

PROTOCOLLO

PROVA VALUTATIVA “ISPRA-IC062”

Saggio di tossicità con *Phaeodactylum tricornutum* su
tossico cieco

Revisione	Del	Note
0	31/01/2024	Prima emissione

PROTOCOLLO	ISPRA IC062	Data: 31/01/2024 Pagina 1 di 9
------------	-------------	-----------------------------------

Indice:

1) Descrizione e scopo	2
2) Destinatari	2
3) Regole Generali	3
4) Calendario attività	3
5) Materiale di Prova	4
5.1 Materiale di prova – tossico di riferimento	4
5.2 Materiale di prova – tossico cieco ISPRA-IC062	4
5.3 Proprietà d'interesse.....	4
6) Esecuzione della Prova	5
6.1 Indicazioni sui metodi di prova.....	5
6.2 Modalità di esecuzione della prova.....	5
6.3 Attività svolta dal personale di ISPRA per conto dei Partecipanti	6
7) Scheda dei Risultati	6
8) Elaborazione statistica e valutazioni	7
9) Rapporto Conclusivo	8
10) Informazioni sulla riservatezza	8
11) Conservazione dati e materiali di prova	8
12) Danneggiamento/ Perdita dei materiali di prova distribuiti	8
13) Costi	8
14) Riferimenti	8

1) Descrizione e scopo

La prova valutativa ISPRA IC062 si pone l'obiettivo di confrontare i risultati relativi alla determinazione dell'inibizione del tasso di crescita della diatomea marina unicellulare *Phaeodactylum triconutum* per effetto di un tossico di riferimento ($K_2Cr_2O_7$) e di un tossico cieco.

Il presente Protocollo specifica le modalità di esecuzione della prova valutativa. I laboratori possono partecipare adottando la procedura di misura in uso presso i propri laboratori e ritenuta adeguata allo scopo.

2) Destinatari

ISPRA IC062 è indirizzato ai laboratori delle ARPA/APPA indicati dalla Rete (RR-TEM 16-3) per il supporto a ISPRA per l'organizzazione di confronti interlaboratorio in ambito SNPA.

Nell'ambito delle Giornate di Ecotossicologia Applicata, organizzate annualmente da ISPRA presso la sede di Livorno, molti laboratori di organizzazioni private e pubbliche (escluse dal circuito SNPA) hanno mostrato un interesse elevato per la tipologia di circuito descritta nel presente Protocollo. Sulla base di quanto riportato, ISPRA ritiene utile e opportuno, in questo specifico ambito, aprire l'adesione ad altri laboratori rendendo anche la base numerica statisticamente più solida.

PROTOCOLLO	ISPRA IC062	Data: 31/01/2024 Pagina 2 di 9
------------	-------------	-----------------------------------

	Area Metrologia – Area Ecotossicologia Via Fosso del Fiorano 64 00143 Roma	
---	---	---

3) Regole Generali

L'adesione alla prova valutativa seguirà la seguente procedura:

1. Invio da parte di ISPRA ai Referenti (RR TEM16-3, università, società privata) dell'**Elenco dei Nominativi** unitamente al **Protocollo** della prova valutativa;
2. Compilazione dell'**Elenco dei Nominativi** da parte di ciascun Referente, sulla base delle adesioni ricevute dai laboratori appartenenti alla propria agenzia/istituzione/società, ed invio ad ISPRA (ic062@isprambiente.it).

Quanto previsto al paragrafo 3 deve essere completato entro la data prevista (vedi paragrafo 4).

I materiali di prova sono costituiti da:

1. Tossico cieco (circa 1,5 g) denominato ISPRA-IC062 (distribuito dall'organizzatore);
2. Tossico di riferimento, dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) (a carico del partecipante).

Ogni unità di materiale di ISPRA-IC062 è distribuita ai laboratori partecipanti in provette in polietilene con bordo dritto e tappo a pressione (volume 5 mL) e consegnate tramite corriere.

Ad ogni laboratorio partecipante viene attribuito un codice identificativo a cui saranno associati i propri risultati. Tale codice è noto al laboratorio partecipante alla prova valutativa e al Referente dell'agenzia/università/società privata a cui afferisce il laboratorio.

I Partecipanti effettuano le misure, secondo le indicazioni del presente protocollo e restituiscono i risultati, unitamente alle informazioni riguardanti le procedure di misura utilizzate, mediante la **Scheda dei Risultati** (Paragrafo 7) collegata al materiale di prova, entro i termini temporali fissati nel calendario delle attività (Paragrafo 4).

Prima dell'elaborazione dei dati, l'organizzatore può eventualmente chiedere ai laboratori partecipanti una conferma dei dati trasmessi.

Ad ogni Partecipante sarà inviato un Rapporto Conclusivo con le valutazioni statistiche.

4) Calendario attività

Il CI si svolge indicativamente secondo la tempistica sotto riportata:

Entro 2 febbraio 2024

ISPRA invia il Protocollo ai Referenti RR-TEM 16-3/università/società privata unitamente all'Elenco dei Nominativi

Entro 15 febbraio 2024

Data ultima di adesione, mediante invio ad ISPRA (ic062@isprambiente.it) da parte dei Referenti RR-TEM 16-3/università/società privata dell'Elenco Nominativi compilato

PROTOCOLLO	ISPRA IC062	Data: 31/01/2024 Pagina 3 di 9
------------	-------------	-----------------------------------

Entro 29 febbraio 2024

Spedizione a ciascun Laboratorio partecipante dei materiali di prova.

Entro 31 marzo 2024

Trasmissione ad ISPRA da parte dei laboratori partecipanti della scheda contenente i risultati delle misure effettuate sul materiale di prova.

Entro aprile 2024

Invio valutazioni statistiche preliminari dei risultati a Referenti e laboratori partecipanti (Rapporto Preliminare)

Entro maggio 2024

Invio del Rapporto Conclusivo ai Referenti e laboratori partecipanti

Entro giugno 2024

Riunione plenaria in videoconferenza di presentazione e discussione degli esiti della prova valutativa tra tutti i partecipanti al CI.

5) Materiale di Prova**5.1 Materiale di prova – tossico di riferimento**

Il tossico di riferimento (TR) per le prove ecotossicologiche con *P. tricornutum* deve essere costituito da sale dicromato di potassio $K_2Cr_2O_7$. Il materiale non è fornito dagli organizzatori.

5.2 Materiale di prova – tossico cieco ISPRA-IC062

Il tossico cieco (ISPRA-IC062) per le prove ecotossicologiche con *P. tricornutum*. è costituito da un sale incognito. Il sale, circa 1,5 g, viene fornito dagli organizzatori del CI ai laboratori partecipanti in provette in polietilene con bordo dritto e tappo a pressione (volume 5 mL). Le provette sono conservate in un locale a temperatura controllata ($+20 \pm 4^\circ C$) prima della loro spedizione.

Ogni unità di ISPRA-IC062 è identificata univocamente da un codice numerico progressivo. Dal ricevimento del materiale di prova, è cura del laboratorio partecipante provvedere ad una sua corretta conservazione nel suo contenitore d'origine, chiuso e posto a temperatura controllata ($+20 \pm 4^\circ C$).

5.3 Proprietà d'interesse

I parametri richiesti relativi alla prova definitiva di inibizione del tasso di crescita dell'alga *P. tricornutum* con il tossico di riferimento e con il tossico cieco ISPRA-IC062 sono i seguenti:



Prova con *P. tricornutum*

- Per il tossico di riferimento TR: valori grezzi ed $E_rC_{50-72 \pm 2}$ ore, espresso in $mg L^{-1}$ di sale $K_2Cr_2O_7$,
- Per il tossico cieco ISPRA-IC062: valori grezzi ed $E_rC_{50-72 \pm 2}$ ore, espresso in $mg L^{-1}$.

I valori grezzi restituiti dai partecipanti saranno rielaborati da ISPRA secondo quanto riportato nel paragrafo 6.3. Quanto riportato di seguito è da intendersi in riferimento ai valori rielaborati.

Il valore assegnato alla proprietà di interesse relativo al tossico cieco sarà determinato come valore medio robusto di consenso (anti-trasformato) dei risultati di E_rC_{50} (trasformati in logaritmo) dei

PROTOCOLLO	ISPRA IC062	Data: 31/01/2024 Pagina 4 di 9
------------	-------------	-----------------------------------

	Area Metrologia – Area Ecotossicologia Via Fosso del Fiorano 64 00143 Roma	
---	---	---

Laboratori partecipanti tramite l'applicazione dell'Algoritmo A [5]. Al valore assegnato sono associati un limite inferiore ed uno superiore di attenzione, pari rispettivamente al valore assegnato più o meno due volte il valore dello scarto tipo robusto del circuito ISPRA-IC062. Tutti i valori, compresi gli outliers, saranno considerati nella valutazione del valore assegnato e dello scarto tipo robusto del circuito. Tuttavia, qualora siano presenti outliers superiori al 20% dei dati questi non verranno inclusi nelle elaborazioni statistiche.

6) **Esecuzione della Prova**

6.1 Indicazioni sui metodi di prova

I laboratori partecipanti devono eseguire il saggio algale in base alla norma UNI EN ISO 10253:2017.

6.2 Modalità di esecuzione della prova

Per il **saggio algale**, ciascun laboratorio dovrà presentare i risultati relativi ad 1 saggio di inibizione di crescita con *P. tricornutum*, per ciascun materiale di prova (TR e ISPRA-IC062), con determinazione dell' $E_rC_{50-72} \pm 2$ ore.

Il saggio con il tossico ISPRA-IC062 deve comportare due fasi:

- prova preliminare per determinare l'intervallo di concentrazioni (range-finding test) entro il quale deve essere eseguita la prova definitiva, come indicato nella norma.
- prova definitiva per il calcolo della $E_rC_{50-72} \pm 2$ ore. Le alghe devono essere esposte ad una serie geometrica di concentrazioni del tossico cieco con un fattore non eccedente 3,2.

La soluzione madre dovrà essere preparata sciogliendo il tossico cieco nel mezzo nutritivo completo nella proporzione di 1g/L.

Il saggio algale è da considerarsi valido secondo i criteri di validità indicati dalla norma UNI EN ISO 10253:2017 (paragrafo 8).

Per il tossico di riferimento è assunto come criterio di validità un valore di E_rC_{50} pari a $20,1 \pm 5,3$ mg L⁻¹ di sale K₂Cr₂O₇ (UNI EN ISO 10253:2017, Annex C).

I risultati delle misure ecotossicologiche devono essere inseriti nella **Scheda dei Risultati** secondo le indicazioni riportate. I laboratori partecipanti si dovranno impegnare ad effettuare le analisi con la stessa accuratezza normalmente posta nelle analisi di routine eseguite dal laboratorio stesso.

Le modalità di calcolo della E_rC_{50-72h} utilizzato dal laboratorio partecipante devono essere anch'esse indicate nella **Scheda dei Risultati**.

Il mancato rispetto di tali criteri di validità, o l'assenza delle informazioni richieste nella scheda risultati, determina l'esclusione dei risultati del laboratorio dalle successive valutazioni statistiche.

PROTOCOLLO	ISPRA IC062	Data: 31/01/2024 Pagina 5 di 9
------------	-------------	-----------------------------------

	Area Metrologia – Area Ecotossicologia Via Fosso del Fiorano 64 00143 Roma	
---	---	---

6.3 Attività svolta dal personale di ISPRA per conto dei Partecipanti

L'Area Ecotossicologia di ISPRA, per ciascun risultato grezzo restituito dai partecipanti, effettuerà un ricalcolo del valore di inibizione dei tassi di crescita e conseguentemente dell'ErC50-72h utilizzando il foglio di calcolo excel Alghe Marine Regtox, derivante dal software gratuito e disponibile nel sito http://www.normalesup.org/~vindimian/en_index.html. Il foglio di calcolo excel Alghe Marine Regtox, sviluppato da Éric Vindimian dell'École normale supérieure di Parigi, è stato adattato al saggio algale, e permette il calcolo di ErCx tramite modelli di regressione non lineare (es.: Hill, Gentox, Weibull, Log-normal). Il foglio di calcolo è stato precedentemente applicato in studi collaborativi organizzati da ISPRA.

7) Scheda dei Risultati

La scheda dei risultati, sottoforma di file Excel (ad esempio LAB-10.xls), sarà inviata ai laboratori all'indirizzo di posta elettronica comunicato al momento dell'adesione.

Il file Excel è composto da cinque (5) fogli in cui la parte di colore verde viene compilata dall'organizzatore e la parte in colore giallo/arancione viene compilata dal Laboratorio partecipante. La struttura della scheda è la seguente:

1. Foglio 1 - “Generalità” del Laboratorio partecipante: viene compilato principalmente dall'organizzatore, per un riscontro sull'esattezza dei dati inviati; i partecipanti possono apportare eventuali correzioni se necessario. Viene inoltre assegnato il codice identificativo del Laboratorio partecipante;
2. Foglio 2 - “TR-ALGHE” riportare per il tossico di riferimento: il valore della concentrazione cellulare iniziale (cellule/mL), i valori delle concentrazioni cellulari (cellule/ mL), per ciascuna replica (sia del controllo che di ogni soluzione di prova) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione, il valore di ErC50-72h (mg K₂Cr₂O₇/L) con i relativi limiti di confidenza, il valore del pH del controllo ad inizio e fine prova¹.
3. Foglio 3 - “ISPRA-IC062-ALGHE” riportare per il tossico cieco: il valore della concentrazione cellulare iniziale (cellule/mL), i valori delle concentrazioni cellulari (cellule/ mL), per ciascuna replica (sia del controllo che di ogni soluzione di prova) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione, il valore di ErC50-72 h con i relativi limiti di confidenza, il valore del pH del controllo ad inizio e fine prova¹.
4. Foglio 4 - “Incertezza”: contiene un campo da compilare a cura del laboratorio con informazioni circa la modalità di calcolo dell'incertezza di misura (metodo, fattore di copertura, etc.).
5. Foglio 5 - “Procedure di Misura”: il partecipante deve fornire una breve descrizione delle procedure analitiche utilizzate, compilando con la maggior cura possibile e ove applicabile, i campi riportati.

¹ Nel caso di test in piastra è sufficiente riportare i valori delle concentrazioni cellulari iniziali e a 72h

PROTOCOLLO	ISPRA IC062	Data: 31/01/2024 Pagina 6 di 9
------------	-------------	-----------------------------------

	Area Metrologia – Area Ecotossicologia Via Fosso del Fiorano 64 00143 Roma	
---	---	---

Le Schede Risultati compilate in ogni loro parte vanno rese ad ISPRA ENTRO E NON OLTRE il 31 marzo 2024 al seguente indirizzo e-mail: ic062@isprambiente.it.

8) Elaborazione statistica e valutazioni

L'analisi dei dati forniti dai laboratori partecipanti, una volta rielaborati da ISPRA secondo quanto riportato al paragrafo 6.3, sarà effettuata utilizzando modelli di elaborazione statistica appropriati ai saggi ecotossicologici ed in conformità alla norma UNI ISO 13528:2022 [5].

I risultati dei laboratori partecipanti saranno sottoposti ad una accurata verifica preliminare. La verifica riguarda la completezza delle informazioni inviate, propedeutiche all'elaborazione statistica, e la corrispondenza tra quanto dichiarato dai laboratori e quanto previsto dal protocollo del circuito. Tutti i valori, compresi gli outliers, saranno considerati nella valutazione del valore assegnato e dello scarto tipo robusto del circuito. Tuttavia, qualora siano presenti outliers superiori al 20% dei dati questi non verranno inclusi nelle elaborazioni statistiche del valore assegnato e dello scarto tipo robusto.

In particolare, tutti i valori di E_rC_{50} , inviati dai laboratori e rielaborati da ISPRA, saranno sottoposti al test per la verifica della normalità, saranno trasformati in logaritmo base 10 secondo quanto riportato nel documento "Environment Canada, 2005" [2].

La valutazione dell'accettabilità dei dati di ciascun laboratorio per il tossico cieco sarà effettuata sulla base dei punteggi di z -score (z) calcolati secondo l'Equazione 1, in accordo a UNI ISO 13528:2022 e UNI ISO 17043:2023 [5,4].

$$Z = \frac{X_{LAB} - X_{RM}}{\hat{\sigma}} \quad \text{Equazione 1}$$

dove:

- X_{LAB} = risultato rielaborato (in base Log10) del laboratorio, relativo alla proprietà di interesse;
- X_{RM} = valore assegnato di riferimento (in base Log10) della proprietà di interesse;
- $\hat{\sigma}$ = scarto tipo robusto della prova valutativa (in base Log10)

Vengono adottati i seguenti criteri di accettabilità degli z -score:

	z	≤ 2	Accettabile
$2 <$	z	< 3	Discutibile
	z	≥ 3	Non Accettabile

PROTOCOLLO	ISPRA IC062	Data: 31/01/2024 Pagina 7 di 9
------------	-------------	-----------------------------------

	Area Metrologia – Area Ecotossicologia Via Fosso del Fiorano 64 00143 Roma	
---	---	---

9) **Rapporto Conclusivo**

I laboratori ed il gruppo dei referenti RR-TEM 16-3 di ciascuna Agenzia riceveranno per commenti entro il 30 aprile 2024 un Rapporto Preliminare (accettabilità dei risultati, z-score). Il Rapporto Conclusivo sarà inviato entro il 31 maggio 2024.

10) **Informazioni sulla riservatezza**

È garantita la confidenzialità dei risultati in quanto ogni Partecipante sarà registrato con un codice noto all'Organizzatore della prova, al referente del laboratorio partecipante e al Referente (della propria agenzia) a supporto dell'organizzazione dei circuiti d'interconfronto.

Tutte le informazioni acquisite durante l'esecuzione della prova valutativa sono trattate in modo confidenziale.

Il Rapporto conclusivo potrà essere reso pubblico e distribuito all'esterno, su esplicita richiesta di una parte interessata.

11) **Conservazione dati e materiali di prova**

Tutte le informazioni fornite dai partecipanti, nonché i dati e le elaborazioni eseguite dall'Organizzatore della prova valutativa sono conservate per un periodo di 10 anni. Nell'ambito delle finalità della prova l'Organizzatore garantisce la disponibilità di unità di materiale di prova fino ad esaurimento delle stesse.

12) **Danneggiamento/ Perdita dei materiali di prova distribuiti**

Qualora il materiale di prova ricevuto dal Laboratorio partecipante risulti danneggiato o altro, l'Organizzatore provvederà ad un nuovo invio/ritiro, valutato in funzione della disponibilità. I tempi di restituzione dei risultati da parte dei partecipanti non variano.

13) **Costi**

La partecipazione al CI e la distribuzione dei materiali di prova è gratuita per i laboratori delle ARPA/APPA e di altre istituzioni pubbliche. Per i laboratori privati è previsto a loro carico solo il costo di spedizione del materiale di prova ISPRA-IC062.

14) **Riferimenti**

1. ASTM E691-1999 “Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method.”
2. Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests. Environment Canada Report EPS 1/RM/46 March 2005 (with June 2007 amendments).
3. UNI EN ISO 10253:2017: Water quality — Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema sp.* and *Phaeodactylum tricorutum*
4. UNI EN ISO/IEC 17043:2023 Valutazione della conformità - Requisiti generali per la competenza dei provider di prove valutative interlaboratorio

PROTOCOLLO	ISPRA IC062	Data: 31/01/2024 Pagina 8 di 9
------------	-------------	-----------------------------------

	Area Metrologia – Area Ecotossicologia Via Fosso del Fiorano 64 00143 Roma	
---	---	---

5. UNI ISO 13528:2022 “Metodi statistici utilizzati nelle prove valutative mediante confronti interlaboratorio”.

Per ogni ulteriore chiarimento, fare riferimento a:

Coordinatori Confronto Interlaboratorio ISPRA IC062

Andrea Tornambè, 0650073228, ic062@isprambiente.it

Claudia Sebbio, 0650072302, ic062@isprambiente.it

Cristina Martone 0650073226, ic062@isprambiente.it

PROTOCOLLO	ISPRA IC062	Data: 31/01/2024 Pagina 9 di 9
------------	-------------	-----------------------------------