida 2/2001: 85 pp. Disponibile dall'Internet <URL: <http://www.sinanet.apat.it>>.
- Brandmayr, P., 1980. *Entomocenosi come indicatori delle modificazioni antropiche del paesaggio e pianificazione del territorio: esempi basati sullo studio di popolamenti a Coleotteri Carabidi*. Atti XII Congresso nazionale italiano di Entomologia, Roma: 263-283.
- Brandmayr, P. e Pizzolotto, R., 1988. *Indicatori "storici" ed ecologici nella coleotterofauna terricola delle foreste dell'Appennino*. Atti XV Congr. naz. ital. Ent., L'Aquila: 589-608.
- Brandmayr, P., Ruffo, S., 1996. *Opportunità di normative riguardanti la cosiddetta "fauna minore" e considerazioni sui loro possibili contenuti*. Atti del Convegno "I presupposti scientifici per la produzione di normativa in materia di flora e fauna minore", Rosolina Mare (Rovigo), 15 giugno 1996: 3-13.
- Brandmayr, P., Scalercio, S., Zetto, T. & Pizzolotto, R., 1998. *Carabid population and community features as an 'adaptation' to the landscape system: Importance of the ecotope as a landscape unit*. In: J. Baumgärtner, P. Brandmayr, B.F.J. Manly (Eds.), *Population and Community Ecology for Insect Management and Conservation*. Proceedings of the Ecology and Population Dynamics Section of the 20th International Congress of Entomology, Florence/Italy, August 25-31, 1996, Balkema, Rotterdam: 227-242.
- Brandmayr, P., Cagnin, M., Mingozi, T., Pizzolotto, R., 2000. *Da Bioitaly alla Carta della Natura: il contributo dell'Unione Zoologica Italiana alla conoscenza ed alla conservazione della biodiversità animale in Italia*. Atti dei Convegni Lincei 157, XVI giornata dell'ambiente "Flora e Fauna a Rischio", Roma, 5 giugno 1998: 23-51.
- Bullini, L., Pignatti, S., Virzo De Santo, A., 1998. *Ecologia generale*. UTET, Torino: 520 pp.
- Chust, G., Pretus, J.L., Ducrot, D., Bedòs, A. e Deharvenge, I., 2003. *Response of Soil Fauna to Landscape Heterogeneity: Determining Optimal Scales for Biodiversity Modeling*. Conservation Biology 17 (6): 1712-1723.
- Coineau Y., R. Cléva, G. du Chatenet, 1997. *Ces animaux minuscules qui nous entourent*. Delachaux et Niestlé.

- D'Avino L., 2002. *Esposizione del metodo di Vittorio Parisi per la valutazione della Qualità Biologica del Suolo (QBS) e proposta di standardizzazione delle procedure*. Museo di Storia Naturale dell'Università di Parma. CD ROM – Parma, aprile 2002
- Drift van der J., 1951. *Analysis of the animal community in a beech forest floor*. Tijdschr. Ent., 94: 1-168.
- Gardi, C., Jacomini, C., Menta, C., Parisi, V., 2003. *Evaluation of land use and crop management impacts on soil quality: application of QBS methods*. Atti dell'OECD Expert Meeting on "Soil Erosion and Soil Biodiversity Indicators". Roma, 25-28 marzo, 2003. URL: <http://www.oecd.org/agr/env/indicators.htm> (Username "soil", Password "italy").
- Ghetti P.F., 1997. *Indice Biotico Esteso (IBE) – I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque dolci*. Manuale di applicazione. Prov. Aut. Trento, Agenzia per la Protezione dell'Ambiente. Pp. 222.
- Górny M. e Grüm L. (Eds), 1993. *Methods in soil zoology*. Elsevier – Amsterdam, London, New York, Tokyo - & PWN – Polish Scientific Publishers, Warszawa.
- Jacomini C., P. Nappi, G. Sbrilli, L. Mancini, 2000. *Indicatori e indici ecotossicologici e biologici applicati al suolo*. ANPA RTI CTN_SSC 3/2000.
- Kaczmarek M., 1993. Apparatus and tools for the extraction of the animals from the soil. In: Górny M. & Grüm L. (Eds), *Methods in soil zoology*. Elsevier Amsterdam, London, New York, Tokyo - & PWN – Polish Scientific Publishers, Warszawa. Pp. 112 – 141.
- Nimis P.L., 1999. *Linee guida per la bioindicazione per degli effetti dell'inquinamento tramite la biodiversità dei licheni epifiti*. In: Atti del workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale". ANPA serie atti 2/1999. Pp. 267 – 277.
- Parisi V., 1974. *Biologia ed ecologia del suolo*. Boringhieri, Torino.
- Parisi V., 1999. *Aeroplancton ed altri organismi*. In: Atti del workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale". ANPA serie atti 2/1999. Pp. 293 – 302.
- Parisi V., 2001. *La qualità biologica del suolo. Un metodo basato sui microartropodi*. Acta Naturalia de "L'Ateneo Parmense", 37, nn. 3/4, (2001): 97 – 106.
- Parisi, V., Menta, C., Gardi, C., Jacomini, C., 2003. *Evaluation of Soil Quality and Biodiversity in Italy: the Biological Quality of Soil Index (QBS) approach*. Atti dell'OECD Expert Meeting on "Soil Erosion and Soil Biodiversity Indicators". Roma, 25-28 marzo, 2003. URL: <http://www.oecd.org/agr/env/indicators.htm> (Username "soil", Password "italy").
- Parisi, V., Menta, C., Gardi, C., Jacomini, C., Mozzanica, E., 2004. *Microarthropod communities as a tool to assess soil quality and biodiversity: a new approach in Italy*. Agriculture, Ecosystems and Environment (in stampa).

- Pizzolotto, R., Brandmayr, P., 1998. *Coleotteri Carabidi e comunità animali: due direzioni per la gestione delle risorse naturali*. Atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia. Rendiconti, Anno XLVI. Giornata di studio su "Filogenesi e sistematica dei Carabidi", Firenze, 27 novembre 1998: 353-362.
- Quercia F., 2001. *Metodi per l'analisi di rischio dei siti contaminati: approcci in Italia ed in Europa*. Scuola Nazionale Residenziale "Siti contaminati: azioni di bonifica e di controllo" Alessandria, 11 - 17 febbraio 2001.
- Zangheri P., 1970. *Il naturalista - esploratore - raccoglitore - preparatore*. Hoepli, Milano.

GLOSSARIO E ABBREVIAZIONI

Analisi dei probits: trasformazione di una curva sigmoide rappresentante una distribuzione cumulativa in una retta, mediante trasformazione delle percentuali di immobilizzazione in probits.

ANPA: Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente

APAT: Agenzia per la Protezione Ambientale e per i servizi Tecnici

ARPA: Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente.

ARPAT: Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana
<<http://www.arp.at.toscana.it>>

AVS: solfuri volatili disponibili (*Available Volatile Sulphurs*)

Bioluminescenza: produzione di luce, dovuta all'interazione dell'enzima luciferasi sul flavinaminonucleotide che regola il trasporto di elettroni della catena respiratoria.

CA: Concentrazione algale.

C_{max}: concentrazione massima del campione.

C_{tmax}: concentrazione massima testabile.

cv.: cultivar.

CV: Coefficiente di Variazione.

DMSO: Dimetilsolfossido

Ec_x: (Concentrazione di effetto per x %): è la concentrazione di sostanza da saggiare che risulta nella riduzione dell'x % dell'effetto in un dato periodo di esposizione, quando paragonato al controllo. Per esempio EC₅₀ è la concentrazione in grado di causare una riduzione della riproduzione del 50% in una popolazione esposta in un definito periodo di esposizione. Le concentrazioni effetto sono espresse come massa di sostanza da saggiare per massa secca del suolo.

EC₅₀: concentrazione di campione che induce un effetto rilevabile sul 50% della popolazione su cui viene effettuato il saggio.

Effetto tossico acuto: effetto che si evidenzia in un lasso di tempo breve, comunque inferiore al tempo di generazione dell'organismo in esame (generalmente per una esposizione inferiore ad 1/10 del ciclo vitale dell'organismo test); prevede la valutazione di risposte facilmente evidenziabili, quali ad esempio l'immobilizzazione o la morte degli organismi impiegati nei saggi.

Effetto tossico cronico: effetto che si sviluppa in un periodo di tempo piuttosto elevato (generalmente per una esposizione superiore ad 1/10 del ciclo vitale dell'organismo test) e che può coinvolgere più generazioni di individui esposti; produce risposte che non compromettono la sopravvivenza degli organismi.

Eluato: è una soluzione ottenuta mediante un processo di rimozione di una sostanza adsorbita su una matrice porosa per mezzo di un flusso di solvente.

Elutriato: è una soluzione acquosa ottenuta mediante un processo di rimozione mediante lavaggio, da una matrice solida, di particolato fine e sostanze solubili.

Endpoint: espressione della caratteristica di un componente ecologico che si manifesta in conseguenza dell'esposizione di uno stressore. L'endpoint è il criterio terminale, ovvero il principio con cui si considera ultimato un saggio ecotossicologico.

FCD: Fattore di Conversione in Densità cellulare.

Fitotrone: apparato costituito da una serie di ambienti climatizzati in cui si riproducono artificialmente diversi climi e situazioni meteorologiche, per lo studio e la sperimentazione delle piante.

Immobilizzazione: si considerano immobili gli individui che, dopo leggera agitazione del contenitore per un periodo di 15 secondi, sono incapaci di spostamento, pur riuscendo a muovere antenne o arti.

Inibizione della bioluminescenza: riduzione della quantità di luce prodotta.

ISO: International Standard Organization.

LC₅₀ (Concentrazione media letale): è la concentrazione di una sostanza da testare che è statisticamente e verosimilmente in grado di uccidere il 50% degli organismi test esposti in un certo periodo.

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*, concentrazione che produce il più basso effetto osservato): la concentrazione più bassa che produce un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) sui parametri considerati (ad es., emergenza e crescita), rispetto alla tesi di controllo. Tutte le concentrazioni superiori a quella del LOEC avranno un effetto letale uguale o più elevato di quello osservato per il LOEC.

log Kow: coefficiente di ripartizione ottanolo / acqua.

MVC: Massima Velocità di Crescita.

NOEC (*No Observed Effect Concentration*, concentrazione di non effetto osservato): la più alta concentrazione del tossico a cui gli organismi sono esposti, che non determina un effetto osservabile e per la quale non è stata osservata una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo.

p/v: rapporto peso / volume.

Probit (*Probability unit*): Il probit di una percentuale P è l'ascissa che corrisponde alla probabilità P in una distribuzione normale con media 5 e varianza 1.

Ps: peso secco.

Px: peso della sostanza x.

rpm: giri al minuto (*rounds per minute*).

s.s.: Sostanza secca.

SOE: estrazione sostanze organiche (*Soil Organic Extraction*).

Sopravvivenza: è il rapporto percentuale tra i sopravvissuti nel campione e i sopravvissuti nel controllo.

Soxhlet: apparecchio di estrazione, a ricircolo di solvente organico, da una matrice ambientale della frazione organica.

SSs: Solidi Sospesi secchi.

Tasso di riproduzione: rapporto tra la media del numero di giovani lombrichi prodotti per contenitore e il periodo del saggio.

TOC: carbonio organico totale (*Total Organic Carbon*).

Tossicità acuta: capacità di una matrice di provocare un effetto tossico rilevabile in un limitato periodo di vita dell'organismo esaminato.

Unità Tossiche: numero intero che esprime la tossicità del campione come reciproco della diluizione che provoca un effetto rilevabile per il 50% degli organismi testati.

v/v: rapporto volume / volume

Valutazione visuale: Annotazione di eventuali danni osservati come: arresto della crescita, clorosi o necrosi sia nei trattati che nei controlli.

Vx: volume della sostanza x.

whc: capacità di ritenzione idrica (*water hydric content*).

ALLEGATO I CTN NELL'AMBITO DELLA RETE SINANET

Ruolo e struttura dei Centri Tematici Nazionali

Il progetto Centri Tematici Nazionali (CTN) ha avuto inizio nell'ottobre del 1998, nell'ambito delle attività di realizzazione e gestione del Sistema nazionale conoscitivo e dei controlli ambientali (SINAnet), con l'avvio e la realizzazione di 6 CTN prioritari, da sviluppare in collaborazione con le Agenzie regionali.

Il criterio di riferimento per l'individuazione dei primi 6 CTN è stato quello di garantire la corrispondenza con gli *European Topic Centres* (ETC), le strutture che giocano nella rete europea EIONet un ruolo omologo a quello dei CTN nella rete SINAnet.

La prosecuzione del progetto nel triennio 2002-2004, conseguente all'approvazione da parte della Conferenza Stato-Regioni del Piano di sviluppo SINAnet, ha visto una rivisitazione delle compagini al fine di permettere la partecipazione diretta a tutte le ARPA. Ciò ha comportato per tutti i CTN una modifica delle compagini e, limitatamente ad alcuni CTN, una parziale rivisitazione della denominazione e dei temi di competenza.

La situazione attuale vede operativi i seguenti CTN:

- Atmosfera, Clima ed Emissioni in aria (ACE)
- Agenti Fisici (AGF)
- Acque Interne e Marino costiere (AIM)
- Natura e Biodiversità (NEB), già Conservazione della Nature (CON)
- Rifiuti e Flussi di Materiali (RFM), già Rifiuti (RIF)
- Territorio e Suolo (TES), già Suolo e Siti Contaminati (SSC)

I Centri Tematici Nazionali, ciascuno nell'ambito delle aree tematiche di competenza, rappresentano per l'APAT il necessario supporto per l'attuazione dei compiti che la legge istitutiva le affida in materia di raccolta e gestione dei dati e delle informazioni ambientali e di controllo. In particolare, il supporto riguarda quanto attiene alla definizione di regole per rendere tali attività omogenee su tutto il territorio nazionale e disponibili sulla rete SINAnet, in linea con lo sviluppo di attività analoghe nel contesto comunitario.

In analogia al modello europeo, i CTN sono attuati da compagini di soggetti, nell'ambito delle quali, un Gruppo *leader* è preposto al coordinamento del progetto. Le compagini sono costituite da ARPA/APPA, con l'integrazione di altri soggetti, le Istituzioni Principali di Riferimento (IPR), che hanno competenze specialistiche in materia di azione conoscitiva per i vari temi ambientali. Per ogni CTN, l'ANPA (ora APAT) ha nominato un responsabile di progetto.

II CTN SSC e il CTN TES

Temi di competenza

I temi di competenza del CTN SSC sono rimasti anche al CTN TES, con l'aggiunta di un nuovo tema sull'uso del territorio. I temi attuali sono dunque:

- Qualità dei Suoli
- Degradazione fisica e biologica del suolo
- Contaminazione dei suoli da fonti diffuse
- Contaminazione puntuale del suolo e siti contaminati
- Uso del territorio

Composizione del CTN SSC

Responsabile di progetto ANPA: Antonio Pugliese

Responsabile CTN leader: Renzo Barberis

I soggetti partecipanti al CTN SSC sono:

Leader: ARPA Piemonte

Co-leader: ARPA Liguria

Partecipanti: ARPA Emilia Romagna

ARPA Toscana

ARPA Veneto

ARPA Campania

IPR:

Istituto di Chimica del Terreno del CNR di Pisa;

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma ;

Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo di Firenze;

European Soil Bureau - Joint Research Centre- ISPRA -VA;

Dipartimento di Chimica Analitica dell'Università di Torino;

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare della Facoltà di Agraria dell'Università di Bologna, sede distaccata di Reggio Emilia;

Ente di Sviluppo Agricolo della Regione Lombardia;

Istituto Nazionale di Economia Agraria.

Composizione del CTN TES

Responsabile di progetto APAT: Antonio Pugliese

Responsabile CTN leader: Renzo Barberis

I soggetti partecipanti al CTN TES sono:

Gruppo Leader: ARPA Piemonte (leader)
 ARPA Campania
 ARPA Friuli Venezia Giulia
 ARPA Marche

Partecipanti: ARPA Emilia Romagna
 ARPA Liguria
 ARPA Veneto
 ARPA Calabria
 ARPA Sardegna

IPR: Dipartimento di Chimica Analitica dell'Università di Torino
 Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo di
 Firenze
 Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma
 Dipartimento di Protezione e Valorizzazione
 Agroalimentare della Facoltà di Agraria dell'Università di
 Bologna, sede distaccata di Reggio Emilia
 Dipartimento di Matematica e Informatica dell'Università di
 Salerno
 Dipartimento Scienze Geologiche, Ambientali e Marine
 dell'Università di Trieste