

➔ **monitoraggio biologico**

Caratteri morfologici come bioindicatori: ditteri chironomidi nelle acque dolci

Laura Marziali e Bruno Rossaro*

* DiPSA, Università degli studi di Milano

Il monitoraggio biologico è previsto dalla normativa europea (WFD, 2000/60/CE) e nazionale (D.L. 152/2006) per la valutazione della qualità degli ecosistemi fluviali e lacustri. Si basa anche sull'analisi delle comunità a macroinvertebrati bentonici, organismi invertebrati che vivono a stretto contatto con i sedimenti e sono considerati ottimi bioindicatori delle condizioni ecologiche dell'ecosistema

L'analisi chimica è in grado di fornire informazioni quantitative sullo stato dell'ambiente al momento del prelievo, mentre l'analisi biologica permette di valutare gli effetti sinergici che le diverse sostanze inquinanti determinano sul biota, nonché di individuare fenomeni episodici di inquinamento e di stress idrologico, che causano effetti irreversibili sulle comunità. Obiettivo imminente, richiesto dalla WFD, è di rendere questo sistema di valutazione quantitativo rispetto alle diverse forme di impatto.

Tra i macroinvertebrati, i Ditteri Chironomidi occupano un posto di rilievo per l'elevata ricchezza in specie e per l'estrema tolleranza ai fattori ambientali, costituendo modelli biologici unici. Mentre gli adulti vivono in ambiente aereo, gli stadi larvali e pupali



Fig.1- Pupa di *Chironomus anthracinus* (cortesia Klaus Peter Brodersen).

colonizzano i più svariati habitat d'acqua dolce, da torrenti, laghi e sorgenti a stagni, torbiere ed estuari. La capacità di questi animali di tollerare ampi gradienti di pH, salinità, profondità, concentrazione di ossigeno, temperatura e produttività permette loro di occupare tutte le nicchie ecologiche e tutti i livelli trofici presenti negli ambienti d'acqua dolce. Come accade per altri macroinvertebrati, essi sono potenzialmente ottimi bioindicatori, tuttavia il loro utilizzo è spesso ostacolato dalle difficoltà di identificazione alla specie, che rimane spesso appannaggio di esperti tassonomi. Mentre le larve di Chironomidi sono state inserite in diversi programmi di biomonitoraggio (es. in Italia: I.B.E., D.L. 152/1999), le pupe sono state a lungo trascurate (fig. 1). Tuttavia, esse possiedono

una notevole varietà di caratteri morfologici che permettono l'identificazione alla specie, a differenza delle larve che spesso possono essere identificate solo fino al genere o al gruppo di specie.

Lo stadio pupale ha una durata molto breve, raramente superiore a 72 ore, durante la quale l'organismo non si nutre e nella maggior parte dei casi rimane all'interno di tubi di sedimento prodotti dagli stadi larvali finali. La struttura pupale deve quindi essere altamente funzionale, dovendosi adattare velocemente, in assenza di forze selettive tradizionali, ai processi evolutivi delle larve e al loro ambiente di vita.

In particolare, il livello di ossigenazione è uno dei principali fattori che determinano la sopravvivenza delle pupe fino allo sfarfallamento, soprattutto negli ecosistemi

d'acqua ferma. Ciò implica una serie di adattamenti morfologici, fisiologici e comportamentali, che concorrono a determinare la resistenza e la tolleranza di ogni specie.

Adattamenti morfologici

Le pupe assorbono ossigeno attraverso la cuticola, ma molte specie possiedono un paio di organi respiratori specializzati, detti corni toracici, che costituiscono un'estensione dell'area superficiale e possono essere direttamente in connessione con il sistema tracheale. Nelle specie tubicole, l'ossigeno viene dunque assorbito direttamente dall'acqua attraverso l'intera superficie dei corni, che funzionano come branchie. Le specie colonizzatrici di habitat d'acqua ferma sono caratterizzate da corni toracici più o meno ramificati (Chironomini), mentre nelle specie reofile queste strutture sono ridotte o perfino assenti (Orthoclaadiinae) (fig. 2). Le pupe, inoltre, attuano movimenti ondulatori dell'addome che convogliano un flusso d'acqua ricca di ossigeno attraverso il tubo. Il segmento terminale dell'addome è modificato in lobi anali dotati di una frangia di macrosete più o meno sviluppata, che ha diversi scopi. Le specie tubicole presentano una folta frangia, che viene utilizzata per facilitare l'ondulazione; le grandi dimensioni corporee determinano una maggiore efficacia nel movimento. Le specie reofile sono generalmente più piccole ed hanno solo alcune spesse macrosete, che vengono usate come uncini per sfuggire al trascinarsi verso valle ad opera della corrente (fig. 3). Queste osservazioni hanno indotto ad ipotizzare l'esistenza di una relazione tra lo sviluppo di alcuni caratteri morfologici di questi organismi e le condizioni di ossigenazione delle acque in cui vivono. In particolare, è stato ipotizzato che la superficie del corno possa costituire una misura dell'optimum di ossigeno della specie. Allo stesso modo, l'estensione della frangia di

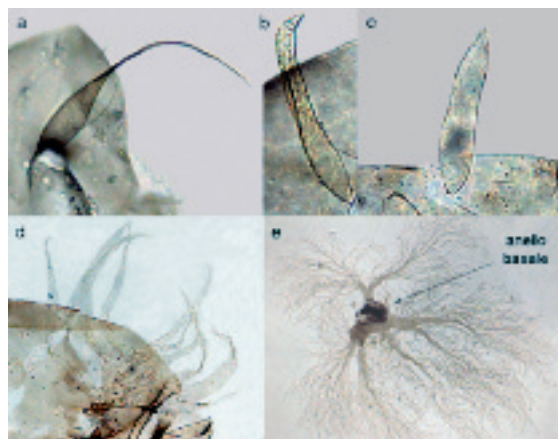


Fig. 2- Corno toracico di: Orthoclaadiinae (a-c, 40x); Chironomini (d: *Polypedilum nubeculosum*; e: *Chironomus plumosus*, 20x).

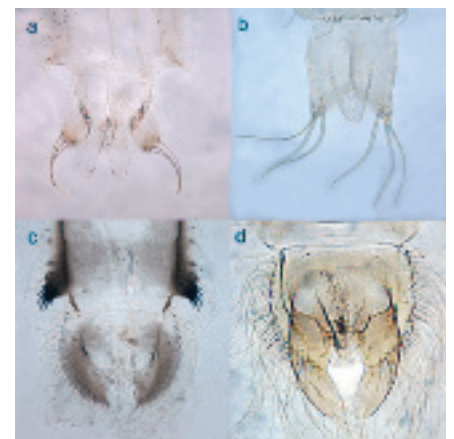


Fig. 3- Lobi anali con macrosete in pupe di Chironomidi: Orthoclaadiinae (a-b, 10x) e Chironomini (c: *Kiefferulus sp.*, 10x; d: *Paracladopelma camptolabis*, 20x).

sete potrebbe essere un indicatore del livello di ossigenazione dell'habitat in cui la specie vive. Infine, le dimensioni corporee sarebbero indicative della capacità ondulatoria specifica. Lo sviluppo massimo del corno toracico, della frangia anale e delle dimensioni corporee è presente ad esempio nelle specie di *Chironomus*, tipiche colonizzatrici di ambienti a scarsa ossigenazione (fig. 1). Apparenti eccezioni, quali le pupe fluviali dotate di frangia anale (es. *Rheocricotopus*), sono in realtà organismi tubicoli che colonizzano le zone a bassa velocità di corrente; allo stesso modo in *Thienemanniella* e *Corynoneura*, specie lacustri, l'estesa frangia compensa l'assenza del corno toracico e le piccole dimensioni. Queste caratteristiche morfologiche possono, dunque, essere tradotte in tratti autoecologici? La morfologia può dare informazioni quantitative sull'ambiente, utili in un eventuale sistema di biomonitoraggio?

Evidenze dai laghi italiani

Larve, pupe ed esuvie pupali di Chironomidi sono state raccolte negli ultimi 20 anni in 17 laghi italiani, per un totale di circa 300 campioni. Gli esemplari sono stati preparati in vetrini per microscopia e identificati al livello tassonomico più dettagliato possibile.

Per pupe ed esuvie pupali è stato contato il numero di ramificazioni del corno e di macrosete anali; è stata misurata inoltre la lunghezza dell'addome. I tre caratteri morfologici sono risultati positivamente correlati tra loro: taxa più grandi possiedono generalmente un corno più ramificato e frange anali più folte. Queste relazioni supportano l'ipotesi di una coevoluzione di queste strutture come adattamento a condizioni ambientali estreme, come quelle che possono verificarsi nella zona profonda dei laghi. Questi caratteri, inoltre, sono risultati correlati con i valori di percentuale di saturazione di ossigeno ipolimnico, fosforo totale e trasparenza misurati nei siti di prelievo, nonché con gli optima calcolati per ogni specie utilizzando i dati a disposizione relativi alle larve (fig. 4 e tab.1). In generale è emerso che corni altamente ramificati, frange anali sviluppate e una taglia corporea maggiore caratterizzano le specie più resistenti all'ipossia e a condizioni di trofia elevate (es. *Chironomus plumosus*), mentre taxa quali *Paratendipes*, *Polypedilum* e *Microtendipes*, dotati di corni poco ramificati, frange anali meno folte e minori dimensioni sono risultati più esigenti (figg. 2-4). Un'eccezione è costituita da *Stictochironomus*, che è risultato meno tollerante dell'atteso, pur vivendo negli strati

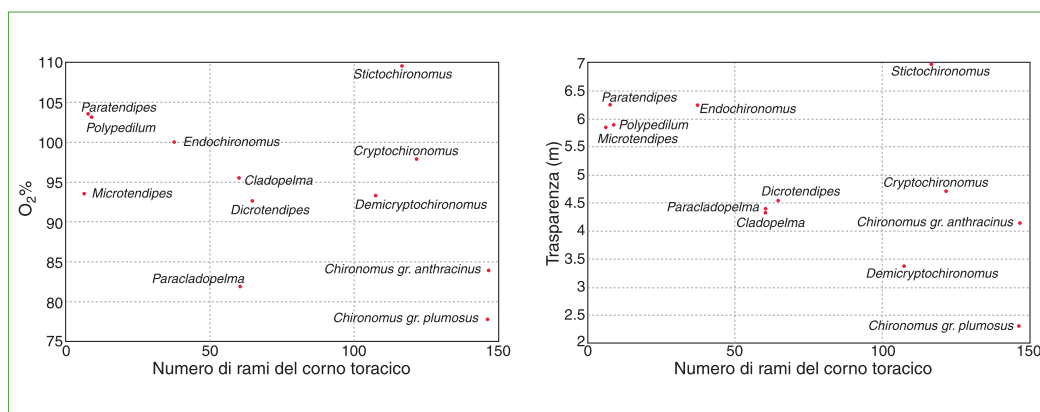


Fig. 4- Relazione tra numero di rami del corno toracico e percentuale di saturazione di ossigeno ipolimnico (sinistra) e trasparenza (destra) misurate nei siti in cui è stata riscontrata ogni specie.

Tabella 1 - Coefficienti di correlazione tra caratteri morfologici e optima delle specie (= media dei valori di una variabile ambientale pesata secondo l'abbondanza degli individui di una specie). Correlazioni significative: * = p<0,05.

Caratteri morfologici delle specie	Numero di rami del corno	Numero di macrosete anali	Lunghezza dell'addome
Numero di macrosete anali	0,68*	-	-
Lunghezza dell'addome	0,73*	0,86*	-
Optima delle specie			
Percentuale di saturazione di ossigeno ipolimnico	-0,43	-0,56*	-0,57*
Forforo totale	0,32	0,52	0,56*
Trasparenza	-0,59*	-0,62*	-0,58*

profondi dei sedimenti. Probabilmente la specie migra tra la zona superficiale dei sedimenti, dove immagazzina ossigeno nell'emoglobina, e la zona profonda, dove trova protezione. Per testare le ipotesi si è però reso necessario migliorare la misurazione della superficie respiratoria. Il corno è formato da tubi tracheali di diametro simile, che terminano nell'anello basale, in contatto diretto con i tubi tracheali dell'adulto che si sviluppa all'interno della pupa (fig. 2 e fig. 5). Più i tubuli sono numerosi nell'anello basale e più aiutano nell'apporto di ossigeno. Pertanto si è scelto di misurare l'area dell'anello basale quale indicatore del numero di tubuli e quindi della capacità respiratoria. Il rapporto medio tra l'area dell'anello basale e la lunghezza dell'addome di ogni specie è stato messo in relazione con l'optimum di ossigeno e

con il 25° percentile dei valori di ossigeno disciolto registrati nei siti in cui la specie era presente, evidenziando in entrambi i casi una correlazione negativa (rispettivamente $r=-0,41$ e $r=-0,62$, $p<0,01$) (fig. 6). È stato possibile inoltre individuare le specie tolleranti e intolleranti all'ipossia: *Chironomus anthracinus* è risultato meno tollerante dell'atteso, *Phaenopsectra flavipes*, *Cladopelma virescens* e *Paracladopelma camptolabis* più tolleranti dell'atteso. Queste specie potrebbero utilizzare altre forme di adattamento, quali strategie fisiologiche e/o comportamentali.

Adattamenti fisiologici e comportamentali

Molte specie di Chironomidi possiedono emoglobina ad alta affinità per l'ossigeno e sono in grado di variare la produzione

di questa molecola in risposta alle condizioni di ossigenazione dell'ambiente in cui vivono. Essa è deputata non solo all'assorbimento di ossigeno dall'acqua e al suo trasporto nell'emolinfa, ma anche all'immagazzinamento, consentendo così di mantenere il metabolismo aerobico anche in condizioni di ipossia. Quando le riserve di ossigeno vengono consumate, questi organismi attuano glicolisi anaerobica come strategia metabolica, consumando le riserve di glicogeno accumulate nel corpo.

La relazione tra microdistribuzione verticale nel sedimento e adattamenti allo stress da ipossia è stata studiata in Chironomidi lacustri litorali ed è emerso che le specie più grandi (e quindi con maggiori riserve di glicogeno) e gli individui dotati di maggior quantità di emoglobina (es. *Chironomus* gruppo *plumosus*) generalmente vivono più in profondità nel sedimento di altri (es. *Tanytarsus sp.*).

Tali taxa (es. *Chironomus*, *Dicrotendipes*, *Procladius*) hanno alta capacità ossigeno-regolatoria, in quanto mantengono alto il tasso di assimilazione di ossigeno dall'ambiente anche quando il livello di ossigenazione decresce. Sono quindi in grado di sopravvivere molti mesi in assenza totale di ossigeno, passando ad un metabolismo anaerobio ed infine alla dormienza. Dall'altro lato, taxa senza capacità di immagazzinamento dell'ossigeno (es. *Stictochironomus*, *Micropsectra*, *Hydrobaenus*) devono passare a strategie anaerobiche anche in presenza di basse concentrazioni residue di ossigeno nell'ambiente.

Il contenuto di emoglobina nell'emolinfa è stato determinato in larve appartenenti a 6 specie di Chironomidi (*Drabkin's solution* - SIGMA*; espressa come mg di Hb sulle proteine totali). È emersa un'ampia variabilità intraspecifica: ad esempio, individui giovani o litorali possiedono meno emoglobina dei conspecifici più maturi o profondi. Inoltre il contenuto di Hb non è risultato correlato

con la lunghezza dell'addome né con l'area dell'anello basale. È però risultato alto in specie piccole con corno ridotto (es. *P. nubeculosum*) e in specie grandi con corno sviluppato (es. *C. plumosus*) (fig. 7). Sono stati osservati, inoltre, comportamenti specifici in risposta alla diminuzione dei livelli di ossigenazione. Ad esempio, nei casi di forte carenza di ossigeno, le pupe di *Chironomus* possono lasciare il tubo e ondulare liberamente nell'acqua. Allo stesso modo, durante i periodi di anossia le larve delle specie meno tolleranti (es. *Tanytarsus sp.*) possono migrare verso la zona litorale prima della muta. È, inoltre, noto che le specie colonizzatrici di habitat ben ossigenati mostrano la tendenza ad aumentare la frequenza delle ondulazioni respiratorie a concentrazioni di ossigeno più elevate rispetto ai taxa che vivono in condizioni di ipossia; questi ultimi sono in grado di ventilare anche in anossia.

Conclusioni e risvolti applicativi

La struttura pupale nei Chironomidi si evolve da geni già presenti nella larva, che si attivano tardivamente negli stadi larvali maturi. L'evoluzione delle pupe è indipendente agli altri stadi vitali e la pressione selettiva è bassa, quindi vengono mantenute tutte le strutture che contribuiscono al successo dello sfarfallamento, mentre le forme aberranti vengono perse. Ciò fa sì che la pupa possa avere confini filogenetici e tassonomici anche più definiti rispetto alla larva e all'adulto: per questo le pupe presentano caratteri morfologici ben riconoscibili e altamente funzionali. Tra questi, la lunghezza dell'addome e l'area dell'anello basale possono essere considerati ottimi predittori di tolleranza all'ipossia. In particolare, sono più correlati con il 25° percentile di $[O_2]$, che non con la media ponderata (optimum delle specie), perché sono i valori più bassi di

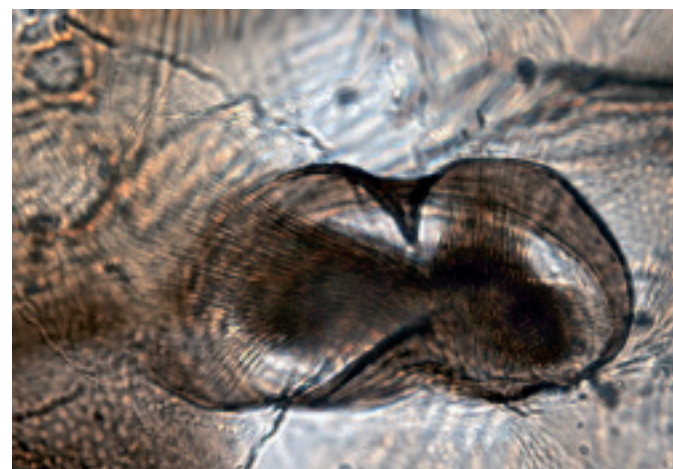


Fig. 5- Anello basale e tubuli tracheali del corno toracico di *Glyptotendipes pallens* (40x).

ossigenazione che determinano una selezione delle specie. Inoltre, i due caratteri vanno sempre considerati contemporaneamente, in quanto lo sviluppo del corno aumenta all'aumentare delle dimensioni corporee per sopperire al diminuire del rapporto superficie/volume. Le dimensioni corporee e lo sviluppo

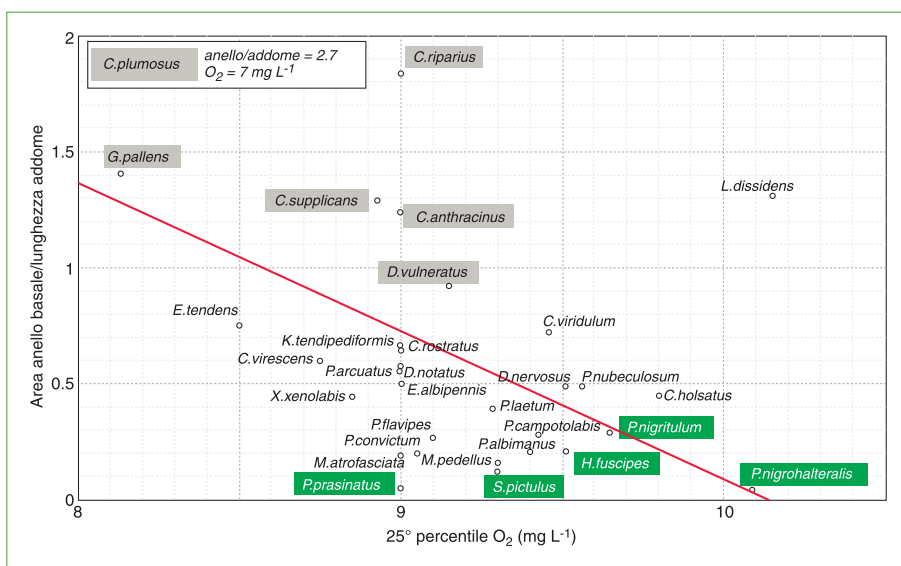


Fig. 6- Regressione tra il rapporto area dell'anello basale / lunghezza dell'addome e 25° percentile dei valori di ossigeno disciolto misurati nei siti di prelievo delle singole specie. Rettangoli grigi: specie tolleranti all'ipossia; rettangoli neri: specie intolleranti.

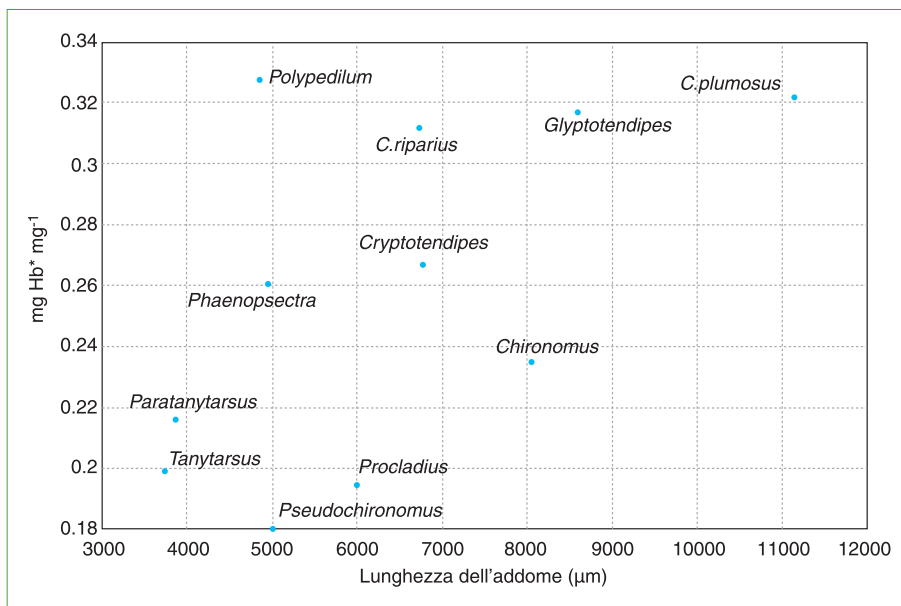


Fig. 7- Relazione tra lunghezza media dell'addome di alcune specie di Chironomidi (pupe) e concentrazione media di emoglobina nell'emolinfa.

del corno toracico possono quindi essere utilizzati come misure per quantificare l'effetto che ripetuti fenomeni di ipossia ed anossia provocano sul biota, in modo complementare rispetto alle analisi chimiche, che forniscono valori di ossigenazione puntiformi ed istantanei. Non è invece emersa una relazione chiara tra il contenuto di emoglobina

nell'emolinfa e la resistenza all'anossia. Probabilmente l'emoglobina va considerata come un adattamento rapido all'ambiente, in quanto l'animale reagisce istantaneamente producendone di più o di meno; al contrario, il corno e le dimensioni corporee sono caratteri stabili, ovvero adattamenti a lungo termine. I risultati suggeriscono comunque

un trend filogenetico verso un aumento della regolazione del metabolismo aerobico in risposta all'aumentare dei fenomeni di ipossia, grazie allo sviluppo di meccanismi di immagazzinamento dell'ossigeno. Suggestiscono inoltre che l'adattamento respiratorio ha un forte significato ecologico, che implica strategie morfologiche, fisiologiche e comportamentali. Se questi meccanismi verranno chiariti, queste conoscenze potrebbero costituire la base di una nuova strategia di monitoraggio per gli ecosistemi d'acqua dolce, basata non più sull'identificazione delle specie, ma sull'analisi di selezionati caratteri altamente adattativi e facilmente riconoscibili.

bibliografia

- 1) Armitage P., Cranston P.S., Pinder L.C.V. (Eds) 1995 - The Chironomidae. The biology and ecology of non-biting midges - Chapman & Hall, London, 572 pp.
- 2) Brodersen K.P., Pedersen O., Lindegaard C., Hamburger K. 2004 - Chironomids (Diptera) and oxy-regulatory capacity: an experimental approach to paleolimnological interpretation - Limnol. Ocean. 49: 1549-1559.
- 3) Hamburger K., Dall P.C., Lindegaard C., Nilson I.B. 2000 - Survival and energy metabolism in an oxygen deficient environment. Field and laboratory studies on the bottom fauna from the profundal zone of Lake Esrom, Denmark - Hydrobiologia 432: 173-188.
- 4) Heinis T., Crommentuijn T., 1989 - The natural habitat of the deposit feeding chironomid larvae *Stictochironomus histrio* (Fabricius) and *Chironomus anthracinus* Zett. in relation to their responses to changing oxygen concentrations - Acta Biol. Debr. Oecol. Hung. 3: 135-140.
- 5) Heinis F., Van De Bund W.J., Davids C. 1989 - Avoidance of low oxygen and food concentrations by the larvae of *Tanytarsus* sp. - Acta Biol. Debr. Oecol. Hung. 3: 141-145.
- Int Panis L., Goddeeris B., Verheyen R. 1996 - On the relationship between vertical microdistribution and adaptations to oxygen stress in littoral Chironomidae (Diptera) - Hydrobiologia 318: 61-67.
- 6) Langton P.H. 1989 - Functional and phylogenetic interpretation of chironomid pupal structure - Acta Biol. Debr. Oecol. Hung. 2: 247-252.
- 7) Marziali L., Lencioni V., Rossaro B. 2006 - Adaptations of pupae of Chironomidae (Insecta: Diptera) to oxygen-poor habitats - Pol. J. Ecol. 54: 687-693.
- 8) Rossaro B., Solimini A., Lencioni V., Marziali L., Giacchini R. and Parenti P. 2007 - The relationship between body size, pupal thoracic horn development and dissolved oxygen in Chironomina (Diptera: Chironomidae) - Fundam. Appl. Limnol./Arch. Hydrobiol. 169: 331-339.