

«C.20 Prova di riproduzione con *Daphnia magna*

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 211 (2012). Le linee guida dell'OCSE per le prove dei prodotti chimici sono periodicamente rivedute e aggiornate alla luce del progresso scientifico. La linea guida n. 211 sulla prova di riproduzione deriva dalla linea guida n. 202, parte II, Prova di riproduzione con *Daphnia sp.* (1984). È generalmente riconosciuto che i dati derivanti da prove effettuate secondo la linea guida n. 202 possono essere variabili. Per questa ragione sono stati intrapresi notevoli sforzi per identificare i motivi alla base di questa variabilità, con l'obiettivo di produrre un metodo di prova migliore. La linea guida n. 211 si basa sui risultati di tali attività di ricerca, su prove interlaboratorio e su studi di validazione effettuati nel 1992 (1), 1994 (2) e 2008 (3).

Le principali differenze tra la versione iniziale (linea guida n. 202, 1984) e la seconda versione (linea guida n. 211, 1998) della linea guida sulla prova di riproduzione sono le seguenti:

- la specie raccomandata da utilizzare è la *Daphnia magna*;
- la durata della prova è di 21 giorni;
- per le prove semistatiche, il numero di animali da utilizzare per ciascuna concentrazione di prova è stato ridotto, passando da almeno 40, preferibilmente suddivisi in quattro gruppi di 10 animali, ad almeno 10 animali trattati individualmente (sebbene sia possibile utilizzare diversi modi operativi per le prove a flusso continuo);

- sono state formulate raccomandazioni più specifiche in merito al mezzo di prova e alle condizioni di alimentazione.
- Le principali differenze tra la seconda versione della linea guida sulla prova di riproduzione (n. 211, 1998) e la presente versione sono le seguenti:
 - è stata aggiunta l'appendice 7 per descrivere le procedure per l'identificazione del sesso dei neonati, se necessario. In linea con le precedenti versioni del presente metodo di prova il rapporto numerico tra i sessi è un endpoint facoltativo;
 - la variabile di risposta espressa dal numero di piccoli vivi prodotti da ciascun animale genitore superstite è stata completata con l'aggiunta di una variabile di risposta supplementare inerente alla riproduzione della *Daphnia*, vale a dire il numero totale di piccoli vivi prodotti alla fine del test da ciascuna *Daphnia* riproduttrice presente all'inizio del test, escludendo dall'analisi la mortalità parentale accidentale e/o casuale. Questa variabile di risposta è stata aggiunta allo scopo di allineare questo parametro con gli altri metodi di prova sulla riproduzione di invertebrati. Inoltre, il presente metodo di prova consente di eliminare una fonte di errore che incide su questa variabile, ossia l'effetto della mortalità parentale casuale e/o accidentale eventualmente osservata durante il periodo di esposizione.
- Sono state aggiunte altre indicazioni statistiche per il disegno sperimentale e per il trattamento dei risultati, sia per l'EC_x (es. EC₁₀ o EC₅₀) sia per l'approccio basato sulla NOEC/LOEC.
- È stata inserita una prova limite.

L'appendice 1 contiene le definizioni dei termini utilizzati.

PRINCIPIO DELLA PROVA

Il principale obiettivo della prova è valutare l'effetto delle sostanze chimiche sulla capacità riproduttiva di *Daphnia magna*. A tal fine giovani femmine di *Daphnia* (animali riproduttori), di età inferiore alle 24 ore al momento dell'inizio della prova, vengono esposte alla sostanza chimica in esame aggiunta all'acqua a un intervallo di concentrazioni diverse. La durata della prova è di 21 giorni. Alla fine della prova, viene verificato il numero totale di piccoli vivi prodotti. La capacità riproduttiva degli animali parentali può essere espressa in altri modi (ad esempio, con il numero dei piccoli vivi prodotti giornalmente da ciascun animale a partire dal primo giorno di comparsa della prole) ma questi dati dovrebbero essere riportati solo ad integrazione del numero totale di piccoli vivi prodotti alla fine del test. A causa della particolare concezione della prova semistatica rispetto ad altri metodi di prova sulla riproduzione di invertebrati, è altresì possibile contare il numero di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore. In questo modo, contrariamente ad altri metodi di prova sulla riproduzione di invertebrati, è possibile escludere dalla valutazione i dati corrispondenti alla prole di un animale riproduttore che muoia accidentalmente e/o casualmente durante il periodo di prova. Di conseguenza, in presenza di mortalità parentale nelle repliche esposte si deve stabilire se essa segue un modello concentrazione-risposta, ad esempio se vi è una significativa regressione della risposta rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame con una pendenza positiva (è possibile utilizzare una prova statistica quale il test di Cochran-Armitage per le tendenze). Se la mortalità non segue un modello concentrazione-risposta, le repliche che presentano mortalità parentale vanno escluse dall'analisi del risultato della prova. Se la mortalità segue un modello concentrazione-risposta, la mortalità parentale è assimilata a un effetto della sostanza chimica in esame e le repliche non vanno escluse dall'analisi. Se l'animale riproduttore si rivela essere un maschio, o se muore durante la prova sia accidentalmente, per incuria o incidente, sia casualmente a causa di un incidente che non trova spiegazione e che non è collegato all'effetto della sostanza chimica in esame, questa replica viene esclusa dall'analisi (per saperne di più, cfr. paragrafo 51). L'eventuale effetto tossico della sostanza chimica in esame sul tasso di riproduzione è misurato da valori espressi come EC_x, eseguendo, per regressione non lineare, un aggiustamento dei dati a un modello adeguato allo scopo di calcolare la concentrazione che causerebbe x % di riduzione del tasso riproduttivo, o in alternativa dal valore NOEC/LOEC (4). *Le concentrazioni di prova devono comprendere le più basse concentrazioni con effetto utilizzate (ad esempio EC₁₀), il che significa che questo valore è calcolato per interpolazione e non per estrapolazione.*

Vanno riportati anche la sopravvivenza degli animali riproduttori e il tempo intercorso fino alla produzione della prima schiusa. È possibile esaminare altri effetti della sostanza chimica su parametri quali la crescita (per es. la lunghezza) e, possibilmente, il tasso intrinseco di aumento della popolazione (cfr. paragrafo 44).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

I risultati di un test di tossicità acuta (cfr. capitolo C.2 del presente allegato: Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia sp.*) effettuato su *Daphnia magna* possono essere utili per selezionare l'adeguato intervallo di concentrazioni di prova da utilizzare nei test sulla riproduzione. È necessario conoscere la solubilità in acqua e la pressione di vapore della sostanza chimica in esame e deve essere disponibile un metodo analitico affidabile per quantificare la sostanza chimica nelle soluzioni di prova con un'efficienza di recupero e un limite di rilevamento noti.

Le informazioni sulla sostanza chimica in esame che possono essere utili per stabilire le condizioni di prova comprendono: formula strutturale, purezza della sostanza, fotostabilità, e stabilità nelle condizioni di esecuzione della prova, pKa, P_{ow} e risultati di una prova di pronta biodegradabilità [cfr. capitoli C.4 (Determinazione della pronta biodegradabilità), C.29 (pronta biodegradabilità — CO₂ in recipienti ermetici) del presente allegato].

VALIDITÀ DELLA PROVA

Perché la prova sia valida, nei gruppi di controllo devono essere soddisfatti i seguenti criteri di prestazione:

- la mortalità degli animali riproduttori (femmine di *Daphnia*) non supera il 20 % alla fine della prova,
- il numero medio dei piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore sopravvissuto alla fine della prova è ≥ 60 .

Nota: Lo stesso criterio di validità (20 %) può essere utilizzato per la mortalità parentale accidentale e casuale nei controlli nonché in ciascuna delle concentrazioni di prova.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiature

I recipienti e le altre apparecchiature destinate a entrare in contatto con le soluzioni di prova devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte. Di norma si utilizzano beaker di vetro come recipienti di prova.

Inoltre sono necessarie alcune o tutte le seguenti apparecchiature:

- misuratore di ossigeno (con microelettrodo o altro apparecchio adatto per la misurazione dell'ossigeno disciolto in campioni di volume ridotto),
- apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura,
- pH-metro,
- apparecchiatura per la determinazione della durezza dell'acqua,
- apparecchiatura per la determinazione della concentrazione dei carbonio organico totale (TOC) nell'acqua o per la determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD),
- apparecchiatura adeguata per il controllo del regime di illuminazione e la misurazione dell'intensità della luce.

Organismo sperimentale

La specie da utilizzare nella prova è la *Daphnia magna* Straus ⁽¹⁾.

Di preferenza il clone va identificato tramite determinazione del genotipo. La ricerca (1) ha dimostrato che le prestazioni riproduttive del Clone A (proveniente dall'IRCHA, in Francia) (5), allevato nelle condizioni descritte nel presente metodo di prova, soddisfa costantemente il criterio di validità di una media di ≥ 60 di piccoli vivi per animale riproduttore sopravvissuto. Sono comunque accettabili altri cloni, purché si dimostri che la coltura di *Daphnia* soddisfa i criteri di validità della prova.

⁽¹⁾ È possibile usare altre specie di Dafnidi, purché soddisfino adeguatamente i criteri di validità (il criterio di validità relativo alla capacità riproduttiva nei controlli deve essere pertinente per tutte le specie). Se sono utilizzate altre specie di Dafnidi, occorre identificarle chiaramente e motivare la scelta.

All'inizio della prova gli animali devono avere meno di 24 ore di vita e non devono provenire dalla prima nidiata. Devono provenire da una popolazione sana (senza segni di stress quali un alto tasso di mortalità, presenza di maschi e formazione di efippi, ritardo nella produzione della prima nidiata, decolorazione ecc.). Gli animali riproduttori vanno mantenuti in condizioni di coltura (luce, temperatura, mezzo, alimentazione e numero di animali per unità di volume) simili a quelle che verranno utilizzate nella prova. Se il mezzo di coltura per la *Daphnia* da usare nella prova è diverso da quello utilizzato di routine per la coltura di *Daphnia*, è buona prassi prevedere un periodo di acclimatazione prima del test, normalmente di tre settimane (cioè una generazione), per evitare di sottoporre a stress gli animali destinati alla riproduzione.

Mezzo di prova

Si raccomanda di usare per questa prova un mezzo completamente definito: ciò può evitare l'uso di additivi (ad esempio alghe, estratto di terra), che sono difficili da caratterizzare, e dunque aumentare la possibilità di standardizzazione fra vari laboratori. I mezzi M4 (6) e M7 di Elenndt (cfr. appendice 2) si sono rivelati adatti a questo scopo. Sono comunque accettabili altri mezzi [es. (7) (8)], purché si dimostri che le prestazioni della coltura di *Daphnia* soddisfano i criteri di validità della prova.

Se si impiegano mezzi contenenti additivi non ben definiti, occorre descriverli in dettaglio aggiungendo nella relazione informazioni sulla loro composizione, con particolare riferimento al contenuto di carbonio, che potrebbe influire sulla dieta. Si raccomanda di determinare il carbonio organico totale (TOC) e/o la domanda chimica di ossigeno (COD) della preparazione madre dell'additivo organico e di effettuare una stima del contributo dato al TOC/COD del mezzo di prova. Si raccomanda inoltre che i livelli di TOC nel mezzo (cioè prima dell'aggiunta delle alghe) siano inferiori a 2 mg/l (9).

Quando si testano sostanze chimiche contenenti metalli è importante tener conto del fatto che le proprietà del mezzo di prova (ad esempio la durezza e la capacità di chelazione) possono influire sulla tossicità della sostanza chimica in esame. Per questo motivo è consigliabile utilizzare un mezzo la cui composizione sia completamente conosciuta. Attualmente, però, gli unici mezzi di questo tipo noti per essere adatti alla coltura a lungo termine di *Daphnia magna* sono l'M4 e l'M7 di Elenndt. Entrambi i mezzi contengono l'agente chelante EDTA. La ricerca ha dimostrato (2) che la «tossicità apparente» del cadmio è generalmente inferiore quando il test sulla riproduzione viene eseguito nei mezzi M4 e M7 invece che in mezzi non contenenti EDTA. I mezzi M4 e M7 non sono pertanto raccomandati per testare sostanze chimiche contenenti metalli; occorre inoltre evitare anche altri mezzi che contengono agenti chelanti. Per le sostanze chimiche contenenti metalli può essere consigliabile utilizzare un mezzo alternativo come ad esempio l'acqua dolce dura ricostituita secondo le indicazioni dell'ASTM (9), che non contiene EDTA. Questa combinazione di acqua dolce dura ricostituita ed estratto di alghe marine è adatta alla coltura a lungo termine (10) di *Daphnia magna* (2).

La concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere superiore a 3 mg/l, all'inizio e durante la prova. Il pH deve collocarsi nell'intervallo 6-9 senza di norma variare di oltre 1,5 unità nell'ambito di una prova. Si raccomanda una durezza superiore a 140 mg/l (come CaCO₃). Le prove eseguite con un valore pari o superiore a questo livello hanno dimostrato che le prestazioni riproduttive sono conformi ai criteri di validità (11) (12).

Soluzioni di prova

Le soluzioni di prova alle concentrazioni prescelte vanno in genere preparate per diluizione di una soluzione madre. Se possibile, le soluzioni madre devono essere preparate preferibilmente senza l'impiego di eventuali solventi o disperdenti, mediante miscelazione o agitazione della sostanza chimica in esame nel mezzo di prova utilizzando mezzi meccanici (es. per agitazione, mescolatura, ultrasuoni) o altri metodi appropriati. È preferibile esporre i sistemi di prova alle concentrazioni della sostanza chimica da utilizzare nello studio per tutto il tempo necessario a dimostrare il mantenimento della stabilità delle concentrazioni di esposizione prima dell'introduzione degli organismi di prova. Se una sostanza chimica in esame è difficile da sciogliere in acqua, vanno applicate le procedure descritte nel documento di orientamento dell'OCSE per la manipolazione di sostanze "difficili" (13). Andrebbe evitato l'uso di solventi o disperdenti, ma in alcuni casi può rendersi necessario utilizzarli per ottenere una soluzione madre di adeguata concentrazione per il dosaggio.

Occorre allestire, oltre alle concentrazioni di prova, un campione di controllo con l'acqua di diluizione con adeguate repliche e, se ciò si rivelasse inevitabile, un controllo con solvente con adeguate repliche. Per la prova vanno utilizzati solo i solventi o disperdenti che hanno dimostrato avere effetti minimi o inesistenti sulla variabile di risposta. In (13) sono indicati esempi di solventi (ad esempio l'acetone, l'etanolo, il metanolo, la dimetilformammide e il glicole trietilenico) e di disperdenti adatti (ad esempio il Cremophor RH 40, la metilcellulosa 0,01 % e l'HCO-40). Se si utilizza un solvente, o un disperdente, la sua concentrazione finale non deve superare 0,1 ml/l (13) e deve essere identica in tutti i recipienti sperimentali, salvo che per il campione di controllo con acqua di diluizione. Tuttavia, occorre compiere ogni sforzo per mantenere la concentrazione di solvente al minimo.

PROCEDURA

Condizioni di esposizione

Durata

La durata del test è di 21 giorni.

Carico

Gli esemplari riproduttori vengono mantenuti individualmente, uno per ciascun recipiente di prova, solitamente con 50-100 ml di mezzo per ogni recipiente (per la *Daphnia magna* sono possibili volumi più piccoli, specialmente per dafnidi più piccoli, ad esempio *Ceriodaphnia dubia*), a meno che sia necessario allestire una prova a flusso continuo.

Talvolta, per soddisfare i requisiti della procedura analitica usata per determinare la concentrazione della sostanza chimica in esame, occorre utilizzare un volume maggiore, sebbene sia consentito il raggruppamento delle repliche per l'analisi chimica. Nel caso si utilizzino volumi superiori a 100 ml, potrebbe essere necessario aumentare la razione fornita alla *Daphnia* per assicurare un'adeguata disponibilità del cibo e il rispetto dei criteri di validità.

Animali da esperimento

Per le prove semistatiche occorrono almeno 10 animali, mantenuti singolarmente, per ogni concentrazione di prova e almeno 10 animali, mantenuti singolarmente, nella serie di controllo.

È stato dimostrato che per le prove a flusso continuo è adeguato utilizzare 40 animali suddivisi in quattro gruppi di 10 per ciascuna concentrazione di prova (1). È possibile utilizzare un numero inferiore di organismi sperimentali, ma si raccomanda comunque di utilizzare un minimo di 20 animali per concentrazione, divisi in due o più repliche con un numero uguale di animali (ad esempio quattro repliche con cinque dafnidi ciascuna). Si noti che per le prove nelle quali gli animali sono mantenuti in gruppi, non sarà possibile escludere nessuna prole dall'analisi statistica in caso di mortalità parentale casuale/accidentale in fase di riproduzione già avviata, e pertanto in questi casi la capacità riproduttiva va espressa come numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore presente all'inizio della prova.

Occorre randomizzare l'assegnazione dei trattamenti ai recipienti di prova e tutte le successive manipolazioni. In caso contrario si potrebbero verificare "bias" che potrebbero essere interpretate come un effetto della concentrazione. In particolare, se le unità sperimentali vengono manipolate in ordine di trattamento o di concentrazione, alcuni effetti collegati al tempo (ad esempio la stanchezza dell'operatore o un altro errore) possono produrre effetti maggiori alle concentrazioni più alte. Inoltre, se si ritiene che i risultati della prova possano essere influenzati da condizioni sperimentali iniziali o ambientali (ad esempio la posizione nel laboratorio), bisogna considerare la possibilità di porre termine alla prova.

Alimentazione

Nelle prove semistatiche è preferibile nutrire gli animali ogni giorno, e comunque almeno tre volte alla settimana (in concomitanza con la sostituzione del mezzo). Occorre tenere conto dell'eventuale diluizione delle concentrazioni di esposizione dovuta all'aggiunta del prodotto alimentare, evitandola, per quanto possibile, grazie a sospensioni ben concentrate di alghe. Se non si osserva questo modello (per esempio nelle prove a flusso continuo) occorre segnalarlo nella relazione.

Durante la prova la dieta degli animali riproduttori deve consistere preferibilmente in alghe unicellulari vive di una o più delle seguenti specie: *Chlorella sp.*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (in precedenza *Selenastrum capricornutum*) e *Desmodesmus subspicatus* (in precedenza *Scenedesmus subspicatus*). La dieta deve essere basata sulla quantità di carbonio organico (C) fornita a ciascun animale riproduttore. Ricerche (14) hanno dimostrato che per ottenere il numero di piccoli vivi di *Daphnia magna* necessari per soddisfare i criteri di validità sono sufficienti razioni comprese fra 0,1 e 0,2 mg C/*Daphnia*/die. È possibile somministrare la razione in maniera costante per tutto il periodo della prova oppure una razione inferiore all'inizio della prova della prova ed una razione più alta durante la prova, tenendo conto della crescita degli animali riproduttori. In questo caso la razione deve comunque restare sempre nell'intervallo raccomandato di 0,1 — 0,2 mg C/*Daphnia*/die.

Se per comodità (visto che la misurazione del tenore di carbonio richiede molto tempo) si utilizzano altri parametri di misurazione, quali la conta delle cellule algali o l'assorbanza della luce, per somministrare la razione necessaria, ogni laboratorio deve elaborare un proprio nomogramma che correli il parametro di misurazione scelto al contenuto di carbonio della coltura di alghe (cfr. appendice 3 per l'elaborazione del nomogramma). I nomogrammi vanno controllati almeno una volta all'anno e con maggiore frequenza in caso di modifica delle condizioni di coltura delle alghe. È stato dimostrato che per il contenuto di carbonio l'assorbanza della luce è un indicatore migliore che non il numero di cellule (15).

Occorre alimentare le *Daphnia* con una sospensione concentrata di alghe per ridurre al minimo il volume del mezzo di coltura algale trasferito nei recipienti di prova. La concentrazione delle alghe può essere ottenuta per centrifugazione e successiva risospensione nel mezzo di coltura delle *Daphnia*.

Luce

16 ore di luce a un'intensità non superiore a $15 - 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ misurata sulla superficie dell'acqua del recipiente. Per gli strumenti per la misurazione della luce calibrati in lux, un intervallo equivalente di 1 000-1 500 lux per la luce bianca fredda corrisponde da vicino all'intensità raccomandata della luce, cioè $15 - 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Temperatura

La temperatura del mezzo di prova si colloca nell'intervallo 18-22 °C. Tuttavia, per ogni test la temperatura non deve variare quotidianamente, se possibile, di più di 2 °C all'interno dell'intervallo indicato (ossia, deve mantenersi nei seguenti intervalli: 18-20, 19-21 o 20-22 °C) Per controllare la temperatura si può utilizzare un recipiente di prova aggiuntivo.

Aerazione

I recipienti di prova non vanno aerati durante la prova.

Disegno sperimentale

Prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni

Ove necessario, si effettua una prova per determinare l'intervallo delle concentrazioni (*range finding test*): ad esempio, cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame e due repliche per ogni gruppo di trattamento e di controllo. Ulteriori informazioni sulla tossicità acuta per *Daphnia* e/o per altri organismi acquatici, derivanti da prove con sostanze chimiche simili o tratte dalla letteratura specializzata, possono anche essere utili per decidere l'intervallo di concentrazioni da sottoporre alla prova di determinazione degli intervalli delle concentrazioni.

La durata della prova di determinazione degli intervalli delle concentrazioni è 21 giorni o una durata sufficiente a prevedere in modo attendibile i livelli degli effetti. Al termine della prova viene valutata la capacità riproduttiva della *Daphnia*. Vanno registrati il numero di animali riproduttori e la comparsa di prole.

Prova definitiva

In genere occorrono almeno cinque concentrazioni di prova, soffermandosi sulle concentrazioni efficaci (ad esempio EC_x) e disposte in una serie geometrica con un fattore di separazione preferibilmente non superiore a 3,2. Vanno usate un numero adeguato di repliche per ciascuna concentrazione di prova (cfr. paragrafi 24-25). L'uso di un numero di concentrazioni inferiore a cinque va giustificato. Le sostanze chimiche non vanno provate al di sopra del loro limite di solubilità nel mezzo di prova. Prima di condurre l'esperimento si consiglia di prendere in considerazione la potenza statistica del disegno di prova e l'uso di metodi statistici adeguati (4). Nel definire l'intervallo delle concentrazioni è necessario tenere conto dei seguenti elementi:

- i) quando si stima l' EC_x per gli effetti sulla riproduzione, è consigliabile usare un numero sufficiente di concentrazioni tale da consentire di definire l' EC_x con un livello di confidenza adeguato. Idealmente, le concentrazioni di prova utilizzate devono comprendere l' EC_x stimata, in modo tale che quest'ultima possa essere determinata per interpolazione anziché per estrapolazione. L'analisi statistica che segue trae vantaggio dall'utilizzare un numero maggiore di concentrazioni di prova (per esempio 10), un numero minore di repliche di ciascuna concentrazione (per esempio 5, così da mantenere costante il numero totale di recipienti) e 10 controlli.
- ii) Se l'obiettivo è ottenere la LOEC e/o la NOEC, la concentrazione di prova più bassa dovrà essere sufficientemente bassa da far sì che la capacità riproduttiva a tale concentrazione non sia significativamente inferiore rispetto a quella del controllo. In caso contrario la prova andrà ripetuta con una concentrazione minima più bassa.
- iii) Se l'obiettivo è ottenere la LOEC e/o la NOEC, la concentrazione di prova più alta sarà sufficientemente alta da far sì che la capacità riproduttiva a tale concentrazione sia significativamente inferiore rispetto a quella del controllo. In caso contrario, la prova va ripetuta con una concentrazione massima più elevata, a meno che la concentrazione massima richiesta per stabilire gli effetti cronici (cioè 10 mg/l) sia già stata utilizzata quale concentrazione massima di prova nel saggio iniziale.

Se non si osservano effetti alla concentrazione massima durante la prova di determinazione degli intervalli delle concentrazioni (ad esempio a 10 mg/l), o quando è altamente probabile che la sostanza chimica in esame sia di tossicità scarsa o nulla basandosi sulla tossicità nulla rilevata per altri organismi, e/o quando tali organismi la assorbono poco o per nulla, la prova di riproduzione può essere eseguita come una prova limite, con una concentrazione di prova, ad esempio, di 10 mg/l e un controllo. Occorre utilizzare dieci repliche sia per i gruppi di trattamento sia per i gruppi di controllo. Se la prova limite richiede un sistema a flusso continuo, può essere adeguato utilizzare meno repliche. Una prova limite fornirà l'occasione di dimostrare che non esiste un effetto statisticamente significativo alla concentrazione limite, ma se invece vengono registrati degli effetti sarà in genere necessario procedere a una prova completa.

Controlli

In aggiunta alle concentrazioni con la sostanza chimica in esame, dovrebbe essere allestita una serie di controllo con il mezzo di prova ed eventualmente una serie di controllo contenente il solvente o il disperdente. La concentrazione dell'eventuale solvente o disperdente deve essere identica a quella usata nei recipienti contenenti la sostanza chimica in esame. Anche per i controlli occorre usare un numero adeguato di repliche (cfr. paragrafi 23-24).

Generalmente, in un test ben condotto, il coefficiente di variazione del numero medio di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore nel o nei controlli dovrebbe essere $\leq 25\%$; il coefficiente di variazione va riportato per le prove dove gli animali riproduttori sono mantenuti individualmente.

Rinnovo del mezzo di prova

La frequenza con cui il mezzo viene rinnovato dipende dalla stabilità della sostanza chimica in esame, ma dovrebbe essere almeno tre volte alla settimana. Se da prove preliminari sulla stabilità (cfr. paragrafo 7) la concentrazione della sostanza chimica in esame non risulta stabile (è cioè al di fuori dell'intervallo 80-120 % della concentrazione nominale o al di sotto dell'80 % della concentrazione iniziale misurata) durante il periodo massimo di rinnovo (tre giorni), si consiglia di rinnovare il mezzo con maggiore frequenza oppure di eseguire una prova a flusso continuo.

Quando si rinnova il mezzo nelle prove semistatiche si prepara una seconda serie di recipienti dove vengono trasferiti gli animali riproduttori mediante, ad esempio, una pipetta di vetro di diametro adeguato. Il volume del mezzo trasferito con le *Daphnia* dovrebbe essere il più piccolo possibile.

Osservazioni

I risultati delle osservazioni fatte durante il test vanno registrati su apposite schede di raccolta dei dati (cfr. appendici 4 e 5). Dovendo fornire i dati di altre misurazioni (cfr. paragrafo 44) possono essere richieste ulteriori osservazioni.

Prole

La prole prodotta da ciascun animale riproduttore dovrebbe essere di preferenza tolta dal recipiente e contata ogni giorno a partire dalla comparsa della prima schiusa, per impedire che consumi cibo destinato all'animale riproduttore. Ai fini del metodo di prova qui descritto è necessario contare solo il numero di piccoli vivi, ma è consigliabile registrare anche la presenza di uova abortite o piccoli morti.

Mortalità

La mortalità fra gli animali riproduttori va rilevata di preferenza quotidianamente, o almeno ad ogni conta dei piccoli.

Altri parametri

Sebbene questo metodo di prova sia fondamentalmente inteso a valutare gli effetti sulla capacità riproduttiva, è possibile che altri effetti siano sufficientemente quantificati da permettere un'analisi statistica. È possibile registrare la capacità riproduttiva per animale riproduttore superstite, ossia il numero di piccoli vivi prodotti durante la prova per riproduttore superstite. Ciò può essere confrontato con la principale variabile di risposta (la capacità riproduttiva all'inizio della prova, per animale riproduttore che non sia vittima di morte casuale o accidentale durante la prova). In presenza di mortalità parentale nelle repliche esposte si deve stabilire se essa segue un modello concentrazione-risposta, ad esempio se vi è una significativa regressione della risposta rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame con una pendenza positiva (è possibile utilizzare una prova statistica quale il test di Cochran-Armitage per le tendenze). Se la mortalità non segue un modello concentrazione-risposta, le repliche che presentano mortalità parentale vanno escluse dall'analisi del risultato della prova. Se la mortalità segue un modello concentrazione-risposta, la mortalità parentale è assimilata a un effetto della sostanza chimica in esame e le repliche non vanno escluse dall'analisi del risultato della prova. La misura della crescita è particolarmente auspicabile in quanto fornisce informazioni su possibili effetti subletali, che potrebbero essere utili e affiancarsi alla sola misura della riproduzione; si raccomanda di misurare la lunghezza degli animali riproduttori (lunghezza del corpo esclusa la spina posteriore del carapace) alla fine del test. Altri parametri che possono essere misurati o calcolati sono: il periodo intercorso fino alla produzione della prima schiusa (e delle schiuse successive), il numero e le dimensioni delle schiuse per animale, il numero delle schiuse abortite, la presenza di maschi neonati (OCSE, 2008) o efippi e possibilmente il tasso intrinseco di aumento della popolazione (cfr. appendice 1 per la definizione e l'appendice 7 per l'identificazione del sesso dei neonati).

Frequenza delle determinazioni e delle misurazioni analitiche

Concentrazione dell'ossigeno, temperatura, durezza e pH dovrebbero essere misurati almeno una volta alla settimana, nei mezzi freschi (dopo il rinnovo) e vecchi (prima del rinnovo), nel/i controllo/i e nella concentrazione massima della sostanza chimica in esame.

Durante la prova le concentrazioni della sostanza chimica in esame vanno determinate a intervalli regolari.

Nelle prove semistatiche in cui si prevede che la concentrazione della sostanza chimica in esame resti intorno a ± 20 % del valore nominale (e cioè entro l'intervallo dell'80-120 %; cfr. paragrafi 6, 7 e 39), si raccomanda di analizzare almeno le concentrazioni minima e massima di prova subito dopo la loro preparazione e in occasione di un rinnovo del mezzo nel corso della prima settimana del test (le analisi vanno effettuate su un campione della stessa soluzione, appena preparata e al momento di rinnovarla). Queste determinazioni vanno poi ripetute a intervalli almeno settimanali.

Per le prove in cui non si prevede che la concentrazione della sostanza in esame resti entro $\pm 20\%$ del valore nominale, è necessario analizzare tutte le concentrazioni di prova, appena preparate e al momento di rinnovarle. Tuttavia, per le prove in cui la concentrazione iniziale misurata della sostanza chimica in esame non è entro $\pm 20\%$ del valore nominale, ma si può fornire prova che le concentrazioni iniziali sono ripetibili e stabili (cioè entro un range dell'80-120 % delle concentrazioni iniziali), nella seconda e terza settimana della prova le determinazioni chimiche possono limitarsi alle concentrazioni massima e minima. In tutti i casi la determinazione delle concentrazioni della sostanza chimica in esame prima del rinnovo può limitarsi a un unico recipiente per ciascuna concentrazione.

Per le prove a flusso continuo è appropriato l'uso di un regime di campionamento simile a quello descritto per le prove semistatiche (sebbene in questo caso non ci sia la misurazione delle soluzioni "vecchie"). Può essere però consigliabile aumentare il numero di campionamenti durante la prima settimana (ad esempio, tre serie di misurazioni) per accertare la stabilità delle concentrazioni di prova. In questi tipi di prova dovrebbe essere controllato quotidianamente il tasso di flusso del diluente e della sostanza chimica in esame.

Potendo dimostrare che durante l'intera prova la concentrazione della sostanza chimica in esame in soluzione è stata mantenuta in modo soddisfacente entro $\pm 20\%$ della concentrazione nominale o della concentrazione iniziale misurata, i risultati possono essere basati sui valori nominali o sui valori iniziali misurati. Se la deviazione dalla concentrazione iniziale nominale o misurata è maggiore del $\pm 20\%$, i risultati vanno espressi in termini di media ponderata nel tempo (v. orientamenti per il calcolo nell'appendice 6).

DATI E RELAZIONI

Trattamento dei risultati

La presente prova è intesa a determinare gli effetti della sostanza chimica in esame sulla capacità riproduttiva. Occorre calcolare il numero complessivo di piccoli vivi per animale riproduttore per ciascun recipiente di prova (replica). Inoltre, la capacità riproduttiva può essere calcolata sulla base della produzione di piccoli vivi per animale riproduttore superstiti. Tuttavia, la variabile di risposta ecologicamente più rilevante corrisponde al numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore che non sia vittima di morte accidentale ⁽¹⁾ o casuale ⁽²⁾ durante la prova. Se l'animale riproduttore muore accidentalmente o casualmente durante il test, o si rivela essere un maschio, la replica viene esclusa dall'analisi. L'analisi si baserà quindi su un numero ridotto di repliche. In presenza di mortalità parentale nelle repliche esposte si deve stabilire se essa segue un modello concentrazione-risposta, ad esempio se vi è una significativa regressione della risposta rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame con una pendenza positiva (è possibile utilizzare una prova statistica quale il test di Cochran-Armitage per le tendenze). Se la mortalità non segue un modello concentrazione-risposta, le repliche che presentano mortalità parentale vanno escluse dall'analisi del risultato della prova. Se la mortalità segue un modello concentrazione-risposta, la mortalità parentale è assimilata a un effetto della sostanza chimica in esame e le repliche non vanno escluse dall'analisi del risultato della prova.

In sintesi, quando gli effetti sono espressi come LOEC e NOEC o EC_x si raccomanda di calcolare gli effetti sulla riproduzione mediante l'uso delle due variabili di risposta succitate, vale a dire

- il numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore che non sia vittima di morte accidentale o casuale durante la prova;
- il numero di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore superstite;

e di utilizzare in seguito come risultato finale il più basso valore LOEC e NOEC o EC_x calcolato utilizzando queste due variabili di risposta.

Prima di ricorrere all'analisi statistica, ad esempio tramite analisi ANOVA o il confronto dei gruppi trattati e dei gruppi di controllo con i test di Student (test t), di Dunnett, di Williams o di Jonckheere-Terpstra (test di tendenza regressiva), si raccomanda di considerare la trasformazione dei dati se ciò è necessario per soddisfare i requisiti del particolare test statistico. Come alternativa non parametrica, si possono prendere in considerazione i test di Dunn o Mann-Whitney. Per le medie di ciascuna concentrazione sono calcolati intervalli di confidenza al 95 %.

⁽¹⁾ Mortalità accidentale: mortalità non legata a sostanze chimiche e causata da un evento accidentale (della quale, cioè, si conosce la causa).

⁽²⁾ Mortalità casuale: mortalità non legata a sostanze chimiche e della quale non si conosce la causa.

Il numero di animali riproduttori sopravvissuti nei controlli non trattati è un criterio di validità che deve essere documentato e registrato. Anche tutti gli altri effetti negativi, ad esempio comportamenti anomali e risultati tossicologici significativi, devono essere registrati nella relazione finale.

ECx

I valori ECx, e i relativi limiti di confidenza superiori e inferiori, vanno calcolati utilizzando metodi statistici appropriati (funzione logistica o di Weibull, metodo semplificato di Spearman-Kärber o semplice interpolazione). Per calcolare la EC10, la EC₅₀ o qualsiasi altra ECx, occorre sottoporre la serie completa di dati a un'analisi di regressione.

NOEC/LOEC

Se l'analisi statistica intende determinare la NOEC/LOEC occorre fare uso di metodi statistici appropriati in base al Documento n. 54 dell'OCSE "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application" (4): In generale, gli effetti nocivi della sostanza chimica in esame rispetto al controllo sono analizzati applicando un'ipotesi unilaterale con $p \leq 0,05$.

La distribuzione normale dei dati e l'omogeneità della varianza possono ad esempio essere analizzate mediante il test di Shapiro-Wilk o il test di Levene ($p \leq 0,05$), rispettivamente. Possono essere eseguiti un'analisi della varianza ANOVA a un fattore e successivi test multi-comparativi. I test multi-comparativi (ad esempio, test di Dunnett) o i test di tendenza regressiva (ad esempio, test di Williams o di Jonckheere-Terpstra) possono essere utilizzati ai fini del calcolo di eventuali differenze significative ($p \leq 0,05$) tra i controlli e le varie concentrazioni della sostanza chimica in esame [(per scegliere la prova raccomandata si consulti il documento n. 54 dell'OCSE (4)]. Altrimenti, per determinare la LOEC e la NOEC si possono utilizzare metodi non parametrici (test U di Bonferroni secondo il test di tendenza di Holm o di Jonckheere-Terpstra).

Prova limite

Se è stata svolta una prova limite (confronto tra il controllo e un unico trattamento) e se sono rispettati i presupposti necessari per le procedure delle prove parametriche (normalità, omogeneità), è possibile valutare le risposte metriche mediante il test di Student (t-test). In caso contrario, si può ricorrere a un test t per varianze disuguali (es.: test di Welch) o a un test non parametrico, come il test di Wilcoxon-Mann-Whitney.

Per determinare significative divergenze tra i controlli (campione di controllo e controllo con solvente o disperdente), le repliche di ciascun controllo possono essere testate come descritto per la prova limite. Se le prove non rilevano alcuna differenza significativa, è possibile raggruppare assieme tutte le repliche di controllo e di controllo con solvente. In caso contrario, occorre confrontare tutti i trattamenti con il controllo con solvente.

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova include le informazioni indicate di seguito.

Sostanza chimica in esame:

- natura fisica e proprietà fisico-chimiche pertinenti,
- dati di identificazione chimica, compresa la purezza.

Specie in esame:

- clone (se è stato tipizzato geneticamente), fornitore o provenienza (se nota) e condizioni di coltura utilizzate. Se si usa una specie diversa dalla *Daphnia magna*, è necessario precisarlo nella relazione e giustificare i motivi di questa scelta.

Condizioni della prova:

- procedura di prova usata (ad esempio semistatica o a flusso continuo, volume, carico espresso in numero di *Daphnia* per litro);

- fotoperiodo e intensità della luce;
- disegno sperimentale (ad esempio, numero di repliche, numero di animali riproduttori per replica);
- particolari sul mezzo di coltura utilizzato;
- eventuali aggiunte di materiale organico, inclusa composizione, fonte, metodo di preparazione, TOC/COD delle preparazioni madri, stima del TOC/COD risultante nel mezzo di prova;
- informazioni dettagliate sull'alimentazione, comprese la quantità (in mg C/*Daphnia*/die) e il programma (ad esempio tipo di alimento/i, compresi il nome della specie di alga e, se noti, il ceppo e le condizioni di coltura);
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (deve essere specificato il tipo e la concentrazione del solvente o disperdente, se usati).

Risultati:

- risultati di eventuali studi preliminari sulla stabilità della sostanza chimica in esame,
- concentrazioni di prova nominali e risultati di tutte le analisi per determinare la concentrazione della sostanza chimica nei recipienti di prova (cfr. esempi di schede di raccolta dati nell'appendice 5); vanno indicati anche l'efficienza di recupero del metodo e il limite di determinazione;
- qualità dell'acqua nei recipienti di prova (cioè: pH, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto, e, dove possibile, anche TOC e/o COD e durezza) (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'appendice 4);
- numero totale di piccoli vivi prodotti durante la prova da ciascun animale riproduttore (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'appendice 4);
- numero di decessi fra gli animali riproduttori e giorno in cui sono avvenuti (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'appendice 4);
- il coefficiente di variazione per la capacità riproduttiva dei controlli (basato sul numero totale di piccoli vivi per animale riproduttore vivo alla fine della prova);
- diagramma del numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore in ogni replica escludendo qualsiasi animale riproduttore vittima di morte accidentale o casuale nel corso della prova, rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame;
- se del caso, diagramma del numero totale di piccoli vivi prodotti per animale riproduttore superstite in ogni replica, rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame;
- se del caso, la concentrazione più bassa alla quale si osservano effetti (LOEC) sulla riproduzione, comprese una descrizione delle procedure statistiche utilizzate e un'indicazione dell'entità dell'effetto previsto (per ottenere tale dato è possibile eseguire un'analisi della potenza prima dell'inizio dell'esperimento) e la concentrazione senza effetto (NOEC) sulla riproduzione; informazioni sulla variabile di risposta utilizzata per il calcolo dei valori di LOEC e NOEC (come totale di piccoli vivi per organismo materno non vittima di morte accidentale o casuale nel corso della prova o come numero totale di piccoli vivi per organismo materno superstite), ove opportuno occorre registrare la LOEC o la NOEC relativa alla mortalità degli animali riproduttori;
- se del caso, la EC_x per la riproduzione e gli intervalli di confidenza (es. 90 % o 95 %), nonché un grafico del modello adeguato utilizzato per il loro calcolo, la pendenza della curva dose-risposta e il suo errore standard;
- altri effetti biologici osservati o misurati: registrare qualsiasi altro effetto biologico osservato o misurato (es. crescita degli animali riproduttori) comprese, se del caso, le giustificazioni pertinenti;
- spiegazione di eventuali deviazioni dal metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 marzo 1993.
- (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Parigi.
- (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 88. OECD, Parigi.
- (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Parigi.
- (5) Baird, D.J., et al. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
- (6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
- (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods
- (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
- (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
- (10) Baird, D.J., et al. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1-8.
- (12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.
- (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Parigi.
- (14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, 2053-2058.
- (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, 459-466.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Ai fini del presente metodo di prova si applicano le seguenti definizioni:

Mortalità accidentale: mortalità non collegata a sostanze chimiche e causata da un evento accidentale (cioè da una causa sconosciuta).

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

EC_x: concentrazione della sostanza chimica in esame disciolta in acqua che provoca una percentuale x di riduzione della capacità riproduttiva della *Daphnia magna* entro un determinato periodo di esposizione.

Mortalità casuale: mortalità non collegata a sostanze chimiche e priva di causa sconosciuta.

Tasso intrinseco di aumento della popolazione: misura della crescita della popolazione che integra la capacità riproduttiva e la mortalità specifica in base all'età (1) (2) (3). Nelle popolazioni in equilibrio dinamico è uguale a zero. Per le popolazioni in crescita è positivo, mentre per quelle in diminuzione è negativo. Ovviamente, quest'ultimo tasso non è sostenibile e, alla fine, porta all'estinzione.

Limite di rilevazione: concentrazione minima che può essere individuata ma non quantificata.

Limite di determinazione: concentrazione minima misurabile quantitativamente.

Minima concentrazione con effetti significativi (Lowest Observed Effect Concentration — LOEC): la concentrazione più bassa sottoposta a prova alla quale si osserva che la sostanza chimica produce un effetto statisticamente significativo sulla riproduzione e sulla mortalità parentale (con $p < 0,05$) rispetto ai controlli, entro un periodo di esposizione definito. Tuttavia, tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quelli osservati alla LOEC. Se non è possibile soddisfare queste due condizioni, è necessario fornire una spiegazione esauriente sulle modalità di scelta della LOEC (e di conseguenza della NOEC).

Mortalità: si considerano morti gli animali che, entro 15 secondi dopo lieve agitazione del contenitore usato per la prova, restano immobili, cioè non sono in grado di nuotare, o nei quali non si osserva alcun movimento delle appendici o della parte posteriore dell'addome. (Nel caso si usi un'altra definizione, essa deve essere indicata insieme al relativo riferimento bibliografico).

Massima concentrazione senza effetti significativi (No Observed Effect Concentration — NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC che, se confrontata con i controlli, non ha un effetto statisticamente significativo (con $p < 0,05$), entro un periodo di esposizione definito.

Prole: piccoli di *Daphnia* generati dagli animali riproduttori nel corso della prova.

Animali riproduttori: femmine di *Daphnia* presenti all'inizio della prova la cui capacità riproduttiva è oggetto dello studio.

Capacità riproduttiva: numero di piccoli vivi prodotti da animali riproduttori entro il periodo di prova.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata applicando il presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- (2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

Appendice 2

PREPARAZIONE DEI MEZZI M7 E M4 DI ELENDT TOTALMENTE DEFINITI

Acclimatazione ai mezzi M7 e M4 di Elendt

Alcuni laboratori hanno avuto difficoltà nel trasferire direttamente le *Daphnia* nei mezzi M4 (1) e M7. Qualche risultato soddisfacente è stato invece ottenuto con un'acclimatazione graduale, cioè trasferendo le *Daphnia* dal proprio mezzo ad un mezzo Elendt al 30 %, poi al 60 % e infine ad un mezzo Elendt al 100 %. I periodi di acclimatazione possono avere anche una durata di un mese.

Preparazione

Oligoelementi

Inizialmente si preparano soluzioni madre distinte (I) dei singoli oligoelementi in acqua di adeguata purezza, ad esempio deionizzata, distillata o sottoposta a osmosi inversa. Da queste diverse soluzioni madre (I) si prepara una seconda soluzione madre singola (II) che contiene tutti gli oligoelementi (soluzione combinata), e cioè:

Soluzione/i madre I (sostanza unica)	Quantità aggiunta ad acqua	Concentrazione (rispetto al mezzo M4) (volte)	Quantità di soluzione madre aggiunta per preparare il mezzo ml/l	
			M 4	M 7
	mg/l		ml/l	
H3BO3	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl2 · 4 H2O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl2 · 6 H2O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Mo Na2O4 · 2 H2O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl2 · 2 H2O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl2	260	20 000	1,0	1,0
CoCl2 · 6 H2O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na2SeO3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH4VO3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na2EDTA · 2 H2O	5 000	2 000	—	—
FeSO4 · 7 H2O	1 991	2 000	—	—

Sia la soluzione Na₂EDTA che la FeSO₄ vengono preparate singolarmente, versate insieme e inserite immediatamente nell'auto-clave. Con ciò si ottiene:

Soluzione Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0
-------------------	--	-------	------	-----

Mezzi M4 e M7

I mezzi di coltura M4 ed M7 sono preparati usando la soluzione madre II, i macronutrienti e le vitamine, nel modo seguente:

	Quantità aggiunta ad acqua	Concentrazione (rispetto al mezzo M4) (volte)	Quantità di soluzione di riserva aggiunto per preparare il mezzo di coltura	
			ml/l	
	mg/l		M 4	M 7
Soluzione madre II (elementi in tracce combinati)		20 volte	50	50
Soluzioni madre con macronutrienti (sostanza unica)				
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Soluzione madre combinata di vitamine	-	10 000	0,1	0,1

La soluzione madre combinata di vitamine si prepara aggiungendo le 3 vitamine a 1 litro di acqua, come segue:

	mg/l			
Cloridrato di tiammina	750	10 000		
Cianocobalamina (B ₁₂)	10	10 000		
Biotina	7,5	10 000		

La soluzione madre combinata di vitamine si conserva congelata in piccole aliquote. Le vitamine si aggiungono al mezzo di coltura poco prima dell'uso.

N.B.: per evitare la precipitazione dei sali durante la preparazione dei mezzi completi, aggiungere le aliquote delle soluzioni madre a circa 500-800 ml di acqua deionizzata e poi portare a 1 litro.

N.N.B. Il primo studio pubblicato sul mezzo M4 si trova in Elendt, B. P. (1990). *Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma*, 154, 25-33.

Appendice 3

ANALISI DEL CARBONIO ORGANICO TOTALE (TOC) E PRODUZIONE DI UN NOMOGRAMMA PER IL CONTENUTO DI TOC DELL'ALIMENTO ALGALE

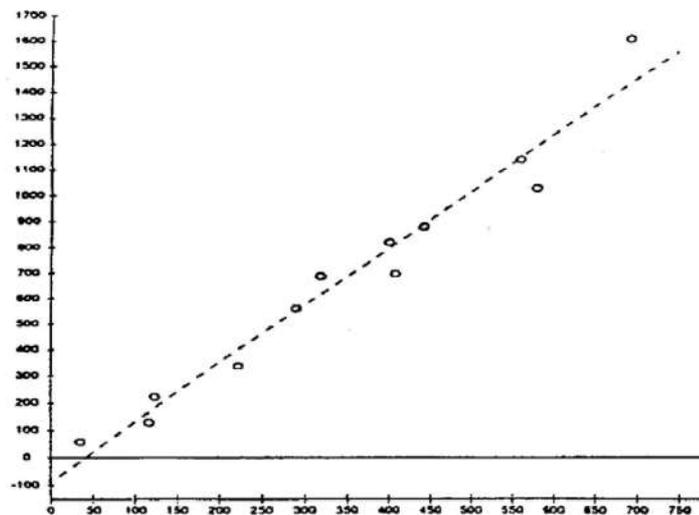
È riconosciuto che il contenuto di carbonio dell'alimento algale non viene di norma misurato direttamente, bensì mediante correlazioni (cioè nomogrammi) con misure sostitutive quali il numero di cellule algali o l'assorbanza della luce.

Il TOC dovrebbe essere misurato per ossidazione ad alta temperatura piuttosto che mediante UV o metodi con persolfati. (Per suggerimenti cfr.: *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Per la produzione del nomogramma, le alghe vanno separate dal mezzo di crescita mediante centrifugazione, seguita da risospensione in acqua distillata. Occorre misurare il parametro surrogato e la concentrazione del TOC in ciascun campione in triplicato. Vanno analizzati i bianchi di acqua distillata e la loro concentrazione di TOC viene dedotta dalla concentrazione del TOC nel campione di alghe.

I nomogrammi devono essere lineari nell'intervallo richiesto di concentrazioni del carbonio. Di seguito sono riportati alcuni esempi.

N.B.: non usare questi nomogrammi per effettuare conversioni; è essenziale che ogni laboratorio prepari il suo nomogramma.



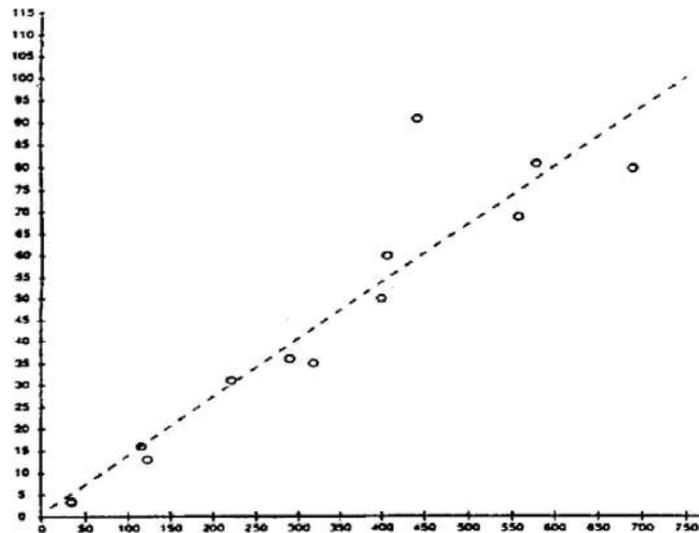
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressione di mg/l di peso secco su mg C/l. Dati da sospensioni concentrate di cellule in coltura in semicontinuo, risospese in acqua distillata.

Asse x: mg C/l di alimento algale concentrato

Asse y: mg/l peso secco di alimento algale concentrato

Coefficiente correttore -0,980



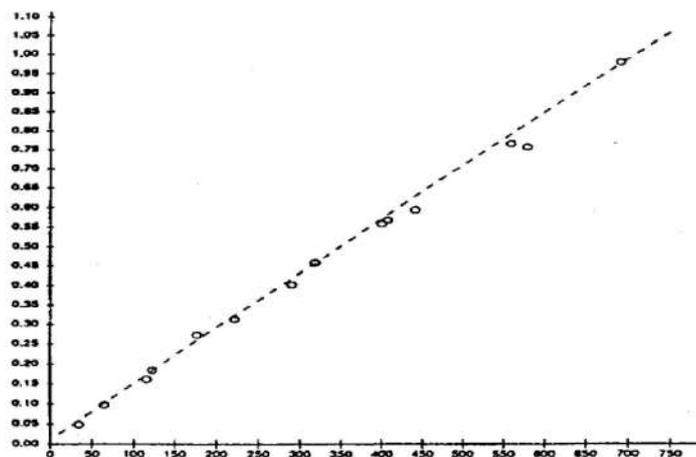
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressione del numero di cellule su mg C/1. Dati da sospensioni concentrate di cellule in coltura in semicontinuo, risospese in acqua distillata.

Asse x: mg C/1 di alimento algale concentrato

Asse y: n. di cellule/1 di alimento algale concentrato

Coefficiente correttore -0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressione dell'assorbanza su mg C/1 (1 cm di cammino ottico). Dati da sospensioni concentrate di cellule in coltura in semicontinuo, risospese in acqua distillata.

Asse x: mg C/1 di alimento algale concentrato

Asse y: Assorbanza a 440 nm di una diluizione 1/10 di alimento algale concentrato

Coefficiente correttore - 0,998

Appendice 6

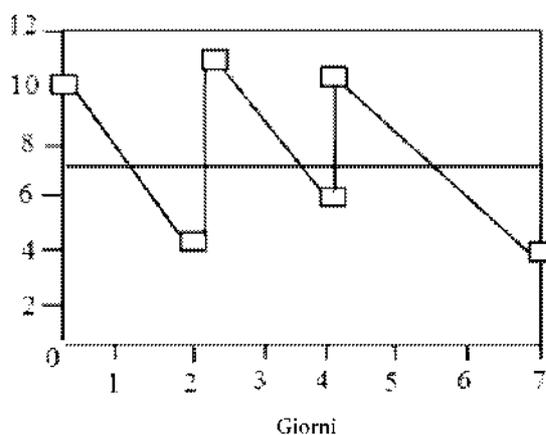
CALCOLO DI UNA MEDIA PONDERATA NEL TEMPO

Media ponderata nel tempo

Dato che la concentrazione della sostanza chimica in esame può diminuire nel periodo fra i rinnovi del mezzo è necessario considerare quale concentrazione vada scelta come rappresentativa dell'intervallo di concentrazioni a cui sono state esposte le *Daphnia* riproduttrici. La selezione deve basarsi su considerazioni biologiche oltre che statistiche. Per esempio, se si ritiene che la riproduzione venga influenzata soprattutto dalla concentrazione picco, si deve utilizzare la concentrazione massima. Se invece si ritiene più importante l'effetto accumulato o a più lungo termine della sostanza chimica tossica, allora risulta più pertinente una concentrazione media. In questo caso una media adeguata è la concentrazione media ponderata nel tempo, in quanto tiene conto della variazione della concentrazione istantanea nel corso del tempo.

Figura 1

Esempio di media ponderata in funzione tempo



La Figura 1 mostra un esempio di test (semplificato) della durata di sette giorni con rinnovo del mezzo nei giorni 0, 2 e 4.

- La linea sottile a zig-zag rappresenta la concentrazione in qualsiasi momento nel tempo. Si suppone che la caduta della concentrazione segua un processo di decadimento esponenziale.
- I sei quadratini rappresentano le concentrazioni osservate misurate all'inizio e alla fine di ciascun periodo di rinnovo.
- La linea retta spessa indica la posizione della media ponderata nel tempo.

La media ponderata nel tempo viene calcolata in modo che l'area ad essa sottostante sia uguale all'area sotto la curva della concentrazione. Il calcolo per l'esempio in figura è illustrato nella tabella 1.

Tabella 1

Calcolo di una media ponderata nel tempo

Rinnovo n.	Giorni	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Area
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Rinnovo n.	Giorni	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Area
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Giorni totali:		7		Area totale:		50,092
				Media ponderata/t:		7,156

Giorni è il numero di giorni nel periodo di rinnovo.

Conc0 è la concentrazione misurata all'inizio di ciascun periodo di rinnovo.

Conc1 è la concentrazione misurata alla fine di ciascun periodo di rinnovo.

Ln(Conc0) è il logaritmo naturale di *Conc0*.

Ln(Conc1) è il logaritmo naturale di *Conc1*.

Area è l'area sotto la curva esponenziale per ciascun periodo di rinnovamento. Viene calcolata nel modo seguente:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

La media ponderata nel tempo (*media ponderata/t*) è l'*Area totale* divisa per i *Giorni totali*.

Ovviamente per la prova di riproduzione con *Daphnia* occorre prolungare la tabella fino a coprire 21 giorni.

È chiaro che quando le osservazioni vengono effettuate solo all'inizio e alla fine di ciascun periodo di rinnovamento non è possibile confermare che il processo di decadimento è effettivamente esponenziale. Una curva diversa produrrebbe un calcolo diverso per l'*Area*. Tuttavia, è tuttavia plausibile che un processo di decadimento sia esponenziale e questa è probabilmente la curva migliore da usare in assenza di altre informazioni.

Occorre però procedere con cautela se l'analisi chimica non rileva alcuna sostanza alla fine del periodo di rinnovo. A meno che non sia possibile stimare la rapidità con cui la sostanza chimica è scomparsa dalla soluzione, è impossibile ottenere un'area sotto la curva che sia realistica, e pertanto è impossibile ottenere una ragionevole media ponderata nel tempo.

Appendice 7

ORIENTAMENTI PER L'IDENTIFICAZIONE DEL SESSO DEI NEONATI

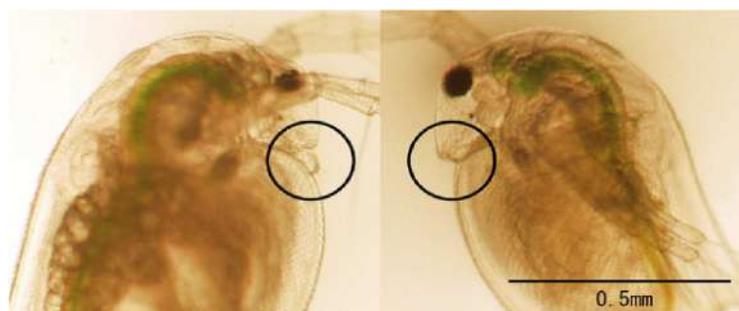
La produzione di neonati di sesso maschile può avvenire modificando le condizioni ambientali, ad esempio abbreviando i fotoperiodi, modificando la temperatura, riducendo la concentrazione degli alimenti e aumentando la densità demografica (Hobaek e Larson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992). La produzione di neonati di sesso maschile è anche una risposta nota ad alcuni regolatori della crescita degli insetti (Oda *et al.*, 2005). In condizioni in cui agenti chimici stressanti inducono una diminuzione della prole da femmine partenogenetiche, si può prevedere un incremento del numero dei maschi (OCSE, 2008). Sulla base delle informazioni disponibili non è possibile prevedere quale parametro, sia esso il rapporto numerico tra i sessi o la riproduzione, sarà quello più sensibile; tuttavia, vi sono indicazioni (cfr. "relazione di validazione", parte 1) secondo cui questo aumento del numero dei maschi sarebbe meno sensibile della diminuzione dei piccoli vivi. Dato che l'obiettivo primario del presente metodo di prova è valutare il numero di piccoli vivi prodotti, l'osservazione della comparsa di maschi va considerata come facoltativa. Se in uno studio si decide di valutare questo endpoint facoltativo, occorre allora introdurre un ulteriore criterio di validità della prova utilizzando non oltre il 5 % di maschi nei controlli.

Il modo più veloce e semplice per differenziare il sesso delle *Daphnia* consiste nell'utilizzare le loro caratteristiche fenotipiche, in quanto maschi e femmine sono geneticamente identici e il sesso è determinato dalle condizioni ambientali. I maschi e le femmine sono diversi per la lunghezza e la morfologia delle prime antenne, più lunghe nei maschi che nelle femmine (fig. 1). Tale differenza è riconoscibile subito dopo la nascita, sebbene lo sviluppo di caratteristiche sessuali secondarie avvenga con la crescita (cfr., ad esempio, fig. 2 in Olmstead e LeBlanc, 2000).

Per osservare le caratteristiche sessuali morfologiche, i neonati prodotti da ciascun animale sperimentale devono essere trasferiti tramite una pipetta e inseriti in una capsula Petri con mezzo di prova. Il mezzo di prova è mantenuto al minimo per limitare il movimento degli animali. È possibile osservare le prime antenne con un microscopio stereoscopico ($\times 10-60$).

Fig. 1

Esemplari di *Daphnia magna* di 24 ore: maschio (sinistra) e femmina (destra). I maschi si distinguono dalle femmine per la lunghezza e la morfologia delle prime antenne, evidenziate nelle cerchiature (Tatarazako *et al.*, 2004).



RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Hobaek A e Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., e Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). *Environmental Science* 17, 439-449.»