

Saggi di embriotossicità con il gasteropode polmonato
Lymnaea (Radix) auricularia

M. Russo, C. Bizzotto, G. G. Distefano, D. Marchetto, M. Picone, A. Volpi Ghirardini

Lymnaea (Radix) auricularia....

La specie oggetto di studio è un gasteropode polmonato tipico di ambienti dulciacquicoli, si nutre principalmente di materiale vegetale, fresco o in decomposizione, batteri e alghe.

Da un punto di vista morfologico presenta conchiglia spiralata ad avvolgimento destro, con apertura non munita di opercolo ed estesa a 5/6 della lunghezza totale della stessa.



Lymnaea auricularia è distribuita in tutta Italia, prevalentemente in habitat come fiumi, stagni, laghi o risorgive, in presenza di acque mesoaline con salinità fino a 6‰ (Girod A. *et al.*, 1980).

....come bioindicatore

Lo studio dettagliato di questo organismo ha avuto come obiettivo la valutazione di un suo potenziale impiego in test ecotossicologici in quanto risponde a numerose caratteristiche che vengono richieste ad un buon bioindicatore:



- è ampiamente distribuita negli ambienti dulciacquicoli;
- riveste un importante ruolo ecologico;
- è semplice da campionare ed allevare in laboratorio;
- è in grado di registrare le variazioni ambientali;
- fornisce risposte rapide e ripetibili.

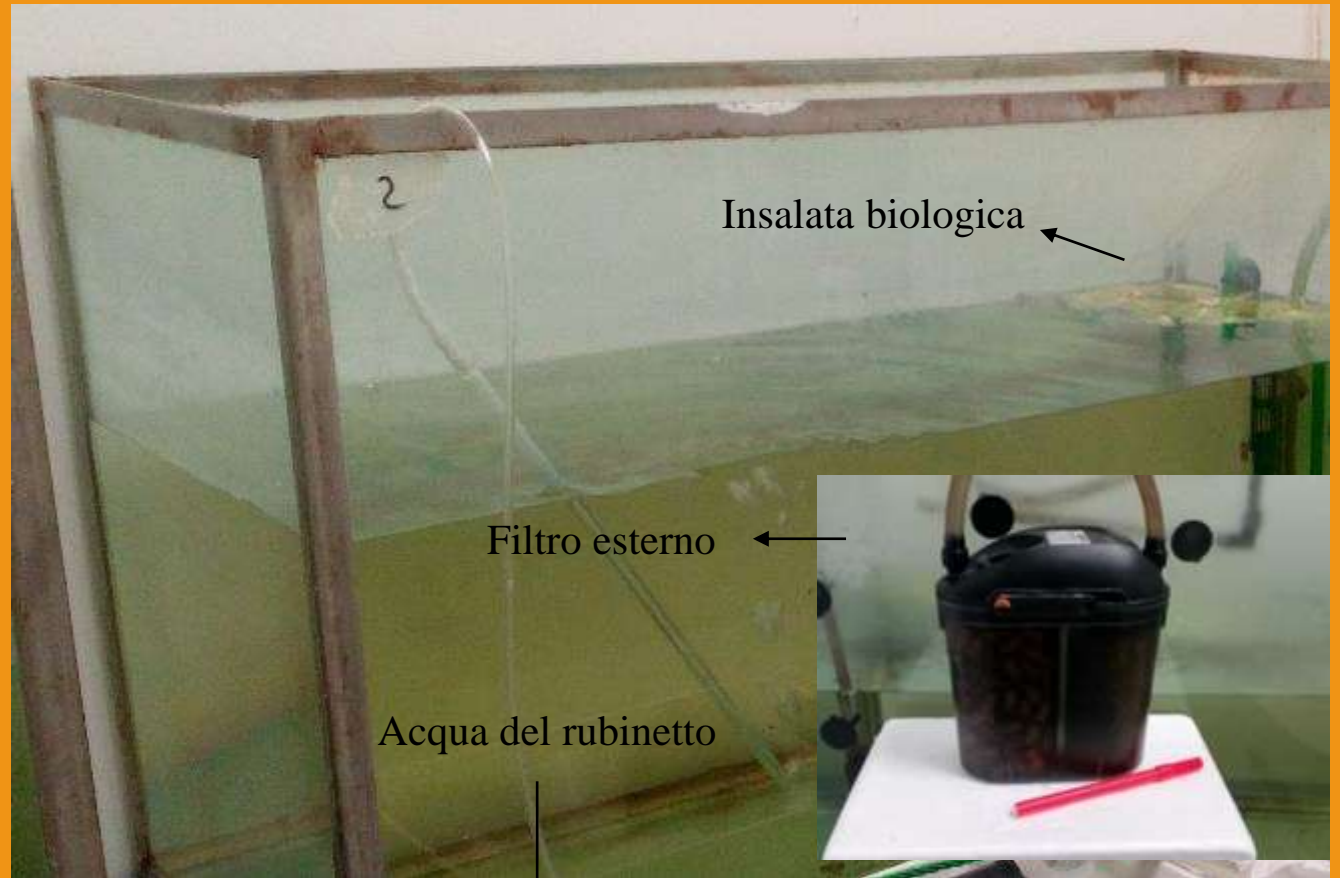
16 ore di luce

8 ore di buio

Allevamento degli organismi in laboratorio

Gli esemplari di *L. auricularia* utilizzati fanno parte di un ceppo originario delle risorgive della bassa pianura friulana, isolati ed allevati in laboratorio dal 1998, quindi con ridotta variabilità genetica all'interno della popolazione.

Le caratteristiche biologiche ed ecologiche di questa specie sono state studiate presso il laboratorio di ecotossicologia del Dipartimento di Scienze Ambientali Informatica e Statistica.



Condizioni chimico-fisiche:

- Temperatura: 22 ± 2 °C;
- pH: tra 8.5 e 9.5;
- Ossigeno disciolto: 6.5-9 mg/L a 20 °C;
- Eh: tra 100 e 200 mV;
- Conducibilità: tra 600 ± 200 μ S/cm;
- Ammoniaca: 0.05 mg/l.

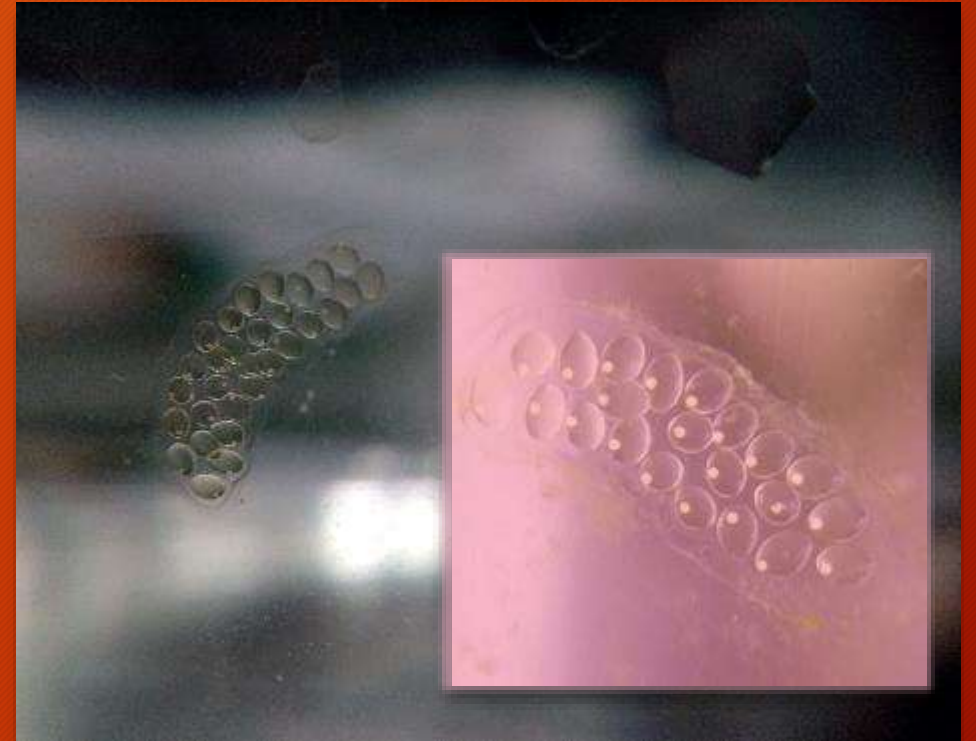
Test di embriotossicità

In questo lavoro è stata messa a punto una metodica per l'esecuzione di test di embriotossicità con la specie *L. auricularia*. Lo sviluppo embrionale, infatti, è la fase più sensibile del ciclo vitale di un organismo. È importante capire come diverse sostanze possono influire sui primi stadi di sviluppo di questo gasteropode.

Questa specie è ermafrodita e depone uova ovoidali, lunghe meno di 1 mm, trasparenti e incolori, caratteristiche che rendono l'osservazione dello sviluppo embrionale semplificata.

Le uova vengono riunite in placche ovigere, gelatinose e cilindriche, dall'aspetto più o meno arcuato. La lunghezza varia tra 4 mm e 9 mm e il numero di uova per placca può arrivare a 45 unità.

La taglia minima riproduttiva della specie è compresa tra 7.5 e 8.5 mm.



Studio dello sviluppo embrionale

Nel corso della prima fase, di natura esplorativa, è stato osservato quotidianamente lo sviluppo di tutte le uova all'interno di alcune placche ovigere, dalla deposizione alla schiusa, registrando lo stadio raggiunto al momento dell'osservazione. La sequenza di stadi presa come riferimento è quella riportata da Tills et al., 2013 per la *Radix balthica*.

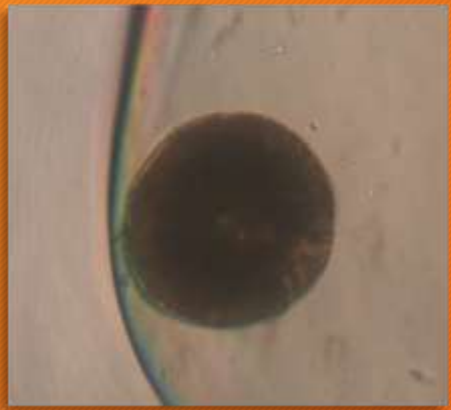
Allestimento colture per la raccolta delle placche

Sono stati allestiti dei contenitori in vetro del volume di 2 litri, posti alle medesime condizioni di temperatura e fotoperiodo degli acquari, dotati di areatore, riempiti con acqua proveniente dagli acquari e con piante acquatiche che rappresentano un'ulteriore superficie di deposizione.

In ciascun contenitore sono stati inseriti 10 organismi, alimentati con lattuga biologica e sottoposti ad un cambio del mezzo con frequenza settimanale.

Per agevolare la raccolta e l'osservazione delle placche, il fondo e i bordi dei contenitori sono stati rivestiti con vetrini da microscopio.

Sviluppo embrionale di *Lymnaea auricularia*



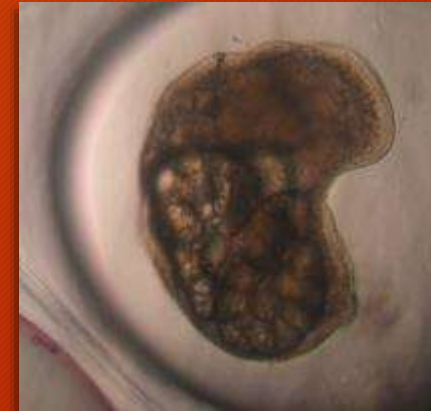
“Velum”- dopo 2 giorni



“Trochophora”- dopo 3 o 4 giorni



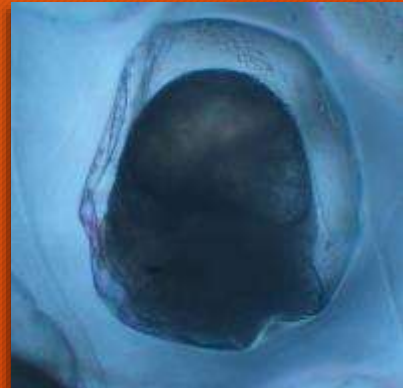
“Veliger”- dopo 5 giorni



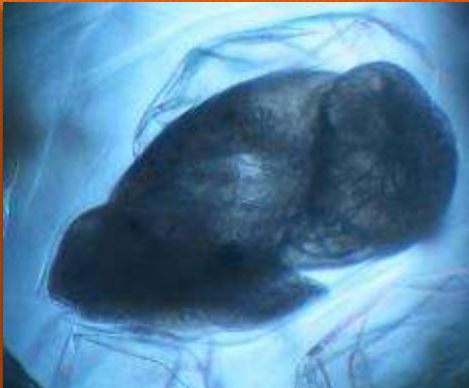
“Eye spot formation”- dopo 6 o 7 giorni



“Shell formation”- dopo 8 giorni



“Capsule rupture”- dopo 13 giorni



“Hatching”- dopo 15 giorni

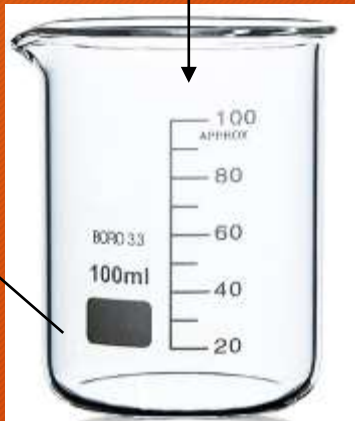
Test di embriotossicità con Cu

Dallo studio dello sviluppo embrionale è emerso che gli endpoint da considerare in questo test di embriotossicità sono il raggiungimento dei seguenti stadi: *Shell formation* dopo 8 giorni e *Capsule rupture* dopo 13 giorni.

Allestimento del test:

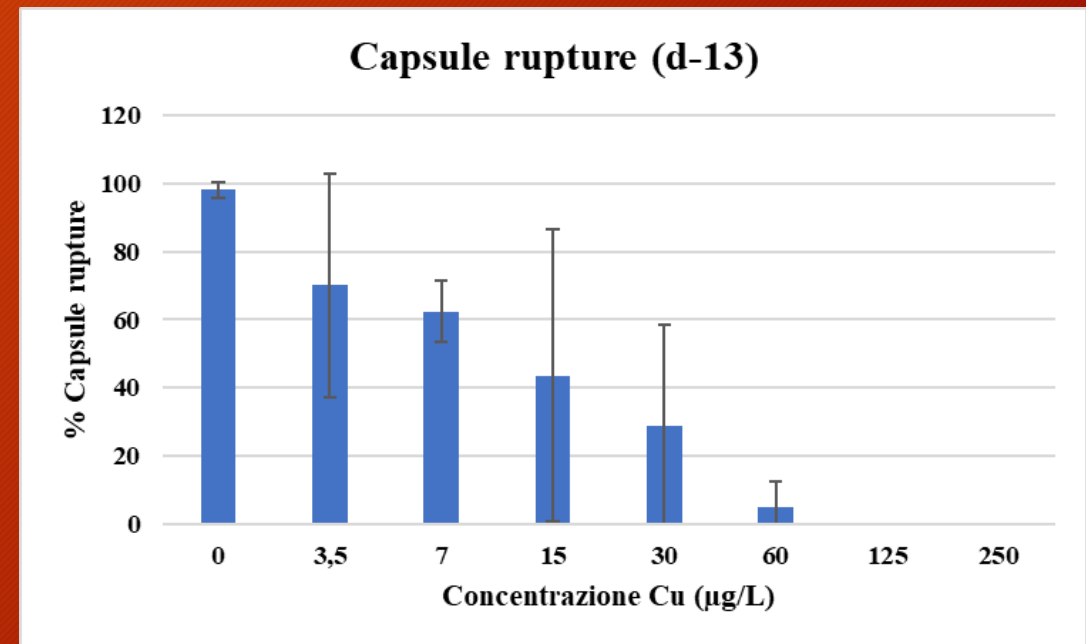
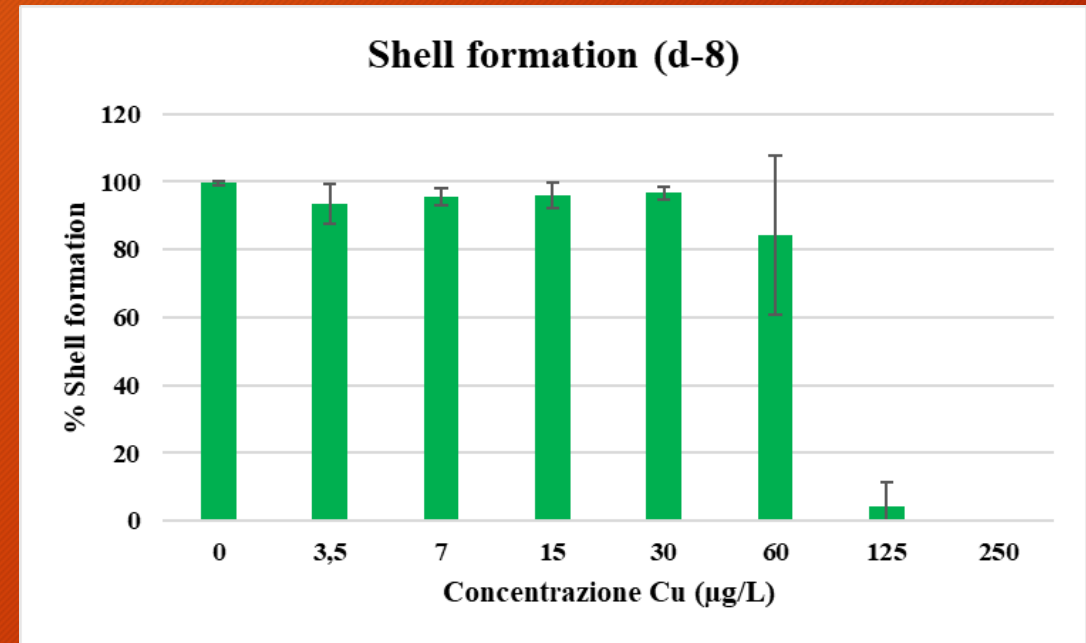
- le placche ovigere devono essere prelevate entro 24 ore dalla loro deposizione in modo da presentare stadio *Before event velum* al giorno 0;
- una volta prelevata la singola placca e verificato lo stadio al microscopio, è stato determinato il numero di uova presenti all'interno;
- la placca è stata quindi disposta all'interno di un becker da 100 mL ed immersa nella soluzione da testare;
- sono state allestite 3 repliche per concentrazione;
- ciascuna replica è stata osservata quotidianamente registrandone gli stadi raggiunti così da valutare un eventuale ritardo nello sviluppo delle placche esposte al tossico rispetto al controllo.

Il mezzo
utilizzato per il
test consiste di
acqua con
durezza pari a
250 mg/L di
CaCO₃



Elaborazione dati e discussione

- Nelle placche del controllo lo sviluppo delle uova è sincronizzato, mentre in quelle esposte alla soluzione di Cu sono presenti embrioni a stadi differenti.
- A 250 $\mu\text{g/L}$ e a 125 $\mu\text{g/L}$ di Cu si osserva un marcato ritardo nello sviluppo dai primi giorni di esposizione e una mortalità del 100% degli individui esposti.
- A concentrazioni inferiori a 125 $\mu\text{g/L}$ di Cu si osserva che il ritardo avviene dopo il quinto giorno, durante i primi giorni di esposizione gli embrioni si sviluppano correttamente e in maniera sincrona all'interno della placca.
- L' EC_{50} per *Shell formation* è pari a 79 $\mu\text{g/L}$ mentre per *Capsula rupture* è pari a 12 $\mu\text{g/L}$.



Grazie per l'attenzione

