

L. MANFRA, F. SAVORELLI^{1,2}, L. MIGLIORE³, I. GARTNER⁴, F. GELLI², M. INGLESE⁵,
T. LEONI⁶, G. LIBRALATO⁷, F. MARTELLI⁸, B. DI LORENZO¹, E. MAGALETTI¹

¹Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare (ICRAM)
Via di Casalotti, 300 - 00166 Roma, Italia.

l.manfra@icram.org

²ARPA Emilia Romagna, Ferrara, Italia.

³Dip. di Biologia, Università di Roma, Italia.

⁴ARPA Toscana, Piombino, Italia.

⁵Dip. Scienze Biologiche, Università di Napoli, Italia.

⁶ARPA Marche, Italia.

⁷Dip. di Scienze Ambientali, Università di Venezia, Italia.

⁸ARPA Toscana, Grosseto, Italia.

PRIMA ESPERIENZA DI INTERCONFRONTO SUL SAGGIO DI SCHIUSA CON *ARTEMIA FRANCISCANA*

FIRST EXPERIENCE OF COMPARISON ON THE HATCHING BIOASSAY WITH ARTEMIA FRANCISCANA

Abstract

In order to verify the interlaboratory variability of the hatching test, 7 laboratories conducted one 24h bioassay, using cysts of Artemia franciscana (Crustacean: Anostraca) exposed to $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$. The dry weight of the nauplii estimates the success rate of the development and hatching complete process. Statistical analyses showed no significant differences in the data produced by most of the laboratories.

Key-words: bioassays, Artemia franciscana, interlaboratory variability.

Introduzione

Nell'ambito del Gruppo di lavoro UNICHIM "Metodi biologici – Acque salate/salmastre e sedimenti", alcuni componenti del sottogruppo *ad hoc* "Cro-stacei" hanno condotto un esercizio di interconfronto sul saggio di schiusa con *Artemia franciscana*.

L'interconfronto si è svolto nel periodo febbraio-giugno 2006, coinvolgendo 7 laboratori afferenti ad Istituti di Ricerca, Università ed Agenzie Regionali per l'Ambiente (ICRAM, Roma; Università Ca' Foscari, Venezia; Università Federico II, Napoli; Università Tor Vergata, Roma; ARPA Marche, Macerata; ARPA Toscana, Grosseto e Piombino).

Considerando che la maggior parte dei laboratori era alla prima esperienza di conduzione di questo saggio, la finalità per cui è stato effettuato l'interconfronto è stata quella di verificare la fattibilità di applicazione del metodo. E' stata valutata, inoltre, la variabilità interlaboratorio del test a 24h.

Materiali e metodi

L'esercizio di interconfronto è stato realizzato applicando il protocollo riportato in Migliore *et al.* (1997). Le prove sono state condotte con un lotto di cisti commercializzate da Argent Chemical Laboratories con il nome "Argentemia – tipo Gold" (AG). Ciascun laboratorio ha eseguito un test con tre repliche saggiando diverse concentrazioni di $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, sostanza di riferimento indicata per Artemia in APAT IRSA-CNR (2003).

Il saggio di schiusa è stato realizzato in schiuditoi da acquariofilia contenenti ciascuno 750 ml di ogni soluzione di trattamento (5,0-7,1-10,1-14,4 mg/l di

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) e di controllo. Come acqua di diluizione per la preparazione delle soluzioni e per il controllo è stata utilizzata acqua di mare artificiale ottenuta aggiungendo 35 g di sale *Instant Ocean*[®] ad 1 l di acqua MilliQ. 1 g di cisti di *A. franciscana* è stato riposto nel comparto più esterno di ogni schiuditoio; dall'involucro rigido (*emergence*) delle cisti e dalla membrana più interna (*hatching membrane*) fuoriescono i naupli. Questi, se sono normalmente sviluppati, attivi e fototattici positivi, si muovono fino al centro dello schiuditoio raggiungendo un'apertura da cui entra la luce. Al centro dello schiuditoio è posto un cestellino di plastica rimovibile con fondo in rete sul quale i naupli si aggregano; questo consente di raccogliarli facilmente dopo 24 e 48 h di esposizione (dati a 48 h non riportati).

I naupli raccolti sono stati filtrati su filtri prepesati da 0,45 μm , ciascuno dei quali è stato poi essiccato a 50 ± 2 °C per 24 h e ripesato per ottenere il peso delle artemie schiuse (differenza tra il peso secco del filtro contenente le larve ed il peso del filtro prima di essere utilizzato). Il peso dei naupli raccolti è misura della percentuale di schiusa e di sviluppo.

Considerata la mancanza di esperienza di molti dei laboratori partecipanti, in questa prima prova preliminare si è scelto di limitare l'analisi intralaboratorio alle sole soluzioni di controllo. Per la buona riuscita dell'esercizio, infatti, è di fondamentale importanza che i laboratori ottengano percentuali di schiusa il più possibile simili tra loro.

Pertanto, allo scopo di verificare se esistono differenze statisticamente significative fra laboratori, è stata eseguita un'analisi della varianza (ANOVA), sulle percentuali di schiusa relative ai controlli ottenuti da tutti i laboratori partecipanti.

L'ANOVA ed il test di Dunnett sono stati applicati ai dati ottenuti da ciascun laboratorio, per verificare se e quali concentrazioni di $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ risultassero significativamente differenti dai controlli.

Risultati

Prima di eseguire l'interconfronto ogni laboratorio ha verificato che le cisti di *Artemia franciscana* avessero una % di schiusa $\geq 90\%$ (Manfra *et al.*, 2007).

L'ANOVA ed il test di Dunnett, eseguiti sui dati provenienti da ogni singolo saggio, hanno evidenziato per 6 laboratori su 7 (cioè escluso il laboratorio 11) una differenza statisticamente significativa tra le diverse concentrazioni di solfato di rame saggiate ed il controllo ($p < 0,05$). D'altra parte la quantità di cisti schiuse in seguito ad esposizione al $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ è risultata essere più bassa rispetto a quella osservata nel controllo "K"⁴ (Fig. 1), evidenziando un effetto tossico della sostanza nei confronti di *A. franciscana*; inoltre il tasso di schiusa è risultato diminuire passando dalle concentrazioni più basse a quelle più elevate. Un laboratorio ha effettuato ulteriori osservazioni sui naupli provenienti dalla schiusa delle cisti: nelle diverse concentrazioni saggiate i naupli sono stati ritrovati immobili, a partire dalle prime 24 h di esposizione, nella zona periferica degli schiuditoi, mentre nei controlli le larve immobili sono state osservate solo dopo un'esposizione superiore alle 48 h e sempre posizionate nella parte centrale degli schiuditoi.

Questi risultati hanno confermato l'effetto tossico della sostanza saggiata in termini di immobilizzazione delle larve, dovuta ad alterazioni diverse che possono essere a carico dei processi di sviluppo, o della capacità motoria o della risposta fototattica.

Sebbene il laboratorio 10 abbia ottenuto una percentuale di schiusa particolarmente bassa, l'analisi della varianza condotta sui dati relativi ai controlli non

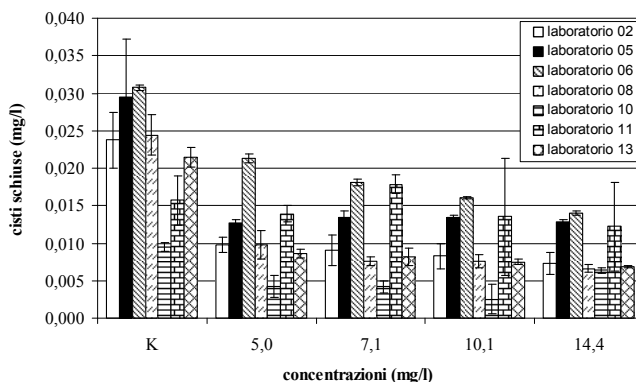


Fig. 1 - Peso netto delle cisti schiuse dopo 24h di esposizione.

Net weight of hatched cysts after 24h of exposition.

ha evidenziato differenze significative tra i valori medi ($\alpha=0,01$) mostrando che i dati prodotti da tutti i laboratori sono tra di loro confrontabili e che, quindi, il metodo può essere facilmente applicato anche da laboratori con poca esperienza.

Conclusioni

Tale attività di interconfronto ha permesso di acquisire competenze riguardo ad un test che, pur conservando la semplicità e la rapidità di un test acuto, può essere considerato cronico a breve termine. Utilizza, infatti, un *endpoint* complesso, poiché valuta il grado di successo del processo completo di schiusa e di sviluppo dell'*A. franciscana*.

La percentuale di schiusa nei trattamenti con $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ è risultata essere più bassa rispetto a quella osservata nel controllo, evidenziando un effetto tossico della sostanza nei confronti di *A. franciscana*. Tale effetto tossico è stato valutato anche per l'*endpoint* immobilizzazione (Manfra *et al.*, 2007), tuttavia per confrontare la sensibilità tra i due tipi di saggio sarà necessario proseguire la sperimentazione fino alla definizione di grandezze confrontabili, come ad esempio NOEC e LOEC.

Vista la bassa variabilità dei dati relativi ai controlli prodotti dai 7 laboratori partecipanti, questa prima esperienza di interconfronto consente di proporre il test di schiusa con *Artemia franciscana* come un potenziale valido strumento di indagine nell'ambito delle valutazioni ecotossicologiche.

Bibliografia

APAT IRSA-CNR (2003) - Metodi analitici per le acque. Manuali e linee guida 29/2003. Volume terzo. Metodo 8060.

MANFRA L., DI LORENZO B., BELLARIA V., DE PALMAS F., FLORIS B., GARTNER I., GELLI F., INGLESE M., LEONI T., LOSSO C., MARTELLI F., MARTONE C., MIGLIORE L., PALAZZI D., RIGHINI P., MAGALETTI E., SAVORELLI F. (2007) - Interconfronto sul saggio acuto di immobilizzazione con *Artemia franciscana*. *Biol. Mar. Mediterr.*, **14** (1): 59-63.

MIGLIORE L., CIVITAREALE C., BRAMBILLA G., DOJMI DI DELUPIS G. (1997) - Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Water Research*, **31** (7): 1801-1806.