

8040. Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia*

1. Introduzione

Il metodo descrive la procedura con la quale indagare se effluenti di scarico o acque superficiali contengono inquinanti a concentrazioni tali da causare effetti tossici acuti sul crostaceo d'acqua dolce *Ceriodaphnia dubia*. La mancata osservazione di effetti tossici acuti per un dato campione non esclude che essi si manifestino saggiando campioni prelevati in altri momenti, e ciò in dipendenza della variabilità dello scarico o del corpo idrico superficiale. Si tenga presente, inoltre, che l'assenza degli effetti tossici che si manifestano a breve termine (acuti) non preclude che lo stesso corpo idrico o lo stesso effluente di scarico possano causare quegli effetti tossici che si manifestano invece solo dopo esposizione prolungata (cronici).

2. Generalità sul metodo

In questo tipo di saggio giovani individui di *Ceriodaphnia dubia* sono esposti per un tempo massimo di 48 ore (eventualmente prolungabile a 96 ore) a campioni dei quali si voglia misurare la tossicità acuta. Generalmente, un campione di acqua di scarico è saggiato ad almeno 5 diluizioni, a ciascuna delle quali è esposto un numero definito di giovani organismi. Elaborando i dati di mortalità osservati alle diverse diluizioni, è possibile ottenere per un dato campione il valore di diluizione letale per il 50 % degli individui (LC_{50}) al tempo di esposizione prescelto. Una procedura analoga è applicabile allo studio degli effetti tossici acuti delle acque dei corpi idrici; tuttavia è raro che in questo caso le concentrazioni degli inquinanti raggiungano livelli tali da permettere l'osservazione di effetti superiori al 50% di mortalità. Molto più spesso l'esame di un corpo idrico si limita a valutare la significatività statistica di pochi eventuali decessi osservati per esposizione di *C. dubia* ad un campione non diluito.

Si tenga presente che il metodo basato sull'uso di questo stesso crostaceo per la stima della tossicità cronica (7 giorni), può consentire anche la valutazione della tossicità acuta, a patto che le diluizioni del campione da saggiare coprano un intervallo di valori sufficientemente ampio. Si raccomanda, di conseguenza, di privilegiare l'applicazione del saggio a 7 giorni ogni qual volta sia possibile.

Nel caso si voglia esaminare la relazione esistente tra la tossicità acuta e quella cronica di un effluente o di un corpo idrico, i due dati di tossicità dovranno essere prodotti nelle stesse condizioni sperimentali e cioè, quelle del saggio cronico (7 giorni).

3. Conduzione del saggio

3.1 Materiali e strumentazione

La conduzione del saggio di tossicità richiede:

- almeno 12 contenitori del tipo beaker in vetro borosilicato con volume utile di 30 mL. Numerosi laboratori usano con successo dei contenitori "a perdere", in polistirene, che sono normalmente commercializzati per alimenti;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro con un temporizzatore per il controllo del fotoperiodo e possibilmente un dispositivo che simuli la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;

- dispositivo per il controllo della temperatura delle diluizioni da saggiare nell'ambito di $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$ per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto con sensore di dimensioni adeguate alla misura nei contenitori di saggio;
- microscopio binoculare da dissezione, provvisto di illuminazione laterale;
- fonte di aria compressa a bassa pressione, con cannule in vetro o pipette Pasteur per far gorgogliare l'aria nelle soluzioni da aerare. L'applicazione di un piccolo compressore del tipo usato in acquariologia può costituire una soluzione adeguata. L'aria distribuita dai grossi impianti centralizzati è spesso contaminata da vapori di oli o altri inquinanti che vanno rimossi con opportuni dispositivi di filtrazione.

3.2 Organismi per il saggio

La specie utilizzata in questo saggio di tossicità è il crostaceo cladocero *Ceriodaphnia dubia*, che è allevato in laboratorio seguendo le indicazioni fornite in Appendice A2. Il saggio è allestito con neonati appartenenti alla terza schiusa o alle successive, prodotte da femmine mantenute in condizioni di allevamento controllate e rispondenti ai requisiti di buone condizioni colturali descritti in Appendice. I giovani organismi da utilizzare sono quelli schiusi entro e non oltre le 24 ore precedenti l'allestimento della prova.

3.3 Acqua di diluizione

Generalmente, le diverse diluizioni del campione da saggiare sono preparate usando come acqua di diluizione e di controllo la stessa in cui sono allevati gli organismi riproduttori. Tuttavia, in funzione delle finalità del saggio è opportuno distinguere tra diverse possibili soluzioni:

- a) Se lo scopo è di evidenziare la presenza di effetti tossici acuti e il loro andamento nel tempo o di confrontare la tossicità di diversi effluenti, come diluente si adatterà un'acqua sintetica (standard) avente durezza di circa 150 mg/L CaCO_3 , per la cui preparazione si aggiungono dei sali di grado analitico ad acqua ultrapura o deionizzata di qualità equivalente.

Per preparare 1 L di acqua standard, i sali ed i quantitativi da aggiungere sono, nell'ordine, i seguenti:

10 mg di KCl, 192 mg di NaHCO_3 , 53 mg di MgSO_4 e 183 mg di $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La soluzione risultante ha durezza compresa tra 140 e 160 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$, alcalinità 110-120 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$, e pH 7,5-6,5. L'acqua standard può anche essere preparata a partire da un'acqua minerale, scelta tra quelle disponibili in commercio, preferibilmente la stessa eventualmente usata per allevare l'organismo e adeguata, se necessario, nelle concentrazioni di alcuni costituenti maggiori per dare i valori di durezza e alcalinità indicati (vedi Appendice A3).

- b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità acuta determinata dall'immissione di uno scarico nelle acque del recettore, come diluente si userà l'acqua non contaminata di quest'ultimo prelevata a monte dell'immissione o comunque al di fuori dell'area esposta a fonti di contaminazione. Nel caso essa non sia disponibile, si può utilizzare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale o un'acqua sintetica (vedi "punto a") avente approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore oggetto del controllo. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purchè di qualità adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 ore dallo stesso, mantenendo refrigerati i campioni (4°C) quando se ne faccia uso a più di 24 ore dalla raccolta.
- c) Se lo scopo del saggio è quello di esaminare gli eventuali effetti additivi o comunque le in-

terazioni tra i contaminanti presenti nello scarico e quelli veicolati dal recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore stesso, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. In questo caso è necessario aggiungere un gruppo di organismi di controllo esposti alla sola acqua di allevamento (vedi Appendice A3).

3.4 Illuminazione

Gli organismi esposti ai campioni di acque da saggiare sono mantenuti nelle stesse condizioni di illuminazione in cui sono allevati. La sorgente luminosa è costituita da un sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro (Indice di resa cromatica ≥ 90), il fotoperiodo è di 16 ore di luce e 8 di buio. Un'intensità luminosa che al piano di lavoro sia compresa tra 500 e 1000 lux si è generalmente dimostrata adeguata.

3.5 Temperatura

il campione da saggiare o le sue diluizioni sono mantenute per tutta la durata della sperimentazione a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Se invece, i risultati ottenuti dal saggio acuto dovranno essere esaminati in relazione a dati di tossicità cronica prodotti con lo stesso organismo, la tossicità acuta del campione deve essere misurata a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, e cioè alla temperatura prevista per la conduzione del saggio cronico. Per entrambi i valori di temperatura il risultato è conseguibile immergendo i contenitori del saggio in un bagno termostato o condizionando la temperatura dell'intero ambiente in cui è condotto il lavoro sperimentale.

3.6 Alimentazione

In generale i giovani individui di *C. dubia* non vengono nutriti durante la prova. Tuttavia, se essi non sono utilizzati entro 2-3 ore dall'isolamento dai recipienti in cui si sono schiusi, può essere suggerita la somministrazione di cibo fino al loro trasferimento nelle soluzioni test, nei quantitativi indicati per l'allevamento del cladocero (vedi Appendice A4). Similmente, se si intende prolungare il saggio fino a 96 ore di esposizione ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), circa 2 ore prima del rinnovo delle soluzioni e quindi del trasferimento degli organismi (vedi Capitolo 4) si somministra la stessa dieta usata per le colture. Il rinnovo è solitamente effettuato allo scadere delle 48 ore di saggio.

3.7 Ossigeno disciolto

Raggiunta la temperatura prevista per il saggio, è necessario misurare la concentrazione di ossigeno disciolto nel campione destinato alla prova. Se tale concentrazione risulta prossima o inferiore al 40% del valore di saturazione, è necessario aerare l'aliquota del campione da saggiare. L'aerazione deve essere moderata in modo da minimizzare i cambiamenti del campione, quali ad esempio quelli relativi al valore di pH, al contenuto di sostanze facilmente ossidabili o volatili. L'importanza e la necessità di intervenire prima dell'allestimento della prova, è dovuta al fatto che successivamente sarebbe pressoché impossibile aerare i piccoli volumi delle soluzioni di saggio senza arrecare disturbo agli organismi. Se tuttavia, durante il saggio si osserva che il consumo di ossigeno è tale da rischiare di invalidare la prova, si può intervenire con rinnovi più frequenti delle soluzioni, ricorrendo a nuove aliquote di campione preventivamente aerato. Considerazioni analoghe valgono anche per i trattamenti di controllo.

4 Procedura di saggio con diluizione (effluente)

4.1 Saggio preliminare

Generalmente, la misura degli effetti tossici acuti di un effluente o di un corso d'acqua, è effettuata senza acquisire dei dati preliminari sulla loro tossicità. In taluni casi, quando ad

esempio si sospetta che un campione sia molto tossico, può essere vantaggioso disporre di informazioni preliminari per meglio impostare i saggi tossicologici definitivi.

In queste eventualità si allestisce una prova preliminare semplificata e di durata inferiore a quella definitiva. Si preparano 5 diluizioni del campione, del volume di 20 mL ciascuna, scelte in modo da coprire un ampio intervallo di concentrazioni. La sequenza 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% (v/v) può essere adottata a questo scopo. In ogni contenitore sono introdotti 6 neonati di *C. dubia* e dopo un massimo di 24 ore si registrano i risultati. Se il campione della prova preliminare dovrà essere saggiato anche nella prova definitiva, si raccomanda di procedere nel rispetto dei limiti di conservabilità del campione stesso. Se viceversa le due prove sono condotte con campioni prelevati in momenti diversi, si tenga presente che, a causa della variabilità più o meno accentuata della tossicità dello scarico o del recettore, i risultati del saggio preliminare e di quello definitivo possono anche essere molto diversi.

4.2 Saggio definitivo

Per la conduzione del saggio definitivo, è necessario preparare almeno 5 diluizioni del campione in esame. Una serie che si è dimostrata applicabile a gran parte delle situazioni è la seguente: 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25 % (v/v). I valori sono in serie geometrica secondo un fattore di diluizione pari a 0,5. In casi particolari, come quelli individuati da un eventuale saggio preliminare, si possono adottare altre sequenze con un diverso fattore di diluizione o anche un maggiore numero di diluizioni.

Se è stato necessario refrigerare i campioni, le aliquote destinate al saggio sono prelevate dopo accurato mescolamento e portate alla temperatura scelta per la prova. Si procede quindi alla misurazione della concentrazione di O₂ disciolto, in accordo alle indicazioni date in precedenza (vedi Paragrafo 3.7). Solo quando le 5 o più diluizioni hanno raggiunto le condizioni indicate per il test, vengono immessi gli organismi. Analoga procedura vale per il gruppo degli organismi di controllo.

Nei saggi di tossicità acuta l'allestimento di più repliche per ogni concentrazione risponde prevalentemente a necessità di tipo pratico; infatti, i singoli risultati che esse forniscono sono, solitamente, combinati in un unico dato riferito al corrispondente valore di concentrazione. Questa consuetudine rende pressochè inutile l'allestimento di più repliche, a meno che non vengano utilizzati più organismi di quanti ne sono previsti nello schema di base qui proposto. In accordo con quest'ultimo per ogni diluizione di effluente o di acqua del recettore si utilizzano almeno 10 neonati di *C. dubia* di età ≤24 ore, in soluzioni di volume pari a 20 mL. Per il trasferimento si utilizza una pipetta di vetro provvista di bulbo in lattice per aspirazione e con diametro interno di almeno un paio di mm, avendo cura di premere il bulbo per immergere gli organismi nel nuovo recipiente solo quando l'estremità della pipetta è sotto la superficie del liquido. Per evitare una diluizione significativa delle soluzioni di saggio, si raccomanda di limitare al minimo il volume di acqua trasferito con gli animali.

L'eventuale prosecuzione della prova fino a 96 ore, richiede che le soluzioni del saggio siano rinnovate almeno una volta e allo scadere delle 48 ore. In base ai criteri già enunciati, si può anche decidere di aumentare la frequenza di rinnovo delle soluzioni e in ogni caso le soluzioni fresche sono preparate rispettando la stessa procedura descritta per allestimento del saggio. Allo scadere delle 48 ore o comunque al momento del rinnovo, i giovani individui di ceriodafnia sono trasferiti nelle diluizioni corrispondenti a quelle cui sono già stati esposti. Giornalmente e a intervalli di esposizione costanti (24 ore, 48 ore, ecc.) si ispezionano i contenitori di saggio con l'aiuto di un microscopio binoculare, al fine di registrare e rimuovere gli eventuali organismi deceduti.

Gli esemplari sopravvissuti alla prova tossicologica, inclusi gli organismi di controllo, non potranno essere riutilizzati.

5. Procedura di saggio senza diluizione (corpo idrico)

5.1 Saggio definitivo

Per determinare se un corpo idrico contiene tossici capaci di determinare effetti acuti su *C. dubia*, si espongono i neonati di questo crostaceo ad un campione non diluito delle acque dello stesso. Se le caratteristiche di quest'ultimo, almeno in termini di durezza, sono sostanzialmente diverse da quelle dell'acqua di allevamento, è necessario utilizzare neonati prodotti da femmine acclimate in un mezzo avente durezza simile a quella del campione da saggiare (vedi Paragrafo 3.3 e Appendice A3). In tal caso, la prova di controllo è allestita usando l'acqua di acclimatazione.

Il campione del corpo idrico viene saggiato in quattro repliche e in modo analogo viene allestita la prova di controllo. In ciascuna delle repliche, aventi volume di 20 mL, sono introdotti 10 neonati di *C. dubia*. Contrariamente alla procedura dei saggi con diluizione, in questo caso i risultati delle diverse repliche non vengono cumulati bensì utilizzati per valutare se le eventuali differenze di sopravvivenza (o di mortalità) tra gli organismi esposti al campione e quelli esposti al mezzo di controllo, sono statisticamente significative. Per quanto riguarda le restanti condizioni di saggio esse sono da considerarsi invariate rispetto a quanto già descritto. Se la tossicità del corpo idrico risultasse tale da causare una mortalità degli organismi superiore al 50%, si può procedere alla misura della tossicità acuta in termini di LC_{50} . In questo caso la procedura da seguire è quella descritta per il saggio con diluizione (vedi Capitolo 4).

6. Validità del saggio

I risultati dei saggi sono giudicati accettabili se al termine del periodo di esposizione la sopravvivenza degli organismi di controllo è $\geq 90\%$ e se la concentrazione di ossigeno disciolto si è mantenuta $\geq 40\%$ del valore di saturazione.

Pur senza imporre altri vincoli alla validità del saggio, è consigliabile la conduzione periodica di test in condizioni standard con un tossico di riferimento, quale ad esempio il bicromato di potassio o il pentaclorofenolo. Questa pratica fa sì che sia disponibile un'ampia serie di valori di LC_{50} del tossico prescelto rispetto alla quale dovrebbe essere possibile evidenziare delle condizioni sperimentali o lotti di organismi anomali. In condizioni normali, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio delle precedenti LC_{50} e dal doppio del loro scarto tipo ($media \pm 2 \cdot \text{scarto tipo}$). Viceversa, se la LC_{50} del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi e in quel periodo sperimentale dovrebbero essere considerati con cautela.

A scopo informativo, vengono riportati alcuni dati di letteratura relativi al saggio acuto con *C. dubia*. Una serie di 7 prove condotte da un unico laboratorio sullo scarico di un impianto di depurazione civile diede un valore medio della $48hLC_{50}$ di 26,1% (v/v) con un coefficiente di variazione del 25,5% (Rue et al., 1988). Una serie analoga di 15 saggi diede un valore medio di $48hLC_{50}$ pari al 60,0% (v/v) con un CV del 31,1%. Il confronto tra il saggio acuto con *C. dubia* e quello con il ciprinide *Pimephales promelas*, condotti in parallelo sui medesimi campioni di acqua di scarico, fornì una $48hLC_{50}$ media di 78,4% per il crostaceo e di 75,8% per il pesce, con CV, rispettivamente, di 33,1 e 19,6% (Norberg-Ring, 1989, memorandum).

Il saggio acuto con *C. dubia* è stata oggetto di due studi di intercalibrazione entrambi con lo stesso tossico di riferimento, il KCl (25°C, durezza 50-100 mg/L $CaCO_3$). Al primo studio parteciparono 11 laboratori e risultò una $48hLC_{50}$ media di 264 mg KCl/L con un CV del 48,5%. Al secondo studio parteciparono 171 laboratori consentendo la valutazione di una $48hLC_{50}$ media di 432 mg KCl/L e di un CV pari a 39,8%.

7. Analisi dei risultati

7.1 Calcolo della LC_{50}

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta, descritto in questa procedura, si propone non solo l'identificazione delle sorgenti di contaminazione capaci di provocare effetti tossici acuti, ma anche la quantificazione della loro potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale per il 50% degli organismi (LC_{50}), per un dato tempo di esposizione (24-48 h). La determinazione della LC_{50} può essere effettuata con diversi metodi la cui applicabilità è in buona parte dipendente dal tipo di risultati ottenuti e, più precisamente, dal numero di effetti parziali osservati, intermedi cioè, tra una mortalità del 100% e una mortalità nulla. La valutazione della LC_{50} dovrebbe basarsi sui risultati relativi ad almeno 5 concentrazioni di campione ed un controllo, sebbene molti metodi di analisi possono essere utilizzati con un numero di dati inferiore. Se la massima concentrazione saggiata ha causato una mortalità inferiore al 50%, non si dovrebbe procedere al calcolo della LC_{50} , il cui valore sarebbe in tal caso poco attendibile. Meglio ripetere il saggio, se possibile, cercando di migliorare la serie delle concentrazioni saggiate. In caso contrario la LC_{50} sarà più correttamente espressa come "maggiore della massima concentrazione sperimentata" (es.: $48hLC_{50} > 80\%$).

Nel metodo di saggio dedicato alla valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna* (metodo 8020) sono stati proposti tre diversi metodi, ampiamente validati, atti alla valutazione della LC_{50} . Si tratta del metodo di Litchfield e Wilcoxon, del test binomiale e del metodo probit. Essi sono adeguatamente illustrati nell'ambito della Sezione 8020 al quale si rinvia. Infine, è opportuno segnalare che sono disponibili in commercio alcuni programmi per personal computer espressamente dedicati ai metodi di analisi statistica dei risultati tossicologici. A questi prodotti si rinvia.

7.2. Effetti da concentrazione unica

L'esame dei risultati ottenuti saggiando un campione non diluito del corpo idrico è riconducibile alla teoria del confronto tra due campioni. Nel presente schema sperimentale, i decessi osservati nelle repliche del corpo idrico e in quelle del controllo rappresentano le due serie di dati posti a confronto.

Di fatto, se la mortalità degli organismi esposti al corpo idrico supera il valore del 10%, e cioè quel limite di decessi accettato come "naturale" in un gruppo di individui di controllo, si può già concludere che il campione contiene inquinanti a concentrazioni tossiche. Tuttavia può essere opportuno dare supporto statistico al risultato del saggio, verificando la cosiddetta ipotesi nulla o zero, e cioè che le medie dei decessi osservati nei due trattamenti siano uguali. Smentire l'ipotesi con un certo grado di probabilità, solitamente $P=0,05$, equivale a verificare che la mortalità osservata per gli organismi esposti al corpo idrico è significativa.

Il test " F " utilizzato per confrontare i due campioni e, dal momento che vi è un'attesa di contaminazione o di mortalità maggiore per il campione del corpo idrico piuttosto che per il controllo, un test unilaterale è generalmente adeguato. L'applicazione del test " F " richiede che le proporzioni di decessi osservati nelle repliche siano distribuite normalmente. Se i dati soddisfano questo requisito è necessario procedere anche alla verifica di omogeneità della varianza dei due gruppi di risultati e solo in caso affermativo è lecito passare all'esame della significatività dei decessi osservati. Se i dati non fossero distribuiti normalmente il problema viene comunemente risolto mediante opportune trasformazioni dei dati stessi. La conversione delle proporzioni di organismi deceduti nella radice quadrata del loro arc sen è la trasformazione più comune. Se non si rivelasse risolutiva è necessario procedere all'esame dei risultati con metodi non parametrici. Se a sua volta, la condizione di omogeneità della varianza non fosse rispettata, il test " F " rimane valido ma deve essere applicato in forma modificata. Il valore calcolato per la funzione " F " è infine confrontato con il valore critico di " F " individuabile in apposite tabelle, in base al numero di gradi di libertà ed al livello di probabilità prescelto. Se il valore di " F " calcolato supera il valore tabellare, le due mortalità sono significativamente diverse. Sono disponibili in commercio dei programmi per personal computer che sono espressamente dedicati all'analisi statistica dei risultati tossicologici e possono svolgere tutte le operazioni necessarie. A questi prodotti, pertanto, si rinvia.

APPENDICE

A1 - Note sulla sistematica e sulla biologia di *Ceriodaphnia dubia*

I Crostacei Cladoceri sono organismi di piccole dimensioni, in larga parte planctonici, che popolano prevalentemente le acque dolci. In particolare, le specie appartenenti alla famiglia Daphnidae sono ubiquitarie delle acque dolci della fascia temperata e a questa famiglia appartengono tre specie che rivestono grande interesse per gli studi tossicologici, e cioè *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* e *Ceriodaphnia dubia*. Quest'ultima, relativamente a tali studi, è quella di più recente acquisizione (Mount e Norberg, 1984).

Caratteristiche generali dei Cladoceri sono la compressione laterale del corpo, il carapace bivalve che racchiude il tronco, l'unico grande occhio composto, la presenza di antennule e di antenne, le prime immobili con papille olfattorie e setole sensoriali e le seconde con funzione natatoria, molto sviluppate. Il postaddome, che è una formazione esclusiva dei Cladoceri, ha ornamentazioni aventi valore tassonomico.

In *Ceriodaphnia*, come in generale nei Cladoceri, i sessi sono separati e con un evidente dimorfismo. In Fig. 1A è illustrato l'aspetto di una femmina partenogenetica di *C. dubia*. Essa è caratterizzata da un corpo ovale molto allargato, lungo da 0,95-1,4 mm (Margaritora, 1933). Il secondo paio di antenne è provvisto di 9 setole natatorie. Il capo è allungato e compresso nettamente distinto, tramite un seno cervicale, dal carapace. Quest'ultimo, che è provvisto di una reticolatura poligonale molto evidente, termina dorsalmente con un angolo aguzzo e una corta spina, appena pronunciata. L'individuo di sesso maschile, illustrato in Fig. 1C, ha dimensioni di poco inferiori e forma più slanciata, meno tondeggiante. Le sue antennule sono allungate con un flagello terminale molto sviluppato. Altrettanto vale per il primo paio di appendici toraciche la cui forma è finalizzata all'accoppiamento. Sia nella femmina che nel maschio, l'artiglio terminale del postaddome presenta un pettine finemente setoloso (Fig. 2).

La presenza di *C. dubia* è stata documentata nella fascia litorale dei laghi, nei piccoli bacini e nelle raccolte d'acqua temporanee praticamente di tutto il mondo. È diffusa negli stessi distretti di una specie molto simile, nota come *C. reticulata*, anche se rispetto a questa è decisamente più rara. È presente sul territorio nazionale dove è stata rinvenuta in Istria, nel tratto inferiore del Po, in Abruzzo e in Sicilia (Margaritora, 1983) anche se spesso è stata citata col sinonimo di *C. affinis*.

Durante gran parte dell'anno, la popolazione di *C. dubia* consiste pressoché esclusivamente di individui di sesso femminile che si riproducono con uova partenogenetiche. Queste sono deposte nella camera dorsale di incubazione (Fig. 1B), in numero da 4 a 10 o più. Schiuse anche di 20 neonati non sono infrequenti.

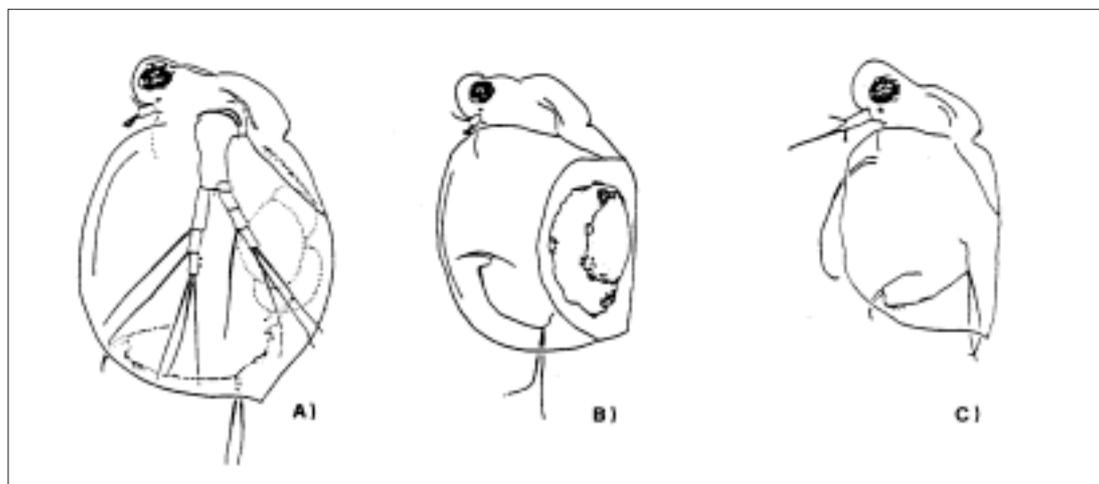


Figura 1: *Ceriodaphnia dubia*: A) femmina in attività riproduttiva partenogenetica; B) femmina con efippio; C) maschio (modificata da Berner, 1986)

I giovani individui sono pressoché identici agli adulti e pertanto si accrescono senza un vero processo di metamorfosi (sviluppo diretto). L'accrescimento, che ha maggiore velocità nel periodo giovanile, ha luogo subito dopo ogni evento di muta, quando il nuovo carapace è ancora elastico e l'organismo può aumentare la sua taglia.

Nei laghi e nelle raccolte d'acqua permanenti, gli individui di sesso maschile schiudono dalle uova partenogenetiche nel solo periodo autunnale, in risposta verosimilmente a stimoli ambientali quali il raffreddamento delle acque, la diminuita disponibilità di cibo e l'abbreviarsi della fase luminosa del fotoperiodo. Il risultato della riproduzione sessuata è la fecondazione di un unico uovo, che viene racchiuso in uno spesso involucro del carapace noto come efippio. Tale struttura si sviluppa nella regione dorsale, in corrispondenza della camera di incubazione (Fig. 1B). L'efippio protegge l'uovo duraturo dalla disidratazione e dagli estremi di temperatura, al punto che può essere conservato per lunghi periodi di tempo senza che ne sia compromessa la vitalità. La deposizione degli efippi non rappresenta necessariamente l'atto finale dell'attività riproduttiva del Cladocero, ma solo una sua fase.

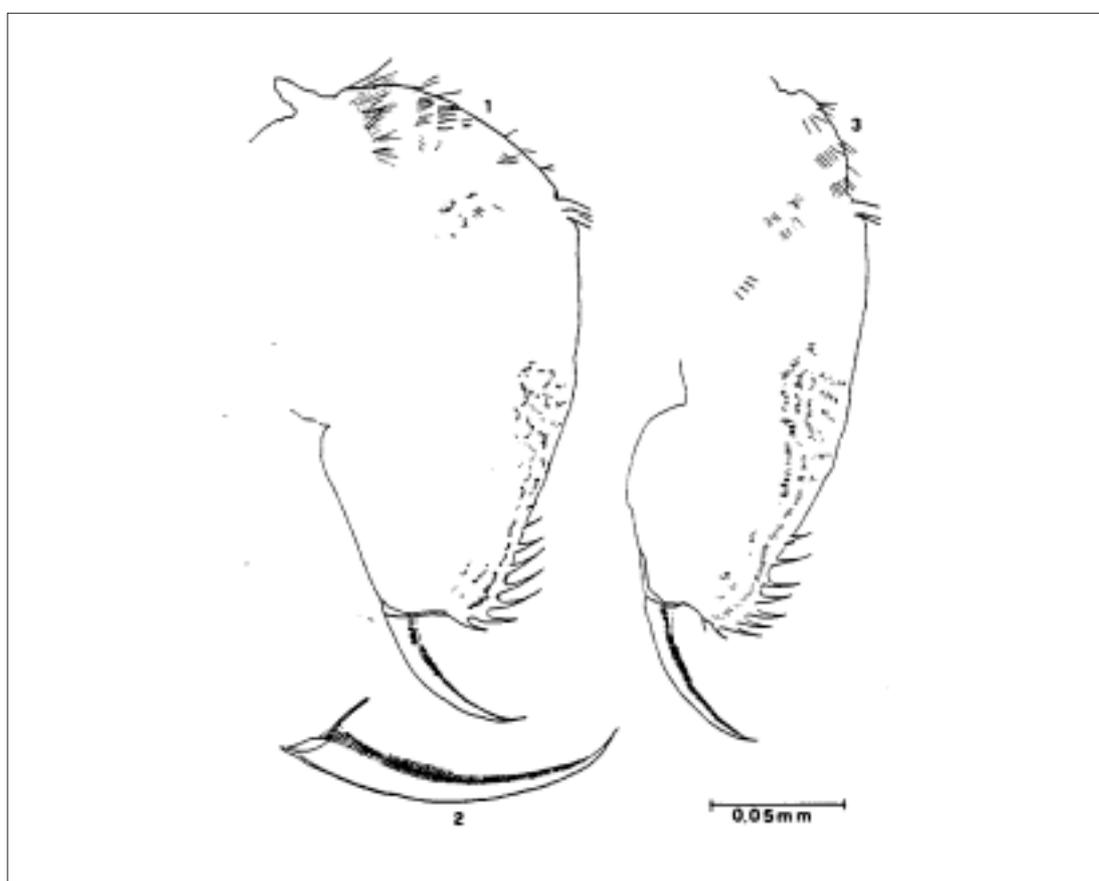


Figura 2: Postaddome di *Ceriodaphnia dubia*:
1) femmina partenogenetica; 2) dettaglio dell'artiglio terminale; 3) maschio (Berner, 1986)

Dopo la produzione di uova anfigoniche può essere ripresa, infatti, la produzione di uova partenogenetiche. Gli individui muoiono solo se intervengono fattori letali, come il prosciugamento del bacino, la mancanza di cibo, i valori estremi di temperatura, lasciando tuttavia le uova durature negli efippi dai quali, dopo reidratazione ed esposizione alla temperatura appropriata, schiederanno individui di sesso femminile che si riprodurranno nuovamente per via partenogenetica.

A2 - Allevamento degli organismi

L'allevamento di *Ceriodaphnia* deve essere avviato 2-3 settimane prima della conduzione dei

saggi, al fine di disporre di femmine acclimatate alle condizioni di mantenimento del laboratorio e che siano in grado di produrre un numero di neonati sufficienti alla sperimentazione. Grazie alla prolificità delle femmine, solo pochi individui (20-30) sono necessari per l'avvio dell'allevamento. In caso di trasporto, questi possono essere trasferiti in un contenitore di polietilene da 1 litro, completamente riempito, nel numero di 20-30 individui. L'acclimatazione alle condizioni colturali del nuovo laboratorio deve essere graduale, al fine di evitare morie massive degli organismi. La procedura da preferire consiste nella progressiva sostituzione dell'acqua di spedizione con percentuali crescenti (25%, 50%, 75%, 100%) del mezzo in uso nel laboratorio, completando il trasferimento in 48-72 ore. Anche per quanto riguarda la temperatura, i bruschi cambiamenti devono essere evitati, limitando le variazioni a 2-3°C nell'arco di 24-48 ore.

È preferibile organizzare l'allevamento secondo due procedure aventi diversa finalità. I due tipi di allevamento che ne derivano sono definibili l'uno come "massivo" e l'altro come "controllato".

L'allevamento di tipo massivo ha come scopo quello di garantire la sopravvivenza della specie in laboratorio e di fornire gli organismi necessari all'allevamento controllato. Per la procedura massiva sono utilizzati dei contenitori da 1-2 L, tipo beaker o cristallizzatori, ma anche dei piccoli acquari in "tutto vetro" possono prestarsi allo scopo. Almeno due colture, ma preferibilmente più di due, sono mantenute in recipienti distinti. Esse sono allestite con non più di 40-50 organismi per ogni litro di mezzo, alimentati giornalmente e trasferiti in mezzo fresco almeno una, ma meglio due volte per settimana. Ogni 14 giorni la coltura viene scartata e riallestita con un nuovo gruppo di neonati appartenenti alla terza schiusa o successive. Gli allevamenti di tipo controllato sono mantenuti come fonte diretta di neonati per i saggi tossicologici. In questo caso le femmine di *C. dubia* possono essere allevate sia in piccoli gruppi, che singolarmente, ed in entrambi i casi, ogni individuo deve avere a disposizione un volume di almeno 15 mL di mezzo. La somministrazione del cibo è quotidiana ed il trasferimento degli organismi deve essere effettuato almeno a giorni alterni, ma preferibilmente anch'esso con frequenza giornaliera. Nel caso venga adottata la soluzione minima di tre cambi settimanali, lunedì, mercoledì e venerdì sono i giorni consigliati. Si tenga presente tuttavia, che giornalmente si deve procedere alla rimozione e alla conta dei neonati prodotti.

Se l'allevamento è in buone condizioni, ogni femmina dovrebbe produrre tre schiuse nell'arco di 7 giorni ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), con un numero medio di neonati pari o superiore a 15; nello stesso arco di tempo, gli eventuali decessi non devono superare il limite del 20%. In caso contrario sussistono dei problemi che sono solitamente dipendenti dalla qualità del mezzo o della dieta. Dopo un massimo di 4 giorni, le femmine adulte sono scartate e gli allevamenti riallestiti con giovani individui di terza schiusa o successive.

Anche nel caso degli allevamenti di tipo controllato è consigliabile mantenere più gruppi di organismi o più serie di singoli individui, sfalsate nell'allestimento di una settimana, e ciò per garantire una disponibilità praticamente continua di neonati.

A3 - Acqua di allevamento

C. dubia può essere allevata con successo in acque di vario tipo quali acque di falda e acque superficiali non contaminate ed anche in acque di rete, purchè non clorate. Al fine di non esporre gli organismi in coltura a continue, e talvolta eccessive, variazioni delle caratteristiche del mezzo, sono da preferire quelle fonti che dimostrano, nel tempo, la maggiore stabilità dei parametri chimico fisici. In considerazione dei molteplici aspetti che debbono essere soddisfatti dal mezzo di allevamento (tossicologico, nutrizionale, di riproducibilità dei risultati, di facilità di approvvigionamento, ecc.) l'impiego di un'acqua minerale, o più esattamente l'impiego di un'acqua sintetica preparata a partire da un'acqua minerale di tipo commerciale, si può configurare come una soluzione ottimale. Un'acqua di questo tipo è infatti facilmente disponibile, altrettanto facilmente preparabile, è di qualità nota e poco variabile, permette buoni risultati in termini di accrescimento e attività riproduttiva e ne assicura la riproducibilità. Sono possibili due modi di impiego di un'acqua minerale scelta tra quelle disponibili in commercio.

Nel primo caso, ci si serve di un'acqua con un elevato contenuto di sali e ad una certa ali-

quota di acqua minerale viene aggiunta acqua Milli-Q o di qualità equivalente, in modo da ottenere, per diluizione, il mezzo semisintetico con le caratteristiche volute. Nel secondo caso, ci si serve di un'acqua a basso contenuto di sali (oligominerale), che viene corretta nei suoi costituenti maggiori mediante l'aggiunta di sali di grado analitico per dare il mezzo con i valori di alcalinità e durezza desiderati.

Entrambe le soluzioni sono state ampiamente collaudate con successo (US EPA, 1989; Viganò, 1991, 1992; Cooney et al., 1992a). Al più si può osservare che nel secondo tipo di impiego il pool di micronutrienti, fornito dall'acqua minerale prescelta, resta invariato nei diversi mezzi di coltura ottenibili. Inoltre, il secondo tipo di applicazione evita, a differenza del primo, il rischio tossicologico introdotto dall'uso di acqua deionizzata per la diluizione dell'acqua minerale, rischio che periodicamente si potrebbe concretizzare in effetti negativi sulla coltura del cladocero (Cooney et al., 1992b), a meno di controlli assidui sulla efficienza del deionizzatore. Nel primo tipo di applicazione infine, può formarsi un precipitato nei mezzi di coltura con durezza ≥ 180 mg CaCO_3/L (US EPA, 1989; Patterson et al., 1992).

Fatta eccezione per quelle colture di organismi che sono dedicate a saggiare dei campioni con caratteristiche peculiari, in generale si consiglia di adottare un mezzo semisintetico con le seguenti caratteristiche: durezza 140-160 mg CaCO_3/L , alcalinità 110-120 mg CaCO_3/L , $\text{Ca}/\text{Mg} > 1$ e prossimo a 4, $\text{Na}/\text{K} > 1$ e prossimo a 10. L'acqua semisintetica viene preparata in volumi dell'ordine di alcune decine di litri e conservata in recipienti di vetro o polietilene dedicati esclusivamente a questo scopo. I recipienti devono essere mantenuti al riparo da fonti di contaminazione e preferibilmente anche dalla luce per evitare crescita algali o batteriche indesiderate.

Se viene utilizzata un'acqua naturale, è necessario filtrarla attraverso membrane da $0,22 \mu\text{m}$, minimizzando in questo modo l'eventualità di un apporto incontrollato di cibo o comunque di particelle aventi valore nutrizionale, come pure l'introduzione di agenti patogeni o di altri organismi indesiderati. Se necessario, si può correggere il contenuto di alcuni dei costituenti maggiori aggiungendo sali di grado analitico (MgSO_4 , CaCl_2 , NaHCO_3 , KCl) o diluendo con acqua Milli-Q. Il passaggio su una colonna di carbone attivo può avere un effetto migliorativo sulla qualità del mezzo, e tuttavia si raccomanda il controllo analitico periodico di alcuni parametri.

Qualora si voglia adottare un nuovo mezzo di coltura è opportuno verificarne preliminarmente l'idoneità su un numero limitato di organismi. La procedura consigliata è quella del confronto con un mezzo di idoneità comprovata e a tale scopo si allestisce un saggio della durata minima di 7 giorni, nel quale due gruppi di 10 organismi ciascuno, sono esposti rispettivamente ai due mezzi da confrontare. La procedura è lo stessa prevista per il saggio cronico con *C. dubia*, ed i parametri di interesse sono sopravvivenza e attività riproduttiva a cui possono essere aggiunti la lunghezza o il peso secco degli organismi.

A4 – Alimentazione

Sono varie le diete che sono state e sono utilizzate con successo per nutrire *C. dubia*. Generalmente, esse risultano dalla combinazione di più ingredienti, ciascuno dei quali insufficiente al mantenimento del crostaceo, se somministrato singolarmente (Cooney et al., 1992b; Knight e Waller, 1992; Viganò, 1992). Di solito si tratta di colture di una o più specie algali, di mangime per pesci, di lievito o suoi estratti, di foglie di cereali, vitamine e così via. Sembra accertato che il componente di base della dieta debba essere un'alga unicellulare. La Cloroficea *Selenastrum Capricornutum* (preparata come in A5.1) si è dimostrata idonea allo scopo e va somministrata quotidianamente, in modo da garantire una densità pari, orientativamente, a 200-250.000 cell/mL (US EPA, 1989; Cooney et al., 1992b). I metodi EPA (1989) e ASTM (1989) prevedono che la dieta algale venga integrata con un secondo alimento rappresentato da una miscela di tre ingredienti: mangime per pesci, foglie di cereali (Cerophyl®) e lievito (vedi A5.2). Questo alimento, preparato in sospensioni contenenti 1,8 g/L di solidi sospesi, è somministrato giornalmente in volumi pari a 100 mL per 15 mL di mezzo acquoso, o anche in ragione di 12 mg di solidi per ogni litro di coltura di *C. dubia*. Sia nel caso in cui la sospensione venga preparato di fresco o sia ottenuta da una aliquota scongelata, se ne consiglia il rinnovo con frequenza settimanale.

Nei laboratori IRSA-CNR è in uso una dieta semplificata secondo la quale l'alga *S. capricornutum* è somministrata ad una densità di poco superiore a quella della dieta originale, unitamente o una sospensione di lievito e a una soluzione di vitamine (vedi A5.3).

A5 - Preparazione della dieta

A5.1 - Sospensione algale

L'alga *S. capricornutum* viene coltivata in un mezzo di coltura preparato a partire da quattro soluzioni composte dai sali di seguito indicati:

Soluzione 1:		
NaNO ₃	25,500	g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12,164	g/L
CaCl ₂	4,410	g/L
H ₃ BO ₃	185,520	mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415,380	mg/L
ZnCl ₂	3,270	mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,428	mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,012	mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,260	mg/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	160,000	mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	300,000	mg/L
Soluzione 2:		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14,700	g/L
Soluzione 3:		
K ₂ HPO ₄	1,044	g/L
Soluzione 4:		
NaHCO ₃	15,000	g/L

I sali di grado analitico, vengono solubilizzati in acqua bidistillata o Milli-Q filtrata su membrane da 0,22 µm. Il mezzo di coltura è ottenuto per diluizione delle quattro soluzioni in ragione di 2 mL di ciascuna di esse per ogni litro di mezzo. La diluizione è anch'essa effettuata con acqua bidistillata o Milli-Q filtrata attraverso membrane con porosità di 0,22 µm. Il mezzo viene inoculato con un volume di sospensione algale tale da ottenere una densità di circa 200.000 cell/mL. Il mezzo inoculato è posto in incubazione alla temperatura di 20±2°C, con un fotoperiodo di 16 ore di luce/8 ore di buio e un'intensità luminosa di circa 400 lux fornita da lampade del tipo cool-white. Nel corso dell'incubazione, il mezzo è aerato insufflando aria filtrata attraverso cannule in vetro con un flusso sufficiente a mantenere le cellule algali continuamente disperse. La scarsa agitazione può rendere inutilizzabile la coltura. Dopo 5-6 giorni di incubazione la biomassa algale raggiunge una densità prossima ai 9-10 milioni di cell/mL e si procede alla sua separazione dai residui del mezzo di coltura. Tale operazione si effettua per centrifugazione della sospensione a circa 400 RCF per 5-10 minuti. Il sovrantante è eliminato mentre le alghe vengono ridisperse in acqua, utilizzando preferibilmente quella di allevamento del cladocero ma con durezza ridotta a 30-50 CaCO₃/L. Si procede quindi, ad una seconda centrifugazione ed alla raccolta delle cellule algali in un unico contenitore nel quale verranno conservate. In mancanza di una centrifuga o di un rotore di dimensioni adeguate, si pongono i contenitori usati per la coltura dell'alga in un frigorifero e si lasciano in quiete per diversi giorni in modo che le cellule possano sedimentare; i residui del mezzo di coltura sono poi rimossi per sifonamento (ASTM, 1989; US EPA, 1989). Il volume finale della sospensione, per i cui aggiustamenti si ricorre alla stessa acqua dei lavaggi, deve essere tale da approssimare una densità di circa 100 milioni di cell/L. La sospensione algale così ottenuta è conservabile per alcuni mesi al buio e alla temperatura di 4°C e potrà essere la fonte dell'inoculo della successiva coltura.

Le operazioni descritte per la coltura del *S. capricornutum* devono essere condotte rispettando alcune precauzioni elementari volte a prevenire la contaminazione della coltura da parte

di altre specie, algali e non. Si deve operare pertanto, in condizioni di massima pulizia, meglio se in condizioni asettiche (sterilizzazione dei recipienti con autoclave, cappe a flusso laminare ecc.) anche se una limitata contaminazione batterica non sembra influire negativamente sul risultato finale (ASTM, 1989).

A5.2 – Alimento composito

L'alimento composito che in letteratura è spesso indicato con la sigla "YTC" (ASTM, 1989; US EPA, 1989), viene preparato secondo le seguenti indicazioni.

La preparazione a base di cibo di pesce richiede una settimana. Ad 1 L di acqua Milli-Q vengono aggiunti e miscelati 5 g di mangime pelletizzato per trota o mangime in scaglie (Tetramin®). La sospensione viene mantenuta in aerazione per una settimana, a temperatura ambiente, compensando l'evaporazione con acqua Milli-Q e tenendo il contenitore preferibilmente sotto una cappa aspirante a causa dell'odore sgradevole che si sviluppa durante il processo di digestione. Al termine, il contenitore viene posto in un frigorifero e lasciato in quiete in modo che la sospensione digerita possa sedimentare per un minimo di 1 ora. Si procede alla filtrazione attraverso un retino con maglie di apertura di 100-150 mm e si scarta il particolato. Per la preparazione delle foglie di cereali, 5 g del prodotto in polvere (Cerophyl®) vengono dispersi in 1 L di acqua Milli-Q. Mediante un agitatore magnetico, la sospensione viene mantenuta in agitazione a velocità moderata per un massimo di 24 ore e lasciata poi sedimentare per almeno 1 ora, ed eventualmente filtrata attraverso un retino con maglie da 100-150 mm, scartando il materiale particolato.

Per la preparazione a base di lievito, si disperdono energicamente 5 g di lievito disidratato (*Saccharomyces cerevisiae*) in acqua Milli-Q, sino alla completa sospensione del prodotto.

L'alimento composito è ottenuto per miscelazione di uguali volumi (circa 300 mL) dei tre preparati e cioè, della sospensione di lievito, della fase decantata od ottenuta per filtrazione di mangime di pesce e di quella ottenuta dalle foglie di cereali.

Prima che l'alimento composito possa essere utilizzato per la coltura di *C. dubia*, è necessario che ne venga determinato il contenuto di solidi sospesi. Tale contenuto, calcolato come media del valore di due repliche di 5 mL ciascuna, essiccate a 105°C per 24 ore, deve essere aggiustato, se necessario, ad un valore di 1,8 g/L. L'alimento può essere suddiviso in aliquote di 50-100 mL che verranno congelate e in tal modo conservate fino al momento dell'uso. Il cibo scongelato e conservato in frigorifero, potrà essere usato per un massimo di 2 settimane, ma sostituito preferibilmente dopo una sola settimana.

In alcuni laboratori, il processo di preparazione periodica e congelamento è limitato al solo mangime di pesce che viene pertanto, miscelato con aliquote preparate al momento dell'uso tanto a di lievito che di Cerophyl®. Il periodo massimo d'impiego resta invariato.

A5.3 – Dieta semplificata

Presso i laboratori dell'IRSA-CNR è in uso una dieta semplificata rispetto a quella proposta nei metodi US EPA(1989) o ASTM (1989) e descritta nei paragrafi precedenti. Nella dieta semplificata, l'alga *S. capricornutum* è somministrata giornalmente in modo da garantire densità di 300.000 cell/mL, mentre l'alimento composito è stato sostituito con una sospensione di cellule di lievito (*S. cerevisiae*) ed una soluzione di tre vitamine.

La prima è preparata con i panetti di lievito commercializzati per la panificazione. Nell'acqua usata per l'allevamento di *C. dubia*, con durezza ridotta a 30-50 mg CaCO₃/L viene dispersa una quantità di lievito tale da approssimare la densità di 100 milioni di cell/mL. Come nel caso dell'alga, anche la sospensione di lievito è conservabile al buio, a 4°C ed è somministrata giornalmente in volumi tali da garantire una densità di 300.000 cell/mL.

Le vitamine sono preparate in un'unica soluzione contenente tiamina cloridrato (vitamina B₁) 75 µg/L, biotina (vitamina H) 0,75 µg/L e cianocobalamina (vitamina B₁₂) 1 µg/L. Per agevolare l'impiego di quantitativi così modesti si consiglia di ricorrere a una o più soluzioni concentrate. La soluzione di vitamine, che è conservabile congelata per tempi pressochè indefiniti, viene aggiunta al momento dell'uso all'acqua di allevamento del crostaceo e nella quantità di 1 mL/L.

A6 - Riproduzione

L'attività riproduttiva di *C. dubia* è largamente dipendente dalla temperatura, dalla qualità dell'acqua e dalla qualità e quantità del cibo (ASTM, 1989). La temperatura dell'acqua delle colture deve essere mantenuta al valore cui saranno condotte le prove di tossicità e pertanto a $20\pm 1^\circ\text{C}$ o $25\pm 1^\circ\text{C}$. *C. dubia* ha ricevuto grande attenzione soprattutto perchè permette di condurre un saggio cronico in 7 giorni a 25°C , mentre il saggio acuto con questo organismo è di interesse minore se non quando è posto in relazione con i dati di tipo cronico. Per questo motivo la grande maggioranza dei saggi acuti è condotta alla temperatura di 25°C , invece che a 20°C , e per lo stesso motivo gran parte dei dati sulla riproduzione e sull'allevamento di *C. dubia* proviene da colture mantenute a 25°C . Se, tuttavia, si decide di allevare l'organismo a $20\pm 1^\circ\text{C}$, si tenga presente che la sua longevità aumenta (da circa 30 a 50 giorni), che diminuisce la frequenza delle schiuse prodotte, e che il numero medio di neonati per schiusa è maggiore che non alla temperatura superiore (Cowgill et al., 1985).

Il fotoperiodo consigliato è di 16 ore di luce e 8 di buio. All'opposto una consistente riduzione delle ore di luce potrebbe stimolare una indesiderata produzione di individui di sesso maschile al punto che il mantenimento della stessa coltura diverrebbe problematico (Cooney et al., 1992a). Per quanto riguarda l'intensità luminosa, livelli comunemente riscontrabili in laboratorio possono essere accettabili e, in ogni caso, si consigliano valori che siano compresi nell'ambito di 500-1000 lux. Si tenga presente che le elevate intensità luminose possono indurre un'attività fotosintetica del *Selenastrum* somministrato come alimento, tale da aumentare il pH del mezzo sino a valori che potrebbero rivelarsi dannosi o anche letali per il crostaceo ($\Delta \text{pH } 9$). Compatibilmente con il potere tampone dell'acqua di coltura e con la densità di alghe presenti, può essere preferibile mantenere valori di intensità luminosa prossimi al limite inferiore dell'intervallo consigliato (ASTM, 1989).

Alla temperatura di $25\pm 1^\circ\text{C}$, *C. dubia* produce 3 schiuse in 7 giorni, con una sequenza secondo la quale la prima schiusa è prodotta al quarto giorno di vita ed è costituita da 3-6 neonati; la seconda è prodotta al quinto o anche al sesto giorno e si compone, mediamente, di 5-10 neonati; la terza schiusa infine, ha luogo al settimo giorno e può comprendere da 7 a 14 individui. I valori minimi e massimi sopra riportati che peraltro hanno valore indicativo, si riferiscono rispettivamente ad un'attività riproduttiva accettabile e ad una ottimale. Valori inferiori a 15 neonati totali nelle prime tre schiuse indicano la presenza di problemi nella coltura.

A7 - Organismi per il saggio

Per l'allestimento del saggio devono essere utilizzati i neonati di *C. dubia* aventi età ≤ 24 ore e appartenenti alla terza schiusa o successive. Se l'acqua del corpo idrico da saggiare o l'acqua usata per le diluizioni di effluente, hanno caratteristiche sostanzialmente diverse dall'acqua usata per la coltura degli organismi, è necessario che i neonati da utilizzare nel saggio, siano prodotti da femmine allevate per almeno 7 giorni nella stessa acqua usata per le diluizioni del saggio di tossicità o in un'acqua con caratteristiche similari.

Gli organismi da saggiare devono provenire da un gruppo di femmine mantenute in condizioni di allevamento controllato. Non si devono utilizzare i neonati prodotti da femmine che non rispondono ai criteri di qualità indicati per la sopravvivenza e l'attività riproduttiva, o che comunque manifestino sintomi di condizioni colturali scadenti. Come ulteriore criterio guida si può suggerire l'utilizzabilità di neonati appartenenti a schiuse composte da almeno 7-8 individui. I neonati prodotti nelle 24 ore immediatamente precedenti all'allestimento del saggio hanno l'età richiesta per la conduzione della prova tossicologica. È preferibile che essi siano nutriti se non utilizzati entro 2-3 ore dalla raccolta.

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1989): "Standard guide for conducting three-brood, renewal toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia*", American Society for Testing and Materials, ASTM E 1295-89.

- BERNER D.B. (1986): "The taxonomy of *Ceriodaphnia* (Crustacea: Cladocera)". in U.S. Environmental Agency cultures. Environmental Monitoring and Support Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, 45268, EPA/600/4-86/032.
- COONEY J.D., DEGRAEVE G.M., MOORE E.L., LENOBLE B.J., POLLOCK T.L. & SMITH C.I. (1992a): "Effects of environmental and experimental design factors on culturing and toxicity testing of *Ceriodaphnia dubia*", *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 839-850.
- COONEY J.D., DEGRAEVE G.M., MOORE E.L., LENOBLE B.J., PALMER W.D. & POLLOCK T.L. (1992b): "Effects of food and water quality on culturing of *Ceriodaphnia dubia*", *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 823-837.
- COWGILL U.M., KEATING K.I. & TAKAHASHI I.T. (1985): "Fecundity and longevity of *Ceriodaphnia dubia/affinis* in relation to diet at two different temperatures", *J. Crust. Biol.*, **5**, 420-429.
- KNIGHT J.T. & WALTER W.T. (1992): "Influence of the addition of Cerophyl on the *Selenastrum capriornutum* diet of the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*", *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 521-534.
- MARGARITORA, F. (1983): "Cladoceri (Crustacea: Cladocera), in "Guide per il riconoscimento delle specie animali nelle acque interne italiane, CNR, P. F. "Promozione della Qualità dell'Ambiente n. 22, CNR AQ/1/197, pp. 169.
- MOUNT. D.I. & NORBERG T.I. (1984): " A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test", *Environ. Toxicol. Chem.*, **3**, 425-434.
- PATTERSON P.W., DICKSON K.L., WALLER W.T. & RODGERS J.H. (1992): "The effects of nine diet and water combinations on the culture health of *Ceriodaphnia dubia*", *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 1023-1035.
- RUE J.W., FAVA J.A. & GROTHE D.R. (1988): "A review of inter- and intralaboratory effluent toxicity test method variability, in *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 10th vol., ASTM STP 971, W.J. Adams, G.A. Chapman and W.G. Landis, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 190-203.
- US EPA (1989): "Cladoceran, *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction test", Method 1002, in *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*, C.I. Weber, W.H. Peltier, T.J. Norberg, W. B. Horning, F.A. Kesler, J. Menkedick et al., EMSL, U.S Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA-600/4-89-001.
- US EPA (1991): "Methods for measuring toxicity of effluents to freshwaters and marine organisms", U.S Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-90/027, Cincinnati, OH.
- VIGANÒ L. (1991): "Suitability of commercially available spring waters as standard for culturing *Daphnia magna*", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 775-782.
- VIGANÒ L. (1992): "Prime applicazioni del saggio a 7 giorni con *Ceriodaphnia dubia* allo studio della tossicità di acque superficiali", in *Atti del 5° Congresso Nazionale S.It.E.*, Marchetti R. e Cotta Ramusino M. eds., Milano 21-25 settembre, 677-682.