

Messa a punto di una metodologia di saggio a 14 giorni su *Artemia franciscana* e *A. parthenogenetica*

Federica Savorelli^{1*}, Donatella Palazzi², Gessica Gorbi³, Marion Invidia³, Sandra Sei³, Erika Magaletti⁴, Loredana Manfra⁴, Fernando Gelli²

1 Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare (I.C.R.A.M.), Roma
c/o A.R.P.A. E.R., sez. prov.le di Ferrara, C.so Giovecca, 169 - 44100 Ferrara

2 Laboratorio Ittiologico - A.R.P.A. E.R., sezione prov.le di Ferrara, C.so Giovecca, 169 - 44100 Ferrara

3 Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Parma, Parco Area delle Scienze 11/A - 43100 Parma

4 Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare (I.C.R.A.M.), Via di Casalotti 300 - 00166 Roma

* Referente per la corrispondenza: fsavorelli@arpa.emr.it

Pervenuto il 7.2.2007; accettato il 20.3.2007

RIASSUNTO

Obiettivo di questo lavoro è stata la messa a punto di una metodologia di saggio a 14 gg. di semplice applicazione e da poter effettuare a domanda, su crostacei del genere *Artemia*. Per i saggi sono stati utilizzati naupli (II-III stadio) di *Artemia franciscana*, ottenuti da cisti reperibili in commercio, e della specie autoctona *A. parthenogenetica*, allevata in laboratorio. La prima fase della sperimentazione è stata finalizzata all'individuazione di un'acqua artificiale idonea e della minima densità algale in grado di assicurare sopravvivenza e crescita degli organismi. La metodologia definita in questa fase (acqua artificiale Instant Ocean, salinità 35±1 ‰; densità dell'alga *Dunaliella tertiolecta* 1x10⁵ cell/mL; rinnovo del mezzo e dell'alimento tre volte a settimana) è stata applicata alla valutazione della tossicità di una sostanza di riferimento, Sodio Dodecil Solfato (SDS), e del prodotto disperdente Safety Sea Cleaner 2, considerando come *end-point* mortalità e accrescimento (valutato in termini di lunghezza corporea). È stata valutata, inoltre, la sensibilità relativa delle due specie di *Artemia* al tossico di riferimento. Sono stati eseguiti test semistatici a 7 e 14 giorni, effettuando per ogni trattamento e per il controllo almeno 3 repliche (10 naupli per replica). Per entrambe le specie, l'*end-point* letale è risultato più sensibile dell'*end-point* subletale (accrescimento) sia dopo 7 che dopo 14 giorni di esposizione. Prolungando il tempo di esposizione a 14 giorni, aumenta la sensibilità del test con *A. franciscana* basato sull'*end-point* letale. I risultati ottenuti con SDS sembrano indicare una maggior sensibilità di *A. franciscana* rispetto ad *A. parthenogenetica*.

PAROLE CHIAVE: saggi ecotossicologici / *Artemia franciscana* / *Artemia parthenogenetica* / Sodio Dodecil Solfato / Safety Sea Cleaner 2

Set up of a standard methodology for 14-day bioassay on *Artemia franciscana* and *A. parthenogenetica*

The objective of this study was to set up a standard methodology for "on demand" 14-day bioassay on the brine shrimp *Artemia*. Nauplii of *Artemia franciscana* and *A. parthenogenetica* at the 2nd-3rd larval stage were used. A first experimental phase was devoted to identify a suitable artificial sea water and the lowest algal density able to assure survival and development of the organism. The defined procedures (Instant Ocean artificial sea water, 35±1 ‰ salinity; density of the alga *Dunaliella tertiolecta* 1x10⁵ cells/mL; renewal of water and food three times a week) were then applied to evaluate toxicity of a reference toxicant, Sodium Dodecylsulfate (SDS), and of the oil dispersant Safety Sea Cleaner 2. Semi-static bioassays (7 and 14-day exposure) were realized on the two *Artemia* species, and the relative sensitivity was evaluated. Mortality and negative effects on somatic growth (i.e. carapace length after 7 and 14-day exposure) were considered as end-points. Three replicate chambers for concentration and control (10 nauplii per test chamber) were run and solutions and food were renewed three times a week. In both *Artemia* species, mortality was more sensitive than the sublethal end-point "growth" after 7 and 14 days of exposure. The increase of the exposure time to 14 days increased the sensitivity of the test on *A. franciscana* based on the lethal end-point. The results of the test with SDS suggest that *A. franciscana* is slightly more sensitive than *A. parthenogenetica*.

KEY WORDS: ecotoxicological bioassay / *Artemia franciscana* / *Artemia parthenogenetica* / Sodium Dodecylsulfate / Safety Sea Cleaner 2

INTRODUZIONE

L'utilizzo di specie del genere *Artemia* (Crustacea, Anostraca) in ecotossicologia è ben documentato: negli ultimi 20 anni il genere è stato largamente impiegato per valutare la tossicità acuta di contaminanti organici ed inorganici e dettagliate rassegne sono riportate da PERSOONE e WELLS (1987) e da NUNES *et al.* (2006). Più limitato è stato invece l'uso di *Artemia* spp. nella valutazione della tossicità subletale cronica. Le prime ricerche risalgono alla metà degli anni '70 e sono state condotte su una specie classificata allora come *A. salina*: GEBHARDT (1976) ha studiato gli effetti di alcuni metalli pesanti su riproduzione, crescita e sopravvivenza e CUNNINGHAM (1976) gli effetti di un insetticida sulla riproduzione. Nuovi studi sono stati realizzati soltanto in anni recenti: BRIX *et al.* (2003, 2004) hanno effettuato test di tossicità cronica su *A. franciscana* valutando l'impatto di arsenico e selenio su sopravvivenza degli adulti, crescita e riproduzione; SARABIA *et al.* (2003) hanno condotto ricerche sugli effetti del cadmio su schiusa delle uova, riproduzione e tratti del ciclo vitale di *A. parthenogenetica*.

Nella legislazione italiana, l'utilizzo di *A. salina* per i test di tossicità acuta sugli scarichi di acque salate è stato disposto dal D. Lgs n. 152/99. Inoltre la lettera del Ministero dell'Ambiente N. DPN/3M/2003/8319 del 16/12/2003 dispone, in via transitoria, la sostituzione di *Mysidopsis bahia* (Crustacea, Mysidacea) con *A. salina* al fine di garantire l'applicabilità del Decreto Direttoriale (D.D. 23/12/2002) recante norme sulla classificazione tossicologica di prodotti disperdenti per la bonifica da idrocarburi petroliferi. *M. bahia* è infatti assente dagli ambienti costieri del Mediterraneo, non facilmente reperibile e specie potenzialmente invasiva. Il D.D. prevede che la classificazione tossicologica sia effettuata mediante test di tossicità sia acuta che cronica, tuttavia non sono attualmente disponibili procedure standardizzate per la valutazione della tossicità cronica di sostanze e campioni ambientali su specie del genere *Artemia*.

Obiettivo di questo lavoro è stata la messa a punto di una metodologia di saggio a 14 gg che risulti di semplice applicazione e da poter effettuare a domanda. Sono state prese in considerazione due specie: *A. franciscana*, specie bisessuale originaria del continente americano e facilmente reperibile in commercio, e *A. parthenogenetica*, specie autoctona. In Mediterraneo sono infatti presenti due specie autoctone: la specie bisessuale *A. salina* e *A. parthenogenetica*. In Italia *A. parthenogenetica* è segnalata lungo le coste adriatiche dell'Emilia Romagna e della Puglia, in particolare nelle saline di Cervia e Comacchio (STAGNI *et al.*, 1994) e di Torre Colimena e Margherita di Savoia, (BARIGOZZI, 1980; MURA, 1999; MOSCATELLO *et al.*, 2002) mentre

A. salina è dominante lungo le coste tirreniche di Lazio, Sicilia e Sardegna, con l'unica eccezione della salina di Santa Gilla (Cagliari), dove coesiste con *A. parthenogenetica* (BARIGOZZI, 1974, 1980; MURA, 1987, 1999; MOSCATELLO *et al.*, 2002). Un recente studio sulla distribuzione delle specie del genere *Artemia* nell'area mediterranea (AMAT *et al.*, 2005), segnala *A. franciscana*, come specie invasiva in espansione, dominante nelle saline di Portogallo e Marocco e lungo le coste di Francia e Spagna.

Allo scopo di verificare la possibilità di utilizzare la specie autoctona nei test ecotossicologici, è stata valutata la sensibilità relativa di *A. parthenogenetica* e *A. franciscana* ad un tossico di riferimento, considerando un *end-point* letale e uno subletale.

MATERIALI E METODI

Colture algali

Durante i test entrambe le specie di *Artemia* sono state alimentate con la microalga *Dunaliella tertiolecta*, specie scelta tra quelle consigliate da D'AGOSTINO (1980) per l'alimentazione di *Artemia* sp., utilizzando colture in crescita esponenziale con densità comprese tra $1,3$ e $2,0 \times 10^6$ cellule/mL. La stessa alga è stata utilizzata anche per l'allevamento di *A. parthenogenetica*.

È stato utilizzato il mezzo colturale f/2 Guillard addizionato ad acqua marina artificiale *Instant Ocean* al 30‰ di salinità. Le colture algali sono state mantenute in beute da 500 mL chiuse con tampone di garza sterile e cotone idrofobo, poste in una camera termostata a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, illuminate con lampade a fluorescenza (3000 lux) ad un fotoperiodo di 16h luce:8h buio.

Allevamento di *Artemia parthenogenetica*

Adulti di *Artemia parthenogenetica* prelevati dalle saline di Cervia sono stati utilizzati per allestire l'allevamento nel Laboratorio Ittiologico ARPA-FE.

Gli organismi sono stati mantenuti in vaschette di cm 35x30x5, ciascuna contenente 3 litri di acqua di mare artificiale *Instant Ocean*[®] ($20 \pm 1^\circ\text{C}$, salinità 35 ± 1 ‰, 16h luce:8h buio, assenza di aerazione), alla densità di circa 30 individui/litro.

Giornalmente si è provveduto alla pulizia delle vaschette e alla somministrazione di una sospensione di *Dunaliella tertiolecta* in quantità tale da assicurare una densità di $0,6 \times 10^5$ cell/mL.

Messa a punto delle metodologie di saggio

Le metodologie per l'esecuzione dei saggi sono state messe a punto su *Artemia franciscana*. Gli stessi metodi sono poi stati applicati nei test con *A. parthenogenetica*.

Valutazione dell'idoneità di diverse acque artificiali

Allo scopo di identificare un'acqua artificiale idonea alla sopravvivenza e alla crescita di *Artemia franciscana*, sono stati testati 5 diversi tipi di acqua marina artificiale al 35‰ di salinità:

- ASPM: acqua preparata secondo la ricetta riportata da GUZZELLA (1997), (NaCl 26,4 g/L, KCl 0,84 g/L, CaCl₂·H₂O 1,67 g/L, MgCl₂·6H₂O 4,6 g/L, MgSO₄·7H₂O 5,58 g/L, NaHCO₃ 0,17 g/L, H₃BO₃ 0,03 g/L in acqua MilliQ).
- ASW: acqua preparata aggiungendo ad acqua MilliQ soluzioni di sali già pronte, fornite con il kit ARTO-XKIT. I sali sono gli stessi indicati nel punto precedente per la preparazione della soluzione ASPM, ma la concentrazione nelle soluzioni non è riportata dalla ditta produttrice.
- Instant Ocean 1: acqua preparata aggiungendo ad 1 litro di acqua MilliQ 35 g della miscela di sali *Instant Ocean*® reperibile in commercio, consigliata anche da VIGANÒ (1996) per l'esecuzione dei test cronici con *Mysidopsis bahia*.
- Instant Ocean 2: acqua preparata aggiungendo ad 1 litro di acqua MilliQ 35 g della miscela di sali *Instant Ocean*® e condizionata su filtri biologici per almeno una settimana prima del suo impiego.
- Standard Methods (SM): acqua preparata secondo A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. (1989), sciogliendo in acqua MilliQ i sali indicati in tabella I, risultata idonea per l'esecuzione di saggi a lungo termine con il crostaceo *Acartia tonsa* (INVIDIA *et al.*, 2004; GORBI *et al.*, 2006; SAVORELLI *et al.*, 2006).

Tutte le acque sono state aerate per 48 ore, filtrate su filtri a porosità di 0,45µm e conservate al buio a 4 °C. Prima dell'uso sono state nuovamente aerate per 24 ore.

Cisti (100 mg) di *A. franciscana* sono state

Tab. I. Composizione dell'acqua marina artificiale Standard Methods (A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F., 1989).

	Concentrazione finale g/L
NaF	0,003
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0,02
H ₃ BO ₃	0,03
KBr	0,1
KCl	0,7
CaCl ₂ · 6H ₂ O	2,1896
Na ₂ SO ₄	4,0
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10,78
NaCl	23,5
Na ₂ SiO ₃ · 5H ₂ O	0,0149
Na ₄ EDTA	0,001
NaHCO ₃	0,2

distribuite in 5 capsule Petri (20 mg per capsula) e attivate utilizzando per l'idratazione 12 mL delle diverse acque artificiali. Le capsule sono state chiuse, mantenute per circa un'ora a 25±1°C alla intensità luminosa di 3000 lux e successivamente incubate al buio alla stessa temperatura. Dopo 24 ore, le capsule sono state poste al binoculare ed è stata posizionata una fonte luminosa in modo da radunare per fototassia le larve schiuse ed eliminare da ciascuna capsula le cisti e le larve ancora parzialmente o totalmente incluse nella membrana. Il contenuto di ogni Petri (acqua e naupli) è stato versato in cristallizzatori (Ø 90 mm) contenenti 200 mL della stessa acqua utilizzata per la attivazione e i naupli sono stati alimentati *ad libitum* con una sospensione della microalga *Dunaliella tertiolecta*. Per 7 giorni le larve sono state mantenute in cella climatizzata (temperatura di 25 ± 1 °C, fotoperiodo 14 h luce:10 h buio, intensità luminosa di 1000 lux), senza effettuare alcun cambio del mezzo; ciò ha consentito di evitare la manipolazione degli organismi durante lo sviluppo naupliare, fase ritenuta da VANHAECKE *et al.* (1980) più sensibile agli stress rispetto allo stadio di metanauplio.

Successivamente gli organismi sono stati distribuiti in beaker da 100 mL contenenti 50 mL di acqua di mare sintetica (densità: 1 ind/5 mL) e alimentati con *D. tertiolecta* alla densità di 0,6x10⁵ cell/mL. I beaker sono stati trasferiti in cella termostata alla temperatura di 25 ± 1 °C e mantenuti in queste condizioni sperimentali per 17 giorni. Ogni 3 giorni è stato effettuato il rinnovo del mezzo trasferendo gli organismi in beaker contenenti acqua artificiale ed alimento freschi. La sopravvivenza è stata controllata ogni 24 ore mediante osservazione allo stereomicroscopio. Sono state considerate morte le larve che, anche a seguito di stimolazione con uno specillo, non presentavano alcun movimento. Per ognuna delle 5 acque sono state effettuate 4 repliche (10 organismi per replica = 40 organismi per ciascun tipo di acqua marina sintetica).

Standardizzazione dell'alimentazione

I saggi di standardizzazione dell'alimentazione hanno avuto lo scopo di identificare la più bassa densità di alghe capace di assicurare sopravvivenza e sviluppo (in termini di incremento della lunghezza) dell'organismo.

Cisti di *A. franciscana* (20 mg) sono state indotte alla schiusa come descritto nel paragrafo precedente. Come acqua di idratazione sono state usate, in parallelo, le acque artificiali scelte sulla base dei risultati ottenuti dai saggi sopra descritti. Dopo 24 ore, le larve schiuse sono state trasferite in nuove capsule Petri riempite con le diverse acque artificiali e mantenute per altre 24 ore al buio, alla stessa temperatura. I naupli al II-III stadio, così ottenuti, sono stati trasferiti in be-

aker (100 mL) contenenti 50 mL della stessa acqua artificiale utilizzata per l'attivazione delle cisti (densità: 1 ind/5 mL), alimentati con *D. tertiolecta* alle densità di 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1,0 e $1,25 \times 10^5$ cell/mL e mantenuti in cella climatizzata (25 ± 1 °C, 14 h luce:10 h buio, 1000 lux) per 9 giorni. Per ogni densità algale e per ciascun tipo di acqua sintetica sono state effettuate 4 repliche (10 organismi per replica = 40 organismi per trattamento).

Per valutare l'accrescimento degli organismi, all'inizio della prova è stato sacrificato un campione di naupli, usando formalina tamponata al 40% (conc. finale 4%), e ciascun individuo è stato misurato allo stereomicroscopio dalla sommità anteriore del capo alla base della furca caudale (AMAT DOMENECH, 1980; GODÍNEZ *et al.*, 2004). Dopo 2, 5 e 7 giorni dall'inizio della sperimentazione è stato effettuato il rinnovo del mezzo e dell'alimento. Ad ogni rinnovo, una replica è stata sacrificata per la misurazione degli organismi. Al termine della prova gli organismi sopravvissuti sono stati contati e misurati.

I dati sono stati analizzati mediante ANOVA e il test di confronto multiplo di Tukey, utilizzando il pacchetto statistico SPSS. La densità di alghe più idonea è stata definita sulla base della lunghezza media degli organismi dopo 7 e 9 giorni di allevamento.

Test di tossicità

Per la messa a punto delle metodologie di saggio su *Artemia* sono state testate due sostanze: Sodio Dodecil Solfato (SDS) e il prodotto disperdente Safety Sea Cleaner (SSC2).

Per entrambe le sostanze sono stati effettuati test a 7 giorni su *A. franciscana*. Per verificare se un aumento del tempo di esposizione potesse comportare un aumento della sensibilità del test, è stato effettuato un saggio con SDS a 14 giorni con *A. franciscana*. Il test a 14 giorni con SDS è stato successivamente ripetuto, utilizzando in parallelo *A. franciscana* e *A. parthenogenetica* allo scopo di valutare la sensibilità relativa delle due specie.

La scelta delle concentrazioni da saggiare è stata fatta sulla base di risultati ottenuti precedentemente da test acuti su *A. franciscana*, ipotizzando per le NOEC valori di un ordine di grandezza inferiori rispetto alle LC_{10} a 24 ore (21,3 mg/L per SDS e 40,6 mg/L per SSC2). In funzione delle serie di concentrazioni da saggiare, per ogni sostanza sono state preparate soluzioni madre di 1 g/L in acqua bidistillata, dalle quali, per diluizione in acqua Instant Ocean 1, sono state ottenute le soluzioni per i trattamenti (3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 mg/L SDS; 2,5 - 5 - 10 - 20 mg/L SSC2).

Per l'alimentazione degli organismi sono state utilizzate aliquote opportune di una sospensione della mi-

croalga *Dunaliella tertiolecta* addizionate al momento della preparazione delle soluzioni. I test a 7 giorni sono stati effettuati in parallelo a due diverse densità algali: 0,75 e $1,0 \times 10^5$ cell/mL; i test a 14 giorni sono stati realizzati con la densità algale più elevata ($1,0 \times 10^5$ cell/mL), in considerazione della maggiore durata del saggio.

I naupli di *A. franciscana* al II-III stadio necessari per i saggi sono stati ottenuti ponendo ad idratare, 48 ore prima dei test, 20 mg di cisti in acqua marina artificiale Instant Ocean 1. I naupli sono stati distribuiti, in modo casuale, in capsule Petri contenenti acqua marina artificiale (controllo) o soluzioni di SDS ed SSC2 alle concentrazioni di trattamento. Immediatamente dopo sono stati trasferiti in beaker (100 mL) contenenti 50 mL di acqua marina artificiale o delle soluzioni delle sostanze da saggiare (densità: 1 ind/5 mL). I beaker sono stati quindi trasferiti in cella climatizzata (25 ± 1 °C, 14 h luce:10 h buio, 1000 lux).

I naupli di *A. parthenogenetica* sono stati ottenuti da adulti allevati in laboratorio: 48 ore prima dell'inizio del test, 25-30 individui sessualmente maturi con uova in avanzato stadio di maturazione sono stati selezionati dall'allevamento e trasferiti, a gruppi di 2-3, in cristallizzatori contenenti 70 mL di acqua di mare in acqua marina artificiale Instant Ocean e *D. tertiolecta* a densità elevata (4×10^5 cell/mL) per favorire l'emissione. I naupli nati nelle 24 ore successive all'isolamento degli adulti, sono stati prelevati singolarmente, posti in capsule Petri del diametro di 5 cm in acqua marina artificiale (Instant Ocean) e mantenuti in camera termostata a 25 ± 1 °C al buio per altre 24 ore. Immediatamente prima dell'inizio del test è stato verificato che i naupli fossero al II - III stadio larvale.

Per ogni trattamento e per il controllo sono state effettuate 3 repliche (10 naupli per replica) per i test a 7 giorni e a 14 giorni con *A. franciscana*, 5 repliche per il test a 14 giorni in parallelo con le due specie. Il test a 7 giorni con SDS è stato ripetuto 3 volte.

Controllo della sopravvivenza e rinnovo del mezzo e dell'alimento sono stati effettuati, mediante osservazione allo stereomicroscopio, a 48 ore e a 5 giorni dall'inizio del test per i saggi a 7 giorni, a 48 h, 5, 7, 9 e 12 giorni per i saggi a 14 giorni. Sono state considerate morte le larve che, anche a seguito di stimolazione con uno specillo, non presentavano alcun movimento. Sia per l'allestimento del test che per il rinnovo del mezzo, le soluzioni madre e le soluzioni per i trattamenti sono state preparate lo stesso giorno dell'utilizzo. Al termine dei test, le larve sopravvissute sono state contate, sacrificate usando formalina tamponata al 40% (conc. finale 4%), e misurate allo stereomicroscopio. Nel saggio a 14 giorni in parallelo con *A. franciscana* e *A. parthenogenetica*, due repliche sono

state sacrificate dopo 7 giorni di esposizione e le larve misurate allo stereomicroscopio.

Come *end-point* sono stati considerati mortalità e accrescimento, valutato in termini di lunghezza corporea. NOEC e LOEC sono state definite mediante ANOVA e test di Dunnett (previa trasformazione in arcsin dei dati di mortalità/lunghezza e verifica della omogeneità delle varianze). Le metodologie descritte sono riassunte sinteticamente in tabella II.

RISULTATI

Valutazione dell' idoneità di diverse acque artificiali

Dopo 7 giorni dal trasferimento delle larve nei beaker, la mortalità degli organismi nelle acque artificiali ASW e Instant Ocean 2 è risultata superiore al 62% e al 32% rispettivamente: il saggio con queste acque è

stato quindi interrotto al settimo giorno (Fig. 1). Con gli altri tre tipi di acqua (ASPM, Instant Ocean 1 e SM), la mortalità è risultata nulla fino al 14° giorno e, al termine dell' esperimento, non ha superato il 2,5% (Fig. 1).

Per la fase successiva della sperimentazione sono state utilizzate soltanto le acque artificiali Instant Ocean 1 e SM, in base ai dati ottenuti risultate idonee ad un impiego in test a 14 giorni. Non è stata invece proseguita la sperimentazione con le acque Instant Ocean 2, ASW e ASPM: Instant Ocean 2 per l' elevata mortalità rilevata, ASPM e ASW per aver mostrato risultati fortemente discordanti pur avendo composizione qualitativa identica.

Standardizzazione dell' alimentazione

Con entrambe le acque e a tutti i regimi alimentari testati, la percentuale di mortalità delle larve di *A.*

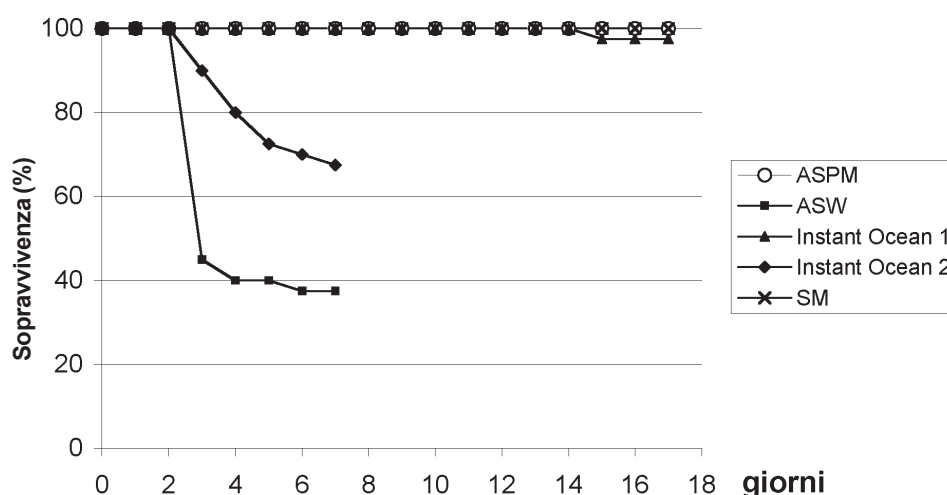


Fig. 1. Sopravvivenza (%) di *A. franciscana* nelle diverse acque marine artificiali.

Tab. II. Test a 7 giorni con naupli di *Artemia franciscana*.

Tipo di test	statico con rinnovo periodico (a 48h e al 5° giorno di esposizione)
Alimentazione	<i>Dunaliella tertiolecta</i> ($0,75 \times 10^5$ e 1×10^5 cell/mL)
Aerazione	assente
Temperatura	25 ± 1 °C
Fotoperiodo	14 h luce / 10 h buio
Acqua di diluizione	artificiale (Instant Ocean®)
Salinità	35 ± 1 ‰
Densità	1 individuo/5 mL
Numero organismi per replica	10
Numero repliche	3 per concentrazione e per il controllo
Numero organismi per trattamento	30
Durata saggio	7 giorni
End-point	mortalità e accrescimento corporeo
Accettabilità del saggio	mortalità nel controllo $\leq 20\%$
Statistica per definizione NOEC-LOEC	ANOVA, Test di Dunnett

franciscana è risultata compresa tra 10 e il 20%. Valori $\leq 20\%$ possono quindi essere considerati casuali e accettabili per i gruppi controllo nei test tossicologici.

Gli organismi mantenuti in acqua Instant Ocean 1 hanno iniziato a mostrare differenze nell'accrescimento dopo 7 giorni di allevamento (Fig. 2): le lunghezze medie delle larve alimentate con 1 e $1,25 \times 10^5$ cell/mL sono risultate significativamente maggiori ($p < 0,05$) rispetto a quelle alimentate con la più bassa densità algale ($0,25 \times 10^5$ cell/mL). Dopo 9 giorni gli organismi alimentati con la densità più alta ($1,25 \times 10^5$ cell/mL) hanno mostrato un accrescimento medio significativamente più elevato rispetto a quanto osservato alle densità algali di 0,25 e $0,5 \times 10^5$ cell/mL ($p < 0,01$), ma non significativamente differente dagli organismi ali-

mentati con 0,75 e 1×10^5 cell/mL. Questi risultati hanno portato quindi a ritenere insufficienti densità di *Dunaliella tertiolecta* $\leq 0,5 \times 10^5$ cell/mL.

Gli organismi allevati in acqua SM hanno invece mostrato differenze significative soltanto dopo 9 giorni: la lunghezza media delle larve alimentate con la densità algale più alta ($1,25 \times 10^5$ cell/mL) è risultata significativamente più elevata ($p < 0,01$) di quella degli organismi alimentati con $0,25 \times 10^5$ cell/mL (Fig. 3). Non sono state osservate differenze significative tra le lunghezze medie delle larve alimentate con 0,5, 0,75, 1 e $1,25 \times 10^5$ cell/mL.

Al termine dell'esperimento, la lunghezza degli organismi allevati in acqua Instant Ocean 1 è risultata significativamente maggiore rispetto a quella degli or-

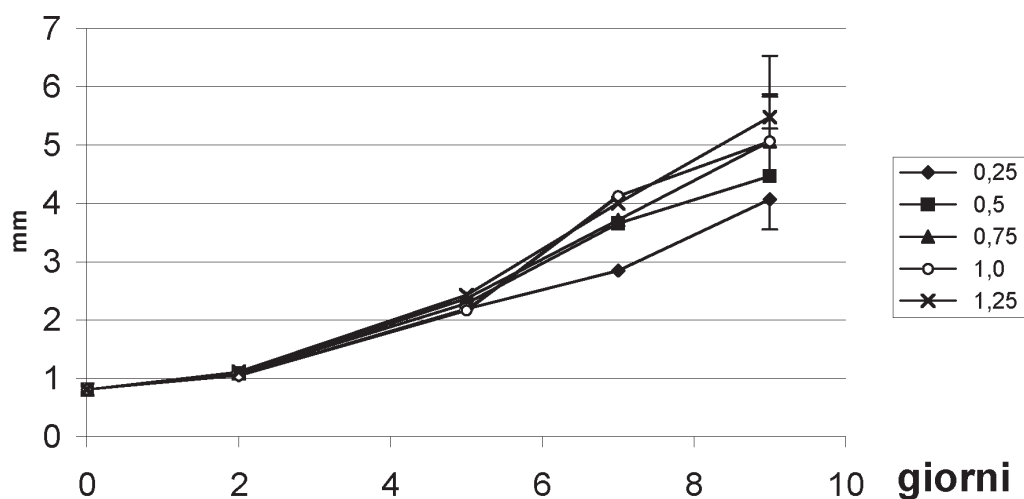


Fig. 2. Accrescimento di *Artemia franciscana* mantenuta in acqua artificiale "Instant Ocean 1" e alimentata con l'alga *Dunaliella tertiolecta* a densità ($\times 10^5$ cells/mL) crescenti.

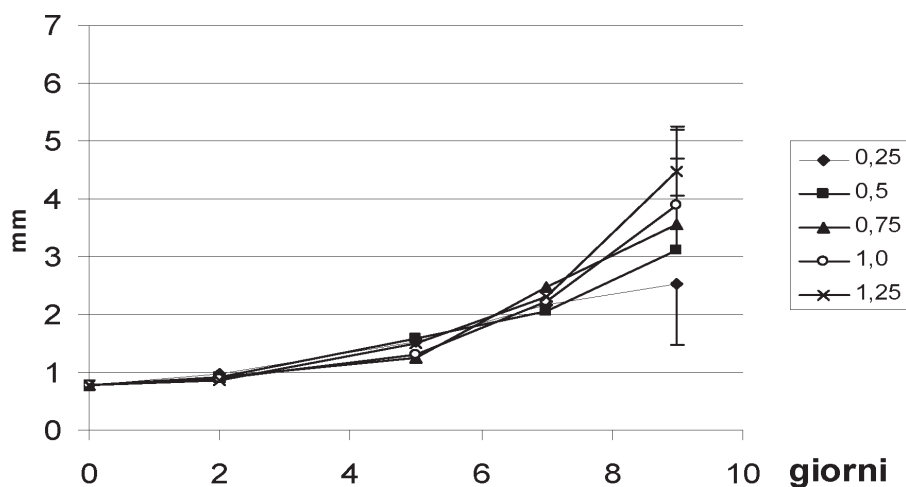


Fig. 3. Accrescimento di *Artemia franciscana* mantenuta in acqua artificiale "SM" e alimentata con l'alga *Dunaliella tertiolecta* a densità ($\times 10^5$ cells/mL) crescenti.

ganismi in acqua SM ($p < 0,05$) con l'unica eccezione di quelli alimentati con $1,0 \times 10^5$ cell/mL.

In base ai risultati ottenuti e considerando che un eccesso di alimento può causare interferenze nei test tossicologici, si è deciso di utilizzare per i test l'acqua artificiale Instant Ocean 1 e di proseguire le prove somministrando alle larve 0,75 e 1×10^5 cell/mL, cioè le più basse concentrazioni di alghe capaci di assicurare la sopravvivenza e un maggiore accrescimento degli organismi.

Test di tossicità

Test a 7 giorni con A. franciscana con sodio dodecil solfato (SDS) e con il prodotto disperdente Safety Sea Cleaner 2 (SSC2) a due diverse densità algali

In tutti i saggi effettuati la mortalità delle larve nel controllo è risultata $\leq 20\%$: i test sono quindi stati considerati accettabili.

In tabella III sono riportati i valori di NOEC e di LOEC ottenuti sulla base degli *end-point* mortalità e accrescimento, valutato in termini di lunghezza corporea raggiunta dopo 7 giorni di esposizione, a due diverse densità di *D. tertiolecta*: 0,75 e $1,0 \times 10^5$ cell/mL.

Mentre nei saggi con SSC2, NOEC e LOEC sono risultate rispettivamente 5 e 10 mg/L per tutti i test effettuati, nei saggi con SDS è stata rilevata una maggiore variabilità.

Considerando l'*end-point* "accrescimento", i valori di NOEC e di LOEC per entrambe le sostanze sono risultati, quando definibili, uguali o potenzialmente più elevati di quelli ricavati dai dati di sopravvivenza. L'*end-*

point "mortalità", quindi, è risultato più sensibile dell'*end-point* "accrescimento".

Tuttavia, alle concentrazioni più elevate, la lunghezza media delle larve era inferiore, seppur non significativamente, rispetto al controllo, risultato che può essere indicativo di una riduzione della crescita negli organismi esposti alle sostanze tossiche. La possibilità di utilizzare la riduzione dell'accrescimento come *end-point* subletale è stata quindi ulteriormente indagata prolungando i tempi di esposizione da 7 a 14 giorni.

Test a 14 giorni con SDS

Anche in questo caso i test effettuati sono risultati accettabili: la mortalità delle larve nel controllo, infatti, non ha superato il 20%.

I valori di NOEC e di LOEC ottenuti utilizzando gli *end-point* "mortalità" e accrescimento sono indicati in tabella IV. Anche nei test a 14 giorni di esposizione l'*end-point* "mortalità" è risultato più sensibile dell'*end-point* "accrescimento".

Test a 14 giorni con SDS con A. franciscana e A. parthenogenetica

Nei controlli la mortalità delle larve di entrambe le specie non ha superato il 20%: i test sono stati considerati accettabili.

I valori di NOEC e di LOEC ottenuti utilizzando l'*end-point* "mortalità" sono indicati in tabella V e VI.

Per entrambe le specie, l'*end-point* "mortalità" è risultato più sensibile dell'*end-point* "accrescimento" sia dopo 7 che dopo 14 giorni di esposizione.

A 14 giorni il test con *A. franciscana* sembra più sensibile del test con *A. parthenogenetica* (tabella VI).

Tab. III. Valori di NOEC e LOEC calcolati sulla base della mortalità e della lunghezza (accrescimento) di *Artemia franciscana* dopo 7 giorni di esposizione a SDS e SSC2 in presenza di diverse densità di *Dunaliella tertiolecta* (0,75 e $1,0 \times 10^5$ cell/mL).

	<i>end-point</i> "mortalità"		<i>end-point</i> "accrescimento"	
	NOEC(mg/L)	*LOEC(mg/L)	NOEC(mg/L)	*LOEC(mg/L)
SDS (<i>D. tertiolecta</i> : $0,75 \times 10^5$ cell/mL)	6,25	12,5	6,25	12,5
	12,5	25		(>12,5) [§]
	12,5	25		(>12,5) [§]
SDS (<i>D. tertiolecta</i> : $1,0 \times 10^5$ cell/mL)	12,5	25	n.d.	n.d.
	**12,6	17,8		(>17,8) [§]
	3,125	6,25	n.d.	n.d.
SSC2 (<i>D. tertiolecta</i> : $0,75 \times 10^5$ cell/mL)	5	10	5	10
SSC2 (<i>D. tertiolecta</i> : 1×10^5 cell/mL)	5	10	n.d.	n.d.
	5	10	n.d.	n.d.

* $p < 0,05$

** Test eseguito alle concentrazioni 8,91 – 12,6 – 17,8 – 25,1 mg/L.

§ massima concentrazione alla quale è stato possibile effettuare misurazioni su organismi sopravvissuti.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La metodologia di saggio messa a punto con il presente lavoro permette di unire un buon grado di standardizzazione (acqua marina artificiale, organismi di età nota, eventualmente ottenuti da stock certificati, alimentazione costante sia qualitativamente che quantitativamente) ad una relativa semplicità di realizzazione (utilizzo di cisti reperibili in commercio o di nauplii ottenuti da organismi partenogenetici facilmente allevabili in laboratorio, realizzabilità a domanda, facile rilevazione della risposta utilizzando sia l'*end-point* letale che l'*end-point* subletale considerato).

Consente inoltre di utilizzare lo stesso criterio di accettabilità del test (sopravvivenza nel controllo $\geq 80\%$) sia a 7 che a 14 giorni di esposizione. A 14 giorni sembra aumentare la sensibilità del test basato sull'*end-point* letale.

L'*end-point* subletale considerato (alterazione dell'accrescimento) non ha dato risultati positivi: riduzioni significative della crescita sono state infatti rilevate (e solo in alcuni casi) a concentrazioni di sostanza

tossica che hanno causato un incremento significativo della mortalità, risposta valutabile con maggiore facilità e rapidità.

Questi risultati sembrano in accordo con quanto osservato da BRIX *et al.* (2003): secondo gli autori, infatti, la sopravvivenza costituisce l'*end-point* più sensibile tra quelli da loro considerati (sopravvivenza, crescita intesa come biomassa degli organismi, e riproduzione). È tuttavia da segnalare che le condizioni sperimentali adottate da Brix e collaboratori differiscono notevolmente da quelle di questo studio: flusso continuo, condizioni di temperatura e salinità, specie e densità algale, densità degli organismi.

Si potrebbe quindi riconsiderare l'ipotesi di altri possibili *end-point* subletali, quali ad esempio il tempo necessario al raggiungimento della maturità sessuale, la percentuale di organismi che raggiungono lo stadio adulto e/o la fecondità. L'uso di questi *end-point* richiederebbe tuttavia tempi di esposizione più prolungati (alle condizioni sperimentali adottate nel presente studio il tempo necessario per lo sviluppo da nauplio ad

Tab. IV. Valori di NOEC e LOEC calcolati sulla base della mortalità e della lunghezza corporea (accrescimento) di *Artemia franciscana* dopo 14 giorni di esposizione a SDS (densità di *Dunaliella tertiolecta* 1×10^5 cell/mL).

SDS (mg/L)	<i>end-point</i> "mortalità"		<i>end-point</i> "accrescimento"	
	NOEC	*LOEC	NOEC	*LOEC
	3,125	6,25		(>12,5) [§]

* $p < 0,05$

§ massima concentrazione alla quale è stato possibile effettuare misurazioni su organismi sopravvissuti.

Tab. V. Valori di NOEC e LOEC calcolati sulla base della mortalità e della lunghezza (accrescimento) degli organismi dopo 7 giorni di esposizione a SDS (densità di *Dunaliella tertiolecta* 1×10^5 cell/mL).

	<i>end-point</i> "mortalità"		<i>end-point</i> "accrescimento"	
	NOEC (mg/L)	*LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)	*LOEC (mg/L)
<i>Artemia franciscana</i>	6,25	12,5		(>12,5) [§]
<i>Artemia parthenogenetica</i>	6,25	12,5	6,25	12,5

* $p < 0,05$

§ massima concentrazione alla quale è stato possibile effettuare misurazioni su organismi sopravvissuti.

Tab. VI. Valori di NOEC e LOEC calcolati sulla base della mortalità e della lunghezza (accrescimento) degli organismi dopo 14 giorni di esposizione a SDS (densità di *Dunaliella tertiolecta* 1×10^5 cell/mL).

	<i>end-point</i> "mortalità"		<i>end-point</i> "accrescimento"	
	NOEC(mg/L)	*LOEC(mg/L)	NOEC(mg/L)	*LOEC(mg/L)
<i>Artemia franciscana</i>	3,125	6,25		(>6,25) [§]
<i>Artemia parthenogenetica</i>	6,25	12,5	6,25	12,5

* $p < 0,05$

§ massima concentrazione alla quale è stato possibile effettuare misurazioni su organismi sopravvissuti.

adulto è di circa 20 giorni). L'utilizzo di organismi allo stadio di metanauplio come materiale di partenza per i test renderebbe possibili tempi di esposizione più brevi. È tuttavia da sottolineare che, mentre l'uso dei naupli (ottenibili in 48 h) permette la realizzazione a domanda, l'uso di metanaupli obbliga all'allestimento di coorti almeno 7 giorni prima del saggio: i test non sarebbero quindi realizzabili a domanda e si avrebbe un notevole aumento del lavoro necessario per ottenere il "materia-

le biologico".

Considerando *end-point* relativi all'attività riproduttiva, potrebbe risultare vantaggioso l'uso di *A. parthenogenetica*. Le popolazioni di questa specie partenogenetica sono infatti costituite soltanto da organismi di sesso femminile e la schiusa delle uova non è subordinata alla fecondazione. D'altra parte, l'utilizzo di questa specie presenta lo svantaggio, rispetto ad *A. franciscana*, del mantenimento di un allevamento.

BIBLIOGRAFIA

- AMAT F., HONTORIA F., RUIZ O., GREEN A. J., SANCHEZ M. I., FIGUEROLA J., HORTAS F., 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biological Invasions*, **7**: 37-47.
- AMAT DOMENECH F., 1980. Differentiation in *Artemia* strains from Spain. In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E. (eds.), *The Brine Shrimp Artemia*, vol. 1. *Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology*. Universa Press, Wetteren, Belgium: 19-39.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F., 1989. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 17th edition, A.P.H.A., Washington, **8**, 1-23.
- BARIGOZZI C., 1974. *Artemia*: a survey of its significance in genetic problems. *Evol. Biol.*, **7**: 221-252.
- BARIGOZZI C., 1980. Genus *Artemia*: problems of systematics. In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E. (eds.), *The Brine Shrimp Artemia*, vol. 1. *Morfology, Genetics, Radiobiology, Toxicology*. Universa Press, Wetteren, Belgium: 147-153.
- BRIX K.V., CARDWELL R.D., ADAMS W.J., 2003. Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **54**: 169-175.
- BRIX K.V., DEFOREST D.K., CARDWELL R.D., ADAMS W.J., 2004. Derivation of a chronic site-specific water quality standard for selenium in the Great Salt Lake, Utah, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 606-612.
- CUNNINGHAM P.A., 1976. Effects of Dimilin (TH 6040) on reproduction in the brine shrimp, *Artemia salina*. *Environ. Entomol.*, **5**: 701-706.
- D'AGOSTINO A. 1980. The vital requirements of *Artemia*: physiology and nutrition. In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E. (eds.), *The Brine Shrimp Artemia*, vol. 2. *Physiology, Biochemistry, Molecular biology*. Universa Press, Wetteren, Belgium: 55-82.
- GEHARDT K.A. 1976. *Effects of Heavy Metals (Cadmium, Copper, and Mercury) on Reproduction, Growth and Survival of Brine Shrimp (Artemia salina)*. Utah State University, Logan, UT.
- GODÍNEZ D. E., DEL CARMEN GALLO M., GELABERT R., DIAZ A. H., GAMBOA J., LANDA V., GODINEZ Y E. M., 2004. Crecimiento larvario de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) alimentada con dos especies de microalgas vivas. *Zootecnia tropical*, **22** (3): 265-275.
- GORBI G., SEI S., INVIDIA M., BETTONI F., 2006. Utilizzo degli stadi uovo/nauplio in test tossicologici con *Acartia tonsa*: proposta di una nuova metodologia di saggio. *Biol. Mar. Medit.* **13** (1): 1081-1084.
- GUZZELLA L., 1997. Saggio di tossicità acuta con *Artemia* sp. *Biologia Ambientale*, **1**: 4-9.
- INVIDIA M., SEI S., GORBI G., 2004. Survival of the copepod *Acartia tonsa* following egg exposure to near anoxia and to sulfide at different pH values. *Marine Ecology Progress Series*, **276**: 187-196.
- MOSCATELLO S., BELMONTE G., MURA G., 2002. The co-occurrence of *Artemia parthenogenetica* and *Branchinella spinosa* (Branchiopoda: Anostraca) in a saline pond of south eastern Italy. *Hydrobiologia*, **486**: 201-206.
- MURA G., 1987. Occurrence of *Artemia* in solar saltworks and coastal brine ponds in Sardinia (Italy). *J. Crust. Biol.*, **7**: 697-703.
- MURA G., 1999. Current status of the Anostracods in Italy. *Hydrobiologia*, **405**: 57-65.
- NUNES B.S., CARVALHO F.D., GUILHERMINO L.M., VAN STAPPEN G., 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, **144**: 453-462.
- PERSOONE G., WELLS P.G., 1987. *Artemia* in aquatic toxicology: A review. In: Sorgeloos P., Bengtson D.A., Declair W., Jaspers E. (eds.), *Artemia Research and its Applications. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology, Vol. 1*. Universa Press, Wetteren, Belgium: 259-275.
- SARABIA R., DEL RAMO J., DIAZ-MAVANS J., TORREBLANCA A., 2003. Development and reproductive effects of low cadmium concentration on *Artemia parthenogenetica*. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, **38**:

- 1065-1071.
- SAVORELLI F., SEI S., GORBI G., INVIDIA M., PALAZZI D., GELLI F., TRENTINI P.L., MAGALETTI E., 2006. Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti: applicazione della metodologia di saggio sugli stadi uovo/nauplio del copepode *Acartia tonsa*. *Biol. Mar. Medit.* **13** (1): 1112-1115.
- STAGNI A. M., TRENTINI M., IMPICCINI R., VALLISNERI M., 1994. Osservazioni cromosomiche su *Artemia parthenogenetica* (Crustacea, anostraca) delle saline di Comacchio (FE) e di Cervia (RA). In: Atti della "Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna" (Università degli Studi di Bologna), classe di Scienze Fisiche – anno 281°, rendiconti serie XIV, Tomo X: 97-102.
- VANHAECKE P., PERSOONE G., CLAUS C., SORGELOOS P., 1980. Research on the development of short term standard toxicity test with *Artemia* nauplii. In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E. (eds.), *The Brine Shrimp Artemia, vol. 1, Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology*. Universa Press, Wetteren, Belgium: 263-285.
- VIGANÒ L., 1996. Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia*. *Notiziario Metodi Analitici IRSA-CNR*, ISSN: 0392-1425, giugno 1996: 19-31.