

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Laboratorio di Parassitologia
Reparto Artropodi Vettori e Molesti

ISTISAN 1981 /56

METODO DI ALLEVAMENTO E CONDUZIONE DELLE PROVE
TOSSICOLOGICHE SU Daphnia spp. (CRUSTACEA, CLA-
DOCERA).

R. ROMI , E. SBARDELLA e MAJORI, G.

ROMA, Novembre 1981

50c

RIASSUNTO:

Nell'ambito dei metodi biologici utilizzati per la ricerca tossicologica e per la valutazione dei limiti di accettabilità di sostanze chimiche destinate ad essere immesse nei vari ecosistemi, è stata messa a punto una tecnica di allevamento di microcrostacei del genere Daphnia in grado di assicurare una elevata produzione di organismi in condizioni standard.

Nel presente rapporto vengono inoltre riportate le metodiche per la conduzione di prove di tossicità acuta, sub-acuta e cronica.

INTRODUZIONE

Nella strategia di ricerca tossicologica per la valutazione della sicurezza ed accettabilità di una nuova sostanza chimica, o per evidenziare la presenza nei vari ecosistemi, oltre che dei principi attivi, anche dei derivati o metaboliti degli stessi, i metodi biologici costituiscono un mezzo insostituibile per il conseguimento dei fini preposti.

L'analisi biologica necessita però di una perfetta standardizzazione dei "tests", in quanto vari fattori possono modificare la sensibilità degli organismi impiegati, sia nella fase di allevamento che di conduzione delle prove.

Tra i vari organismi utilizzati nei saggi di tossicità acuta, subacuta e cronica, i micro-crostacei del genere Daphnia presentano notevoli vantaggi rispetto agli altri, soprattutto in relazione all'uniformità genetica della coltura, grazie alla riproduzione partenogenetica. Attualmente anche in sede CEE sono in fase di avanzata discussione e di formalizzazione metodiche basate sull'impiego di Daphnia spp., atte a svelare concentrazioni assai modeste di contaminanti ambientali.

Numerosi sono i metodi di allevamento riportati in letteratura (Banta, 1921; Watanabe, 1955; Sasa, 1960; Dewey, 1964; Frear, 1967; Murphy, 1970; Kersting, 1978; Ten Berge, 1978), ma le varie tecniche descritte sono molto diverse tra loro. Sono stati adottati, infatti, i tipi più diversi di acque, di contenitori, di alimentazione, ecc., con risultati in pratica molto spesso insoddisfacenti.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di mettere a punto una tecnica di allevamento molto semplice ed in grado di fornire una elevata produzione di organismi di età e dimensioni note, con una economia notevole di lavoro e spazio.

Sono state inoltre messe a punto procedure standard per la conduzione di prove di tossicità acuta e cronica.

1. IL GENERE Daphnia

Per la conduzione delle prove tossicologiche si possono utilizzare vari ceppi di Daphnia ottenuti da allevamenti condotti presso laboratori specializzati o raccolti in natura da focolai sicuramente non contaminati. Si ritiene quindi opportuno riportare brevi cenni sulla anatomia e biologia di Daphnia spp. ed i caratteri distintivi della famiglia, del genere e delle due specie più diffuse.

1.1. Daphnia spp.: cenni di anatomia e biologia.

Il genere Daphnia è formato da piccoli crostacei acquatici generalmente conosciuti come "pulci d'acqua", appartenenti all'ordine Cladocera ed alla famiglia Daphnidae.

In natura, durante la maggior parte dell'anno, le femmine producono uova che generano solamente altre femmine partenogenetiche; queste a loro volta danno origine ad altra prole in una settimana circa.

La giovane dafnia neonata (nauplio) è appena visibile a occhio nudo, sia per le sue minute dimensioni sia perché diafana. Essa deve compiere 4 mute prima di giungere alla maturità, processo che si compie in 7-8 giorni circa, a condizioni di allevamento ottimali.

La prima muta avviene generalmente nel corso delle prime 24 ore di vita e la seconda entro le 48. I naupli di 36-48 ore misurano già un mm, e sono ben visibili, anche perché assumono una colorazione più decisa.

La dafnia continua ad accrescersi compiendo altre due mute entro 7 giorni, dopodiché è pronta per la prima riproduzione. Dopo la prima volta essa si riproduce con regolarità a giorni alterni per le due settimane seguenti. Alla quarta settimana di vita la riproduzione non è più regolare ed il numero dei naupli comincia a diminuire fino a cessare del tutto.

L'accrescimento continua attraverso ulteriori mute (che possono essere anche più di 20) ed il crostaceo può raggiungere, nel caso di Daphnia magna, anche 5 mm di lunghezza. La regolarità nella produzione dei naupli ed il loro numero dipendono dalle condizioni ambientali: disponibilità di cibo, temperatura dell'acqua, sovrappopolamento, ecc. In condizioni ottimali (21° C, alimentazione mista, 100 ml d'acqua per individuo) una singola dafnia produce nelle prime due settimane di maturità circa 120 naupli, cioè una media di 8 individui per giorno, ovvero 16 per ogni riproduzione. In realtà questo numero medio è, per la prima generazione, più basso (8-10), mentre aumenta gradatamente fino a raggiungere il valore massimo al termine della prima settimana (anche più di 20), per poi ridiscendere rapidamente nel corso della seconda. In condizioni ottimali non vive più di 6-8 settimane.

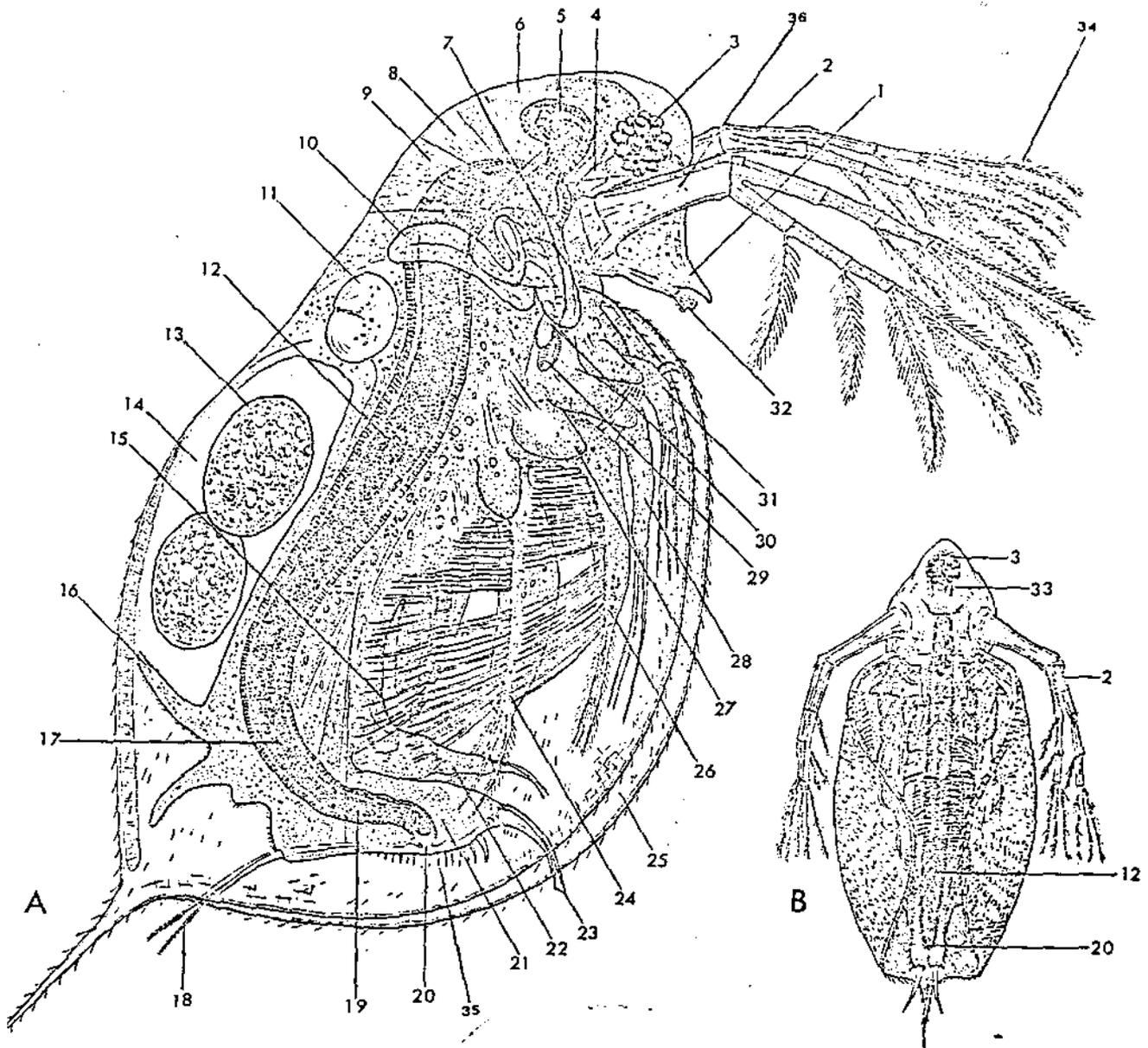
La partenogenesi continua fin quando le condizioni non divengono sfavorevoli per le cause già citate (carenza di cibo, accumulo di tossine, sovrappopolamento, ecc.). In queste condizioni difficili la produzione di uova partenogenetiche diminuisce e da queste si sviluppano anche alcuni maschi (anzichè tutte femmine). Nello stesso periodo le femmine adulte producono uova, più scure delle altre, che hanno bisogno di essere fecondate. Alla muta seguente queste uova ed i carapaci, insieme ai quali si sono liberate come unità (efippi), giacciono inattive finchè le condizioni ambientali non ridiventino favorevoli per la ripresa dello sviluppo.

I maschi aumentano od appaiono nella popolazione soprattutto in condizioni di sovrappopolamento, mentre la carenza di cibo è ritenuta la condizione più importante per stimolare la produzione di uova asessuate.

La bassa temperatura invernale, invece, induce la diapausa, stato di ridotta attività biologica tipico di molti artropodi.

Femmine partenogenetiche, maschi, femmine normali, uova sessuate ed asessuate possono coesistere simultaneamente, ma

Fig. 1 Anatomia della Daphnia.



- | | | |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
| 1. Rostro o becco | 13. Uovo | 25. Carapace |
| 2. Exopodite dell'antenna | 14. Camera genitale | 26. Appendice III |
| 3. Occhio composto | 15. Tetto del canale alim. | 27. Metepipodite |
| 4. Ganglio sopraesofageo | 16. Processo medio-dors. | 28. Appendice II |
| 5. Intestino cieco | 17. Int. medio posteriore | 29. Maxillule |
| 6. Muscolo adduttore ant. 1 | 18. Setola caudale | 30. Mandibole |
| 7. Esofago | 19. Int. terminale | 31. Appendice I |
| 8. Muscolo adduttore ant. 2 | 20. Ano | 32. Antennulae |
| 9. Muscolo elevatore ant. | 21. Post addome | 33. Muscolo occhio |
| 10. Ghiandola del guscio | 22. Appendice V del tronco | 34. Setae |
| 11. Cuore | 23. Furca caudale | 35. Pettine |
| 12. Intestino | 24. Appendice IV | 36. Fornice |

Da Bioreview Sheet, Carolina Biological Supply Company, 1969.

in condizioni favorevoli controllate la riproduzione è in genere limitata alle sole femmine partenogenetiche.

1.2. Caratteri distintivi della famiglia, del genere e delle due specie più diffuse:

Famiglia Daphnidae Straus:

- Antennule attaccate alla faccia ventrale del capo
- Antennule delle femmine corte e spesso rudimentali
- Ramo dorsale dell'antenna diviso in 4 branche, ramo ventrale diviso in 3 branche
- Formula delle setae $\frac{0013}{133}$
- 5 paia di appendici di cui le prime 2 prensili e prive di lamelle branchiali. Il quinto paio munito di un grosso uncino ricurvo. Intestino con due ciechi epatici. Occhio largo, ocello piccolo o rudimentale, raramente assente.

Genere Daphnia Müller 1785:

- Rostro presente
- Sinus cervicale assente
- Cresta sulla parte dorsale del capo
- Valve reticolate, a disegno romboidale, con spina terminale
- Forma ovale od ellittica; rostro marcato nelle femmine ed assente nei maschi, muniti invece di antennule sviluppate.
- Post-addome munito di pettine o dentato.

Daphnia magna Straus 1820:

- Post-addome munito di due pettini ben distinti, di cui quello distale è munito di più di 12 denti
- Fornice e fornice secondario ben sviluppati
- Forma ovale e corpo spesso; lunghezza fino a 5 mm la femmina e 2 mm o poco più il maschio. Efippio con due uova poste trasversalmente.

Daphnia pulex de Geer 1778:

- Fornice secondario rudimentale o molto piccolo
- Denti del pettine distale normalmente meno di 10
- Ocello presente ed antennule molto piccole
- Corpo tozzo e robusto generalmente non trasparente. Lunghezza della femmina circa 2,5 mm. Efippio con due uova poste verticalmente.

Daphnia pulex include un gran numero di varietà, molte delle quali sono considerate come specie a sé, anche se spesso si tende a considerare come pulex tutti gli appartenenti al genere Daphnia, dotati di corpo tozzo e non trasparente, e con il pettine munito di uncini.

1.3. Il dimorfismo sessuale:

Il dimorfismo sessuale in Daphnia magna è molto accentuato. Le femmine ed i maschi adulti differiscono fra loro per molti caratteri, che vengono acquisiti nel corso dello sviluppo post-embrionale durante le prime 4 mute. I principali sono:

Femmine: maggiore taglia corporea (4 mm di lunghezza);

- corpo arrotondato con rostro ben marcato;
- antennule molto piccole poste dietro il rostro;
- margini ventrali del carapace ovali, regolari e ravvicinati tra loro;
- margine dorsale del post-addome con profonda incisione dietro l'ano che divide la doppia fila di 13-17 denti anali in due parti: una anale vera e propria (9-11 denti) ed una post-anale (4-6 denti).

Maschi: minore taglia corporea (2-3 mm di lunghezza);

- capo di forma diversa con occhio più grande e sporgente;
- assenza del rostro;
- antennule grandi e mobili, terminanti con un lungo flagello plumoso;
- margini ventrali del carapace appiattiti, ricoperti da una fitta massa di lunghe setole, e divaricati in modo da lasciar sporgere il primo paio di piedi toracici muniti di uncini e flagelli.

2. CONDIZIONI D'ALLEVAMENTO

2.1. Temperatura ed illuminazione: l'allevamento è stato condotto ad una temperatura di 21° C; il fotoperiodo è stato di 12 ore.

2.2. Camere d'allevamento: per l'allevamento sono state utilizzate delle vasche in vetro tipo acquario, delle dimensioni di 30x50x30 cm, con pareti spesse circa 5 mm. I 45 litri di volume sono stati normalmente sfruttati per i 3/4. Per contenere individui selezionati, di età compresa fra 1-8 giorni, sono state utilizzate invece delle vasche più piccole,

di dimensioni 20x30x15.

Per la riproduzione controllata vengono utilizzate le apposite camere a forma di imbuto (pag. 14) o dei grossi recipienti cilindrici tipo cristallizzatori da 3-5 l, sempre in vetro. Allo scopo di non sconvolgere il delicato equilibrio creatosi in ognuna delle vasche, queste sono state svuotate e pulite il meno possibile, cioè solamente quando alcuni microrganismi, quali funghi ed alghe, vi si sono depositati aderendo alle pareti. Inoltre sono state lavate con acido ogni 6 mesi, per eliminare i depositi di calcio e i detriti sul fondo.

2.3. L'acqua:

In letteratura si trovano molti esempi di acque "standard" costituite da soluzioni di sali ed elementi nutritivi ma la loro complessa preparazione ne rende difficoltosa l'utilizzazione in un allevamento di medie dimensioni. E' possibile utilizzare un'acqua naturale purchè le caratteristiche chimico-fisiche di questa non siano molto differenti dalle seguenti:

- Conducibilità a 18° C (K_{18})	7.19 μ S
- Durezza	36° F
- Alcalinità (HCl N/10.1)	60.8
- PH	7.8

L'acqua deve essere libera da cloro addizionato; a questo scopo è sufficiente utilizzarla 24 o 48 ore dopo la raccolta.

Per l'impianto di allevamenti con ceppi di Daphnia raccolti in natura, è molto importante cercare di porre i crostacei in un mezzo il più simile possibile a quello di provenienza, in quanto un brusco cambiamento del suddetto causa un rallentamento dello sviluppo; per questo è necessario seguire un graduale processo di diluizione dell'acqua originale, attraverso le seguenti fasi:

a) distribuzione degli individui raccolti in varie vasche contenenti l'acqua originale e mantenimento per almeno 24 ore;

b) graduale e progressiva diluizione dell'acqua originale con quella nuova;

c) completa sostituzione del mezzo originale nell'arco di una settimana.

Le camere d'allevamento non richiedono un ricambio totale e costante dell'acqua. E' infatti sufficiente limitarsi ad aggiungere alle vasche quella parte di acqua evaporata.

L'aerazione dell'acqua mediante aeratori da acquario non è indispensabile per il buon andamento dell'allevamento, ma può comunque dimostrarsi utile, sia per annullare eventuali effetti tossici da parte della CO₂ liberata dai fermenti utilizzati come nutrimento, sia per rimuovere meccanicamente lo strato superficiale di polvere e microrganismi.

2.4. L'alimentazione:

In base alle prove effettuate è risultato che un tipo di alimentazione mista, ottenuto integrando quella primaria a base di lievito con una accessoria costituita da alghe monocellulari, dà i migliori risultati. Infatti lievito ed alghe sia usati separatamente sia combinati, si sono dimostrati superiori a tutti gli altri tipi di alimentazione studiati per gli allevamenti di Daphnia riportati in letteratura. Soprattutto la combinazione dei due alimenti ha portato ad un forte aumento della produzione di prole rispetto a quella riscontrata nelle colture ad alimentazione singola.

Il lievito è del tipo comunemente usato per cucina, costituito da fermenti vivi, in vendita sfuso od in confezioni pronte. L'uso delle confezioni già pronte evita l'inquinamento da parte di muffe, cosa assai frequente in quello sfuso quando la conservazione superi i pochi giorni.

La sospensione nutritiva viene preparata alla concen-

trazione dell'1% in acqua distillata; essa può essere conservata alla temperatura di +5° C per circa una settimana. Alla conta delle cellule una sospensione di questo tipo contiene circa 801×10^5 cellule/cc e viene distribuita nelle vasche in quantità di 1 ml per ogni litro d'acqua.

Questo dato è però solamente indicativo in quanto è necessario tenere conto delle dimensioni delle vasche e della densità della popolazione di Daphnia nelle stesse.

Infatti mentre in una vasca grande (20-40 l) e con un'ampia superficie è sempre possibile introdurre la relativa quantità di lievito, in un recipiente molto piccolo o dalla ridotta superficie si possono avere dei fenomeni tossici legati alla CO₂ liberata dalla cellule in fermentazione. Inoltre quando la popolazione è in fase di crescita ed il rapporto acqua/N. dafnie è ancora basso, sarà bene immettere un quantitativo inferiore alla dose normale. A questo proposito è comunque consigliabile di controllare, prima di ogni ulteriore distribuzione, che l'acqua delle vasche sia perfettamente limpida, cioè che le dafnie abbiamo utilizzato tutto il lievito a disposizione. L'acqua torbida indica infatti la presenza residua di cellule dei fermenti. Quando invece la densità delle dafnie è elevata si può superare il limite di 1 ml/l, soprattutto nelle vasche di media e grande superficie.

Riguardo all'alimentazione dei naupli è consigliabile una dieta primaria a base di alghe, integrata con basse dosi di lievito o, nel caso non si disponesse di alghe, l'alimentazione con solo lievito aumentando gradatamente la dose fino a raggiungere il ml/l al 4°-5° giorno, in quanto i naupli sono molto più sensibili degli adulti agli effetti tossici della CO₂.

Per quanto riguarda le alghe in letteratura sono riportati molti dati circa l'utilizzazione come fonte di alimentazione per Daphnia dei generi Chlorella, Scenedesmus e Selenastrum (Watanabe, 1955; Sasa, 1960; Ten Berge, 1978). Per il nostro allevamento è stata utilizzata una coltura di

Selenastrum capricornutum. Fra le varie soluzioni per coltura algale riportate in letteratura, particolarmente efficace di semplice preparazione è risultata la soluzione "Bristol" (Kantz, 1969), che si ottiene nel seguente modo:

I) prelevare 10 cc da ognuna delle seguenti soluzioni:

NaNO ₃	(2,5 g/100 ml)
MgSO ₄ -H ₂ O	(0,42 g/100 ml)
CaCl ₂	(0,188 g/100 ml)
KH ₂ PO ₄	(0,175 g/100 ml)
Na ₂ HPO ₄	(0,76 g/100 ml)
NaCl	(0,25 g/100 ml)

II) prelevare 1 cc da ognuna delle seguenti soluzioni:

Na ₂ EDTA	(1,25 g/25 ml)
KOH	(3,1 g/100 ml)
FeCl ₃ -6H ₂ O	(0,484 g/100 ml)
H ₂ SO ₄	(0,1 g/100 ml)
H ₃ BO ₃	(1,142 g/100 ml)
ZnCl ₂	(0,42 g/100 ml)
MnCl ₂ -H ₂ O	(0,144 g/100 ml)
Na ₂ MoO ₄ -H ₂ O	(0,119 g/100 ml)
CuCl ₂ -2H ₂ O	(1,07 g/100 ml)
Tiamina	(250 mg/25 ml)
Biotina	(25 mg/50 ml)
Cianocobalamina	(25 mg/50 ml)

III) Portare tutto ad un litro con acqua distillata; il PH finale deve essere di 6.6; la soluzione pronta può essere conservata in frigo anche per diverse settimane.

Le alghe vanno preparate settimanalmente ed utilizzate dopo il 10° giorno, cioè dopo il raggiungimento della densità ottimale (25° C, fotoperiodo n. 12 ore).

Al momento della preparazione la sospensione è di un colore verde molto tenue, che scurisce gradatamente col passare dei giorni. In seguito tende ad ingiallire e se ne sconsiglia l'uso, in quanto potrebbe dare luogo ad effetti tossici.

Per ottenere un litro di sospensione algale unire:

500 ml di soluzione Bristol.
400 ml di acqua distillata
100 ml di alghe dello stock precedente

Questa sospensione viene mantenuta in beute da 2 l, chiuse con un tappo di cotone e va aerata in continuazione mediante un aeratore da acquario. Le beute vanno agitate quotidianamente per evitare che le alghe si depositino sul fondo. Le alghe vanno distribuite nelle vasche due volte a settimana nella quantità di 20-25 ml per litro d'acqua, per sospensioni algali di 15×10^5 cellule/ml, od in proporzione a seconda della concentrazione ottenuta.

E' possibile inoltre conservare parte della coltura di Selenastrum seminandola in Agar secondo la procedura seguente: il mezzo di coltura consiste nelle soluzioni A e B, mescolate in parti uguali:

Sol. A) 1 litro di H₂O distillata
0,4 g MgSO₄
1,5 g NH₄NO₃
0,4 g citrato di sodio
3 gocce di FeSO₄ soluzione satura
20 g di glucosio

Sol. B) 1 litro H₂O distillata
14,528 g KH₂PO₄
4,646 g K₂HPO₄

Alle due soluzioni unite in un pallone di vetro vanno aggiunti 30 g di Agar, che vanno quindi sciolti a bagnomaria; la soluzione va filtrata su garza. L'Agar si distribuisce in provettoni da 60 ml in quantità di circa 15 cc per tubo, ponendo poi il tutto in autoclave per 20 minuti a 0,75 atmosfere.

Dopo la sterilizzazione si fa solidificare l'Agar a becco di clarino nelle provette e si seminano le alghe con l'

ansa di platino. Le colture vengono conservate alla temperatura dell'allevamento (21° C), evitando l'esposizione diretta alla luce solare.

3. CONDUZIONE DELL'ALLEVAMENTO

3.1. Manutenzione generale:

- Controllo della densità delle dafnie nelle vasche, con eventuale redistribuzione degli organismi;
- Misurazione del PH;
- Rimozione per agitazione o prelievo superficiale dell'eventuale pellicola presente sulla superficie dell'acqua;
- Eventuale aggiunta d'acqua nelle vasche;
- Distribuzione del nutrimento;
- Eventuale preparazione del lievito e/o delle alghe.

3.2. Mantenimento della coltura:

Oltre alle vasche di dimensioni maggiori, necessarie per l'allevamento vero e proprio dove coesistono crostacei di tutte le taglie ed età, è necessario avere a disposizione una serie di vasche più piccole contenenti individui di età conosciuta e taglia uniforme, da usare per le eventuali prove tossicologiche. A questo scopo bisogna raccogliere giornalmente una quantità appropriata di naupli e porli in una o più vaschette numerate. Nel giro di 8 giorni si avranno una serie di vasche contenenti individui separati, che vanno da quelli di 12 ore agli adulti pronti per la riproduzione. Parte di questi ultimi verranno utilizzati per la riproduzione di altri naupli, secondo le seguenti modalità: il richiesto numero di adulti, nell'interno dei quali siano già visibili gli embrioni dei futuri naupli, viene posto dentro cristallizzatori da 2-4 litri, in modo da ottenere un rapporto acqua/N. dafnie di 100 cc/1, ed alimentati con il

lievito. Dopo 24 o 48 ore sarà possibile raccogliere i nuovi naupli mediante filtrazione dell'acqua. A questo proposito sono riportate le dimensioni dei filtri più comunemente usati per D. magna, in materiale plastico a maglia quadrata, indicando in micron il lato delle singole maglie:

- 800 μ trattiene solo gli adulti di oltre 2 settimane
- 650 μ trattiene tutti gli adulti
- 520 μ lascia passare i naupli fino a 2-3 giorni
- 420 μ lascia passare solamente i naupli di 12-24 ore
- 200 μ trattiene tutte le dafnie lasciando passare l'acqua con i sedimenti presenti.

Per accelerare le operazioni di divisione e raccolta dei naupli è stata modificata una particolare camera d'allevamento, descritta da Dewey, 1964, già predisposta per la separazione dei naupli dagli adulti: essa è costituita da un contenitore di vetro che termina con un rubinetto per regolare il deflusso dell'acqua. E' stata realizzata con un imbuto della capacità di circa 1 litro e mezzo, alla fine del quale è montato un rubinetto, sempre in vetro, tramite tubi di gomma di diverso diametro ed una fascetta stringitubo. Nell'interno, all'altezza della strozzatura, è posto un filtro che trattiene gli adulti e lascia passare solo i naupli, ottenuto montando un dischetto di rete metallica in ottone su un tappo privato del fondo, e che entri a pressione nel collo dell'imbuto. (fig. 2).

Per raccogliere i piccoli si procede nel seguente modo:

a) coprire l'apertura superiore dell'imbuto con un disco di cartone di apposite dimensioni;

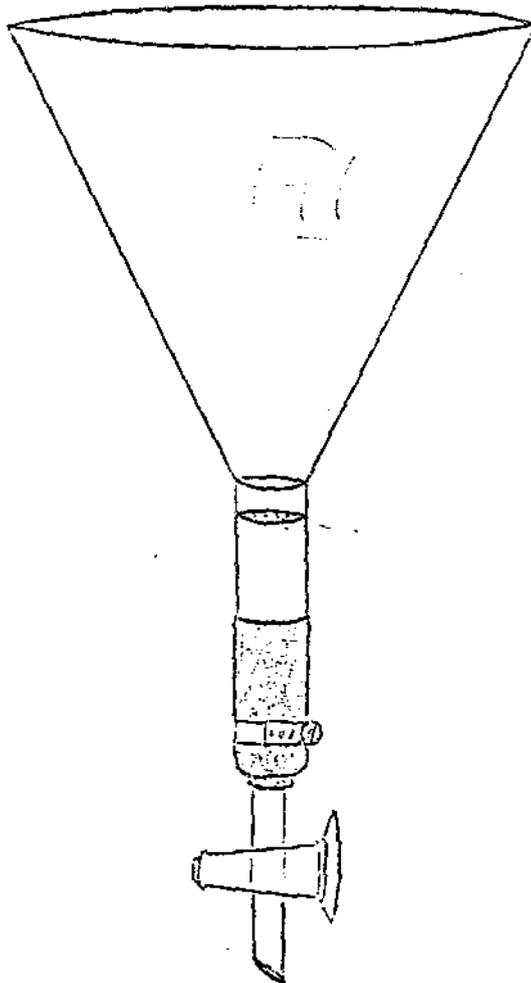
b) avvolgere l'imbuto in un panno nero sagomato che non lasci passare la luce, fino all'altezza del filtro e fissarlo con un legaccio;

c) illuminare con una lampada portatile di discreta potenza la parte dell'imbuto rimasta scoperta per attirare i naupli al di sotto del filtro;

d) attendere circa 15' e poi aprire il rubinetto, facendo scorrere l'acqua fino a che i piccoli non siano tutti passati nell'apposito recipiente di raccolta.

I naupli raccolti vengono posti a gruppi di 50-100 in vaschette da 3 litri, dove possono rimanere per le prime 72 ore. In seguito vengono posti nei contenitori più grandi già descritti, da 5 litri, con un rapporto acqua/N. dafnie almeno di 50 cc/1.

Fig. 2



4. UN SEMPLICE METODO PER LA CONDUZIONE DI PROVE TOSSICOLOGICHE

Premessa

Il metodo descritto di seguito risultato da una lunga serie di sperimentazioni, ha lo scopo di fornire utili indicazioni in materia, in attesa della definizione di metodi standard. Questo paragrafo ha dunque per oggetto la descrizione di un metodo che permetta la determinazione della qualità di un'acqua, evidenziando la presenza di eventuali sostanze tossiche, oppure di saggiare direttamente un prodotto specifico, valutandone gli effetti immediati (tossicità acuta) od a lungo termine (tossicità cronica) su Daphnia.

Per quanto riguarda la tossicità acuta il principio è quello di determinare la concentrazione che, alle condizioni descritte, porta a morte od immobilizza in 24 o 48 ore il 50% delle dafnie usate per l'esperimento, dove si intende per "immobilizzazione" la inibizione della capacità natatoria delle stesse, durante un periodo di 15", dopo agitazione del contenitore in cui si trovano.

Per la determinazione degli effetti cronici, invece, è possibile considerare parametri diversi, quali l'influenza che il prodotto può avere sulla regolarità delle mute, sulla maturazione sessuale e sulla capacità riproduttiva di Daphnia.

4.1. Organismi per il test:

- a) naupli di 12 ore (più di 6 e meno di 24).
- b) adulti pronti per la prima riproduzione, cioè dopo aver effettuato la 4^a muta e raggiunta la maturità sessuale (circa 7-8 giorni).

4.2. Acqua di diluizione:

La più semplice delle Standard Reference Water (SRW) è riportata di seguito (EEC directive, 1980):

I) Soluzione madre:

- cloruro di calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 11,76 g
sciogliere in acqua distillata e portare ad 1 l
- solfato di magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 4,93 g
stessa procedura
- bicarbonato di sodio (NaHCO_3) 2,59 g
stessa procedura
- cloruro di potassio (KCl) 0,23 g
stessa procedura

II) SRW:

Mescolare 25 ml di ognuna delle 4 precedenti soluzioni e portare ad 1 litro con acqua distillata. Aerare con aria gorgogliante. Il PH finale è 7.9 (\pm 0.3).

4.3. Condizioni per condurre il test:

- la temperatura alla quale effettuare il test può essere compresa tra 18° e 22° C, ma per ogni singolo test deve rimanere praticamente costante (\pm 1).
- l'illuminazione è facoltativa nelle prove di tossicità acuta (anche l'oscurità completa è accettabile), mentre deve essere regolata ad intervalli di 12 ore durante le prove di tossicità cronica.

4.4. Contenitori:

Cristallizzatori e beakers esclusivamente in vetro.

4.5. Alimentazione:

- nessuna per la prova di tossicità acuta
- giornaliera per le altre

4.6. Durata del test:

- due giorni (con controlli a 24 e 48 h) per la tossicità acuta
- da una a più settimane per le altre

4.7. Soluzioni per il test:

Tutte le concentrazioni vanno preparate immediatamente prima della prova, utilizzando possibilmente come mezzo di diluizione la stessa acqua adottata per il test. Nel caso in cui, per aumentare la solubilità in acqua del prodotto da saggiare, sia stato necessario usare una sostanza ausiliaria, questa andrà aggiunta anche nei controlli.

4.8. Metodo - prove di tossicità acuta e cronica:

- adulti: 10 individui in cristallizzatori da 300 cc (Ø 10 cm) contenenti 200 cc d'acqua; allestire 4 repliche per ogni concentrazione diversa da saggiare, più 4 di controllo.
- piccoli: 10 individui in beakers da 200 cc (Ø 5 cm) con 150 cc d'acqua; stessa procedura.

Ai fini della validità del test la mortalità nel controllo non deve superare il 20%; la mortalità osservata deve inoltre essere corretta secondo la seguente formula di Abbott:

$$\frac{\text{mortalità osservata} - \text{mortalità controllo}}{100 - \text{mortalità controllo}} \times 100$$

BIBLIOGRAFIA :

- 1) Adema D.M.M. (1978)
Daphnia magna as a test animal in acute and chronic tests.
Hydrobiology, 59, 113-120.
- 2) Banta A.M. (1937)
Population density as related to sex and to evolution in
Cladocera. Amer. Nat., 71, 34-49.
- 3) Banta A.M. (1939)
Studies on the physiology, genetics and evolution of some
Cladocera. Carnegie Inst. Wash., Paper N. 39, 1-285.
- 4) Banta A.M. (1921)
A convenient culture medium for Daphnids.
Science, 53, 557-559.
- 5) Berg K. (1934)
Cyclic reproduction, sex determination and depression in
Cladocera. Cambridge Phil. Soc. Biol. Rev., 9, 139-174.
- 6) Crosby P.G., Tucker R.K., Aharonson N. (1966)
The detection of acute toxicity with Daphnia magna.
Food, Cosm., Toxicol., 4, 503-514.
- 7) D'Agostino A.S., Provasoli L. (1970)
Dixenic culture of Daphnia magna Straus.
Biol. Bull., 139, 485-494.
- 8) Dewey J.E., Parker B.L. (1964)
Mass rearing of Daphnia magna for insecticide bioassay.
J. Econ. Entomol., 57, 821-825.
- 9) EEC directive 79/831. Annex V.
Methods for the determination of ecotoxicity.
5.1.2. Acute toxicity for Daphnia. ENV/920/80.

- 10) Frank P.W., Ball C.O., Kelly R.W. (1957)
Vital statistic of laboratory cultures of *Daphnia pulex*
De Geer as related to density. *Physiol. Zool.*, 30, 287-305.
- 11) Frear D.E.M., Boyd D.E. (1967)
Use of *Daphnia magna* for the microbioassay of pesticides.
I. Development of standardized techniques fo rearing *Daphnia*
and preparation of dosage mortality curve for pesticides.
J. Econ. Entomol., 50, 1228-1236.
- 12) Freeman L. (1953)
A standard method for determining toxicity of pure compounds
to fish. *Sewage and Ind. Wastes*, 25, 845-848.
- 13) Freeman L. (1953)
Toxicity of combinations of certain inorganic compounds to
Daphnia magna Straus. *Sewage and Ind. Wastes*, 25, 1191-1195.
- 14) Kantz T., Bold H.C. (1969)
Univ. Texas, publication n. 6924.
- 15) Kersting K. (1978)
Some features of feedeing, respiration and energy of *Daphnia*
magna. *Hydrobiol.*, 59, 113-120.
- 16) Kersting K. (1978)
The growth efficiency of *Daphnia magna*. I. Effect of the
food concentration. *Hidrobiol. Bull.*, (in stampa)
- 17) Kohn G.H. (1980)
Bioassay as monitoring tool.
Residue Reviews, 75.
- 18) Mc Arthur J.W., Boillie W.H.T. (1929)
Metabolic activity and duration of life. I. Influence of
temperature on longevity in *Daphnia magna*.
J. Exper. Zool., 53, 221-242.

- 19) Murphy J.S. (1970)
A general method for the monoxenic cultivation of the Daphnidae. Biol. Bull., 139, 321-322.
- 20) Pratt D.M. (1943)
Analysis of population development in Daphnids at different temperatures. Biol. Bull., 85, 116-140.
- 21) Sasa T., Kunieda R., Tamiya M. (1960)
Growing Daphnia with Chlorella.
J. Gen. Appl. Microbiol., 1, 137-141.
- 22) Stross R.G., Hill J.C. (1965)
Diapause induction in Daphnids requires two stimuli.
Science, 150, 1462-1464.
- 23) Ten Berge W.F. (1978)
Breeding Daphnia magna.
Hydrobiologia, 59, 121-123.
- 24) Treillard M. (1924)
Sur l'elevage en culture pure d'un crustacè cladocère,
Daphnia magna. C.R. Sèanc. Acad. Sci., Paris, 179, 1090-1092.
- 25) Watanabe A., Ito R., Sasa T. (1955)
Micro-algae as a source of nutrients for Daphnids.
J. Gen. Appl. Microbiol., 1, 137-141.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei rapporti ISTISAN è dei singoli autori*

*La riproduzione parziale o totale dei "Rapporti ISTISAN"
deve essere preventivamente autorizzata dai
competenti Direttori di Laboratorio o Servizio*

*Stampato dal Servizio Documentazione
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - Roma*

DICEMBRE 1981