

**RICERCHE
E FORMAZIONE**

Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico



**Agenzia Regionale
per la Protezione Ambientale della Toscana**

Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico

a cura di
**Giancarlo Sbrilli, Antonio Limberti
Gabriella Caldini, Adelmo Corsini**

**Gruppo di Lavoro “Test di Tossicità”
coordinatore Giancarlo Sbrilli**

ARPAT

Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana

Ricerche e formazione

8

Gli autori

Giancarlo Sbrilli - biologo, in servizio presso il Dipartimento Arpat di Livorno, Servizio di Piombino, si occupa di ecotossicologia e di bioindicazione degli ambienti acquatici con particolare riferimento alle acque costiere.

Antonio Limberti - biologo, in servizio presso il Dipartimento ARPAT di Prato, si occupa di ecotossicologia e di bioindicazione delle acque superficiali e dell'aria.

Gabriella Caldini - biologa, in servizio presso il Dipartimento ARPAT di Firenze, si occupa di bioindicazione delle acque superficiali e dell'aria e di microbiologia ambientale.

Adelmo Corsini - biologo, responsabile di Unità Operativa presso il Dipartimento ARPAT di Pistoia, si occupa di microbiologia ambientale e di bioindicazione delle acque superficiali e dell'aria.

Coordinamento editoriale:

Pietro Bertoli, ARPAT, settore tecnico CEDIF

Via Baracca, 9 - 50127 Firenze

Tel. 055-3206355/62/63/64

Fax 055-3206367

E mail: cedoc@fi.nettuno.it

Realizzazione editoriale:

Litografia I.P. - Firenze - Tel. 055/578661

Finito di stampare nel febbraio 1998

Progetto grafico della copertina:

Gianni Sinni - CDC graphics

Stampato su carta ecologica

PRESENTAZIONE

La Legge 10/05/1976, n. 319, finalizzata anche al controllo ed alla regolamentazione degli scarichi idrici, nonostante sia in vigore da oltre vent'anni non ha prodotto tutti quegli effetti positivi che ci si poteva attendere anche perché ha inciso prevalentemente sulle caratteristiche degli scarichi degli insediamenti produttivi. D'altra parte sulla qualità dei corpi ricettori hanno influito negativamente i "nutrienti", composti tipici degli scarichi civili e delle attività agricole e zootecniche, correlabili del fenomeno eutrofizzazione.

A questo riguardo è importante sottolineare come la recente normativa comunitaria a tutela della risorsa idrica rivolga una particolare attenzione alla qualità dei corpi idrici per definire la strategia del loro progressivo risanamento attraverso una nuova regolamentazione degli scarichi. A livello nazionale, il testo unico delle acque, attualmente in fase di preparazione, pone, infatti, al centro della strategia del risanamento la conoscenza dello stato della qualità dei corpi idrici, imponendo conseguentemente una complessiva revisione della attuale regolamentazione degli scarichi. Anche il prossimo Piano di risanamento delle acque della Regione Toscana si uniformerà a questa nuova filosofia.

È evidente, quindi, che la salvaguardia dei molteplici usi, a cui i corpi idrici sono destinati, richiede un'approfondita conoscenza dell'ambiente idrico. A tal fine è necessario integrare le tradizionali indagini chimico-fisiche e microbiologiche con valutazioni sulla risposta biologica proveniente da alcuni gruppi di organismi viventi.

In particolare i sistemi di indagine ambientale capaci di indicare il comportamento delle popolazioni algali rappresentano un utile mezzo di controllo del fenomeno dell'eutrofizzazione.

In questo contesto si inserisce la pubblicazione dei metodi di saggio algale, come necessario supporto metodologico-conoscitivo agli operatori impegnati nel risanamento dei corpi idrici.

Lario Agati
Direttore Tecnico dell'ARPAT

AVVERTENZA

Per la maggior parte degli utilizzatori della metodica di saggio algale i metodi di riferimento risalgono agli anni '70. Si tratta delle pubblicazioni EPA ed IRSA: Marine algal assay procedures bottle test. Eutrophication and Lake Restoration Branch (1974) per le acque costiere; The Selenastrum capricornutum PRINTZ Algal Assay Bottle Test (1978) per le acque dolci superficiali e la Metodologia di saggio algale per lo studio della contaminazione delle acque marine (1978).

Alla seconda metà degli anni '80 risalgono le pubblicazioni EPA relative all'applicazione del saggio algale per il controllo delle acque di scarico: Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms (1985); Methods for toxicity tests of single substances and liquid complex wastes with marine unicellular algae (1988).

Con il trascorrere del tempo la metodica del saggio algale, nella sua fase applicativa, è stata modificata dai singoli operatori sulla scorta delle proprie esperienze e in base ai lavori pubblicati sull'argomento sia da autorevoli istituzioni tecnico-scientifiche (APHA-AWWA-WEF, ASTM, ecc.) che dalla letteratura scientifica internazionale.

Dopo anni di utilizzazione, in molti operatori si è andata consolidando la convinzione della necessità di un processo di revisione e standardizzazione della metodologia, al fine di ricomporre all'interno di quest'ultima le risposte ai problemi applicativi che si sono presentati nel corso di questi ultimi anni.

In relazione alle attività di controllo della qualità delle acque, l'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana ha ritenuto opportuno fornire le proprie strutture laboratoristiche di un manuale pratico capace di garantire un'applicazione estesa, uniforme e aggiornata della metodica di saggio algale. A tal fine il Gruppo di Lavoro "Test di Tossicità" ha prodotto il presente quaderno, con riferimento costante alle metodiche tradizionali ma con l'intenzione di fornire anche un contributo per una auspicabile revisione e standardizzazione della metodica di saggio algale da parte delle Istituzioni scientifiche di riferimento.

Giancarlo Sbrilli
Coordinatore del G.d.l. "Test di tossicità"

INDICE

I - Il saggio algale

1	<i>Introduzione</i>	19
2	<i>Le caratteristiche principali del saggio algale</i>	20
2.1	Definizione	20
2.2	La crescita algale	20
	2.2.1 Illuminazione	21
	2.2.2 Temperatura	21
	2.2.3 Nutrienti	21
	2.2.4 CO ₂ e controllo del pH	22
2.3	La Massima Velocità di Crescita (MVC) e la Massima Crescita Algale (MCA)	22
2.4	La Massima Velocità di Crescita (MVC)	23
2.5	La Massima Crescita Algale (MCA)	24
2.6	Variabilità dei dati	24
3	<i>Lavaggio e preparazione della vetreria</i>	24
3.1	Vetreria e materiali in plastica	24
3.2	Soluzioni da preparare per il lavaggio della vetreria	25
3.3	Procedura per la preparazione della vetreria che viene a contatto con le colture algali	25
3.4	Procedura per la preparazione della vetreria non destinata al contatto con le colture algali.	25

II - Saggio algale per la valutazione della qualità dei corpi idrici

1	<i>Principi generali del metodo</i>	26
2	<i>Utilizzazioni ed informazioni ottenibili con il saggio algale per le acque superficiali</i>	27
2.1	Uso del saggio algale	27
2.2	Informazioni ottenibili mediante il saggio algale	27
3	<i>Prelievo, trasporto, preparazione e conservazione dei campioni</i>	27
3.1	Individuazione dei punti di prelievo	27
3.2	Campionamento	28
3.3	Preparazione del campione	28
3.4	Conservazione del campione	28
3.5	Modifiche del campione	29

4	<i>Strumentazione e accessori di laboratorio</i>	29
4.1	Prelievo e preparazione del campione	29
4.2	Preparazione, incubazione e misura della crescita delle colture algali	30

II. 1 - Utilizzazione di *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocyllis subcapitata*) nel saggio algale per la valutazione della qualità delle acque dolci superficiali.

1	<i>La specie algale</i>	31
2	<i>Terreno di coltura per il clone algale</i>	31
2.1	Metodi per la preparazione del terreno	31
2.2	Preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale	32
2.3	Preparazione del terreno di mantenimento in fase solida	34
2.4	Preparazione del terreno per l'esecuzione del saggio di tossicità algale	34
3	<i>Mantenimento del clone algale</i>	35
3.1	Terreno di mantenimento	35
3.2	Vetreria per le colture algali	35
3.3	Condizioni di incubazione	35
3.4	Colture algali su terreno liquido	36
3.5	Colture algali su terreno agarizzato	36
3.6	Preparazione dell'inoculo algale	37
3.6.1	Soluzione per il lavaggio delle alghe	37
3.6.2	Lavaggio della sospensione algale	37
3.6.3	Conteggio delle cellule algali della sospensione	38
3.6.4	Diluizione della sospensione algale	38
3.6.5	Distribuzione dell'inoculo nelle beute del saggio	38
4	<i>Sistemi di misura della crescita algale</i>	39
4.1	Massima Crescita Algale (MCA) e Crescita Algale alla 96° ora (CA96)	39
4.2	Peso secco	39
4.2.1	Metodo gravimetrico	40
4.2.2.	Determinazione della biomassa espressa in termini di peso secco mediante conteggio cellulare e determinazione del Volume Globulare Medio (VGM).	41

4.2.3	Determinazione della biomassa espressa in termini di peso secco mediante il Fattore di Conversione in Biomassa (FCB).	42
4.3	Densità cellulare	42
4.3.1	Conteggio cellulare mediante contaglobuli elettronico	42
4.3.2	Conteggio cellulare mediante lettura microscopica	43
4.4	Determinazione della clorofilla-a mediante fluorescenza	43
4.5	Determinazione della densità cellulare mediante misura dell'assorbanza	44
5	<i>Analisi statistica dei dati</i>	45
5.1	Espressione dei dati relativi alla crescita algale e numero di replicati	45
5.2	Elaborazione dei dati per la valutazione dello stato trofico	45
5.3	Elaborazione dei dati relativi al test di tossicità	46
5.4	Esclusione di dati anomali dal calcolo statistico	47
6	<i>Parametri chimico-fisici</i>	48
7	<i>Piano sperimentale</i>	49
7.1	Valutazione dello stato trofico e saggio di tossicità	49
7.2	Piano di lavoro per la valutazione dello stato trofico	49
7.2.1	Aggiunte di nutrienti e distribuzione nelle beute	49
7.2.2	Calcoli per le aggiunte	51
7.2.3	Volume delle aggiunte	52
7.2.4	Identificazione delle beute	52
7.2.5	Aggiunta dell'inoculo	52
7.2.6	Incubazione delle beute	52
7.2.7	Uso dei fogli di lavoro	53
7.3	Piano di lavoro per la valutazione della tossicità	53
7.3.1	Preparazione del campione	53
7.3.2	Preparazione della soluzione di riferimento (controllo)	54
7.3.3	Distribuzione del campione e del controllo nelle beute	54
7.3.4	Identificazione delle beute	54
7.3.5	Aggiunta dell'inoculo	54
7.3.6	Incubazione delle beute	54
7.3.7	Uso dei fogli di lavoro	55
8	<i>Valutazione dei dati</i>	55
8.1	Valutazione dei dati provenienti dal saggio per lo stato trofico (vedere punto 7.2).	55

8.1.1	Valutazione del fattore limitante	56
8.1.2	Limitazione da fosforo	56
8.1.2.1	Caso A , limitazione primaria da fosforo e secondaria da azoto	56
8.1.2.2	Caso B, limitazione esclusiva da fosforo	56
8.1.3	Limitazione da azoto	57
8.1.4	Limitazione contemporanea da azoto e fosforo	57
8.1.5	Limitazione da parte di altri nutrienti	57
8.1.6	Presenza di fattori inibenti la crescita algale	57
8.1.7	Rapporto ottimale di assimilazione N/P	58
8.2	Determinazione della quantità biodisponibile dei principali nutrienti limitanti la crescita algale.	58
8.2.1	Fattore di Produzione di Biomassa (FPB)	59
8.2.2	Calcolo dell'azoto biodisponibile	59
8.2.3	Calcolo del fosforo biodisponibile.	60
8.2.4	Calcolo della percentuale di nutriente biodisponibile	60
8.3	Valutazione dello stato trofico.	60
 II.2 - Utilizzazione di <i>Dunaliella tertiolecta</i> nel saggio algale per la valutazione della qualità delle acque marine costiere.		
1	<i>La specie algale</i>	61
2	<i>Terreno di coltura per il clone algale</i>	61
2.1	Composizione del terreno	61
2.2	Acqua di mare per la preparazione del terreno e per l'uso come acqua di controllo e diluizione	63
2.3	Preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale	64
2.4	Preparazione del terreno di mantenimento in fase solida	65
2.5	Preparazione del terreno per l'esecuzione del saggio di tossicità algale	65
3	<i>Mantenimento del clone algale</i>	66
3.1	Terreno di mantenimento	66
3.2	Vetreteria per le colture algali	66
3.3	Condizioni di incubazione	67
3.4	Colture algali su terreno liquido	67
3.5	Colture algali su terreno agarizzato	67
3.6	Preparazione dell'inoculo algale	68
3.6.1	Soluzione per il lavaggio delle alghe	68

3.6.2	Lavaggio della sospensione algale	68
3.6.3	Conteggio delle cellule algali della sospensione	69
3.6.4	Diluizione della sospensione algale	69
3.6.5	Distribuzione dell'inoculo nelle beute del saggio	69
4	<i>Sistemi di misura della crescita algale</i>	70
4.1	Massima Crescita Algale (MCA) e Crescita Algale alla 96° ora (CA96)	70
4.2	Peso secco	70
4.2.1	Metodo gravimetrico	70
4.2.2	Determinazione della biomassa espressa in termini di peso secco mediante i Fattori di Conversione in Biomassa (FCB).	72
4.3	Densità cellulare	72
4.3.1	Conteggio cellulare mediante contaglobuli elettronico	73
4.3.2	Conteggio cellulare mediante lettura microscopica	73
4.4	Determinazione della clorofilla-a mediante fluorescenza	74
4.5	Determinazione della densità cellulare mediante misura dell'assorbanza	75
5	<i>Analisi statistica dei dati</i>	75
5.1	Espressione dei dati relativi alla crescita algale e numero di replicati	75
5.2	Elaborazione dei dati per la valutazione dello stato trofico	76
5.3	Elaborazione dei dati relativi al test di tossicità	77
5.4	Esclusione di dati anomali dal calcolo statistico	78
6	<i>Parametri chimico-fisici</i>	79
7	<i>Piano sperimentale</i>	79
7.1	Valutazione dello stato trofico e saggio di tossicità	79
7.2	Piano di lavoro per la valutazione dello stato trofico	79
7.2.1	Aggiunte di nutrienti e distribuzione nelle beute	80
7.2.2	Calcoli per le aggiunte	83
7.2.3	Volume delle aggiunte	83
7.2.4	Identificazione delle beute	83
7.2.5	Aggiunta dell'inoculo	83
7.2.6	Incubazione delle beute	83
7.2.7	Uso dei fogli di lavoro	84
7.3	Piano di lavoro per la valutazione della tossicità	84
7.3.1	Preparazione del campione	85

7.3.2	Preparazione della soluzione di riferimento (controllo)	85
7.3.3	Distribuzione del campione e del controllo nelle beute	85
7.3.4	Identificazione delle beute	85
7.3.5	Aggiunta dell'inoculo	86
7.3.6	Incubazione delle beute	86
7.3.7	Uso dei fogli di lavoro	86
8	<i>Valutazione dei dati</i>	86
8.1	Valutazione dei dati provenienti dal saggio per lo stato trofico (vedere punto 7.2).	86
8.1.1	Valutazione del fattore limitante	87
8.1.2	Limitazione da fosforo	87
8.1.2.1	Caso A , limitazione primaria da fosforo e secondaria da azoto	87
8.1.2.2	Caso B, limitazione esclusiva da fosforo	88
8.1.3	Limitazione da azoto	88
8.1.4	Limitazione contemporanea da azoto e fosforo	88
8.1.5	Limitazione da parte di altri nutrienti	88
8.1.6	Presenza di fattori inibenti la crescita algale	89
8.1.7	Rapporto ottimale di assimilazione N/P	89
8.2	Determinazione della quantità biodisponibile dei principali nutrienti limitanti la crescita algale.	90
8.2.1	Fattore di Produzione di Biomassa (FPB)	90
8.2.2	Calcolo dell'azoto biodisponibile	91
8.2.3	Calcolo del fosforo biodisponibile.	91
8.2.4	Calcolo della percentuale di nutriente biodisponibile	91
8.3	Valutazione dello stato trofico.	92

III - Saggio algale per la valutazione della tossicità delle acque di scarico.

1	<i>Principi generali del metodo</i>	93
2	<i>Utilizzazioni ed informazioni ottenibili con il saggio</i> di tossicità algale per le acque di scarico	94
2.1	Uso del saggio algale	94
2.2	Informazioni ottenibili mediante il saggio algale	94
3	<i>Prelievo, trasporto, preparazione e conservazione dei campioni</i>	95
3.1	Il prelievo	95
3.2	Preparazione del campione	95

3.3	Conservazione del campione	96
3.4	Modifiche del campione	96
4	<i>Strumentazione ed accessori di laboratorio</i>	96
4.1	Prelievo e preparazione del campione	96
4.2	Preparazione, incubazione e misura della crescita delle colture algali	97

III. 1 - Utilizzazione di *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocyllis subcapitata*) nel saggio algale per la valutazione della tossicità delle acque di scarico.

1	<i>La specie algale</i>	99
2	<i>Terreno di coltura per il clone algale</i>	99
2.1	Metodi per la preparazione del terreno	99
2.2	Preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale	100
2.3	Preparazione del terreno di mantenimento in fase solida	102
2.4	Preparazione del terreno per l'esecuzione del saggio di tossicità algale	102
3	<i>Mantenimento del clone algale</i>	103
3.1	Terreno di mantenimento	103
3.2	Vetreria per le colture algali	103
3.3	Condizioni di incubazione	103
3.4	Colture algali su terreno liquido	104
3.5	Colture algali su terreno agarizzato	104
3.6	Preparazione dell'inoculo algale	105
3.6.1	Soluzione per il lavaggio delle alghe	105
3.6.2	Lavaggio della sospensione algale	105
3.6.3	Conteggio delle cellule algali della sospensione	106
3.6.4	Diluizione della sospensione algale	106
3.6.5	Distribuzione dell'inoculo nelle beute del saggio	106
4	<i>Sistemi di misura della crescita algale</i>	107
4.1	Crescita Algale alla 96° ora (CA96)	107
4.2	Densità cellulare	107
4.2.1	Conteggio cellulare mediante contaglobuli elettronico	107
4.2.2	Conteggio cellulare mediante lettura microscopica	108
4.3	Determinazione della clorofilla-a mediante fluorescenza	109
4.4	Determinazione della densità cellulare mediante misura dell'assorbanza	109

5	<i>Analisi statistica dei dati</i>	110
5.1	Espressione dei dati relativi alla crescita algale e numero di replicati	110
5.2	Elaborazione dei dati	110
5.2.1	Analisi dei Probits (Probability units)	111
5.2.2	Calcolo della EC50 ^{96h} (Concentrazione Efficace mediana determinata alla 96° ora).	112
5.2.3	Calcolo della NOEC (No Observed Effect Concentration)	112
5.2.4	Calcolo della LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)	113
5.2.5	Test di Dunnett	113
5.2.6	Test t di Student	113
5.2.7	Esclusione di dati anomali dal calcolo statistico	114
6	<i>Parametri chimico-fisici</i>	115
6.1	pH	115
6.2	Salinità	115
6.2.1	Scarichi salini in acque dolci	116
6.2.2	Scarichi di acque dolci in acque marine o salmastre	116
6.3	Cloro attivo totale	116
7	<i>Piano sperimentale</i>	117
7.1	Piano sperimentale	117
7.2	Preparazione del campione	117
7.3	Preparazione della soluzione di riferimento (controllo)	117
7.4	Campioni con elevate concentrazioni di nutrienti	117
7.5	Preparazione delle diluizioni del campione	118
7.5.1	Saggio preliminare	118
7.5.2	Saggio definitivo	118
7.6	Distribuzione delle diluizioni del campione e del controllo nelle beute	119
7.7	Identificazione delle beute	119
7.8	Aggiunta dell'inoculo	119
7.9	Incubazione delle beute	119
7.10	Misura della crescita algale	120
7.11	Uso dei fogli di lavoro	120
8	<i>Controllo di qualità</i>	120
8.1	Controllo di precisione, utilizzo delle carte di controllo.	120

9	<i>Valutazione dei dati</i>	121
9.1	Risposta delle colture algali agli effetti biologici esercitati dalle acque di scarico	122
9.1.1	Stimolazione della crescita algale	122
9.1.2	Inibizione della crescita algale	123
9.1.3	Stimolazione della crescita algale da parte delle alte diluizioni del campione e inibizione della crescita da parte delle basse diluizioni.	124
9.2	Scarichi tossici, gestione dei risultati	125
9.2.1	Uso di tabelle per il confronto e la classificazione degli scarichi tossici	125
9.2.2	Determinazione del Carico Tossico Complessivo (CTC)	126
 III. 2 - Utilizzazione di <i>Dunaliella tertiolecta</i> nel saggio algale per la valutazione della tossicità delle acque di scarico.		
1	<i>La specie algale</i>	127
2	<i>Terreno di coltura per il clone algale</i>	127
2.1	Composizione del terreno	127
2.2	Acqua di diluizione per la preparazione del terreno	129
2.3	Preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale	130
2.4	Preparazione del terreno di mantenimento in fase solida	131
2.5	Preparazione del terreno per l'esecuzione del saggio di tossicità algale	131
3	<i>Mantenimento del clone algale</i>	132
3.1	Terreno di mantenimento	132
3.2	Vetreria per le colture algali	132
3.3	Condizioni di incubazione	132
3.4	Colture algali su terreno liquido	133
3.5	Colture algali su terreno agarizzato	133
3.6	Preparazione dell'inoculo algale	134
	3.6.1 Soluzione per il lavaggio delle alghe	134
	3.6.2 Lavaggio della sospensione algale	134
	3.6.3 Conteggio delle cellule algali della sospensione	135
	3.6.4 Diluizione della sospensione algale	135
	3.6.5 Distribuzione dell'inoculo nelle beute del saggio	135
4	<i>Sistemi di misura della crescita algale</i>	136
4.1	Crescita Algale alla 96° ora (CA96)	136

4.2	Densità cellulare	136
4.2.1	Conteggio cellulare mediante contaglobuli elettronico	136
4.2.2	Conteggio cellulare mediante lettura microscopica	137
4.3	Determinazione della clorofilla-a mediante fluorescenza	137
4.4	Determinazione della densità cellulare mediante misura dell'assorbanza	138
5	<i>Analisi statistica dei dati</i>	139
5.1	Espressione dei dati relativi alla crescita algale e numero di replicati	139
5.2	Elaborazione dei dati	139
5.2.1	Analisi dei Probits (Probability units)	140
5.2.2	Calcolo della EC50 ^{96h} (Concentrazione Efficace mediana determinata alla 96° ora).	141
5.2.3	Calcolo della NOEC (No Observed Effect Concentration)	141
5.2.4	Calcolo della LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)	141
5.2.5	Test di Dunnett	142
5.2.6	Test t di Student	142
5.2.7	Esclusione di dati anomali dal calcolo statistico	142
6	<i>Parametri chimico-fisici</i>	143
6.1	pH	144
6.2	Salinità	144
6.2.1	Scarichi salini in acque dolci	144
6.2.2	Scarichi di acque dolci in acque marine o salmastre	144
6.3	Cloro attivo totale	145
7	<i>Piano sperimentale</i>	145
7.1	Piano sperimentale	145
7.2	Preparazione del campione	146
7.3	Preparazione della soluzione di riferimento (controllo)	146
7.4	Campioni con elevate concentrazioni di nutrienti	146
7.5	Preparazione delle diluizioni del campione	146
7.5.1	Saggio preliminare	147
7.5.2	Saggio definitivo	147
7.6	Distribuzione delle diluizioni del campione e del controllo nelle beute	147
7.7	Identificazione delle beute	148

7.8	Aggiunta dell'inoculo	148
7.9	Incubazione delle beute	148
7.10	Misura della crescita algale	148
7.11	Uso dei fogli di lavoro	149
8	<i>Controllo di qualità</i>	149
8.1	Controllo di precisione, utilizzo delle carte di controllo	149
9	<i>Valutazione dei dati</i>	150
9.1	Risposta delle colture algali agli effetti biologici esercitati dalle acque di scarico	150
9.1.1	Stimolazione della crescita algale	150
9.1.2	Inibizione della crescita algale	152
9.1.3	Stimolazione della crescita algale da parte delle alte diluizioni del campione e inibizione della crescita da parte delle basse diluizioni.	153
9.2	Scarichi tossici, gestione dei risultati	153
9.2.1	Uso di tabelle per il confronto e la classificazione degli scarichi tossici	154
9.2.2	Determinazione del Carico Tossico Complessivo (CTC)	154

Appendice n.1

	Calcoli statistici	156
1.1	Valore medio (\bar{x})	156
1.2	Devianza (D)	156
1.3	Varianza (v)	156
1.4	Deviazione standard (DS)	156
1.5	Calcolo del t di student	156
1.5.1	Significato del t di Student	157
1.5.2	Uso della tabella del t di Student	157
1.6	Tabella di distribuzione del chi-quadro (x^2)	159
1.7	Applicazione Excel per la procedura di Dunnett "Dunaliella"	159
1.7.1	Premessa	159
1.7.2	Istruzioni per l'uso	160
1.7.3	Installazione	160
1.7.4	Utilizzo	160
1.7.5	Riferimenti	162

Appendice n. 2	
Fattore di conversione in biomassa (FCB) per misure di densità algale per <i>R. Subcapitata</i>	165
Appendice n. 3	
Fattore di conversione in biomassa (FCB) per misure di densità algale per <i>D. Tertiolecta</i>	167
Appendice n.4	
Valutazione dei sistemi di misura della crescita algale	169
Appendice n. 5	
Fattore di produzione di biomassa (FPB) per la determinazione del fosforo per <i>D. Tertiolecta</i>	172
Appendice n. 6	
Fattore di produzione di biomassa (FPB) per la determinazione dell'azoto per <i>D. Tertiolecta</i>	174
Appendice n.7	
Determinazione della densità algale mediante misure spettrofotometriche.	176
Appendice n.8	
Scheda di lavoro per la valutazione dello stato trofico	178
Appendice n. 9	
Scheda di lavoro per la valutazione della tossicità	179
Appendice n. 10	
Controllo di qualità test algale.	180
Appendice n. 11	
Determinazione del rapporto ottimale di assorbimento dei nutrienti azoto e fosforo in <i>D. Tertiolecta</i> .	182
Sigle utilizzate nel testo	186
Bibliografia	189

I - Il Saggio Algale

1 Introduzione

Le alghe rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici; l'ossigeno prodotto mediante il processo fotosintetico è indispensabile per la sopravvivenza delle specie animali. Le alghe contribuiscono all'attività auto-purificatrice dei corsi d'acqua, dei laghi e delle acque costiere e costituiscono la base sulla quale si instaurano le reti alimentari degli organismi consumatori.

Le modificazioni della comunità fitoplanctonica causate da effetti tossici possono alterare la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema. (Mosser et al., 1972).

Elevate concentrazioni di sostanze nutritive (come i composti del fosforo e dell'azoto), in presenza di condizioni climatiche caratterizzate da elevato irraggiamento solare e temperature miti, possono favorire crescite algali di notevole intensità tali da modificare gli ambienti acquatici alterandone profondamente le normali oscillazioni della concentrazione di ossigeno disciolto e favorendo lo sviluppo di metaboliti tossici per numerose specie animali. I corpi d'acqua caratterizzati dai fenomeni eutrofici possono finire col risultare compromessi per i numerosi usi ai quali sono spesso destinati (idropotabile, ittiocoltura, molluschiocoltura, balneazione). L'incremento della crescita algale, legato all'arricchimento in sostanze nutritive dei corpi idrici risulta un fenomeno generalizzato, anche se gli effetti più evidenti sono osservabili nelle acque lacustri e nelle lagune costiere dove, in alcuni casi, essi assumono le dimensioni di vere e proprie crisi distrofiche.

Si rende necessario, per le attività di controllo ambientale, disporre di un metodo capace di fornire risposte utili alla valutazione degli effetti eser-

citati dalle sorgenti inquinanti, localizzate e diffuse, sulla produttività algale.

Il saggio algale, eseguito con alghe verdi monocellulari, costituisce un valido strumento di indagine capace di fornire risposte utili nelle attività di monitoraggio ambientale e nella previsione dell'impatto sui ricettori da parte degli scarichi idrici.

2 Le caratteristiche principali del saggio algale

2.1 Definizione

Trainor fornisce la seguente definizione semplice e sintetica del saggio algale.

...La maggior parte dei saggi algali sono teoricamente molto simili. Dopo l'eliminazione degli organismi indigeni attraverso un sistema di rimozione meccanica, di regola per mezzo della filtrazione in ambiente sterile, introdurre la specie algale prescelta per il saggio nel campione d'acqua, il quale viene utilizzato come terreno di coltura. Incubare quest'ultimo in ambiente controllato per alcuni giorni. La crescita algale, o l'assenza di essa, è indice di presenza di nutrienti o di sostanza tossiche... (Trainor, 1984).

2.2 La crescita algale

La crescita delle popolazioni di alghe monocellulari disposte in mezzo di coltura liquido segue, di regola, una cinetica di I ordine :

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

dove:

X = parametro indicatore della crescita algale (biomassa, densità cellulare, ecc.);

μ = tasso specifico di crescita.

Il tasso specifico di crescita μ è influenzato da importanti fattori quali la luce, la temperatura, la disponibilità di nutrienti e di biossido di carbonio.

L'andamento esponenziale della cinetica di I ordine si può trasformare in un andamento lineare caratteristico delle cinetiche di ordine zero se la

disponibilità di luce, di nutrienti o di CO_2 si riduce a tal punto da limitare la crescita algale (Nyholm e Kallqvist, 1989).

2.2.1 Illuminazione

La crescita delle colture algali tende ad aumentare con l'intensità luminosa sino ad un livello di saturazione. Il livello di saturazione dipende dalla specie algale, dalla temperatura, dalla disponibilità di nutrienti e di biossido di carbonio. Nel saggio algale le condizioni di illuminazione devono essere tali da consentire una crescita esponenziale; a tal fine è necessario che l'intensità luminosa sia superiore al livello di saturazione e che sia evitato l'effetto di "auto-schermatura" esercitato sulla luce incidente dalle colture con elevata densità cellulare (l'agitazione delle colture algali e l'utilizzazione di contenitori di piccole dimensioni riducono l'effetto schermante). Nella conduzione dei saggi algali la condizione di illuminazione continua è preferibile al ritmo giorno-notte.

2.2.2 Temperatura

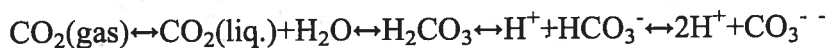
La crescita delle colture algali tende ad aumentare con la temperatura sino al raggiungimento della temperatura ottimale oltre la quale la crescita rapidamente declina. Le colture algali devono essere incubate in ambienti con temperatura costante; tali ambienti devono essere inoltre capaci di contenere l'incremento di temperatura causato dalle sorgenti luminose.

2.2.3 Nutrienti

La crescita algale dipende dalle concentrazioni intracellulari di nutrienti mentre non risulta direttamente legata alle concentrazioni dei nutrienti stessi nel mezzo di coltura. Nelle colture algali dove l'illuminazione e la disponibilità di CO_2 sono tali da non limitare la crescita algale, quest'ultima presenterà un andamento esponenziale sino a che vi sarà disponibilità bilanciata di nutrienti nel mezzo di coltura. Dopo l'esaurimento di un nutriente (di regola fosforo o azoto) nel mezzo di coltura la crescita algale continuerà grazie all'utilizzazione delle riserve intracellulari ma la crescita tenderà gradualmente a declinare man mano che anche la concentrazione intracellulare di nutrienti tenderà a ridursi sempre di più.

2.2.4 CO₂ e controllo del pH

Le alghe monocellulari utilizzano come sorgente di carbonio prevalentemente la CO₂ presente nel mezzo acquoso.



Nelle colture algali la densità cellulare può raggiungere rapidamente livelli elevati, con una richiesta di biossido di carbonio superiore alla diffusione del gas stesso nella fase liquida. In una tale situazione la richiesta di CO₂ in fase liquida determina il consumo del bicarbonato presente in soluzione (con spostamento verso sinistra dell'equilibrio chimico), la conseguente riduzione degli ioni idrogeno e l'innalzamento del pH. In tali condizioni la crescita esponenziale della coltura algale prosegue sino all'esaurimento del bicarbonato o sino al raggiungimento di un valore del pH così elevato da risultare inibente la stessa crescita algale.

Tra le reazioni biochimiche che hanno luogo nelle colture algali anche l'utilizzazione di azoto inorganico è capace di alterare significativamente il pH del mezzo di coltura (Stumm e Morgan, 1980). Ad esempio l'assunzione di nitrato determina la produzione equimolare di ioni ossidrilici con incremento del pH: $\text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH}^- + \text{N}(\text{organico})$.

Nel saggio algale le variazioni di pH devono essere ridotte al minimo; a tal fine è necessario tenere presenti le seguenti condizioni di lavoro:

a) assicurare il trasferimento del biossido di carbonio all'interno delle colture algali mediante agitazione continua delle beute o aerazione dell'ambiente di incubazione;

b) pianificare le condizioni del saggio in modo da ottenere una non elevata produzione di biomassa algale; a tal fine è consigliabile utilizzare basse densità algali all'inizio del test o terminare il test stesso dopo un breve periodo di incubazione (72 o 96 ore).

2.3 La Massima Velocità di Crescita (MVC) e la Massima Crescita Algale (MCA)

I parametri utilizzabili per descrivere la crescita algale sono: la Massima Velocità di Crescita specifica (MVC) e la Massima Crescita Algale (MCA), quest'ultima corrisponde al raggiungimento della fase di crescita stazionaria della coltura algale. La MVC viene misurata nelle fasi iniziali del saggio, la MCA viene misurata al termine del saggio.

2.4 La Massima Velocità di Crescita (MVC)

La massima velocità di crescita specifica (MVC), nota come Maximum specific growth rate (APHA-AWWA-WEF, 1992) rappresenta la più alta velocità di crescita registrabile durante la fase di crescita logaritmica. Per determinare la MVC è necessario misurare la crescita algale (μ) giornalmente entro i primi 4-5 giorni dall'inoculo. Usare l'equazione (1) per calcolare la velocità di crescita specifica giornaliera (μ); registrare il valore massimo (μ_{\max}) di μ rilevato nelle misure giornaliere. Eseguire le misure in almeno 3 colture algali; la MVC corrisponde al valore medio relativo ai valori di μ_{\max} .

$$\mu \cdot d^{-1} = \frac{\ln(X_2/X_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

X_2 = parametro indicatore della crescita algale rilevata al termine dell'intervallo di tempo previsto (n. cellule x $10^3/\text{mL}$);

X_1 = parametro indicatore della crescita algale rilevata all'inizio dell'intervallo di tempo previsto (n. cellule x $10^3/\text{mL}$);

$t_2 - t_1$ = intervallo di tempo previsto (giorni); quando viene eseguita una lettura dopo 24 ore allora $t_2 - t_1 = 1$.

Se la lettura non viene eseguita dopo esattamente 24 ore allora è necessario esprimere il valore di t in termini decimali (ad esempio se la lettura viene eseguita dopo 21 ore, il valore di t sarà espresso come $21/24=0,87$).

Le misure della crescita algale relative alla determinazione della MVC possono essere eseguite con differenti sistemi, come ad esempio il conteggio del numero di cellule, la misura fluorimetrica in vivo della concentrazione di clorofilla-a, la determinazione gravimetrica del peso secco, la misura spettrofotometrica della densità algale, senza necessariamente convertire le misure eseguite con uno dei sistemi suddetti ad un unico sistema di riferimento. Tuttavia è opportuno tenere presente che l'uso dei sistemi di misura gravimetrico e spettrofotometrico, essendo poco sensibili e richiedendo elevate densità cellulari, è sconsigliabile. E' importante inoltre tenere presente che la velocità di crescita è controllata dalla concentrazione intracellulare di nutrienti mentre non vi è alcuna diretta dipendenza dalla concentrazione dei nutrienti presenti nel mezzo di coltura (Nyholm e Lyngby, 1988).

2.5 La Massima Crescita Algale (MCA)

La massima crescita algale (MCA) è determinabile quando la coltura algale ha raggiunto la fase stazionaria di crescita; quest'ultima è identificabile quando misure consecutive del numero di cellule indicano un incremento inferiore al 5%. La MCA può essere espressa anche mediante il valore di biomassa prodotta; in tal caso la MCA è identificabile con il parametro MSC (Maximum Standing Crop) (EPA, 1978; APHA-AWWA-WEF, 1992), quest'ultimo rappresenta la massima produzione algale in termini di biomassa. La MCA è proporzionale alla quantità iniziale nel nutriente limitante la crescita presente nel mezzo di coltura (Nyholm e Lyngby, 1988). Le misure della crescita algale relative alla determinazione della MCA possono essere eseguite con i sistemi presi in considerazione nel paragrafo 2.4. Per la valutazione della concentrazione di nutrienti biodisponibili e per utilizzare il sistema EPA di classificazione delle acque eutrofiche (EPA, 1978) è necessario convertire le misure in termini di biomassa espressa come mg/L di peso secco.

2.6 Variabilità dei dati

Il confronto tra le risposte di crescita ottenute mediante il saggio algale deve essere sempre analizzato statisticamente. A tal fine ogni coltura algale deve essere eseguita su almeno tre aliquote e deve essere individuato un ambito di variabilità all'interno del quale le differenze di crescita rilevabili nelle diverse aliquote possono essere considerate non significative.

3 Lavaggio e preparazione della vetreria

3.1 Vetreria e materiali in plastica

La vetreria da utilizzare per il saggio algale deve essere in vetro boro-silicato pyrex 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:

- a) una trasmissione dello spettro della luce incidente uguale al vetro
- b) l'assenza di effetto inibente la crescita algale
- c) l'assenza di effetto adesivo sulle cellule algali

d) l'assenza di effetto adsorbente rispetto a sostanze presenti in soluzione.

3.2 Soluzioni da preparare per il lavaggio della vetreria

- a) 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);
- b) 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);
- c) carbonato di sodio 10% p/v;
- d) acqua distillata o deionizzata;

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

- a) lavare con acqua corrente con sapone privo di fosforo (oppure lavare senza sapone) e risciacquare;
- b) immergere in acido solforico 4N almeno per 2 ore;
- c) lavare con acqua corrente;
- d) immergere in acido cloridrico 4N almeno per 20 minuti;
- e) lavare in acqua corrente;
- f) lavare con soluzione di carbonato di sodio al 10%;
- g) lavare per 5 volte in acqua distillata o deionizzata;
- h) asciugare in stufa;
- i) confezionare la vetreria;
- j) sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

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

- a) lavare con acqua corrente con sapone privo di fosforo (oppure lavare senza sapone) e risciacquare;
- b) immergere in acido cloridrico 4N almeno per 20 minuti;
- c) lavare in acqua corrente;
- d) lavare con soluzione di carbonato di sodio al 10%;
- e) lavare per 5 volte in acqua distillata o deionizzata;
- f) asciugare in stufa;
- g) confezionare la vetreria;
- h) sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

II - Saggio algale per la valutazione della qualità dei corpi idrici

1 Principi generali del metodo

La procedura di saggio algale per il controllo della qualità dei corpi idrici comprende la valutazione dello stato trofico e della eventuale presenza di fattori inibenti la crescita algale (tossicità).

Il metodo si basa sulla Legge del minimo di Liebig la quale stabilisce che la massima produttività è proporzionale alla quantità di un nutriente o combinazione di nutrienti biologicamente disponibili in misura minore rispetto agli altri elementi necessari per la crescita degli organismi.

Il fosforo o l'azoto, ad esempio, si possono comportare come fattori limitanti quando la rispettiva concentrazione risulta insufficiente per sostenere la crescita algale in una coltura di laboratorio o in un'acqua naturale dove gli altri elementi essenziali risultano presenti in eccesso. Il concetto di fattore limitante può essere applicato anche a più di un nutriente; azoto e fosforo possono limitare contemporaneamente la crescita di una determinata specie algale quando il rapporto tra le rispettive concentrazioni è molto vicino al rapporto di assimilazione ottimale; ad esempio per *S. capricornutum* (recentemente rinominata *Raphidocellis subcapitata*) $N/P = 11$, per *Dunaliella tertiolecta* $N/P = 6,3$.

Durante l'esecuzione del saggio deve essere favorito lo scambio di gas all'interfaccia aria-acqua al fine di evitare che la concentrazione del biossido di carbonio in fase acquosa risulti limitante la crescita algale; per questo motivo il piano sperimentale riportato in questo lavoro non può essere usato per definire la limitazione della crescita da parte della CO_2 .

2 Utilizzazioni ed informazioni ottenibili con il saggio algale per le acque superficiali

2.1 Uso del saggio algale

Il saggio algale per le acque superficiali può essere utilizzato per i seguenti scopi

1. valutazione dello stato trofico;
2. valutazione della sensibilità del corpo idrico a subire modificazioni;
3. valutazione dell'effetto di materiali o prodotti specifici sulla crescita algale nelle acque del corpo idrico;
4. valutazione dell'efficacia degli impianti di trattamento reflui;
5. valutazione dell'effetto dei nutrienti veicolati dai tributari di laghi o acque costiere;
6. monitoraggio delle attività di risanamento dei corpi idrici;
7. valutazione dell'effetto delle acque di scarico;
8. valutazione dell'effetto esercitato dalle acque di dilavamento provenienti da suoli agrari o da aree contaminate.

2.2 Informazioni ottenibili mediante il saggio algale

Il saggio per le acque superficiali fornisce le seguenti informazioni

1. individuazione dei fattori limitanti la crescita algale;
2. determinazione dello stato trofico
3. determinazione della quantità biodisponibile dei nutrienti limitanti la crescita algale;
4. quantificazione della risposta biologica a variazioni in concentrazione dei fattori limitanti la crescita algale;
5. individuazione di un eventuale effetto inibente la crescita algale (tale effetto si può verificare anche in presenza di nutrienti).

3 Prelievo, trasporto, preparazione e conservazione dei campioni

3.1 Individuazione dei punti di prelievo

I programmi di campionamento devono tenere presente che la qualità delle acque può variare notevolmente in relazione al periodo stagionale. La programmazione dei prelievi deve considerare la possibilità di tali va-

riazioni anche considerando la capacità di diluizione delle acque del ricettore rispetto alle immissioni di vario tipo.

Di regola i prelievi possono essere eseguiti a livello superficiale; in ambienti acquatici dove è presente una stratificazione termica è necessario, invece, eseguire i prelievi nella colonna d'acqua all'interno della zona eufotica. Quest'ultima è compresa entro la profondità dove è ancora disponibile almeno l'1% della luce incidente in superficie. Nei corsi d'acqua corrente è opportuno individuare punti di prelievo a monte e a valle di sorgenti inquinanti o di confluenze con altri corsi d'acqua.

3.2 Campionamento

Per il campionamento devono essere utilizzati contenitori da 1 litro in polietilene o in vetro; i contenitori riciclabili devono essere soggetti al lavaggio della vetreria come riportato al punto 3 del Cap. I. I contenitori devono essere completamente riempiti avendo cura di evitare spazi d'aria al loro interno. Il trasporto deve avvenire in ambiente privo di luce e a temperatura di frigorifero (4-6°C).

3.3 Preparazione del campione

È necessario rimuovere le alghe "indigene" e altri organismi contaminanti presenti nel campione per permettere la crescita di una coltura pura dell'alga utilizzata nel saggio. E' inoltre necessario rimuovere il particolato presente nel campione poiché esso potrebbe interferire sulla misura della crescita algale, quando quest'ultima viene eseguita mediante un contatore di particelle. A tal fine il campione, appena giunto in laboratorio, deve essere sottoposto a filtrazione con membrane da 0,45 μm .

3.4 Conservazione del campione

Il periodo di conservazione può determinare modifiche non prevedibili nel campione. Per questo motivo è opportuno seguire le seguenti indicazioni:

- a) ridurre quanto possibile i tempi di conservazione programmando i prelievi in base alle capacità ricettive del laboratorio;
- b) filtrare il campione appena giunto in laboratorio;
- c) conservare il campione filtrato a 4°C per un periodo massimo di 72 h, al buio, in contenitore sterile, evitando di lasciare spazi d'aria all'interno del

contenitore. Se è necessario prolungare il tempo di conservazione è opportuno congelare il campione a una temperatura uguale o inferiore ai -20°C .

3.5 Modifiche del campione

È importante tenere presente che le operazioni di preparazione e conservazione possono comportare le seguenti modifiche del campione:

- a) la filtrazione comporta l'esclusione degli effetti sulla crescita algale esercitati da eventuali sostanze nutrienti o tossiche adsorbite al particolato in sospensione;
- b) la tossicità può diminuire con il prolungarsi della conservazione e con l'incremento della temperatura di conservazione (Van Coillie et al., 1983);
- c) la tossicità può diminuire con il congelamento del campione.

4 Strumentazione e accessori di laboratorio

4.1 Prelievo e preparazione del campione

- 1) contenitori in polietilene da 1 L;
- 2) contenitori in vetro e tappo in plastica sterilizzabile da 500 mL e 1 L;
- 3) apparato filtrante in vetro o policarbonato sterilizzabile con capacità di 750 ml per membrane da 47 mm di diametro;
- 4) pompa da vuoto provvista di regolatore di pressione;
- 5) tubo al silicone o tipo Tygon per vuoto, adatto per membrane filtranti e raccordi in plastica ad innesto rapido;
- 6) matracci per filtrazione sottovuoto da anteporre alla pompa da vuoto;
- 7) membrane filtranti sterili in acetato di cellulosa con pori da 0,45 e da $0,22\ \mu\text{m}$ e con diametro di 47 mm;
- 8) membrane filtranti per analisi gravimetrica in materiale resistente alle alte temperature con pori da 0,45 e con diametro di 47 mm;
- 9) frigorifero con temperatura da 4 a 6°C ;
- 10) congelatore con minimo di temperatura di almeno -20°C ;
- 11) autoclave;
- 12) ossimetro portatile con sistema di misura elettrometrico e compensazione automatica della temperatura o sistema portatile per la determinazione chimica dell'Ossigeno disciolto (metodo Winkler);
- 13) termometro a pozzetto, preferibilmente con scala da -10 a $+50^{\circ}\text{C}$ e divisioni da $0,5^{\circ}\text{C}$;

14) salinometro o conducimetro da banco con compensazione automatica della temperatura, o sistema chimico di titolazione dei cloruri mediante il metodo argentometrico;

15) pH-metro con compensazione automatica della temperatura;

4.2 Preparazione, incubazione e misura della crescita delle colture algali

1) beute in vetro borosilicato Pyrex tipo Erlenmayer da 100, 250 ml per le colture algali;

2) beute e bicchieri (beakers) in vetro borosilicato Pyrex con capacità di 50, 100, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL;

3) cilindri graduati in vetro con piede e becco da 25, 50, 100, 250 mL, 1000 mL, 2000 mL;

4) cilindri graduati in vetro da 100 ml con piede e tappo con raccordo conico in vetro smerigliato oppure in plastica sterilizzabile in autoclave;

5) palloni e matracci tarati con varie capacità da 50; 100; 250; 500; 1000 mL,

6) cella climatica o frigotermostato con temperatura regolabile da 10 a 40°C, precisione $\pm 1^\circ\text{C}$, con sistema di illuminazione idoneo alla crescita algale e in grado di illuminare uniformemente i piani dove sono posizionate le beute contenenti le colture algali;

7) lampade fluorescenti tipo "cool white" in grado di produrre un'intensità luminosa superiore a 4300 lux;

8) lux-metro;

9) temporizzatori;

10) bilancia analitica;

11) microscopio ottico;

12) camere di Burkner per il conteggio delle cellule algali al microscopio;

13) contaparticelle automatico con capillare da 100 μm , con soglia regolabile e con sistema di misura del Volume Globulare Medio;

14) dispensatore di liquidi a volume regolabile;

15) n.2 stufe a secco con temperatura regolabile, disposte per lavorare a 70°C e a 120°C;

16) essiccatori per determinazioni gravimetriche;

17) vetri da orologio grandi;

18) centrifuga;

19) cappa a flusso laminare;

20) personal computer per l'elaborazione statistica dei dati;

21) pompa a membrana per aereazione (tipo pompa per acquari).

II.1 Utilizzazione di *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocellis subcapitata*) nel saggio algale per la valutazione della qualità delle acque dolci superficiali.

1 La specie algale

Selenastrum capricornutum Printz (recentemente rinominata *Raphidocellis subcapitata*) è un'alga verde monocellulare (cloroficee) appartenente all'ordine *Chlorococcales*. Le cellule hanno un volume cellulare di $40\text{--}60\text{ }\mu\text{m}^3 \rightarrow \mu\text{m}^3$; e dimensioni di $6\text{--}7\text{ }\mu\text{m} \rightarrow \mu\text{m}$; esse risultano immobili per l'intero ciclo vitale. L'uso di *Raphidocellis subcapitata* nel saggio algale per le acque dolci viene proposto in numerose pubblicazioni e metodi ufficiali (Joubert, 1983; EPA, 1978; EPA, 1985; APHA-AWWA-WEF, 1992).

L'alga è disponibile presso il Laboratorio I.R.S.A. di Idrobiologia Applicata di Brugherio (Milano).

2 Terreno di coltura per il clone algale

2.1 Metodi per la preparazione del terreno

Sono attualmente a disposizione diversi metodi di preparazione del terreno di mantenimento delle colture di *Raphidocellis subcapitata*,

- metodo di Joubert (1983);
- metodo Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1992)
- metodo ASTM (1986);
- metodo EPA (1978), riportato anche in EPA (1985);

tali metodi differiscono essenzialmente nel numero di soluzioni utili alla preparazione del mezzo finale di crescita. I sali utilizzati e le loro concentrazioni finali risultano essere uguali in tutti i metodi considerati. Si ritiene opportuno utilizzare il metodo EPA, 1978.

2.2 Preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale

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

1	NaNO ₃	12,750	g/ 500 mL
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,350	g/ 500 mL
3	K ₂ HPO ₄	0,522	g/ 500 mL
4	NaHCO ₃	7,500	g/ 500 mL
5	SOLUZIONE DEI MICRONUTRIENTI, 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		
	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

(*) Relativamente alle soluzioni di ZnCl₂, CoCl₂·6 H₂O, CuCl₂·2H₂O e Na₂MoO₄·2H₂O, 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.

CoCl₂·6 H₂O - 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.

Il cloruro di magnesio e il cloruro di calcio, benché dal punto di vista quantitativo debbano ritenersi dei macronutrienti, per motivi di praticità vengono inseriti all'interno della soluzione dei micronutrienti.

Filtrare le soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5 su membrana da $0,45\ \mu\text{m}$ in condizioni asettiche, mediante filtri sterili e conservare al buio, a $4-6^\circ\text{C}$, in contenitori sterili, per un tempo massimo di 3 mesi.

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

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

Tab.1: Macronutrienti: concentrazione finale nel terreno di coltura come sali e come elementi

sali	conc. mg/L	elementi	conc. mg/L
NaNO_3	25,500	N	4,200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,700	Mg	2,904
K_2HPO_4	1,044	Ca	1,202
NaHCO_3	15,000	S	1,911
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\ \text{H}_2\text{O}$	12,164	P	0,186
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\ \text{H}_2\text{O}$	4,410	Na	11,001
		K	0,469
		C	2,143

Tab. 2: Micronutrienti: concentrazione finale nel terreno di coltura come sali e come elementi

sali	conc. $\mu\text{g/L}$	elementi	conc. $\mu\text{g/L}$
H_3BO_3	185,520	B	32,460
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415,610	Mn	115,374
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	160,000	Fe	33,051
ZnCl_2	3,271	Zn	1,570
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,428	Co	0,354
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,012	Cu	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,260	Mo	2,878
Na_2EDTA	300,000		

2.3 Preparazione del terreno di mantenimento in fase solida

Aggiungere a caldo al terreno di mantenimento (preparato come riportato al punto 2.2) 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 pyrex 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 $4-6^\circ\text{C}$, al buio, per un tempo massimo di 1 mese.

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

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

1	NaNO_3	12,750	g/ 500 mL
2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350	g/ 500 mL
3	K_2HPO_4	0,522	g/ 500 mL
4	NaHCO_3	7,500	g/ 500 mL

5a SOLUZIONE DEI MICRONUTRIENTI, 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

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,082	g/ 500 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,205	g/ 500 mL

H_3BO_3	92,760	mg/ 500 mL
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	207,810	mg/ 500 mL
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80,000	mg/ 500 mL
ZnCl_2	1,635	mg/ 500 mL (*)
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,714	mg/ 500 mL (*)
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006	mg/ 500 mL (*)
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,630	mg/ 500 mL (*)

(*) Vedere preparazione della soluzione 5 al punto 2.2.

Essendo le soluzioni 1, 2, 3 e 4 uguali a quelle riportate nel punto 2.2, per la preparazione del terreno per il saggio di tossicità è possibile utilizzare quest'ultime.

Filtrare la soluzione 5a su membrana da $0.45 \mu\text{m}$ in condizioni asettiche, mediante filtri sterili e conservare al buio, a $4-6^\circ\text{C}$, in contenitori sterili, per un tempo massimo di 3 mesi.

3 Mantenimento del clone algale

3.1 Terreno di mantenimento

Utilizzare il terreno indicato al punto 2.2

3.2 Vetreria per le colture algali

Per l'allestimento delle colture algali si raccomanda l'uso di beute in vetro borosilicato di tipo Erlenmayer preparate come riportato nel punto 3 del Cap. I. Per evitare un effetto limitante dovuto alla CO_2 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 (ad esempio 25 ml di coltura in beuta da 125 ml). Tale rapporto deve essere mantenuto quando la coltura algale viene agitata manualmente una volta al giorno; mentre in condizione di agitazione continua, mediante piano oscillante o rotante, la percentuale di volume occupato dalla coltura può raggiungere il 50%.

3.3 Condizioni di incubazione

Le condizioni di incubazione sono le seguenti: temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$; illuminazione con lampade fluorescenti tipo "cool white" con intensità

luminosa superiore a 4300 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 frigotermostato dove sono disposte le colture algali non presentano ricambi d'aria naturali, è consigliabile immettere aria mediante una pompa a membrana da acquari.

3.4 Colture algali su terreno liquido

Si allestisce 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 (lavata e sterilizzata come riportato al punto 3 del Cap. I) contenente una quantità idonea di terreno di coltura (50 ml) preparato come riportato al punto 2.2. Se il clone di partenza è conservato in terreno liquido trasferire 2 mL di coltura algale in beuta da 250 mL. La coltura deve essere mantenuta in frigotermostato 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 mL di terreno; è buona regola mantenere la vecchia coltura per una ulteriore settimana in modo tale di avere sempre a disposizione due cloni algali. I trapianti ogni sette giorni garantiscono la disponibilità di cellule algali in fase esponenziale di crescita.

3.5 Colture algali su terreno agarizzato

E' conveniente allestire colture algali su terreno agarizzato le quali vanno a costituire 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 al punto 2.3. A partire dalla vecchia coltura su terreno liquido allestire inizialmente una coltura algale di isolamento su piastra incubando a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e in condizione di illuminazione continua; successivamente, a partire da una colonia algale isolata, predisporre una coltura di mantenimento per spandimento 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 per spandimento su un nuovo tubo con terreno agarizzato. È possibile conservare le colture di mantenimento anche a temperatura di 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.

3.6 Preparazione dell'inoculo algale

Il saggio algale prevede di aggiungere in beuta di una quantità standardizzata di sospensione algale a concentrazione nota e costante (inoculo); 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.

3.6.1 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 $0,45 \mu\text{m}$ e disporre in contenitore sterile (a tal fine può essere diluita la soluzione 4 riportata al punto 2.2. Tale soluzione può essere mantenuta per un tempo massimo di un mese a $4-6^\circ\text{C}$. In tal caso, la soluzione proveniente dal frigorifero, prima di essere utilizzata, deve essere riportata ad una temperatura di circa 20°C .

3.6.2 Lavaggio della sospensione algale

Prelevare in condizioni asettiche circa 10 ml della coltura algale in fase esponenziale, disporre in provetta da centrifuga sterile e tappata, centrifu-

gare a 1500-2000 rpm (300-600 g) per 5 minuti. Aspirare il sovranatante con pipetta pasteur di plastica 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.

3.6.3 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 Burkner (vedere punto 4.2).

3.6.4 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

$$\frac{\begin{array}{c} \text{(A)} \\ \text{Volume totale} \\ \text{inoculo} \\ \text{(mL)} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{(B)} \\ \text{Densità inoculo} \\ 100 \cdot 10^3 \\ \text{cellule/mL} \end{array}}{\begin{array}{c} \text{(C)} \\ \text{Densità della sosp. algale} \\ \text{cellule/mL} \end{array}} = \begin{array}{c} \text{(D)} \\ \text{Volume della sosp. algale} \\ \text{da prelevare per l'inoculo} \\ \text{(mL)} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{(A)} \\ \text{Volume totale} \\ \text{Inoculo (mL)} \end{array} = \begin{array}{c} \text{(E)} \\ \text{n. beute previste} \\ \text{per il saggio} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{(F)} \\ 0,25 \text{ (volume dell'inoculo)} \\ \text{(mL)} \end{array}$$

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).

3.6.5 Distribuzione dell'inoculo nelle beute del saggio

In ogni beuta del saggio deve essere aggiunto un inoculo costituito da

4.2.1 Metodo gravimetrico

Questo metodo si basa sulla filtrazione e la determinazione gravimetrica del peso secco di una sospensione algale.

Il peso secco della biomassa algale proveniente da una coltura corrispondente allo stadio di crescita stazionaria (MCA) si riduce a pochi milligrammi; è perciò necessario, prevedendo di utilizzare il metodo gravimetrico, allestire il saggio algale tenendo presenti le seguenti indicazioni:

- preparare le colture algali con un volume di 100 mL in beute da almeno 300 mL, utilizzare un inoculo costituito da 1 mL di una sospensione algale con densità di $100 \cdot 10^3$ cell./mL;
- monitorare giornalmente la crescita algale mediante conteggio cellulare o altro sistema (fluorimetria, spettrofotometria) a partire dal sesto giorno di incubazione ed eseguire la determinazione gravimetrica lo stesso giorno in cui viene raggiunto lo stadio di crescita stazionaria (MCA);
- quando il saggio algale comprende una serie di colture algali con concentrazioni di nutrienti diverse (ad esempio nel caso in cui lo scopo del saggio sia la determinazione del Fattore di Conversione in Biomassa (FCB) come riportato nel punto 4.2.3) è prevedibile che le colture con concentrazioni di nutrienti più basse raggiungano la fase di crescita stazionaria con qualche giorno di anticipo rispetto alle altre. In tal caso le determinazioni gravimetriche per colture algali appartenenti allo stesso saggio verranno eseguite in giorni diversi;
- prima di eseguire la filtrazione verificare a campione, mediante esame microscopico, l'assenza di contaminazione delle colture; in presenza di organismi estranei (ad esempio altre alghe, protozoi, batteri) il test deve essere ripetuto previo controllo delle colture algali di mantenimento.

La filtrazione viene eseguita mediante membrane filtranti con pori di $0,45 \mu\text{m}$ e 47 mm di diametro, adatte per l'analisi gravimetrica e resistenti alle alte temperature.

a) alcuni giorni prima di eseguire le determinazioni gravimetriche preparare un numero di membrane filtranti pari al numero di colture algali che costituiscono il saggio; siglare ogni singola membrana con numerazione crescente;

b) disporre le membrane in stufa a secco a 70°C per almeno 2 ore (è op-

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.

4 Sistemi di misura della crescita algale

4.1 Massima Crescita Algale (MCA) e Crescita Algale alla 96° ora (CA96)

I parametri utilizzabili per descrivere la crescita algale sono: la Massima Crescita Algale (MCA) e la Crescita Algale alla 96° ora di incubazione (CA96).

La MCA viene misurata al raggiungimento della fase di crescita stazionaria (ovvero dopo circa 15 giorni di incubazione) e viene utilizzata per i seguenti scopi:

- a) individuazione del fattore limitante;
- b) valutazione dello stato trofico (ovvero indicazione dello stato di eutrofizzazione);
- c) determinazione della concentrazione di fosforo e azoto biodisponibili.

Per lo scopo indicato in a) è sufficiente esprimere la crescita algale indicata come densità cellulare (numero di cellule $\cdot 10^3$ /mL), per gli scopi indicati in b) e c) è necessario esprimere la crescita in termini di biomassa prodotta indicata come peso secco (mg/L). La CA96 misurata alla 96° ora di incubazione viene utilizzata per valutare la eventuale presenza di effetto tossico esercitato dal campione rispetto ad un controllo.

Un confronto tra alcuni sistemi di misura della crescita algale è riportato in appendice n. 4.

4.2 Peso secco

Il peso secco della biomassa prodotta può essere determinato direttamente tramite misure gravimetriche oppure determinato indirettamente tramite il conteggio cellulare accompagnato dalla determinazione del Volume Globulare Medio (VGM) o mediante l'uso del Fattore di Conversione in Biomassa (FCB).

portuno non superare i 70°C per evitare di alterare la porosità delle membrane);

- c) raffreddare le membrane in essiccatore per almeno 1 ora;
- d) pesare le membrane con bilancia analitica, registrare il peso e disporre in apposito contenitore avendo cura di separare le membrane adiacenti con le apposite cartine separatrici;
- e) disponendo le membrane precedentemente tarate su un apparecchio filtrante ben pulito filtrare un volume noto di sospensione algale (visto la scarsa sensibilità del metodo è opportuno filtrare il massimo volume possibile); filtrare con un vuoto di 380 mm Hg;
- f) lavare la tramoggia dell'apparecchio filtrante con 50 mL di acqua distillata avendo cura di far scorrere l'acqua lungo le pareti della tramoggia e di non allontanare le cellule depositate sulla membrana;
- g) togliere la membrana e disporla su un vetro da orologio grande (non disporre le membrane una sull'altra);
- h) ripetere le operazioni e), f), e g) per ogni beuta contenente una sospensione algale presente nel saggio;
- i) essiccare le membrane in stufa a 70°C;
- j) raffreddare le membrane in essiccatore per almeno 1 ora;
- k) pesare le membrane con bilancia analitica ripetere le operazioni (i) e (j) sino al raggiungimento del peso costante; registrare il peso, sottrarre da quest'ultimo la tara corrispondente determinata al punto d); il risultato, espresso come mg/L, costituisce il peso secco della biomassa prodotta.

4.2.2 Determinazione della biomassa espressa in termini di peso secco mediante conteggio cellulare e determinazione del Volume Globulare Medio (VGM).

$$\text{conteggio cellulare (n. cell./mL)} \times \text{VGM } (\mu\text{m}^3) \times 3,6 \cdot 10^{-7} = \text{peso secco } R. \text{ subcapitata (mg/L)}$$

Questo sistema di calcolo, proposto in EPA (1978), è utilizzabile solo quando è possibile determinare il Volume Globulare Medio (VGM) per mezzo di strumentazione appropriata e tarata mediante l'uso di sospensioni di particelle di riferimento a VGM noto.

4.2.3 Determinazione della biomassa espressa in termini di peso secco mediante il Fattore di Conversione in Biomassa (FCB).

Per mezzo del FCB è possibile convertire le misure di crescita algale in termini di peso secco della biomassa (Mingazzini e Berri, 1991). Il parametro FCB può essere determinato in laboratorio correlando, mediante il sistema della regressione lineare, misure gravimetriche con altre misure della crescita algale (conteggi cellulari, densità ottica, fluorescenza) eseguite in parallelo su una serie di colture algali con valori crescenti di MCA. Nelle Appendici n. 2 e n. 3 sono riportate le determinazioni dei valori di FCB per *R. subcapitata* e per *D. tertiolecta*.

4.3 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 (Appendice n.4).

4.3.1 Conteggio cellulare mediante contaglobuli elettronico

Disporre di una soluzione elettrolitica costituita da NaCl 1% filtrata su membrana da 0,22 μm (si suggerisce di prepararne 2 L alla volta utilizzando NaCl (AR-grade) 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 microscopico).

4.3.2 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 rialzo 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 (Pasquinelli, 1978).

Allo scopo possono essere utilizzate le camere di Burker 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 mm², ognuno di questi quadrati è a sua volta suddiviso in 16 quadrati con superficie unitaria di 1/25 mm². Per il conteggio delle cellule algali si depone una goccia della sospensione tra la camera e 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 · 10³/mL. Determinazioni più precise possono essere ottenute da un valore medio di cellule conteggiate su un numero maggiore di quadrati grandi.

4.4 Determinazione della clorofilla-a mediante fluorescenza

La determinazione della clorofilla presente nelle cellule algali è in gra-

do di fornire una stima del numero di cellule e della biomassa prodotta. La misura della clorofilla-a può essere eseguita in vitro, mediante misure spettrofotometriche o fluorimetriche, o in vivo, mediante misure fluorimetriche; si ritiene opportuno segnalare solo quest'ultimo sistema di misura il quale 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 (Gaggi et al., 1995). Eseguire la lettura del bianco con acqua distillata; agitare accuratamente la coltura algale e deporne circa 5 mL all'interno di una cuvetta da fluorimetria in vetro o plastica; eseguire rapidamente la lettura e registrare il dato strumentale; confrontare i risultati ottenuti con una retta di taratura effettuata con una soluzione di riferimento di clorofilla-a. Mediante i fattori FCB o FCD è possibile convertire i dati espressi in clorofilla-a in biomassa o in densità cellulare.

E' 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 nelle acque di scarico possono interferire nella determinazione fluorimetrica (EPA, 1978).

4.5 Determinazione della densità cellulare mediante misura dell'assorbanza

La misura dell'assorbanza deve essere eseguita mediante spettrofotometro o colorimetro con lunghezza d'onda di 670 nm corrispondente al picco di massimo assorbimento della clorofilla nel campo del visibile (vedere appendice n.7).

La misura di assorbanza delle colture algali in corrispondenza della lunghezza d'onda di 670 nm viene proposta anche da Persoone (Persoone, in corso di stampa); Walsh e Bahner (1980) propongono, invece, di leggere l'assorbanza delle colture algali a 525 nm; in Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1992) vengono indicate le lunghezze d'onda di 600 o 750 nm; Chiaudani e Vighi (1977) indicano una lunghezza d'onda compresa tra 700 e 750 nm.

Per aumentare la sensibilità del sistema di lettura è consigliabile l'utilizzazione di cuvette con percorso ottico di 10 cm.

Eseguire la lettura del bianco con acqua distillata; agitare accuratamente la coltura algale e deporne circa 5 mL all'interno di una cuvetta in vetro o

plastica; eseguire rapidamente la lettura e registrare il dato strumentale. Mediante i fattori FCB o FCD è possibile convertire i dati espressi in assorbanza in termini di biomassa o di densità cellulare. La misura spettrofotometrica risulta tuttavia poco sensibile e il metodo viene sconsigliato in EPA, 1978.

5 Analisi statistica dei dati

5.1 Espressione dei dati relativi alla crescita algale e numero di replicati

In riferimento a quanto riportato in 4 si ricorda che la crescita algale può essere espressa come densità cellulare (numero di cellule $\cdot 10^3/\text{mL}$), oppure come biomassa prodotta, indicata come peso secco (mg/L). La densità cellulare e la biomassa possono essere determinate direttamente (mediante il conteggio cellulare la prima e la determinazione gravimetrica del peso secco la seconda) o indirettamente (mediante l'uso dei fattori di conversione).

Ogni aliquota di campione arricchita con uno o più nutrienti nel saggio per la valutazione dello stato trofico e 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.

5.2 Elaborazione dei dati per la valutazione dello stato trofico

Per determinare il nutriente che limita la crescita (fattore limitante) misurare la MCA nelle beute che costituiscono il controllo (ovvero il campione privo di aggiunte) e nelle beute contenenti le aggiunte dei nutrienti singoli o associati. Per ogni gruppo di repliche determinare i seguenti parametri statistici (vedere Appendice n.1):

- valore medio (\bar{x})
- deviazione standard (DS)
- devianza (D)
- varianza (V)
- Coefficiente di Variazione (CV)

Confrontare i valori medi della MCA ottenuti nelle beute con le varie aggiunte con il valore medio della MCA ottenuto nelle beute del controllo mediante il test "t di Student" o altri metodi statistici.

Per i calcoli statistici è opportuno tenere presente le seguenti condizioni:

- L'ipotesi nulla (ovvero che ci aspettiamo di contraddire per mezzo dell'analisi statistica) è che il valore di MCA medio ottenuto per ogni aggiunta sia minore o uguale al valore medio ottenuto nel controllo;
- L'ipotesi alternativa (ovvero che ci aspettiamo di confermare per mezzo dell'analisi statistica) è che il valore di MCA medio ottenuto per ogni aggiunta sia maggiore del valore medio ottenuto nel controllo;
- Livello di significatività $\alpha = 0,05$. Ovvero 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%);
- Test a una coda. È necessario confrontare il t di Student calcolato con i valori tabulati rilevati nell'ambito del test ad una coda perché l'ipotesi alternativa è che il valore di MCA medio ottenuto per ogni aggiunta sia maggiore del valore medio ottenuto nel controllo. Per applicare il test a due code, invece, l'ipotesi alternativa deve prevedere il valore di MCA medio dell'aggiunta maggiore o minore del valore medio del controllo.
- Per il calcolo del valore t di Student vedere Appendice n.1.

5.3 Elaborazione dei dati relativi al test di tossicità

Per valutare la presenza di un effetto inibente la crescita algale esercitato dal campione è necessario procedere come segue. Determinare dopo 96 ore di incubazione la CA96 nelle beute che costituiscono il controllo (ovvero acqua ultrapura con aggiunta di nutrienti) e nelle beute contenenti il campione arricchito con nutrienti. Per ogni gruppo di repliche determinare i seguenti parametri statistici (vedere in Appendice n.1):

- valore medio (\bar{x})
- deviazione standard (DS)
- devianza (D)
- varianza (V)
- Coefficiente di Variazione (CV)

Confrontare il valore medio della CA96 ottenuto nelle beute contenenti

il controllo con il valore medio della CA96 ottenuto nelle beute contenenti il campione mediante il test "t di Student" o altri metodi statistici.

Per i calcoli statistici è opportuno tenere presente le seguenti condizioni:

- L'ipotesi nulla (ovvero che ci aspettiamo di contraddire per mezzo dell'analisi statistica) è che il valore della CA96 medio ottenuto nel campione sia uguale al valore medio ottenuto nel controllo;
- L'ipotesi alternativa (ovvero che ci aspettiamo di confermare per mezzo dell'analisi statistica) è che il valore della CA96 medio ottenuto nel campione sia minore o maggiore del valore medio ottenuto nel controllo. Il valore CA96 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 $\alpha = 0,05$. Ovvero per $\alpha=0,05$ 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%);
- Test a due code. È necessario confrontare il t di Student calcolato con i valori tabulati rilevati nell'ambito del test a due code perché l'ipotesi alternativa è che il valore della CA96 medio ottenuto nel campione sia maggiore o minore del valore medio ottenuto nel controllo.
- Per il calcolo del valore t di Student vedere Appendice n.1.

5.4 Esclusione di dati anomali dal calcolo statistico

Quando all'interno di una serie di repliche si presenta un dato che si discosta dalla media per un valore superiore a 3 o 4 Deviazioni Standard è possibile applicare il seguente test per verificare la possibilità di considerare il dato come anomalo e, quindi, scartarlo (Draper e Smith, 1968).

- a) Ordinare i dati della serie secondo valori crescenti: $x_1 \leq x_2 \leq \dots x_n$;
- b) calcolare il valore c mediante la seguente procedura

$$\text{se } x_1 \text{ è il dato anomalo } c = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1}$$

$$\text{se } x_n \text{ è il dato anomalo } c = \frac{x_n - (x_n - 1)}{x_n - x_1}$$

- c) se il valore c calcolato eccede il valore tabulato corrispondente al numero di repliche a disposizione (tab. 3) allora il dato può essere scartato.

Tabella 3. Valori c per l'individuazione dei dati anomali

n	valori c limite	
	$\alpha=0,05$	$\alpha=0,01$
3	0,941	0,988
4	0,765	0,889
5	0,642	0,780
6	0,560	0,698
7	0,507	0,637

d) in presenza di due dati che sembrano anomali (ad esempio x_1 e x_n oppure x_1 e x_2) il calcolo può essere ripetuto; prima deve essere applicato al valore che si discosta maggiormente dal valore medio;

6 Parametri chimico-fisici

Per l'esecuzione del saggio algale è necessario conoscere i seguenti parametri chimici da rilevare durante le fasi del prelievo o nel campione d'acqua prelevato per il saggio.

- pH;
- Temperatura (come °C);
- Salinità: determinabile direttamente come mg/L; oppure come Conduttività ($\mu\text{S}/\text{cm}$) o come Cloruri (mg/L di Cl^-). Per la determinazione della salinità mediante la titolazione degli ioni cloruro fare riferimento al metodo IRSA n. 2090 (IRSA, 1994);
- Ossigeno Disciolto (come mg/L di O_2 e come % di saturazione).

È inoltre preferibile conoscere i seguenti parametri chimici:

- fosforo totale (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di P);
- orto-fosfati (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di P);
- azoto ammoniacale (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di N);
- azoto nitroso (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di N);
- azoto nitrico (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di N);
- azoto totale Kjeldahl (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di N).

7 Piano sperimentale

7.1 Valutazione dello stato trofico e saggio di tossicità

Per ogni campione destinato al saggio algale il piano sperimentale viene predisposto per la valutazione dello stato trofico e per il saggio di tossicità algale. In sintesi, per un piano sperimentale basato su 3 repliche per ciascuna aliquota di campione, verranno utilizzate 21 beute (15 per la valutazione dello stato trofico e 6 per la valutazione della tossicità).

7.2 Piano di lavoro per la valutazione dello stato trofico

Il piano di lavoro di seguito descritto permette di individuare il fattore limitante quando la limitazione dipende da fosforo, azoto o micronutrienti. I volumi riportati hanno carattere indicativo e possono essere modificati in base al numero di repliche che si desidera effettuare. Tutte le operazioni devono essere eseguite sotto cappa a flusso laminare o comunque in ambiente asettico.

7.2.1 Aggiunte di nutrienti e distribuzione nelle beute

Il campione (500 mL provenienti dal trattamento previsto al punto 3.3 del Cap. II) viene suddiviso in 5 aliquote da 100 mL così denominate: controllo senza aggiunte (SA), aggiunta fosforo (P), aggiunta azoto (N), aggiunta fosforo e azoto (N-P), aggiunta di mezzo completo (MC). Ciascuna aliquota viene disposta in un cilindro graduato da 100 mL (con raccordo conico in vetro smerigliato) dove viene arricchita con i nutrienti; il cilindro viene chiuso con l'apposito tappo in vetro smerigliato ed agitato per capovolgimento; l'aliquota arricchita viene distribuita in sottoaliquote da 25 mL (mediante un cilindro da 25 mL) in 3 beute da 100 mL, ciascuna sottoaliquota costituisce una replica. Di conseguenza per ogni aliquota sono previste 3 repliche.

- **Controllo senza aggiunte (SA):** l'aliquota di campione corrispondente al controllo non subisce alcuna aggiunta di nutrienti e viene direttamente distribuita in 3 beute da 100 mL;
- **aggiunta di fosforo (P):** aggiungere a 100 mL di campione una quantità di K_2HPO_4 tale che si determini un incremento della concentrazione di fosforo (come P) pari a 0,05 mg/L. A tal fine:
 - a) disporre 100 mL di campione in cilindro graduato;

- b) calcolare il volume corrispondente della soluzione concentrata di K_2HPO_4 (soluzione n.3 riportata nel punto 2.4) da aggiungere a 100 mL di campione. Ad esempio preparare una soluzione intermedia (soluzione P/10) diluendo 1:10 la soluzione concentrata di K_2HPO_4 , quindi prelevarne 0,269 mL da aggiungere ai 100 mL di campione);
- c) sottrarre dai 100 mL di campione il volume della soluzione da aggiungere
- d) aggiungere il volume di soluzione concentrata e agitare per capovolgimento prima di distribuire in 3 beute da 100 mL.
- **aggiunta di azoto (N):** aggiungere a 100 mL di campione una quantità di $NaNO_3$ tale che si determini un incremento della concentrazione di azoto (come N) pari a $1,00 \text{ mg/L}^{-1}$. A tal fine:
 - a) disporre 100 mL di campione in cilindro graduato;
 - b) calcolare il volume corrispondente della soluzione concentrata di $NaNO_3$ (soluzione n.1 riportata nel punto 2.4) da aggiungere a 100 mL di campione. Ad esempio preparare una soluzione intermedia (soluzione N/10) diluendo 1:10 la soluzione concentrata di $NaNO_3$, quindi prelevarne 0,238 mL da aggiungere ai 100 mL di campione);
 - c) sottrarre dai 100 mL di campione il volume della soluzione da aggiungere;
 - d) aggiungere il volume di soluzione concentrata e agitare per capovolgimento prima di distribuire in 3 beute da 100 mL.
 - **aggiunta di azoto e fosforo (N-P):** aggiungere a 100 mL di campione una quantità di K_2HPO_4 tale che si determini un incremento della concentrazione di fosforo (come P) pari a $0,05 \text{ mg/L}$; aggiungere inoltre una quantità di $NaNO_3$ tale che si determini un incremento della concentrazione di azoto (come N) pari a $1,00 \text{ mg/L}$. A tal fine procedere come nei due punti precedenti.
 - **aggiunta di Mezzo Completo (MC):** aggiungere a 100 mL di campione una quantità di K_2HPO_4 tale che si determini un incremento della concentrazione di fosforo (come P) pari a $0,05 \text{ mg/L}$; aggiungere inoltre una quantità di $NaNO_3$ tale che si determini un incremento della concentrazione di azoto (come N) pari a $1,00 \text{ mg/L}$. Oltre a fosforo e azoto tale soluzione deve comprendere anche gli altri macro e microelementi nelle concentrazioni riportate nelle tabelle 1 e 2 del punto 2.2 ad esclusione

dell'EDTA. A tal fine eseguire le aggiunte di P e N come nei punti precedenti ed inoltre aggiungere 0,1 mL delle soluzioni n.2 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), n.4 (NaHCO_3) e n.5a (micronutrienti) riportate nel punto 2.4.

Tab. 4. Aggiunte da impiegare per la valutazione dello stato trofico

Controllo senza aggiunte	SA
Controllo + 0,05 mg/L di P	P
Controllo + 1,00 mg/L di N	N
Controllo + 0,05 mg/L di P+ 1,00 mg/L di N	N-P
Controllo + 0,05 mg/L di P+ 1,00 mg/L di N +Mezzo Completo	MC

Tab. 5. Esempio di schema delle aggiunte per la valutazione dello stato trofico

Aggiunte	Volume totale (mL)	Volume sol.ne P/10 (mL)	Volume sol.ne N/10 (mL)	Volume sol.ni altri elementi (*) (mL)	Volume in beuta (mL)	Numero beute
SA	100	0	0	0	25	3
P	100	0,269	0	0	25	3
N	100	0	0,238	0	25	3
N-P	100	0,269	0,238	0	25	3
MC	100	0,269	0,238	0,100	25	3

(*)soluzione n.2 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), n.4 (NaHCO_3) e n.5a (micronutrienti) riportate nel punto 2.4

7.2.2 Calcoli per le aggiunte

Per il calcolo del volume di soluzione concentrata di nutriente da aggiungere al campione può essere utilizzata la seguente formula:

$$\text{mL sol.ne di fosforo da aggiungere in 100 mL di campione} = \frac{\text{Conc. P nella soluzione (E}_1\text{. 0,05 mg/L)} \times 100}{\text{Concentrazione sol.ne P concentrata (Es. sol. P/10 = 18,6 mg/L)}}$$

$$\frac{\text{mL sol.ne di azoto da aggiungere} \times \text{Conc. N nella soluzione (Es. 1,1 mg/L)} \times 100}{\text{in 100 mL di campione} \times \text{Concentrazione sol.ne N concentrata (Es. sol. N/10 = 420 mg/L)}}$$

7.2.3 Volume delle aggiunte

Il volume delle soluzioni nutrienti da aggiungere deve essere inferiore all'1% del volume totale. Ad esempio in 100 mL di campione il volume complessivo delle aggiunte deve essere inferiore a 1 mL.

7.2.4 Identificazione delle beute

Al termine dell'arricchimento delle aliquote di campione e della distribuzione delle sottoaliquote abbiamo un totale di 15 beute distribuite in 5 sottogruppi da 3 beute; ogni gruppo di 3 beute deve essere denominato con le sigle SA, P, N, N-P, MC ed ogni beuta all'interno del gruppo deve essere individuata mediante un numero o una lettera (ad esempio SA1, SA2, SA3).

7.2.5 Aggiunta dell'inoculo

Ad ogni beuta viene aggiunto l'inoculo algale come riportato nel punto 3.6. La sospensione algale dell'inoculo deve essere preparata 24 ore prima dell'esecuzione del saggio. La concentrazione iniziale della coltura algale è di $1 \cdot 10^3$ cellule/mL.

7.2.6 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 frigotermostato a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 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 al giorno). A partire dal quarto o dal sesto giorno misurare giornalmente in ogni beuta la crescita algale mediante uno dei sistemi riportati nel punto 4, effettuare il monitoraggio della crescita fino al raggiungimento dello stadio stazionario di crescita in corrispondenza del quale registrare la Massima Crescita Algale (MCA). Da ogni beuta si ot-

tiene un valore di MCA, da ogni gruppo di beute (3 repliche) si ottiene il valore medio della MCA e gli altri parametri statistici previsti nel punto 5.2.

7.2.7 Uso dei fogli di lavoro

Tutti i dati relativi al saggio algale, le eventuali note e quant'altro si renda necessario eseguire e registrare nel corso del saggio devono essere riportati in un foglio di lavoro come quello riportato in appendice n.8.

7.3 Piano di lavoro per la valutazione della tossicità

Nella valutazione della qualità dei corpi idrici superficiali è importante considerare anche la eventuale presenza di tossicità; un effetto inibente la crescita algale potrebbe inoltre inficiare i risultati del saggio per la valutazione dello stato trofico. È quindi necessario eseguire in parallelo al saggio per la valutazione dello stato trofico riportato nel punto 7.2 anche un test di tossicità algale. Nel test algale l'effetto tossico tende a ridursi o a scomparire con il prolungarsi del periodo di incubazione (Walsh et al., 1982; Walsh e Merrill, 1984) e con l'incremento della biomassa algale (Mingazzini, 1993). Nel saggio algale rivolto alla valutazione della tossicità del campione la misura della MCA al raggiungimento dello stadio stazionario di crescita (ovvero dopo circa 14 giorni di incubazione) risulta inadeguata.

Il piano di lavoro di seguito descritto permette di individuare la presenza di fattori inibenti la crescita algale attraverso la misura della Crescita Algale dopo 96 ore di incubazione (CA96); la crescita algale rilevata nel campione viene confrontata con quella rilevata in una soluzione di riferimento (controllo). Anche in questo caso i volumi riportati hanno carattere indicativo e possono essere modificati in base al numero di repliche che si desidera effettuare. Tutte le operazioni devono essere eseguite sotto cappa a flusso laminare o comunque in ambiente asettico.

7.3.1 Preparazione del campione

Utilizzando un cilindro graduato da 100 mL dotato di tappo in vetro smerigliato aggiungere a 100 mL di campione (proveniente dal trattamento previsto nel punto 3.3 del Cap. II) 0,1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5a descritte nel punto 2.4. Agitare per capovolgimento.

7.3.2 Preparazione della soluzione di riferimento (controllo).

Utilizzando un cilindro graduato da 100 mL dotato di tappo in vetro smerigliato aggiungere a 100 mL di acqua ultrapura, filtrata con membrana da 0,45 μm , 0,1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5a descritte nel punto 2.4. Agitare per capovolgimento.

Si vengono così a costituire, con il campione e l'acqua ultrapura, 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 in soluzione.

La presenza di campioni con caratteristiche eutrofiche rende consigliabile una riduzione della concentrazione del terreno del 50% rispetto alle colture di mantenimento; allo scopo si dovranno aggiungere a 100 mL di campione e della soluzione di riferimento 0,05 mL di ciascuna delle soluzioni di nutrienti.

7.3.3 Distribuzione del campione e del controllo nelle beute

Il campione ed il controllo vengono distribuiti, mediante un cilindro da 25 mL, in sottoaliquote da 25 mL disposte in 3 beute da 100 mL, ciascuna sottoaliquota costituisce una replica.

7.3.4 Identificazione delle beute

Al termine della distribuzione nelle beute abbiamo un totale di 6 beute, le 3 beute contenenti il campione verranno denominate con la sigla C e numerate da 1 a 3; le 3 beute contenenti il controllo verranno denominate con la sigla K ed anch'esse numerate da 1 a 3.

7.3.5 Aggiunta dell'inoculo

Ad ogni beuta viene aggiunto l'inoculo algale come riportato nel punto 3.6. La sospensione algale dell'inoculo deve essere preparata 24 ore prima dell'esecuzione del saggio. La concentrazione iniziale della coltura algale è di $1 \cdot 10^3$ cellule/mL.

7.3.6 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 frigotermostato a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 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 al giorno). Dopo 96 ore in ogni beuta verrà misurata la crescita algale mediante uno dei sistemi riportati nel punto 4. Il risultato rappresenta la CA96 rilevata alla 96° ora. Da ogni beuta si ottiene un valore di CA96, da ogni gruppo di beute (3 repliche) si ottiene il valore medio della CA96 e gli altri parametri statistici previsti nel punto 5.2.

7.3.7 Uso dei fogli di lavoro

Tutti i dati relativi al saggio di tossicità algale, le eventuali note e quant'altro si renda necessario eseguire e registrare nel corso del saggio devono essere riportati in un foglio di lavoro analogo a quello utilizzato per lo stesso campione nel saggio algale rivolto alla valutazione dello stato trofico (riportato nel punto 7.2.7 e in Appendice n.8).

8 Valutazione dei dati

I dati relativi alle misure della MCA e della CA96, opportunamente registrati nel foglio di lavoro, costituiscono la base per la loro successiva valutazione.

8.1 Valutazione dei dati provenienti dal saggio per lo stato trofico (vedere punto 7.2).

Le concentrazioni finali delle aggiunte sono quelle indicate in EPA (1978) e riportate nel punto 7.2.

La concentrazione del fosforo (0,05 mg/L) è stata scelta per assicurare un eccesso di fosforo all'interno del campione con la scopo di raggiungere la limitazione da azoto. La concentrazione di azoto (1,00 mg/L) è stata scelta per assicurare un eccesso di azoto e favorire una crescita limitata dal fosforo. L'aggiunta simultanea di azoto e fosforo produce una crescita algale limitata dal fosforo. Infatti i due principali nutrienti sono aggiunti in rapporto $N/P = 22$ che indica una limitazione da fosforo.

8.1.1 Valutazione del fattore limitante

L'individuazione del fattore limitante si basa sul confronto statistico tra il valore medio della MCA registrata nel controllo senza aggiunte (SA) rispetto al valore medio della MCA registrata per ogni aggiunta; la MCA viene espressa mediante il valore della densità cellulare (numero di cellule·10³/mL).

Per facilitare la valutazione dei dati fare riferimento alla tabella 6.

Tab. 6. Esempi di crescita algale in base alle aggiunte (i valori della crescita algale sono espressi in numero di cellule·10³/mL)

Aggiunta	Limitazione da fosforo		Limitazione da azoto	Limitazione da azoto e fosforo	Limitazione da altri nutrienti	Presenza di effetto inibente
	caso A	caso B				
senza aggiunte	100	100	200	200	100	40
fosforo	320	320	202	198	98	46
azoto	98	98	520	202	100	38
azoto e fosforo	540	318	650	550	102	42
mezzo completo	540	325	660	554	540	46

8.1.2 Limitazione da fosforo

In presenza di limitazione da fosforo si rileva, nell'aggiunta di fosforo singola e in combinazione con gli altri nutrienti, una crescita superiore (in termini statisticamente significativi) rispetto al controllo senza aggiunte.

8.1.2.1 Caso A , limitazione primaria da fosforo e secondaria da azoto

La differenza tra la crescita nell'aggiunta singola di fosforo e nell'aggiunta combinata di azoto e fosforo indica che l'addizione di fosforo ha determinato nella prima una limitazione da parte dell'azoto; nella seconda, invece, l'addizione combinata dei due elementi ha consentito una crescita algale proporzionale alla quantità totale di fosforo. In questo caso l'azoto si comporta come limitante secondario.

8.1.2.2 Caso B, limitazione esclusiva da fosforo

La differenza tra la crescita nell'aggiunta singola di fosforo e nell'aggiunta combinata di azoto e fosforo risulta non statisticamente significati-

va; ciò significa che la limitazione da parte del fosforo è molto accentuata e rimane tale anche in seguito all'aggiunta di questo elemento.

8.1.3 Limitazione da azoto

In presenza di limitazione da azoto si rileva, nell'aggiunta di azoto singola e in combinazione con gli altri nutrienti, una crescita superiore (in termini statisticamente significativi) rispetto al controllo senza aggiunte. La differenza tra la crescita nell'aggiunta singola di azoto e nell'aggiunta combinata di azoto e fosforo indica che l'addizione di azoto ha determinato nella prima una limitazione da parte del fosforo; nella seconda l'addizione combinata dei due elementi ha consentito una crescita algale proporzionale alla quantità totale di fosforo. In questo caso il fosforo si comporta come limitante secondario. La crescita algale nei corpi idrici è, di regola, limitata dal fosforo; nei casi in cui è l'azoto il fattore limitante primario il fosforo, di regola, si comporta come limitante secondario. Pertanto una limitazione esclusiva da parte dell'azoto successiva all'aggiunta di azoto è molto rara.

8.1.4 Limitazione contemporanea da azoto e fosforo

La limitazione della crescita algale da parte dell'azoto e del fosforo contemporaneamente si può verificare in acque eutrofiche dove la concentrazione del fosforo ha subito un incremento tale da condurre il rapporto N/P a valori prossimi a 11. La crescita dovuta alle singole addizioni di fosforo e azoto non differisce in misura significativa dalla crescita registrata nel controllo senza aggiunte. Un incremento significativo è invece rilevabile nell'aggiunta combinata di azoto e fosforo e nell'aggiunta del mezzo completo.

8.1.5 Limitazione da parte di altri nutrienti

La limitazione della crescita da parte di altri nutrienti (macro e micronutrienti) è molto rara e si evidenzia con un incremento significativo della crescita nell'aggiunta di mezzo completo rispetto al controllo senza aggiunte ed alle altre aggiunte a base di fosforo e azoto.

8.1.6 Presenza di fattori inibenti la crescita algale

La presenza di sostanze tossiche all'interno del campione inibisce la crescita algale nel controllo senza aggiunte e nelle aggiunte singole o com-

binare delle sostanze nutritive. In tal caso la presenza di effetto tossico si deve evidenziare anche nel saggio di tossicità nel quale la crescita algale (CA96) nel campione deve risultare inferiore rispetto alla crescita rilevata nel controllo. In tal caso è necessario ripetere il saggio di tossicità algale nel campione in esame secondo la procedura riportata nel Cap. III.1 al fine di determinare l'EC50-96h, le Unità Tossiche, il valore della NOEC e della LOEC.

8.1.7 Rapporto ottimale di assimilazione N/P

Il rapporto ottimale di assimilazione in *R. subcapitata* dei due nutrienti principali (azoto e fosforo) risulta prossimo a 11 (EPA, 1978).

Tale rapporto potrebbe essere utilizzato come indicatore del fattore limitante nelle acque superficiali. Nei corpi idrici dove viene individuato un rapporto N/P superiore a 11 il fosforo potrebbe essere considerato come il fattore limitante; nei corpi idrici dove viene invece individuato un rapporto N/P inferiore a 11 dovrebbe essere considerato limitante l'azoto.

Una procedura rivolta all'individuazione del fattore limitante basata unicamente sulla determinazione chimica della concentrazione dell'ortofosfato e dell'azoto totale inorganico ($\text{NH}_4 + \text{NO}_2 + \text{NO}_3$) e sul conseguente calcolo del rapporto N/P è sconsigliata. Essa, infatti ha scarse capacità predittive sulla potenziale crescita algale la quale risulta influenzata da altri importanti parametri quali, ad esempio, la presenza di nutrienti in forma organica biodisponibile, l'effetto di altri elementi macro e micronutrienti, la presenza di fattori inibenti. Soltanto il saggio biologico, che rappresenta una sommatoria di tutti i fattori in grado di esercitare il proprio effetto sulla crescita algale, è in grado di individuare il fattore limitante.

8.2 Determinazione della quantità biodisponibile dei principali nutrienti limitanti la crescita algale.

Come già indicato nel punto 8.1.7 la quantità di nutrienti biodisponibile può non coincidere con la rispettiva quantità determinata per via chimica.

Utilizzando il valore di MCA espresso come peso secco di biomassa prodotta ($\mu\text{g/L}$ peso secco) e il valore della biomassa prodotta da un quantitativo unitario di nutriente (Fattore di Produzione di Biomassa, espresso come $\mu\text{g/L}$ peso secco) è possibile calcolare la quantità di nutriente biodisponibile (vedere punti 8.2.2 e 8.2.3).

8.2.1 Fattore di Produzione di Biomassa (FPB)

Il Fattore di Produzione di Biomassa (FPB) si ricava dal peso secco della biomassa algale (Q), espressa come $\mu\text{g/L}$, prodotta da 1 $\mu\text{g/L}$ di nutriente (P o N).

$$\frac{Q (\mu / L)}{\text{Conc. Nutriente } (\mu / L)} = \text{FPB}$$

Considerata la variabilità del fattore di produzione di biomassa in funzione delle condizioni in cui viene eseguito il saggio algale è necessario che ogni laboratorio determini il proprio fattore. In via preliminare si consiglia di utilizzare i valori dei Fattori di Produzione di Biomassa pubblicati dall' EPA.

- fattore di produzione di biomassa per il fosforo = **430** (EPA, 1978);
- fattore di produzione di biomassa per l'azoto = **38** (EPA, 1978).

Secondo i metodi pubblicati dall'Agenzia americana ogni $\mu\text{g/L}$ di P determina la produzione di $430 \pm 20\%$ $\mu\text{g(p.s.)}/\text{L}$ di *R. subcapitata* in termini di biomassa espressa come peso secco in assenza di altri fattori limitanti. Ogni $\mu\text{g/L}$ di N determina la produzione di $38 \pm 20\%$ $\mu\text{g(p.s.)}/\text{L}$ di *R. subcapitata* in termini di biomassa espressa come peso secco in assenza di altri fattori limitanti (EPA, 1978).

8.2.2 Calcolo dell'azoto biodisponibile

L'azoto biodisponibile si ricava utilizzando il valore della MCA ottenuto dalle repliche contenenti l'aggiunta di fosforo (0,05 mg/L di P) dove la crescita algale è proporzionale alla quantità di azoto. Verificare che l'azoto si comporti effettivamente da limitante secondario tenendo presente anche il risultato della crescita algale nell'aggiunta contemporanea di azoto e fosforo che deve essere superiore alla crescita registrata nella aggiunta del fosforo (punto 8.1.1, tabella 6, caso A).

MCA media ($\mu\text{g p.s./L}$) ottenuta
nell'aggiunta di fosforo

38

= azoto biodisponibile
($\mu\text{g/L}$)

8.2.3 Calcolo del fosforo biodisponibile.

Il fosforo biodisponibile si ricava utilizzando il valore della MCA ottenuto dalle repliche contenenti l'aggiunta di azoto (1,00 mg/L di N) dove la crescita algale è proporzionale alla quantità di fosforo.

MCA media ($\mu\text{g p.s./L}$) ottenuta
nell'aggiunta di azoto

430

= fosforo biodisponibile
($\mu\text{g/L}$)

8.2.4 Calcolo della percentuale di nutriente biodisponibile

Il valore di nutriente biodisponibile calcolato mediante le formule riportate nei punti 8.2.2 e 8.2.3 può essere usato per calcolare la percentuale di azoto e fosforo biodisponibile, tali valori possono essere successivamente confrontati con i rispettivi valori di azoto totale Kjeldahl e fosforo totale rilevati nel campione filtrato secondo la procedura riportata nel cap. II, punto 3.3.

8.3 Valutazione dello stato trofico.

Il saggio algale è indispensabile per la valutazione dello stato trofico di un'acqua superficiale. In assenza di un sistema di classificazione dei corpi idrici in categorie trofiche in base alla biodisponibilità dei nutrienti principali l'EPA, in *The S. capricornutum* Printz Algal Assays Bottle Test, (1978) propone quanto segue:

le acque contenenti una concentrazione di fosforo biodisponibile superiore a 15 $\mu\text{g/L}$ e una concentrazione di azoto biodisponibile superiore a 165 $\mu\text{g/L}$ sono da considerarsi eutrofiche.

II.2 Utilizzazione di *Dunaliella tertiolecta* nel saggio algale per la valutazione della qualità delle acque marine costiere.

1 La specie algale

Dunaliella tertiolecta Butcher è un alga verde monocellulare (clorofitice) appartenente all'ordine *Volvocales*. Le cellule sono di forma ovoidale con diametro maggiore di 10-12 μm ; sono provviste di due flagelli e risultano mobili; sono facilmente conteggiabili mediante contaglobuli elettronici. L'uso di *Dunaliella tertiolecta* nel saggio algale per le acque marine o salmastre viene proposto in numerose pubblicazioni e metodi ufficiali (IRSA, 1978; EPA, 1974; APHA-AWWA-WEF, 1992).

L'alga è disponibile presso l'Istituto per lo Sfruttamento delle Lagune - CNR, Lesina (FOGGIA).

2 Terreno di coltura per il clone algale

2.1 Composizione del terreno

Sono attualmente a disposizione diverse composizioni chimiche del terreno di mantenimento;

- metodo M.A.A.P. (Marine Algal Assay Procedure) (EPA, 1974);
- metodo Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1992);
- metodo IRSA (IRSA, 1978);

le composizioni sono riportate in tabella 1.

Tabella 1 - Composizione dei terreni di coltura EPA, IRSA e Standard Methods

Sostanze	M.A.A.P. - EPA		IRSA		St. Methods	
NaNO ₃	25,500	mg/L	25,500	mg/L	25,500	mg/L
K ₂ HPO ₄	1,044	mg/L	1,044	mg/L	1,050	mg/L
Na ₂ EDTA	0,300	mg/L	0,300	mg/L	0,300	mg/L
FeCl ₃	0,096	mg/L	0,096	mg/L	0,073	mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	416,000	μg/L	416,000	μg/L	36,000	μg/L
ZnCl ₂	32,000	μg/L	32,700	μg/L	2,100	μg/L
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	1,428	μg/L	1,428	μg/L		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,021	μg/L	0,011	μg/L	0,273	μg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,260	μg/L	7,260	μg/L	2,500	μg/L
H ₃ BO ₃	92,800	μg/L				
Tiamina					0,100	mg/L
Biotina					0,500	μg/L
Vitamina B12					0,500	μg/L

Si ritiene opportuno utilizzare il terreno IRSA il quale si presenta con composizione simile al terreno indicato dall'EPA nel M.A.A.P. con alcune modifiche apportate da Chiaudani e Vighi (IRSA, 1978); il terreno è stato utilizzato in alcune esperienze di valutazione dello stato trofico nel Mar Tirreno e nel Mar Ligure e, dal 1988, viene utilizzato nel laboratorio ARPAT di Piombino per il mantenimento del clone di *Dunaliella tertiolecta* e per l'esecuzione dei saggi algali rivolti alla valutazione dello stato trofico ed alla valutazione della tossicità degli scarichi.

Le concentrazioni degli elementi macro e micronutrienti presenti nel terreno IRSA sono indicate in tabella 2.

Tab.2: Concentrazione finale nel terreno di coltura degli elementi macro e micronutrienti

macronutrienti	conc. mg/L	micronutrienti	conc. µg/L
N	4,200	Mn	115,374
P	0,186	Zn	15,685
		Fe	33,054
		Co	0,354
		Cu	0,004
		Mo	2,878

Il rapporto N/P risulta pari a 22,6, indice di una limitazione da parte del fosforo.

2.2 Acqua di mare per la preparazione del terreno e per l'uso come acqua di controllo e diluizione

Per la preparazione del terreno è sconsigliato l'uso di acqua marina artificiale, le miscele saline presenti in commercio possono contenere, a livello di impurezza, quantità di fosfati tali da produrre concentrazioni di fosforo dello stesso ordine di grandezza di quella utilizzata nel terreno (IRSA, 1978).

Preparare il terreno di mantenimento con acqua di mare naturale prelevata al largo e in zona lontana da sorgenti inquinanti. L'acqua, prelevata in contenitori di plastica da 20-25 L, viene filtrata con membrane da 0,45 µm e mantenuta a 4-6°C, al buio in appositi contenitori in policarbonato sterilizzabile per un periodo di tempo non superiore a tre mesi. L'acqua di mare così trattata e conservata deve essere anche utilizzata come acqua di diluizione e controllo per il saggio di tossicità (Cap. III.2).

Nell'acqua di mare pelagica le concentrazioni dei nutrienti principali risultano di regola inferiori ai limiti di rilevabilità delle metodiche analitiche comunemente utilizzate (tabella 3).

Tab.3 - Principali caratteristiche dell'acqua pelagica del Mar Ligure (IRSA, 1978) mod.

Salinità	‰	≈ 37
PO ₄ (come P)	μg/L	< 1
NO ₃ (come N)	μg/L	< 1
NO ₂ (come N)	μg/L	< 1
NH ₄ (come N)	μg/L	< 1

2.3 Preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale
Allestire le seguenti soluzioni concentrate con acqua ultrapura.

- 1 - NaNO₃12,750 g/ 500 mL
- 2 - K₂HPO₄0,522 g/ 500 mL
- 3 - FeCl₃0,048 g/ 500 mL
- 4 - SOLUZIONE DEI MICRONUTRIENTI; 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

MnCl₂·4H₂O208,000 mg/ 500 mL
 ZnCl₂16,350 mg/ 500 mL (*)
 CoCl₂·6 H₂O0,714 mg/ 500 mL (*)
 CuCl₂·2H₂O0,006 mg/ 500 mL (*)
 Na₂MoO₄·2H₂O.....3,630 mg/ 500 mL (*)
 Na₂EDTA150,000 mg/ 500 mL

(*) Relativamente alle soluzioni di ZnCl₂, CoCl₂·6 H₂O, CuCl₂·2H₂O e Na₂MoO₄·2H₂O, 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 preparate le seguenti soluzioni di partenza:

ZnCl₂ - pesare 327,1 mg e portare a 100 mL; prelevare 5 mL da portare a 500 mL.

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

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - pesare 120 mg e portare a 1000 mL; prelevare 0,050 mL e portare a 500 mL.

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - pesare 726 mg e portare a 100 mL; prelevare 0,5 mL e portare a 500 mL.

Filtrare le soluzioni 1, 2, 3 e 4 su membrana da $0,45 \mu\text{m}$ in condizioni asettiche, mediante filtri sterili e conservare al buio, a $4-6^\circ\text{C}$, 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 e 4) a 450 mL di acqua di mare filtrata preparata e conservata secondo le indicazioni del punto 2.2, portare a volume finale di 500 mL. L'acqua di mare è un buon sistema tampone, tuttavia controllare ed aggiustare, se necessario, il pH a $8,0 \pm 0,1$ usando HCl o NaOH 0,1N. Filtrare il terreno liquido sottoposto a controllo e correzione del pH su membrana da $0,45 \mu\text{m}$. Il terreno deve essere conservato in contenitori sterili, al buio, a $4-6^\circ\text{C}$, per un tempo massimo di 1 mese.

2.4 Preparazione del terreno di mantenimento in fase solida

Aggiungere a caldo al terreno di mantenimento (preparato come riportato al punto 2.3) 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 pyrex 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 $4-6^\circ\text{C}$, al buio, per un tempo massimo di 1 mese.

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

Allestire le seguenti soluzioni concentrate con acqua ultrapura:

1 - NaNO_3 12,75 g/ 500 mL

2 - K_2HPO_4 0,522 g/ 500 mL

3 - FeCl_3 0,048 g/ 500 mL

4a - SOLUZIONE DEI MICRONUTRIENTI; tale soluzione differisce da quella utilizzata per la preparazione del terreno di mantenimento soltanto per la mancanza di EDTA. 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

MnCl ₂ ·4H ₂ O	208,000 mg/ 500 mL
ZnCl ₂	16,350 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
(*) Vedere preparazione della soluzione 5 al punto 2.3.	

Essendo le soluzioni 1, 2, e 3 uguali a quelle riportate nel punto 2.3, per la preparazione del terreno per il saggio di tossicità è possibile utilizzare quest'ultime.

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

3 Mantenimento del clone algale

3.1 Terreno di mantenimento

Utilizzare il terreno indicato al punto 2.3

3.2 Vetreria per le colture algali

Per l'allestimento delle colture algali si raccomanda l'uso di beute in vetro borosilicato di tipo Erlenmayer preparate come riportato nel punto 3 del Cap. I. 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 (ad esempio 25 ml di coltura in beuta da 125 ml). Tale rapporto deve essere mantenuto quando la coltura algale viene agitata manualmente una volta al giorno; mentre in condizione di agitazione continua, mediante piano oscillante o rotante la percentuale di volume occupato dalla coltura può raggiungere il 50%.

3.3 Condizioni di incubazione

Le condizioni di incubazione sono le seguenti: temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$; illuminazione con lampade fluorescenti tipo "cool white" con intensità luminosa superiore a 4300 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 CO_2 . Se la cella climatica o il frigotermostato dove sono disposte le colture algali non presentano ricambi d'aria naturali, è consigliabile immettere aria mediante una pompa a membrana da acquari.

3.4 Colture algali su terreno liquido

Al momento dell'arrivo in laboratorio trasferire 2 mL della coltura algale in beuta da 250 mL (lavata e sterilizzata come riportato al punto 3 del Cap. I) con una quantità idonea di terreno di coltura (50 mL) preparato come riportato al punto 2.3. La coltura deve essere mantenuta in frigotermostato 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 mL di terreno; è buona regola mantenere la vecchia coltura per una ulteriore settimana in modo tale di avere sempre a disposizione due cloni algali. I trapianti ogni sette giorni garantiscono la disponibilità di cellule algali in fase esponenziale di crescita.

3.5 Colture algali su terreno agarizzato

E' conveniente allestire colture algali su terreno agarizzato le quali vanno a costituire 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 al punto 2.4. A partire dalla vecchia coltura su terreno liquido allestire inizialmente una coltura algale di isolamento su piastra incubando a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e in condizione di illuminazione continua; successivamente, a partire da una colonia algale isolata, predisporre una coltura di mantenimento per spandimento 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 due mesi, quindi rinnovare la coltura seminando per spandimento su un nuovo tubo con terreno agarizzato.

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.

3.6 Preparazione dell'inoculo algale

Il saggio algale ha inizio con l'inoculo in beuta 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 acqua di mare filtrata (vedere punto 2.2) 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.

3.6.1 Soluzione per il lavaggio delle alghe

Per il lavaggio delle alghe usare l'acqua di mare filtrata e preparata secondo quanto riportato nel punto 2.2. L'acqua di mare filtrata deve essere mantenuta a 4-6°C per un tempo massimo di un mese. La soluzione proveniente dal frigorifero, prima di essere utilizzata, deve essere riportata ad una temperatura di circa 20°C.

3.6.2 Lavaggio della sospensione algale

Prelevare in condizioni asettiche circa 10 mL della coltura algale in fase 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 di plastica sterile e risospendere le cellule algali in ac-

qua di mare filtrata. Ripetere il lavaggio, risospendere di nuovo in acqua di mare e disporre per 24 ore nelle stesse condizioni ambientali della coltura di mantenimento.

3.6.3 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 (vedere punto 4.3).

3.6.4 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.

$$\frac{\begin{array}{c} \text{(A)} \\ \text{Volume totale} \\ \text{inoculo} \\ \text{(mL)} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{(B)} \\ \text{Densità inoculo} \\ 100 \cdot 10^3 \\ \text{cellule/mL} \end{array}}{\begin{array}{c} \text{(C)} \\ \text{Densità della sosp. algale} \\ \text{cellule/mL} \end{array}} = \begin{array}{c} \text{(D)} \\ \text{Volume della sosp. algale} \\ \text{da prelevare per l'inoculo} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{(A)} \\ \text{Volume totale} \\ \text{Inoculo (mL)} \end{array} = \begin{array}{c} \text{(E)} \\ \text{n. beute previste} \\ \text{per il saggio} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{(F)} \\ 0,25 \text{ (volume dell'inoculo)} \\ \text{(mL)} \end{array}$$

Il Volume della sospensione algale da prelevare per l'inoculo (D) deve essere portato, mediante aggiunta di acqua di mare filtrata, 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).

3.6.5 Distribuzione dell'inoculo nelle beute del saggio

In ogni beuta del saggio deve essere aggiunto 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.

4 Sistemi di misura della crescita algale

4.1 Massima Crescita Algale (MCA) e Crescita Algale alla 96° ora (CA96)

I parametri utilizzabili per descrivere la crescita algale sono: la massima crescita algale (MCA) e la Crescita Algale alla 96° ora di incubazione (CA96).

La MCA viene misurata al raggiungimento della fase di crescita stazionaria (ovvero dopo circa 7 giorni di incubazione) e viene utilizzata per i seguenti scopi:

- a) individuazione del fattore limitante;
- b) valutazione dello stato trofico (ovvero indicazione dello stato di eutrofizzazione);
- c) determinazione della concentrazione di fosforo e azoto biodisponibili.

Per gli scopi indicati in a) e b) è sufficiente esprimere la crescita algale indicata come densità cellulare (numero di cellule $\cdot 10^3$ /mL), per lo scopo indicato in c) è necessario esprimere la crescita in termini di biomassa prodotta indicata come peso secco (mg/L).

La CA96 misurata alla 96° ora di incubazione viene utilizzata per valutare la eventuale presenza di effetto tossico esercitato dal campione rispetto ad un controllo.

Un confronto tra alcuni sistemi di misura della crescita algale è riportato in appendice n. 4.

4.2 Peso secco

Il peso secco della biomassa prodotta può essere determinato direttamente tramite misure gravimetriche oppure determinato indirettamente mediante l'uso di Fattori di Conversione in Biomassa (FCB).

4.2.1 Metodo gravimetrico

Questo metodo si basa sulla filtrazione e la determinazione gravimetrica del peso secco di una sospensione algale.

Il peso secco della biomassa algale proveniente da una coltura corri-

spondente allo stadio di crescita stazionaria (MCA) si riduce a pochi milligrammi; è perciò necessario, prevedendo di utilizzare il metodo gravimetrico, allestire il saggio algale tenendo presente le seguenti indicazioni:

- preparare le colture algali con un volume di 100 mL in beute da almeno 300 mL, utilizzare un inoculo costituito da 1 mL di una sospensione algale con densità di $100 \cdot 10^3$ cell./mL;
- monitorare giornalmente la crescita algale mediante conteggio cellulare o altro sistema (fluorimetria, spettrofotometria) a partire dal terzo giorno di incubazione ed eseguire la determinazione gravimetrica lo stesso giorno in cui viene raggiunto lo stadio di crescita stazionaria (MCA);
- quando il saggio algale comprende una serie di colture algali con concentrazioni di nutrienti diverse (ad esempio nel caso in cui lo scopo del saggio sia la determinazione del Fattore di Conversione in Biomassa - FCB come riportato nel punto 4.2.2) è prevedibile che le colture con concentrazioni di nutrienti più basse raggiungano la fase di crescita stazionaria con qualche giorno di anticipo rispetto alle altre. In tal caso le determinazioni gravimetriche per colture algali appartenenti allo stesso saggio algale verranno eseguite in giorni diversi;
- prima di eseguire la filtrazione verificare a campione, mediante esame microscopico, l'assenza di contaminazione delle colture; in presenza di organismi estranei (ad esempio altre alghe, protozoi, batteri) il test deve essere ripetuto previo controllo delle colture algali di mantenimento.

a) alcuni giorni prima di eseguire le determinazioni gravimetriche preparare un numero di membrane filtranti pari al numero di colture algali che costituiscono il saggio; siglare ogni singola membrana con numerazione crescente;

b) disporre le membrane in stufa a secco a 70°C per almeno 2 ore (è opportuno non superare i 70°C per evitare di alterare la porosità delle membrane);

c) raffreddare le membrane in essiccatore per almeno 1 ora;

d) pesare le membrane con bilancia analitica, registrare il peso e disporre in apposito contenitore avendo cura di separare le membrane adiacenti con le apposite cartine separatrici;

e) disponendo le membrane precedentemente tarate su un apparecchio filtrante ben pulito filtrare un volume noto di sospensione algale (visto la

scarsa sensibilità del metodo è opportuno filtrare il massimo volume possibile); filtrare con un vuoto di 380 mm Hg;

f) lavare la tramoggia dell'apparecchio filtrante con 50 mL di acqua distillata avendo cura di far scorrere l'acqua lungo le pareti della tramoggia e di non allontanare le cellule depositate sulla membrana; il lavaggio serve anche per allontanare i residui salini dalle alghe depositate sulla membrana; g) togliere la membrana e disporla su un vetro da orologio grande (non disporre le membrane una sull'altra);

h) ripetere le operazioni e), f), e g) per ogni beuta contenente una sospensione algale presente nel saggio;

i) essiccare le membrane in stufa a 70°C;

j) raffreddare le membrane in essiccatore per almeno 1 ora;

k) pesare le membrane con bilancia analitica ripetere le operazioni (i) e (j) sino al raggiungimento del peso costante; registrare il peso, sottrarre da quest'ultimo la tara corrispondente determinata al punto d); il risultato, espresso come mg/L, costituisce il peso secco della biomassa prodotta.

4.2.2 Determinazione della biomassa espressa in termini di peso secco mediante i Fattori di Conversione in Biomassa (FCB).

Per mezzo del FCB è possibile convertire le misure di crescita algale in termini di peso secco della biomassa (Mingazzini e Berri, 1991). I valori dei FCB possono essere determinati in laboratorio correlando, mediante il sistema della regressione lineare, misure gravimetriche con altre misure della crescita algale (conteggi cellulari, densità ottica, fluorescenza) eseguite in parallelo su una serie di colture algali con valori crescenti di MCA. Nelle Appendici n. 2 e n. 3 sono riportate le determinazioni dei valori di FCB per *R. Subcapitata* e per *D. tertiolecta*.

4.3 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 dei Fattori di Conversione in Densità Cellulare (FCD). I valori dei fattori di conversione

FCD devono essere calcolati mediante il sistema della regressione lineare tra conteggi cellulari e le altre misure strumentali (Appendice n.4).

4.3.1 Conteggio cellulare mediante contaglobuli elettronico

Disporre di una soluzione elettrolitica costituita da NaCl 1% filtrata su membrane da $0,22\ \mu\text{m}$ (si suggerisce di prepararne 2 L alla volta utilizzando NaCl AR-grade 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 $100\ \mu\text{m}$ 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 *Dunaliella tertiolecta* 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.

Dunaliella tertiolecta presenta di regola dimensioni piuttosto costanti, tuttavia è consigliabile monitorare l'accuratezza della risposta del contaglobuli mediante taratura con soluzioni a densità algale nota e determinata con altra tecnica (ad esempio il conteggio microscopico).

4.3.2 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 rialzo 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 (Pasquinelli, 1978).

Allo scopo possono essere utilizzate le camere di Burker 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 è necessario aggiungere alla sospensione algale una goccia di acido acetico concentrato per immobilizzare le cellule; deporre quindi una piccola aliquota 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 $\times 10^3/\text{mL}$. Determinazioni più precise possono essere ottenute da un valore medio di cellule conteggiate su un numero maggiore di quadrati grandi.

4.4 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 in vitro, mediante misure spettrofotometriche o fluorimetriche, o in vivo, mediante misure fluorimetriche; si ritiene opportuno segnalare solo quest'ultimo sistema di misura il quale 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 (Gaggi et al., 1995). Eseguire la lettura del bianco con acqua distillata; agitare accuratamente la coltura algale e deporne circa 5 mL all'interno di una cuvetta da fluorimetria in vetro o plastica; eseguire rapidamente la lettura e registrare il dato strumentale; confrontare i risultati ottenuti con una retta di taratura effettuata con una soluzione di riferimento di clorofilla-a. Mediante i fattori FCB o FCD è possibile convertire i dati espressi in clorofilla-a in biomassa o in densità cellulare.

E' 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 nelle acque di scarico possono interferire nella determinazione fluorimetrica (EPA, 1978).

4.5 Determinazione della densità cellulare mediante misura dell'assorbanza

La misura dell'assorbanza deve essere eseguita mediante spettrofotometro o colorimetro con lunghezza d'onda di 670 nm corrispondente al picco di massimo assorbimento della clorofilla nel campo del visibile (vedere appendice n.7).

La misura di assorbanza delle colture algali in corrispondenza della lunghezza d'onda di 670 nm viene proposta anche da Persoone (Persoone, in corso di stampa); Walsh e Bahner (1980) propongono, invece, di leggere l'assorbanza delle colture algali a 525 nm; in Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1992) vengono indicate le lunghezze d'onda di 600 o 750 nm; Chiaudani e Vighi (1977) indicano una lunghezza d'onda compresa tra 700 e 750 nm.

Per aumentare la sensibilità del sistema di lettura è consigliabile l'utilizzazione di cuvette con percorso ottico di 10 cm.

Eseguire la lettura del bianco con acqua distillata; agitare accuratamente la coltura algale e deporne circa 5 mL all'interno di una cuvetta in vetro o plastica; eseguire rapidamente la lettura e registrare il dato strumentale. Mediante i fattori FCB o FCD è possibile convertire i dati espressi in assorbanza in termini di biomassa o di densità cellulare. La misura spettrofotometrica risulta tuttavia poco sensibile e il metodo viene sconsigliato in EPA, 1978.

5 Analisi statistica dei dati

5.1 Espressione dei dati relativi alla crescita algale e numero di replicati

In riferimento a quanto riportato in 4 si ricorda che la crescita algale può essere espressa come densità cellulare (numero di cellule·10³/mL), oppure come biomassa prodotta, indicata come peso secco (mg/L). La densità cellulare e la biomassa possono essere determinate direttamente (mediante il conteggio cellulare la prima e la determinazione gravimetrica del peso secco la seconda) o indirettamente (mediante l'uso dei fattori di conversione).

Ogni aliquota di campione arricchita con uno o più nutrienti nel saggio per la valutazione dello stato trofico e 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.

5.2 Elaborazione dei dati per la valutazione dello stato trofico

Per determinare il nutriente che limita la crescita (fattore limitante) misurare la MCA nelle beute che costituiscono il controllo (ovvero il campione privo di aggiunte) e nelle beute contenenti le aggiunte dei nutrienti singoli o associati. Per ogni gruppo di repliche determinare i seguenti parametri statistici (vedere Appendice n. 1):

- valore medio (\bar{x})
- deviazione standard (DS)
- devianza (D)
- varianza (V)
- Coefficiente di Variazione (CV)

Confrontare i valori medi della MCA ottenuti nelle beute con le varie aggiunte con il valore medio della MCA ottenuto nelle beute del controllo mediante il test "t di Student" o altri metodi statistici.

Per i calcoli statistici è opportuno tenere presente le seguenti condizioni:

- L'ipotesi nulla (ovvero che ci aspettiamo di contraddire per mezzo dell'analisi statistica) è che il valore di MCA medio ottenuto per ogni aggiunta sia minore o uguale al valore medio ottenuto nel controllo;
- L'ipotesi alternativa (ovvero che ci aspettiamo di confermare per mezzo dell'analisi statistica) è che il valore di MCA medio ottenuto per ogni aggiunta sia maggiore del valore medio ottenuto nel controllo;
- Livello di significatività α ($\alpha=0,05$ oppure $\alpha=0,01$). Ad esempio, per $\alpha=0,05$ si prevede una possibilità su 20 che il risultato ottenuto sia errato, cioè che l'ipotesi nulla sia quella giusta (ovvero è prevedibile un errore del 5%);
- Test a una coda. è necessario confrontare il t di Student calcolato con i valori tabulati rilevati nell'ambito del test ad una coda perché l'ipotesi

alternativa è che il valore di MCA medio ottenuto per ogni aggiunta sia maggiore del valore medio ottenuto nel controllo. Per applicare il test a due code, invece, l'ipotesi alternativa deve prevedere il valore di MCA medio dell'aggiunta maggiore o minore del valore medio del controllo.

- Per il calcolo del valore t di Student vedere Appendice n. 1.

5.3 Elaborazione dei dati relativi al test di tossicità

Per valutare la presenza di un effetto inibente la crescita algale esercitato dal campione è necessario procedere come segue. Determinare la Crescita Algale dopo 96 ore di incubazione (CA96) nelle beute che costituiscono il controllo (ovvero acqua di mare trattata come previsto nel punto 2.2 con aggiunta di nutrienti) e nelle beute contenenti il campione arricchito con nutrienti. Per ogni gruppo di repliche determinare i seguenti parametri statistici (vedere in Appendice n.1):

- valore medio (\bar{x})
- deviazione standard (DS)
- devianza (D)
- varianza (V)
- Coefficiente di Variazione (CV)

Confrontare il valore medio della CA96 ottenuto nelle beute contenenti il controllo con il valore medio della CA96 ottenuto nelle beute contenenti il campione mediante il test "t di Student" o altri metodi statistici.

Per i calcoli statistici è opportuno tenere presente le seguenti condizioni:

- L'ipotesi nulla (ovvero che ci aspettiamo di contraddire per mezzo dell'analisi statistica) è che il valore della CA96 medio ottenuto nel campione sia uguale al valore medio ottenuto nel controllo;
- L'ipotesi alternativa (ovvero che ci aspettiamo di confermare per mezzo dell'analisi statistica) è che il valore della CA96 medio ottenuto nel campione sia minore o maggiore del valore medio ottenuto nel controllo. Il valore CA96 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 α ($\alpha=0,05$ oppure $\alpha=0,01$). Ad esempio, per $\alpha=0,05$ si prevede una possibilità su 20 che il risultato ottenuto sia erra-

to, cioè che l'ipotesi nulla sia quella giusta (ovvero è prevedibile un errore del 5%);

- Test a due code. é necessario confrontare il t di Student calcolato con i valori tabulati rilevati nell'ambito del test a due code perché l'ipotesi alternativa è che il valore della CA96 medio ottenuto nel campione sia maggiore o minore del valore medio ottenuto nel controllo.
- Per il calcolo del valore t di Student vedere Appendice n.1.

5.4 Esclusione di dati anomali dal calcolo statistico

Quando all'interno di una serie di repliche si presenta un dato che si discosta dalla media per un valore superiore a 3 o 4 Deviazioni Standard è possibile applicare il seguente test per verificare la possibilità di considerare il dato come anomalo e, quindi, scartarlo (Draper e Smith, 1968).

- Ordinare i dati della serie secondo valori crescenti: $x_1 \leq x_2 \leq \dots x_n$;
- calcolare il valore c mediante la seguente procedura

se x_1 è il dato anomalo $c = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1}$

se x_n è il dato anomalo $c = \frac{x_n - (x_n - 1)}{x_n - x_1}$

- se il valore c calcolato eccede il valore tabulato corrispondente al numero di repliche a disposizione (tab. 3) allora il dato può essere scartato.

Tabella 3. Valori c per l'individuazione dei dati anomali

n	valori c limite	
	$\alpha=0,05$	$\alpha=0,01$
3	0,941	0,988
4	0,765	0,889
5	0,642	0,780
6	0,560	0,698
7	0,507	0,637

- in presenza di due dati che sembrano anomali (ad esempio x_1 e x_n oppure x_1 e x_2) il calcolo può essere ripetuto; prima deve essere applicato al valore che si discosta maggiormente dal valore medio;

6 Parametri chimico-fisici

Per l'esecuzione del saggio algale è necessario conoscere i seguenti parametri chimici da rilevare durante le fasi del prelievo o nel campione d'acqua prelevato per il saggio.

- pH;
- Temperatura (come °C);
- Salinità: determinabile direttamente come mg/L; oppure come Conduttività ($\mu\text{S}/\text{cm}$) o come Cloruri (mg/L di Cl^-). Per la determinazione della salinità mediante la titolazione degli ioni cloruro fare riferimento al metodo IRSA n. 2090 (IRSA, 1994);
- Ossigeno Disciolto (come mg/L di O_2 e come % di saturazione).

È inoltre preferibile conoscere i seguenti parametri chimici:

- fosforo totale (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di P);
- orto-fosfati (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di P);
- azoto ammoniacale (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di N);
- azoto nitroso (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di N);
- azoto nitrico (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di N);
- azoto totale Kjeldahl (come $\mu\text{g}/\text{L}$ di N).

7 Piano sperimentale

7.1 Valutazione dello stato trofico e saggio di tossicità

Per ogni campione destinato al saggio algale il piano sperimentale viene predisposto per la valutazione dello stato trofico e per il saggio di tossicità algale. In sintesi, per un piano sperimentale basato su 3 repliche per ciascuna aliquota di campione, verranno utilizzate 21 beute (15 per la valutazione dello stato trofico e 6 per la valutazione della tossicità)

7.2 Piano di lavoro per la valutazione dello stato trofico

Il piano di lavoro di seguito descritto permette di individuare il fattore limitante quando la limitazione dipende da fosforo, azoto o micronutrienti. I volumi riportati hanno carattere indicativo e possono essere modificati in base al numero di repliche che si desidera effettuare. Tutte le operazioni

devono essere eseguite sotto cappa a flusso laminare o comunque in ambiente asettico.

7.2.1 Aggiunte di nutrienti e distribuzione nelle beute

Il campione (500 mL provenienti dal trattamento previsto punto 3.3 del Cap. II) viene suddiviso in 5 aliquote da 100 mL così denominate: controllo senza aggiunte (SA), aggiunta fosforo (P), aggiunta azoto (N), aggiunta fosforo e azoto (N-P), aggiunta di mezzo completo (MC). Ciascuna aliquota viene disposta in un cilindro graduato da 100 mL (con raccordo conico in vetro smerigliato) dove viene arricchita con i nutrienti; il cilindro viene chiuso con l'apposito tappo in vetro smerigliato ed agitato per capovolgimento; l'aliquota arricchita viene distribuita in sottoaliquote da 25 mL (mediante un cilindro da 25 mL) in 3 beute da 100 mL, ciascuna sottoaliquota costituisce una replica, per ogni aliquota sono, di conseguenza, previste 3 repliche.

Secondo le indicazioni fornite Chiaudani e Vighi nel Quaderno IRSA n.39 (IRSA, 1978) le aggiunte di fosforo e azoto devono essere tali da rispettare il rapporto azoto-fosforo presente nel terreno di mantenimento ($N/P = 22$). La quantità dei nutrienti da aggiungere deve essere stabilita in funzione della concentrazione dei nutrienti medesimi presenti nel campione; essa deve essere capace di determinare incrementi significativi della crescita rispetto al controllo senza aggiunte.

Nella valutazione della quantità di nutrienti da aggiungere è opportuno tenere presente che quest'ultima deve supportare una densità cellulare nello stadio di MCA tale da superare la soglia di rilevabilità dei metodi comunemente adottati per la misura della crescita algale.

Si ritiene opportuno indicare, se la concentrazione dei nutrienti è ignota o se la concentrazione dei fosfati (espressi come P) è inferiore a 0,05 mg/L, un'aggiunta di 0,05 mg/L di fosforo (come fosfato) e, conseguentemente, di 1,1 mg/L di azoto (come nitrato). Nei campioni con concentrazione di fosforo superiore a 0,05 mg/L è necessario aggiungere una quantità di fosforo (sottoforma di fosfato) corrispondente ad una concentrazione uguale o doppia.

Ad esempio per un campione di acqua contenente 0,06 mg/L di fosforo e 0,80 mg/L di azoto l'aggiunta dovrà essere di 0,06-0,12 mg/L di fosforo e 1,32-2,64 mg/L di azoto.

Schema delle aggiunte per un campione con concentrazione dei nutrienti ignota o con concentrazione del fosforo inferiore a 0,05 mg/L.

- **Controllo senza aggiunte (SA):** l'aliquota di campione corrispondente al controllo non subisce alcuna aggiunta di nutrienti e viene direttamente distribuita in 3 beute da 100 mL;
- **aggiunta di fosforo (P):** aggiungere a 100 mL di campione una quantità di K_2HPO_4 tale che si determini un incremento della concentrazione di fosforo (come P) pari a 0,05 mg/L. A tal fine:
 - a) disporre 100 mL di campione in cilindro graduato;
 - b) calcolare il volume corrispondente della soluzione concentrata di K_2HPO_4 (soluzione n.2 riportata nel punto 2.5) da aggiungere a 100 mL di campione. Ad esempio preparare una soluzione intermedia (soluzione P/10) diluendo 1:10 la soluzione concentrata di K_2HPO_4 , quindi prelevarne 0,269 mL da aggiungere ai 100 mL di campione);
 - c) sottrarre dai 100 mL di campione il volume della soluzione da aggiungere;
 - d) aggiungere il volume di soluzione concentrata e agitare per capovolgimento prima di distribuire in 3 beute da 100 mL.
- **aggiunta di azoto (N):** aggiungere a 100 mL di campione una quantità di $NaNO_3$ tale che si determini un incremento della concentrazione di azoto (come N) pari a 1,10 mg/L. A tal fine:
 - a) disporre 100 mL di campione in cilindro graduato;
 - b) calcolare il volume corrispondente della soluzione concentrata di $NaNO_3$ (soluzione n.1 riportata nel punto 2.5) da aggiungere a 100 mL di campione. Ad esempio preparare una soluzione intermedia (soluzione N/10) diluendo 1:10 la soluzione concentrata di $NaNO_3$, quindi prelevarne 0,262 mL da aggiungere ai 100 mL di campione);
 - c) sottrarre dai 100 mL di campione il volume della soluzione da aggiungere;
 - d) aggiungere il volume di soluzione concentrata e agitare per capovolgimento prima di distribuire in 3 beute da 100 mL.
- **aggiunta di azoto e fosforo (N-P):** aggiungere a 100 mL di campione una quantità di K_2HPO_4 tale che si determini un incremento della concentrazione di fosforo (come P) pari a 0,05 mg/L; aggiungere inoltre una

quantità di NaNO_3 tale che si determini un incremento della concentrazione di azoto (come N) pari a 1,10 mg/L. A tal fine procedere come nei due punti precedenti.

- **aggiunta di Mezzo Completo (MC):** aggiungere a 100 mL di campione una quantità di K_2HPO_4 tale che si determini un incremento della concentrazione di fosforo (come P) pari a 0,05 mg/L; aggiungere inoltre una quantità di NaNO_3 tale che si determini un incremento della concentrazione di azoto (come N) pari a 1,10 mg/L. Oltre a fosforo e azoto tale soluzione deve comprendere anche gli altri macro e microelementi nelle concentrazioni riportate nelle tabelle 1 e 2 del punto 2.1 ad esclusione dell'EDTA. A tal fine eseguire le aggiunte di P e N come nei punti precedenti ed inoltre aggiungere 0,1 mL delle soluzioni n.3 (FeCl_3) e n.4a (micronutrienti) riportate nel punto 2.5.

Tab. 4. Aggiunte da impiegare per la valutazione dello stato trofico

Controllo senza aggiunte	SA
Controllo + 0,05 mg/L di P	P
Controllo + 1,10 mg/L di N	N
Controllo + 0,05 mg/L di P+ 1,10 mg/L di N	N-P
Controllo + 0,05 mg/L di P+ 1,10 mg/L di N +Mezzo Completo	MC

Tab. 5. Esempio di schema delle aggiunte per la valutazione dello stato trofico

Aggiunte	Volume totale (mL)	Volume sol.ne P/10 (mL)	Volume sol.ne N/10 (mL)	Volume sol.ni altri elementi (*) (mL)	Volume in beuta (mL)	Numero beute
C	100	0	0	0	25	3
P	100	0,269	0	0	25	3
N	100	0	0,262	0	25	3
N-P	100	0,269	0,262	0	25	3
MC	100	0,269	0,262	0,100	25	3

(*)soluzione n.3 (FeCl_3) e n.4 (micronutrienti) riportate nel punto 2.5

7.2.2 Calcoli per le aggiunte

Per il calcolo del volume di soluzione concentrata di nutriente da aggiungere al campione può essere utilizzata la seguente formula:

$$\begin{array}{l} \text{mL sol.ne di} \\ \text{fosforo da aggiungere} = \\ \text{in 100 mL di campione} \end{array} = \frac{\text{Conc. P nella soluzione (ES. 0,05 mg/L)} \times 100}{\text{Concentrazione sol.ne P concentrata} \\ \text{(Es. sol. P/10 = 18,6 mg/L)}}$$

$$\begin{array}{l} \text{mL sol.ne di} \\ \text{azoto da aggiungere} = \\ \text{in 100 mL di campione} \end{array} = \frac{\text{Conc. N nella soluzione (Es. 1,1 mg/L)} \times 100}{\text{Concentrazione sol.ne N concentrata} \\ \text{(Es. sol. N/10 = 420 mg/L)}}$$

7.2.3 Volume delle aggiunte

Il volume delle soluzioni nutrienti da aggiungere deve essere inferiore al 1% del volume totale. Ad esempio in 100 mL di campione il volume complessivo delle aggiunte deve essere inferiore a 1 mL.

7.2.4 Identificazione delle beute

Al termine dell'arricchimento delle aliquote di campione e della distribuzione delle sottoaliquote abbiamo un totale di 15 beute distribuite in 5 sottogruppi da 3 beute; ogni gruppo di 3 beute deve essere denominato con le sigle SA, P, N, N-P, MC ed ogni beuta all'interno del gruppo deve essere individuata mediante un numero o una lettera (ad esempio SA1, SA2, SA3).

7.2.5 Aggiunta dell'inoculo

Ad ogni beuta viene aggiunto l'inoculo algale come riportato nel punto 3.6. La sospensione algale dell'inoculo deve essere preparata 24 ore prima dell'esecuzione del saggio. La concentrazione iniziale della coltura algale è di $1 \cdot 10^3$ cellule/mL.

7.2.6 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 frigotermostato a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 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 al giorno). A partire dal terzo o dal quarto giorno misurare giornalmente in ogni beuta la crescita algale mediante uno dei sistemi riportati nel punto 4, effettuare il monitoraggio della crescita fino al raggiungimento dello stadio stazionario di crescita in corrispondenza del quale registrare la Massima Crescita Algale (MCA). Da ogni beuta si ottiene un valore di MCA, da ogni gruppo di beute (3 repliche) si ottiene il valore medio della MCA e gli altri parametri statistici previsti nel punto 5.2.

7.2.7 Uso dei fogli di lavoro

Tutti i dati relativi al saggio algale, le eventuali note e quant'altro si renda necessario eseguire e registrare nel corso del saggio devono essere riportati in un foglio di lavoro come quello riportato in appendice n.8.

7.3 Piano di lavoro per la valutazione della tossicità

Nella valutazione della qualità delle acque marine costiere è importante considerare anche la eventuale presenza di tossicità; un effetto inibente la crescita algale potrebbe inoltre inficiare i risultati del saggio per la valutazione dello stato trofico. È quindi necessario eseguire, in parallelo al saggio per la valutazione dello stato trofico riportato nel punto 7.2, anche un test di tossicità algale. Nel test algale l'effetto tossico tende a ridursi o a scomparire con il prolungarsi del periodo di incubazione (Walsh et al., 1982; Walsh e Merrill, 1984) e con l'incremento della biomassa algale (Mingazzini, 1993). Nel saggio algale rivolto alla valutazione della tossicità del campione la misura della MCA al raggiungimento dello stadio stazionario di crescita (ovvero dopo circa 7-10 giorni di incubazione) risulta inadeguata.

Il piano di lavoro di seguito descritto permette di individuare la presenza di fattori inibenti la crescita algale attraverso la misura della Crescita Algale dopo 96 ore (CA96) di incubazione; la crescita algale rilevata nel campione viene confrontata con quella rilevata in una soluzione di riferimento (controllo). Anche in questo caso i volumi riportati hanno carattere indicativo e possono essere modificati in base al numero di repliche

che si desidera effettuare. Tutte le operazioni devono essere eseguite sotto cappa a flusso laminare o comunque in ambiente asettico.

7.3.1 Preparazione del campione

Utilizzando un cilindro graduato da 100 mL dotato di tappo in vetro smerigliato aggiungere a 100 mL di campione (proveniente dal trattamento previsto nel punto 3.3 del Cap. II) 0,1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3 e 4a descritte nel punto 2.5. Agitare per capovolgimento.

7.3.2 Preparazione della soluzione di riferimento (controllo)

Utilizzando un cilindro graduato da 100 mL dotato di tappo in vetro smerigliato aggiungere a 100 mL di acqua di mare naturale (preparata come riportato nel punto 2.2) 0,1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3 e 4a descritte nel punto 2.5. Agitare per capovolgimento.

Si vengono così a costituire, con il campione e l'acqua di mare naturale filtrata, 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 in soluzione.

La presenza di campioni con caratteristiche eutrofiche rende consigliabile una riduzione della concentrazione del terreno del 50% rispetto alle colture di mantenimento; allo scopo si dovranno aggiungere a 100 mL di campione e della soluzione di riferimento 0,05 mL di ciascuna delle soluzioni di nutrienti.

7.3.3 Distribuzione del campione e del controllo nelle beute

Il campione ed il controllo vengono distribuiti, mediante un cilindro da 25 mL, in sottoaliquote da 25 mL disposte in 3 beute da 100 mL, ciascuna sottoaliquota costituisce una replica.

7.3.4 Identificazione delle beute

Al termine della distribuzione nelle beute abbiamo un totale di 6 beute, le 3 beute contenenti il campione verranno denominate con la sigla C e numerate da 1 a 3; le 3 beute contenenti il controllo verranno denominate con la sigla K ed anch'esse numerate da 1 a 3.

7.3.5 Aggiunta dell'inoculo

Ad ogni beuta viene aggiunto l'inoculo algale come riportato nel punto 3.6. La sospensione algale dell'inoculo deve essere preparata 24 ore prima dell'esecuzione del saggio. La concentrazione iniziale della coltura algale è di $1 \cdot 10^3$ cellule/mL.

7.3.6 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 frigotermostato a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 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 al giorno). Dopo 96 ore in ogni beuta verrà misurata la crescita algale mediante uno dei sistemi riportati nel punto 4. Il risultato rappresenta la CA96 rilevata alla 96° ora. Da ogni beuta si ottiene un valore di CA96, da ogni gruppo di beute (3 repliche) si ottiene il valore medio della CA96 e gli altri parametri statistici previsti nel punto 5.2.

7.3.7 Uso dei fogli di lavoro

Tutti i dati relativi al saggio di tossicità algale, le eventuali note e quant'altro si renda necessario eseguire e registrare nel corso del saggio devono essere riportati in un foglio di lavoro analogo a quello utilizzato per lo stesso campione nel saggio algale rivolto alla valutazione dello stato trofico (riportato nel punto 7.2.7, e in Appendice n.8).

8 Valutazione dei dati

I dati relativi alle misure della MCA e della CA96, opportunamente registrati nel foglio di lavoro, costituiscono la base per la loro successiva valutazione.

8.1 Valutazione dei dati provenienti dal saggio per lo stato trofico (vedere punto 7.2).

Le concentrazioni delle aggiunte sono quelle indicate nel punto 7.2.1. La concentrazione del fosforo (0,05 mg/L o superiore) è stata scelta per

assicurare un eccesso di fosforo all'interno del campione con la scopo di raggiungere la limitazione da azoto. La concentrazione di azoto (1,10 mg/L o superiore) è stata scelta per assicurare un eccesso di azoto e favorire una crescita limitata dal fosforo. L'aggiunta simultanea di azoto e fosforo produce una crescita algale limitata dal fosforo. Infatti i due principali nutrienti sono aggiunti in rapporto N/P = 22 che indica una limitazione da fosforo.

8.1.1 Valutazione del fattore limitante

L'individuazione del fattore limitante si basa sul confronto statistico tra il valore medio della MCA registrata nel controllo senza aggiunte (SA) rispetto al valore medio della MCA registrata per ogni aggiunta; la MCA viene espressa mediante il valore della densità cellulare (numero di cellule·10³/mL).

Per facilitare la valutazione dei dati fare riferimento alla tabella 6.

Tab. 6. Esempi di crescita algale in base alle aggiunte (i valori della crescita algale sono espressi in numero di cellule·10³/mL)

Aggiunta	Limitazione da fosforo		Limitazione da azoto	Limitazione da azoto e fosforo	Limitazione da altri nutrienti	Presenza di effetto inibente
	caso A	caso B				
senza aggiunte	100	100	200	200	100	40
fosforo	320	320	202	198	98	46
azoto	98	98	520	202	100	38
azoto e fosforo	540	318	650	550	102	42
mezzo completo	540	325	660	554	540	46

8.1.2 Limitazione da fosforo

In presenza di limitazione da fosforo si rileva, nell'aggiunta di fosforo singola e in combinazione con gli altri nutrienti, una crescita superiore (in termini statisticamente significativi) rispetto al controllo senza aggiunte.

8.1.2.1 Caso A , limitazione primaria da fosforo e secondaria da azoto

La differenza tra la crescita nell'aggiunta singola di fosforo e nell'aggiunta combinata di azoto e fosforo indica che l'addizione di fosforo ha determinato nella prima una limitazione da parte dell'azoto; nella secon-

da, invece, l'addizione combinata dei due elementi ha consentito una crescita algale proporzionale alla quantità totale di fosforo. In questo caso l'azoto si comporta come limitante secondario.

8.1.2.2 Caso B, limitazione esclusiva da fosforo

La differenza tra la crescita nell'aggiunta singola di fosforo e nell'aggiunta combinata di azoto e fosforo risulta non statisticamente significativa; ciò significa che la limitazione da parte del fosforo è molto accentuata e rimane tale anche in seguito all'aggiunta di questo elemento.

8.1.3 Limitazione da azoto

In presenza di limitazione da azoto si rileva, nell'aggiunta di azoto singola e in combinazione con gli altri nutrienti, una crescita superiore (in termini statisticamente significativi) rispetto al controllo senza aggiunte. La differenza tra la crescita nell'aggiunta singola di azoto e nell'aggiunta combinata di azoto e fosforo indica che l'addizione di azoto ha determinato nella prima una limitazione da parte del fosforo; nella seconda l'addizione combinata dei due elementi ha consentito una crescita algale proporzionale alla quantità totale di fosforo. In questo caso il fosforo si comporta come limitante secondario. La crescita algale nei corpi idrici è, di regola, limitata dal fosforo; nei casi in cui è l'azoto il fattore limitante primario il fosforo, di regola, si comporta come limitante secondario. Pertanto una limitazione esclusiva da parte dell'azoto successiva all'aggiunta di azoto è molto rara.

8.1.4 Limitazione contemporanea da azoto e fosforo

La limitazione della crescita algale da parte dell'azoto e del fosforo contemporaneamente si può verificare in acque eutrofiche dove la concentrazione del fosforo ha subito un incremento tale da condurre il rapporto N/P a valori prossimi a 6. La crescita dovuta alle singole addizioni di fosforo e azoto non differisce in misura significativa dalla crescita registrata nel controllo senza aggiunte. Un incremento significativo è invece rilevabile nell'aggiunta combinata di azoto e fosforo e nell'aggiunta del mezzo completo.

8.1.5 Limitazione da parte di altri nutrienti

La limitazione della crescita da parte di altri nutrienti (ferro e micronutrienti) è molto rara e si evidenzia con un incremento significativo della

crescita nell'aggiunta di mezzo completo rispetto al controllo senza aggiunte ed alle altre aggiunte a base di fosforo e azoto.

8.1.6 Presenza di fattori inibenti la crescita algale

La presenza di sostanze tossiche all'interno del campione inibisce la crescita algale nel controllo senza aggiunte e nelle aggiunte singole o combinate delle sostanze nutrienti. In tal caso l'effetto tossico si deve evidenziare anche nel saggio di tossicità, nel quale la crescita algale (CA96) nel campione deve risultare inferiore rispetto alla crescita rilevata nel controllo. In tal caso è necessario ripetere il saggio di tossicità algale nel campione in esame secondo la procedura riportata nel Cap. III.2 al fine di determinare l'EC50-96h, le Unità Tossiche, il valore della NOEC e della LOEC.

8.1.7 Rapporto ottimale di assimilazione N/P

Il rapporto ottimale di assimilazione in *Dunaliella tertiolecta* dei due nutrienti principali (azoto e fosforo) risulta compreso tra 6,3 e 6,4 (vedere Appendice n.11); Chiaudani e Vighi indicano tale rapporto compreso tra 5,9 e 6,5 (IRSA, 1978).

Il rapporto N/P potrebbe essere utilizzato come indicatore del fattore limitante nelle acque marine costiere e lagunari. Nei corpi idrici dove viene individuato un rapporto N/P superiore a 6,5 il fosforo potrebbe essere considerato come il fattore limitante; nei corpi idrici dove viene invece individuato un rapporto N/P inferiore a 5,9 dovrebbe essere considerato limitante l'azoto.

Una procedura rivolta all'individuazione del fattore limitante basata unicamente sulla determinazione chimica della concentrazione dell'ortofosfato e dell'azoto totale inorganico ($\text{NH}_4 + \text{NO}_2 + \text{NO}_3$) e sul conseguente calcolo del rapporto N/P è sconsigliata. Essa, infatti ha scarse capacità predittive sulla potenziale crescita algale la quale risulta influenzata da altri importanti parametri quali, ad esempio, la presenza di nutrienti in forma organica biodisponibile, l'effetto di altri elementi macro e micronutrienti, la presenza di fattori inibenti. Soltanto il saggio biologico, che rappresenta una sommatoria di tutti i fattori in grado di esercitare il proprio effetto sulla crescita algale, è in grado di individuare il fattore limitante.

8.2 Determinazione della quantità biodisponibile dei principali nutrienti limitanti la crescita algale.

Come già indicato nel punto 8.1.7 la quantità di nutrienti biodisponibile può non coincidere con la rispettiva quantità determinata per via chimica.

Utilizzando il valore di MCA espresso come peso secco di biomassa prodotta ($\mu\text{g/L}$ peso secco) e il valore della biomassa prodotta da un quantitativo unitario di nutriente (Fattore di Produzione di Biomassa, espresso come $\mu\text{g/L}$ peso secco) è possibile calcolare la quantità di nutriente biodisponibile (vedere punti 8.2.2 e 8.2.3).

8.2.1 Fattore di Produzione di Biomassa (FPB)

Il Fattore di Produzione di Biomassa (FPB) si ricava dal peso secco della biomassa algale (Q) espressa come $\mu\text{g/L}$ prodotta da 1 $\mu\text{g/L}$ di nutriente (P o N).

$$\frac{Q (\mu / L)}{\text{Conc. Nutriente } (\mu / L)} = \text{FPB}$$

La produzione di biomassa algale (espressa come $\mu\text{g/L}$ di peso secco) per quantità unitaria di nutriente (espressa come $\mu\text{g/L}$) può risultare tuttavia diversa a seconda del laboratorio dove è stata eseguita la determinazione. In tabella 7 è presentato un esempio della variabilità dei dati disponibili.

Tab.7 - Produzione di biomassa algale (espressa come $\mu\text{g/L}$ di peso secco) per quantità unitaria di nutriente (espressa come $\mu\text{g/L}$). Terreno preparato con acqua di mare naturale .

	IRSA, 1978 $\mu\text{g/L}$ p.s.	EPA, 1974 $\mu\text{g/L}$ p.s.	ARPAT Piombino $\mu\text{g/L}$ p.s.
1 $\mu\text{g/L}$ P	270	1129	606
1 $\mu\text{g/L}$ N		31	60

Considerata la variabilità del fattore di produzione di biomassa ogni laboratorio dovrà determinare il proprio fattore. In via preliminare si consiglia di utilizzare i valori dei Fattori di Produzione di Biomassa determi-

nati presso le strutture ARPAT le quali hanno proceduto alla determinazione dei Fattori stessi adottando le condizioni sperimentali indicate dal presente manuale.

- Fattore di Produzione di Biomassa per il fosforo = **606** (ARPAT Piombino);

- Fattore di Produzione di Biomassa per l'azoto = **60** (ARPAT Piombino).

In Appendice n.5 è riportata la determinazione del FPB relativamente al fosforo; in Appendice n.6 è riportata la determinazione del FPB relativamente all'azoto.

8.2.2 Calcolo dell'azoto biodisponibile

L'azoto biodisponibile si ricava utilizzando il valore della MCA ottenuto dalle repliche contenenti l'aggiunta di fosforo (0,05 mg/L di P) dove la crescita algale è proporzionale alla quantità di azoto. Verificare che l'azoto si comporti effettivamente da limitante secondario tenendo presente anche il risultato della crescita algale nell'aggiunta contemporanea di azoto e fosforo che deve essere superiore alla crescita registrata nella aggiunta del fosforo (punto 8.1.1., tabella 6, caso A).

$$\frac{\text{MCA media } (\mu\text{g p.s./L})}{\text{ottenuta nell'aggiunta di fosforo}} = \text{azoto biodisponibile } (\mu\text{g/L})$$

60

8.2.3 Calcolo del fosforo biodisponibile.

Il fosforo biodisponibile si ricava utilizzando il valore della MCA ottenuto dalle repliche contenenti l'aggiunta di azoto (1,00 mg/L di N) dove la crescita algale è proporzionale alla quantità di fosforo.

$$\frac{\text{MCA media } (\mu\text{g/L})}{\text{ottenuta nell'aggiunta di azoto}} = \text{fosforo biodisponibile } (\mu\text{g/L})$$

606

8.2.4 Calcolo della percentuale di nutriente biodisponibile

Il valore di nutriente biodisponibile calcolato mediante le formule riportate nei paragrafi 8.2.2 e 8.2.3 può essere usato per calcolare la percentuale

di azoto e fosforo biodisponibile rispetto ai valori di azoto totale Kjeldahl e fosforo totale rilevati nel campione.

8.3 Valutazione dello stato trofico.

Il saggio algale è indispensabile per la valutazione dello stato trofico di un'acqua superficiale.

In assenza di un sistema di classificazione dei corpi idrici in categorie trofiche in base alla biodisponibilità dei nutrienti principali l'IRSA propone, a fini comparativi, il seguente sistema di classificazione delle acque marine costiere:

	Crescita <i>D. tertiolecta</i>
Trofia naturale	< 5 cell·10 ³ /mL
lieve eutrofizzazione	< 10 cell·10 ³ /mL
media eutrofizzazione	< 20 cell·10 ³ /mL
elevata eutrofizzazione	> 20 cell·10 ³ /mL

IRSA, 1978 (mod.)

III - Saggio algale per la valutazione della tossicità delle acque di scarico.

1 Principi generali del metodo

Le alterazioni della comunità fitoplanctonica causate da effetti tossici o eutrofizzanti possono modificare la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema del quale le alghe, in qualità di produttori primari, costituiscono una componente fondamentale. (Mosser et al., 1972). Da ciò deriva l'importanza di includere il saggio algale nelle batterie di test per la valutazione degli effetti biologici esercitati da composti chimici o acque di scarico. A tal fine il saggio di inibizione della crescita algale fa parte della serie di test ecotossicologici raccomandati dall'OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) e, in ambito CEE, è richiesto per la valutazione delle nuove sostanze chimiche prodotte in quantità superiori alle 100 t/anno (Nyholm e Kallqvist, 1989).

Il saggio di tossicità algale, condotto su numerose generazioni di una popolazione di organismi unicellulari, può essere definito come test cronico, sub-letale, a breve termine, di tipo statico.

Tradizionalmente il saggio algale è stato prevalentemente impiegato per la valutazione dello stato trofico dei corpi idrici; come test di tossicità ha avuto una utilizzazione più limitata e, a tal fine, si avverte l'esigenza di una standardizzazione del piano sperimentale comprendente anche una valutazione della variabilità del metodo e una valutazione della sensibilità legata alla scelta della specie algale da utilizzare.

La maggiore sensibilità del test algale rispetto agli altri test di tossicità a breve termine, indicata da Nyholm e Kallqvist (1989) è stata anche rilevata nell'attività di controllo tossicologico degli scarichi industriali ad elevata componente salina da Sbrilli et al. (1995). Ciò è in buon accordo con quanto riportato da Walsh e Merrill (1984) i quali sostengono quanto segue: benché il saggio algale risulti meno sensibile rispetto a quello con inverte-

brati o pesci nel determinare la tossicità di singole sostanze organiche, le alghe monocellulari dimostrano maggiore capacità, rispetto ad altri organismi, di rilevare la tossicità di effluenti complessi. La maggiore sensibilità del saggio algale, relativamente alle acque di scarico, rispetto ad altri test microbiologici, è stata confermata anche da altri Autori (Joubert, 1981; Van Coillie et al, 1981)

2 Utilizzazioni ed informazioni ottenibili con il saggio di tossicità algale per le acque di scarico

2.1 Uso del saggio algale

Il saggio di tossicità algale può essere utilizzato per i seguenti scopi

1. fase istruttoria di autorizzazione dello scarico;
2. fase dei controlli delle acque di scarico;
3. controllo della tossicità degli scarichi parziali all'interno dei cicli produttivi;
4. valutazione della tossicità di sostanze chimiche pure o di miscele di sostanze chimiche;
5. valutazione dell'effetto di materiali o prodotti specifici sulla crescita algale;
6. valutazione dell'efficacia di modifiche ai sistemi di trattamento reflui;
7. valutazione dell'effetto tossico rilevato nei corpi idrici superficiali;
8. valutazione dell'effetto tossico dei percolati di discarica;
9. valutazione della presenza di sostanze fitotossiche nelle acque sotterranee;
10. valutazione della presenza di eventuali sostanze tossiche nelle acque condottate o comunque destinate all'uso potabile.

2.2 Informazioni ottenibili mediante il saggio algale

Il saggio di tossicità algale fornisce le seguenti informazioni

1. individuazione della presenza di effetto tossico;
2. individuazione della presenza di effetto eutrofizzante;
3. determinazione dei parametri necessari per la quantificazione dell'effetto tossico;

3 Prelievo, trasporto, preparazione e conservazione dei campioni

3.1 Il prelievo

Le attività di campionamento delle acque di scarico devono essere eseguite in conformità alle indicazioni riportate nelle metodiche IRSA-CNR (IRSA-CNR, 1977); tuttavia è opportuno precisare alcuni aspetti connessi al prelievo di campioni per i saggi di tossicità.

Tenendo presente che le acque di scarico hanno, di solito, una portata variabile nel tempo, si deve considerare se sia più appropriato prelevare un campione istantaneo oppure un campione composito e raccolto in un intervallo di tempo la cui lunghezza viene lasciata alla discrezione del personale addetto al prelievo.

Il prelievo istantaneo permette di evidenziare i cosiddetti "picchi" di tossicità, i quali possono saltuariamente verificarsi negli scarichi la cui composizione non è costante nel tempo; in questi casi il prelievo composito maschererebbe tale tossicità fornendo un risultato mediato. D'altra parte il prelievo istantaneo, in quanto tale, difficilmente potrebbe, da solo, definire completamente la qualità di uno scarico. L'Agenzia americana per l'ambiente esamina vantaggi e svantaggi delle due modalità di campionamento, senza peraltro proporre una scelta precisa (EPA, 1991a).

In accordo con quanto riportato da Nemetz e Drechsler (1978) e da Grothe et al. (1990) è preferibile effettuare, ove possibile, un certo numero di prelievi istantanei per un ciclo di almeno 24 ore.

Per il campionamento devono essere utilizzati contenitori da 1 litro in polietilene o in vetro; i contenitori riciclabili devono essere soggetti al lavaggio della vetreria come riportato al punto 3.4 del Cap. I. I contenitori devono essere completamente riempiti avendo cura di evitare spazi d'aria al loro interno. Il trasporto deve avvenire in ambiente privo di luce e a temperatura di frigorifero (4-6°C).

3.2 Preparazione del campione

È necessario rimuovere le alghe "indigene" ed altri organismi contaminanti presenti nel campione per permettere la crescita di una coltura pura dell'alga utilizzata nel saggio. E' inoltre necessario rimuovere il particolare presente nel campione che potrebbe interferire nella misura della crescita algale eseguita mediante un contatore di particelle. A tal fine il campione, appena giunto in laboratorio, deve essere sottoposto a filtrazio-

ne con membrane da $0,45\ \mu\text{m}$. Nel campione in arrivo al laboratorio devono inoltre essere determinati i parametri chimico-fisici indicati nel Cap. III.1, paragrafo 6.

3.3 Conservazione del campione

Il periodo di conservazione può determinare modifiche non prevedibili nel campione. Per questo motivo è opportuno seguire le seguenti indicazioni:

- a) ridurre quanto possibile i tempi di conservazione programmando i prelievi in base alle capacità ricettive del laboratorio;
- b) filtrare il campione appena giunto in laboratorio;
- c) conservare il campione filtrato a 4°C per un periodo massimo di 72 h, al buio, in contenitore sterile, evitando di lasciare spazi d'aria all'interno del contenitore. Se è necessario prolungare il tempo di conservazione è opportuno congelare il campione ad una temperatura uguale o inferiore ai -20°C .

3.4 Modifiche del campione

È importante tenere presente che le operazioni di preparazione e conservazione possono comportare le seguenti modifiche del campione:

- a) la filtrazione comporta l'esclusione degli effetti sulla crescita algale esercitati da eventuali sostanze nutrienti o tossiche adsorbite al particolato in sospensione;
- b) la tossicità può diminuire con il prolungarsi della conservazione e con l'incremento della temperatura di conservazione (Van Coillie, 1983);
- c) la tossicità può diminuire con il congelamento del campione.

4 Strumentazione ed accessori di laboratorio

4.1 Prelievo e preparazione del campione

- 1) contenitori in polietilene da 1000 mL;
- 2) contenitori in vetro e tappo in plastica sterilizzabile da 500 mL e 1000 mL;
- 3) apparato filtrante in vetro o policarbonato sterilizzabile con capacità di 750 ml per membrane da 47 mm di diametro;
- 4) pompa da vuoto provvista di regolatore di pressione;

- 5) tubo al silicone o tipo Tygon per vuoto adatto per membrane filtranti e raccordi in plastica innesto rapido;
- 6) matracci per filtrazione sottovuoto da anteporre alla pompa da vuoto;
- 7) membrane filtranti sterili in acetato di cellulosa con pori da 0,45 e da 0,22 μm e con diametro di 47 mm;
- 8) frigorifero con temperatura da 4 a 6 °C;
- 9) congelatore con temperatura di -20°C o inferiore;
- 10) autoclave;
- 11) salinometro o conducimetro da banco con compensazione automatica della temperatura o sistema chimico di titolazione dei cloruri mediante il metodo argentometrico;
- 12) pH-metro con compensazione automatica della temperatura;
- 13) autocampionatore automatico e programmabile con possibilità di raccolta di campioni almeno su base oraria in contenitori in vetro o polietilene con capacità non inferiore ai 500 mL

4.2 Preparazione, incubazione e misura della crescita delle colture algali

- 1) beute in vetro borosilicato Pyrex tipo Erlenmayer da 100, 250 ml per le colture algali;
- 2) beute e bicchieri (beakers) in vetro borosilicato Pyrex con capacità di 50, 100, 500, 1000, 2000 mL;
- 3) cilindri graduati in vetro con piede e becco da 25, 50, 100, 250 mL, 1000 mL, 2000 mL;
- 4) cilindri graduati in vetro da 100 ml con piede e tappo con raccordo conico in vetro smerigliato oppure in plastica sterilizzabile in autoclave;
- 5) palloni e matracci tarati con varie capacità da 50, 100, 250, 500, 1000 mL;
- 6) cella climatica o frigotermostato con temperatura regolabile da 10 a 40°C, precisione $\pm 1^\circ\text{C}$, con sistema di illuminazione idoneo alla crescita algale e in grado di illuminare uniformemente i piani dove sono posizionate le beute contenenti le colture algali;
- 7) lampade fluorescenti tipo "cool white" in grado di produrre un'intensità luminosa superiore a 4300 lux;
- 8) lux-metro;
- 9) temporizzatori;
- 10) bilancia analitica;
- 11) microscopio ottico per batteriologia;

- 12) camere di Burkner per il conteggio delle cellule algali al microscopio;
- 13) contaparticelle automatico con capillare da 100 μm , con soglia regolabile e con sistema di misura del Volume Globulare Medio;
- 14) dispensatore di liquidi a volume regolabile;
- 15) n.l stufa a secco con temperatura regolabile, disposta per lavorare a 70 e a 120°C;
- 16) centrifuga;
- 17) cappa a flusso laminare;
- 18) personal computer per l'elaborazione statistica dei dati;
- 19) pompa a membrana per aerazione (tipo pompa per acquari).

III.1 Utilizzazione di *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocellis subcapitata*) nel saggio algale per la valutazione della tossicità delle acque di scarico.

1 La specie algale

Selenastrum capricornutum Printz (recentemente rinominata *Raphidocellis subcapitata*) è un'alga verde monocellulare (cloroficee) 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. L'uso di *Raphidocellis subcapitata* nel saggio algale per le acque di scarico viene proposto in numerose pubblicazioni e metodi ufficiali (Joubert, 1983; EPA, 1978; EPA, 1985; APHA-AWWA-WEF, 1992).

L'alga è disponibile presso il Laboratorio I.R.S.A. di Idrobiologia Applicata di Brughiero (Milano).

2 Terreno di coltura per il clone algale

2.1 Metodi per la preparazione del terreno

Sono attualmente a disposizione numerosi metodi di preparazione del terreno di mantenimento delle colture di *Raphidocellis subcapitata*,

- metodo di Joubert (1983);
- metodo Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1992)
- metodo ASTM (1986);
- metodo EPA (1978), riportato anche in EPA (1985);

tali metodi differiscono essenzialmente nel numero di soluzioni utili alla preparazione del mezzo finale di crescita. I sali utilizzati e le loro concentrazioni finali risultano essere uguali in tutti i metodi considerati.

Si ritiene opportuno utilizzare il terreno di coltura indicato nella metodologia EPA, 1978.

2.2 Preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale

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

- | | | | |
|---|---|--------|-----------|
| 1 | NaNO ₃ | 12,750 | g/ 500 mL |
| 2 | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 7,350 | g/ 500 mL |
| 3 | K ₂ HPO ₄ | 0,522 | g/ 500 mL |
| 4 | NaHCO ₃ | 7,500 | g/ 500 mL |
| 5 | SOLUZIONE DEI MICRONUTRIENTI; 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 | | |

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

(*) Relativamente alle soluzioni di ZnCl₂, CoCl₂·6 H₂O, CuCl₂·2H₂O e Na₂MoO₄·2H₂O, 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.

CoCl₂·6 H₂O - 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.

Il cloruro di magnesio e il cloruro di calcio, benché dal punto di vista quantitativo debbano ritenersi dei macronutrienti, per motivi di praticità vengono inseriti all'interno della soluzione dei micronutrienti.

Filtrare le soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5 su membrana da $0,45\ \mu\text{m}$ in condizioni asettiche, mediante filtri sterili e conservare al buio, a $4-6^\circ\text{C}$, in contenitori sterili, per un tempo massimo di 3 mesi.

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

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

Tab.1: Macronutrienti: concentrazione finale nel terreno di coltura come sali e come elementi

sali	conc. mg/L	elementi	conc. mg/L
NaNO_3	25,500	N	4,200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,700	Mg	2,904
K_2HPO_4	1,044	Ca	1,202
NaHCO_3	15,000	S	1,911
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12,164	P	0,186
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\ \text{H}_2\text{O}$	4,410	Na	11,001
		K	0,469
		C	2,143

Tab. 2: Micronutrienti: concentrazione finale nel terreno di coltura come sali e come elementi

sali	conc. $\mu\text{g/L}$	elementi	conc. $\mu\text{g/L}$
H_3BO_3	185,520	B	32,460
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415,610	Mn	115,374
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	160,000	Fe	33,051
ZnCl_2	3,271	Zn	1,570
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,428	Co	0,354
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,012	Cu	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,260	Mo	2,878
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	300,000		

2.3 Preparazione del terreno di mantenimento in fase solida

Aggiungere a caldo al terreno di mantenimento (preparato come riportato al punto 2.2) 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 pyrex 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 $4-6^\circ\text{C}$, al buio, per un tempo massimo di 1 mese.

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

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

1	NaNO_3	12,750	g/ 500 mL
2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350	g/ 500 mL
3	K_2HPO_4	0,522	g/ 500 mL
4	NaHCO_3	7,500	g/ 500 mL

5a **SOLUZIONE DEI MICRONUTRIENTI;** 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

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	6,082	g/ 500 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	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 (*)

(*) Vedere preparazione della soluzione 5 al punto 2.1.

Essendo le soluzioni 1, 2, 3 e 4 uguali a quelle riportate nel punto 2.2, per la preparazione del terreno per il saggio di tossicità è possibile utilizzare quest'ultime.

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

3 Mantenimento del clone algale

3.1 Terreno di mantenimento

Utilizzare il terreno indicato al punto 2.2

3.2 Vetreria per le colture algali

Per l'allestimento delle colture algali si raccomanda l'uso di beute in vetro borosilicato di tipo Erlenmayer lavate come riportato nel punto 3 del Cap. I. 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%.

3.3 Condizioni di incubazione

Le condizioni di incubazione sono le seguenti: temperatura 24 \pm 1°C;

illuminazione con lampade fluorescenti tipo "cool white" con intensità luminosa superiore a 4300 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 frigotermostato dove sono disposte le colture algali non presentano ricambi d'aria naturali, è consigliabile immettere aria mediante una pompa a membrana da acquari.

3.4 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 (lavata e sterilizzata come riportato al punto 3 del Cap. I) contenente una quantità idonea di terreno di coltura (50 mL) preparato come riportato al punto 2.2. La coltura deve essere mantenuta in frigotermostato 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 tale di avere sempre a disposizione due cloni algali. I trapianti ogni sette giorni garantiscono la disponibilità di cellule algali in fase esponenziale di crescita.

3.5 Colture algali su terreno agarizzato

E' conveniente allestire colture algali su terreno agarizzato le quali vanno a costituire 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 al punto 2.3. A partire dalla vecchia coltura su terreno liquido allestire inizialmente una coltura algale di isolamento su piastra incubando a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e in condizione di illuminazione continua; successivamente, a partire da una colonia algale isolata, predisporre una coltura di mantenimento per spandimento 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 per spandimento su un nuovo tubo con terreno agarizzato. È possibile conservare le colture di mantenimento anche a temperatura di 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.

3.6 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.

3.6.1 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 $0,45 \mu\text{m}$ e disporre in contenitore sterile. Tale soluzione può essere mantenuta per un tempo massimo di un mese a $4-6^\circ\text{C}$. In tal caso, la soluzione proveniente dal frigorifero, prima di essere utilizzata, deve essere riportata ad una temperatura di circa 20°C .

3.6.2 Lavaggio della sospensione algale

Prelevare in condizioni asettiche circa 10 mL della coltura algale in fase esponenziale, disporre in provetta da centrifuga sterile e tappata, centrifu-

gare a 1500-2000 rpm (300-600 g) per 5 minuti. Aspirare il sovranatante con pipetta pasteur di plastica 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.

3.6.3 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 (vedere punto 4.2).

3.6.4 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.

$$\frac{\begin{array}{c} \text{(A)} \\ \text{Volume totale} \\ \text{inoculo} \\ \text{(mL)} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{(B)} \\ \text{Densità inoculo} \\ 100 \cdot 10^3 \\ \text{cellule/mL} \end{array}}{\begin{array}{c} \text{(C)} \\ \text{Densità della sosp. algale} \\ \text{cellule/mL} \end{array}} = \begin{array}{c} \text{(D)} \\ \text{Volume della sosp. algale} \\ \text{da prelevare per l'inoculo} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{(A)} \\ \text{Volume totale} \\ \text{Inoculo (mL)} \end{array} = \begin{array}{c} \text{(E)} \\ \text{n. beute previste} \\ \text{per il saggio} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{(F)} \\ 0,25 \text{ (volume dell'inoculo)} \\ \text{(mL)} \end{array}$$

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).

3.6.5 Distribuzione dell'inoculo nelle beute del saggio

In ogni beuta del saggio deve essere aggiunto 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.

4 Sistemi di misura della crescita algale

4.1 Crescita Algale alla 96° ora (CA96)

Il parametro utilizzato per descrivere la crescita algale è la crescita algale alla 96° ora di incubazione (CA96). La CA96 rappresenta, in pratica, la misura della Massima Velocità di Crescita (MVC) in rapporto ad un periodo di 96 ore.

Per la misura della CA96 esprimere la crescita algale come densità cellulare (numero di cellule $\cdot 10^3$ /mL).

Un confronto tra alcuni sistemi di misura della crescita algale è riportato in appendice n. 4.

4.2 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 (Appendice n.4).

4.2.1 Conteggio cellulare mediante contaglobuli elettronico

Disporre di una soluzione elettrolitica costituita da NaCl 1% filtrata su membrane da $0,22 \mu\text{m}$ (si suggerisce di prepararne 2 L alla volta utilizzando NaCl AR-grade 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 fun-

zionamento 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 microscopico).

4.2.2 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 (Pasquinelli, 1978).

Allo scopo possono essere utilizzate le camere di Burkler predisposte per il conteggio degli elementi figurati del sangue. Il reticolo della camera di Burkler 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 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·10³/mL. Determinazioni più precise possono essere ottenute da un valore medio di cellule conteggiate su un numero maggiore di quadrati grandi.

4.3 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 in vitro, mediante misure spettrofotometriche o fluorimetriche, o in vivo, mediante misure fluorimetriche; si ritiene opportuno segnalare solo quest'ultimo sistema di misura il quale 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 (Gaggi et al., 1995). Eseguire la lettura del bianco con acqua distillata; agitare accuratamente la coltura algale e deporne circa 5 mL all'interno di una cuvetta da fluorimetria in vetro o plastica; eseguire rapidamente la lettura e registrare il dato strumentale; confrontare i risultati ottenuti con una retta di taratura effettuata con una soluzione di riferimento di clorofilla-a. Mediante il fattore FCD è possibile convertire i dati espressi in clorofilla-a in biomassa o in densità cellulare.

E' 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 nelle acque di scarico possono interferire nella determinazione fluorimetrica (EPA, 1978).

4.4 Determinazione della densità cellulare mediante misura dell'assorbanza

La misura dell'assorbanza deve essere eseguita mediante spettrofotometro o colorimetro con lunghezza d'onda di 670 nm corrispondente al picco di massimo assorbimento della clorofilla nel campo del visibile (vedere appendice n.7).

La misura di assorbanza delle colture algali in corrispondenza della lunghezza d'onda di 670 nm viene proposta anche da Persoone (Persoone, in corso di stampa); Walsh e Bahner (1980) propongono, invece, di leggere

l'assorbanza delle colture algali a 525 nm; in Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1992) vengono indicate le lunghezze d'onda di 600 o 750 nm; Chiaudani e Vighi (1977) indicano una lunghezza d'onda compresa tra 700 e 750 nm.

Per aumentare la sensibilità del sistema di lettura è consigliabile l'utilizzazione di cuvette con percorso ottico di 10 cm.

Eseguire la lettura del bianco con acqua distillata; agitare accuratamente la coltura algale e deporne circa 5 mL all'interno di una cuvetta in vetro o plastica; eseguire rapidamente la lettura e registrare il dato strumentale. Mediante i fattori FCB o FCD è possibile convertire i dati espressi in assorbanza in termini di biomassa o di densità cellulare. La misura spettrofotometrica risulta tuttavia poco sensibile e il metodo viene sconsigliato in EPA, 1978.

5 Analisi statistica dei dati

5.1 Espressione dei dati relativi alla crescita algale e numero di replicati

In riferimento a quanto riportato nel punto 4 si ricorda che la crescita algale viene espressa come densità cellulare (numero di cellule $\cdot 10^3/\text{mL}$).

Ogni diluizione utilizzata nel saggio di tossicità ed 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.

5.2 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 96 ore di incubazione la CA96 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 (vedere in Appendice n.1):

- valore medio (\bar{x})

- deviazione standard (DS)
- devianza (D)
- varianza (V)
- Coefficiente di Variazione (CV)

Confrontare il valore medio della CA96 ottenuto nelle beute contenenti il controllo con il valore medio della CA96 ottenuto nelle beute contenenti le varie diluizioni del campione mediante l'analisi statistica dei dati..

5.2.1 Analisi dei Probits (Probability units)

Presa in esame una risposta di tipo qualitativo all'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 della dose 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 italica o curva sigmoide.

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

Potrebbe essere rilevato che la curva di crescita algale costituisce una risposta di tipo quantitativo alla quale l'analisi dei Probits non dovrebbe essere applicata. A tal proposito è opportuno ricordare che nel metodo EPA (1985), pur tenendo presente che la natura del saggio algale mal si adatta ad una applicazione dell'analisi dei Probits, quest'ultima viene comunque indicata per la determinazione dell'EC50. Si potrebbe inoltre fare presente che la crescita di una popolazione algale si basa pur sempre sul processo di divisione cellulare il quale risponde al principio del "tutto o nulla" che viene richiamato per giustificare il carattere qualitativo dei saggi di tossicità che comportano la misura della concentrazione letale (LC50).

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

L'analisi dei probits (Finney, 1971), consiste nel calcolo della retta dose-risposta mediante il sistema della regressione lineare con un procedimento iterativo per approssimazioni successive. (Lison, 1961).

Calcolata la retta è possibile determinare da quest'ultima il valore della concentrazione efficace mediana (EC50) 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 test 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 (vedere tavola del χ^2 riportata in Appendice n.1).

5.2.2 Calcolo della EC_{50}^{96h} (Concentrazione Efficace mediana determinata alla 96° ora).

La EC_{50}^{96h} evidenzia la concentrazione dello scarico, espressa in termini percentuali, che determina una crescita algale (CA96 registrata alla 96° ora di incubazione) ridotta del 50% rispetto alla crescita riscontrata nel controllo. L'IRSA fornisce un metodo di calcolo della EC_{50}^{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 (vedere appendice n.1) considerando un numero di gradi di libertà pari al numero di osservazioni meno 2 ed un livello di probabilità pari al 5%.

Quando i valori misurati sono tali da non permettere l'applicazione del metodo Probit è possibile utilizzare, per la determinazione della EC_{50}^{96h} , il metodo grafico su carta log-Probit (Frumin et al., 1992 ; Walsh et al., 1987).

5.2.3 Calcolo della NOEC (No Observed Effect Concentration)

La NOEC è la più alta concentrazione del tossico, espressa come percentuale di effluente, a cui gli organismi sono esposti, che non determina un effetto tossico osservabile. Relativamente al saggio algale la NOEC rappresenta la più alta concentrazione di effluente 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 (vedere punto 5.2.5). In alternativa può essere utilizzato anche un test molto meno sensibile quale il test "t" di Student (vedere punto 5.2.6).

5.2.4 Calcolo della LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)

La LOEC è la più bassa concentrazione di tossico, a cui sono esposti gli organismi test, che causa un effetto tossico osservabile.

Nel saggio algale la LOEC si identifica come la più bassa concentrazione di effluente che produce un effetto inibitorio statisticamente significativo rispetto alla crescita misurata nel controllo.

Anche per il calcolo della LOEC è consigliato l'utilizzo della Procedura di Dunnett (vedere punto 5.2.5). In alternativa può essere utilizzato il test "t" di Student (vedere punto 5.2.6).

5.2.5 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 CA96 medio ottenuto nel campione sia uguale al valore medio ottenuto nel controllo;
- l'ipotesi alternativa è che il valore di CA96 medio ottenuto nel campione sia minore o maggiore del valore medio ottenuto nel controllo. Il valore CA96 del campione sarà minore in presenza di effetto tossico oppure sarà maggiore se il campione contiene, in origine, sostanze nutritive capaci di produrre un effetto eutrofizzante;
- livello di significatività $\alpha = 0,05$. Ovvero per $\alpha = 0,05$ 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;
- determinazione della LOEC: il confronto viene fatto considerando le diluizioni via via decrescenti. La diluizione dove viene rifiutata l'ipotesi nulla corrisponde al valore della LOEC;

La procedura di Dunnett esegue una trasformazione dei dati in \arctg^2 ed effettua per ogni media e controllo il Test di Dunnett. Per i calcoli utilizzati nella procedura di Dunnett si rimanda all'appendice n.1 "Procedura di Dunnett".

5.2.6 Test t di Student

Il test "t" di Student viene utilizzato come il test di Dunnett per com-

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

Per il calcolo del valore t di Student vedere Appendice n.1.

5.2.7 Esclusione di dati anomali dal calcolo statistico

Quando all'interno di una serie di repliche si presenta un dato che si discosta dalla media per un valore superiore a 3 o 4 Deviazioni Standard è possibile applicare il seguente test per verificare la possibilità di considerare il dato come anomalo e, quindi, scartarlo (Draper e Smith, 1968).

- a) Ordinare i dati della serie secondo valori crescenti: $x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_n$;
- b) calcolare il valore c mediante la seguente procedura

$$\text{se } x_1 \text{ è il dato anomalo } c = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1}$$

$$\text{se } x_n \text{ è il dato anomalo } c = \frac{x_n - (x_n - 1)}{x_n - x_1}$$

- c) se il valore c calcolato eccede il valore tabulato corrispondente al numero di repliche a disposizione (tab. 3) allora il dato può essere scartato.

Tabella 3. Valori c per l'individuazione dei dati anomali

n	valori c limite	
	$\alpha=0,05$	$\alpha=0,01$
3	0,941	0,988
4	0,765	0,889
5	0,642	0,780
6	0,560	0,698
7	0,507	0,637

- d) in presenza di due dati che sembrano anomali (ad esempio x_1 e x_n oppure x_1 e x_2) il calcolo può essere ripetuto; prima deve essere applicato al valore che si discosta maggiormente dal valore medio.

6 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 (Sbrilli et al., 1995).

- pH;
- Salinità: determinabile direttamente come mg/L; oppure come Conduttività ($\mu\text{S}/\text{cm}$) o come Cloruri (mg/L di Cl^-);
- Cloro attivo totale (mg/L);
- Altri eventuali disinfettanti (Es. acido peracetico);

6.1 pH

Valori di pH inferiori a 6 e superiori a 9 possono provocare un effetto inibente la crescita algale capace di mascherare la tossicità dovuta ad altri composti chimici. In questi casi in un'aliquota di campione il pH viene aggiustato a $7 \pm 0,5$, aggiungendo goccia a goccia acido cloridrico o idrossido di sodio 0,1 N (EPA, 1991). In caso di modifica del campione è necessario condurre un test parallelo anche con il campione non modificato.

6.2 Salinità

Il saggio algale deve essere eseguito tenendo di conto delle condizioni naturali del corpo idrico ricettore con lo scopo di evidenziare eventuali caratteristiche dello scarico capaci di alterare l'ambiente del corpo idrico ricettore. Secondo indicazioni EPA (1991) il valore di salinità che permette di discriminare le acque dolci da quelle salate è pari a 1000 mg/L. È necessario utilizzare organismi di acqua dolce quando la salinità del corpo idrico ricettore risulta inferiore a 1000 mg/L e organismi marini quando quest'ultimo valore viene superato. A partire da un contenuto salino equivalente a 500 mg/L di ioni Cl^- la crescita di *R. subcapitata* dimostra segni di inibizione; in presenza di campioni con contenuto salino compreso da 500 a 1000 mg/L di ioni Cl^- è necessario preparare il controllo con un contenuto salino equivalente al campione. A tal fine aggiungere all'acqua di controllo una equivalente quantità di NaCl. Per la determinazione della salinità mediante la titolazione degli ioni cloruro fare riferimento al metodo IRSA n. 2090 (IRSA, 1994).

6.2.1 Scarichi salini in acque dolci

Il contenuto salino dello scarico deve essere considerato un contaminante non presente nel corpo idrico ricettore. In tal caso è necessario valutare la tossicità dello scarico mediante organismi di acqua dolce.

6.2.2 Scarichi di acque dolci in acque marine o salmastre

Il basso contenuto salino nelle acque di scarico non deve essere considerato come causa di contaminazione. In tal caso è necessario eseguire il saggio algale con organismi marini e modificare la salinità del campione sino a renderla accettabile per tali organismi.

6.3 Cloro attivo totale

Il cloro attivo deve essere inattivato con quantità equivalente di tiosolfato di sodio al fine di evitare la presenza della quantità in eccesso di tiosolfato nel campione. A tal fine è possibile calcolare il volume (espresso in mL) di una soluzione a titolo noto di tiosolfato pentaidrato da aggiungere ad un volume prestabilito del campione in esame mediante la seguente equazione (IRSA, 1996):

$$\text{mL di tiosolfato} = \frac{(\text{mL di campione}) \times F \times (\text{Conc. Cl}_2)}{(\text{Conc. di tiosolfato})}$$

dove:

mL di tiosolfato = mL della soluzione a titolo noto da aggiungere al campione;

F per il tiosolfato anidro = 6,7; F per il tiosolfato pentaidrato = 10,52;

Conc. di Cl_2 = concentrazione del cloro attivo totale presente nel campione espressa in mg/L;

Conc. di tiosolfato = concentrazione di tiosolfato espressa in mg/L.

Il titolo del tiosolfato deve essere controllato ogni 15 giorni.

7 Piano sperimentale

7.1 Piano sperimentale

Il piano sperimentale si basa sulla metodologia EPA (1985), sui lavori di Joubert (1983) e di Elnabarawy e Welter (1984).

Il piano di lavoro è rivolto alla misura della Crescita algale dopo 96 ore di incubazione (CA96); 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.

7.2 Preparazione del campione

Aggiungere a 1000 mL di campione (proveniente dal trattamento previsto nel punto 3.2 del Cap. III) 1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5a descritte nel punto 2.4. Agitare per capovolgimento.

7.3 Preparazione della soluzione di riferimento (controllo)

Aggiungere a 1000 mL di acqua ultrapura, filtrata con membrana da 0,45 μm , (ed eventualmente modificata come riportato nel punto 6.2), 1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5a descritte nel punto 2.4. Agitare per capovolgimento.

7.4 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.

7.5 Preparazione delle diluizioni del campione

Utilizzando la procedura prevista nei punti 7.2, 7.3 e 7.4 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 alte: 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.

7.5.1 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. Quest'ultimo intervallo indicherà le diluizioni da utilizzare nel saggio definitivo.

7.5.2 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%, allora le diluizioni del saggio definitivo saranno 10%; 5%; 1%; 0,5%; 0,1%.

7.6 Distribuzione delle diluizioni del campione e del controllo nelle beute

Diluire il campione arricchito (come riportato nei punti 7.2 o 7.4) con la soluzione di riferimento preparata al punto 7.3. 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 ed il controllo, mediante un cilindro da 25 mL, in 3 sottoaliquote da 25 mL disposte in 3 beute da 100 mL, ciascuna sottoaliquota costituisce una replica.

7.7 Identificazione delle beute

Al termine della distribuzione nelle beute abbiamo 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.

7.8 Aggiunta dell'inoculo

Ad ogni beuta viene aggiunto l'inoculo algale come riportato nel punto 3.6. 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

7.9 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 frigotermostato a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 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).

7.10 Misura della crescita algale

Dopo 96 ore di incubazione in ogni beuta verrà misurata la crescita algale mediante uno dei sistemi riportati nel punto 4. Il risultato rappresenta la crescita algale rilevata alla 96° ora (CA96). Da ogni beuta si ottiene un valore di CA96, da ogni gruppo di beute (3 repliche) si ottiene il valore medio della CA96 e gli altri parametri statistici previsti nel punto 5.2.

7.11 Uso dei fogli di lavoro

Tutti i dati relativi al saggio algale, le eventuali note e quant'altro si renda necessario eseguire e registrare nel corso del saggio devono essere riportati in un foglio di lavoro come quello illustrato in appendice n.9.

8 Controllo di qualità

Il controllo di qualità deve comprendere tutte le operazioni che possono influire sulla qualità del dato. In particolare è opportuno pianificare il controllo dei seguenti punti relativi alla metodologia di saggio algale:

- 1 - procedure di campionamento e trattamento del campione;
- 2 - stato di salute delle colture di mantenimento;
- 3 - taratura dei dispositivi di trasferimento dei liquidi;
- 4 - calibrazione degli strumenti;
- 5 - condizioni di incubazione (temperatura, illuminazione, agitazione);
- 6 - variabilità del dato. Il Coefficiente di Variazione (CV) della CA96 rilevata tra le repliche di una stessa diluizione o del controllo, non deve superare il 15%;
- 7 - valore della MVC nel controllo. Tale valore non deve essere inferiore a $200 \cdot 10^3$ cellule/mL;

8.1 Controllo di precisione, utilizzo delle carte di controllo.

Il controllo di precisione si basa sulla valutazione della variabilità dei valori di $EC50^{96h}$ 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 potas-

sio 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 (EPA, 1991a) riportandovi, ogni volta che viene eseguito un saggio, i seguenti valori:

- valore della $EC50^{96h}$ calcolato nel saggio;
- valore medio ponderale della $EC50^{96h}$ calcolato utilizzando tutti i valori di $EC50^{96h}$ 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 $EC50^{96h}$.

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 ricalcolo dei valori della carta di controllo. Allo stesso tempo i test eseguiti contemporaneamente al test di controllo devono essere ripetuti.

9 Valutazione dei dati

I dati relativi alla misura della CA96, opportunamente registrati nel foglio di lavoro ed elaborati statisticamente così come riportato nel punto 5, costituiscono la base per la loro successiva valutazione.

9.1 Risposta delle colture algali agli effetti biologici esercitati dalle acque di scarico

L'effetto biologico esercitato da un campione di acqua di scarico 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.

9.1.1 Stimolazione della crescita algale

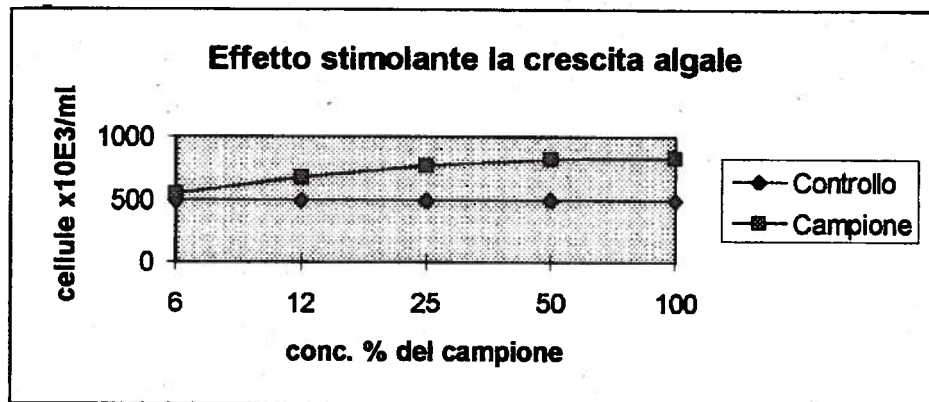
Un campione è capace di stimolare la crescita quando contiene una quantità di sostanze nutrienti tale da determinare un incremento della crescita statisticamente significativo rispetto al controllo. La significatività della differenza può essere valutata mediante il test t di Student (vedere punto 5.2.6) Per ognuna delle diluizioni del campione utilizzate nel saggio è possibile calcolare la percentuale di stimolazione (S%) (EPA, 1985).

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

dove; T = CA96 della diluizione del campione;
C = CA96 del controllo.

La presenza di un effetto stimolante la crescita algale (Fig.1) indica un possibile effetto eutrofizzante dello scarico nei confronti del corpo idrico ricettore. Per una più accurata valutazione della concentrazione di nutrienti biodisponibili nell'acqua di scarico presa in esame è necessario eseguire con quest'ultima il saggio algale per la valutazione dello stato trofico (Cap. II.1)

Fig.1



9.1.2 Inibizione della crescita algale

Un campione presenta effetto tossico quando inibisce la crescita algale in misura statisticamente significativa rispetto al controllo (Fig.2). 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 $EC50^{96h}$. A tal fine utilizzare il sistema di calcolo indicato nel punto 5.2.2. Al fine di rendere più facilmente comprensibile la misura della tossicità è opportuno affiancare alla risposta in termini di $EC50^{96h}$ anche il valore delle Unità Tossiche (UT). Per Unità Tossiche si intende il quoziente risultante dal seguente rapporto

$$UT = 100/EC50^{96h}$$

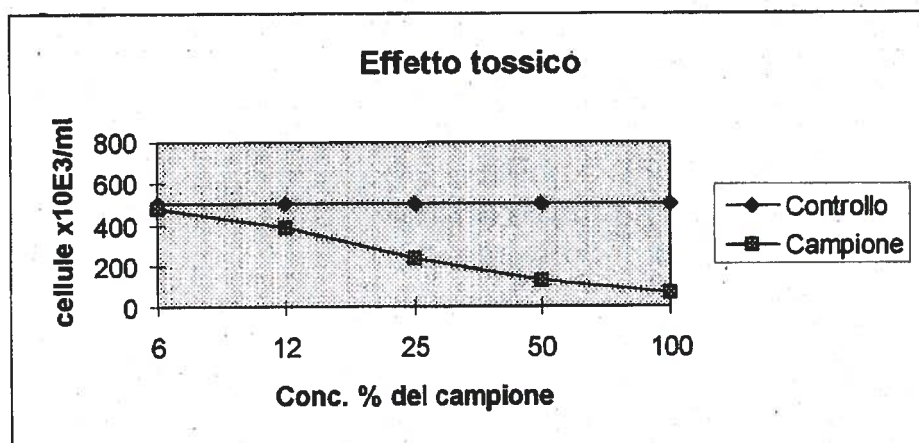
il valore delle UT tende ad aumentare con la tossicità del campione.

Oltre alla determinazione della $EC50^{96h}$ è opportuno considerare anche i valori della NOEC (No Observed Effect Concentration) e della LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) determinati mediante le procedure indicate ai punti 5.2.3 e 5.2.4.

In alcuni casi, in presenza di debole effetto tossico, il valore della

EC50^{96h} non risulta calcolabile mentre è possibile esprimere l'effetto tossico mediante i valori della NOEC e della LOEC.

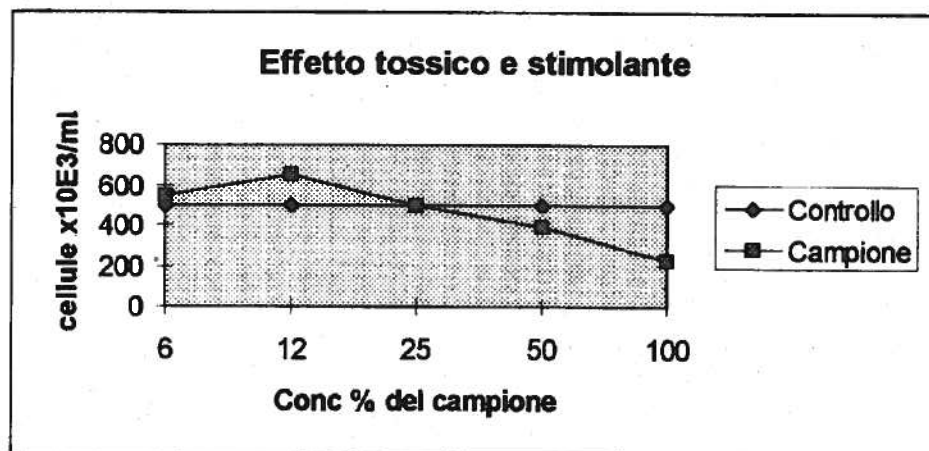
Fig.2



9.1.3 Stimolazione della crescita algale da parte delle alte diluizioni del campione e inibizione della crescita da parte delle basse diluizioni.

Alcuni campioni possono presentare debole effetto tossico congiuntamente alla presenza di elevate concentrazioni di sostanze nutrienti (Fig.3). 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 (Walsh e Bahner, 1980; Walsh et al., 1982; EPA, 1982). In tali casi, per il calcolo della EC50^{96h}, della NOEC e della LOEC è necessario utilizzare soltanto le diluizioni dove si evidenzia l'effetto tossico.

Fig.3



9.2 Scarichi tossici, gestione dei risultati

Il risultato del saggio algale eseguito su uno scarico tossico, espresso mediante i parametri descrittivi della tossicità (EC_{50}^{96h} , Unità Tossiche, NOEC, LOEC) può essere utilizzato per verificare il rispetto di eventuali limiti tabellari oppure, nella fase istruttoria di autorizzazione allo scarico, come base per la previsione di effetto sul corpo idrico ricettore.

9.2.1 Uso di tabelle per il confronto e la classificazione degli scarichi tossici

Sono stati pubblicati numerosi sistemi di classificazione delle acque di scarico basati sul risultato dei saggi di tossicità (Volterra, 1996); a titolo di esempio viene riportato lo schema di classificazione proposto dal Laboratory for biological research in aquatic pollution dell'Università di Ghent (Rep. To Comm. Europ. Com.; Contr. ACE 89/BE 2/D3; 1989.) Tale schema si basa sul confronto delle Unità Tossiche.

non tossico	per TU = 0
debolmente tossico	per TU < 1
tossico	per TU 1 - 10
molto tossico	per TU 11 - 100
estremamente tossico	per TU > 100

È opportuno, tuttavia, tenere presente la notevole variabilità dei dati relativi alla tossicità degli effluenti complessi, dipendente soprattutto dal-

le variazioni in composizione e portata degli scarichi. Di conseguenza appare evidente la scarsa utilità delle tabelle che si propongono di classificare le acque di scarico in base alla loro tossicità ma senza tenere di conto delle rispettive portate.

9.2.2 Determinazione del Carico Tossico Complessivo (CTC)

Il calcolo del Carico Tossico Complessivo (CTC) permette di normalizzare i valori della tossicità, espressi come Unità Tossiche, con i valori della portata dello scarico, espressa in $\text{m}^3/24\text{h}$, rilevata durante le fasi del prelievo. La procedura di determinazione del CTC si basa sulle indicazioni fornite da Walsh e Alexander (1980).

$$\text{CTC (m}^3/24\text{h)} = \text{UT} \times \text{Portata dello Scarico (m}^3/24\text{h)}$$

Per mezzo della determinazione del CTC si introduce la portata dello scarico come una componente rilevante nella sua caratterizzazione tossicologica sottolineando l'inadeguatezza del solo dato di concentrazione (espresso come $\text{EC}_{50}^{96\text{h}}$ o come UT) nel valutare l'impatto di uno scarico sul corpo idrico ricettore, ove non si tenga conto dei volumi scaricati. La valutazione del CTC, normalizzando i dati con la portata, permette di confrontare correttamente la pericolosità di scarichi diversi. (Sbrilli et al., 1995).

Per considerare l'impatto dello scarico sul corpo idrico ricettore è necessario conoscere, oltre al CTC, la capacità di quest'ultimo di diluire lo scarico che vi si immette. Un concetto importante, presente nel Clean Water Act (EPA, 1991), è quello di individuare dei valori di tossicità tollerabili nell'effluente al fine di precludere lo scarico di sostanze tossiche in quantità tossiche. Quest'ultimo potrebbe essere l'obiettivo al quale l'attività di controllo dovrebbe tendere; a tal fine occorrerebbe modificare l'attuale sistema normativo, basato sull'imposizione di limiti tabellari rigidi e uguali su tutto il territorio nazionale, introducendo la possibilità, per le Autorità adibite al controllo, di imporre limiti tabellari variabili basati sulle caratteristiche dello scarico e del corpo idrico ricettore.

III.2 Utilizzazione di *Dunaliella tertiolecta* nel saggio algale per la valutazione della tossicità delle acque di scarico.

1 La specie algale

Dunaliella tertiolecta Butcher è una cloroficea appartenente all'ordine *Volvocales*. E' una specie costituita da organismi monocellulari mobili, non coloniali, di forma ovoidale provvisti di due flagelli; il diametro maggiore è di 10-12 μm . L'uso di *Dunaliella tertiolecta* nel saggio algale per la della tossicità delle acque di scarico viene proposto a margine della Metodologia di saggio algale per lo studio della contaminazione delle acque marine (IRSA, 1978). Altri Autori ne prevedono l'uso specifico nei test di tossicità su sostanze chimiche e acque di scarico (Butler, 1977; Pace et al., 1977; Lustigman et al., 1985; Lustigman et al., 1987; Walsh et al., 1987; Sbrilli et al., 1990; Sbrilli et al., 1995; Pun et al., 1995; Gaggi et al., 1995). Per ulteriori informazioni relative alle procedure di coltivazione e alle caratteristiche di *Dunaliella tertiolecta* si rimanda a quanto riportato da Mc Lachlan (1960) e da Bonin et al. (1986).

L'alga è disponibile presso l'Istituto per lo Sfruttamento delle Lagune - CNR con sede a Lesina (FOGGIA).

2 Terreno di coltura per il clone algale

2.1 Composizione del terreno

Sono attualmente a disposizione diverse composizioni chimiche del terreno di mantenimento;

- metodo M.A.A.P. (Marine Algal Assay Procedure) (EPA, 1974);
- metodo Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1992);
- metodo IRSA (IRSA, 1978);

le composizioni sono riportate in tabella 1.

Tabella 1 - Composizione dei terreni di coltura EPA, IRSA e Standard Methods

Sostanze	M.A.A.P. - EPA		IRSA		St. Methods	
NaNO ₃	25,500	mg/L	25,500	mg/L	25,500	mg/L
K ₂ HPO ₄	1,044	mg/L	1,044	mg/L	1,050	mg/L
Na ₂ EDTA	0,300	mg/L	0,300	mg/L	0,300	mg/L
FeCl ₃	0,096	mg/L	0,096	mg/L	0,073	mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	416,000	μg/L	416,000	μg/L	36,000	μg/L
ZnCl ₂	32,000	μg/L	32,700	μg/L	2,100	μg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,428	μg/L	1,428	μg/L		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,021	μg/L	0,011	μg/L	0,273	μg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,260	μg/L	7,260	μg/L	2,500	μg/L
H ₃ BO ₃	92,800	μg/L				
Tiamina					0,100	mg/L
Biotina					0,500	μg/L
Vitamina B12					0,500	μg/L

Si ritiene opportuno utilizzare il terreno IRSA il quale si presenta con composizione simile al terreno indicato dall'EPA nel M.A.A.P. con alcune modifiche apportate da Chiaudani e Vighi (IRSA, 1978); il terreno è stato utilizzato in alcune esperienze di valutazione dello stato trofico nel Mar Tirreno e nel Mar Ligure e, dal 1988, viene utilizzato nel laboratorio ARPAT di Piombino per il mantenimento del clone di *Dunaliella tertiolecta* e per l'esecuzione dei saggi algali rivolti alla valutazione dello stato trofico ed alla valutazione della tossicità degli scarichi.

Le concentrazioni degli elementi macro e micronutrienti presenti nel terreno IRSA sono indicate in tabella 2.

Tab.2: Concentrazione finale nel terreno di coltura degli elementi macro e micronutrienti

macronutrienti	conc. mg/L	micronutrienti	conc. $\mu\text{g/L}$
N	4,200	Mn	115,374
P	0,186	Zn	15,685
		Fe	33,054
		Co	0,354
		Cu	0,004
		Mo	2,878

Il rapporto N/P risulta pari a 22,6, indice di una limitazione da parte del fosforo.

2.2 Acqua di diluizione per la preparazione del terreno

Per la preparazione del terreno è sconsigliato l'uso di acqua marina artificiale, le miscele saline presenti in commercio possono contenere, a livello di impurezza, quantità di fosfati tali da produrre concentrazioni di fosforo dello stesso ordine di grandezza di quella utilizzata nel terreno (IRSA, 1978).

Preparare il terreno di mantenimento con acqua di mare naturale prelevata al largo e in zona lontana da sorgenti inquinanti. L'acqua, prelevata in contenitori di plastica da 20-25 L, viene filtrata con membrane da $0,45 \mu\text{m}$ e mantenuta a $4-6^\circ\text{C}$, al buio in appositi contenitori in policarbonato sterilizzabile per un periodo di tempo non superiore a tre mesi. Nell'acqua di mare pelagica le concentrazioni dei nutrienti principali risultano di regola inferiori ai limiti di rilevabilità delle metodiche analitiche comunemente utilizzate (tabella 3).

Tab.3 - Principali caratteristiche dell'acqua pelagica del Mar Ligure (IRSA, 1978) mod.

Salinità	‰	≈ 37
PO ₄ (come P)	μg/L	< 1
NO ₃ (come N)	μg/L	< 1
NO ₂ (come N)	μg/L	< 1
NH ₄ (come N)	μg/L	< 1

2.3 Preparazione del terreno per il mantenimento del clone algale

Allestire le seguenti soluzioni concentrate con acqua ultrapura.

1 - NaNO₃12,750 g/ 500 mL

2 - K₂HPO₄0,522 g/ 500 mL

3 - FeCl₃0,048 g/ 500 mL

4 - SOLUZIONE DEI MICRONUTRIENTI; 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

MnCl₂·4H₂O208,000 mg/ 500 mL

ZnCl₂16,350 mg/ 500 mL(*)

CoCl₂·6 H₂O0,714 mg/ 500 mL(*)

CuCl₂·2H₂O0,006 mg/ 500 mL(*)

Na₂MoO₄·2H₂O.....3,630 mg/ 500 mL(*)

Na₂EDTA150,000 mg/ 500 mL

(*) Relativamente alle soluzioni di ZnCl₂, CoCl₂·6 H₂O, CuCl₂·2H₂O e Na₂MoO₄·2H₂O, 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 preparate le seguenti soluzioni di partenza:

ZnCl₂ - pesare 327,1 mg e portare a 100 mL; prelevare 5 mL da portare a 500 mL.

CoCl₂·6 H₂O - 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.

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - pesare 726 mg e portare a 100 mL; prelevare 0,5 mL e portare a 500 mL.

Filtrare le soluzioni 1, 2, 3 e 4 su membrana da $0,45 \mu\text{m}$ in condizioni asettiche, mediante filtri sterili e conservare al buio, a $4-6^\circ\text{C}$, 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 e 4) a 450 mL di acqua di mare filtrata preparata e conservata secondo le indicazioni del punto 2.2, portare a volume finale di 500 mL. L'acqua di mare è un buon sistema tampone, tuttavia controllare ed aggiustare, se necessario, il pH a $8,0 \pm 0,1$ usando HCl o NaOH 0,1N. Filtrare il terreno liquido sottoposto a controllo e correzione del pH su membrana da $0,45 \mu\text{m}$. Il terreno deve essere conservato in contenitori sterili, al buio, a $4-6^\circ\text{C}$, per un tempo massimo di 1 mese.

2.4 Preparazione del terreno di mantenimento in fase solida

Aggiungere a caldo al terreno di mantenimento (preparato come riportato al punto 2.3) 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 pyrex 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 $4-6^\circ\text{C}$, al buio, per un tempo massimo di 1 mese.

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

Allestire le seguenti soluzioni concentrate con acqua ultrapura:

1 - NaNO_3 12,750 g/ 500 mL

2 - K_2HPO_4 0,522 g/ 500 mL

3 - FeCl_3 0,048 g/ 500 mL

4a - SOLUZIONE DEI MICRONUTRIENTI; tale soluzione differisce da quella utilizzata per la preparazione del terreno di mantenimento soltanto per la mancanza di EDTA. 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

MnCl ₂ ·4H ₂ O	208,000 mg/ 500 mL
ZnCl ₂	16,350 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

(*) Vedere preparazione della soluzione 5 al punto 2.3.

Essendo le soluzioni 1, 2, e 3 uguali a quelle riportate nel punto 2.3, per la preparazione del terreno per il saggio di tossicità è possibile utilizzare quest'ultime.

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

3 Mantenimento del clone algale

3.1 Terreno di mantenimento

Utilizzare il terreno indicato al punto 2.3

3.2 Vetreria per le colture algali

Per l'allestimento delle colture algali si raccomanda l'uso di beute in vetro borosilicato di tipo Erlenmayer lavate come riportato nel punto 3 del Cap. I. 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%.

3.3 Condizioni di incubazione

Le condizioni di incubazione sono le seguenti: temperatura 20±1°C; illuminazione con lampade fluorescenti tipo "cool white" con intensità

luminosa superiore a 4300 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 frigotermostato dove sono disposte le colture algali non presentano ricambi d'aria naturali, è consigliabile immettere aria mediante una pompa a membrana da acquari.

3.4 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 (lavata e sterilizzata come riportato al punto 3 del Cap. I) contenente una quantità idonea di terreno di coltura (50 mL) preparato come riportato al punto 2.3. La coltura deve essere mantenuta in frigotermostato 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 tale di avere sempre a disposizione due cloni algali. I trapianti ogni sette giorni garantiscono la disponibilità di cellule algali in fase esponenziale di crescita.

3.5 Colture algali su terreno agarizzato

E' conveniente allestire colture algali su terreno agarizzato le quali vanno a costituire 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 al punto 2.4. A partire dalla vecchia coltura su terreno liquido allestire inizialmente una coltura algale di isolamento su piastra incubando a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e in condizione di illuminazione continua; successivamente, a partire da una colonia isolata, predisporre una coltura di mantenimento per spandimento 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 2 mesi,

quindi rinnovare la coltura seminando per spandimento su un nuovo tubo con terreno agarizzato.

Per ripristinare una coltura di mantenimento a partire da una colonia su terreno agarizzato vedere quanto riportato nel cap. II-2, punto 3.5.

3.6 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 acqua di diluizione (preparata come riportato nel punto 2.2) 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.

3.6.1 Soluzione per il lavaggio delle alghe

Utilizzare l'acqua di diluizione preparata secondo le modalità indicate nel punto 2.2. La soluzione per il lavaggio 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.

3.6.2 Lavaggio della sospensione algale

Prelevare in condizioni asettiche circa 10 mL della coltura algale in fase 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 di plastica sterile e risospendere le cellule algali nell'acqua di diluizione. Ripetere il lavaggio, risospendere di nuovo nella soluzione di bicarbonato e disporre per 24 ore nelle stesse condizioni ambientali della coltura di mantenimento.

3.6.3 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 Burkner (vedere punto 4.2).

3.6.4 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.

$$\frac{\begin{array}{c} \text{(A)} \\ \text{Volume totale} \\ \text{inoculo} \\ \text{(mL)} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{(B)} \\ \text{Densità inoculo} \\ 100 \cdot 10^3 \\ \text{cellule/mL} \end{array}}{\begin{array}{c} \text{(C)} \\ \text{Densità della sosp. algale} \\ \text{cellule/mL} \end{array}} = \begin{array}{c} \text{(D)} \\ \text{Volume della sosp. algale} \\ \text{da prelevare per l'inoculo} \\ \text{(mL)} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{(A)} \\ \text{Volume totale} \end{array} = \begin{array}{c} \text{(E)} \\ \text{n. beute previste} \\ \text{per il saggio} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{(F)} \\ 0,25 \text{ (volume dell'inoculo)} \end{array} \text{ (mL)}$$

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).

3.6.5 Distribuzione dell'inoculo nelle beute del saggio

In ogni beuta del saggio deve essere aggiunto 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.

4 Sistemi di misura della crescita algale

4.1 Crescita Algale alla 96° ora (CA96)

Il parametro utilizzato per descrivere la crescita algale è la crescita algale alla 96° ora di incubazione (CA96). La CA96 rappresenta, in pratica, la misura della Massima Velocità di Crescita (MVC) in rapporto ad un periodo di 96 ore.

Per la misura della CA96 esprimere la crescita algale come densità cellulare (numero di cellule $\cdot 10^3/\text{mL}$).

Un confronto tra alcuni sistemi di misura della crescita algale è riportato in appendice n. 4.

4.2 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 (Appendice n.4).

4.2.1 Conteggio cellulare mediante contaglobuli elettronico

Disporre di una soluzione elettrolitica costituita da NaCl 1% filtrata su membrane da $0,22 \mu\text{m}$ (si suggerisce di prepararne 2 L alla volta utilizzando NaCl AR-grade 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 $100 \mu\text{m}$ 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 *D. tertiolecta* 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.

E buona regola monitorare l'accuratezza della risposta del contaglobuli mediante taratura con soluzioni a densità algale nota e determinata con altra tecnica (ad esempio il conteggio microscopico).

4.2.2 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 (Pasquinelli, 1978).

Allo scopo possono essere utilizzate le camere di Burkner predisposte per il conteggio degli elementi figurati del sangue. Il reticolo della camera di Burkner 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 $\cdot 10^3/\text{mL}$. Determinazioni più precise possono essere ottenute da un valore medio di cellule conteggiate su un numero maggiore di quadrati grandi.

4.3 Determinazione della clorofilla-a mediante fluorescenza

La determinazione della clorofilla presente nelle cellule algali è in gra-

do di fornire una stima del numero di cellule e della biomassa prodotta. La misura della clorofilla-a può essere eseguita in vitro, mediante misure spettrofotometriche o fluorimetriche, o in vivo, mediante misure fluorimetriche; si ritiene opportuno segnalare solo quest'ultimo sistema di misura il quale 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 (Gaggi et al., 1995). 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; confrontare i risultati ottenuti con una retta di taratura effettuata con una soluzione di riferimento di clorofilla-a. Mediante il fattore FCD è possibile convertire i dati espressi in clorofilla-a in biomassa o in densità cellulare.

E' 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 nelle acque di scarico possono interferire nella determinazione fluorimetrica (EPA, 1978).

4.4 Determinazione della densità cellulare mediante misura dell'assorbanza

La misura dell'assorbanza deve essere eseguita mediante spettrofotometro o colorimetro con lunghezza d'onda di 670 nm corrispondente al picco di massimo assorbimento della clorofilla nel campo del visibile (vedere appendice n.7).

La misura di assorbanza delle colture algali in corrispondenza della lunghezza d'onda di 670 nm viene proposta anche da Persoone (Persoone, in corso di stampa); Walsh e Bahner (1980) propongono, invece, di leggere l'assorbanza delle colture algali a 525 nm; in Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1992) vengono indicate le lunghezze d'onda di 600 o 750 nm; Chiaudani e Vighi (1977) indicano una lunghezza d'onda compresa tra 700 e 750 nm.

Per aumentare la sensibilità del sistema di lettura è consigliabile l'utilizzazione di cuvette con percorso ottico di 10 cm.

Eseguire la lettura del bianco con acqua distillata; agitare accuratamente la coltura algale e deporre circa 5 mL all'interno di una cuvetta in vetro o

plastica; eseguire rapidamente la lettura e registrare il dato strumentale. Mediante i fattori FCB o FCD è possibile convertire i dati espressi in assorbanza in termini di biomassa o di densità cellulare. La misura spettrofotometrica risulta tuttavia poco sensibile e il metodo viene sconsigliato in EPA, 1978.

5 Analisi statistica dei dati

5.1 Espressione dei dati relativi alla crescita algale e numero di replicati

In riferimento a quanto riportato nel punto 4 si ricorda che la crescita algale viene espressa come densità cellulare (numero di cellule $\cdot 10^3/\text{mL}$).

Ogni diluizione utilizzata nel saggio di tossicità ed 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.

5.2 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 96 ore di incubazione la CA96 nelle beute che costituiscono il controllo (ovvero acqua di diluizione preparata come riportato nel punto 2.2 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 (vedere in Appendice n.1):

- valore medio (\bar{x})
- deviazione standard (DS)
- devianza (D)
- varianza (V)
- Coefficiente di Variazione (CV)

Confrontare il valore medio della CA96 ottenuto nelle beute contenenti il controllo con il valore medio della CA96 ottenuto nelle beute contenenti le varie diluizioni del campione mediante l'analisi statistica dei dati..

5.2.1 Analisi dei Probits (Probability units)

Preso in esame una risposta di tipo qualitativo all'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 della dose 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 italice o curva sigmoide.

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

Potrebbe essere rilevato che la curva di crescita algale costituisce una risposta di tipo quantitativo alla quale l'analisi dei Probits non dovrebbe essere applicata. A tal proposito è opportuno ricordare che nel metodo EPA (1985), pur tenendo presente che la natura del saggio algale mal si adatta ad una applicazione dell'analisi dei Probits, quest'ultima viene comunque indicata per la determinazione dell'EC50. Si potrebbe inoltre fare presente che la crescita di una popolazione algale si basa pur sempre sul processo di divisione cellulare il quale risponde al principio del "tutto o nulla" che viene richiamato per giustificare il carattere qualitativo dei saggi di tossicità che comportano la misura della concentrazione letale (LC50).

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

L'analisi dei probits (Finney, 1971), consiste nel calcolo della retta dose-risposta mediante il sistema della regressione lineare con un procedimento iterativo per approssimazioni successive. (Lison, 1961).

Calcolata la retta è possibile determinare da quest'ultima il valore della concentrazione efficace mediana (EC50) 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 test 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 (vedere tavola del χ^2 riportata in appendice n.1).

5.2.2 Calcolo della EC50^{96h} (Concentrazione Efficace mediana determinata alla 96° ora).

La EC50^{96h} evidenzia la concentrazione dello scarico, espressa in termini percentuali, che determina una crescita algale (CA96 registrata alla 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 (vedere appendice n.1) considerando un numero di gradi di libertà pari al numero di osservazioni meno 2 ed un livello di probabilità pari al 5%.

Quando i valori misurati sono tali da non permettere l'applicazione del metodo Probit è possibile utilizzare, per la determinazione della EC50^{96h}, il metodo grafico su carta log-Probit (Frumin et al., 1992 ; Walsh et al., 1987).

5.2.3 Calcolo della NOEC (No Observed Effect Concentration)

La NOEC è la più alta concentrazione del tossico, espressa come percentuale di effluente, a cui gli organismi sono esposti, che non determina un effetto tossico osservabile. Relativamente al saggio algale la NOEC rappresenta la più alta concentrazione di effluente 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 (vedere punto 5.2.5). In alternativa può essere utilizzato anche un test molto meno sensibile quale il test "t" di Student (vedere punto 5.2.6).

5.2.4 Calcolo della LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)

La LOEC è la più bassa concentrazione di tossico, a cui sono esposti gli organismi test, che causa un effetto tossico osservabile.

Nel saggio algale la LOEC si identifica come la più bassa concentrazione di effluente che produce un effetto inibitorio statisticamente significativo rispetto alla crescita misurata nel controllo.

Anche per il calcolo della LOEC è consigliato l'utilizzo della Procedura di Dunnett (vedere punto 5.2.5). In alternativa può essere utilizzato il test "t" di Student (vedere punto 5.2.6).

5.2.5 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 CA96 medio ottenuto nel campione sia uguale al valore medio ottenuto nel controllo;
- l'ipotesi alternativa è che il valore di CA96 medio ottenuto nel campione sia minore o maggiore del valore medio ottenuto nel controllo. Il valore CA96 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 $\alpha = 0,05$. Ovvero per $\alpha = 0,05$ 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;
- determinazione della LOEC: il confronto viene fatto considerando le diluizioni via via decrescenti. La diluizione dove viene rifiutata l'ipotesi nulla corrisponde al valore della LOEC;

La procedura di Dunnett esegue una trasformazione dei dati in \arctg^2 ed effettua per ogni media e controllo il Test di Dunnett. Per i calcoli utilizzati nella procedura di Dunnett si rimanda all'appendice n.1 "Procedura di Dunnett".

5.2.6 Test t di Student

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

Per il calcolo del valore t di Student vedere Appendice n.1.

5.2.7 Esclusione di dati anomali dal calcolo statistico

Quando all'interno di una serie di repliche si presenta un dato che si discosta dalla media per un valore superiore a 3 o 4 Deviazioni Standard

è possibile applicare il seguente test per verificare la possibilità di considerare il dato come anomalo e, quindi, scartarlo (Draper e Smith, 1968).

a) Ordinare i dati della serie secondo valori crescenti ;

b) calcolare il valore c mediante la seguente procedura

$$\text{se } x_1 \text{ è il dato anomalo } c = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1}$$

$$\text{se } x_n \text{ è il dato anomalo } c = \frac{x_n - (x_n - 1)}{x_n - x_1}$$

c) se il valore c calcolato eccede il valore tabulato corrispondente al numero di repliche a disposizione (tab. 3) allora il dato può essere scartato.

Tabella 3. Valori c per l'individuazione dei dati anomali

n	valori c limite	
	$\alpha=0,05$	$\alpha=0,01$
3	0,941	0,988
4	0,765	0,889
5	0,642	0,780
6	0,560	0,698
7	0,507	0,637

d) in presenza di due dati che sembrano anomali (ad esempio x_1 e x_n oppure x_1 e x_2) il calcolo può essere ripetuto; prima deve essere applicato al valore che si discosta maggiormente dal valore medio.

6 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 (Sbrilli et al., 1995).

- pH;
- Salinità: determinabile direttamente ed esprimibile come mg/L; oppure come Conducibilità ($\mu\text{S}/\text{cm}$) o come Cloruri (mg/L di Cl^-);
- Cloro attivo totale (mg/L);
- Altri eventuali disinfettanti (Es. acido peracetico);

6.1 pH

Valori di pH inferiori a 6 e superiori a 9 possono provocare un effetto inibente la crescita algale capace di mascherare la tossicità dovuta ad altri composti chimici. In questi casi in un'aliquota di campione il pH viene aggiustato a $7 \pm 0,5$, aggiungendo goccia a goccia acido cloridrico o idrossido di sodio 0,1 N (EPA, 1991). In caso di modifica del campione è necessario condurre un test parallelo anche con il campione non modificato.

6.2 Salinità

Il saggio algale deve essere eseguito tenendo di conto delle condizioni naturali del corpo idrico ricettore con lo scopo di evidenziare eventuali caratteristiche dello scarico capaci di alterare l'ambiente del corpo idrico ricettore. Secondo indicazioni EPA (1991) il valore di salinità che permette di discriminare le acque dolci da quelle salate è pari a 1000 mg/L. È necessario utilizzare organismi di acqua dolce quando la salinità del corpo idrico ricettore risulta inferiore a 1000 mg/L e organismi marini quando quest'ultimo valore viene superato.

Per quanto riguarda campioni di acqua di scarico costituiti da acqua marina, salmastra o a salinità superiore a quella dell'acqua di mare è necessario che l'acqua di controllo e di diluizione abbia un contenuto salino uguale al campione. A tal fine, se necessario, diluire l'acqua di mare utilizzata nei controlli e nelle diluizioni con acqua distillata oppure arricchirne il contenuto salino con NaCl (AR-grade) o con acqua di mare ipersalina. *Dunaliella tertiolecta* può essere utilizzata entro l'intervallo di salinità compreso tra 3‰ e 50‰ (Mc Lachlan, 1960). Per la determinazione della salinità mediante la titolazione degli ioni cloruro fare riferimento al metodo IRSA n. 2090 (IRSA, 1994).

6.2.1 Scarichi salini in acque dolci

Il contenuto salino dello scarico deve essere considerato un contaminante non presente nel corpo idrico ricettore. In tal caso è necessario valutare la tossicità dello scarico mediante organismi di acqua dolce.

6.2.2 Scarichi di acque dolci in acque marine o salmastre

Il basso contenuto salino nelle acque di scarico non deve essere considerato come causa di contaminazione. In tal caso è necessario eseguire il

saggio algale con organismi marini e modificare la salinità del campione sino a renderla accettabile per tali organismi; utilizzando *Dunaliella tertiolecta* aggiungere NaCl al campione fino a raggiungere una salinità equivalente a quella dell'acqua di mare.

6.3 Cloro attivo totale

Il cloro attivo deve essere inattivato con quantità equivalente di tiosolfato di sodio al fine di evitare la presenza della quantità in eccesso di tiosolfato nel campione. A tal fine è possibile calcolare il volume (espresso in mL) di una soluzione a titolo noto di tiosolfato pentaidrato da aggiungere ad un volume prestabilito del campione in esame mediante la seguente equazione (IRSA, 1996):

$$\text{mL di tiosolfato} = \frac{(\text{Ml di campione}) \times F \times (\text{Conc. Cl}_2)}{(\text{Conc. di tiosolfato})}$$

dove:

mL di tiosolfato = mL della soluzione a titolo noto da aggiungere al campione;

F per il tiosolfato anidro = 6,7; F per il tiosolfato pentaidrato = 10,52;

Conc. di Cl_2 = concentrazione del cloro attivo totale presente nel campione espressa in mg/L;

Conc. di tiosolfato = concentrazione di tiosolfato espressa in mg/L.

Il titolo del tiosolfato deve essere controllato ogni 15 giorni.

7 Piano sperimentale

7.1 Piano sperimentale

Il piano sperimentale si basa sulle metodologie IRSA (1978), ed EPA (1988), sui lavori di Joubert (1983), di Walsh e Merrill (1984), di Elnabrawy e Welter (1984), di Sbrilli et al. (1990) e di Bucci e Sbrilli (1992).

Il piano di lavoro è rivolto alla misura della Crescita algale dopo 96 ore di incubazione (CA96); 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 impie-

gate 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.

7.2 Preparazione del campione

Aggiungere a 1000 mL di campione (proveniente dal trattamento previsto nel punto 3.2 del Cap. III) 1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5a descritte nel punto 2.5. Agitare per capovolgimento.

7.3 Preparazione della soluzione di riferimento (controllo)

Aggiungere a 1000 mL di acqua marina di diluizione preparata come riportato nel punto 2.2 (ed eventualmente modificata come riportato nel punto 6.2), 1 mL di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3 e 4a descritte nel punto 2.5. Agitare per capovolgimento.

7.4 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.

7.5 Preparazione delle diluizioni del campione

Utilizzando la procedura prevista nei punti 7.2, 7.3 e 7.4 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 alte: 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.

7.5.1 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. Quest'ultimo intervallo indicherà le diluizioni da utilizzare nel saggio definitivo.

7.5.2 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%, allora le diluizioni del saggio definitivo saranno 10%; 5%; 1%; 0,5%; 0,1%.

7.6 Distribuzione delle diluizioni del campione e del controllo nelle beute

Diluire il campione arricchito (come riportato nei punti 7.2 o 7.4) con la soluzione di riferimento preparata al punto 7.3. Per ogni diluizione il vo-

lume 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 ed il controllo, mediante un cilindro da 25 mL, in 3 sottoaliquote da 25 mL disposte in 3 beute da 100 mL, ciascuna sottoaliquota costituisce una replica.

7.7 Identificazione delle beute

Al termine della distribuzione nelle beute abbiamo 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.

7.8 Aggiunta dell'inoculo

Ad ogni beuta viene aggiunto l'inoculo algale come riportato nel punto 3.6. 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

7.9 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 frigotermostato a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 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).

7.10 Misura della crescita algale

Dopo 96 ore di incubazione in ogni beuta verrà misurata la crescita algale mediante uno dei sistemi riportati nel punto 4. Il risultato rappresenta la crescita algale rilevata alla 96° ora (CA96). Da ogni beuta si ottiene un valore di CA96, da ogni gruppo di beute (3 repliche) si ottiene il valore medio della CA96 e gli altri parametri statistici previsti nel punto 5.2.

7.11 Uso dei fogli di lavoro

Tutti i dati relativi al saggio algale, le eventuali note e quant'altro si renda necessario eseguire e registrare nel corso del saggio devono essere riportati in un foglio di lavoro come quello illustrato in appendice n.9.

8 Controllo di qualità

Il controllo di qualità deve comprendere tutte le operazioni che possono influire sulla qualità del dato. In particolare è opportuno pianificare il controllo dei seguenti punti relativi alla metodologia di saggio algale:

- 1 - procedure di campionamento e trattamento del campione;
- 2 - stato di salute delle colture di mantenimento;
- 3 - taratura dei dispositivi di trasferimento dei liquidi;
- 4 - calibrazione degli strumenti;
- 5 - condizioni di incubazione (temperatura, illuminazione, agitazione);
- 6 - variabilità del dato. Il Coefficiente di Variazione (CV) della CA96 rilevata tra le repliche di una stessa diluizione o del controllo, non deve superare il 15%;
- 7 - valore della MVC nel controllo. Tale valore non deve essere inferiore a $200 \cdot 10^3$ cellule/mL;

8.1 Controllo di precisione, utilizzo delle carte di controllo.

Il controllo di precisione si basa sulla valutazione della variabilità dei valori di $EC50^{96h}$ prodotti con una sostanza di riferimento: il bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$).

A tal fine utilizzare una soluzione concentrata di bicromato di potassio pari a 1000 mg/L (353,5 mg/L come Cromo); con cadenza mensile eseguire un saggio di tossicità con le seguenti concentrazioni di bicromato di potassio espresse come mg/L di Cromo: 5; 10; 20; 30; 40.

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

- valore della $EC50^{96h}$ calcolato nel saggio;
- valore medio ponderale della $EC50^{96h}$ calcolato utilizzando tutti i valori di $EC50^{96h}$ 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 EC50^{96h}.

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 ricalcolo dei valori della carta di controllo. Allo stesso tempo i test eseguiti contemporaneamente al test di controllo devono essere ripetuti.

9 Valutazione dei dati

I dati relativi alla misura della CA96, opportunamente registrati nel foglio di lavoro ed elaborati statisticamente così come riportato nel punto 5, costituiscono la base per la loro successiva valutazione.

9.1 Risposta delle colture algali agli effetti biologici esercitati dalle acque di scarico

L'effetto biologico esercitato da un campione di acqua di scarico 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.

9.1.1 Stimolazione della crescita algale

Un campione è capace di stimolare la crescita quando contiene una quantità di sostanze nutritive tale da determinare un incremento della cre-

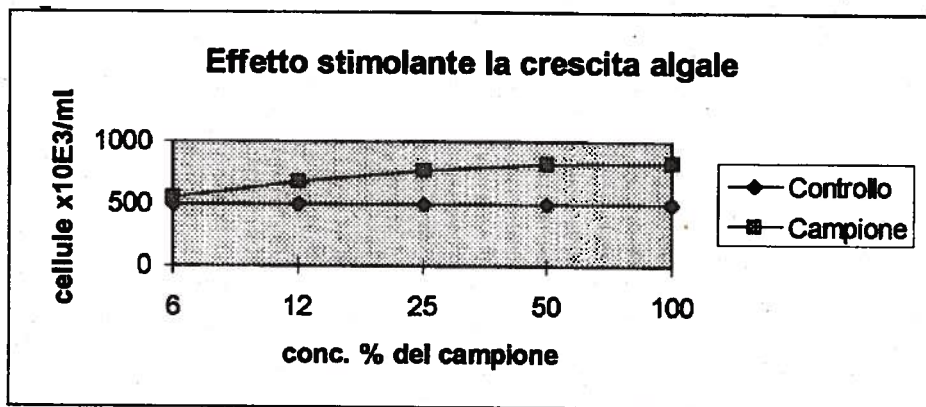
scita statisticamente significativo rispetto al controllo. La significatività della differenza può essere valutata mediante il test t di Student (vedere punto 5.2.6) Per ognuna delle diluizioni del campione utilizzate nel saggio è possibile calcolare la percentuale di stimolazione (S%) (EPA, 1985).

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

dove; T = CA96 della diluizione del campione;
C = CA96 del controllo.

La presenza di un effetto stimolante la crescita algale (Fig.1) indica un possibile effetto eutrofizzante dello scarico nei confronti del corpo idrico ricettore. Per una più accurata valutazione della concentrazione di nutrienti biodisponibili nell'acqua di scarico presa in esame è necessario eseguire con quest'ultima il saggio algale per la valutazione dello stato trofico (Cap. II.1).

Fig. 1



9.1.2 Inibizione della crescita algale

Un campione presenta effetto tossico quando inibisce la crescita algale in misura statisticamente significativa rispetto al controllo (Fig.2). 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 $EC50^{96h}$. A tal fine utilizzare il sistema di calcolo indicato nel punto 5.2.2. Allo scopo di rendere più facilmente comprensibile la misura della tossicità è opportuno affiancare alla risposta in termini di $EC50^{96h}$ anche il valore delle Unità Tossiche (UT). Per Unità Tossiche si intende il quoziente risultante dal seguente rapporto

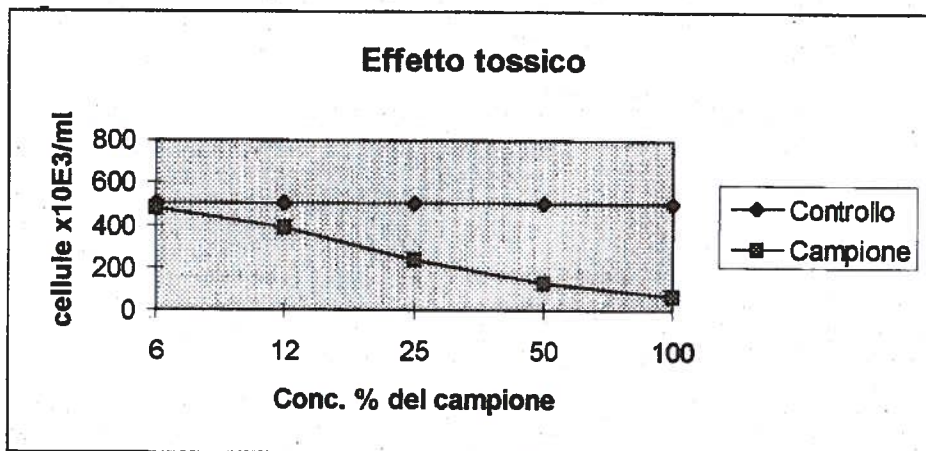
$$UT = 100/EC50^{96h}$$

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) e della LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) determinati mediante le procedure indicate ai punti 5.2.3 e 5.2.4.

In alcuni casi, in presenza di debole effetto tossico, il valore della $EC50^{96h}$ non risulta calcolabile mentre è possibile esprimere l'effetto tossico mediante i valori della NOEC e della LOEC.

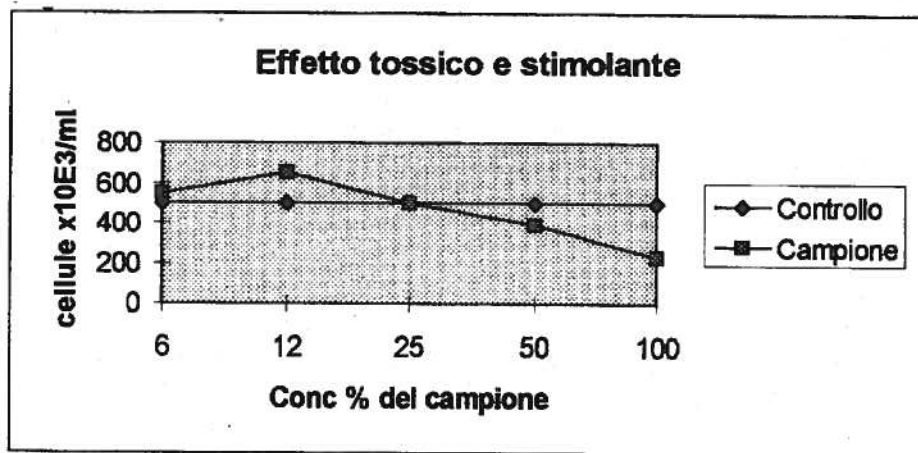
Fig.2



9.1.3 Stimolazione della crescita algale da parte delle alte diluizioni del campione e inibizione della crescita da parte delle basse diluizioni.

Alcuni campioni possono presentare debole effetto tossico congiuntamente alla presenza di elevate concentrazioni di sostanze nutritive (Fig.3). 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 (Walsh e Bahner, 1980; Walsh et al., 1982; EPA, 1982). In tali casi, per il calcolo della EC50^{96h}, della NOEC e della LOEC è necessario utilizzare soltanto le diluizioni dove si evidenzia l'effetto tossico.

Fig.3



9.2 Scarichi tossici, gestione dei risultati

Il risultato del saggio algale eseguito su uno scarico tossico, espresso mediante i parametri descrittivi della tossicità (EC50^{96h}, Unità Tossiche, NOEC, LOEC) può essere utilizzato:

- nella fase istruttoria di autorizzazione allo scarico, come base per la previsione di effetto sul corpo idrico ricettore;
- nella successiva fase del controllo, per verificare il rispetto di eventuali limiti tabellari.

9.2.1 Uso di tabelle per il confronto e la classificazione degli scarichi tossici

Sono stati pubblicati numerosi sistemi di classificazione delle acque di scarico basati sul risultato dei saggi di tossicità (Volterra, 1996); a titolo di esempio viene riportato lo schema di classificazione proposto dal Laboratory for biological research in aquatic pollution dell'Università di Ghent (Rep. To Comm. Europ. Com.; Contr. ACE 89/BE 2/D3; 1989.) Tale schema si basa sul confronto delle Unità Tossiche.

non tossico	per TU = 0
debolmente tossico	per TU < 1
tossico	per TU 1 - 10
molto tossico	per TU 11 - 100
estremamente tossico	per TU > 100

È opportuno, tuttavia, tenere presente la notevole variabilità dei dati relativi alla tossicità degli effluenti complessi, dipendente soprattutto dalle variazioni in composizione e portata degli scarichi. Di conseguenza appare evidente la scarsa utilità delle tabelle che si propongono di classificare le acque di scarico in base alla loro tossicità ma senza tenere di conto delle rispettive portate.

9.2.2 Determinazione del Carico Tossico Complessivo (CTC)

Il calcolo del Carico Tossico Complessivo (CTC) permette di normalizzare i valori della tossicità, espressi come Unità Tossiche, con i valori della portata dello scarico, espressa in $\text{m}^3/24\text{h}$, rilevata durante le fasi del prelievo. La procedura di determinazione del CTC si basa sulle indicazioni fornite da Walsh e Alexander (1980).

$$\text{CTC } (\text{m}^3/24\text{h}) = \text{UT} \times \text{Portata dello Scarico } (\text{m}^3/24\text{h})$$

Per mezzo della determinazione del CTC si introduce la portata dello scarico come una componente rilevante nella sua caratterizzazione tossicologica sottolineando l'inadeguatezza del solo dato di concentrazione (espresso come $\text{EC}_{50}^{96\text{h}}$ o come UT) nel valutare l'impatto di uno scarico sul corpo idrico ricettore, ove non si tenga conto dei volumi scaricati. La valutazione del CTC, normalizzando i dati con la portata, permette di con-

frontare correttamente la pericolosità di scarichi diversi. (Sbrilli et al., 1995).

Per considerare l'impatto dello scarico sul corpo idrico ricettore è necessario conoscere, oltre al CTC, la capacità di quest'ultimo di diluire lo scarico che vi si immette. Un concetto importante, presente nel Clean Water Act (EPA, 1991), è quello di individuare dei valori di tossicità tollerabili nell'effluente al fine di precludere lo scarico di sostanze tossiche in quantità tossiche. Quest'ultimo potrebbe essere l'obiettivo al quale l'attività di controllo dovrebbe tendere; a tal fine occorrerebbe modificare l'attuale sistema normativo, basato sull'imposizione di limiti tabellari rigidi e uguali su tutto il territorio nazionale, introducendo la possibilità, per le Autorità adibite al controllo, di imporre limiti tabellari variabili basati sulle caratteristiche dello scarico e del corpo idrico ricettore.

Appendice n.1

Calcoli statistici

1.1 Valore medio (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

1.2 Devianza (D)

$$D = \sum (x - \bar{x})^2$$

1.3 Varianza (V)

$$V = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

1.4 Deviazione Standard (DS) e Coefficiente di Variazione (CV)

$$DS = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad CV = \frac{DS}{\bar{x}} \cdot 100$$

equivalente algebrico della Deviazione Standard più facile da calcolare

$$DS = \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}{n - 1}}$$

1.5 Calcolo del t di Student (Colton, 1979);

$$t = \frac{m1 - m2}{\sqrt{s2(\frac{1}{n1} + \frac{1}{n2})}} \quad \text{dove} \quad S2 = \frac{D1 + D2}{n1 + n2 - 2}$$

m1 = media 1, con valore assoluto più elevato;

m2 = media 2;

n_1 = numero di repliche relative alla media 1; D_1 = Devianza relativa alla media 1;

n_2 = numero di repliche relative alla media 2; D_2 = Devianza relativa alla media 2;

1.5.1 Significato del t di Student

Il test di confronto si esegue calcolando la probabilità dell'ipotesi nulla tra le medie; l'ipotesi nulla significa che la differenza tra le medie "vere" delle due popolazioni è uguale a zero. Il valore t calcolato rappresenta il rapporto tra la differenza delle due medie e la deviazione standard stimata della differenza tra le medie. I valori di t si distribuiscono simmetricamente attorno allo zero secondo la distribuzione t di Student (in realtà esistono numerose distribuzioni di t le quali si modificano in funzione dei gradi di libertà conseguenti al numero dei dati disponibili) (Lison, 1961). Ciascuna distribuzione t di Student ricorda la distribuzione normale e indica che man mano che i valori di t aumentano aumenta anche la loro distanza dal valore zero e diminuiscono le probabilità di confermare l'ipotesi nulla. Quando la probabilità di confermare l'ipotesi nulla scende al di sotto del 5% l'ipotesi nulla si considera non verificata ed i corrispondenti valori di t rivelano una differenza significativa tra le medie.

1.5.2 Uso della tabella del t di Student

Il valore di t tende ad aumentare quando aumenta la differenza tra le medie oppure quando diminuisce la variabilità dei dati. Il valore assoluto del t calcolato in base alla formula riportata nel punto 1.5 viene confrontato con la tabella di distribuzione del t di Student. Allo scopo procedere come di seguito riportato:

- a) utilizzare la distribuzione di t corrispondente ai gradi di libertà relativi al numero di dati utilizzati. Gradi di libertà (g.l.) = $n_1 + n_2 - 2$;
- b) utilizzare la scala delle probabilità relative al test ad una coda;
- c) individuare la colonna corrispondente alla probabilità del 5% (0,05);
- d) verificare il valore di t corrispondente (t tabulato);
- e) se il valore assoluto di t calcolato è superiore al valore di t tabulato l'ipotesi nulla non è verificata, cioè il test rivela una differenza "significativa" tra le due medie;
- f) se il valore assoluto di t calcolato è superiore al valore di t tabulato cor-

rispondente anche alla probabilità dell'1% (0,01) il test rivela una differenza "altamente significativa" tra le due medie.

Tabella della distribuzione di t

Gradi di Libertà	Area nelle due code			
	0,10	0,05	0,02	0,01
	Area in una coda			
	0,05	0,025	0,01	0,005
1	6,314	12,706	31,821	63,657
2	2,920	4,303	6,965	9,925
3	2,353	3,182	4,541	5,841
4	2,132	2,776	3,747	4,604
5	2,015	2,571	3,365	4,032
6	1,943	2,447	3,143	3,707
7	1,895	2,365	2,998	3,499
8	1,860	2,306	2,896	3,355
9	1,833	2,262	2,821	3,250
10	1,812	2,228	2,764	3,169

Da Pearson e Hartley (1966), (mod.)

1.6 Tabella di distribuzione del chi-quadro (χ^2)

probabilità % di un valore di χ^2 maggiore del valore indicato

Gradi di Libertà	Probabilità	
	5%	1%
1	3,84	6,64
2	5,99	9,21
3	7,82	11,34
4	9,49	13,28
5	11,07	15,09
6	12,59	16,81
7	14,07	18,48
8	15,51	20,09
9	16,92	21,67
10	18,31	23,21

Lison, 1961 (mod.)

1.7 Applicazione excel per la Procedura di Dunnett "dunaliella"

1.7.1 Premessa

La Procedura di Dunnett consiste in un metodo di comparazione multipla mediante il quale ogni media viene confrontata con la media del controllo, in una serie di tests a coppie nei quali si utilizza il termine di incertezza ottenuto mediante una analisi della varianza (ANOVA).

Le assunzioni che stanno alla base dell'applicazione della Procedura di Dunnett sono:

- osservazioni indipendenti e distribuite normalmente;
- omogeneità della varianza delle osservazioni tra tutte le concentrazioni considerate compreso il controllo.

Il programma DUNALIELLA è un'applicazione EXCEL che esegue tutte le operazioni necessarie per la Procedura di Dunnett.

Partendo dai valori di popolazione in funzione delle varie concentrazioni considerate per il test di tossicità, effettua le seguenti operazioni:

- opportuna trasformazione dei dati (\arctg^2)
- test C2 per valutare la distribuzione normale delle osservazioni
- test di Bartlett per verificare l'omogeneità delle varianze
- ANOVA
- test di Dunnett tra le osservazioni relative alle varie concentrazioni e il controllo.

Sulla base dei risultati ottenuti determina la NOEC (Concentrazione di non effetto osservato) che rappresenta il risultato finale di tutta la procedura, e la MDS (minima differenza percentuale significativa) che da un'idea della bontà del test eseguito.

1.7.2 Istruzioni per l'uso

DUNALIELLA è sviluppata su cartelle EXCEL (versione 4.0) raccolte in un'area di lavoro. E' costituito da due files:

INPUT.XLS foglio di lavoro in cui vanno inseriti i dati di ingresso e che riassume tutti i risultati delle elaborazioni, rappresentando così il referto dell'analisi statistica)

DUNALIEL.XLW area di lavoro che raccoglie tutti i files necessari alle elaborazioni ma con i quali l'utilizzatore non deve interagire.

1.7.3 Installazione

E' necessario disporre di un PC in cui sia installato EXCEL versione 4.0 o superiori.

Copiare i due files contenuti nel dischetto nella directory prescelta. (E' possibile lavorare anche da dischetto).

Aprire FILE MANAGER e fare doppio click su DUNALIEL.XLW

E' possibile anche creare un'icona sul PROGRAM MANAGER; in questo caso posizionarsi nel GRUPPO DI PROGRAMMI prescelto, scegliere sul menù FILE NUOVO, digitare il nome scelto e indicare il percorso (C:\.....\DUNALIEL.XLW).

1.7.4 Utilizzo

Dopo aver aperto DUNALIEL.XLW tramite la sua icona o tramite il FILE MANAGER, appare sul video una parte del file INPUT.XLS (Fig. 1) che contiene la mascherina per l'inserimento dei valori di concentrazio-

ne utilizzati nel test di tossicità e i corrispondenti valori di popolazione osservati nelle varie ripetizioni (sono necessarie almeno due ripetizioni).

Le concentrazioni vanno inserite in ordine crescente.

Se le ripetizioni forniscono tutti valori uguali è necessario "truccare" i dati in quanto, poiché nelle elaborazioni vengono utilizzati la media e la deviazione standard di ogni singola concentrazione, non è possibile matematicamente ottenere un risultato quando una deviazione standard vale zero.

Per esempio: supponiamo di effettuare per ogni concentrazione tre ripetizioni e supponiamo di ottenere, per una data concentrazione, il valore di 100 per tutte e tre le ripetizioni; sarà opportuno allora digitare i seguenti valori:

100 - 100 - 99,99.

Sullo schermo apparirà:

100 - 100 - 100

ma la deviazione standard sarà leggermente diversa da zero e potrà essere utilizzata nei calcoli successivi.

Dopo aver inserito tutti i dati digitare F9; verranno eseguiti i calcoli di tutti i test considerati e, nella parte successiva del file INPUT.XLS si leggeranno le risposte.

Il file INPUT.XLS è organizzato in maniera tale da raccogliere tutti i risultati della Procedura di Dunnett, basta eseguire una stampa di questo file utilizzando i comandi EXCEL per avere un referto completo dell'analisi statistica effettuata (un esempio in fig. 2).

Una volta effettuato il test, se si desidera avere un'archiviazione su disco delle analisi eseguite, è possibile salvare con un nome opportuno il file INPUT.XLS.

Per eseguire un nuovo test è necessario inserire i nuovi dati nel file INPUT.XLS vuoto. Per ottenerlo basta chiudere quello appena utilizzato SENZA SALVARE (o salvandolo con nome diverso) e aprire di nuovo il file INPUT.XLS.

Al termine delle elaborazioni chiudere tutti i files aperti facendo attenzione a NON SALVARE i cambiamenti effettuati nei vari files contenuti nell'area di lavoro DUNALIEL.XLW che il programma richiamerà: in questo modo DUNALIELLA rimarrà inalterato e potrà tranquillamente essere utilizzato per nuove elaborazioni.

Per eventuali ulteriori informazioni o problemi rivolgersi a:

Dr. Barbara Bracci

ARPAT - Servizio Sub-provinciale di Piombino, tel. 0565/277311

1.7.5 Riferimenti

- EPA - SHORT-TERM METHODS FOR ESTIMATING THE CHRONIC TOXICITY OF EFFLUENTS AND RECEIVING WATERS TO FRESHWATER ORGANISMS. (1985) cod. EPA/600/06 U.S. CINCINNATI OHIO 45268
- MICROSOFT - EXCEL 4.0 MANUALE D'USO

TEST DI DUNNETT

Riempire le caselle bianche della tabella:

inserire le concentrazioni test e il NUMERO di CELLULE nelle varie ripetizioni.

Per i calcoli DIGITARE F9

Concentrazioni	Cellule	Ripetizioni						
%	F	A	B	C	D	E	F	
Controllo	1							

RISULTATI

Test X^2	X calc. = #DIV/0!	X critico = 0	#DIV/0!
Test Bartlett	B calc. = #DIV/0!	B critico = 0,99	#DIV/0!

Analisi della varianza tra i gruppi (concentrazioni)

F	#DIV/0!
Concentrazioni	
Test	0
Gradi di libertà	-1
F critico	#DIV/0!

Se il valore di F è superiore al valore F critico è possibile calcolare il valore di NOEC mediante i valori T_i riportati nella tabella sottostante

Confronto tra controllo e concentrazione i-esima

Concentrazione	T_i	T_c
%		

Minima differenza rispetto al controllo che può essere riconosciuta come statisticamente significativa

MDS = #DIV/0! %

NOEC = #DIV/0!

TEST DI DUNNETT

Riempire le caselle bianche della tabella:
inserire le concentrazioni test e il NUMERO di CELLULE nelle varie ripetizioni.
Per i calcoli DIGITARE F9

Concentrazioni	Indice	Ripetizioni	A	B	C	D	E	F
Controllo	1	100	99	97				
5	2	95	94	98				
20	3	80	80	82				
50	4	58	62	60				
75	5	32	30	40				
100	6	12	15	14				

RISULTATI

Test X^2	X calc. = #DIV/0!	X critico = 0	#DIV/0!
Test Bartlett	B calc. = #DIV/0!	B critico = 0,99	#DIV/0!

Analisi della varianza tra i gruppi (concentrazioni)

F	#####
Concentrazioni	
Test	0
Gradi di libertà	-1
F critico	#####

Se il valore di F è superiore al valore F critico è
possibile calcolare il valore di NOEC mediante
i valori TI riportati nella tabella sottostante

Confronto tra controllo e concentrazione i-esima

Concentrazione	F	TI	F _c
%			#####

Minima differenza rispetto al controllo che può essere
riconosciuta come statisticamente significativa

ND5 = #DIV/0! %

NOEC = #####

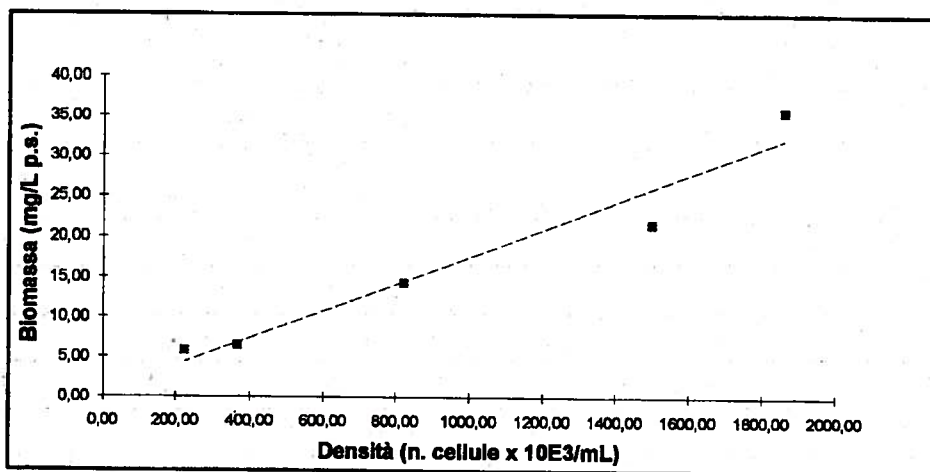
Appendice n. 2

Fattore di Conversione in Biomassa (FCB) per misure di densità algale per *R. subcapitata*

Determinazione del Fattore di Conversione di Biomassa (FCB) per *R. subcapitata*; utilizzabile per convertire le misure di densità algale espresse in numero di cellule $\times 10^3/\text{mL}$ in biomassa algale espressa come mg/L (peso secco).

Il FCB è rappresentato dalla seguente equazione della retta di regressione:

$$\text{Biomassa algale (mg/L p.s.)} = 0,017 \times \text{Densità (n. Cellule} \times 10^3/\text{mL}) + 0,5777$$



Regressione lineare: parametri della retta:

$$y = a + bx$$

$$r = 0,972$$

$$r^2 = 0,9448$$

$$a = 0,017$$

$$b = 0,5777$$

n = 5

significatività r (95%) = 0,8782

L'equazione della retta di regressione, che rappresenta il valore FCB, è stata calcolata in base al seguente piano sperimentale.

È stato pianificato un saggio algale rivolto alla determinazione della MCA costituito da 5 soluzioni contenenti concentrazioni di fosforo crescenti. Le soluzioni sono state preparate con terreno di mantenimento del clone algale (punto 2.2, Cap. II.1) privo di fosforo. La concentrazione del terreno è stata ridotta del 50%.

Le condizioni di esecuzione del saggio sono quelle indicate nei punti 3.6, 4.2.1, 4.2.2, 4.3 e 7.2.6 del Cap. II.1.

Concentrazione azoto nel mezzo culturale (come N): 2,1 mg/L;

Soluzione fosforo P2: 18,6 mg/L (utilizzata per la preparazione delle soluzioni con concentrazioni di fosforo crescenti);

Preparazione della soluzione P2: portare 1 mL della soluzione P (soluzione n.3 riportata al punto 2.2 del Cap. II.1) a 10 mL con acqua ultrapura.

Lo schema di lavoro con i risultati conseguiti è riportato nella tabella seguente

Conc. P ($\mu\text{g/L}$)	mL della P2 da portare a 300 mL	Rapporto N/P	MCA cell $\cdot 10^3/\text{mL}$	MCA mg/L p.s.
25	0,40	84	224 \pm 32	5,79
50	0,81	42	131 \pm 47	6,43
100	1,61	21	410 \pm 92	14,34
200	3,23	10,5	583 \pm 221	21,63
300	4,84	7	673 \pm 280	35,65

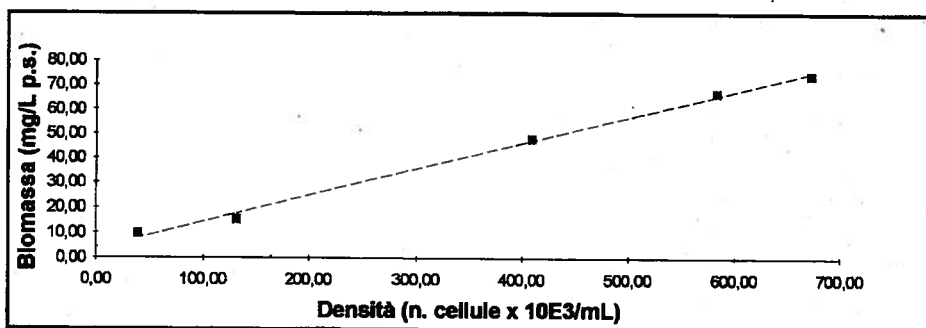
Appendice n. 3

Fattore di Conversione in Biomassa (FCB) per misure di densità algale per *D. tertiolecta*

Calcolo del Fattore di Conversione di Biomassa (FCB) per *D. tertiolecta*; utilizzabile per convertire le misure di densità algale espresse in numero di cellule $\times 10^3/\text{mL}$ in biomassa algale espressa come mg/L (peso secco).

Il FCB è rappresentato dalla seguente equazione della retta di regressione:

$$\text{Biomassa algale (mg/L p.s.)} = 0,106 \times \text{Densità algale (n. Cellule} \times 10^3/\text{mL}) + 3,8688$$



Regressione lineare: parametri della retta:

$$y = ax + b$$

$$r = 0,9984$$

$$r^2 = 0,9967$$

$$a = 0,106$$

$$b = 3,8688$$

$$n = 5$$

$$\text{significatività } r (95\%) = 0,8782$$

L'equazione della retta di regressione, che rappresenta il valore FCB, è stata calcolata in base al seguente piano sperimentale.

E stato pianificato un saggio algale rivolto alla determinazione della MCA costituito da 5 soluzioni contenenti concentrazioni di fosforo crescenti. Le soluzioni sono state preparate con terreno di mantenimento del clone algale (punto 2.3, Cap. II.2) privo di fosforo. La concentrazione del terreno è stata ridotta del 50%.

Le condizioni di esecuzione del saggio sono quelle indicate nei punti 3.6, 4.2.1, 4.2.2, 4.3 e 7.2.6 del Cap. II.2.

Concentrazione azoto nel mezzo di coltura (come N): 2,1 mg/L;

Soluzione fosforo P2: 18,6 mg/L (utilizzata per la preparazione delle soluzioni con concentrazioni di fosforo crescenti);

Preparazione della soluzione P2: portare 1 mL della soluzione P (soluzione n.2 riportata al punto 2.3 del Cap. II.2) a 10 mL con acqua ultrapura.

Lo schema di lavoro con i risultati conseguiti è riportato nella tabella seguente

Conc. P ($\mu\text{g/L}$)	mL della P2 da portare a 300 mL	Rapporto N/P	MCA cell $\cdot 10^3/\text{mL}$	MCA mg/L p.s.
25	0,40	84	39 ± 13	9,65
50	0,81	42	131 ± 9	15,34
100	1,61	21	410 ± 35	47,91
200	3,23	10,5	583 ± 11	66,83
300	4,84	7	673 ± 101	74,18

Appendice n.4

Valutazione dei sistemi di misura della crescita algale

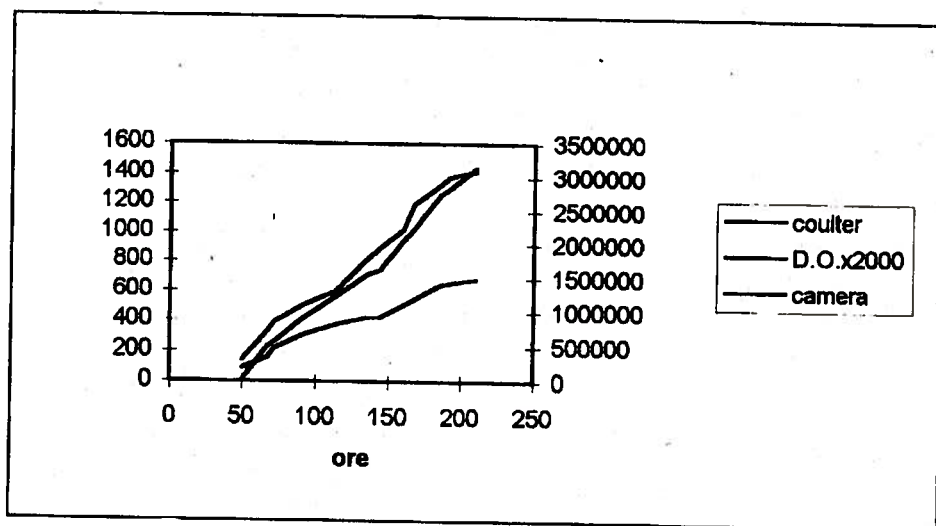
La misura della crescita algale può essere effettuata utilizzando tecniche diverse come riportato nel punto 4 dei Cap. II.1, II.2, III.1, III.2.

Al fine di valutare la presenza di una correlazione fra i dati ricavati con metodi di misura diversi si è provveduto a monitorare la crescita algale mediante il conteggio diretto in camera di Burkner, tramite contaglobuli elettronico e misura della densità ottica a 670 nm.

E' stata seguita la crescita algale in tre colture cellulari.

I dati relativi alle varie misure sono riportati nei grafici seguenti.

Campione 1 - crescita algale nel terreno colturale standard:



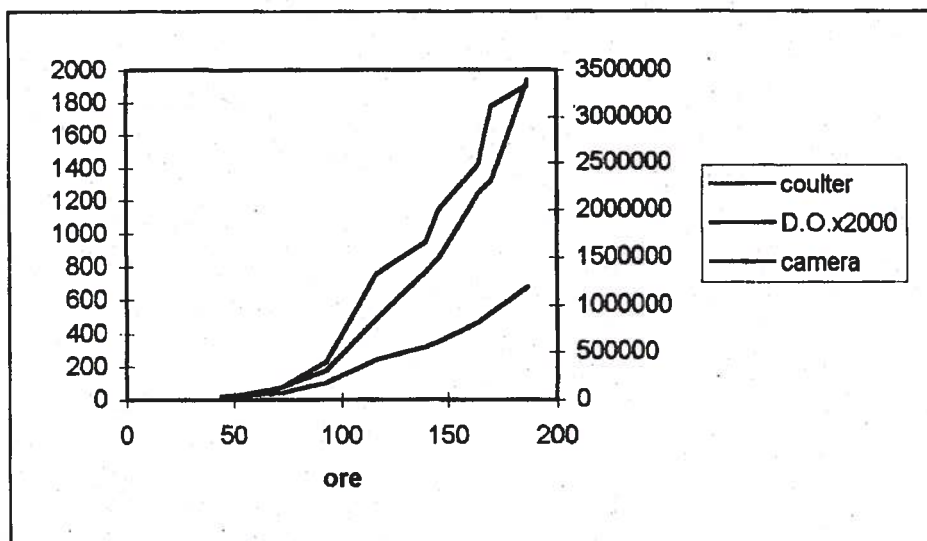
I dati forniscono coefficienti di correlazione calcolati su 12 misure rispettivamente di:

Coefficiente $r = 0.993$ (D.O. a 670 nm - conteggio con contaglobuli)

Coefficiente $r = 0.990$ (D.O. a 670 nm - conteggio con camera di Burkner)

Coefficiente $r = 0.994$ (conteggio con contaglobuli - conteggio con camera di Burkner)

Campione 2 - crescita algale nel terreno colturale standard:



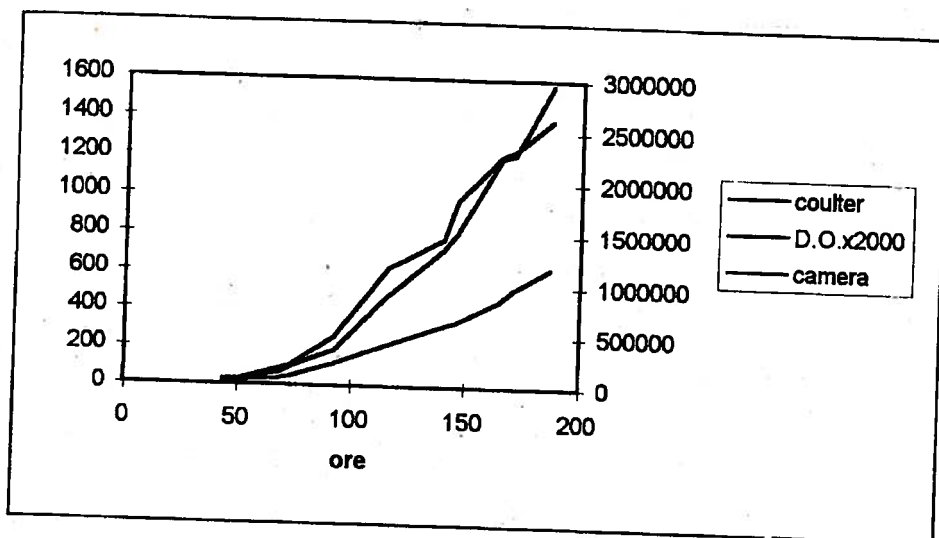
I dati forniscono coefficienti di correlazione calcolati su 12 misure rispettivamente di:

Coefficiente $r = 0.995$ (D.O. a 670 nm - conteggio con contaglobuli)

Coefficiente $r = 0.993$ (D.O. a 670 nm - conteggio con camera di Burkert)

Coefficiente $r = 0.980$ (conteggio con contaglobuli - conteggio con camera di Burkert)

Campione 3 - crescita algale nel terreno colturale standard con aggiunta di 1 mg/L di N:



I dati forniscono coefficienti di correlazione calcolati su 12 misure rispettivamente di:

Coefficiente $r = 0.997$ (D.O. a 670 nm - conteggio con contaglobuli)

Coefficiente $r = 0.990$ (D.O. a 670 nm - conteggio con camera di Burkert)

Coefficiente $r = 0.988$ (conteggio con contaglobuli - conteggio con camera di Burkert)

Osservazioni

I dati sperimentali evidenziano l'esistenza di una correlazione fra i tre metodi di misura utilizzati con coefficienti di correlazione r sempre maggiori di 0.95.

Il metodo di misura tramite contaglobuli pur ben correlandosi con gli altri offre maggiori garanzie utilizzando per la misura un'aliquota significativa di campione e dimostrando una buona sensibilità, la misura della D.O. a 670 nm non mostra una buona sensibilità, mentre il conteggio in camera di Burkert evidenzia le problematiche legate alla scarsa significatività del campione (andamento incerto della curva di crescita).

Appendice n. 5

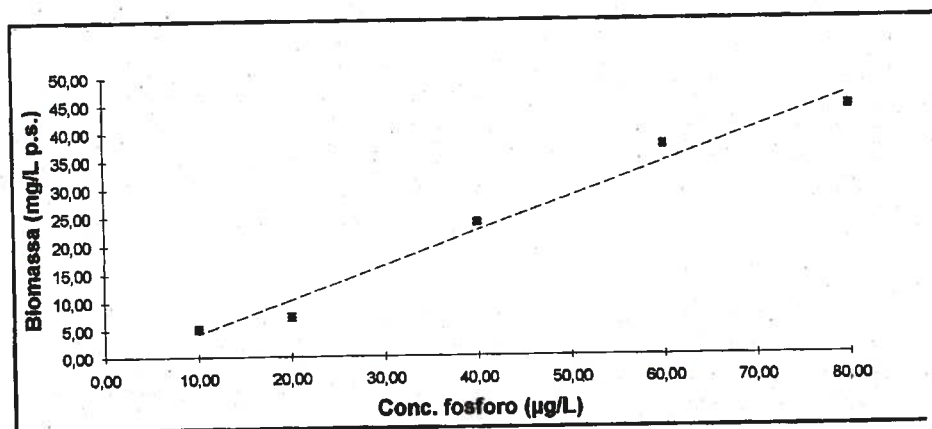
Fattore di Produzione di Biomassa (FPB) per la determinazione del Fosforo per *D. tertiolecta*

Calcolo del Fattore di Produzione di Biomassa (FPB) per *D. tertiolecta* utilizzabile per la determinazione della concentrazione di Fosforo biodisponibile come riportato ai punti 8.2, 8.2.1 e 8.2.3 del Cap. II.2.

Il Fattore di Produzione di Biomassa (FPB) si ricava dal peso secco della biomassa algale (Q) espressa come $\mu\text{g/L}$ prodotta da 1 $\mu\text{g/L}$ di nutriente (P).

$$\frac{Q (\mu\text{g} / \text{L})}{P (\mu\text{g} / \text{L})} = \text{FPB}$$

Fattore di Produzione di Biomassa = 606,1



Regressione lineare: parametri della retta:

$$y = ax + b$$

$$r = 0,9894$$

$$r^2 = 0,979$$

$$a = 0,6061$$

$$b = 1,816$$

$$n = 5$$

$$\text{significatività } r (95\%) = 0,8782$$

L'equazione della retta di regressione, dalla quale è stato calcolato il valore FPB, è stata determinata in base al seguente piano sperimentale.

È stato pianificato un saggio algale rivolto alla determinazione della MCA costituito da 5 soluzioni contenenti concentrazioni di fosforo crescenti. Le soluzioni sono state preparate con terreno di mantenimento del clone algale (punto 2.3, Cap. II.2) privo di fosforo. La concentrazione del terreno è stata ridotta del 50%.

Le condizioni di esecuzione del saggio sono quelle indicate nei punti 3.6, 4.2.1, 4.2.2, 4.3 e 7.2.6 del Cap. II.2.

Concentrazione azoto (come N) nel mezzo di coltura: 2,1 mg/L;

Soluzione fosforo P2: 18,6 mg/L (utilizzata per la preparazione delle soluzioni con concentrazioni di fosforo crescenti);

Preparazione della soluzione P2: portare 1 mL della soluzione P (soluzione n.2 riportata al punto 2.3 del Cap. II.2) a 10 mL con acqua ultrapura.

Lo schema di lavoro con i risultati conseguiti è riportato nella tabella seguente

Conc. P ($\mu\text{g/L}$)	mL della P2 da portare a 300 mL	Rapporto N/P	MCA cell $\cdot 10^3/\text{mL}$	MCA mg/L p.s.
10	0,16	210	20 \pm 0	5,12
20	0,32	105	75 \pm 3	7,32
40	0,64	52,5	250 \pm 5	23,9
60	0,97	35	397 \pm 15	37,5
80	1,29	26,2	533 \pm 6	44,36

Appendice n. 6

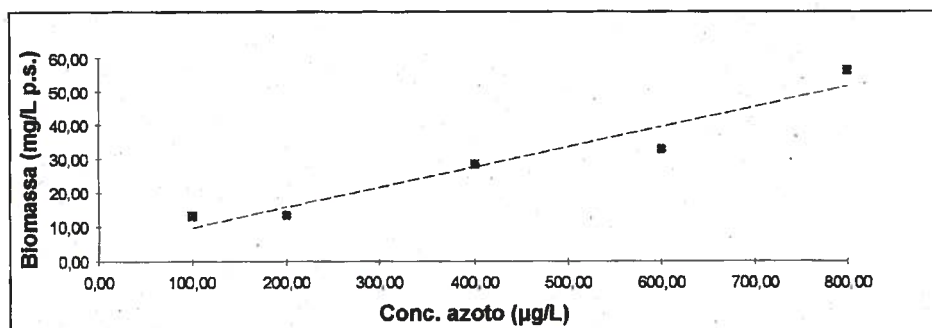
Fattore di Produzione di Biomassa (FPB) per la determinazione dell'Azoto per *D. tertiolecta*

Calcolo del Fattore di Produzione di Biomassa (FPB) per *D. tertiolecta* utilizzabile per la determinazione della concentrazione di Azoto biodisponibile come riportato ai punti 8.2, 8.2.1 e 8.2.2 del Cap. II.2.

Il Fattore di Produzione di Biomassa (FPB) si ricava dal peso secco della biomassa algale (Q) espressa come $\mu\text{g/L}$ prodotta da 1 $\mu\text{g/L}$ di nutriente (N).

$$\frac{Q (\mu\text{g} / \text{L})}{P (\mu\text{g} / \text{L})} = \text{FPB}$$

Fattore di Produzione di Biomassa = 59,9



Regressione lineare: parametri della retta:

$$y = ax + b$$

$$r = 0,9652$$

$$r^2 = 0,9315$$

$$a = 0,0599$$

$$b = 3,7163$$

$$n = 5$$

$$\text{significatività } r (95\%) = 0,8782$$

L'equazione della retta di regressione, dalla quale è stato calcolato il valore FPB, è stata determinata in base al seguente piano sperimentale.

È stato pianificato un saggio algale rivolto alla determinazione della MCA costituito da 5 soluzioni contenenti concentrazioni di azoto crescenti. Le soluzioni sono state preparate con terreno di mantenimento del clone algale (punto 2.3, Cap. II.2) privo di azoto.

Le condizioni di esecuzione del saggio sono quelle indicate nei punti 3.6, 4.2.1, 4.2.2, 4.3 e 7.2.6 del Cap. II.2.

Concentrazione fosforo (come P) nel mezzo di coltura: 0,186 mg/L;

Soluzione azoto N3: 42 mg/L (utilizzata per la preparazione delle soluzioni con concentrazioni di azoto crescenti);

Preparazione della soluzione N3: portare 1 mL della soluzione N (soluzione n.1 riportata al punto 2.3 del Cap. II.2) a 100 mL con acqua ultrapura.

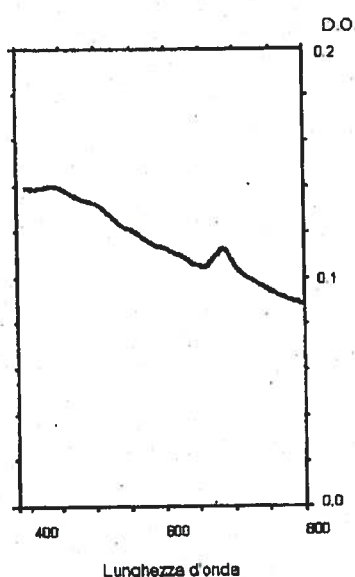
Lo schema di lavoro con i risultati conseguiti è riportato nella tabella seguente

Conc. N ($\mu\text{g/L}$)	mL della N3 da portare a 300 mL	Rapporto N/P	MCA $\text{cell} \cdot 10^3/\text{mL}$	MCA mg/L p.s.
100	0,71	0,5	$63 \pm 1,1$	13,18
200	1,43	1,1	$90 \pm 3,5$	13,41
400	2,86	2,1	$150 \pm 4,0$	28,44
600	4,29	3,2	$247 \pm 14,4$	32,94
800	5,71	4,3	$317 \pm 7,6$	56,50

Appendice n.7

Determinazione della densità algale mediante misura dell'assorbanza

La determinazione della densità cellulare di una coltura algale, mediante la misura della Densità Ottica (D.O.), risulta essere un metodo molto pratico e veloce che però presenta alcune importanti limitazioni quali scarsa sensibilità ed aspecificità.



La scarsa sensibilità alle basse concentrazioni può essere aumentata utilizzando per la misura cuvette a maggior cammino ottico (100 mm).

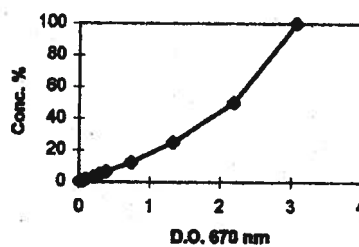
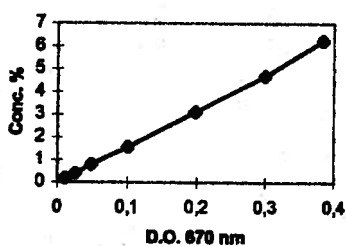
Osservando lo spettro di assorbimento di una sospensione algale (*Raphidocellis subcapitata*) fra 400 e 800 nm si evidenzia un forte assorbimento aspecifico che decresce all'aumentare della lunghezza d'onda sul quale si innesta il picco di assorbimento specifico della clorofilla-a a 670 nm.

L'aspecificità può essere in parte corretta utilizzando una radiazione incidente con lunghezza d'onda di 670 nm corrispondente al picco di assorbimento della clorofilla-a.

Per quanto concerne la correlazione fra D.O. e numero di cellule nella sospensione algale, le prove sperimentali, eseguite sulla stessa sospensione algale a livelli diversi di concentrazione, evidenziano un andamento lineare per una D.O. compresa fra 0.01 e 0.30, utilizzando una cella di lettura da 10 mm di cammino ottico, con un coefficiente di correlazione $r = 0.99$.

Nei limiti di quanto riportato il metodo può essere utilizzato per una valutazione del raggiungimento della fase di crescita stazionaria durante l'esecuzione del test algale per la determinazione dello stato trofico delle

acque superficiali, utilizzando poi un metodo più affidabile per la valutazione finale della massima crescita algale.



Appendice n. 8

Scheda di lavoro per la valutazione dello stato trofico

Campione	Data prelievo	Data inizio test	Alga test:
Stato Trofico Aggiunte	Gorni dall'inoculo	MCA	t
a			
b			
c			
P			
a			
b			
c			
N			
a			
b			
c			
NP			
a			
b			
c			
MC			
a			
b			
c			
Tossicità Campione 100%			
a			
b			
c			
Tossicità Controllo			
a			
b			
c			

Appendice n. 9

Scheda di lavoro per la valutazione della tossicità

Campione		Data prelievo				Data inizio test				Alga test:	
Conc.	Giorni dall'inoculo	CA	M	DS	CV	V	D	t	Significatività: $\alpha=0.05$		
									Test t a due code	CA=Crescita algale 96h	M=Media
a											
b											
c											
a											
b											
c											
a											
b											
c											
a											
b											
c											
a											
b											
c											
a											
b											
c											
a											
b											
c											
a											
b											
c											
Note	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Risultato Firma </div>										

Appendice n. 10

Controllo di qualità test algale.

Controllo di precisione con preparazione della carta di controllo eseguita come riportato nel punto 8.1 del Cap. III.2.

Organismo utilizzato: *Dunaliella tertiolecta*.

Sostanza utilizzata: bicromato di potassio - $K_2Cr_2O_7$.

Concentrazione della soluzione di partenza:

1000 mg/L come $K_2Cr_2O_7$ ovvero 353 mg/L come cromo.

Soluzioni di lavoro espresse come mg/L di cromo: 5; 10; 20; 30; 40.

Carta di controllo: periodo 17/06/93 - 11/05/96

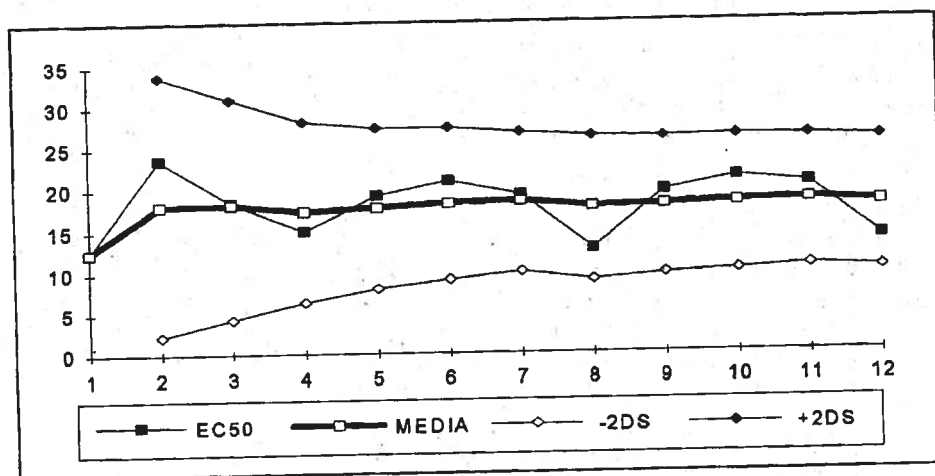


Tabella relativa alla carta di controllo: periodo 17/06/93 - 11/05/96

Data	EC50-96h	Media	- 2DS	+2DS	C.V.
17/06/93	12,4				
06/07/93	23,6	18,0	2,2	33,8	44
28/09/93	18,4	18,1	4,3	32,0	38
08/10/93	15,0	17,3	6,4	28,2	31
29/10/93	19,2	17,7	8,0	27,4	27
30/11/93	20,9	18,2	9,1	27,4	25
01/02/94	19,2	18,4	10,0	26,8	23
04/06/94	12,7	17,7	9,0	26,3	24
27/02/96	19,6	17,9	9,7	26,1	23
07/03/96	21,2	18,2	10,1	26,3	22
14/03/96	20,4	18,4	10,6	26,2	21
11/05/96	14,0	18,0	10,2	25,9	22

Appendice n. 11

Determinazione del rapporto ottimale di assorbimento dei nutrienti azoto e fosforo in *D. tertiolecta*.

Per verificare l'ipotesi che il mezzo di coltura sia limitato dal fosforo e per valutare meglio le esigenze nutrizionali di *D. tertiolecta* sono state eseguiti due saggi algali con lo scopo di individuare il rapporto ottimale di assorbimento dei due nutrienti principali: azoto e fosforo. Il piano sperimentale è quello descritto da Chiaudani e Vighi (IRSA, 1978) (richiamato anche nel Cap. II.2, punto 8.1.7), parzialmente modificato.

Curva di crescita del fosforo

È stato utilizzato il mezzo di coltura riportato nel Cap. II.2, punto 2.3. Con tale terreno sono state preparate 8 soluzioni con concentrazione di fosforo crescente; le soluzioni di fosforo sono riportate in tabella 1. Con ogni soluzione sono state preparate due repliche.

Concentrazione di azoto nel mezzo di coltura: 4200 $\mu\text{g/L}$;

Soluzione fosforo P2: 18,6 mg/L;

Preparazione della soluzione P2: portare 1 mL della soluzione P (soluzione n.2 riportata al punto 2.3 del Cap. II.2) a 10 mL con acqua ultrapura.

Tabella 1: Preparazione delle soluzioni contenenti le aggiunte di fosforo.

Conc. P $\mu\text{g/L}$	mL della sol.ne P2 da aggiungere a 100 mL	rapporto N/P
12,3	0,066	34,0
18,6	0,100	22,6
31	0,167	13,5
46,7	0,251	9,0
62	0,333	6,8
93	0,500	4,5
124	0,667	3,4
186	1,000	2,3

Le condizioni di incubazione sono state quelle riportate al Cap. II.2, punto 7.2.6, l'inoculo algale è stato eseguito come riportato nel Cap. II.2, punto 3.6.

La crescita algale è stata misurata mediante il valore della MCA espresso come densità cellulare (numero di cellule·10³/mL).

L'andamento della crescita algale è riportato nel grafico denominato "Curva del fosforo".

Curva di crescita dell'azoto

È stato utilizzato il mezzo di coltura riportato nel Cap. II.2, punto 2.3 con concentrazione ridotta al 10% e privo di azoto. Con tale terreno sono state preparate 8 soluzioni con concentrazione di azoto crescente; le soluzioni di azoto sono riportate in tabella 2. Con ogni soluzione sono state preparate due repliche.

Concentrazione di fosforo nel mezzo di coltura al 10%: 18,6 µg/L;
Soluzione azoto N4: 4,2 mg/L;

Preparazione della soluzione N4: portare 0,1 mL della soluzione N (soluzione n.1 riportata al punto 2.3 del Cap. II.2) a 100 mL con acqua di mare preparata come riportato nel Cap. II.2, punto 2.2.

Tabella 2: Preparazione delle soluzioni contenenti le aggiunte di azoto.

Conc. N µg/L	mL della sol.ne N4 da aggiungere a 100 mL	rapporto N/P
21	0,500	1,1
42	1,000	2,3
63	1,500	3,4
84	2,000	4,5
126	3,000	6,8
210	5,000	11,2
315	7,500	16,9
420	10,000	22,6

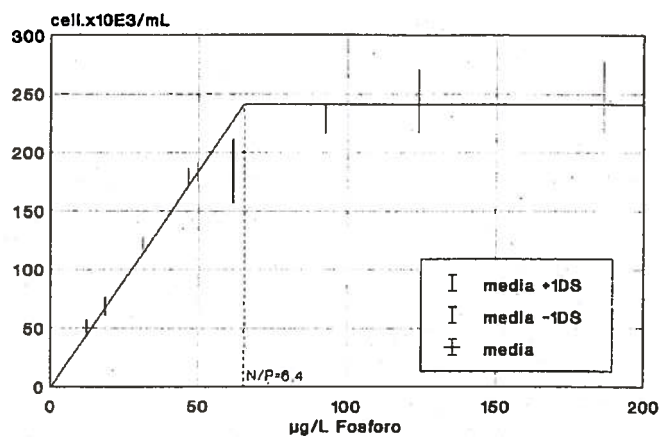
Le condizioni di incubazione sono state quelle riportate al Cap. II.2, punto 7.2.6, l'inoculo algale è stato eseguito come riportato nel Cap. II.2, punto 3.6.

La crescita algale è stata misurata mediante il valore della MCA espresso come densità cellulare (numero di cellule $\cdot 10^3/\text{mL}$).

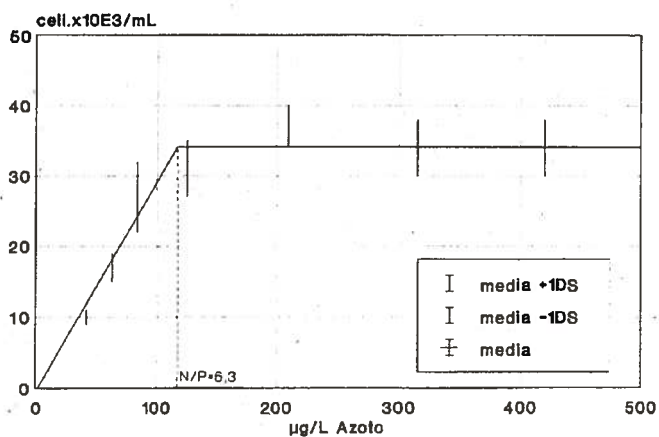
L'andamento della crescita algale è riportato nel grafico denominato "Curva dell'azoto".

Esaminando i due grafici si evidenzia che la crescita algale tende ad aumentare con l'incremento della concentrazione dell'elemento aggiunto, il quale si comporta come fattore limitante. Quando la concentrazione dell'elemento limitante raggiunge il rapporto di assimilazione ottimale rispetto alla concentrazione dell'altro nutriente la crescita algale si ferma. Ulteriori incrementi dell'elemento aggiunto determinano la limitazione della crescita da parte dell'elemento già presente a concentrazione costante nel mezzo di coltura causando variazioni non significative della risposta di crescita.

Curva del Fosforo



Curva dell'Azoto



Sigle utilizzate nel testo

CA96: Crescita algale misurata dopo un periodo di incubazione di 96 ore.

CTC: Carico Tossico Complessivo.

EC50^{96h}: Concentrazione Efficace Mediana calcolata dopo 96 ore di incubazione.

FCB: Fattore di Conversione in Biomassa.

FCD: Fattore di Conversione in Densità cellulare. Il fattore di conversione FCD deve essere calcolato mediante il sistema della regressione lineare tra conteggi cellulari e le altre misure strumentali.

FPB: Fattore di Produzione di Biomassa.

LOEC: Lowest Observed Effect Concentration.

MCA: Massima Crescita Algale.

MVC: Massima Velocità di Crescita algale.

NOEC: No Observed Effect Concentration.

UT: Unità Tossiche. $UT = 100/EC50$

VGM: Volume Globulare Medio.

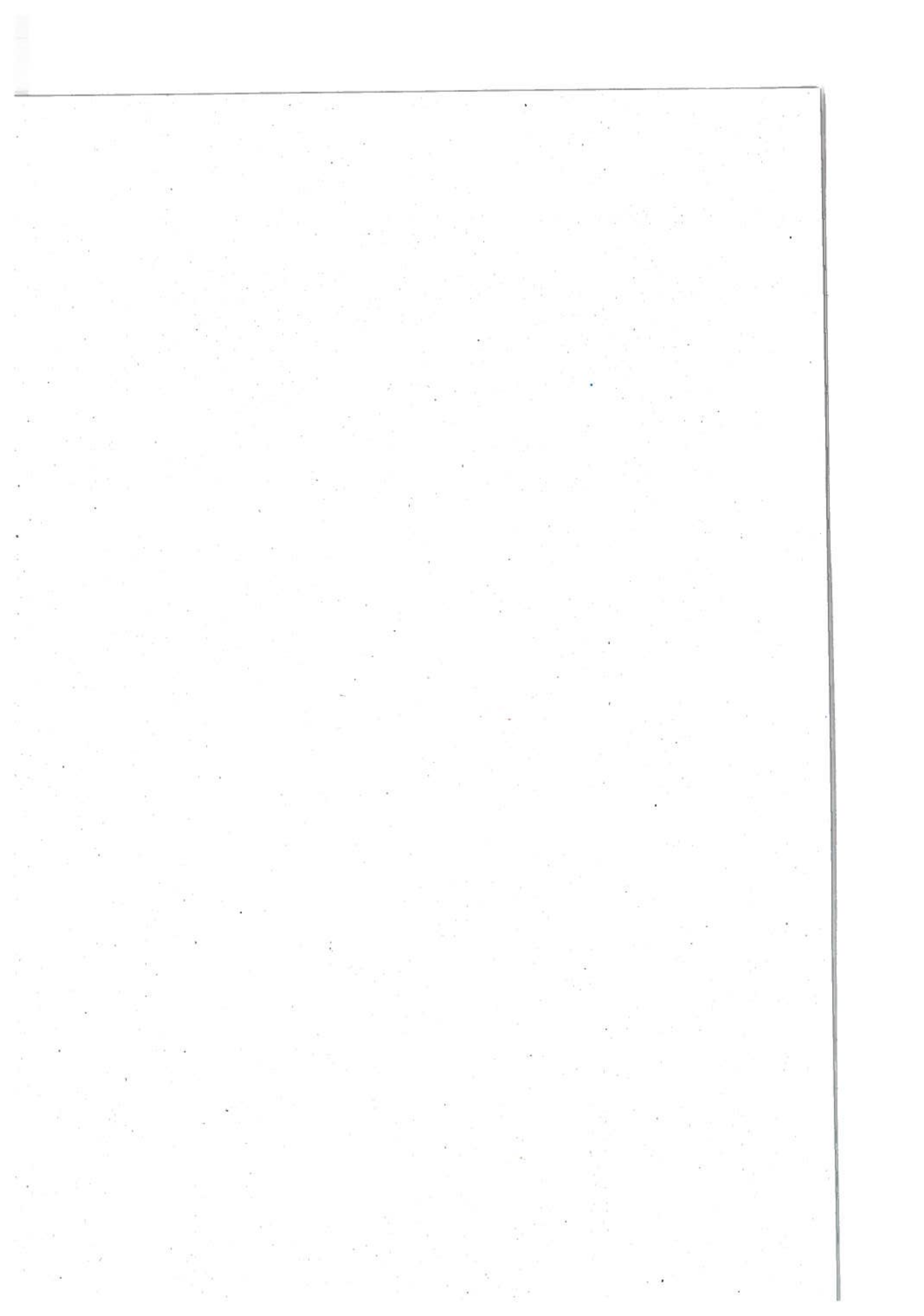
Ringraziamenti

Si ringrazia per la messa a punto dei sistemi di analisi statistica la Dr.ssa Barbara Bracci del Servizio Sub-Provinciale ARPAT di Piombino.

Si ringrazia per le prove sperimentali il personale tecnico di laboratorio del Servizio Sub-Provinciale ARPAT di Piombino, Sig.ra Lorella Brillì e Sig.ra Stefania Milani.

Si ringrazia per la sperimentazione relativa ai terreni colturali la Dr.ssa Monica Carmignani.

Si ringrazia inoltre la Sig.ra Cristina Pastorelli per aver curato con particolare attenzione la qualità della vetreria utilizzata nei saggi algali.



Bibliografia

- APHA-AWWA-WEF (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18th ed.
- ASTM, (1986). *Standard practice for algae growth potential testing with Selenastrum capricornutum*. Designation D 3978-80, in American Society for Testing and Materials, Annual Book of ASTM Standards. Water and Environmental technology. Section 11. Vol.11.04:27-32.
- Bonin D. J., M. R. Droop, S. Y. Maestrini and M. C. Bonin, (1986), *Physiological features of six micro-algae to be used as indicators of seawater quality*, "Cryptogamie, Algologie", 7:23-83.
- Bucci M. and G. Sbrilli, (1992), *The Dunaliella tertiolecta test, a marine Algal assay procedure*. INVITTOX Protocol n. 45, Nottingham, England.
- Butler G. L., (1977), *Algae and pesticides*, "Residue Rev.", 66:19-62.
- Chiaudani G. e M. Vighi, (1977), *Applicazione di un saggio algale standard per lo studio di fenomeni di tossicità*, "Nuovi Annali d'Igiene e Microbiologia", 3:145-163.
- Colton T., (1979), *Statistica in medicina*, Traduzione di E. Marubini, Piccin Editore. Padova.
- Draper N. R., H. Smith, (1968), *Applied Regression Analysis*. John Wiley and Sons.
- Elnabarawy, W. T., A. N. Welter, (1984), *Utilization of algal cultures and assays by industry*, in *Algae as ecological indicators*, L. Elliot Shubert ed., Academic Press, 317-328.
- EPA, (1974), *Marine algal assay procedure bottle test*. Eutrophication and Lake Restoration Branch, National Environmental Research Center, Corvallis, Oregon.
- 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, EPA-600/9-78-018.
- EPA, (1982), *Second US/USSR Symposium: biological aspects of pollutant effects on marine organisms*, Environmental Research Laboratory, Corvallis, Oregon 97333, EPA-600/3-82-034.
- 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, EPA-600/4-85/014.
- EPA, (1988), *Methods for toxicity tests of single substances and liquid complex wastes with marine unicellular algae*, Environmental Research Lab., Gulf Breeze, FL. EPA-600/04.
- EPA, (1991), *Technical support document for water quality-based toxics control*, Office of Water Enforcement and Permits, Office of Water Regulations and Standards, Washington, EPA/505/2-90-001.
- EPA, (1991a), *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving Waters to freshwater and marine organisms*, 4th ed., Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OHIO, EPA-600/4-90-027.
- Finney D.J., (1971), *Probit analysis*, Cambridge University Press, London.
- Frumin G. T., G. M. Chuiko, D. F. Pavlov and O. V. Menzykova, (1992), *New rapid method to evaluate the median effect concentrations of xenobiotics in hydrobionts*, "Bull. Environ. Contam. Toxicol." 49:361-367.
- Gaggi C., G. Sbrilli, A.M. Hasab El Naby, M. Bucci, M. Duccini, E. Bacci, (1995), *Toxicity and hazard ranking of s-triazine herbicides using Microtox(r), two green algal species and a marine crustacean*, "Environmental Toxicology and Chemistry", 6:1065-1069.
- Grothe D. R., R. A. Kimerle C. D. Malloch, (1990), *A perspective on biological assessment*, "Water Environmental & Technology", 4:62-67.
- IRSA, (1978), *Metodologia di saggio algale per lo studio della contaminazione delle acque marine*, "Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque", 39, IRSA-CNR, Milano.
- IRSA, (1994), *Metodi analitici per le acque*, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma.
- IRSA, (1996), *Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti*, CNR - Istituto di ricerca sulle acque, "Notiziario dei metodi analitici", giugno 1996, 1-8.
- IRSA-CNR, (1977), *Metodiche analitiche per le acque*, Roma

- Joubert G., (1981), *Etude comparative des reactions a la toxicité, entre la truite Salmo gairdneri et quatre autres intégrateurs biologiques sur 36 cas de bioessais statiques.*, in Proceedings of the Seventh Annual Aquatic Toxicity Workshop, November 5-7, 1980, Montreal, Quebec. 990:519.
- Joubert G. (1983). *Detailed method for quantitative toxicity measurements using the green algae Selenastrum capricornutum*, in *Aquatic Toxicology - Advanced in Environmental Science and Technology* (J.Q., Nriagu Ed.), John Wiley & Sons, vol. 13:467-485.
- Lison L., (1961), *Statistica applicata alla biologia sperimentale*, Casa Editrice Ambrosiana. Milano.
- Lustigman B., J. Korkoy, A. Zabady, J. M. McCormick, (1985), *Absorption of Cu++ by long-term cultures of Dunaliella salina, D. Tertiolecta, and D. Viridis*, "Bull. Environ. Contam. Toxicol.", 35:362-367.
- Lustigman B., J. M. McCormick, G. Dale, J.J.A. McLaughlin, (1987), *Effect of increasing copper and salinity on glycerol production by Dunaliella salina*, "Bull. Environ. Contam. Toxicol.", 38:359-362.
- Mc Lachlan J., (1960), *The culture of Dunaliella tertiolecta Butcher a euryaline organism*, "Can. J. Microbiol.", 6:367-379.
- Mingazzini M., (1993), *Comparison of different methods for quantitative toxicity measurements on natural waters using S. Capricornutum*, "Wat. Res." 6:1055-1062.
- Mingazzini M., A. Berri, (1991), *Indagini biologiche con saggi algali*, atti del Convegno: La qualità delle acque del fiume Po negli anni '90, Ferrara, 18-20 aprile 1991, Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque n.92.
- Mosser J. L., N. S. Fisher and C. F. Wurster, (1972), *Polychlorinated biphenyls and DDT alter species composition in mixed cultures of algae*, "Science" 176 :533-535.
- Nemetz P. and N. D. Drechsler, (1978), *The role of effluent monitoring in environmental control*, "Water Air Soil Pollut.", 10:477-497.
- Nyholm N. and J. E. Lyngby, (1988), *Algal bioassays in eutrophication research - a discussion in the framework of a mathematical analysis*, "Wat. Res.", 10:1293-1300.
- Nyholm N. and T. Kallqvist, (1989), *Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae*, "Environmental Toxicology and Chemistry", 8:689-703.
- Pace F., R. Ferrara and G. Del Carratore, (1977), *Effects of sub-lethal doses of copper sulphate and lead nitrate on growth and pigment composition of Dunaliella salina Teod.*, "Bull. Environ. Contam. Toxicol.", 6:679-685.
- Pasquinelli F. (1978), *Manuale per tecnici di laboratorio*, Ed. Rosini, Firenze.
- Pearson E. S. and H.O. Hartley, (1966), *Biometrika tables for statisticians* (3rd ed.), vol.1, Cambridge University Press, Cambridge.
- Persone G., *Development and first validation of a "(stock) culture free" algal microbioassay: the algaltoxit*, in: Wells P.G., K. Lee and C. Blaise (Eds) *Microscale aquatic toxicology, advances, techniques and practice*, CRC Lewis Publishers (in corso di stampa).
- 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.
- Pun K. C., R. Y. H. Cheung and M. H. Wong, (1995), *Characterization of sewage sludge and toxicity evaluation with microalgae*, Marine Pollution Bulletin, 31:394-401.
- Sbrilli G., M. Bucci and R. Luti (1990), *Saggio algale di tossicità. Utilizzazione di Dunaliella tertiolecta nella valutazione degli effetti biologici di scarichi industriali a prevalente componente marina*, Acqua Aria, 6:483-489.
- Sbrilli G., M. Bucci, L. Brilli and F. Gambassi, (1995), *Utilizzazione di test di tossicità nel controllo degli scarichi industriali*, Acqua Aria, 5:539-548.
- Stumm W. and J. J. Morgan, (1980), *Aquatic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, NY.
- Trainor F. R., (1984), *Indicator algal assays: laboratory and field approaches*, in *Algae as ecological indicators*, Shubert L.E. (Ed.), Academic Press.
- Van Coillie, R., S. A. Visser, P. Couture, (1981), *Utilisation de bioessais avec des algues pour l'étude des répercussions liées à la mise en eau des réservoirs*, Ann. Limnol., 17:79-91.

- Van Coillie R., P. Couture and S.A. Visser, (1983), *Use of algae in aquatic ecotoxicology*, in *Aquatic Toxicology - Advanced in Environmental Science and Technology* (J.O., Nriagu Ed.), John Wiley & Sons, vol. 13:487-502.
- Volterra L., (1996), *L'Ecotossicologia come strumento di salvaguardia ambientale*. Normativa straniera e italiana, "Acqua Aria", 4:365-369.
- Walsh G. E., S. V. Alexander, (1980), *A marine algal bioassay method: results with pesticides and industrial wastes*, "Water Air Soil Pollut.", 13:45-55.
- Walsh G. E., L. H. Bahner (1980), *Toxicity of textile mill effluents to freshwater and estuarine algae, crustaceans and fishes*, "Environmental Pollution" (Series A), 21:169-179.
- Walsh G. E., R. G. Merrill, (1984), *Algal bioassays of industrial and energy process effluents, in Algae as ecological indicators*, Shubert L.E. (Ed.), Academic Press.
- Walsh G. E., K. M. Duke and R.B. Foster, (1982), *Algae and crustaceans as indicators of bioactivity of industrial wastes*, "Water Res.", 16:879-883.
- Walsh G. E. and C. H. Deans, L. L. McLaughlin, (1987), *Comparison of the EC50s of algal toxicity tests calculated by four methods*, "Environmental Toxicology and Chemistry", 6:767-770.