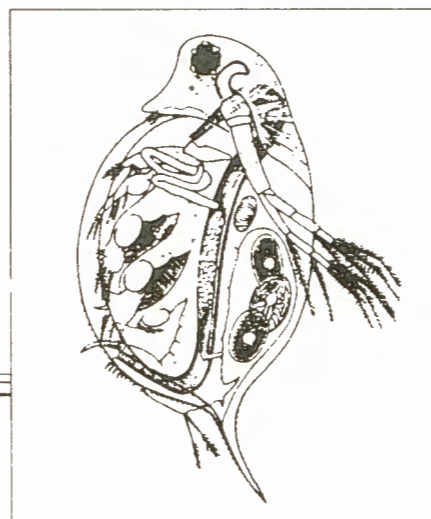


SAGGI TOSSICOLOGICI



Daphnia magna NEL CONTROLLO TOSSICOLOGICO DELLE ACQUE SUPERFICIALI

Problemi relativi alla nutrizione degli organismi di saggio

Miria Amodei* & Rossella Azzoni*, Alessandra Ardemagni**, Paola Pasquini**

Il Piano Regionale di Risanamento delle Acque (P.R.R.A.) della Regione Lombardia fissa quattro classi di qualità dei corpi idrici, definite in funzione di usi multipli delle risorse; i corpi idrici che non soddisfano i requisiti di tali classi sono da considerare inquinati⁽¹⁾.

La classificazione delle acque lombarde prevede come criterio di qualità per le acque di classe inferiore l'assenza di tossicità acuta alla vita acquatica; una nota esplicativa del Piano precisa che "i campioni prelevati dai corpi idrici, non diluiti, devono permettere in condizione di aerazione la sopravvivenza di almeno il 90% degli animali utilizzati per il saggio tossicologico per un periodo di 96 h alla temperatura di 15 °C; la specie impiegata per il saggio deve essere,

similmente a quanto previsto dalla Tabella A della Legge 319, *Salmo gairdnerii* Rich". Prosegue, inoltre, specificando che "quanto sopra rappresenta un criterio operativo; tuttavia, nell'ipotesi in cui l'uso riconosciuto più esigente sia la salvaguardia della vita acquatica, deve essere opportunamente verificata l'assenza di fenomeni di tossicità cronica."

Considerazioni di ordine pratico -fra cui il numero di stazioni di prelievo previste dal protocollo operativo del P.M.I.P., i volumi di campione da raccogliere per l'allestimento dei saggi, le esigenze vitali della trota iridea rispetto alle attrezzature disponibili- hanno condotto alla convinzione dell'opportunità di sostituire l'organismo di saggio *Salmo gairdnerii* con *Daphnia magna*.

Poichè i test statici a 96 ore con vertebrati sono considerati sperimentazioni per la ricerca di fattori di tossicità acuta, la sostituzione dell'organismo di saggio impone di organizzare test di uguale potenza: il

* Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione
via F. Juvara, 22 - 20129 Milano

** P.M.I.P. Milano (volontarie)

confronto ritenuto più confacente è quello che comporta l'esposizione di *Daphnia magna* per 48 ore^(2,3).

Nonostante ciò, considerata la necessità di differenziare l'approccio nei confronti della matrice "fiume" rispetto a quella "acqua di scarico", per la quale è stato prospettato l'uso del medesimo saggio⁽⁴⁾, si è preferito tentare di aumentare l'informazione tossicologica attraverso l'adozione di un test acuto protratto onde poter disporre di parametri dei quali valutare la relazione con il benessere degli organismi. L'incremento del tempo di esposizione degli organismi di saggio richiede, però, di pareggiare la potenzialità alimentare delle acque di fiume rispetto a quella dell'acqua utilizzata per condurre le sperimentazioni di controllo. A questo proposito si può procedere, mediante filtrazione della matrice, all'eliminazione dalle acque di fiume delle popolazioni batteriche, protozoarie ed algali, nonché dei solidi sospesi⁽⁵⁾. Poiché eventuali fenomeni di incompatibilità con la vita acquatica, compresa la biodisponibilità degli xenobiotici, sono comunque determinati dalla matrice in toto, si è ritenuto inopportuno manipolare in tal senso i campioni e si è preferito ricorrere all'arricchimento dell'acqua di allevamento utilizzata per la conduzione dei saggi di controllo.

Nella presente nota verranno discussi i problemi connessi con la nutrizione degli organismi di saggio, per definire la procedura di uno schema metodologico che consenta di ottenere organismi di controllo confrontabili con i trattati.

MATERIALI E METODI

Il test acuto protratto adottato consiste nell'esposizione di *Daphnia magna* ad acqua di fiume indiluita per 7 giorni; a tempi determinati (24 e 48 ore; 5, 6 e 7 giorni) viene rilevato il numero di dafnie immobili ed il numero di dafnie che presentano uova nella camera di incubazione, mentre al settimo giorno viene misurato anche il peso secco degli organismi.

Per i saggi vengono utilizzati neonati di età inferiore alle 24 ore, nati da dafnie allevate con la procedura IRSA-CNR⁽⁶⁾; le condizioni operative di conduzione del saggio sono le seguenti:

- temperatura: 20 ± 2 °C
- fotoperiodo: 16 ore di luce e 8 ore di buio
- illuminazione: 300 lux circa

Vengono allestite 6 repliche per ogni campione,

costituite ognuna da un volume di 50 ml in cui vengono trasferiti 5 neonati; le repliche di controllo utilizzano acqua di allevamento semisintetica. Ogni campione è costituito dall'acqua prelevata in una certa stazione di campionamento, in una certa data, suddivisa in tre aliquote: le soluzioni vengono rinnovate dopo 48 e dopo 120 ore di esposizione dei dafnidi ricorrendo alle aliquote refrigerate; se i campioni presentano una concentrazione di O.D. insufficiente, si procede ad un'acrazione preventiva rispetto all'introduzione degli organismi, fino a raggiungere la concentrazione minima di 6 mg O₂/l: quotidianamente viene effettuato il controllo dell'O.D., che deve risultare superiore alla concentrazione minima indicata.

L'alimentazione è costituita da *Selenastrum capricornutum* e da *Saccharomices cerevisiae*, somministrati in quantità tali da assicurare nel recipiente di ogni replica una densità di circa 300.000 cellule/ml per ciascuno dei due organismi.

La tabella I mostra le tre varianti di dieta sperimentate: le dosi indicate si riferiscono alle sospensioni di alga e di lievito precedentemente citate.

Il peso secco al settimo giorno viene determinato

Tabella I
Schemi nutrizionali sperimentali adottati

1° SCHEMA NUTRIZIONALE		
t esposiz.	BIANCHI	TRATTATI
0 ore	-	-
48 ore	300+300 µl/50 ml	300+300 µl/50 ml
120 ore	300+300 µl/50 ml	300+300 µl/50 ml
2° SCHEMA NUTRIZIONALE		
t esposiz.	BIANCHI	TRATTATI
0 ore	300+300 µl/50 ml	-
48 ore	300+300 µl/50 ml	300+300 µl/50 ml
120 ore	300+300 µl/50 ml	300+300 µl/50 ml
3° SCHEMA NUTRIZIONALE		
t esposiz.	BIANCHI	TRATTATI
0 ore	150+150 µl/50 ml	150+150 µl/50 ml
24 ore	150+150 µl/50 ml	150+150 µl/50 ml
48 ore	300+300 µl/50 ml	300+300 µl/50 ml
120 ore	150+150 µl/50 ml	150+150 µl/50 ml
144 ore	150+150 µl/50 ml	150+150 µl/50 ml

effettuando due lavaggi con acqua MilliQ ed essiccando le dafnie a 60 °C per 24 ore⁽⁷⁾; esso è stato ottenuto riunendo gli organismi delle sei repliche, ed è rappresentato dall'espressione "Peso totale / Numero di individui". Secondo criteri soggettivi, la variabilità fra gli individui è apparsa bassa nella maggior parte dei casi e rimarchevole in alcune occasioni.

I dati relativi ai pesi secchi degli organismi di controllo (bianchi) e degli organismi mantenuti in acqua di fiume (trattati) sono stati confrontati attraverso metodi statistici per confronti multipli della varianza^(8,9).

I corsi d'acqua oggetto di studio sono stati classificati come inquinati, o non inquinati, in base alla maggior parte dei parametri chimici individuati dal P.R.R.A. della Regione Lombardia.

RISULTATI

I risultati dell'applicazione dei tre schemi nutrizionali, espressi come peso secco in µg, sono proposti in Tabella II dove "n" corrisponde al numero di sperimentazioni effettuate.

Per sperimentazione si intende ogni test eseguito con l'acqua prelevata -in una qualunque campagna di campionamento- in una delle 47 stazioni di prelievo previste dal protocollo operativo del P.M.I.P.

Le medie dei pesi secchi dei bianchi e dei trattati ottenuti nelle sperimentazioni con le diverse diete sono state confrontate attraverso il metodo di Scheffè (Tabella III).

Il test statistico ha evidenziato differenze significative fra i pesi secchi degli organismi di controllo alimentati secondo il primo schema nutrizionale (95,56 µg) ed i pesi secchi degli organismi alimentati secondo gli altri schemi, siano essi di controllo o trattati; ha

Tabella II

Peso secco espresso in µg: media $\pm$ t_{0,05} · s_m

	BIANCHI	TRATTATI
1° SCHEMA NUTRIZIONALE	95,56 $\pm$ 28,04 (n = 5)	217,67 $\pm$ 30,22 (n = 19)
2° SCHEMA NUTRIZIONALE	221,30 $\pm$ 42,49 (n = 5)	217,67 $\pm$ 30,22 (n = 19)
3° SCHEMA NUTRIZIONALE	207,35 $\pm$ 36,05 (n = 12)	263,05 $\pm$ 15,20 (n = 52)

Tabella III

Confronto dei pesi secchi mediante analisi della varianza, e test di Scheffè

Gruppo	B1	B2	B3	T1
B2	*			
B3	*	-		
T1	*	-	-	
T2	*	-	*	-

Gruppo B1: bianchi del primo schema nutrizionale

Gruppo B2: bianchi del secondo schema nutrizionale

Gruppo B3: bianchi del terzo schema nutrizionale

Gruppo T1: trattati del primo e secondo schema nutrizionale

Gruppo T2: trattati del terzo schema nutrizionale

* differenze significative (P < 0,05)

- differenze non significative

inoltre evidenziato una differenza significativa fra i pesi secchi degli organismi di controllo (207,35 µg) ed i trattati (263,05 µg) alimentati secondo il terzo schema nutrizionale.

Sembra quindi plausibile affermare che nutrire i bianchi solo a partire dalla quarantottesima ora di esposizione ponga questi organismi di controllo in uno stato di carenza alimentare rispetto ai trattati; tale effetto sembra annullarsi quando si applica il secondo schema nutrizionale. Utilizzando lo schema nutrizionale che comporta l'alimentazione sia dei bianchi che dei trattati sin dall'inizio della sperimentazione (3° schema) si generano nuovamente popolazioni statisticamente differenti.

Il confronto fra la media dei pesi secchi dei bianchi del secondo schema nutrizionale (221,30 µg) e quella dei bianchi del terzo schema (207,35 µg) sembra indicare che l'arricchimento alimentare del mezzo vitale degli organismi di controllo possa essere effettuato indifferentemente con l'una o con l'altra metodologia (dose doppia al tempo zero, o dose singola alle ore zero e ventiquattro). Il confronto fra la media dei pesi secchi dei trattati del primo o secondo schema nutrizionale (217,67 µg) e quella dei trattati del terzo schema (263,05 µg) conferma la relazione fra crescenti concentrazioni di cibo presenti nel mezzo vitale e l'incremento ponderale delle dafnie.

DISCUSSIONE

L'obiettivo cui si voleva pervenire attraverso la sperimentazione denominata "test acuto protratto"

era quello di individuare uno o più parametri che potessero indicare non solo l'assenza di fattori letali per gli organismi esposti, ma anche una sorta di stato di benessere degli individui: questo tentativo era legato all'impossibilità di condurre saggi di tossicità cronica routinariamente.

La scelta del peso secco degli individui esposti come indicatore del loro benessere ha richiesto, però, l'adozione di alcuni accorgimenti per pareggiare la potenzialità alimentare delle acque di fiume rispetto a quella dell'acqua utilizzata per condurre le sperimentazioni di controllo.

Stabilito attraverso il secondo schema nutrizionale che la disponibilità di cibo per i bianchi all'inizio della sperimentazione porta a pareggiare le loro opportunità di crescita ponderale rispetto ai trattati, il test acuto protratto è stato successivamente condotto alimentando in prima giornata sia i bianchi che i trattati per rientrare nei canoni della correttezza sperimentale (3° schema nutrizionale).

Quest'ultimo ha però sortito una nuova differenza fra le medie dei pesi secchi, riproponendo la questione in termini diversi: il surplus alimentare comunque presente nelle acque di fiume, soprattutto in quelle inquinate, probabilmente permette ai dafnidi di crescere più di quanto non facciano gli organismi mantenuti in acqua di allevamento.

Per capire se il condurre le prove di controllo utilizzando un'acqua naturale prelevata in un bacino sicuramente non inquinato potrebbe risolvere questo problema, si è tentato un nuovo confronto estraendo dalla serie di dati dei trattati i pesi secchi corrispondenti a corsi d'acqua non inquinati e paragonandoli ai pesi dei bianchi (2° schema + 3° schema).

A tale scopo, sono stati utilizzati i soli pesi secchi degli organismi di saggio cresciuti in acqua di fiumi

risultati storicamente non inquinati secondo i criteri del P.R.R.A.⁽¹⁰⁾ ed a condizione che risultasse presente almeno un caso di nutrizione al tempo zero ed uno alla quarantottesima ora per la stessa stazione di prelievo.

I dati estratti sono riportati in tabella IV, la rappresentazione grafica complessiva in figura 1 mentre l'analisi della varianza dei confronti ortogonali è presentata in tabella V.

Quest'ultima indica che la differenza di peso secco che si registra fra organismi cresciuti in acque non inquinate e quelli cresciuti in acqua di allevamento non è significativa se essi vengono nutriti sin dall'inizio della sperimentazione, mentre anche per gli organismi cresciuti in acqua naturale non inquinata si ha un crollo significativo del peso secco quando il nutrimento viene somministrato solo dopo 48 ore dall'inizio della sperimentazione.

Perciò, sebbene l'analisi della varianza di tabella III abbia evidenziato una differenza significativa fra i pesi secchi ricavati dal terzo schema nutrizionale, il confronto fra i pesi secchi degli organismi cresciuti in

Tabella IV

Pesi secchi in µg di individui nutriti secondo due diversi schemi nutrizionali ed allevati in acqua di fiume non inquinata prelevata in 6 diverse stazioni di campionamento

STAZIONE	NUTRIZIONE a t = 0 h	NUTRIZIONE a t = 48 h
A	263,3	165,4
B	243,3	111,1
C	255,2	113,0
D	253,3-207,7	185,2
E	250,0	124,1-228,0
F	256,7-213,8	62,1

Tabella V

Analisi della varianza dei confronti ortogonali dei pesi secchi di figura 1 (* P < 0,01)

SORGENTI DI VARIAZIONE	Devianze	G.L.	Varianze	F
CONFRONTO FRA SCHEMI NUTRIZIONALI				
1. t = 48 h vs t = 0 h	35,22	1	35,22	16,44*
2. fiume t = 0 h vs bianco t = 0 h	5,38	1	5,38	2,51
ERRORE	62,12	29	2,14	
TOTALE	102,72	31		

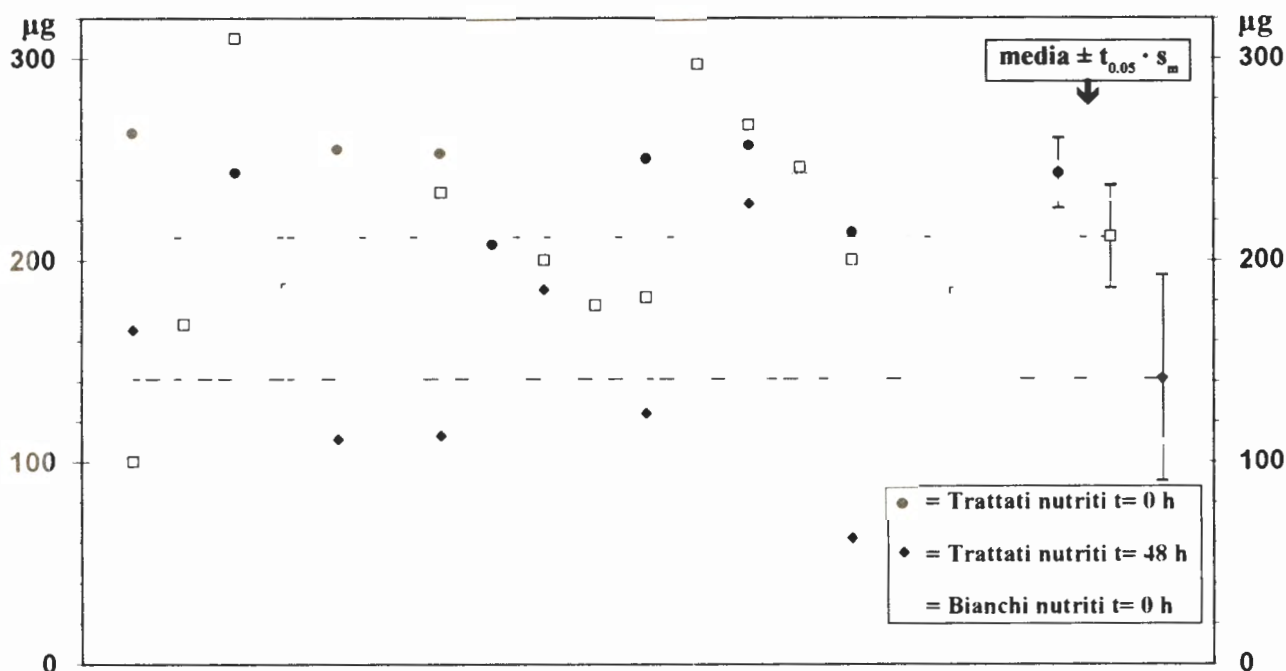


Figura 1: Pesi secchi descritti in tab. IV e dei bianchi del secondo e del terzo schema nutrizionale

acque naturali non inquinate e quelli degli organismi cresciuti in acqua di allevamento (tab. V) sembra dimostrare la validità della procedura che comporta la nutrizione dei bianchi e dei trattati sin dall'inizio della sperimentazione. Il terzo schema nutrizionale appare quindi quello da seguire per l'esecuzione del test acuto protratto applicato alla sorveglianza tossicologica delle acque superficiali perchè pone gli organismi di controllo nelle stesse condizioni in cui si troverebbero se si decidesse di utilizzare un'acqua naturale incontaminata come mezzo d'allevamento.

Nonostante ciò, non va dimenticato che la somministrazione di cibo durante le prove tossicologiche riduce la tossicità di numerose sostanze chimiche⁽¹¹⁾⁽¹²⁾.

Per quanto attiene ai pesi secchi dei trattati nutriti alla quarantottesima ora o nutriti in prima giornata, che presentano una media di 217,67 µg e 263,05 µg rispettivamente, si può supporre che nel primo caso - e probabilmente anche nel secondo - non sia stato raggiunto l'ILL (Incipient Limiting Level), concentrazione di cibo alla quale il tasso di ingestione raggiunge il plateau⁽¹³⁾.

Alla luce delle esperienze fino ad oggi condotte e dei dati di letteratura, però, va segnalato che l'utilizzazione del peso secco come stima del benessere degli

organismi di saggio merita qualche considerazione supplementare: i dafnidi si nutrono filtrando in modo relativamente non selettivo un'ampia gamma di particelle alimentari⁽¹³⁾ ed anche la sostanza organica disciolta può divenire disponibile come fonte addizionale di cibo per i filtratori d'acqua dolce attraverso un meccanismo di adsorbimento sulle particelle minerali⁽¹⁴⁾. L'esperienza in atto, condotta con acque di fiumi risultati particolarmente inquinati e ricchi in sostanza organica, sta mostrando una tendenza alla proporzionalità fra il peso secco degli organismi esposti ed il B.O.D.₅; questo aspetto verrà discusso più approfonditamente in una nota successiva.

Va segnalato, inoltre, che *Daphnia magna* -allevata nelle condizioni sperimentali descritte- mostra al settimo giorno presenza di uova nella camera incubatrice, in particolar modo quando mantenuta nelle acque fluviali.

BODAR et AL.⁽¹⁵⁾, in un'esperienza sulla strategia riproduttiva di *Daphnia magna*, hanno dimostrato che la biomassa di neonati prodotti per femmina subisce un incremento a concentrazioni di tossico inferiori ad un valore limite, al di sopra del quale la biomassa si riduce sensibilmente: questo fenomeno può ricadere nel concetto di "hormesis", definito come "un effetto

stimolatorio determinato da concentrazioni sub-inibitorie di qualunque sostanza tossica nei confronti di qualunque organismo"; l'hormesis è perciò considerata una risposta non specifica di un organismo ai tossici.

CONCLUSIONI

Quando la matrice da saggiare è un'acqua dolce naturale, è necessario che il test acuto protratto fino ai sette giorni di esposizione preveda uno schema nutrizionale secondo il quale trattati e controlli vengano alimentati sin dall'inizio della sperimentazione: la dieta suggerita è quella descritta come terzo schema nutrizionale.

BIBLIOGRAFIA

- 1- REGIONE LOMBARDIA, SETTORE AMBIENTE ED ECOLOGIA - 1992. Piano Regionale di Risanamento delle Acque. Criteri di pianificazione in rapporto alla gestione delle risorse idriche lombarde.
- 2- DORN P.B., RODGERS J.H., JOP K.M., RAJA J.C. & DICKSON K.L. - 1987. Hexavalent chromium as a reference toxicant in effluent toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6: 435-444
- 3- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - 1989. Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants under the Clean Water Act. *Federal Register*, 54: 231: 50216-50224
- 4- VIGANÒ L. - 1989. Test di tossicità su effluenti di scarico con trota e *Daphnia*: confronto dei risultati *Acqua-Aria*, 4: 409-413
- 5- MUNZINGER A. - 1990. Effects of nickel on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to nickel. *Water Research*, 24 (7): 845-852.
- 6- MARCHETTI R. e VIGANÒ L. - 1991. Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna*. Atti della Giornata di Studio "Saggio di tossicità con *Daphnia*". *Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque*, 93: (2): 1-23.
- 7- KNIGHT J.T. & WALLER W.T. - 1987. Incorporating *Daphnia magna* into the seven-day *Ceriodaphnia* effluent toxicity test method. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6: 635-645
- 8- CAMUSSI A., MOLLER F., OTTAVIANO E., SARI GORLA M. - 1986. Metodi statistici per la sperimentazione biologica. Edizioni Zanichelli.
- 9- LISON L. - 1961. Statistica applicata alla biologia sperimentale. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- 10- PROVINCIA DI MILANO, ASSESSORATO ALL'ECOLOGIA - 1989. Indagine sulla qualità delle acque nella provincia di Milano.
- 11- ADAMS W.J. & HEILDOLPH B.B. - 1985. Short-cut chronic toxicity estimates using *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium, ASTM STP 854, R.D. Cardwell, R. Purdy and R.C. Bahner, Eds., pp.87-103.
- 12- TAYLOR M.J. - 1985. Effect of diet on the sensitivity of *Daphnia magna* to linear alkylbenzene sulfonate. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium, ASTM STP 854, R.D. Cardwell, R. Purdy and R.C. Bahner, Eds., pp. 53-72.
- 13- LAMPERT W. - 1987. Feeding and nutrition in *Daphnia*. *Daphnia*, R.H. Peters & R De Bernardi Eds., *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 45: 143-192.
- 14- ARRUDA J.A., MARZOLF G.R. & FAULK R.T. - 1983. The role of suspended sediments in the nutrition of zooplankton in turbid reservoirs. *Ecology*, 64: 1225-1235.
- 15- BODAR C.W.M., LEEUWEN C.J., VOGT P.A. & ZANDEE D.I. - 1988. Effect of cadmium on the reproduction strategy of *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 12: 301-310.