



Test di tossicità su *Daphnia*

Saggi su consumatori primari (acque dolci)

Es. *Daphnia magna*

Phylum: Artropoda

Subphylum: Crustacea

Classe: Branchiopoda

Superordine: Sarsostraca

Ordine: Cladocera

Famiglia: Daphniidae



Caratteristiche anatomiche

Crostaceo d'acqua dolce

2-3 mm lunghezza

Corpo compresso lateralmente
avvolto da carapace bivalve (escluso il capo)
diviso in 4 parti (adulto):

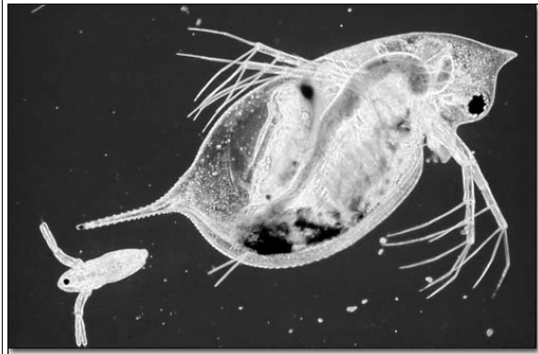
1. Capo con due paia di antenne biramose (2° paio usate per il nuoto) e 1 occhio composto centrale
2. Torace con 2-6 paia di appendici fillopodiali
3. Addome nella femmina racchiude una camera incubatrice (uova)
4. Post-addome con una furca

3

Biologia e ciclo vitale

- **Vivono all'incirca 4 mesi** (in condizioni ottimali)
- **Si alimentano per filtrazione** di alghe, batteri, detriti (1 - 50 μm)
- **Dimorfismo sessuale**
- **Riproduzione**
 - partenogetica (condizioni ottimali) $\Rightarrow$ juveniles
 - anfionica (condizioni limitanti) $\Rightarrow$ uova durature in efippi
- **Ciclomorfosi**
 - cambiamenti morfologici ciclici non genetici della forma (temperatura, fotoperiodo, velocità dell'acqua)

4



Daphnia adulta e juvenile



Occhio composto centrale



Camera incubatrice con uova

Saggio di tossicità acuta con *Daphnia spp.*

Il metodo:

- si basa sull'esposizione degli organismi a diverse concentrazioni del campione
- consente di valutare la tossicità acuta di campioni o estratti provenienti da corpi idrici o salmastri utilizzando come risposta la morte/immobilizzazione del crostaceo d'acqua dolce *Daphnia spp.*

Saggio di tossicità ACUTA con *Daphnia* spp.

Principio del metodo

Juveniles di età ≤ 24 h vengono utilizzati in un saggio della durata di 24-48 ore per determinare

- EC₅₀ (EC = Concentrazione Efficace)
- EC₂₀
- NOEC (Concentrazione di non effetto)

7

Allestimento test acuto

Materiali:

- ✕ Contenitori (almeno 30 ml di capacità) in vetro
- ✕ Dispositivo per mantenimento e controllo della temperatura
- ✕ Lampade
- ✕ Dispositivo per aerazione

8

Allestimento test acuto

Organismi per il saggio:

- * Juveniles di *Daphnia* di età $\leq$ 24h

9

Allestimento test acuto

Acqua di allevamento :

- * Acqua di falda
 - * Acqua superficiale non contaminata
 - * Acqua di rete
 - * Acqua MILLI Q + Sali (KCl, NaHCO₃, MgSO₄, CaSO₄)
- } Non clorate

Acqua di diluizione

- * Acqua di allevamento

10

Allestimento test acuto

Condizioni di allevamento :

- Temperatura: $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Illuminazione: fotoperiodo di 18h luce/6h buio
- pH: 6.0 - 8.5
- Ossigeno disciolto: $\geq 40\%$ del valore di saturazione

11

Allestimento test acuto

Alimentazione:

- ✖ test a 24-48h: nessuna
- ✖ test a 96h (prolungato): necessaria prima del rinnovo del mezzo, a 48h

12

Allestimento test acuto

Soluzioni da saggiare:

sostanza/composto chimico:

- ✖ Si preparano le soluzioni test (a partire da uno stock)

campione ambientale:

- ✖ Tal quale o si preparano le diluizioni (es. 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, V/V)

13

Allestimento test acuto

...e ancora, indipendentemente dal campione da saggiare:

- ✖ almeno 20 ml di soluzione per contenitore
- ✖ organismi da saggiare: almeno 30 per diluizione
- ✖ numero repliche per diluizione: 3
- ✖ contenitori coperti (es. lastre di vetro...) per evitare evaporazione e perdita di sostanze volatili

14

Validità del saggio acuto

- * sopravvivenza degli organismi di controllo $\geq 90\%$
- * mantenimento della concentrazione della sostanza test

Endpoint

- * % immobilizzazione/morte degli organismi esposti rispetto al controllo

15

Saggio di tossicità CRONICA con *Daphnia spp.*

Principio del metodo

Juveniles di età $\leq 24\text{h}$ vengono utilizzati per un saggio della durata di 21 giorni per determinare

- Sopravvivenza
- Accrescimento
- Riproduzione

16

Allestimento test cronico

Differentemente dal test acuto:

- ✖ cambio dell'acqua del test:
 - 1) ogni 48 ore (saggio statico): se la sostanza in esame e/o l'ossigeno disciolto si mantengono alla concentrazione di inizio test
 - 2) più spesso: se la sostanza in esame e/o l'ossigeno disciolto non si mantengono alla concentrazione iniziale (es. campioni ambientali con sostanze non persistenti, volatili ecc...)
- ✖ Alimentazione: regolare (ogni 24h)

17

Validità del saggio cronico

- ✖ sopravvivenza degli organismi di controllo $\geq 80\%$
- ✖ mantenimento della concentrazione della sostanza test

Endpoint

- ✖ % immobilizzazione/morte degli organismi esposti rispetto al controllo
- ✖ % inibizione della crescita
- ✖ % inibizione della riproduzione

18