

8000 - METODI ECOTOSSICOLOGICI

Premessa

Questa nuova edizione del manuale dei Metodi Analitici per le Acque presenta un gruppo di metodi tossicologici molto più nutrito rispetto all'edizione precedente. Buona parte di questi metodi, tuttavia, sono stati messi a punto per rispondere al precedente Decreto Legislativo n. 133 del 1992 che, in materia di scarichi industriali di sostanze pericolose, richiedeva metodi atti al rilevamento delle caratteristiche qualitative tanto dello scarico che del recettore. L'attuale D.Lgs. 152/99 ha abrogato quello come altri precedenti decreti, senza peraltro inficiare complessivamente la validità dei metodi fin qui prodotti. Secondo l'attuale decreto, infatti, ogni volta che un corpo idrico dimostra un livello qualitativo inferiore a "buono" o uno scarico evidenzia una tossicità superiore al limite di accettabilità, devono essere attivate indagini di approfondimento volte ad identificare e rimuovere le cause del degrado. Generalmente, indagini di questo tipo richiedono confronti sia nel tempo che nello spazio, richiedono cioè dei dati che, per quanto riguarda la tossicità, possono essere forniti solo da procedure di saggio come quelle proposte.

Se l'utilità dei metodi presentati è fuori discussione, non per questo si possono ignorare alcuni problemi. Ad esempio, non sono stati ancora proposti né un metodo di saggio con specie algali né un metodo di saggio cronico con *Daphnia magna*, sebbene entrambi siano da tempo impiegati con finalità di ricerca e di controllo. Nel caso del crostaceo marino *Mysidopsis bahia*, l'applicabilità del metodo sembra essere limitata dalla difficoltà di importare organismi che non sono garantiti come indenni da virus. E non ultimo, è evidente un certo grado di disomogeneità nella impostazione dei metodi, dovuta, in parte, ai differenti anni di nascita dei metodi stessi. A questo proposito, il metodo *daphnia*, che era originalmente concepito per la Legge Merli, è stato con alcune modifiche reso idoneo alle nuove condizioni di saggio su effluenti di scarico previste dal D.Lgs. 152/99.

È chiaro quindi che, se da un lato i metodi presentati sono un buon punto di partenza, dall'altro altre iniziative dovranno essere intraprese ed opportunamente coordinate allo scopo di garantire la migliore applicabilità del D.Lgs. 152/99.

A tal fine, pur se non presente tra le specie consigliate dal suddetto Decreto per la valutazione dell'accettabilità di uno scarico, il manuale riporta il metodo per trota iridea. Tale saggio infatti può dare importanti contributi alle indagini tossicologiche.

Considerazioni generali

I saggi di tossicità con animali acquatici vengono effettuati per valutare se un dato composto, una miscela di composti o un campione d'acqua di scarico sono tossici e, in caso positivo, per definire il grado di tossicità o i valori di diluizione compatibili con la vita acquatica.

Nel passato sono stati condotti saggi con organismi di una sola specie allo scopo di aumentare il grado di protettività del dato ottenuto; oggi si tende a sviluppare saggi "multispecie", condotti con organismi di livelli trofici diversi (batteri, alghe, crostacei, pesci).

Con i "test" riportati in questo volume si amplia ancora di più la possibilità di utilizzare metodi specifici in funzione delle esigenze del controllo e quindi di consentire sempre più quella valutazione della "qualità ecologica" delle acque verso cui si sta indirizzando la politica europea relativamente al controllo delle risorse idriche. Accanto ai "test" di tossicità acuta sono stati sviluppati "test" di tossicità di tipo cronico (prolungato). Si tratta di saggi mediamente più impegnativi dei rispettivi saggi acuti ma che, a differenza di questi, possono fornire risultati con un contenuto informativo assolutamente superiore e quindi di grande valore per chi aspiri ad un'effettiva tutela della vita acquatica.

In questa sezione viene dato ampio spazio agli aspetti operativi che precedono l'esecuzione del "test" (trasporto e mantenimento degli organismi, scelta dell'acqua e delle attrezzature per l'acclimatazione e l'alimentazione degli organismi) e che costituiscono un aspetto fondamentale per la corretta riuscita del saggio e per la riproducibilità dello stesso.

In considerazione della specificità di questo raggruppamento rispetto ai precedenti (Metodi fisici, chimici e chimico-fisici e Metodi microbiologici) tutti gli aspetti di carattere generale quali, campionamento, attrezzature, reattivi e metodi di calcolo sono trattati nei singoli saggi.

8010. Metodi di valutazione della tossicità con pesci

METODO A - Valutazione della LC₅₀

1. Generalità

1.1 Principio del metodo

Questo metodo, adottato nei casi in cui si presenti la necessità di salvaguardare ambienti biologici specifici od organismi particolari, si basa sulla determinazione della tossicità acuta espressa dalla LC₅₀, che è la diluizione alla quale il 50% degli animali considerati muore in un tempo prestabilito (24-48 ore o più). Tale diluizione viene determinata con un saggio preliminare ed uno definitivo: il saggio preliminare serve ad individuare l'ambito approssimato di diluizione entro il quale si trova la LC₅₀; il saggio definitivo invece permette di precisarne il valore. Per stabilire quali sono i rapporti di diluizione che debbono essere rispettati perchè l'ambiente biologico che riceverà le acque esaminate sia salvaguardato nella sua funzionalità, occorrerà infine che dalla LC₅₀ venga calcolata la "diluizione di sicurezza".

1.2 Interferenze

Nella valutazione della tossicità le principali interferenze possono essere rappresentate da mortalità dovute a livelli troppo bassi di ossigeno, da perdite di sostanze tossiche (per esempio volatili) o da altre cause che aumentino o riducano la tossicità del campione (per esempio precipitazione di sali di metalli pesanti, variazioni di pH, ecc.). Qualora l'analisi chimica abbia dimostrato che queste interferenze effettivamente esistono, la loro eliminazione potrà aver luogo essenzialmente in due modi:

- 1) sostituendo le soluzioni in esame con frequenza maggiore di quella prevista dal metodo, oppure operando con apparecchiature che permettano un ricambio continuo della soluzione in esame;
- 2) fornendo l'ossigeno necessario in modo tale da compensare quello utilizzato nei processi ossidativi dell'acqua e per la respirazione degli animali.

Controlli dovranno assicurare che durante tutto il periodo delle prove il livello di ossigeno si mantenga fra il 60 e 100% della saturazione.

1.3 Raccolta e conservazione dei campioni

Il volume del liquido necessario alle prove dipende dalla composizione e dal grado di tossicità del liquido stesso (in genere 10÷20 litri sono sufficienti). I campioni vanno raccolti in recipienti riempiti completamente e conservati a circa 4°C.

2. Apparecchiature

Per le prove di tossicità di tipo convenzionale (cioè a liquido non ricambiato in modo continuo), le apparecchiature necessarie sono rappresentate da vasche di vetro o bottiglie a collo

largo. Ne occorre una serie di almeno 8 della capacità minima di litri 4 (per il saggio preliminare), ed una serie di almeno 4 della capacità minima di litri 10 (per il saggio definitivo). La forma dei recipienti non ha grande importanza a condizione che la profondità del liquido non sia inferiore ai 15 cm. È inoltre indispensabile poter regolare (con bagni o camere termostate) la temperatura dei liquidi in esame durante tutto il tempo della prova. L'ambito di temperatura utile è compreso, orientativamente, tra 15 e 25°C, con oscillazioni di $\pm 1^\circ\text{C}$. Le temperature d'esperimento saranno prestabilite in funzione della temperatura massima osservata nel corpo recipiente in cui verrà scaricata l'acqua in esame. Occorrono infine vasche di stabulazione nelle quali conservare gli animali prima del loro impiego. L'acqua di queste vasche dovrà essere portata gradualmente alla temperatura alla quale si effettueranno le prove, curando che rimanga limpida (con riciclo su carbone o con ricambio in maniera continua) e ad un adeguato livello di ossigenazione (60÷100%) ottenibile con gorgogliamento d'aria. Nel caso di vasche a riciclo, occorrerà sostituire l'acqua di stabulazione con una frequenza che dipende dalla densità degli animali, e dalle loro esigenze. Analisi di alcune caratteristiche chimiche dell'acqua (per esempio N-NH_3) eseguite in tempi successivi, potranno dare utili indicazioni sulla frequenza del ricambio. Questo sistema di stabulazione è comunque da adottarsi solo quando manchi ogni possibilità di un continuo ricambio. In tali circostanze il periodo di stabulazione dovrà essere ridotto al minimo indispensabile.

3. Animali per il saggio e soluzioni

3.1 *Animali per il saggio*

Il metodo A, per definizione richiede che gli animali da usare nelle prove di tossicità vengano scelti in base all'interesse locale e contingente. Tale scelta cade generalmente sui pesci, ma anche altri rappresentanti della biocenosi acquatica possono essere utilizzati con successo (crostacei, insetti, ecc.) purché sufficientemente sensibili e tali da garantire la sopravvivenza anche alle altre componenti della citata biocenosi. In tutti i casi, è condizione indispensabile che i soggetti prescelti sopportino bene le condizioni di acquario, e questa possibilità va controllata in base al loro comportamento e alla mortalità osservata durante il periodo di acclimatazione che precede le prove. Quando la mortalità naturale supera il 10%, il lotto intero di animali deve essere accantonato e rimesso in uso solo quando detta mortalità receda. Occorre inoltre che gli animali siano assolutamente sani e di dimensioni omogenee: nel caso dei pesci sono preferibili soggetti di lunghezza corporea tra 5 e 10 cm. È altresì indispensabile che la loro classificazione sia effettuata con esattezza e che il nome scientifico sia indicato fino alla specie. Nell'ambito nazionale le specie di Pesci cui si fa generalmente ricorso per prove tossicologiche sono le seguenti: *Salmo gairdinerii* (trota iridea) attualmente denominata *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario* (trota di fiume), *Phoxinus laevis* (sanguinerola), *Alburnus albidus* (alborella), *Leuciscus cephalus cadeda* (cavedano). Queste specie si possono ottenere dalle piscicoltura o raccogliere nella maggior parte delle acque italiane. Durante il periodo di stabulazione, gli animali devono essere regolarmente ed opportunamente alimentati (sospendendo la somministrazione del cibo il giorno prima che inizino le prove e durante le prove stesse) e acclimatati alla temperatura alla quale si effettuerà il test.

3.2 *Numero di animali e volume di liquido*

Nel "test" preliminare, il numero minimo di animali da usare può essere di 2 per ogni diluizione e, in questo caso, anche il volume del liquido in esame potrà essere ridotto a 4 litri. Per la prova definitiva occorreranno invece almeno 10 soggetti per ogni diluizione a meno di non operare con organismi diversi dai pesci (crostacei, insetti ecc.) per i quali il numero dovrà essere più elevato (oltre 20). Il rapporto tra il peso complessivo degli animali ed il volume di acqua che li contiene dovrà essere stabilito in funzione di numerosi fattori e soprattutto con determinazioni del contenuto di ossigeno residuo. Poiché, usando 10 animali ciascuno del peso di 10 grammi occorrerebbero considerevoli volumi di liquido, si consiglia di superare la difficoltà che comporta l'uso di grandi vasche operando con animali di minori dimensioni o areando il liquido in esame.

3.3 *Acqua di diluizione*

In questo metodo, la condizione ideale sarebbe quella di poter effettuare le necessarie diluizioni del campione con l'acqua prelevata in una zona pura dello stesso corpo recipiente. Poiché ciò è raramente possibile (il corpo recipiente può essere già contaminato oppure possono essere necessari volumi di acqua troppo elevati), il diluente dovrà essere ricavato da altra fonte e corretto nelle sue principali caratteristiche (ad esempio pH, alcalinità e durezza) fino ad avere una composizione chimica simile a quella media del corpo recipiente.

4. **Procedimento**

4.1 *Saggio preliminare*

Tale saggio deve indicare se esiste una tossicità e, in caso positivo, quale sia dopo 24 ore l'ambito di diluizione entro il quale si trova la LC_{50} . A questo scopo si prepara, con gli accorgimenti indicati in precedenza, una vasca di 4 litri contenente il campione in esame tal quale (al 100%) e si controlla se il campione è tossico, introducendovi un piccolo gruppo di animali (per esempio 2 pesci). Se il campione non è tossico, il controllo di non tossicità viene prolungato a 48 ore, se invece entro le 24 ore si sono avuti esiti parziali o totali di mortalità, si procede all'allestimento delle diluizioni secondo una serie ad intervalli logaritmici uguali. Per esempio: 100 - 89,1 - 79,4 - 70,8 - 63,1 - 56,3 - 50,1 - 44,7 - 39,8 - 35,5 - 31,6 - 28,2 - 25,1 - 22,4 - 19,9 - 17,8 - 15,8 - 14,1 - 12,6 - 11,2 - 10, ecc. (*).

Esattamente a 24 ore di distanza dall'introduzione degli animali, la prova effettuata permetterà di individuare l'intervallo compreso tra la diluizione in cui la totalità o una parte soltanto (più della metà) degli animali usati è deceduta e quella che ha causato la morte solo di una parte (inferiore alla metà) o di nessuno degli animali usati. È evidente che, quando il saggio preliminare venga condotto con un elevato numero di intervalli di diluizione, l'ambito cercato (e cioè quello in cui si trova la LC_{50}) sarà più ristretto e la prova definitiva più agevole da effettuare.

4.2 *Saggio definitivo*

Quando nei recipienti contenenti il campione tal quale (100%) la sopravvivenza sia totale anche dopo 48 ore, il saggio definitivo consisterà semplicemente nel ripetere la prova con un numero maggiore di animali (almeno 10) con un maggiore volume di liquido. Quando invece con il saggio preliminare sia stato individuato l'ambito in cui si trova la LC_{50} , il saggio definitivo dovrà servire ad indicare quali sono le diluizioni che determinano, dopo 24 e 48 ore, percentuali di sopravvivenza inferiori (ma non nulle) al 50% e superiori (ma non totali) al 50%. Allo scopo si preparano alcune soluzioni nell'intervallo individuato attraverso le prove preliminari, diluendo secondo lo schema degli intervalli logaritmici e vi si introducono gli animali, annotando dopo 24 ore le percentuali di sopravvivenza come nel caso precedente e protraendo l'osservazione per 48 ore (gli animali che muoiono devono essere rimossi dalle vasche appena possibile). Se dopo i tempi indicati si ottengono i risultati necessari si può procedere al calcolo della LC_{50} . Diversamente, occorre ripetere la prova selezionando altri intervalli di diluizione.

5. **Determinazione grafica della LC_{50}**

Si portano su carta logaritmica le percentuali di sopravvivenza osservate per due diluizioni successive (diluizioni sulla scala logaritmica) dopo 24 ore. Si uniscono con una retta i due punti

(*) L'andamento del saggio effettuato con il campione tal quale dà in linea di massima già un'indicazione: per esempio con un campione che al 100% abbia causato la morte in circa 2 ore di tutti gli animali si potrà allestire la serie delle diluizioni alle concentrazioni del 25,1 - 12,6 - 6,31 - 3,16 e 1,58%, mentre con un campione poco tossico si potrà utilizzare la serie 100 - 79,4 - 63,1 - 50,1. Quando una scelta a priori non sia possibile, occorrerà allestire una serie di prove tra 100 e 0,1%, per esempio 100 - 31,6 - 10 - 3,16 - 1 - 0,361 - 0,1.

situati, per quanto detto in precedenza, sopra e sotto la linea del 50% e, dal punto in cui la retta interseca la linea del 50%, si traccia una perpendicolare all'asse delle diluizioni, ottenendo un valore corrispondente alla LC₅₀-24 ore. Lo stesso procedimento si segue utilizzando le percentuali di sopravvivenza annotate a 48 ore, ottenendo così la LC₅₀-48 ore (Fig. 1). Valutazioni più accurate della LC₅₀ possono essere effettuate con le metodologie di calcolo riportate in appendice ai metodi che utilizzano la *Daphnia*.

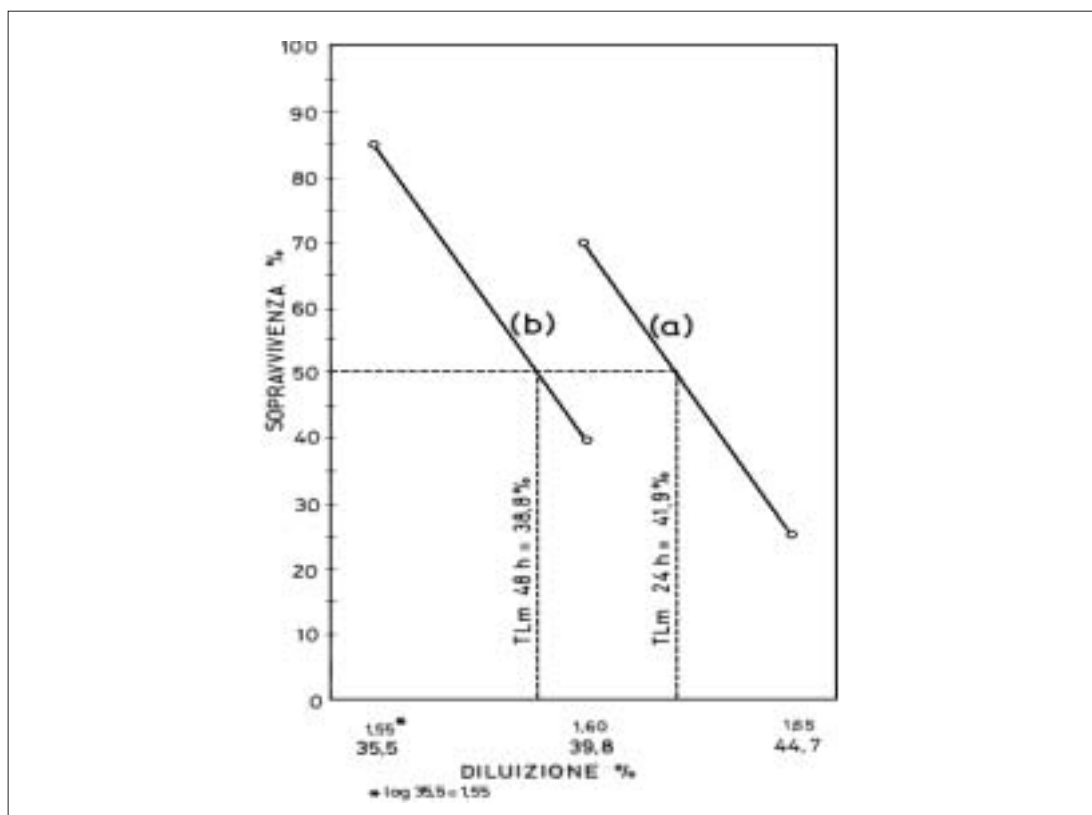


Figura 1: Determinazione grafica della LC₅₀.
 * I valori di sopravvivenza più indicativi e più corretti per il calcolo della LC50 sono quelli che si trovano per le diluizioni tra il 20 e l'80%.

6. Calcolo della diluizione di sicurezza

La LC₅₀ calcolata con il metodo descritto non è evidentemente utilizzabile tal quale; in questo caso non solo si esige che il 100% di detta popolazione sopravviva, ma occorre anche prevenire gli eventuali effetti nocivi che si potrebbero verificare in un tempo maggiore di quello previsto dal metodo A. I valori di LC₅₀-24 e 48 ore vengono a questo scopo elaborati come segue:

$$D = \frac{LC_{50} 48h \times 0,3}{\left[\frac{LC_{50} 24h}{LC_{50} 48h} \right]^2}$$

dove D è la diluizione di sicurezza cercata.

Questa diluizione, adottando animali molto sensibili, quali ad esempio i Salmonidi, può dare sufficienti garanzie ai fini della protezione dell'intero ambiente biologico.

Esempio: Un campione di acqua contaminata deve essere immesso in un fiume di cui è ne-

cessario salvaguardare l'intera biocenosi. Occorre stabilire di conseguenza, qual è nel caso specifico la diluizione di sicurezza, adeguando il più possibile le condizioni sperimentali a quelle del corpo recipiente (temperatura, caratteristiche del diluente, specie di animali da utilizzare, ecc.). La ricerca è condotta in due tempi:

Saggio preliminare con 2 animali per ogni diluizione

La prova del campione tal quale dà il seguente esito: entrambi gli animali muoiono in 6 ore. Si procede di conseguenza all'allestimento di almeno 4 diluizioni, per esempio quelle comprese tra il 79,4 e il 19,9%. (cioè 79,4 - 50,1 - 31,6 - 19,9%. Se è il caso i valori possono essere approssimati). A 24 ore di distanza la prova preliminare dà il seguente esito: alle diluizioni 79,4 e 50,1 si ha sopravvivenza nulla; alle diluizioni 31,6 e 19,9 si ha sopravvivenza totale. Di conseguenza la LC_{50} si troverà tra 50,1 e 31,6%.

Saggio definitivo con 2 animali per ogni diluizione

Si preparano 3 diluizioni comprese tra 50,1 e 31,6% ad intervalli logaritmici eguali e cioè 44,7 - 39,8 e 35,5%. Si introducono 20 animali per ogni diluizione e si annotano i sopravvissuti a 24, 48 e 96 ore. Nell'esempio gli esiti di questa prova sono:

Diluizione	44,7%	39,8%	35,5%
Animali sopravvissuti a 24 h	5 (25%)	14 (70%)	20 (100%)
Animali sopravvissuti a 48 h	0 (-)	8 (40%)	17 (85%)

Si portano su un grafico semilogaritmico (Fig. 1) le diluizioni (in scala logaritmica) e le % di sopravvivenza osservate alle 24 ore (il 100% di sopravvivenza non è utilizzabile così come lo 0%). Si congiungono i due punti con una retta (a nella figura). Dal punto di intersezione con la linea del 50% si traccia la perpendicolare all'asse delle diluizioni ottenendo il valore logaritmico 1,622 il cui corrispondente in % è la LC_{50} -24 h = 41,9%. Con analogo procedimento si trova la LC_{50} a 48 ore che è 38,8% (b nella figura). La diluizione di sicurezza, applicando l'equazione riportata al paragrafo 6, di conseguenza è:

$$D = \frac{0,3 \times 38,8}{\left[\frac{41,9}{38,8} \right]^2} = 9,98\%$$

Se lo scarico in questione ha una portata per esempio di 8 litri al secondo si potrà così calcolare la portata minima (Q) che il corpo recipiente dovrà avere perchè non abbiano luogo eventi tossici di nessun genere:

$$Q = \frac{8(100 - 9,98)}{9,98}$$

Dopo diluizione la portata sarà quindi di 80 litri al secondo.

7. Controlli e precisione del metodo

Le prove di tossicità esigono controlli soprattutto quando la mortalità ottenuta, nel periodo che precede le prove sia al limite del valore accettabile (10%). I controlli vanno effettuati allestendo, con il solo diluente, delle vasche in condizioni identiche a quelle delle prove. Quando, durante la prova, si osservano tra gli animali di controllo mortalità superiori al 10%, la prova va ripetuta usando un altro lotto di animali.

La valutazione della LC_{50} può essere resa più precisa, impiegando carta di probabilità o usando metodi statistici basati sul calcolo, anziché sull'extrapolazione grafica della LC_{50} .

Ai fini abituali per i quali vengono condotte queste determinazioni, il metodo descritto può essere tuttavia considerato soddisfacente. Incidono però sulla precisione del metodo anche altri fattori (numero e cariche degli animali, ampiezza dell'intervallo tra le diluizioni, uniformità della metodologia adottata, ecc.), che possono essere in buona parte ridotti aumentando il numero dei soggetti, riducendo gli intervalli tra le diluizioni ed adottando metodi con ricambio continuo o intervallato del liquido in esame.

8. Espressione dei risultati

I risultati del saggio tossicologico vengono espressi in termini di LC_{50} a 24 e a 48 ore (in volumi % del campione originale o altra unità). È indispensabile che accanto ai due valori di LC_{50} vengano indicate le condizioni sperimentali adottate e in particolare: specie usata, temperatura di esperimento, caratteristiche del diluente, modalità di ossigenazione, condizioni chimiche all'inizio e alla fine delle prove, volume del liquido usato, numero, dimensioni e peso degli animali.

METODO B - Valutazione dell'accettabilità di un effluente

1. Generalità

1.1 Campo di applicazione del metodo

Il metodo B prevede, per un giudizio di accettabilità delle acque di scarico, che il campione in esame diluito 1:1 con acqua standard, consenta la sopravvivenza di almeno il 50% degli animali usati per il saggio il carassio e la trota per un periodo di 24 ore, alla temperatura, rispettivamente, di 20°C e 15°C, e in condizioni di aerazione.

Il metodo quindi, a differenza di quello descritto in precedenza, è rigorosamente standardizzato per la necessità di operare in condizioni confrontabili nell'esecuzione dei controlli sui diversi scarichi.

1.2 Principio del metodo

Il metodo consiste nel valutare il numero di animali che sopravvivono dopo un periodo di 24 ore a contatto con il campione di effluente, in condizioni sperimentali standardizzate e ad un'unica diluizione (50% con acqua standard).

1.3 Raccolta e conservazione dei campioni

Il volume del campione necessario per il saggio è di 20 litri. Di questi, 10 vengono utilizzati per il saggio e 10 vengono tenuti come riserva nel caso che quest'ultimo debba essere ripetuto. Il campione va conservato a 4°C per non oltre 2 giorni in recipiente riempito completamente.

2. Apparecchiature, reattivi e animali per il saggio

2.1 Apparecchiature

Sono necessarie due vasche di vetro o di altro materiale inerte di almeno 20 litri di capacità. La forma dei recipienti non ha grande importanza, a condizione che sia assicurato un battente di almeno 15 cm. Particolarmente adatte possono essere vasche di cm 50x25 di base e cm 20-30 di altezza.

Le vasche per il saggio con trota devono essere fornite di una ricopertura a rete. Per la ter-

moregolazione sono necessari bagni o camere termostatiche alla temperatura di 15°C (saggio con trota) e 20°C (saggio con carassio).

Per quanto riguarda l'aerazione, le vasche devono essere fornite di un gorgogliatore ad aria che consenta di mantenere la concentrazione dell'ossigeno tra il 40 e il 100% di saturazione durante tutto il saggio.

Per le vasche di stabulazione vedasi il Capitolo 2 del metodo A.

2.2 Acqua standard

L'acqua standard, da utilizzare per la diluizione del campione di effluente e per il saggio di controllo, va preparata con i seguenti sali:

NaHCO ₃	mg/L 192
CaSO ₄ ·2H ₂ O	mg/L 120
MgSO ₄	mg/L 120
KCl	mg/L 8

I sali elencati vanno disciolti, nelle quantità indicate, in acqua distillata o deionizzata e la soluzione va aerata prima dell'uso. Il pH che si ottiene dopo aerazione è di 7,8-8, la durezza è 160-180 mg/L CaCO₃ e l'alcalinità 110-120 mg/L CaCO₃.

2.3 Animali per il saggio

Per il saggio con carassio si utilizzano animali della specie *Carassius auratus* di 5-6 cm di lunghezza.

Per il saggio con trota s'impiegano animali della specie *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mykiss*) di 8-12 cm di lunghezza. Per quanto riguarda le condizioni di stabulazione si rinvia al Capitolo 2 e al paragrafo 3.1 del metodo A.

2.4 Numero di animali e volume del campione

Per ogni prova sono necessari 10 animali che dovranno essere mantenuti in vasche contenenti 20 litri di campione da saggiare opportunamente diluito, aerato e termostato.

3. Procedimento

Si preparano due contenitori per il saggio. In uno vengono travasati 10 litri del campione da saggiare e 10 di acqua standard, nell'altro 20 litri di acqua standard. Si procede all'aerazione e alla termostatazione a 15°C (trota) o a 20°C (carassio).

A condizioni operative raggiunte, si trasferiscono dalle vasche di stabulazione (che devono avere la stessa temperatura del saggio) 10 animali nella vasca con il campione diluito e 10 in quella con il solo diluente (controllo). Il trasferimento va eseguito utilizzando un retino che consenta di effettuare tutte le operazioni con rapidità e senza eccessivo stress per gli animali. A 2-3 ore dall'inizio del saggio si verificano le condizioni di ossigenazione e si regola l'aerazione in modo da mantenere la saturazione sopra il 40% nel caso del carassio e sopra il 60% in quello della trota.

Dopo 24 ore si rileva il numero degli animali sopravvissuti.

Se durante la prova si osservano mortalità, gli organismi deceduti vanno rimossi dalle vasche.

4. Risultato del saggio

Il campione in esame è giudicato accettabile se al termine della prova, sopravvivono 5 o più animali.

Se nella vasca di controllo si è registrato anche un solo decesso la prova va ripetuta.