

TEST CRONICI DI TOSSICITA' CON *DAPHNIA MAGNA* SU SEDIMENTI FLUVIALI. Considerazioni sulla possibilità di confronto di due metodi biologici

N. De Marco*, E. Barabas*, M. Lucchese*, R. Loro** e M. Zanetti**

*Presidio Multizonale di Prevenzione, USSL 11 - Pordenone

**Bioprogram s.c.r.l. - Oderzo

Riassunto

Sono stati saggiati 13 sedimenti fluviali derivanti dai bacini del Sile e del Livenza (Veneto/Friuli-Venezia Giulia) con *Daphnia magna* mediante test acuti e test a lungo termine. I sedimenti sono stati caratterizzati per il contenuto organico e il contenuto di alcuni metalli. I corsi d'acqua da cui i sedimenti provengono sono stati monitorati attraverso Indici Biotici (E.B.I. e CB₂) nello stesso periodo in cui sono stati prelevati i campioni per le analisi ecotossicologiche. I risultati ottenuti hanno permesso di trovare delle correlazioni fra due metodi biologici applicati per la valutazione dello stato di qualità delle acque superficiali.

Summary

Thirteen river sediments from Sile's and Livenza's basins (Regione Veneto/Friuli-Venezia Giulia) have been submitted to acute and long term *Daphnia magna* tests. Sediments were characterized for their organic matter and metallic content. The river were monitored by means of E.B.I. and CB₂ Biotic Index at the time of sampling for ecotoxicological analysis. Results made possible a correlation between the biological tests (E.B.I. and CB₂) and *Daphnia magna* tests.

8.1 Introduzione

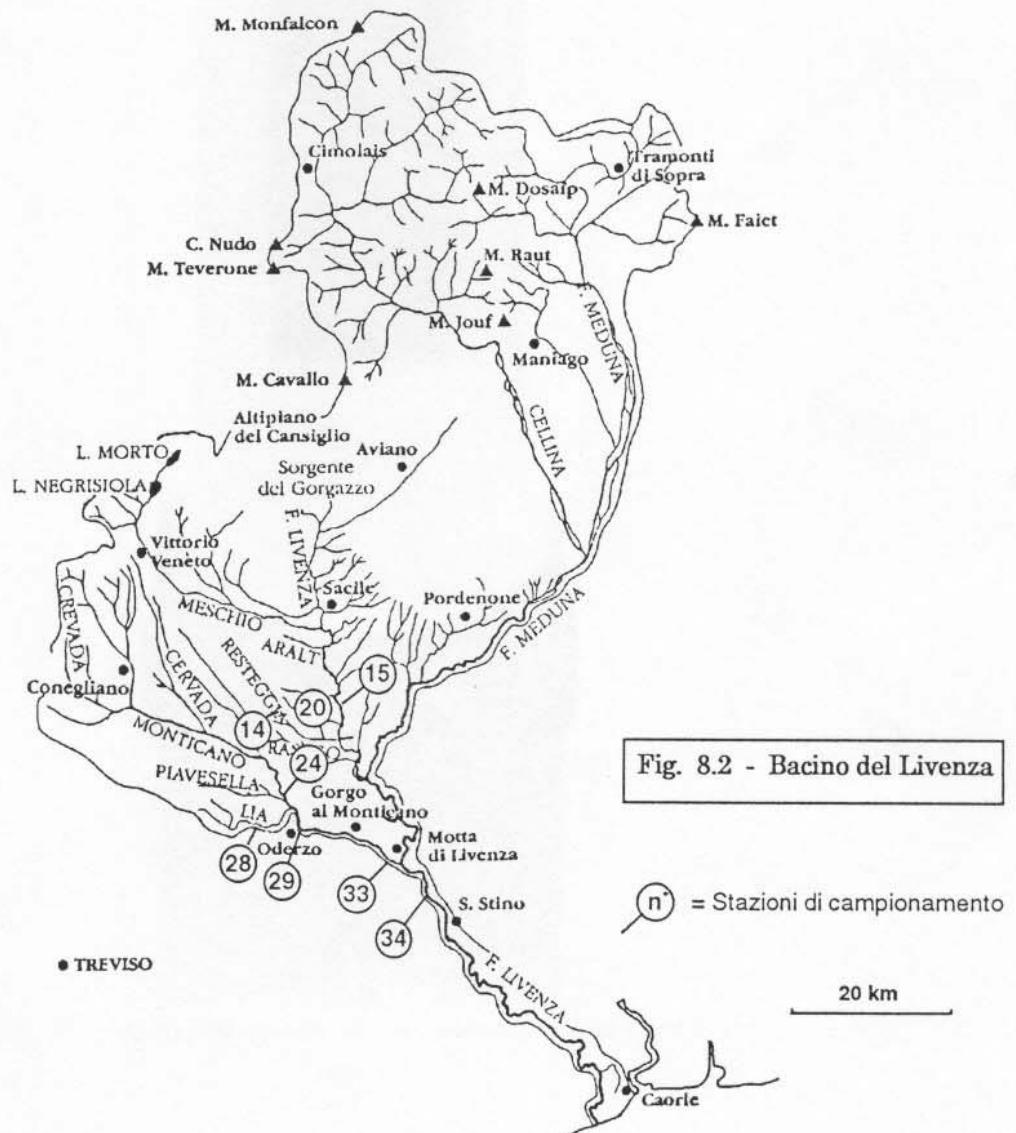
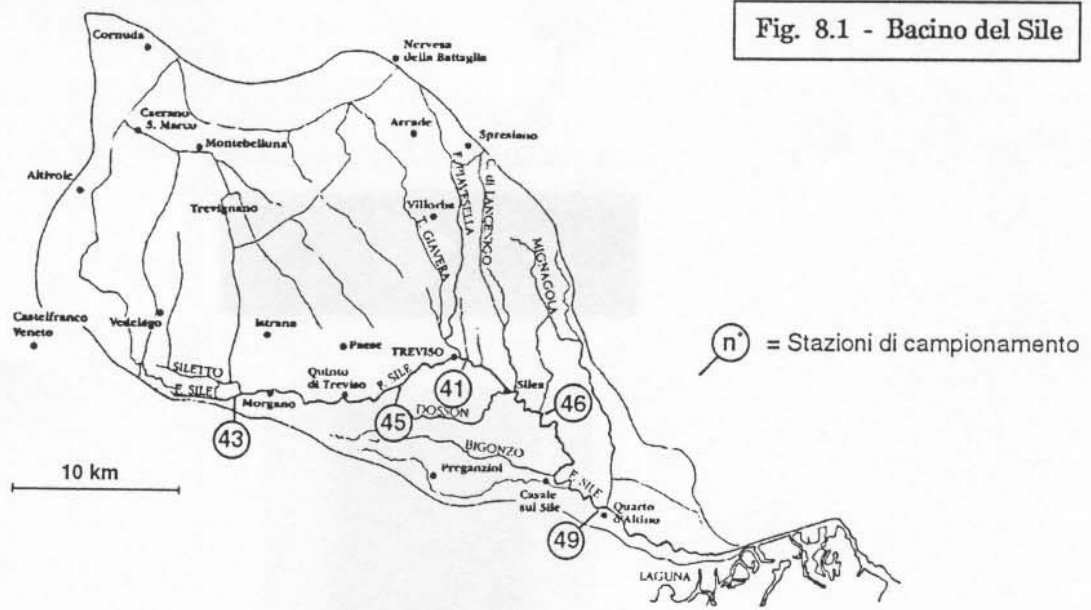
L'ecosistema "fiume" è stato oggetto di studio in tutte le sue componenti. E' ormai superato il concetto di concentrazione chimica di una sostanza inquinante presente nell'acqua per la valutazione dello stato di salute di un corpo idrico. Attualmente l'approccio chimico-fisico viene pressoché routinariamente affiancato dall'approccio biologico. Una metodica che quasi tutte le provincie italiane utilizzano per la classificazione biologica delle acque superficiali è l'E.B.I. (Extended Biotic Index) (Woodiwiss, 1978), modificato e standardizzato da Ghetti nel 1986, per adattarlo alle diverse realtà ambientali italiane. E' importante studiare, infatti, l'effetto che eventuali sostanze tossiche eterogenee (sversate abitualmente o casualmente) producono sulla "struttura" delle comunità biologiche di un corpo idrico; è altrettanto importante verificare gli effetti funzionali su una comunità biologica di un determinato ecosistema fluviale. Per dare una valutazione delle condizioni di stress di un determinato ambiente, sono stati condotti dei test cronici con *Daphnia magna* (Straus) su sedimenti fluviali, monitorati in periodo di magra e di morbida, nello stesso anno con i metodi E.B.I. e CB₂.

I test acuti e cronici con *Daphnia magna* (Straus) (Cladocera: Crustacea) sono già stati usati con successo su sedimenti (Buikema e Coll., 1980; Voyer and Heltshe, 1984; Wentzel e Coll., 1977; Brannon e Coll., 1980). Le stesse prove tossicologiche (Butler, 1978) sono state usate da noi su sedimenti fluviali dove parallelamente sono stati applicati altri metodi di valutazione biologica. Infine, si è cercato di rilevare una eventuale corrispondenza di vari metodi biologici.

8.2 Materiali e metodi

8.2.1 Campionamento

I sedimenti da saggiare sono stati campionati in concomitanza al mappaggio biologico (metodo E.B.I.) condotto per la realizzazione della Carta Ittica della Provincia di Treviso (Loro e Coll., 1990) e si riferiscono ad alcuni punti appartenenti al bacino del Sile e al bacino del Livenza (fiume situato a confine tra la regione Veneto e Friuli-



Venezia Giulia) (Figg. 8.1 e 8.2), scelti in base alla loro rappresentatività rispetto alla zonazione spaziale (Vannote e Coll., 1980) dei corsi d'acqua. I sedimenti sono stati prelevati con benna Ekman e conservati a 4 °C prima dell'utilizzo. Si è scelto come controllo un sedimento di un corso d'acqua, Rio Castellana, per il quale le analisi chimiche e fisiche non avevano evidenziato presenza degli inquinanti saggiati routinariamente e presentava caratteristiche di contenuto organico simili agli altri campioni testati (Tab. 8.1). In laboratorio i sedimenti sono stati essiccati a 55-60 °C per 24 ore, omogeneizzati e setacciati, per rimuovere le particelle più grossolane. La granulometria finale era di 80 mesh. Trenta grammi di campione sono stati addizionati a 270 mL di acqua milliQ in beute di vetro della capacità di 300 mL. L'acqua milliQ era stata precedentemente saturata con CO₂ mantenendo il pH (di estrazione) a un valore di 5,5 come da metodo (delibera C.I., 1984). Le beute sono state poste in agitatore meccanico rotante per 6 ore: si è quindi prelevato il surnatante per i test dopo decantazione. Su una aliquota

del campione liquido è stata condotta la ricerca di alcuni metalli, che solitamente si ritrovano nelle aree considerate, con ICP-AES (Perkin Elmer ICP 5500 equipaggiato con Data System 10 e Stampante PR 100).

8.2.2 Test di tossicità acuta con *Daphnia magna*

Su una aliquota del surnatante limpido, dopo estrazione del sedimento, sono stati effettuati i test acuti secondo le modalità indicate da Marchetti e Viganò nel 1990.

8.2.3 Test di fertilità con *Daphnia magna*

E' stata saggiata la fertilità di *Daphnia magna* mediante test a 7 giorni, secondo metodo Nebeker, 1988, utilizzando dafnie di 7 giorni, prodotte da femmine in fase di riproduzione partenogenetica allevate singolarmente in condizioni standardizzate, rispondenti alle metodiche indicate da Marchetti e Viganò, 1990. Per i test sono state utilizzate cinque dafnie per becker di 250 mL, contenenti 200 mL di campione non rinnovato giornalmente. I saggi sono stati condotti alla temperatura di 20 ± 2 °C e con fotoperiodo di 16 ore di luce; si è provveduto quotidianamente alla somministrazione di cibo costituito da una sospensione di alga verde (*Selenastrum capricornutum* Prinitz) e lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) in quantità di 300.000 cell/mL ciascuno. Si è provveduto ad una leggera aerazione del mezzo. Il valore di pH non ha mai superato i 9,2 (Havas and Hutchinson, 1982) e l'ossigeno disciolto il 100% di saturazione. Giornalmente è stata controllata la sopravvivenza degli organismi e sono stati contati e rimossi i neonati. I dati così ottenuti hanno consentito il calcolo del tasso di fertilità totale (T.F.T.) usato per la stima degli effetti sulla fertilità.

8.2.4 Calcolo dell'E.B.I. e del Coefficiente di Attitudine Biogena

L'analisi del macrobenthos è stata condotta per il calcolo dell'E.B.I. e del Coefficiente di Attitudine Biogena (Verneaux e Tuffery, 1977; Verneaux e Coll., 1978) in un periodo di morbida (marzo) e magra (dicembre) idrologica. I dati fanno parte della Carta Ittica della Provincia di Treviso (Loro e Coll., 1990) e in questo contesto sono utilizzati solo a scopo comparativo.

Tab. 8.1
Tipologia: Caratterizzazione dei sedimenti C.O.D., NH₄⁺

Corpo idrico	Codice	C.O.D. g/kg	NH ₄ ⁺ g/kg
Bacino: Fiume Livenza			
Livenza	15	60,09	0,34
	34	24,35	0,40
Resteggia	14	43,90	0,27
	20	59,09	0,42
Monticano	24	21,54	0,35
	33	50,58	0,28
Lia	28	87,61	0,38
	29	102,77	0,48
Bacino: Fiume Sile			
Sile	41	56,50	0,39
	43	79,96	0,39
	45	78,13	0,42
	46	122,59	0,67
	49 a	70,85	0,27
	49 b	38,05	0,42
Bianco		67,47	0,48

8.3 Risultati e discussione

In tabella 8.2 sono rappresentati i valori dei test acuti. I test acuti non hanno evidenziato per nessun campione effetti tossici acuti. Nella tabella 8.3 è rappresentato il numero di dafnidi prodotti in totale, la percentuale di madri sopravvissute a fine test e i valori di T.F.T. Solo nel caso del campione 20 c'è stato un effetto sulla fertilità. Nei campioni 43 e 15 il numero totale di neonati prodotti, inferiore rispetto al controllo, è da attribuirsi alla elevata mortalità nel gruppo di organismi; infatti il T.F.T. ha presentato in questi campioni valori prossimi al controllo. Un'alta mortalità delle madri tuttavia deve essere considerata di per sé un effetto tossico. In generale sembra che vi sia una stimolazione delle attività riproduttive. Nella tabella 8.4 sono rappresentate le concentrazioni di metalli nei campioni dopo estrazione, prima della conduzione dei test acuti e a lungo termine. Nella tabella 8.5 sono indicate le MATC

e le NOEC riscontrate in letteratura per alcuni metalli (Viganò, 1987). Il confronto fra i valori della tabella 8.5 e le concentrazioni dei metalli in tabella 8.4 sembra indicare che gli effetti osservati sulla sopravvivenza e la fertilità in *Daphnia magna* non siano da attribuire alla presenza di quantità tossiche di metalli (Biesinger e Coll., 1986; Baudouin e Scoppa, 1973; Bertram, 1981;

Tab. 8.2
Tipologia: Test acuti, percentuale di immobilizzati. Metodologia: *Daphnia magna* - 24 ore

Corpo idrico	Codice	Camp. tal quale 100%	Diluiz. 1-1 50%	Diluiz. 1-1 50%
Bacino: Fiume Livenza				
Livenza	15	NE	NE	NE
	34	NE	NE	NE
Resteggia	14	NE	20	NE
	20	NE	NE	NE
Monticano	24	NE	NE	NE
	33	NE	NE	NE
Lia	28	NE	NE	NE
	29	NE	NE	NE
Bacino: Fiume Sile				
Sile	41	NE	20	NE
	43	NE	NE	NE
	45	NE	NE	NE
	46	NE	NE	NE
	49 a	NE	NE	20
	49 b	NE	NE	NE
	Bianco	NE	NE	NE

NE = Nessun Effetto

Tab. 8.3
Tipologia: Test di fertilità su sedimenti fluviali. Metodologia: *Daphnia magna* a 7 giorni

Corpo idrico	Codice	Dafnie vive a fine test %	Dafnidi prodotti n.	Tasso di Fertilità Totale T.F.T.
Bacino: Fiume Livenza				
Livenza	15	20	63	21,03
	34	80	132	26,70
Resteggia	14	100	139	27,80
	20	80	87	17,40
Monticano	24	80	125	28,10
	33	100	154	30,80
Lia	28	100	133	26,60
	29	100	186	37,20
Bacino: Fiume Sile				
Sile	41	100	110	22,00
	43	0	88	27,20
	45	100	163	32,60
	46	100	183	43,54
	49 a	80	99	22,30
	49 b	80	158	39,00
	Bianco	100	113	22,60

Tab. 8.5
Concentrazioni Massime Accettabili (MATC) e Concentrazione di Non Effetto (NOEC) riportate in letteratura per alcuni metalli. Concentrazioni espresse in mg/L. (Viganò, 1987)

Elemento	<i>Daphnia magna</i>	
	MATC	NOEC
Cadmio	.0014-.0019	.00035-.0026
Cromo VI	.019	.0094
Piombo	.030	.018
Rame	.0025-.060	.016
Zinco	.074	.014

Tab. 8.4

Tipologia: Determinazione di alcuni metalli nel surnatante limpido. Metodologia: ICP-AES

Corpo idrico	Cod.	Cr mg/L	Cu mg/L	Fe mg/L	Mg mg/L	Mn mg/L	Zn mg/L	Cd mg/L	Pb mg/L
Bacino: Fiume Livenza									
Livenza	15	ND	0,011	0,020	11,1	0,025	ND	ND	ND
	34	ND	ND	ND	11,8	ND	ND	ND	ND
Resteggia	14	ND	0,011	0,020	13,4	0,010	0,010	ND	ND
	20	ND	0,026	ND	17,3	0,062	ND	ND	ND
Monticano	24	ND	0,014	ND	9,5	0,329	0,022	ND	ND
	33	ND	0,025	ND	19,7	0,133	ND	ND	ND
Lia	28	ND	0,036	0,130	17,9	0,013	ND	ND	ND
	29	ND	0,029	0,030	15,6	0,017	ND	ND	ND
Bacino: Fiume Sile									
Sile	41	ND	0,015	ND	14,1	ND	ND	ND	ND
	43	ND	ND	ND	20,0	ND	ND	ND	ND
	45	ND	0,018	0,020	15,4	ND	ND	ND	ND
	46	ND	0,017	0,020	21,4	ND	ND	ND	ND
	49 a	ND	0,018	ND	20,1	ND	ND	ND	ND
	49 b	ND	0,015	ND	14,8	ND	ND	ND	ND
Bianco		ND	ND	ND	23,8	0,100	0,100	ND	ND
ND*		<.010	<.010	<.020	<.2	<.010	<.010	<.0010	<.005

* ND = Non Determinabile

Tab. 8.6

Tipologia: Qualità biologica delle acque correnti. Metodologia: mediante indice biotico, E.B.I.

Corpo idrico	Codice	Numero Unità Sistematiche		E.B.I.		Classe Qualità	
		Mar.	Dic.	Mar.	Dic.	Mar.	Dic.
Bacino: Fiume Livenza							
Livenza	15	17	19	8	8	II	II
	34	29	20	11	8-9	I	II
Resteggia	14	23	22	10	10	I	I
	20	5	4	2-3	4	V	IV
Monticano	24	14	16	7	8-7	III	II-III
	33	22	14	9	6	II	III
Lia	28	11	10	7-6	5-6	III	IV-III
	29	19	14	8	6	II	III
Bacino: Fiume Sile							
Sile	41	15	15	7-8	7-8	II-III	II-III
	43	25	18	9-10	7	II-I	III
	45	24	19	9	8	II	II
	46	18	18	7	7	III	III
	49	16	14	6	7	III	III

Taylor, 1981b; Sayrs, 1975; Winner and Farrell, 1976). Si è osservata invece, per il solo campione 20, unico della serie per il quale si è rilevata una situazione di elevato inquinamento (Classe di Qualità V e IV e CB_2 1,0 e 1,5)* (Tab. 8.6, Tab. 8.7) una significativa corrispondenza con il rispettivo valore di T.F.T.. Nel campione 43 in cui c'è una maggiore variabilità stagionale di E.B.I. e CB_2 si è riscontrato un significativo aumento nel valore di T.F.T. Questo potrebbe essere messo in relazione ad un maggior apporto di nutrienti dal bacino idrografico.

8.4 Conclusioni

I test cronici con *Daphnia magna* sugli estratti di sedimento sembrano essere un mezzo idoneo per lo studio della tossicità dei sedimenti fluviali (Giesy e Coll., 1988). L'analisi degli effetti sulla fertilità e sulla sopravvivenza consentono l'individuazione di situazioni di stress non rilevabili con i test acuti sugli estratti. Da questa indagine, ancora da approfondire, sembra emergere una possibile corrispondenza fra gli effetti osservati sulla fertilità con test ecotossicologici e le indicazioni degli Indici Biotici E.B.I. e CB_2 .

* Le Classi di Qualità (da I a V) e i valori di CB_2 (1-10) definiscono in senso decrescente condizioni progressivamente più deteriorate per un dato ambiente.

Ringraziamenti

Si ringrazia il p.i. Dino De Franceschi e la sig.a Anita Zanin per l'elaborazione grafica di questo manoscritto.

Tab. 8.7

Tipologia: Calcolo dei coefficienti di attitudine biogena. Metodologia: CB_2 - Verneaux

Corpo idrico	Codice	Numero Unità Sistematiche		E.B.I.		CB_2	
		Mar.	Dic.	Mar.	Dic.	Mar.	Dic.
Bacino: Fiume Livenza							
Livenza	15	11	17	9	13	5,0	4,5
	34	20	16	16	11	5,5	3,5
Resteggia	14	17	19	16	16	5,5	6,5
	20	3	3	3	3	1,0	1,5
Monticano	24	12	9	10	7	4,0	3,5
	33	18	13	14	11	5,5	4,0
Lia	28	9	9	7	5	2,5	3,0
	29	16	11	11	6	4,5	4,0
Bacino: Fiume Sile							
Sile	41	14	14	11	11	4,0	4,0
	43	19	13	13	11	4,5	7,5
	45	19	18	18	13	6,0	4,5
	46	12	13	9	12	3,5	4,0
	49	13	11	9	10	3,5	3,5

8.5 Bibliografia

- Baudouin M.F. and Scoppa P., 1973. The influence of environmental factors on the toxicity of heavy metals to aquatic organisms.
Ispira, Ann. Rep.
- Bertram P.E., 1981. Population responses of *Daphnia* to long-term exposure to cadmium.
Diss. Abstr. Int., 41, 4008B.
- Biesinger K.E. and Coll., 1986. Effects of metal salt mixtures on *Daphnia magna* reproduction.
Ecotox. Environ. Safety, 11: 9-14.
- Brannon J.M. and Coll., 1980. Long term release of heavy metals from sediments.
In: Baker R.A. (ed.) "Contaminants and Sediments, vol. 2, Analysis, Chemistry, Biology". *Ann Arbor Science Publisher*, Ann Arbor, MI: 221-266.
- Buikema A.L. and Coll., 1980. *Daphnia* toxicity tests.
In: Buikema A.L. and Cairns J. Jr. (eds.) "Aquatic Invertebrate Bioassays", STP 715. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, P.A.: 48-69.
- Butler G.C. (Ed.), 1978. Principles of ecotoxicology.
SCOPE Report 12, *Wiley*, New York.
- Ghetti P.F., 1986. I macroinvertebrati nell'analisi di qualità dei corsi d'acqua. Manuale di applicazione.
Prov. Auton. di Trento, Staz. Sperim. Agr. Forest., Serv. Protez. Amb., Trento.
- Giesy J.P. and Coll., 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit River sediments.
Environ. Toxicol. Chem.: 483-498.
- Havas M. and Hutchinson T.C., 1982. Aquatic invertebrates from the Smoking Hills, N.W.T.: effect of pH and metals on mortality.
Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39: 890-903.
- Loro L. e Coll., 1990. Carta Ittica - Carta di Qualità delle Acque.
Provincia di Treviso.
- Marchetti R. e Viganò L., 1990. Misura degli effetti acuti con *Daphnia magna*. Proposte per una metodologia standard.
Relazione non pubblicata.
- Nebeker A.V. and Coll., 1988. Chronic effects of contaminated sediment on *Daphnia magna* and *Chironomus tentans*.
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 41: 574-581.
- Sayrs R.L. Jr., 1975. Lethal and sublethal effects of cadmium on *Daphnia* (Crustacea: Cladocera).
M.S. Thesis, Univ. Tennessee, Knoxville.
- Taylor D., 1981b. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. Vol. 5, Cadmium.
Brixham Lab. Rep. BL/A/1900.
- Vannote R.L. and Coll., 1980. The river continuum concept.
J. Fish. Res. Board Can., 3: 130-137.
- Verneaux J. et Tuffery G., 1967. Une methode zoologique pratique de determination de la qualité biologique des eaux courantes. Indices Biotiques.
Ann. Sci. Univ. Besançon, Zool., 3: 79-89.
- Verneaux et Coll., 1978. Note preliminaire a la proposition de nouvelles methodes de determination de la qualité des eaux courantes (I.Q.B.G.).
Centre Hydrobiol. Univ. Besançon et Lab. Hydroécol. CT-GREF.
- Viganò L., 1987. Metalli e non metalli tossici totali: esame del limite della legge 319/76 con *Daphnia magna*.
Ingegneria Ambientale, 16: 341-345.
- Voyer R.A. and Heltshe J.F., 1984. Factor interactions and aquatic toxicity testing.
Water Res., 18: 441-447.
- Wentzel R.A. and Coll., 1977. Sublethal effects of heavy metals contaminated sediment on midge larvae (*Chironomus tentans*).
Hydrobiologia, 56: 153-156.
- Winner R.W. and Farrell M.P., 1976. Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*.
J. Fish. Res. Board Can., 33: 1685-1691.
- Woodiwiss F.S., 1978. Second Technical Seminar - Background information.
Commission of the European Communities.