

IMPIEGO DELLA DAPHNIA PULEX De Geer PER LA RIVELAZIONE DI INSETTICIDI ESTRATTI DA VEGETALI

Nell'ambito delle indagini sulle possibilità di impiego di tests biologici per l'analisi di residui di antiparassitari sulle derrate vegetali abbiamo rivolto la nostra attenzione anche alla *D. pulex*, piccolo crostaceo vivente nelle acque dolci.

Le ragioni che ci hanno indirizzato a sperimentare anche questo organismo sono legate sia alla sua grande sensibilità a diversi fitofarmaci — segnalata da alcuni ricercatori — ed alla relativa rapidità con cui possono essere condotti — con il suo uso — i saggi di cui si parla (Wasserburger 1952, Kämpfe 1951-1953, Kocher 1953, Pfaff 1955, Wyniger 1961, Fhrese 1963).

La presente ricerca, inoltre, va inquadrata in un programma di indagini che stiamo intraprendendo in merito alla pericolosità che erbicidi, distribuiti sulle infestanti emerse e sommerse dei canali, possono esercitare nei confronti dei pesci e su quegli organismi di cui i pesci d'acqua dolce si cibano, fra cui un ruolo di notevole importanza è svolto, appunto, da alcune specie di *Dafnia*.

A tal proposito, già da tempo, ricercatori di altri paesi hanno condotto delle indagini utilizzando prevalentemente *Daphnia magna* Straus. Fra di essi Scheuring e Haug (1933) dimostrarono come soluzioni al 2% ed all'1% di cloruro di sodio o di potassio provocassero la morte di tutti gli organismi utilizzati, già dopo 5 o 6 ore e Neururer e Slanina (1960) osservarono come la *Dafnia* fosse in grado di sopportare per 7 giorni, senza trarne alcun apparente danno, 2 mg/l di 2,

4, 5 acido triclorofenossiacetico (2, 4, 5 T) e 2 mg/l di M.C.P.A. (acido 2-metil-4 clorofenossiacetico).

Il problema che ci siamo proposti di affrontare con la presente indagine era quello di controllare il grado di sensibilità della *Daphnia pulex* De Geer (da noi preferita alla *D. magna* Straus perché dotata di maggiore sensibilità come viene riferito da Kocher (1953) e da Wyniger, 1961), a diversi insetticidi sia fosforati organici che cloroderivati. Abbiamo inteso accertare, inoltre, quale, fra i diversi metodi di estrazione per i residui di insetticidi dalle matrici vegetali, ci permettesse di ottenere un estratto sufficientemente puro da tutte quelle impurezze che avrebbero potuto interferire sui risultati delle nostre prove, pur garantendo un soddisfacente recupero del residuo presente nella sostanza vegetale.

Le analisi per il controllo della sensibilità del test sono state condotte, secondo il metodo descritto da Foschi, Cesari e Olmo (1967), in base al quale diverse concentrazioni di prodotto da esaminare sono lasciate evaporare in cristallizzatori di vetro in cui vengono, in seguito, aggiunti 10 cc di acqua di allevamento ed immersi 25 individui adulti di *D. pulex* di età compresa fra i 6 e i 7 giorni.

Il rilievo dei risultati è stato effettuato dopo 16 ore dalla messa a contatto; in certi casi, però, l'intervallo di tempo è stato notevolmente ridotto, data l'estrema rapidità di azione che i fitofarmaci mostravano di avere esercitato nei riguardi del suddetto organi-

smo. In questi rilievi la tossicità veniva valutata conteggiando il numero di individui incapaci di nuotare che giacevano, quasi immobili, sul fondo dei contenitori; tali valori sono espressi in percentuale di mortalità.

I dati ottenuti sono stati, in seguito, rappresentati graficamente mediante una retta di regressione dei cui parametri ci si è serviti per procedere al controllo statistico della validità del saggio secondo il metodo di Litchfield e Wilcoxon (1949) e dalla quale si sono estrapolati i valori di DL_{25} , DL_{50} e DL_{95} , al fine di esprimere numericamente la ampiezza di sensibilità del test.

Con la metodica suddetta abbiamo saggiato la sensibilità della *Dafnia* ai seguenti prodotti: Azinfos-etile (Gusathion em.), Demeton (Systox), DDT, D.D.V.P., Dimetoato (Rogor), Endrina, Eptacloro, Isolano, Lindano, Parathion e Thiodan ed abbiamo ottenuto i risultati riportati nella Tab. 1.

Dall'esame dei dati rilevati si può osservare come *D. pulex* mostri un'elevatissima sensibilità ad alcuni prodotti quali il D.D.V.P., Azinfos-etile, Parathion e Sistox, fra i fosforati organici le cui DL_{50} variano da 0,0027 a 0,62 ppm, e l'Endrina e l'Eptacloro fra i cloroderivati, le cui DL_{50} vanno da 0,03 a 0,84 ppm. Tale crostaceo non è, invece, risultato altrettanto sensibile al DDT ed al Thiodan le cui DL_{50} sono superiori ad 1 ppm. È interessante notare, inoltre, dai risultati ottenuti con Dimetoato e con Isolano, l'estrema rapidità di indagine che si può raggiungere con l'impiego del test in questione in quanto la presenza di dosi diverse di anti-parassitari anche relativamente basse (0,20 ppm di Isolano), possono essere rivelate appena 6-7 ore dopo la messa a contatto di tali preparati con il test. La grande rapidità di analisi che, come risulta dalle nostre indagini, si può raggiungere con l'utilizzazione della *Dafnia* è un fattore di grande interesse soprattutto per ciò che riguarda l'impiego futuro di detto organismo in analisi di «routine» di derrate vegetali facilmente e rapidamente decomponibili.

* * *

Come si è detto, oltre ad indagini intese a saggiarne il grado di sensibilità, con la *D. pulex* abbiamo condotto degli esperimenti al fine di controllare quali metodi di estrazione da matrice vegetale — con un soddi-

sfacente recupero del residuo — ci permettessero di ottenere dei materiali sufficientemente purificati. Tale requisito è, ovviamente, essenziale per evitare che materiali estranei influissero sui risultati o rivelandosi, essi stessi, tossici nei riguardi del test, o mascherando ed esaltando l'attività del fitofarmaco in esame.

TABELLA N. 1 - Sensibilità della *Daphnia pulex* ad alcuni formulati commerciali, espressa in valori di DL_{25} , DL_{50} e DL_{95} rilevati sulle rette di regressione

PRODOTTO	DL_{25}	DL_{50}	DL_{95}	RILIEVO EFFETTUATO DOPO ORE:
Azinfos-etile . . .	0,0016	0,0027	0,011	16
Demeton (Systox)	0,021	0,035	0,120	16
DDT	0,41	1,35	—	16
DDVP	0,25	0,62	6,2	16
Dimetoato (Rogor)	2,2	4,1	10,9	7
Endrin	0,011	0,03	—	16
Eptacloro	0,20	0,51	5,20	6
Lindano	3,00	6,80	15,00	16
Parathion	0,007	0,025	0,25	16
Thiodan	1,55	3,20	12,00	16

I nostri saggi, in tal senso, sono stati effettuati con Endrin ed Azinfos-etile aggiungendo quantità diverse di detti prodotti ad omogenati di mela e sottoponendoli alle successive fasi estrattive. I metodi di estrazione adottati sono stati: quello descritto da Constance e coll. (1960), per gli omogenati contenenti Endrin e quelli indicati da Getz (1962) e da Laws e Webley (1961) per l'Azinfos-etile. Al termine dei procedimenti suindicati gli estratti sono stati sottoposti ad una successiva fase di purificazione, con colonna cromatografica, secondo le indicazioni di Borgatti, Cesari e Stanzani (1967).

Le analisi dei campioni sono state effettuate mettendo a confronto alcune diluizioni dei vari estratti con diverse quantità note (espresse in ppm) di una soluzione di principio attivo di confronto. I dati rilevati sono stati, poi, rappresentati graficamente e si è quindi proceduto all'analisi statistica ed al successivo «dosaggio» della quantità di resi-

duo presente nell'estratto con il metodo di Litchfield e Wilcoxon (1949) che è basato sulla determinazione del cosiddetto «rapporto di potenza» fra la DL₅₀ del campione da esaminare e quella dello standard di confronto.

Dai dati ottenuti dalle nostre indagini e riportati nelle Tab. 2 e 3, possiamo quindi trarre alcune indicazioni:

— per quanto riguarda il saggio con *Endrin* si è messo in evidenza che soltanto il 41,4% del residuo presente nell'omogenato è stato recuperato a seguito del procedimento estrattivo ed a tal proposito è interessante notare come ciò contrasti con il risultato di altre analisi, in cui però l'estratto non era stato sottoposto a purificazione mediante colonna cromatografica, che avevano fornito più soddisfacenti valori di recupero. Questo è, quindi, un chiaro indice che, almeno per ciò che concerne l'*Endrin*, la purificazione con tale tipo di «colonna» non appare pienamente soddisfacente determinan-

do una così grave perdita di prodotto.

Per l'*Azinfos-etile* si è avuto una forte differenza fra il recupero con il metodo di Getz, che è risultato quasi nullo e quello ottenuto con il metodo di Laws e Webley da cui il prodotto risulta totalmente estratto. Da queste analisi risulta quindi che, mentre per i fosforati organici si può ottenere, mediante un adeguato metodo estrattivo, un materiale sufficientemente esente da impurezze senza alcuna perdita di residuo, per l'*Endrina* e probabilmente per altri cloroderivati organici, la necessaria purezza dell'estratto può andare a grave detrimento dell'efficacia estrattiva.

Possiamo concludere, quindi, che la *D. pulex* è un test pienamente soddisfacente e per la sua elevata sensibilità ai diversi insetticidi e per la relativa rapidità di rilievo che il suo impiego consente di raggiungere. Questo organismo, inoltre, ha dimostrato di ben reagire anche in indagini su estratti da materiale vegetale.

TABELLA N. 2 - Recupero di *Endrin* da estratto di mela purificato, valutato con *Daphnia pulex*

CAMPIONI	DILUIZIONI	ppm DI PRODOTTO	MORTALITÀ %	DL 50 (LIMITI FIDUCIARI) ppm	R.P. (RAPPORTO DI POTENZA E LIMITI FIDUCIARI)	ENTITÀ DEL RECUPERO	
						ppm	%
Soluzione Standard di <i>Endrina</i>	0,0500	0,0500	64				
	0,0250	0,0250	48	0,03			
	0,0125	0,0125	25	(0,02-0,04)			
Estratto di mele purificato (**)	0,0500	—	76				
	0,0250	—	58	0,018	0,60		
	0,0125	—	46	(0,012-0,024)	(0,33-1,06)	0,0207 (*)	41,4

(*) Il risultato finale è ottenuto dividendo la quantità effettivamente presente nell'estratto per 4, poiché l'estratto è stato concentrato 4 volte.

(**) L'estratto è stato purificato con colonna cromatografica secondo il procedimento indicato nella nota di Borgatti, Cesari e Stanzani (1967).

TABELLA N. 3 - Recupero di Azinfos-etile da estratti di mele ottenuti con metodi diversi, valutato con la *Daphnia pulex*

CAMPIONI	DILUIZIONI	ppm DI PRODOTTO	MORTALITÀ %	DL 50 (LIMITI FIDUCIARI) ppm	R. P. (RAPPORTO DI POTENZA E LIMITI FIDUCIARI)	ENTITÀ DEL RECUPERO	
						ppm	%
Soluzione Standard di Azinfos-etile	0,4	0,4	68,90	0,18 (0,11-0,27)			
	0,3	0,3	60,66				
	0,2	0,2	53,33				
	0,1	0,1	36,66				
Estratto di mele ottenuto con il metodo Getz	0,4	—	24,66	1,05 (0,681-1,61)	5,83 (3,23-9,06)	0,0171	4,27
	0,3	—	16,66				
	0,2	—	16,66				
	0,1	—	14,66				
Estratto di mele ottenuto con il metodo Lawse & Webley	0,4	—	63,33	0,168 (0,109-0,258)	0,933 (0,51-1,67)	0,44	110,00
	0,3	—	61,33				
	0,2	—	50,00				
	0,1	—	44,00				

N.B. - In questi saggi gli estratti non sono stati concentrati.

BIBLIOGRAFIA

- BORGATTI A.R., CESARI A., STANZANI R. (1967), «Atti delle Giornate Fitopatologiche 1967».
- CONSTANCE A., MCKINLEY W.P. (1960), «J. Agr. Food. Chem.», 8, 186.
- FOSCHI S., CESARI A., OLMO E. (1967), «Atti delle Giornate Fitopatologiche 1967».
- FHRESE J.P., NIESSEN H. (1963), «Z. Analyt. Chem.», 192, 94-136.
- GETZ M. (1962), «J. Agr. Food. Chem.», 45, 2.
- KÄMPE L. (1951), «Anz. f. Schaedlingskunde», 24, 179-180.
- KÄMPE L. (1953), «Die Pharmazie», 8, 575-582.
- KOCHER C., ROTH W., TREBOUX J. (1953), «Mitt. d. Schwz. Entomol. Ges.», 26, 47.
- LAWSE E., WEBLEY D.J. (1961), «Analist», 86, 249.
- LITCHFIELD J.T., WILCOXON F. (1949), «J. Pharmacol. Exptl. Therap.», 96, 99-113.
- NUERURER H., SLANINA K. (1960), «Pflanzenschutzberichte», Wien, 24, 139-162.
- PPAFF W. (1955), «Z. Pflanzenkrankheit», 62, 361.

- SCHOURING L., HAUG G. (1933), «Bad. Fisch. Ztg.», 10, 17-21.
- WASSERBURGER H.J. (1952), «Die Pharmazie», 7, 731-734.
- WYNIGER R. (1961), citato da Needham P.H., «Insecticide Newsletter», 10-9, 345-363.

RIASSUNTO

Gli autori hanno condotto delle indagini intese a saggiare il grado di sensibilità del test ad insetticidi diversi, dalle quali risulta che la *D. pulex* è dotata di un'elevata sensibilità sia ai fosforati organici che ai cloroderivati ed ai carbammati. Si osserva inoltre la grande rapidità di analisi che si può raggiungere con il suddetto organismo. Sono state condotte prove, inoltre, per valutare diversi metodi di estrazione da matrici vegetali, ottenendo dei risultati pienamente soddisfacenti per quanto riguarda i fosforati organici, ma non altrettanto per il clorurati.