

Proposta di saggio di tossicità prolungato con differenti specie ittiche (*Alburnus alburnus alborella*, *Cyprinus carpio* e *Carassius auratus*)

Fernando Gelli¹, Luciano Pregnotato¹, Donatella Palazzi¹, Federica Savorelli¹, Alessandra Roncarati²

1 Ittiolab (Laboratorio Ittiologico ARPA-Emilia Romagna), Corso Giovecca, 169 - 44100 Ferrara

2 CURDAM (Centro Universitario di Ricerca e Didattica in Acquacoltura e Maricoltura)- Università di Camerino

* Autore referente per la corrispondenza (Fax: 0532 204945; E-mail: Laboratoriolttiologico@fe.arpa.emr.it)

INTRODUZIONE

Gli ambienti acquatici in tutto il mondo sono soggetti ad un crescente inquinamento chimico ed i tossicologi cercano di evidenziare gli effetti delle sostanze tossiche sui sistemi biologici (POULIN, 1992).

L'uso di organismi a vita libera, in particolare di pesci, quali indicatori della qualità degli ambienti acquatici, si inserisce in metodologie adottate da tempo in altre nazioni (US-EPA, 1993; UNICHIM, 1999) e supportate da una vasta letteratura (JOHNSON, 1998; NIMMO *et al.*, 1998; KOSMALA *et al.*, 1999; KASTHURI e CHANDRAN, 1997), mentre, in campo nazionale, non sono ancora stati validati metodi che prevedono la possibilità di adottare tali organismi. Al riguardo, il nuovo Decreto Legislativo 152/99 affida all'ANPA il compito di sviluppare studi e ricerche al fine di predisporre protocolli operativi in materia.

In tale ottica, l'ARPA di Ferrara, che già sta collaborando con ANPA nella realizzazione di protocolli per test di ittiotossicità acuti nelle acque, propone l'utilizzo di diverse specie ittiche per saggi di tossicità prolungati.

La capacità di alcune specie ittiche di sopportare senza proble-

mi le condizioni di acquario (MELLOTTI *et al.*, 1992) nonché l'allevamento in gabbie galleggianti, ci permette di proporre una metodologia per test cronici (28 giorni) con pesci "sentinella" (PALAZZI *et al.*, 2001) per consentire la valutazione di effetti più tipicamente subletali, quali sono quelli osservabili sull'accrescimento dell'organismo. Infatti, l'accrescimento, valutabile come "velocità di crescita specifica", è l'espressione ultima di molteplici aspetti, sia di natura biochimica, fisiologica, come anche comportamentale, tutti potenzialmente alterabili, in vario grado, quando un organismo venga esposto ad una miscela di contaminanti (VIGANÒ, 1998). I test cronici si prestano anche alla valutazione degli effetti letali che pure potrebbero manifestarsi a causa dell'esposizione prolungata ai contaminanti.

In generale, si tenga presente che la variabilità, talvolta elevata, sia delle fonti di contaminazione sia del corpo idrico che ne è recapito, può essere causa di una corrispondente variabilità degli effetti osservati. Pertanto, la mancata osservazione di effetti tossici in un preciso momento del regime idrologico del corpo idrico, non esclude che si possano riscontrare effetti

tossici attuando la sperimentazione in momenti e condizioni idrologiche differenti (IRSA-CNR, 1994). La novità metodologica da noi proposta, il saggio di tossicità prolungato in campo, deriva dalla possibilità di associare il metodo adottato negli Stati Uniti (US-EPA, 1993), che prevede l'utilizzo di specie ittiche per determinare la tossicità acuta su acque di scarico in campo, con la proposta di metodo per saggio di tossicità prolungato in laboratorio prospettata dall'IRSA-CNR (VIGANÒ, 1998). Le considerazioni sopra esposte ci hanno portato a ritenere idonee le seguenti specie ittiche: alborella (*Alburnus alburnus alborella* L.), carpa comune (*Cyprinus carpio* L.) e carassio dorato (*Carassius auratus* L.) (TORTONESE, 1975; DE LUISE, 1998).

Il ciprinide *Alburnus alburnus alborella* è una sottospecie indigena d'acqua dolce, ampiamente distribuita in Italia settentrionale, mentre nei bacini più meridionali dell'Italia centrale sono presenti popolazioni originatesi da materiale introdotto.

La sottospecie vive in acque limpide a lenta corrente, nonché in bacini lacustri, purché ben ossigenati e con ridotta vegetazione sommersa. È un pesce di piccola taglia,

vive in media 7-8 anni durante i quali cresce al ritmo di circa 2 cm l'anno. Negli adulti non si evidenzia dimorfismo sessuale ed il rapporto dei sessi, inizialmente prossimo all'unità, si sposta a favore delle femmine con il passare degli anni.

Il ciprinide *Cyprinus carpio* è diffuso in gran parte dell'Europa, Italia compresa. L'habitat tipico di questo ciprinide è quello caratterizzato sia da acque stagnanti o a debolissima corrente, con fondi melmosi e riccamente inerbiti (dove in estate l'acqua si fa particolarmente calda), sia da acque debolmente saline. La carpa abita quindi il tratto inferiore del corso d'acqua del fiume (foce compresa), le lanche, i canali di bonifica, i laghi, gli stagni, nonché le paludi. Durante l'inverno, e comunque a temperature inferiori a 10 °C, questo ciprinide rallenta notevolmente la sua attività metabolica, adagiandosi sul fondo e nascondendosi parzialmente nella melma. La carpa è un pesce longevo (25-30 anni) che, a seconda delle caratteristiche bioclimatiche naturali del suo habitat, cresce più o meno velocemente. La carpa consigliata in questa sperimentazione è la varietà "a specchi".

Il ciprinide *Carassius auratus*, molto simile nei caratteri morfologici al suo parente stretto, il carassio comune (*Carassius carassius*), rappresenta la forma originale e selvatica del pesce rosso. Vive nei piccoli stagni ricchi di vegetazione, nei laghi e nel corso inferiore di parecchi fiumi asiatici e dell'Europa orientale (zona dell'abramide). Supera raramente i 20 cm di lunghezza (5-6 anni di età), ma può raggiungere una taglia massima di 45 cm (circa 3 kg di peso).

Il metodo di seguito esposto, pur non essendo un metodo standard in quanto non ancora oggetto

del consenso e della validazione necessari, viene proposto perché, in base ad osservazioni preliminari degli autori, appare particolarmente adatto per il saggio di tossicità prolungato nelle acque dolci.

MATERIALI E STRUMENTAZIONE

La conduzione del saggio di tossicità richiede:

- gabbie galleggianti in rete con capacità netta di circa 100 litri, munite di sostegni metallici, di un disco di poliuretano espanso con funzione di galleggiante e con all'apice una struttura apposita per l'inserimento di una mangiatoia da esterno automatica;
- funi di adeguata lunghezza, necessarie per fissare le gabbie galleggianti;
- acquari della capacità unitaria di 120 litri, operanti in ciclo chiuso e in grado di garantire un ricambio idrico completo ogni 3 ore, provvisti di un sistema di filtrazione meccanica e biologica (l'innesco dei filtri biologici richiede un'accurata preparazione preliminare e tempi medi di 40 giorni necessari all'insediamento delle popolazioni batteriche) nonché di un dispositivo per la termoregolazione delle acque, le quali devono avere una durezza di 160-180 mg/L CaCO₃, un'alcalinità di 110-120 mg/L CaCO₃ (IRSA-CNR, 1994), un pH di 6,5-9,0. È possibile utilizzare acqua di rete preventivamente dechlorata;
- sistema di aerazione a bassa pressione fornito di diffusori a pietra porosa;
- retini per il trasferimento dei pesci;
- reti o coperture trasparenti in materiale atossico per evitare la

fuoriuscita degli animali dalle gabbie galleggianti o dagli acquari di laboratorio;

- mangime pellettato con formulazione variabile a seconda della specie ittica impiegata;
- sacchi di polietilene per il trasporto dei pesci;
- frigo portatile;
- bombola di ossigeno;
- analizzatore di ossigeno disciolto, analizzatore di pH e termometro per la misura istantanea della temperatura;
- bilancia analitica per la misura del peso dei pesci;
- ittiometro per la misura della lunghezza dei pesci.

Tutti gli oggetti destinati ad entrare in contatto con l'acqua di mantenimento, o con l'acqua da saggiare, devono essere realizzati con materiali inerti, che non adsorbano significativamente i tossici e, tanto meno, possano rilasciarne. Il vetro borosilicato e le plastiche fluorurate dovrebbero essere impiegati ovunque possibile. Gli oggetti costruiti con questi materiali possono essere riutilizzati dopo le necessarie procedure di pulizia.

Come organismi per il saggio si possono utilizzare giovani esemplari di alborella (quando la pesca in natura lo consente), carpa e pesce rosso (quando disponibili presso gli allevamenti specializzati). Si privilegiano gli stadi giovanili in quanto: si adattano meglio alle condizioni di allevamento ed alla fase di svezzamento; danno migliori informazioni sulla velocità di crescita, quale parametro fondamentale per la comprensione del test; sono più sensibili degli stadi adulti, come si è potuto verificare attraverso test con sostanze tossiche (erbicidi).

In seguito al loro invio al laboratorio, gli esemplari devono essere mantenuti in quarantena,

per circa 20 giorni, al fine di poter individuare manifestazioni patologiche e mortalità derivanti dallo stress di trasporto e dall'acclimatazione alle nuove condizioni di allevamento (GHITTINO, 1983). Successivamente i pesci vengono suddivisi negli acquari. Durante il periodo di mantenimento e acclimatazione i pesci sono alimentati con un quantitativo giornaliero minimo di mangime sfarinato equivalente al 1-2 % del loro peso fresco (MELOTTI *et al.*, 1992).

PROCEDURA DI SAGGIO

Per effettuare un saggio di tossicità prolungato sulle acque di un corpo idrico, si utilizza un minimo di dieci organismi. Gli effetti osservati nel gruppo di pesci esposti alle acque del corpo idrico vengono confrontati con quelli osservati in uno stesso numero di organismi di controllo mantenuti in laboratorio.

Il saggio è organizzato limitando la scelta delle dimensioni dei pesci ad un ambito relativamente ristretto. Inoltre, la necessità di mantenere nelle gabbie galleggianti e negli acquari densità unitarie comprese tra 0,1 e 0,2 pesci/L e di valutare la velocità di crescita dei pesci nel corso della sperimentazione, comporta la scelta di taglie ridotte. È comunque opportuno non scendere al di sotto dei 3 cm per evitare, durante la manipolazione, il rischio di mortalità dovuto all'eccessiva delicatezza degli organismi.

La misurazione della lunghezza totale si effettua dall'estremità anteriore del capo, e più precisamente dalla mascella, terminando all'estremità della pinna caudale. Per misurare accuratamente peso e lunghezza dei singoli individui è consigliabile che essi vengano anestetizzati. Questa operazione deve essere effettuata con pesci a digi-

no da 24 ore. Si prepara una vaschetta contenente una soluzione di alcuni litri di anestetico, per esempio fenossietanolo alla concentrazione di 0,1 ml/L, debolmente aerata ed alla temperatura di 20 ± 1 °C e vi si trasferiscono gli animali per circa 5 minuti. Trattandosi di misurazioni di peso fresco è necessario adottare piccoli accorgimenti per minimizzare il rischio di errore dovuto alla presenza di gocce d'acqua sul corpo del pesce; queste possono essere rimosse appoggiando delicatamente il pesce su carta da filtro o simile, senza danneggiare lo strato di muco protettivo; dopo aver valutato se l'organismo anestetizzato risponde ai requisiti di lunghezza e peso desiderati, si procede alla sua immersione in una vaschetta simile alla precedente, ma contenente solo acqua di diluizione, si attende che il pesce riprenda le sue attività funzionali e si trasferisce definitivamente o nel sacco di polietilene con cui i pesci vengono trasportati in campo o nell'acquario di laboratorio destinato a contenere i controlli.

Per il trasferimento sul luogo di monitoraggio, gli organismi scelti sono immessi in sacchi di polietilene precedentemente riempiti con una quantità opportuna di acqua (1/3 del volume) dell'acquario di stabulazione. Ogni sacco viene gonfiato insufflando ossigeno (2/3 del volume) e posto all'interno di un frigo portatile. Una volta giunti al sito di monitoraggio, si procede al raggiungimento dell'equilibrio delle temperature sostituendo gradualmente l'acqua contenuta nel sacco con quella del corpo idrico. La gabbia galleggiante viene immersa nelle acque del corpo idrico e fissata con una fune, vi si introduce un minimo di 10 pesci e, successivamente, viene coperta con una rete per impedirne la fuga. Il trasferimento dei pesci deve essere effet-

tuato con appositi retini, rapidamente e con la massima cura, per minimizzare lo stress e non danneggiare gli organismi.

Periodicamente devono essere eseguiti controlli sulla tenuta e sulla pulizia delle gabbie galleggianti. Queste devono essere eventualmente sostituite se molto sporche o incrostate da alghe. Quotidianamente si deve provvedere alla rimozione degli eventuali organismi deceduti, sia in campo che in laboratorio.

In base agli obiettivi del saggio e ai risultati ottenuti dai primi 14 giorni di esposizione, si può decidere di prolungare la sperimentazione sino al 28° giorno.

Il giorno stesso del termine del test i pesci vengono di nuovo portati in laboratorio, con la stessa metodica di trasporto iniziale, e anestetizzati per essere pesati e misurati.

In laboratorio, nella vasca di controllo, devono essere mantenute le stesse condizioni di illuminazione (circa 300 lux) cui gli animali sono stati acclimatati. Il fotoperiodo deve coincidere, per quanto possibile, con il fotoperiodo naturale. La temperatura deve essere mantenuta simile alla temperatura media esterna (± 2 °C) per l'intera durata della sperimentazione. Non è opportuno condurre il saggio quando la temperatura naturale non è idonea all'accrescimento dei pesci, quando cioè è troppo bassa (minore di 10 °C) o troppo alta (oltre i 30 °C).

L'alimento somministrato ai pesci, sia in laboratorio che in campo, è un mangime pellettato, specificamente formulato per Ciprinidi e caratterizzato da un tenore proteico pari al 45% s.s. e un contenuto lipidico del 12,5% s.s. Durante la sperimentazione, i pesci di controllo in laboratorio devono essere alimentati quotidianamente con una

quantità di mangime equivalente al 4% del loro peso fresco, mentre i pesci sentinella sono alimentati quotidianamente con mangime distribuito *ad libitum*, a causa della maggiore dispersione dovuta alla struttura particolare della gabbia galleggiante. A parità di altre condizioni, la velocità di crescita è strettamente dipendente dalla quantità di alimento disponibile; pertanto, la somministrazione giornaliera della dieta deve essere attentamente controllata.

La distribuzione del mangime deve essere interrotta 24 ore prima di effettuare il rilievo dei parametri biometrici dei pesci, evitando così che i processi digestivi possano interferire in modo significativo. L'alimentazione, quindi, viene sospesa prima dell'allestimento del saggio, come pure al 27° giorno di trattamento.

Per un corretto svolgimento della ricerca è necessario misurare quotidianamente la concentrazione di ossigeno disciolto sia nell'acqua del corpo idrico che nell'acquario di laboratorio contenente i controlli. Nell'acquario di controllo il valore dell'ossigeno deve essere superiore al 60% del valore di saturazione per l'intera durata della sperimentazione.

È opportuno predisporre apposite schede di laboratorio e di campo per registrare quotidianamente i valori di temperatura, di ossigeno disciolto, di pH e di even-

tuali altri parametri chimico-fisici di interesse per la fase sperimentale, il numero di pesci morti e ogni altra alterazione osservabile (cambiamento della colorazione, perdita di equilibrio, nuoto scoordinato, aumento della velocità respiratoria, ecc.).

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

I risultati del saggio sono considerati validi se nell'acquario contenente gli organismi di controllo si osserva una mortalità $\leq 10\%$ ed una concentrazione di ossigeno disciolto $\geq 60\%$ del valore di saturazione.

Al termine del saggio vengono considerati i valori di peso e lunghezza dei singoli organismi.

Vista l'impossibilità nel metodo proposto di riconoscere il singolo pesce (in alcune sperimentazioni questo si ottiene attraverso la marcatura), per l'espressione dei risultati si effettua una valutazione di tipo intermedio che consiste nel calcolo della velocità di crescita "pseudo" specifica (r) come indicato da Viganò (1998) attraverso la seguente formula:

$$r = [(\log_e w_2 - \log_e w_{1\text{medio}}) / (t_2 - t_1)] \times 100$$

dove:

w_1 e w_2 = peso (in grammi) rilevato ai tempi t_1 e t_2 ,

t_1 , t_2 = inizio e termine della sperimentazione.

In pratica, non potendo fare riferimento al peso di quel determinato individuo al tempo t_1 , l'accrescimento dell'organismo in esame viene valutato usando come riferimento il peso medio dell'intero gruppo di pesci immesso nella vasca al tempo t_1 , che è indicato come $w_{1\text{medio}}$.

La significatività della differenza tra i valori di lunghezza, peso e velocità di crescita r degli organismi esposti ed i valori corrispondenti degli organismi di controllo viene verificata mediante il test t di Student. Se vengono evidenziate differenze statisticamente significative per almeno uno dei parametri, si può affermare che il corpo idrico monitorato contiene concentrazioni di contaminanti tali da ridurre l'accrescimento dei pesci. Lo scopo dell'analisi statistica è di confrontare le risposte degli organismi che sono stati esposti con quelle degli organismi di controllo e di valutare se le eventuali differenze, ad esempio di taglia corporea, siano da considerare significative e quindi imputabili agli inquinanti presenti nel campione stesso.

La relativa facilità d'uso dei programmi disponibili in commercio non deve fuorviare e si consiglia di avvalersi sempre della collaborazione di un esperto di statistica che possa consigliare sulla scelta dei metodi di analisi più appropriati.

Bibliografia

- DE LUISE G., 1998. Ittiologia speciale. *Pesci, pesca & ambiente d'acqua dolce*. Litoimmagine editore, Udine, 4: 9-253.
- GHITTINO P., 1983. *Tecnologia e Patologia in Acquacoltura*. Vol.1- Tecnologia.

- Tipografia Emilio Bono, Torino, 532 pp.
- IRSA-CNR, 1994. *Metodi analitici per le acque*. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 342 pp.
- JOHNSON R. K., 1998. Spatiotemporal

- variability of temperate lake macroinvertebrate communities: detections of impact. *Ecological Applications*, 8 (1): 61-70.
- KASTHURI J., CHANDRAN M. R., 1997. Sublethal effects of lead on feeding

- energetics, growth performance, biochemical composition and bioaccumulation of the estuarine catfish, *Mystus gulio* (Hamilton). *Journal for Environmental Biology*, **18** (1): 95-101.
- KOSMALA A., CHARVET S., ROGER M. C., FAESSEL B., 1999. Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Water Research*, **33** (1): 266-278.
- MELOTTI P., AMERIO M., GENNARI L., RONCARATI A., 1992. Valutazioni comparative sull'impiego di alcune diete inerti nello svezzamento del branzino (*Dicentrarchus labrax* L.). *Zool. Nutr. Anim.* **3-4**: 191-200.
- NIMMO D. R., WILLOX M.-J., LANFRANCOIS T.D., CHAPMAN P.L., BRINKMAN S. F., GREENE J. C., 1998. Effects of metal mining and milling boundary waters of Yellowstone National Park, USA. *Environmental Management*, **22** (6): 913-926.
- PALAZZI D., GELLI F., NOVI C., PENAZZI L., PREGNOLATO L., TRENTINI P. L., CORAZZARI M., SAVORELLI F., RONCARATI A., MELOTTI P., MANTOVANI E., FINCO R., 2001. Messa a punto di metodi ecotossicologici, come auspicato dal Decreto Legislativo 152/'99: uso di specie ittiche endemiche (*Alburnus alburnus*) e verifica di questo indicatore per la classificazione e valutazione delle acque interne della provincia di Ferrara. In: Atti Conv. "Conservazione e sviluppo sostenibile nel Parco del Delta del Po", Comacchio (Fe), 9 febbraio 2001.
- POULIN R., 1992. Toxic pollution and parasitism in freshwater fish. *Parasitology Today*, **8** (2): 58-61.
- TORTONESE E., 1975. *Fauna d'Italia. Osteichthyes*. Edizioni Calderini, Bologna, X+540 pp (parte prima) e XVIII+636 pp (parte seconda).
- UNICHIM, 1999. *Linee guida per la classificazione biologica delle acque correnti superficiali*. Manuale n. 191, 59 pp.
- US-EPA, 1993. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, Fourth Edition, 293 pp.
- VICANÒ L., 1998. Metodo per saggio di tossicità prolungato (14-28 giorni) con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). *Notiziario dei metodi analitici IRSA-CNR*: 19-27.