

Esercizi di intercalibrazione del test di LC₅₀ con *Corophium orientale* (Schellenberg, 1928)

LC₅₀ intercomparison tests with *Corophium orientale* (Schellenberg, 1928)

L. Dentone¹, M. Picone², E. Prato³, F. Biantolino³, D. Traldi⁴, T. Leoni⁵, A. Valenti⁵, E. Rossi⁶, F. Porrone⁷, I. Buttino^{1,8}, E. Giacco⁹, O. Faraponova¹⁰, S. Macchia¹

¹ ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale-Livorno; ² Thetis; ³ CNR IAMC Taranto; ⁴ Shoreline; ⁵ ARPA Marche; ⁶ ARPA Liguria; ⁷ CNR-ISMAR Genova; ⁸ Staz. Zool. A. Dohrn Napoli; ⁹ Università di Genova; ¹⁰ ISPRA - Roma

Introduzione

Il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare ha richiesto ad UNICHIM (Ente Nazionale di Unificazione) di definire e standardizzare dei protocolli metodologici per la conduzione di saggi di tossicità acuta e cronica con crostacei endemici del Mar Mediterraneo per la valutazione della tossicità di prodotti disperdenti ed assorbenti, in sostituzione del crostaceo *Mysidopsis bahia*, specie prevista dal D.D. 23.12.2002.

Un primo progetto di ricerca ha portato all'individuazione delle specie di crostacei più idonee alla valutazione di tali prodotti tra quelle utilizzate per l'esecuzione di saggi biologici nei laboratori afferenti ad UNICHIM. Un successivo progetto di ricerca ha come scopo la stesura di protocolli per la conduzione di test ecotossicologici con le specie individuate dal precedente progetto e la loro standardizzazione tramite esercizi di intercalibrazione con sostanze tossiche di riferimento comunemente utilizzate. Una delle sei specie risultate idonee per la valutazione della tossicità di prodotti disperdenti ed assorbenti è l'anfipode estuarino *Corophium orientale* (Schellenberg, 1928) (Fig. 1) endemico del Mediterraneo (Ruffo, 1982). Per questa specie è stato redatto un protocollo metodologico, da utilizzare nelle prove di intercalibrazione tra dieci laboratori italiani (Tab. 1), a cura dei laboratori ISPRA (ex-ICRAM) Sede Operativa di Livorno e Thetis,

Materiali e Metodi

Ad oggi sono state eseguite due prove di intercalibrazione, la prima nel settembre 2008 e la seconda nell'ottobre 2008. Gli organismi utilizzati per gli esercizi di intercalibrazione sono stati campionati lungo le rive della foce del fiume Magra (SP), dove è stata effettuata la selezione degli organismi di dimensioni ottimali per l'esecuzione del test (2-4 mm).

Gli organismi così campionati sono stati inviati ai laboratori partecipanti (Tab. 1) in contenitori in PVC contenenti acqua e sedimento del sito di campionamento. Una volta arrivati nei laboratori gli organismi sono stati posti per 24h in camera termostata alla temperatura di esecuzione del test ed in presenza di areazione. Il giorno successivo all'arrivo degli organismi è stata avviata la fase di acclimatazione alla salinità di esecuzione del test con acqua di mare naturale filtrata a 0,45 µm (35±2‰); l'aumento giornaliero medio della salinità è stato all'incirca del 5%. La sostanza tossica di riferimento utilizzata è stato il cadmio (Cd(NO₃)₂·4H₂O, soluzione standard per assorbimento atomico 1000 mg/l in Cd), come suggerito dal protocollo ISO 2005.



Fig. 1 *Corophium orientale* (Schellenberg, 1928)

Laboratori partecipanti	Acronimo
ISPRA - Livorno	Lab. 1
Thetis-Venezia	Lab. 2
Staz. Zool. A. Dohrn-Napoli	Lab. 3
CNR IAMC-Taranto	Lab. 4
ARPA-Liguria	Lab. 5
CNR-Genova	Lab. 6
Università Genova	Lab. 7
ARPA-Marche	Lab. 8
Shoreline-Trieste	Lab. 9
ISPRA-Roma	Lab. 10

Tab. 1 Laboratori partecipanti

Le concentrazioni utilizzate sono state 0,0-0,5-1,0-2,0-4,0 e 8,0 mg/l per la prima prova e 0,0-0,4-0,8-1,6-3,2 e 6,4 mg/l per la seconda prova; per ogni concentrazione sono state eseguite tre repliche con 20 organismi ciascuna.

Le concentrazioni sono state cambiate per l'esecuzione della seconda prova in quanto la concentrazione di 8 mg/l è risultata essere superflua poiché già a concentrazioni più basse si raggiunge una mortalità prossima al 100%; inoltre i valori di pH a questa concentrazione risultano essere inadeguati per l'esecuzione di questo test.

Il test è stato eseguito secondo il protocollo redatto da ISPRA-Thetis sulla base del Protocollo ISO 16712 :2005 e di progressi lavori condotti su questa specie (Bigongiari *et al.* 2004). La durata del test è di 96h al termine delle quali è stata valutata la mortalità degli organismi; sono stati considerati morti gli eventuali anfipodi mancanti e quelli che, ad un'osservazione al microscopio ottico, non hanno mostrato alcun movimento degli arti o delle antenne.

Al termine di ogni prova, dai dati di mortalità ottenuti da ogni laboratorio sono stati calcolati i valori di LC₅₀ e i relativi limiti di confidenza al 95% tramite il metodo di Trimmed Sperman-Karber.

Risultati e Discussione

Prima prova

mg/l Cd	Lab. 1	Lab. 2	Lab. 3	Lab. 4	Lab. 5	Lab. 6	Lab. 7	Lab. 8	Lab. 9	Lab. 10
0,0	1,33±1,15	-	0,00±0,00	1,33±0,58	1,00±1,00	0,67±0,58	1,67±1,53	0,00±0,00	-	2,67±1,15
0,5	2,67±1,53	-	0,33±0,58	3,33±0,58	4,00±1,73	1,67±0,58	3,00±2,00	2,00±0,00	-	3,33±2,31
1,0	6,00±0,00	-	0,67±1,11	4,67±0,58	6,67±1,53	3,67±0,58	6,33±1,53	3,33±0,58	-	8,33±1,15
2,0	10,00±1,73	-	11,00±1,73	11,33±3,51	10,67±1,53	14,00±1,73	15,00±3,61	13,00±2,00	-	8,67±1,53
4,0	16,33±2,08	-	19,33±1,15	19,00±0,00	15,33±3,06	18,67±1,15	19,33±1,15	18,00±2,00	-	18,33±2,89
8,0	20,00±0,00	-	20,00±0,00	19,67±0,58	20,00±0,00	20,00±0,00	20,00±0,00	20,00±0,00	-	20,00±0,00

Tab. 2 Risultati della prima prova

Laboratorio	LC ₅₀	UL	LL
Lab. 1	1,94	2,27	1,65
Lab. 2	test non eseguito*	-	-
Lab. 3	1,92	2,13	1,74
Lab. 4	1,78	2,07	1,54
Lab. 5	1,83	2,24	1,49
Lab. 6	1,61	1,82	1,42
Lab. 7	1,42	1,62	1,24
Lab. 8	1,66	1,91	1,44
Lab. 9	test non accettabile**	-	-
Lab. 10	1,87	2,15	1,63

Tab. 4 LC₅₀ prima prova

Media LC ₅₀	d.s.	c.v. %
1,75	0,18	10,18

Tab. 4 LC₅₀ prima prova

* Parametri chimici delle soluzioni al di fuori del range di accettabilità
** Mortalità nel controllo > 15%

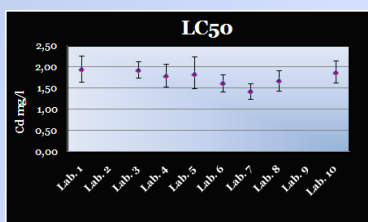


Fig. 2 Grafico delle LC₅₀ ottenute dalla prima prova

Specie test / sostanza di riferimento	c.v. %
<i>Corophium volutator</i> / Bithan battericide	24,2
<i>Corophium volutator</i> / Ivermectin	28,0
<i>Mysidopsis bahia</i> / CuSO ₄	13,6
<i>Mysidopsis bahia</i> / SDS	35,5

Tab. 6 Coefficienti di Variazione ottenuti in alcuni esercizi di intercalibrazione

Seconda prova

mg/l Cd	Lab. 1	Lab. 2	Lab. 3	Lab. 4	Lab. 5	Lab. 6	Lab. 7	Lab. 8	Lab. 9	Lab. 10
0,0	2,00±1,00	0,00±0,00	0,33±0,58	2,33±0,58	0,67±0,58	0,33±0,58	1,33±1,15	0,67±0,58	0,33±0,58	1,33±1,53
0,4	4,33±1,53	1,67±1,15	3,33±1,53	2,67±2,08	2,00±1,00	3,67±1,53	3,67±1,53	1,67±0,58	1,67±0,58	4,67±1,53
0,8	8,33±0,58	8,00±1,00	7,00±2,65	9,67±3,06	6,00±1,00	5,00±1,00	7,00±2,65	6,00±2,65	3,67±0,58	5,67±0,58
1,6	18,00±1,00	11,33±1,53	15,33±1,53	17,33±0,58	12,67±1,15	13,00±2,00	14,00±1,00	16,00±1,00	8,33±2,08	7,67±2,08
3,2	19,33±0,58	16,67±2,08	20,00±0,00	19,33±0,58	18,33±0,58	17,67±1,15	19,33±0,58	17,00±0,00	14,67±2,52	20,00±0,00
6,4	20,00±0,00	19,67±0,58	20,00±0,00	20,00±0,00	20,00±0,00	20,00±0,00	20,00±0,00	19,33±0,58	19,67±0,58	20,00±0,00

Tab. 3 Risultati della seconda prova

Laboratorio	LC ₅₀	UL	LL
Lab. 1	0,91	1,03	0,80
Lab. 2	1,23	1,45	1,04
Lab. 3	0,99	1,16	0,85
Lab. 4	0,86	1,01	0,74
Lab. 5	1,24	1,43	1,07
Lab. 6	1,25	1,50	1,05
Lab. 7	1,12	1,31	0,95
Lab. 8	1,16	1,33	1,00
Lab. 9	1,84	2,16	1,57
Lab. 10	1,67	2,01	1,40

Tab. 5 LC₅₀ seconda prova

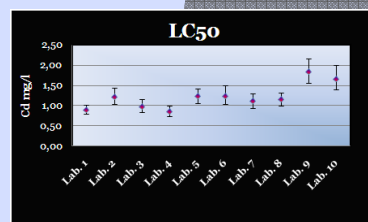


Fig. 3 Grafico delle LC₅₀ ottenute dalla seconda prova

Media LC ₅₀	d.s.	c.v. %
1,23	0,31	25,48

I test di entrambe le prove sono risultati accettabili, ad eccezione del test eseguito da un laboratorio nella prima prova (Lab. 9), in quanto la mortalità nel controllo è risultata inferiore al 15%, come indicato nel Protocollo ISO 2005.

Nelle tabelle 2 e 3 sono riportati i valori di mortalità ottenuti dai vari laboratori al termine di ogni prova. I valori di LC₅₀ ed i relativi limiti di confidenza al 95% sono stati ottenuti elaborando i dati di mortalità forniti dai laboratori partecipanti tramite il metodo di TrimmedSperman-Karber (Tab. 4 e Fig. 2; Tab. 5 e Fig. 3). La media delle LC₅₀ per la prima prova è stata di 1,75±0,18 mg/l e per la seconda è stata di 1,23±0,31 mg/l. I coefficienti di variazione per la prima e la seconda prova sono stati rispettivamente 10,18% e 25,48%; tali valori sono confrontabili con valori riportati in letteratura (ISO 2005; Morrison *et al.*, 1985) per esercizi di intercalibrazioni eseguiti con diverse specie test (Tab. 6).

Il progetto prevede l'esecuzione di almeno tre prove di intercalibrazione, i risultati delle prime due prove finora eseguite fanno presupporre che il protocollo proposto abbia una buona riproducibilità interlaboratorio e quindi possa essere proposto per la valutazione di sostanze inquinanti tra cui i prodotti disperdenti come richiesto da UNICHIM.

Bibliografia

Bigongiari N., Braidà T., Carretti F., Pellegrini (2004). Influence of temperature on the mortality and sensitivity of *Corophium orientale*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72 (5): 881-887.
ISO (2005). Water quality: Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods, 16712.
Morrison G., Torello E., Comeleo R., Walsh R., Kuhn A., Burgess R., Tagliabue M., Greene W. (1989). Intralaboratory precision of saltwater short-term chronic toxicity tests. *Research Journal WPCF*, Volume 61, Numbers 11/12: 1707-1710.
Ruffo S. (1982). The Amphipoda of the Mediterranean. *Memories de l'Institut Oceanographique*, 13:364.