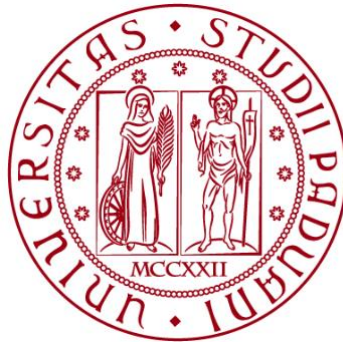


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Scienze Naturali



ELABORATO DI LAUREA

Indagini ecotossicologiche con organismi di acqua dolce per la determinazione della classe di pericolo dei rifiuti

Tutor: Prof. Valerio Matozzo
Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Martina Lorenzetto
Agrolab Italia s.r.l.

Laureanda: Alice Azzolin

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1	INTRODUZIONE	4
1.1	LA CLASSIFICAZIONE DEI RIFIUTI	4
1.1.1	Riferimenti normativi	4
1.1.2	La classe HP 14	5
2	SCOPO DELLA TESI	7
3	MATERIALI E METODI.....	8
3.1	PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	8
3.2	PROVE ECOTOSSICOLOGICHE	9
3.2.1	<i>Danio rerio</i>	9
3.2.2	<i>Daphnia magna</i>	11
3.2.3	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	13
3.3	SKIN CORROSION E SKIN IRRITATION TEST	14
4	RISULTATI	16
4.1	<i>DANIO RERIO</i>	16
4.2	<i>DAPHNIA MAGNA</i>	18
4.3	<i>RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA</i>	20
4.4	SKIN CORROSION E SKIN IRRITATION TEST	22
5	DISCUSSIONE.....	23
6	CONCLUSIONI	25
7	BIBLIOGRAFIA	26
8	SITOGRAFIA.....	28

1 Introduzione

1.1 La classificazione dei rifiuti

Nell'ambito delle procedure di gestione dei rifiuti, risulta fondamentale garantire *in primis* la loro corretta classificazione, al fine di procedere con le operazioni di manipolazione, trasporto, recupero e smaltimento nella maniera più adeguata. La classificazione assume un ruolo determinante in particolar modo nel caso dei rifiuti pericolosi, che costituiscono un rischio per l'ambiente e per la salute umana. Le principali indicazioni sulla gestione dei rifiuti vengono fornite dal decreto legislativo n. 152/2006, che riporta anche alcune definizioni basilari: esso definisce come "rifiuto" qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l'intenzione o l'obbligo di disfarsi, mentre "rifiuto pericoloso" è il rifiuto che presenta una o più caratteristiche di cui all'allegato I della parte quarta del decreto (art. 183). I rifiuti vengono preliminarmente suddivisi in base alla loro origine in rifiuti urbani e rifiuti speciali e, secondo le caratteristiche di pericolosità, in rifiuti pericolosi e rifiuti non pericolosi (art. 184). Un elenco esaustivo dei rifiuti è contenuto nel Catalogo Europeo dei Rifiuti (CER), nel quale ad ogni rifiuto viene assegnato un codice identificativo composto da tre coppie di numeri, che indicano rispettivamente la famiglia di attività di provenienza del rifiuto, la specifica attività produttiva che lo origina ed infine la tipologia di rifiuto originata. Una volta determinato il codice di appartenenza, nel caso dei rifiuti pericolosi il processo di classificazione prosegue con la valutazione della loro pericolosità, attraverso l'assegnazione di una precisa classe di pericolo.

La classificazione e, più in generale, la gestione dei rifiuti urbani e industriali è diventata una priorità assoluta, poiché la loro produzione aumenta regolarmente con il tenore di vita delle popolazioni. Inoltre, il conferimento in discarica dei rifiuti, che ancora rappresenta una delle principali vie di smaltimento, può costituire una potenziale fonte di contaminazione dei suoli e delle falde acquifere da parte delle acque di percolazione (Pandard et al., 2006). L'importanza di una corretta classificazione diventa evidente anche considerando che attribuire o meno ad un rifiuto la caratteristica di pericolosità influenza l'intero processo cui esso sarà sottoposto, oltre a quella che sarà la sua destinazione finale.

1.1.1 Riferimenti normativi

Nell'Unione Europea, la classificazione dei rifiuti è disciplinata essenzialmente dalla direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e dalla decisione della Commissione 2000/532/CE. La prima si prefigge lo scopo di fornire una serie di misure volte a proteggere l'ambiente e la salute umana, in particolare

attraverso una più efficace gestione dei rifiuti; la seconda stabilisce invece l'elenco europeo dei rifiuti e la corretta procedura di attribuzione del codice a sei cifre pertinente. Infine, con la comunicazione 2018/C 124/01, la Commissione Europea ha elaborato una serie di linee guida che predispongono ulteriori orientamenti tecnici su alcuni aspetti della decisione e della direttiva appena descritte. Essa riporta le procedure generali per la classificazione dei rifiuti, che si articolano in diverse fasi: dopo aver identificato un rifiuto come tale, esso va associato ad una delle voci dell'elenco dei rifiuti di pericolo assoluto, non pericolo assoluto, oppure di voce specchio. Una volta riconosciuto un rifiuto come pericoloso, sarà necessario determinare quali siano le specifiche caratteristiche di pericolo che esso presenta, tra le 15 definite. A tal fine, si considerano tutte le informazioni disponibili sulla composizione del rifiuto e sulla presenza di sostanze pericolose; se le conoscenze sono sufficienti è possibile procedere con il metodo di calcolo, relativo al superamento di determinati valori limite di concentrazione delle sostanze pericolose, oppure si può effettuare una prova. Nel caso vengano applicati entrambi i metodi, prevalgono i risultati della prova.

Per quanto riguarda la normativa italiana, il principale riferimento per la classificazione dei rifiuti è il Testo Unico Ambientale, costituito dal decreto legislativo n. 152/2006. In particolare, la Parte Quarta si occupa della gestione dei rifiuti e la definisce come un'attività di pubblico interesse, da effettuare conformemente ai principi di precauzione, prevenzione, proporzionalità, responsabilizzazione e cooperazione. Ai sensi di tale decreto, i rifiuti sono classificati in base all'origine e alle caratteristiche di pericolosità e vengono inclusi in un elenco, riportato nell'allegato D, attraverso il codice a sei cifre.

Nell'interesse della presente tesi, si considereranno in particolare le seguenti caratteristiche di pericolo, individuate dalla normativa comunitaria e nazionale:

- HP 4 - "Irritante": rifiuto la cui applicazione può provocare irritazione cutanea o lesioni oculari;
- HP 8 - "Corrosivo": rifiuto la cui applicazione può provocare corrosione cutanea;
- HP 14 - "Ecotossico": rifiuto che presenta o può presentare rischi immediati o differiti per uno o più comparti ambientali.

1.1.2 La classe HP 14

Come detto prima, i rifiuti che rientrano nella classe di pericolosità HP 14 sono rifiuti in grado di rappresentare un rischio immediato o differito per uno o più settori ambientali. Nel caso dei rifiuti ecotossici si parla, ad esempio, di tutti quei rifiuti che contengono sostanze in grado di ridurre lo strato di ozono, oppure

sostanze con tossicità acuta o cronica per l'ambiente acquatico. Per la stima dell'ecotossicità è possibile procedere in due diversi modi: si può decidere per un approccio chimico, che compara i risultati delle analisi a precisi valori soglia, oppure scegliere di effettuare test biologici. Generalmente, l'approccio chimico è utilizzato per definire la conformità rispetto ai valori limite definiti dalle normative, mentre l'uso dei saggi ecotossicologici permette di misurare in maniera più diretta la tossicità del rifiuto. Infatti, i saggi biologici restituiscono un'immagine più completa della pericolosità ecologica di un campione, in quanto rispondono in modo integrato a tutti i composti in esso presenti e riescono a quantificare anche gli effetti sinergici tra i diversi inquinanti (Balzamo et al., 2010). Per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti non è stata finora definita né una batteria di test né un livello soglia che distingua i rifiuti in "pericolosi" o "non pericolosi" per l'ambiente; tuttavia, vi è consenso sul fatto che il potenziale di pericolo dei rifiuti per l'ambiente sia meglio determinato mediante test biologici (Wilke et al., 2008). Naturalmente, risulta indispensabile disporre di procedure e protocolli standardizzati per l'esecuzione dei test, al fine di ottenere risultati comparabili.

All'interno dell'Unione Europea e nei suoi stati membri sono state proposte diverse batterie di test ecotossicologici, così come diversi limiti di concentrazione, per la determinazione della proprietà di pericolo HP 14. In generale, i test seguono un approccio dose/risposta che mette a confronto le diverse concentrazioni di rifiuto testate con il loro effetto sugli organismi. Quando la concentrazione in grado di produrre un effetto biologico del 50% risulta essere inferiore al limite di concentrazione testato, il rifiuto viene classificato come pericoloso per HP 14. Solamente se tutti i risultati sono al di sopra dei limiti di concentrazione, il rifiuto è considerato non pericoloso (Hennebert, 2018).

2 Scopo della tesi

L'obiettivo di questa tesi è stato di determinare le caratteristiche di pericolosità di un rifiuto ai sensi delle normative vigenti, attraverso un'indagine ecotossicologica. Al fine di valutare le caratteristiche di tossicità a livello dei vari compartimenti trofici dell'ambiente acquatico, sono effettuati test con diversi organismi modello d'acqua dolce: il vertebrato *Danio rerio*, l'invertebrato cladocero *Daphnia magna* e la microalga *Raphidocelis subcapitata*. Con un'ulteriore analisi vengono valutate anche altre caratteristiche di pericolosità al di fuori dell'ambito ecotossicologico, mediante l'esecuzione di *skin corrosion* e *skin irritation test*.

3 Materiali e metodi

3.1 Preparazione del campione

Oggetto di quest'analisi è stato un rifiuto di tipo solido, nel quale è stato possibile riconoscere tre frazioni principali, presenti in proporzioni simili. La porzione costituita da granuli di dimensioni millimetriche e dal colore scuro rappresentava la frazione metallica; erano inoltre presenti una frazione di fibra sintetica ed una frazione plastica, quest'ultima composta da filamenti più rigidi, dal colore blu acceso. Attraverso le prove ecotossicologiche, eseguite in conformità con le linee guida del Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (SNPA) sulla classificazione dei rifiuti, il campione è stato analizzato cercando di valutare le caratteristiche del rifiuto nelle sue condizioni originali, ovvero considerando gli effetti delle tre frazioni in sinergia. Inoltre, sono stati realizzati test aggiuntivi, non previsti dalla normativa, con lo scopo di valutare gli effetti delle tre frazioni considerate singolarmente. Di seguito si farà riferimento al campione originale come "mix" e alle tre frazioni come "metallica", "fibrosa" e "plastica", rispettivamente (fig. 1).

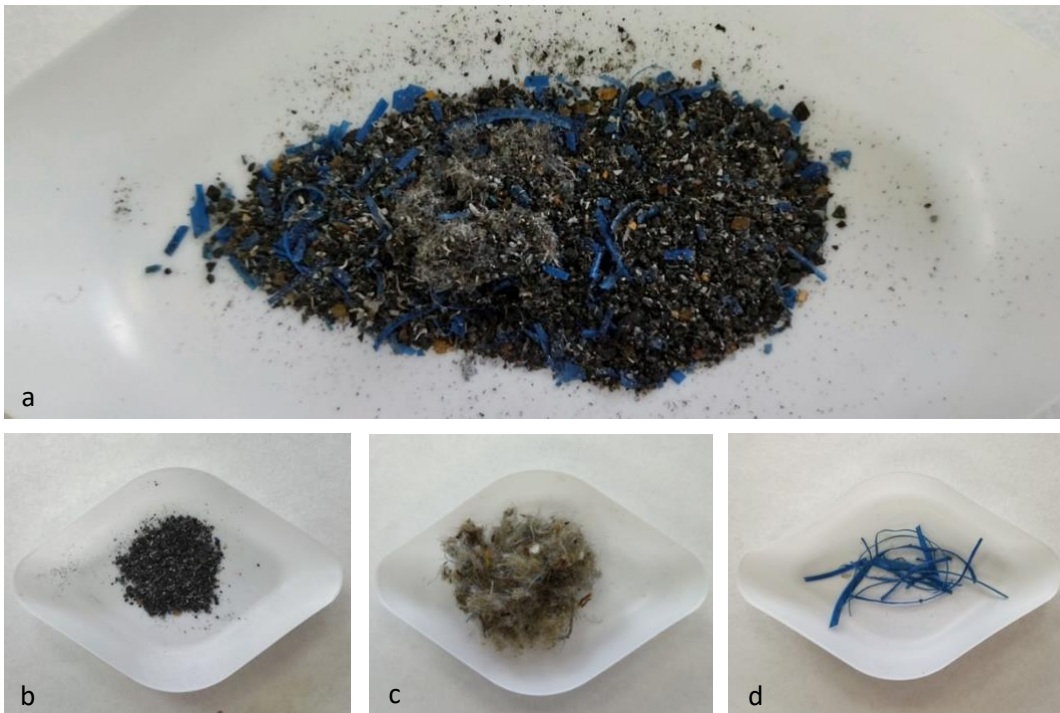


Figura 1: campione di rifiuto come mix (a), frazione metallica (b), fibra sintetica (c), frazione plastica (d).

Le soluzioni per i test sono state preparate impiegando diverse quantità di campione e di acqua di diluizione appropriata, quest'ultima contenente CaCl_2 ,

MgSO₄, NaHCO₃ e KCl. In questo modo, si sono ottenute le concentrazioni di seguito elencate:

- 1 g L⁻¹, 100 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 12,5 mg L⁻¹ e 6,25 mg L⁻¹ per il mix;
- 100 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹ per ognuna delle tre frazioni.

Le linee guida SNPA prevedono la realizzazione di cinque concentrazioni, che indagano il risultato dei test al valore soglia di 100 mg L⁻¹. Tuttavia, al fine di ottenere un valore di tossicità statisticamente calcolabile, è stata applicata anche la concentrazione di 1 g L⁻¹. Le soluzioni realizzate con le singole frazioni sono invece legate ad una semplice indagine conoscitiva, per ricercare l'eventuale prevalenza di una componente sulle altre in termini di tossicità. Questa serie di concentrazioni è stata realizzata per testare tre diversi periodi di trasformazione e dissoluzione (in seguito anche T/D) della sostanza nel mezzo acquoso: 24 ore, 7 giorni e 28 giorni. Pertanto, le soluzioni alle concentrazioni sopra indicate sono state realizzate per ognuno dei tre casi, quindi mantenute in agitazione continua per mezzo di un rotore per il periodo di tempo prestabilito.

3.2 Prove ecotossicologiche

Allo scopo di conferire all'indagine una maggiore completezza, i test sono stati effettuati su tre organismi modello, in modo tale da ottenere informazioni sulla pericolosità del rifiuto su tre differenti livelli trofici di un sistema acquatico: un pesce d'acqua dolce, un crostaceo cladocero ed un'alga verde unicellulare. Gli esperimenti si sono svolti nel laboratorio di ecotossicologia presso l'azienda Agrolab Italia S.r.l. di Altavilla Vicentina.

3.2.1 *Danio rerio*

Comunemente noto come zebrafish, *Danio rerio* (fig. 2) è un teleosteo tropicale d'acqua dolce, appartenente alla famiglia dei Cyprinidae e originario dell'Asia meridionale. Presenta dimorfismo sessuale, con femmine dall'addome rigonfio e maschi più snelli, caratterizzati da una colorazione arancione aggiuntiva. La facilità di cura, l'allevamento prolifico e la caratteristica trasparenza dell'embrione (fig. 3) durante lo sviluppo hanno reso questa specie un vertebrato modello popolare in molti campi della biologia (Meyers, 2018).



Figura 2: adulti di *D. rerio* (L. Ketchum, Oregon State University, 2013).

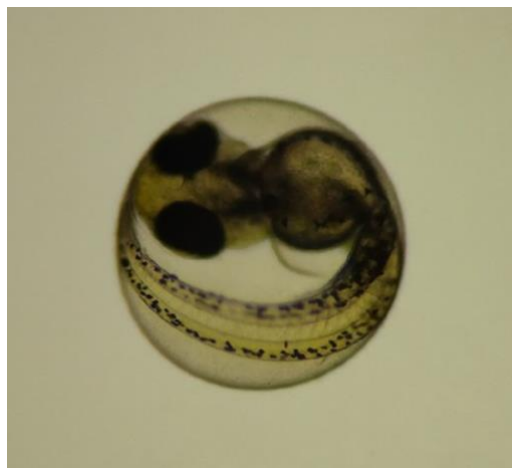


Figura 3: individuo di *D. rerio* allo stadio embrionale.

La tossicità acuta del campione è stata valutata attraverso il *Fish Embryo Toxicity* (FET) test, secondo quanto previsto dalla linea guida OECD n.236. Il test ha una durata totale di 96 ore e per essere ritenuto valido deve seguire precisi criteri, indicati nella linea guida di riferimento. Tra questi criteri, la temperatura dell'acqua dev'essere mantenuta a 26 ± 1 °C in qualsiasi momento durante la prova; il pH dev'essere compreso tra 6,5 e 8,5 e non variare di oltre 1,5 unità nel corso del test; la sopravvivenza complessiva degli embrioni nel controllo negativo dev'essere maggiore o uguale al 90% fino alla fine dell'esposizione ed il tasso di schiusa dev'essere non inferiore all'80%. Per questo tipo di test vengono impiegate uova fecondate di zebrafish che devono essere raccolte, selezionate ed esposte il prima possibile alla soluzione da testare, non oltre 180 minuti dalla fecondazione o comunque prima dello stadio di sviluppo a 16 cellule.

Nelle 24 ore precedenti l'inizio del test sono state preparate le piastre a 24 pozzetti necessarie, una per ogni concentrazione da studiare e una per il controllo negativo, che consisteva in semplice acqua di diluizione. In ogni piastra, 20 pozzetti sono stati riempiti con 2 ml della soluzione da testare, mentre i 4 pozzetti rimanenti sono stati utilizzati come controllo negativo per la singola piastra e riempiti con acqua di diluizione. Addizionalmente, un'intera piastra è stata riempita con acqua, con la funzione di controllo negativo esterno. Una volta preparate, le piastre sono state poste in incubatore a 26 ± 1 °C. All'inizio del test, le uova fecondate selezionate sono state trasferite nelle piastre, preconizionate, una per ogni pozzetto. Il test effettuato è di tipo semi-statico, pertanto le soluzioni sono state rinnovate regolarmente, ogni 24 ore.

Inoltre, ogni 24 ore e fino alla fine del test, sono state registrate le caratteristiche che costituiscono gli indicatori di letalità per l'embrione. Di seguito sono riportati i

quattro *endpoints*, definiti nella linea guida OECD n. 236, che identificano l'effetto tossico del campione.

- Coagulazione dell'embrione: gli embrioni coagulati appaiono di colore biancastro, mentre sono scuri se visti al microscopio.
- Assenza dei somiti: dopo 24 ore si sono formati circa 20 somiti in un embrione a sviluppo normale. Se dopo 48 ore si registra ancora la mancanza dei somiti, spesso associata all'assenza di movimenti spontanei e contrazioni laterali, gli embrioni sono considerati morti.
- Mancato distacco della coda: normalmente si osserva il distacco della porzione caudale dal sacco del tuorlo in seguito all'allungamento posteriore del corpo embrionale.
- Assenza di battito cardiaco: a partire da 48 ore dall'inizio del test, l'assenza di battito cardiaco in un minuto di osservazione viene considerata letale.

L'esito positivo per una qualsiasi di queste osservazioni corrisponde a letalità per l'embrione. Oltre alle caratteristiche appena elencate, viene osservata anche la schiusa a partire da 48 ore, sebbene un ritardo in questo caso non corrisponda ad un endpoint letale secondo la normativa. La registrazione di questo parametro, tuttavia, garantisce che l'embrione sia effettivamente stato esposto alla sostanza testata, senza una potenziale funzione di barriera da parte del corion. All'inizio e alla fine del test vengono misurati il pH, la durezza e la conduttività nel controllo e nella soluzione di prova alla concentrazione più alta. A conclusione delle 96 ore di esposizione, le informazioni raccolte in termini di endpoint registrati come positivi permettono di calcolare la LC_{50} , ovvero la concentrazione che corrisponde ad un effetto letale per il 50% degli embrioni.

3.2.2 *Daphnia magna*

Tra gli organismi modello più utilizzati in ambito ecotossicologico, va sicuramente menzionata *Daphnia magna* (fig. 4). Si tratta di un crostaceo cladocero planctonico, con un ciclo vitale partenogenetico. Questa specie ha raggiunto una distribuzione pressoché mondiale, poiché è in grado di abitare corpi d'acqua dolci e salmastri, dalle piccole pozze temporanee ai grandi laghi (Ebert, 2022). È caratterizzata da una notevole plasticità, in quanto può passare dalla riproduzione asessuale a quella sessuale a seconda delle condizioni ambientali (fig. 5): quando queste sono favorevoli si riproduce per partenogenesi, mentre al sopraggiungere di stress ambientali agisce dapprima generando individui maschi asessualmente, in seguito producendo uova aploidi che necessitano di fecondazione e che

passeranno per una fase di riposo chiamata *ephippium*, prima di svilupparsi completamente (Ebert, 2022).



Figura 4: individuo di *D. magna* (D. Ebert, 2006).

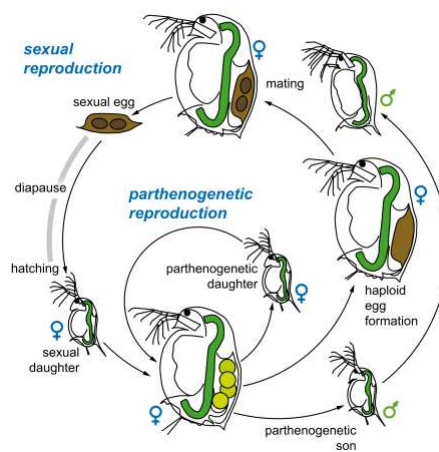


Figura 5: rappresentazione schematica del ciclo partenogenetico in *D. magna* (D. Vizoso, 2013).

Il rifiuto oggetto di questa tesi è stato sottoposto ad un test di tossicità acuta con *D. magna*. Le prove sono state condotte seguendo le procedure indicate nella linea guida OECD n. 202, che permette di valutare la tossicità del campione considerando gli effetti di immobilizzazione sugli organismi dopo un determinato periodo di esposizione. Per questo test, giovani individui di *D. magna* sono stati immersi nelle soluzioni da testare per 48 ore, senza essere nutriti. Per mezzo di un incubatore, la temperatura delle soluzioni è stata mantenuta a 20 ± 2 °C per tutta la durata del test e gli organismi sono stati esposti in modo alternato a 16 ore di luce e 8 ore di buio. Per ognuna delle concentrazioni testate si sono utilizzati 4 recipienti, riempiti con 10 ml di soluzione. Secondo quanto indicato dalle linee guida, infatti, sono state eseguite 4 repliche con 5 organismi, per un totale di 20 organismi, per ogni concentrazione testata e per il controllo negativo, costituito da acqua di diluizione. Ogni 24 ore si sono registrati gli effetti di immobilizzazione sulle daphnie ed eventuali comportamenti anomali. Un organismo viene considerato immobile se non risulta in grado di nuotare entro 15 secondi di osservazione, anche a seguito di una leggera agitazione del recipiente.

Perché il test sia ritenuto valido, nel controllo negativo non dev'essere stato immobilizzato più del 10% degli organismi. Dopo 48 ore, alla conclusione del test, si sono valutati i risultati mettendo in relazione il numero di immobili con la concentrazione cui sono stati esposti. Analizzando i dati grazie al software RegTox, si è potuto calcolare il valore della EC_{50} , ovvero la concentrazione in grado di immobilizzare il 50% degli organismi entro il tempo di esposizione prestabilito.

3.2.3 *Raphidocelis subcapitata*

La microalga d'acqua dolce *Raphidocelis subcapitata* è stata utilizzata per il test di inibizione della crescita algale, indicato alla linea guida OECD n. 201. Quest'alga verde planctonica è generalmente presente come organismo unicellulare e la crescita esponenziale delle popolazioni costituisce un parametro chiave nella determinazione dell'ecotossicità in ambiente acquatico. Il test è stato eseguito secondo quanto indicato nello standard internazionale ISO 8692:2012, che prevede di esporre gli organismi alla soluzione da testare a diverse concentrazioni per 72 ore. Alla conclusione della prova si procede a valutare l'eventuale riduzione nella crescita della coltura algale, per determinare il livello di inibizione e relazionarlo alla concentrazione di esposizione. Per quantificare l'inibizione è stato determinato il numero di cellule per millilitro di ogni soluzione, misurandone la densità ottica per mezzo di uno spettrofotometro calibrato a 670 nm.

Ad ognuna delle soluzioni da testare, realizzate con una diversa concentrazione di campione e acqua di diluizione per un volume totale di 100 ml, è stato aggiunto l'inoculo algale di 1 ml prelevato da una coltura di densità 10^6 cellule/ml. In questo modo si è ottenuta una densità di 10^4 cellule/ml per tutte le soluzioni realizzate. Analogamente sono stati eseguiti anche un controllo negativo ed un controllo positivo: nel primo caso l'inoculo algale è stato aggiunto direttamente a 100 ml di acqua di diluizione, mentre nel secondo caso si sono preparate una serie di soluzioni a concentrazioni crescenti di $K_2Cr_2O_7$, nelle quali è poi stata inoculata la biomassa. In tutte le soluzioni sono inoltre stati aggiunti i nutrienti necessari. Sono state preparate tre repliche per ciascuna concentrazione da testare, oltre a tre repliche per il controllo negativo, costituito da acqua di diluizione, così come per tutte le concentrazioni del controllo positivo, realizzato con $K_2Cr_2O_7$. La quantità, sufficientemente bassa, di biomassa inizialmente inoculata e l'aggiunta di nutrienti erano finalizzati a consentire agli organismi le condizioni necessarie al mantenimento della crescita esponenziale.

Una volta preparate, le soluzioni sono state trasferite in cuvette rettangolari che facilitassero la lettura allo spettrofotometro e che potessero assicurare la permeabilità all'aria della soluzione (fig. 6). In seguito, sono state riposte in un incubatore alla temperatura di $23 \pm 2^\circ C$, con illuminazione continua e uniforme, per tutta la durata del test.

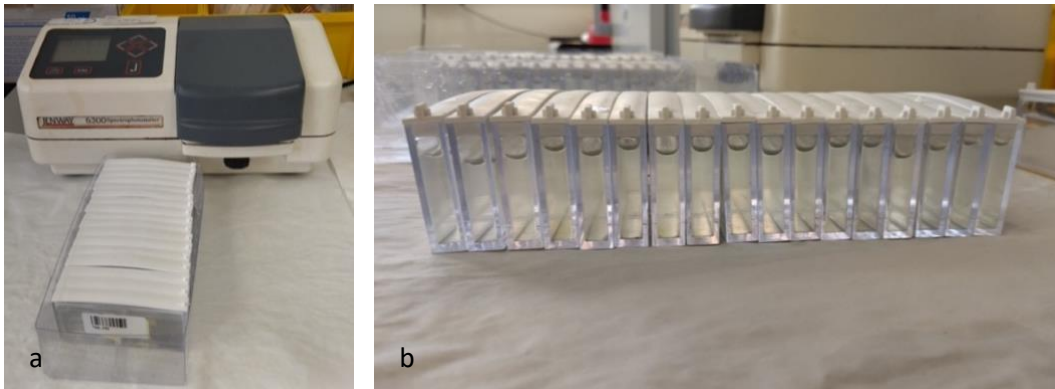


Figura 6: spettrofotometro (a) e cuvette (b) utilizzati nel test di inibizione della crescita algale

Ogni 24 ore è stata registrata la densità ottica in tutte le cuvette, fino alla conclusione della prova. Al termine delle 72 ore la concentrazione di biomassa osservata è stata messa in relazione alle diverse concentrazioni di esposizione e ai tempi di misurazione. In questo modo si è potuto valutare l'endpoint della prova, ovvero l'inibizione della crescita della coltura algale, elaborando i dati per mezzo del software RegTox. Dai risultati ottenuti è stato possibile determinare il valore della EC_{50} , quindi della concentrazione corrispondente al 50% di inibizione.

3.3 Skin corrosion e skin irritation test

La pericolosità del rifiuto è stata valutata anche per quanto riguarda la sua capacità corrosiva ed irritante, predisponendo due test effettuati su campioni di epidermide umana ricostruita. In questo caso le prove sono state condotte in conformità con le linee guida OECD n. 431 (skin corrosion test) e n. 439 (skin irritation test) e seguendo i protocolli EPI-200-SIT ed EPI-200-SCT forniti dalla MatTek Corporation. Per la valutazione della capacità irritante, in base ai protocolli appena citati, un modello di epidermide umana ricostruita viene esposto ad una quantità di rifiuto pari a 0.025 g per 60 minuti. Contemporaneamente vengono eseguiti anche un controllo positivo realizzato con KOH ed un controllo negativo realizzato con acqua. Per questo test sono state eseguite tre repliche per il rifiuto e per i controlli.

Una volta trascorsi i 60 minuti, i tessuti sono stati risciacquati e quindi trasferiti su un terreno contenente MTT, un sale di tetrazolio. La tossicità viene determinata attraverso un test di vitalità cellulare, con un saggio colorimetrico che misura la riduzione enzimatica di MTT (giallo) a sale di formazano (blu). A questo scopo, dopo essere stati incubati in MTT per 3 ore, i tessuti vengono nuovamente risciacquati e trattati con isopropanolo per estrarre il sale di formazano. La densità ottica di quest'ultimo viene determinata allo spettrofotometro, utilizzando isopropanolo come bianco e quindi effettuando le misurazioni a 570 nm.

Per quanto riguarda il test di corrosione, il procedimento è simile a quello descritto per l'irritazione. In questo caso, tuttavia, i tessuti sono esposti al rifiuto per 3 minuti e per 1 ora di tempo. Sono state realizzate tre repliche per ciascun trattamento e per i controlli positivo e negativo. Dopo l'esposizione i tessuti sono stati risciacquati e trasferiti su un terreno MTT, quindi incubati per 3 ore e nuovamente risciacquati. Analogamente a quanto descritto in precedenza, il sale di formazano è stato estratto con isopropanolo, quindi analizzato allo spettrofotometro a 570 nm.

4 Risultati

4.1 *Danio rerio*

Le linee guida prevedono che le percentuali di embrioni per i quali è stato registrato almeno uno degli endpoint vengano messe in relazione con le concentrazioni di esposizione, così da poter elaborare i risultati e calcolare il valore della LC_{50} . Tuttavia, i FET test effettuati nell'ambito di questa tesi non hanno prodotto dati sufficienti ad effettuare una valutazione in termini statistici della pericolosità ecotossicologica del rifiuto. Per questo motivo, sono state fatte alcune considerazioni oggettive sugli effetti osservati negli embrioni, in particolar modo per quanto riguarda quelli esposti alle soluzioni a concentrazioni maggiori.

Le soluzioni a $6,25 \text{ mg L}^{-1}$, $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 25 mg L^{-1} non hanno infatti prodotto effetti rilevanti sullo sviluppo degli embrioni, sia per quanto riguarda le soluzioni "mix", sia per quelle realizzate con le singole frazioni del rifiuto. Un'eccezione è costituita da un embrione testato con la soluzione T/D 28 giorni a concentrazione 25 mg L^{-1} , il quale si era sviluppato dopo 96 ore, ma presentava battito cardiaco rallentato ed era generalmente indebolito, non reattivo. Al contrario, negli organismi esposti alle concentrazioni più alte si è registrato un generale ritardo nello sviluppo, che risulta evidente soprattutto se confrontato con gli embrioni nel controllo negativo. Dopo 72 ore, infatti, tutti gli embrioni nella soluzione di controllo erano sviluppati in modo normale e natanti, mentre nelle soluzioni a concentrazione maggiore si è registrato in generale un gran numero di embrioni con un ritardo di oltre 24 ore della schiusa (fig. 7).

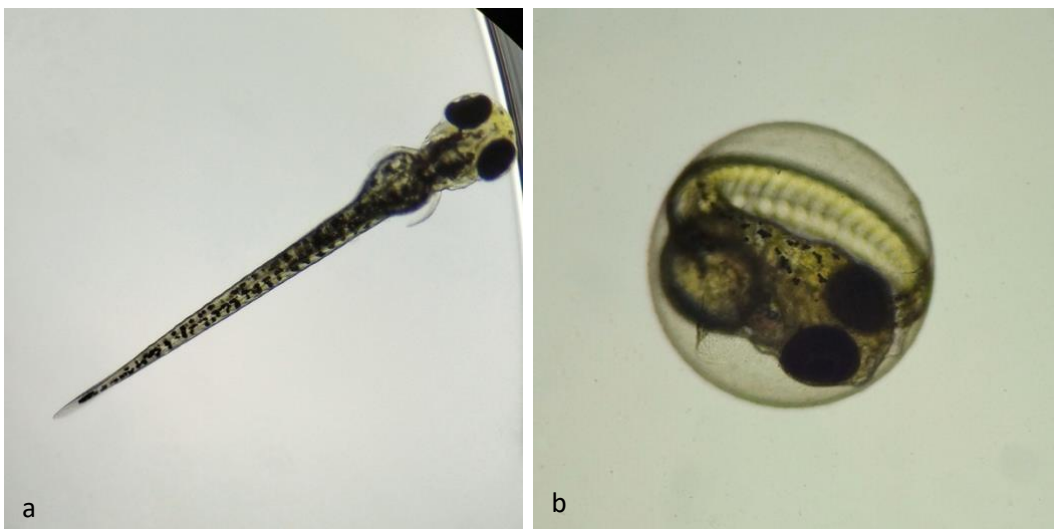


Figura 7: embrioni di *D. rerio* dopo 96 ore dall'inizio dei test. Nel primo caso (a) l'embrione è regolarmente sviluppato, mentre nel secondo caso (b) presenta un ritardo nella schiusa.

Considerando le soluzioni “mix” a 100 mg L^{-1} , la percentuale di organismi con sviluppo ritardato va crescendo con il tempo di trasformazione e dissoluzione del campione. Nella soluzione a T/D 24 ore, il 60% degli embrioni ha mostrato un ritardo nella schiusa di circa 96 ore; in questo caso si è deciso di prolungare il test per ulteriori 48 ore, al termine delle quali più del 50% si è schiuso. Tuttavia, dopo questo ulteriore intervallo di tempo, il 25% degli embrioni totali risultava malformato. Nella soluzione a T/D 7 giorni la percentuale di organismi in ritardo nello sviluppo sale a 85%, ma anche in questo caso due degli embrioni che erano normalmente sviluppati dopo 96 ore presentavano deformazioni della porzione caudale (fig. 8). Infine, con una T/D di 28 giorni, la percentuale degli embrioni in ritardo ha raggiunto il 95%.

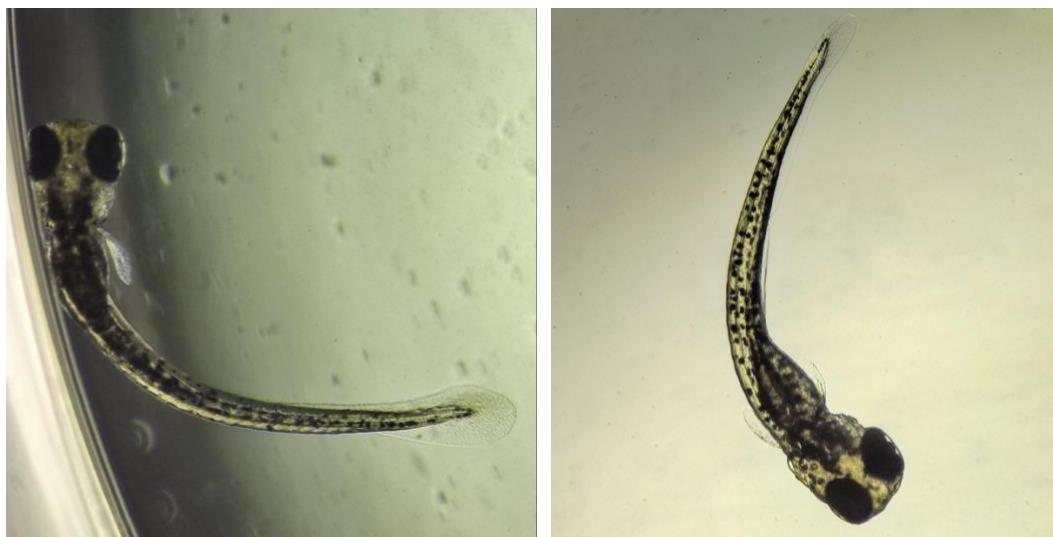


Figura 8: embrioni esposti alla soluzione “mix” 100 mg L^{-1} dopo 96 ore, con deformazione della coda

Per quanto riguarda le soluzioni “mix” a 1 g L^{-1} , si è registrato uno sviluppo ritardato dopo 96 ore per il 100% degli embrioni, per tutti i casi di T/D testati.

Considerando, invece, le informazioni ottenute per le tre frazioni del rifiuto testate singolarmente, i dati suggeriscono un effetto prevalente di quella a composizione metallica. Infatti, gli embrioni esposti a questa frazione a 100 mg L^{-1} hanno mostrato un ritardo significativo nella schiusa per tutti i casi di T/D realizzati.

Dopo le prime 24 e 48 ore dall’inizio del test, sono stati registrati casi di coagulazione degli embrioni (fig. 9) in alcune soluzioni a diverse concentrazioni, così come nel controllo negativo. Tuttavia, si tratta di casi numericamente limitati e non direttamente attribuibili agli effetti del rifiuto testato, poiché verificatisi nelle stesse proporzioni sia per gli embrioni esposti al campione, sia per quelli non esposti. In ogni caso, la percentuale di coagulati nel controllo negativo non ha raggiunto il 10% e non ha compromesso la validità del test.

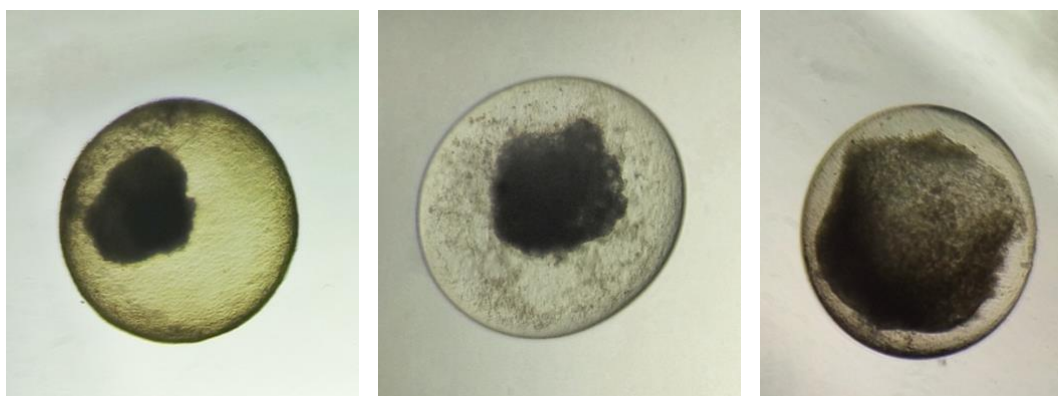


Figura 9: embrioni di *D. rerio* coagulati nelle prime 24 ore dall'inizio del FET test

I risultati più rilevanti vengono riassunti nella tabella 1, di seguito riportata, nella quale per ogni periodo di T/D testato e per ciascuna concentrazione del rifiuto viene espressa la percentuale di embrioni che hanno presentato un ritardo nello sviluppo alla fine del test. Sono evidenziati i casi maggiormente significativi.

Tabella 1: percentuali di embrioni con un ritardo dello sviluppo al termine del FET test

Concentrazione	T/D 24 ore	T/D 7 giorni	T/D 28 giorni
MIX 1 g L ⁻¹	100	100	100
MIX 100 mg L ⁻¹	60	85	95
MIX 50 mg L ⁻¹	0	0	0
MIX 25 mg L ⁻¹	0	0	0
BLU 100 mg L ⁻¹	50	20	0
LANA 100 mg L ⁻¹	0	0	20
POLVERE 100 mg L ⁻¹	80	95	63
BLU 50 mg L ⁻¹	0	0	0
LANA 50 mg L ⁻¹	0	0	0
POLVERE 50 mg L ⁻¹	0	0	0
CONTROLLO	0	0	0

4.2 *Daphnia magna*

Dopo 24 e 48 ore dall'inizio del test con *D. magna* si è registrato il numero di organismi considerati immobili. I risultati sono di seguito riportati (tabella 2).

Tabella 2: numero di individui di *D. magna* immobili dopo 24 e 48 ore di esposizione

Concentrazione		T/D 24 ore		T/D 7 giorni		T/D 28 giorni	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
MIX	1 g L ⁻¹	1	5	3	18	0	15
MIX	100 mg L ⁻¹	0	4	2	5	1	2
MIX	50 mg L ⁻¹	0	0	0	1	0	0
MIX	25 mg L ⁻¹	0	0	1	1	0	2
MIX	12,5 mg L ⁻¹	0	0	0	1	0	0
MIX	6,25 mg L ⁻¹	0	0	0	0	0	0
F. PLASTICA	100 mg L ⁻¹	0	0	0	0	0	0
F. FIBROSA	100 mg L ⁻¹	0	0	0	0	0	0
F. METALLICA	100 mg L ⁻¹	0	0	0	0	0	0
F. PLASTICA	50 mg L ⁻¹	0	0	0	1	0	0
F. FIBROSA	50 mg L ⁻¹	0	0	0	0	0	0
F. METALLICA	50 mg L ⁻¹	0	0	0	0	0	0
CONTROLLO		0	0	0	0	0	0

Il maggior numero di organismi immobilizzati dopo 48 ore è stato osservato in corrispondenza della soluzione a 1 g L⁻¹. Per questa concentrazione, infatti, l'endpoint è stato registrato per il 90% delle daphnie esposte a T/D 7 giorni e per il 75% a T/D 28 giorni. Per quanto riguarda la concentrazione 100 mg L⁻¹, l'unico effetto rilevante è quello associato alla soluzione "mix", mentre le altre soluzioni realizzate con le singole frazioni del rifiuto non hanno prodotto immobilizzazione. Per le concentrazioni inferiori a 100 mg L⁻¹ non sono stati registrati effetti di tossicità rilevanti per gli organismi.

Le informazioni raccolte sono state analizzate per mezzo del software RegTox, che ha restituito un valore di EC₅₀ calcolato considerando i risultati ottenuti con le soluzioni 1 g L⁻¹ preparate a T/D 7 giorni e a T/D 28 giorni (tabella 3). Per quanto riguarda invece il caso T/D 24 ore, il valore della EC₅₀ non era determinabile con i dati disponibili.

Tabella 3: percentuale di organismi immobili dopo 48 ore e rispettiva EC₅₀ calcolata

	T/D 7 giorni	T/D 28 giorni
Organismi immobili (%) 1 g L ⁻¹	90	75
EC ₅₀	969 mg L ⁻¹	953 mg L ⁻¹

Le linee guida SNPA si limitano a richiedere il calcolo della EC₅₀ sulla base di cinque concentrazioni con valore soglia di 100 mg L⁻¹. Nel caso analizzato, il campione non risulta tossico per *D. magna* se presente a queste concentrazioni. Tuttavia, estendendo l'indagine ad una concentrazione dieci volte superiore, il risultato varia drasticamente. Infatti, effettuando il calcolo sulla base dei dati ottenuti con la concentrazione 1 g L⁻¹, il valore di EC₅₀ ottenuto risulta essere ben inferiore al valore soglia indagato, denotando tossicità per gli organismi.

4.3 *Raphidocelis subcapitata*

I risultati ottenuti con il test d'inibizione della crescita algale hanno dimostrato una certa tossicità del rifiuto nei confronti di *R. subcapitata*. Le densità ottiche registrate giornalmente (tabella 4) hanno permesso di ricostruire, al termine del test, l'andamento della crescita nelle colture esposte alle diverse concentrazioni. Una prima immagine del potenziale inibitorio del campione era già deducibile confrontando i valori ottenuti a 72 ore per le soluzioni a concentrazione maggiore con quelli del controllo negativo, anche se soltanto i metodi statistici hanno in seguito conferito significatività al risultato.

Tabella 4: esempio di densità ottica registrata a 670 nm, in questo caso per la soluzione T/D 24 ore alle concentrazioni 100 mg L⁻¹ (C5), 50 mg L⁻¹ (C4), 25 mg L⁻¹ (C3), 12,5 mg L⁻¹ (C2) e 6,25 mg L⁻¹ (C1)

Tempo:	Replicate	Controllo	C1	C2	C3	C4	C5
24 h	1	0,031	0,053	0,062	0,162	0,061	0,069
	2	0,022	0,073	0,07	0,078	0,072	0,043
	3	0,019	0,054	0,061	0,097	0,042	0,054
48 h	1	0,132	0,145	0,14	0,129	0,095	0,066
	2	0,119	0,159	0,165	0,151	0,126	0,053
	3	0,122	0,141	0,128	0,131	0,091	0,068
72 h	1	0,781	0,335	0,219	0,162	0,092	0,073
	2	0,791	0,294	0,221	0,172	0,104	0,084
	3	0,786	0,292	0,208	0,121	0,092	0,074

La rielaborazione dei dati con RegTox ha restituito i valori di EC₅₀ calcolati per i tre casi di trasformazione e dissoluzione considerati. I risultati ottenuti sulla base delle concentrazioni previste da metodo, con valore soglia di 100 mg L⁻¹, hanno evidenziato tossicità per l'alga verde nel caso T/D 24 ore, mentre negli altri due casi la concentrazione EC₅₀ è risultata superiore a quella testata, pertanto non era associabile a tossicità. Considerando, invece, i valori calcolati partendo dalla concentrazione di 1 g L⁻¹, il campione è risultato tossico per l'organismo in ognuno dei tre casi T/D analizzati. Di seguito (tabella 5) sono riassunti i risultati del test d'inibizione: viene indicato il valore della EC₅₀ per i vari casi, indicativo della tossicità del campione; inoltre è riportato il valore della EC₂₀, ovvero della

concentrazione che ha prodotto un'inibizione del tasso di crescita del 20%, interpretabile come un indice di sensibilità dell'organismo al rifiuto.

Tabella 5: valori di EC₅₀ ed EC₂₀ calcolati per *R. subcapitata*

	T/D 24 ore	T/D 7 giorni	T/D 28 giorni
EC ₅₀ (1 g L ⁻¹)	66,54 mg L ⁻¹	312,8 mg L ⁻¹	998 mg L ⁻¹
EC ₅₀ (100 mg L ⁻¹)	61,45 mg L ⁻¹	207,38 mg L ⁻¹	1194,6 mg L ⁻¹
EC ₂₀ (100 mg L ⁻¹)	5,08 mg L ⁻¹	17,33 mg L ⁻¹	47,35 mg L ⁻¹

RegTox permette inoltre di visualizzare graficamente l'inibizione. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti per i quattro casi associati a tossicità (fig. 10-13).

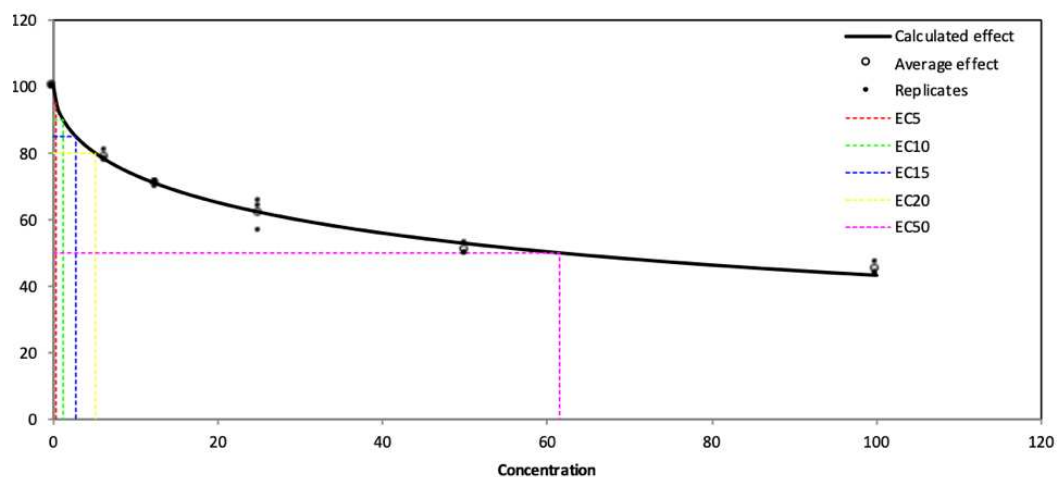


Figura 10: inibizione della crescita in *R. subcapitata* nel caso T/D 24 ore, EC₅₀ da 100 mg L⁻¹

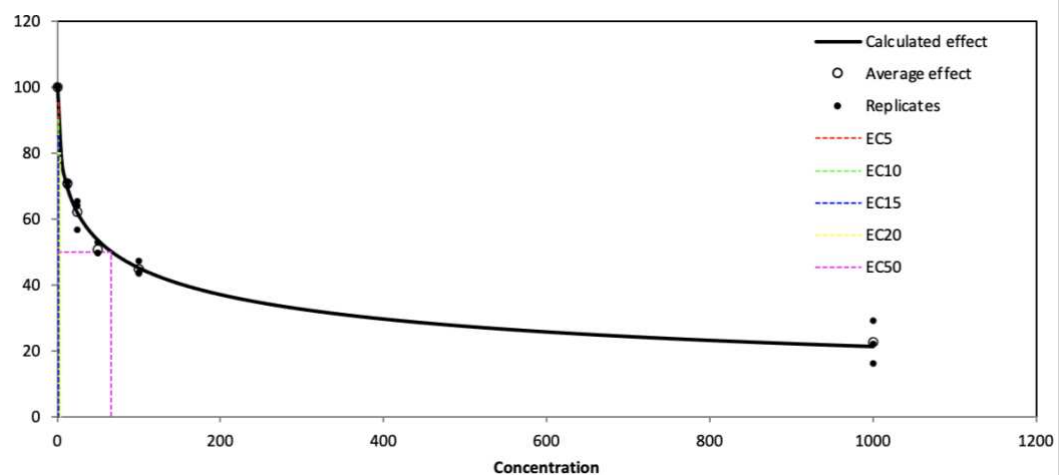


Figura 11: inibizione della crescita in *R. subcapitata* nel caso T/D 24 ore, EC₅₀ da 1 g L⁻¹

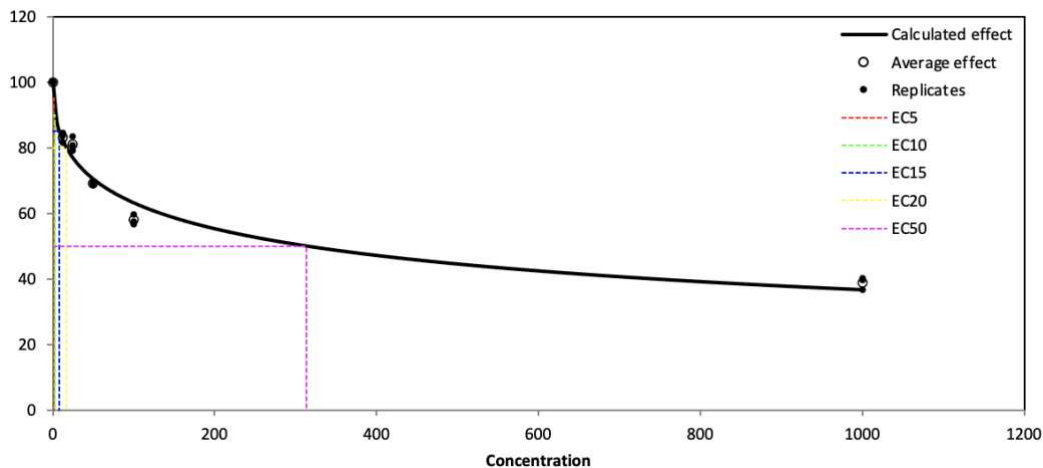


Figura 12: inibizione della crescita in *R. subcapitata* nel caso T/D 7 giorni, EC₅₀ da 1 g L⁻¹

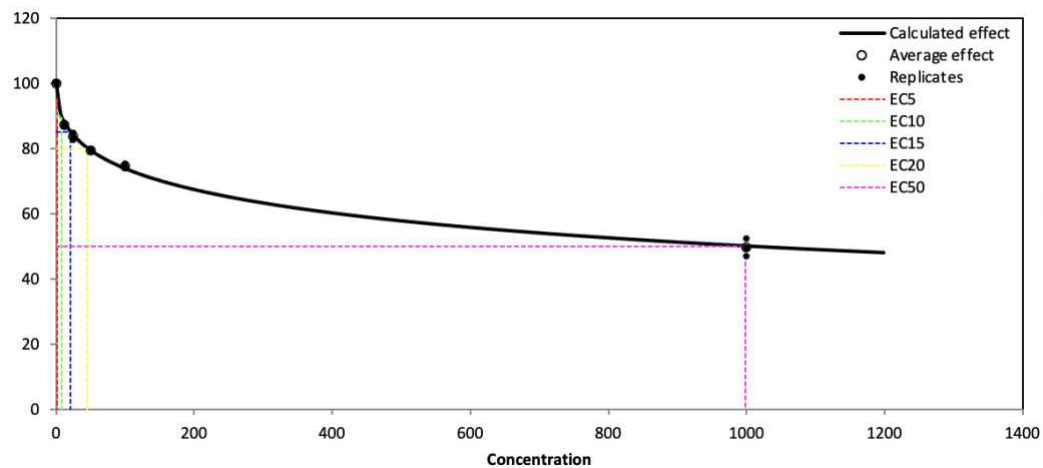


Figura 13: inibizione della crescita in *R. subcapitata* nel caso T/D 28 giorni, EC₅₀ da 1 g L⁻¹

4.4 Skin corrosion e skin irritation test

In base ai protocolli EPI-200-SIT e EPI-200-SCT, una volta determinata la densità ottica del sale blu di formazano, la vitalità cellulare viene calcolata per ciascun tessuto come percentuale della media dei tessuti di controllo negativi. I risultati vengono però interpretati diversamente nei due tipi di test effettuati. Il campione si riconosce infatti come irritante se la vitalità cellulare relativa residua è inferiore al 50% (tabella 6), mentre è classificato come corrosivo se la vitalità relativa del tessuto dopo 3 minuti è inferiore al 50%, oppure se dopo un'ora è diminuita al di sotto del 15% (tabella 7).

Tabella 6: criteri di pericolosità per skin irritation test (<https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation-MK-24-007-0023.pdf>)

In vitro result	In vivo prediction	
	EPI-200-SIT classification	OECD/OCDE TG No. 439 (adopted and updated in 2019)
mean tissue viability \leq 50%	Irritant (I) (R38 or GHS category 2)	Requiring classification and labeling (GHS Category 1 or 2)
mean tissue viability $>$ 50%	Non-irritant (NI)	Non-irritant to skin (GHS No Category)

Tabella 7: criteri di pericolosità per skin corrosion test (https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SCT-Skin-Corrosion-Protocol-MK-24-007-0024_06_22_21.pdf)

Mean tissue viability (expressed as % of negative control)	Prediction
3 min $<$ 50%	corrosive
3 min \geq 50% and 1 hour: $<$ 15%	corrosive
3 min \geq 50% and 1 hour: \geq 15%	non-corrosive

I test di skin corrosion e skin irritation non hanno attribuito al campione alcuna capacità irritante o corrosiva per la cute umana; pertanto, il rifiuto non può essere associato alle classi di pericolo HP4 o HP8.

5 Discussione

Mentre i test su epidermide umana ricostruita hanno facilmente escluso la pericolosità del rifiuto in termini di irritazione e corrosione, le prove ecotossicologiche hanno prodotto risultati ben più complessi. Nel caso del FET test, nonostante non siano stati registrati gli endpoints definiti dalla normativa, ad eccezione di rari casi di coagulazione, il rifiuto ha prodotto un generale ritardo nello sviluppo di zebrafish. Occorre sottolineare come una percentuale relativamente alta degli embrioni schiusi in ritardo abbia comunque manifestato delle malformazioni, che sarebbero probabilmente risultate letali nei giorni successivi alla prova. Questo aspetto potrebbe portare a ipotizzare una carenza nella normativa, che non prevede di considerare come significativi gli endpoint secondari, tra cui il ritardo nello sviluppo. Nel caso di *D. magna*, il test di immobilizzazione ha avuto un riscontro limitato, con percentuali di organismi immobili al termine del test che non hanno raggiunto livelli elevati, sebbene si sia registrato un effetto maggiore negli organismi esposti alle concentrazioni più alte di rifiuto. Infine, per quanto riguarda la microalga, il test d'inibizione ha riportato una netta diminuzione del tasso di crescita nelle colture esposte alle soluzioni a

concentrazione maggiore, dimostrando l'effetto tossico del campione, che è stato confermato statisticamente.

Anche lo studio di diversi casi di trasformazione e dissoluzione nel mezzo acquoso è risultato utile, poiché ha evidenziato alcune differenze nelle risposte dei vari organismi in relazione al rifiuto. Considerando *D. rerio*, la percentuale di embrioni con un ritardo nello sviluppo sembra aumentare con il periodo T/D testato, raggiungendo le percentuali più alte nel caso dei 28 giorni; per *D. magna* l'effetto maggiore è stato invece registrato a 7 giorni, raggiungendo un picco di immobilizzazione prima di tornare a diminuire. Nel caso di *R. subcapitata*, invece, l'inibizione è stata maggiore nelle 24 ore, mentre è diminuita con l'aumentare del periodo di trasformazione e dissoluzione. Le risposte così diverse nei tre organismi modello costituiscono un aspetto essenziale di cui tenere conto nella determinazione della pericolosità di una sostanza a livello ambientale, soprattutto considerando che alcuni compartimenti ecosistemici sono stati trascurati nel corso di questa indagine.

6 Conclusioni

Secondo le linee guida ed i metodi sopra citati, i risultati ottenuti in questa indagine hanno portato a classificare il rifiuto come ecotossico esclusivamente per via della EC_{50} calcolata per il test d'inibizione della crescita algale a T/D 24 ore, negli organismi esposti alla concentrazione di 100 mg L^{-1} . In questo caso, infatti, il comportamento a livello acuto del campione ha dato una risposta di tossicità, che non si è verificata per altri casi e in altri organismi entro il valore soglia di 100 mg L^{-1} previsto nella linea guida SNPA e determinato dal regolamento n. 2008/1272/CE. Tuttavia, la presenza del rifiuto nella concentrazione di 1 g L^{-1} , non così inverosimile da riscontrarsi nel caso reale, ha prodotto effetti tossici notevolmente più estesi, sia tra i vari organismi che nei diversi periodi di trasformazione e dissoluzione. La definizione di una più completa batteria di organismi da includere nelle indagini e, soprattutto, la rivisitazione dei valori soglia previsti per i test, potrebbero risultare determinanti per rendere ancora più efficaci i metodi che valutano la pericolosità ecotossica dei rifiuti. In questo senso, un metodo di prova efficace e che sia in grado di considerare tutti gli effetti più importanti a livello ecosistemico, senza tralasciarne alcuni, determina il destino finale del rifiuto e contribuisce a preservare l'ambiente dai potenziali danni legati alle attività antropiche.

7 Bibliografia

- Balzamo, S., Finocchiaro, G., Frizza, C., Conti, D., Martone, C., Cadoni, F. (2010). Proposta di una batteria minima di biosaggi per valutazioni di ecotossicità ambientale mediante analisi statistica multivariata. Atti del Convegno “Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici” Roma, Italia (pp. 20-22). https://www.researchgate.net/publication/282605658_Proposta_di_una_batteria_minima_di_biosaggi_per_valutazioni_di_ecotossicita_ambientale_mediante_analisi_statistica_multivariata
- Comunicazione 2018/C 124/01 della Commissione “Orientamenti tecnici sulla classificazione dei rifiuti” (GUUE 124/1, 9.04.2018).
- Decisione 2000/532/CE della Commissione, del 3 maggio 2000, che istituisce un elenco di rifiuti conformemente all'articolo 1, lettera a), della direttiva 75/442/CEE del Consiglio relativa ai rifiuti e la decisione 94/904/CE del Consiglio che istituisce un elenco di rifiuti pericolosi ai sensi dell'articolo 1, paragrafo 4, della direttiva 91/689/CEE del Consiglio relativa ai rifiuti pericolosi (OJ L 226, 6.9.2000, p. 3–24)
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 “Norme in materia ambientale” (GU n. 88 del 14.04.2006 - Suppl. Ordinario n. 96)
- Delibera n. 105/2021 del Sistema Nazionale per la Protezione dell’Ambiente, del 18 maggio 2021, “Linee guida sulla classificazione dei rifiuti”
- Direttiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 19 novembre 2008, relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive (OJ L 312, 22.11.2008, p. 3-30)
- Ebert, D. (2022). Daphnia as a Versatile Model System in Ecology and Evolution. *EvoDevo*, 13 (1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>
- Hennebert, P. (2018). Proposal of Concentration Limits for Determining the Hazard Property HP 14 for Waste Using Ecotoxicological Tests. *Waste Management*, 74, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.048>
- Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: Development of a vertebrate model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, e19. <https://doi.org/10.1002/cpet.19>
- OECD (2021), Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>

- OECD (2019), Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>.
- OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- OECD (2011), Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>
- OECD (2004), Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A.-M., Poulsen, V., Jourdain, M.-J., Férard, J.-F., Grand, C., Bispo, A. (2006). Selecting a Battery of Bioassays for Ecotoxicological Characterization of Wastes. *Science of The Total Environment*, 363 (1–3), 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.12.016>.
- Regolamento n. 1272/2008/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (GU L 353/1 31.12.2008)
- Wilke, B.-M., Riepert, F., Koch, C., Kühne, T. (2008). Ecotoxicological Characterization of Hazardous Wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70 (2), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.003>

8 Sitografia

In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), protocollo MatTek:

<https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation-MK-24-007-0023.pdf> (consultato il 29 luglio 2023)

In Vitro EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), protocollo MatTek:

https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SCT-Skin-Corrosion-Protocol-MK-24-007-0024_06_22_21.pdf (consultato il 29 luglio 2023)

ISO 8692:2012, Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae: <https://www.iso.org/standard/54150.html> (consultato il 22 luglio 2023)

Zebrafish (L. Ketchum, Oregon State University, 2013):

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zebrafish_%282826436913602%29.jpg (consultato il 22 luglio 2023)

Partenogenesi ciclica in *D. magna* (D. Vizoso, 2013):

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DaphniaMagna_LifeCycle_DVizo_so.svg (consultato il 5 agosto 2023)

D. magna (D. Ebert, 2006):

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Daphnia_magna_asexual.jpg (consultato il 5 agosto 2023)