

# STANDARDIZATION OF ACUTE TOXICITY ASSAY USING EUROPEAN SEA BASS (*DICENTRARCHUS LABRAX*, L., 1758) LARVAE: II<sup>nd</sup> INTERCALIBRATION EXERCISE

Mariani<sup>1</sup>, F. Savorelli<sup>1</sup>, De Luca Picione<sup>2</sup>, F. Del Prete<sup>5</sup>, E. Di Capua<sup>7</sup>, B. Di Lorenzo<sup>1</sup>, F. Gelli<sup>3</sup>, E. Giacco<sup>4</sup>, A.L. Langellotti<sup>5</sup>, S. Manzo<sup>2</sup>, P. Masullo<sup>5</sup>, A. Mazzola<sup>6</sup>, P. Pizzolo<sup>3</sup>, L. Pane<sup>4</sup>, G. Sansone<sup>5</sup>, G. Sbrilli<sup>7</sup>, M. Vacri<sup>7</sup>.

Roma: <sup>2</sup>ENEA, Portici Napoli; <sup>3</sup>IPED, E.R. (sez.Fe), Università di Genova; <sup>5</sup>Università Federico II, Napoli; <sup>6</sup>ARPA Sicilia (sez.SR); <sup>7</sup>ARPAT Toscana (sez.GR).

l.mariani@icram.org

## Obiettivo

Utilizzo dei pesci nei test ecotossicologici per la valutazione della qualità ambientale delle acque costiere, evidenza della necessità di disporre di metodiche specifiche e conformi a specie ittiche autoctone e fruibili sul territorio nazionale, com'è richiesta dalla Direttiva Italiana: D. Lgs.152/99 (agg. D. Lgs. 152/06), D.D. del 23/12/2002. L'esigenza emerge in adempimento al Regolamento Comunitario Europeo sulle Sostanze Chimiche (REACH, EC n.1907/2006), che impone per la determinazione della tossicità, attraverso l'impiego di pesci, indicando specie marine alloctone. L'adozione di protocolli UNI o ISO per pesci marini mediterranei, diffusamente allevati (spigola ed orata) e maggiormente utilizzati (L. 2005; Masini *et al.*, 2007, Mariani *et al.* 2006), ha sinora comportato la progressiva messa a punto di metodiche idonee a l'adattamento di protocolli approvati per altre specie (OECD n. 203; OECD n. 204; OSPAR, 2005). L'obiettivo è di standardizzare e normare un protocollo per test acuti specifico per la spigola (*Dicentrarchus labrax*) ed applicabile ad altre mediterranee, è stato svolto dal Gruppo di Lavoro *ad hoc* "PESCI" (UNICHIM) un II esercizio di interconfronto, i cui risultati sono oggetto di questo lavoro.

## Obiettivi

Valutare:

- la variabilità dei risultati ottenuti da differenti laboratori italiani
- la trasferibilità del metodo sperimentale

Standardizzare:

un metodo per la valutazione della tossicità acuta a breve termine specifico per la spigola (*Dicentrarchus labrax*)

## Materiali e Metodi

**Specie utilizzata:** spigola (*D. labrax*) (L.S.:  $17.31 \pm 1.54$  mm; età: 70 gg), pesci provenienti dallo stesso lotto di deposizione.

**Località del lotto di organismi utilizzati:** impianto di Piscicoltura Civitavecchia, Roma (Gruppo Pizzolo).

**Alimentazione degli organismi:** per 7 giorni prima dell'utilizzo nei saggi; alimentazione: naupli di *Artemia sp.*

**Modalità di esecuzione dell'esercizio di interconfronto:**

**Partecipanti:** n. 7

**Protocollo di riferimento:** OECD 203.(1992), per pesci alloctoni dolciacquicoli, modificato per larve di spigola.

**Reattivo di riferimento prescelto:** Sodio dodecil solfato (SDS)

**Concentrazioni utilizzate:** 6,31-3,98-2,51-1,58-1,00 mg/L

**Tabella TEST:** vedi tabella 1

Confronto con il precedente esercizio, l'interconfronto è stato condotto con la procedura formulata e condivisa dal GdL PESCI.

Il laboratorio ha eseguito contemporaneamente **due test acuti (48h)**, con lo stesso lotto di organismi alle medesime condizioni sperimentali. Per determinare la variabilità dei risultati intra- ed intergruppo, sono stati utilizzati i valori di **LC50 a 24h e a 48h di ogni singola replica** utilizzando il software statistico per il metodo *Trimmed Spearman-Kärber*. Sono stati ottenuti, pertanto, 3 valori di LC50 per ciascun test effettuato e il valore medio di LC50 per ciascun laboratorio (Figura 2).

La **variabilità intralaboratoria** è stata valutata mediante il coefficiente di variazione (CV%); la presenza tra i dati di **outliers** è stata valutata mediante l'applicazione del **test di Cochran**, che individua valori anomali fra le varianze.

La **variabilità interlaboratoria** è stata valutata di accettabilità del valore medio di LC50 di ogni laboratorio è stata effettuata sulla base dei **test di Z-score**, considerando accettabili i valori che rientravano nei limiti di confidenza del 95% e 99% (con  $\alpha=0,025$  e  $\alpha=0,005$ ). Un test di **interconfronto** è stato effettuato mediante il **test di Grubbs**.

I laboratori su 7 hanno completato l'esercizio con due prove (i laboratori 04 e 06, con una sola prova). I laboratori hanno ottenuto valori di LC50 compresi tra 3 mg/L e 5 mg/L, ad eccezione dei laboratori 04 e 05 che hanno valori inferiori a 3 mg/L.

I laboratori condotti hanno soddisfatto la condizione di accettabilità (mortalità del 50%) con una deviazione standard (0,56).

Il **test di Z-score di esposizione (Tabella 2):** tutti i laboratori presentano una bassa dispersione attorno al valore medio (CV% < 0,2), solo il laboratorio 02 presenta una dev. standard più elevata (0,56).

Il **test di Cochran** non ha rilevato il laboratorio 02 come **outlier** (a livello  $\alpha=0,05$ ).

Il **test di Z-score** per i valori medi di LC50 rientrano nell'intervallo dato dalla media complessiva (3,98±0,99 mg/L) ad eccezione dei laboratori 04 e 05.

I **test di Z-score** attribuiti ai laboratori rientrano tutti nell'intervallo di confidenza del 95% (Fig.3).

Il **test di Grubbs** non ha rilevato **outliers** (a livello  $\alpha=0,05$ ).

Il **test di Z-score di esposizione (Tabella 3):**

si conferma una bassa dispersione attorno al valore medio di LC50 (CV% < 0,2) a 48h il laboratorio 02 presenta una deviazione standard più elevata (0,59).

Il **test di Cochran** non ha rilevato il laboratorio 02 come **outliers** (a livello  $\alpha=0,05$ ).

Tabella 1 - Condizioni del test acuto con spigola (24-48h)

Tipo di test	statico
Alimentazione	assente
Aerazione	assente
Temperatura	21 ± 2 °C
Fotoperiodo	16 h luce / 8 h buio
Acqua di diluizione	acqua marina artificiale (Instant Ocean® in acqua deionizzata o MilliQ) maturata attraverso un filtro meccanico-biologico
Salinità	30±1 ‰
Densità	1 g/L (1 individuo/30mL)
Numero organismi per replica	10
Numero repliche	3 per concentrazione e per il controllo
Numero organismi per trattamento	30
End-point	mortalità
Accettabilità del saggio	mortalità nel controllo ≤ 10%
Statistica per calcolo 24-48h LC50	metodo Trimmed Spearman-Kärber



Figura 1 - a) specie utilizzata; b) bistabilizzazione; c) allestimento di un test acuto.

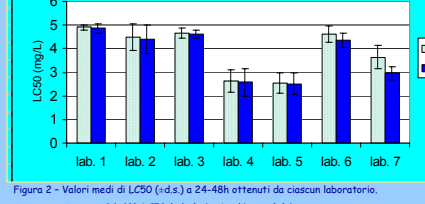


Figura 2 - Valori medi di LC50 (i.d.s.) a 24-48h ottenuti da ciascun laboratorio.

Average 24-48h LC50 (i.d.s.) obtained by each laboratory.

Tabella 2 - Statistiche descrittive dei valori di LC50 a 24h.

	LC50 media (mg/L)	deviazione standard (mg/L)	varianza	coeff. Variazione	errore standard
Lab 01	4,90	0,11	0,01	0,02	0,05
Lab 02	4,50	0,31	0,12	0,25	0,25
Lab 03	4,67	0,22	0,05	0,10	0,10
Lab 04	2,64	0,47	0,22	0,18	0,33
Lab 05	2,53	0,43	0,19	0,17	0,19
Lab 06	4,62	0,33	0,11	0,07	0,23
Lab 07	3,63	0,50	0,25	0,14	0,22

Tabella 3 - Statistiche descrittive dei valori di LC50 a 48h.

	LC50 media (mg/L)	deviazione standard (mg/L)	varianza	coeff. Variazione	errore standard
Lab 01	4,85	0,15	0,03	0,04	0,04
Lab 02	4,41	0,18	0,35	0,13	0,13
Lab 03	4,62	0,15	0,03	0,04	0,04
Lab 04	2,58	0,58	0,33	0,22	0,22
Lab 05	2,52	0,44	0,19	0,17	0,17
Lab 06	4,36	0,31	0,09	0,07	0,07
Lab 07	2,94	0,28	0,08	0,10	0,10

## Conclusioni

L'esercizio di interconfronto non ha evidenziato una significativa variabilità tra le Unità Operative partecipanti all'esercizio, indicando una buona trasferibilità del metodo sperimentale e una buona standardizzazione.

Pertanto, il metodo utilizzato sarà preso in considerazione per portare alla normalizzazione della procedura per l'esecuzione di test acuti con *Dicentrarchus labrax*, specie ittica mediterranea diffusamente allevata.

Si ringrazia, la dott.ssa A. Grispan, il dott. C. Magugliani e l'impianto di Piscicoltura di Tor Valdalgia (Civitavecchia-RM) del Gruppo Pizzolo per aver fornito il materiale biologico utile allo svolgimento delle sperimentazioni.

## Bibliografia:

<CICERO A. M., MARIANI L., SAVORELLI F., BONCARATI A., GELLI F., PALAZZI D., PREGNOLATO L. (2004) - Prove preliminari di interconfronto nella conduzione di saggi ecotossicologici con *Dicentrarchus labrax* (L.). Biol. Mar. Mediterr. 11 (2): 496-498.  
<D.D. del 23/12/2002 "Definizione delle procedure per il riconoscimento di idoneità dei prodotti fitofarmaci ed assorbenti da utilizzare per la bonifica della contaminazione da idrocarburi petroliferi", emanato dal Ministero dell'Ambiente e pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale.