

GAETANO BARBATO \* e GABRIELLA LODA \*

## EFFETTI DI SOSTANZE INQUINANTI SU *Anodonta cygnea* L.

**SOMMARIO** - Nel corso di due anni è stata saggiata la resistenza del bivalve *Anodonta cygnea* al trattamento con tre sostanze che normalmente inquinano le acque dei laghi, cercando di identificare le dosi massime sub-letali di ognuna di esse. E' stata inoltre fatta un'indagine istologica sulle branchie e sul mantello per mettere in evidenza le alterazioni subite da questi organi, in particolare quando gli individui erano stati trattati con soluzioni di inquinanti a bassa concentrazione, ritenute cioè sub-letali.

**SUMMARY** - During the period of two years we have tested the resistance of the bivalve *Anodonta cygnea* to three substances usually polluting the lakes's waters, trying to identify the maximum sub-lethal dosis of each one of these substances. We have also effected an istological test on the branchiae and mantle in order to bring into evidence eventual morphological variations of these organs, particularly when the animals had been treated with toxic substances at low concentration, considered sub-lethal.

### PREMESSA

Presso l'Istituto di Istologia dell'EULO nel corso di due anni si è svolta una ricerca tendente a mettere in evidenza gli effetti che potevano avere alcune sostanze inquinanti le acque del lago di Garda su due specie di bivalvi — *Dreysena polymorpha* e *Anodonta cygnea* — che vivono nello specchio lacustre. E' un ulteriore tentativo di indagine biologica al fine di una determinazione di degradazione ambientale in alternativa alle analisi chimiche: una tale indagine può dare risultati interessanti soprattutto qualora il livello di alterazione non risulti particolarmente accentuato. Le piccole alterazioni infatti sono assai difficilmente accertate con i metodi chimici che d'altra parte tengono necessariamente conto di un numero limitato di parametri, mentre gli organismi viventi risentono della globalità di essi presi nei loro rapporti di interdipendenza.

Il presente articolo riguarda i risultati della ricerca sulla *Anodonta cygnea*.

---

\* Istituto di Istologia - Ente Universitario Lombardia Orientale - Brescia.

## MATERIALI E METODI

Gli individui usati per gli esperimenti sono stati raccolti nel lago in una località inserita fra Desenzano e Sirmione, alla profondità di circa un metro con fondo misto sabbioso-ciottoloso. Sono stati portati in laboratorio e tenuti in un acquario di circa 40 litri, con sabbia ed acqua di lago, munito di filtro di fondo e con gorgogliamento continuo di aria: solo dopo un periodo ragionevolmente lungo — almeno un mese — di permanenza nell'acquario, quando si poteva pensare che fosse stato superato il trauma del cambiamento d'ambiente, gli animali sono stati usati per gli esperimenti. L'acqua veniva cambiata, unitamente alla sabbia, ogni due o tre settimane. E' stato anche allestito un acquario con sabbia del lago e acqua dell'acquedotto comunale, lasciata riposare per circa 48 ore dopo il prelievo, al fine di facilitare l'uscita del cloro eventualmente immesso per potabilizzarla. La sabbia dopo essere stata essicata all'aria è stata in seguito ripetutamente lavata con acqua distillata. Ad acquario completato e con animali immessi è stata fornita un'alimentazione con lievito di birra e con prodotti liquidi per acquari a base di alghe, volendo impedire cioè una estinzione degli animali per denutrizione. In ambedue gli acquari sono stati fatti controlli periodici dell'ossigeno disciolto (metodo Winkler) e del pH senza mai rinvenire situazioni anormali.

Le sostanze usate per gli esperimenti sono state: 1) un antiparassitario a base di rame-ossicloruro e di Etilen-bis-ditiocarbammato di zinco indicato qui convenzionalmente con la lettera P; 2) solfato di rame; 3) ammoniaca. I primi due possono arrivare nelle acque del Benaco in conseguenza di pratiche agricole svolte sulle sponde del bacino lacustre, l'ammoniaca tramite i condotti fognari.

Le vaschette da esperimento per il P e per il solfato di rame avevano la capacità di 3 litri e la soluzione veniva rinnovata in media due volte al giorno: erano in funzione sempre i motorini per l'aerazione. Le soluzioni sono state fatte sia con acqua di lago, portata in laboratorio quasi quotidianamente, che con acqua dell'acquedotto. Sono stati fatti regolari controlli del pH, della conducibilità e, meno frequentemente, della concentrazione del rame presente. Per quanto riguarda l'ammoniaca è stato fatto uso dell'apparecchio già descritto nella pubblicazione riguardante i risultati con la *Dreysena polymorpha* (BARBATO, 1980), con rinnovo continuo della soluzione, metodo già sperimentato da altri ricercatori (MARCHETTI, 1969).

E' stata fatta anche un'indagine istologica sulle branchie (ctenidii) ed il mantello dei bivalvi: i metodi sono quelli normalmente usati nella microscopia ottica - fissazione in formalina 10% o in bouin, inclusione in paraffina a 54°, taglio a 5 u. Sono state usate varie colorazioni: oltre alla classica eosina-ematossilina, la P.A.S., la colorazione Azan-Mallory e coloranti metacromatici come il bleu di toluidina. E' stata anche utilizzata la colorazione di Okamoto e Uzman con l'acido rubeanico per la determinazione del rame. La fig. 1 evidenzia il numero di individui utilizzati.

	CuSO <sub>4</sub>	NH <sub>3</sub>	P	acqua dell'acquedotto	bivalvi utilizzati come termine di confronto
indagine statistica sui tempi di sopravvivenza	70	50	40	40	
esami istologici	20	20	20	5	7

Fig. 1 - Numero di Bivalvi utilizzati per la ricerca.

## RISULTATI

E' opportuno precisare subito che gli animali immessi nell'acquario con acqua di lago non hanno apparentemente risentito molto del cambiamento d'ambiente: dopo oltre un anno dal prelievo fatto dal Garda circa il 90% degli individui sono tuttora in vita. Più difficile la sopravvivenza degli animali immessi nell'acquario con acqua dell'acquedotto, tanto che dopo circa 70 giorni il 90% degli animali era estinto. La letalità è probabilmente legata alle difficoltà di alimentazione più che alla nocività dell'ambiente.

E' stato anche fatto un semplice controllo visivo, senza ricorrere a metodi più complessi (GRASSÉ, 1960), dato che non era questo lo scopo della ricerca, sul tempo di apertura delle valve nell'arco delle 24 ore. In ambedue gli acquari è stato molto difficile accertare la chiusura delle valve, che si è comunque sempre verificata per tempi molto brevi.

Lo stesso controllo è stato anche fatto per gli animali sottoposti a trattamento con i risultati opposti, cioè è stato molto difficile accertare l'apertura delle valve a quasi tutte le concentrazioni.

Dato che la chiusura delle valve è un sistema di difesa, probabilmente imperfetto rispetto a quello dei Gastropodi opercolati è stata fatta una breve indagine per avere un'idea sulla funzionalità di questo sistema difensivo: 30 individui sono stati immessi in acquari con acqua di lago e sostanza inquinante P alla concentrazione ritenuta minima letale; a 15 di essi è stata meccanicamente impedita la chiusura delle valve. Il tempo di sopravvivenza degli individui a valve chiuse è risultato del 40% superiore a quello di individui con valve forzatamente aperte: è da precisare tuttavia che tutti gli individui sono morti entro un tempo massimo di 30 giorni, tempo che è inferiore a quello necessario alla morte per denutrizione e che anche gli individui con valve aperte sono sopravvissuti in media 15 giorni, un periodo cioè non molto breve.

Una certa azione della sostanza inquinante è ipotizzabile anche se apparentemente le valve permangono chiuse.

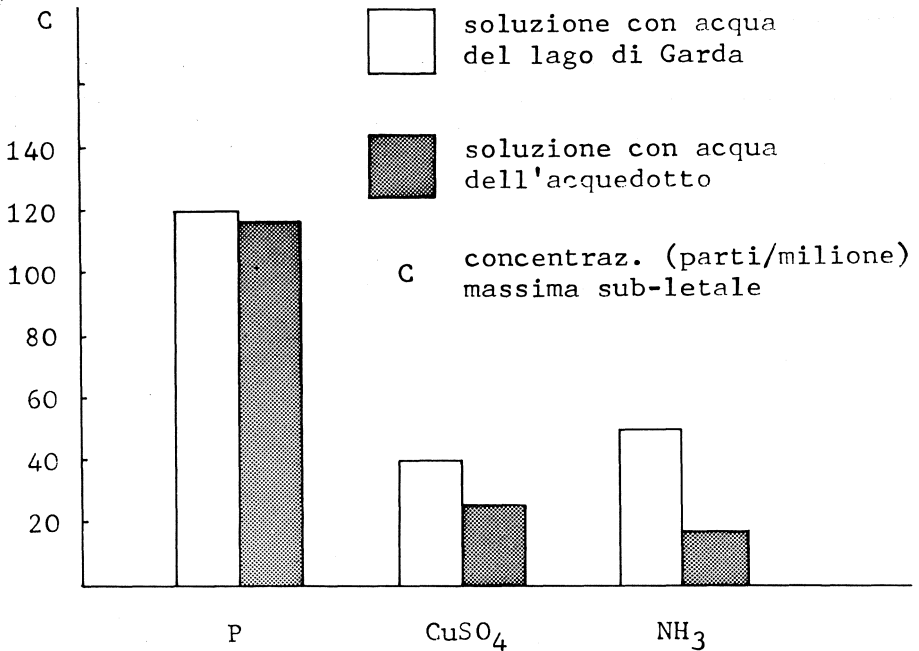


Fig. 2 - Confronto delle concentrazioni massime sub-letali dei tre composti in esame.

Per tutte le sostanze usate si è cercato di identificare la dose massima sub-letale tollerata dai bivalvi della specie *Anodonta cygnea* secondo il seguente criterio: allorchè, in prove successive, almeno il 60% degli individui sopravviveva non meno di 20 giorni, la concentrazione veniva considerata probabilmente sub-letale.

I risultati sono evidenziati dalla fig. 2 nella quale sono messe a confronto le concentrazioni massime sub-letali dei tre composti in esame ottenute utilizzando sia l'acqua del lago che quella dell'acquedotto.

## P

Come già accertato nell'indagine sulla *Dreissena polymorpha* (BARBARO, 1980) il composto P risulta meno tossico dell'ammoniaca e questa un po' meno tossica del solfato di rame. L'*Anodonta cygnea* si adatta abbastanza bene a questo antiparassitario che conferisce alla soluzione un colore blu intenso: 120 parti per milione rappresentano un valore assai elevato. Si nota ancora che non vi è quasi alcuna differenza di resistenza dell'*Anodonta* se la soluzione è fatta con acqua dell'acquedotto anzichè con acqua del lago.

## SOLFATO DI RAME

Il solfato di rame si dimostra il composto più tossico: tuttavia 40 parti per milione non sono poche, soprattutto considerando che in un lago come il Garda tali concentrazioni non dovrebbero mai rinvenirsi. La tossicità aumenta quando la soluzione è fatta con acqua dell'acquedotto.

## AMMONIACA

L'ammoniaca che ai laghi in genere arriva tramite gli scarichi fognari con una forte frequenza, presenta una tossità intermedia, fra i composti esaminati, considerando le soluzioni fatte con acqua del Garda. La tossicità aumenta cospicuamente (oltre il doppio) quando le soluzioni sono fatte con acqua dell'acquedotto, ed è anche la massima facendo il confronto con tutti i tipi di soluzioni fatti. Qui intervengono probabilmente fenomeni di interazione con i diversi componenti del solvente.

## INDAGINE ISTOLOGICA

L'indagine istologica è stata fatta sulle branchie (ctenidii) e sul mantello dei bivalvi. Si è iniziato acquisendo dati inerenti la struttura normale, non tanto come controllo di conoscenze già note nella bibliografia classica (GRASSÉ, 1960) o in lavori specialistici quanto per una acquisizione diretta di notizie e di tecniche da usare in seguito con sicurezza. Le colorazioni maggiormente utilizzate sono state tre: la classica eosina-ematossilina, la P.A.S. e quella di Okamoto-Uzman.

## BRANCHIE

Negli esemplari esaminati sono stati bene evidenziati i foglietti ed i filamenti branchiali: questi ultimi risultano costituiti (fig. 3) da un epitelio cilindrico con cellule di diverse dimensioni, nucleo voluminoso e munite di rivestimento cuticolare sia sul lato esterno che su quello interno. La parete interna del filamento appare rivestita da una struttura chitinosa, molto voluminosa sui lati e quasi assente all'apice e alla base (fig. 3). Sono risultate anche evidenti le ciglia frontali, latero-frontali e laterali (Atkins). Molto bene evidenti le giunzioni tra i foglietti ed i filamenti (fig. 4) che conferiscono alle lamelle una struttura molto regolare: proprio a livello di queste giunzioni è visibile un tessuto che presenta l'aspetto di un connettivo lacunoso con vasi ed anche mucociti discretamente voluminosi (fig. 5).

Passiamo ad esporre i risultati delle analisi istologiche fatte su animali trattati con le sostanze di cui ai paragrafi precedenti.

Per quanto riguarda le ricerche fatte su animali vissuti nell'acquario con acqua dell'acquedotto comunale, non risulta che vi siano modificazioni nei ctenidi: forse una leggera diminuzione del numero di microciglia frontali e una leggera ipertrofia dei mucociti.

Gli animali trattati con le sostanze inquinanti mostrano modificazioni delle branchie che possono essere anche assai vistose, in rapporto sia alla concentrazione delle sostanze che alla resistenza individuale. Non sembra sussistere una vera differenza nell'azione degradante dei tre composti se non per i tempi di azione e le diversità di concentrazione usate: indipendentemente il solfato dal solvente usato (acqua del lago o dell'acquedotto): il solfato di rame agisce più rapidamente e più drasticamente del P a parità di concentrazione, ma il risultato finale è lo stesso.

Il processo sembra avvenire così: prima scompare quel mal definito rivestimento cuticolare dei filamenti, successivamente si ha un appiattimento delle cellule cilindriche (fig. 6) seguito dalla scomparsa delle ciglia; in seguito non sono più visibili le cellule cilindriche ridotte a strutture lineari, il tessuto lacunoso interno si sfalda e finisce per demolirsi e i foglietti divengono filiformi. Il rivestimento chitinoso permane fino all'ultimo (fig. 7).

Esaminando le branchie dei bivalvi trattati con gli inquinanti a concentrazioni sub-letali e quindi sacrificati dopo un notevole numero di giorni,<sup>1</sup> è molto difficile evidenziare modificazioni, sia pur minime, conseguenti al diverso ambiente nel quale l'animale ha vissuto (fig. 8).

## MANTELLO

La bibliografia inerente il mantello dei bivalvi è discretamente vasta anche se alcuni autori si sono occupati solo di una specie e spesso limitatamente a strutture particolari. Notizie sulla morfologia e sulla struttura si possono avere, fra l'altro, dal già citato trattato del GRASSÉ, dai lavori di DEFRETIN e RIF (1948),<sup>2</sup> di BOLOGNANI-FANTIN, VIGO e GERVASO (1969) e di ZYLSTRA (1972). Per quanto riguarda effetti di sostanze inquinanti sugli animali acquatici sono stati pubblicati lavori piuttosto frammentari, privilegiando l'ambiente marino (EISLER, 1967-69-70).

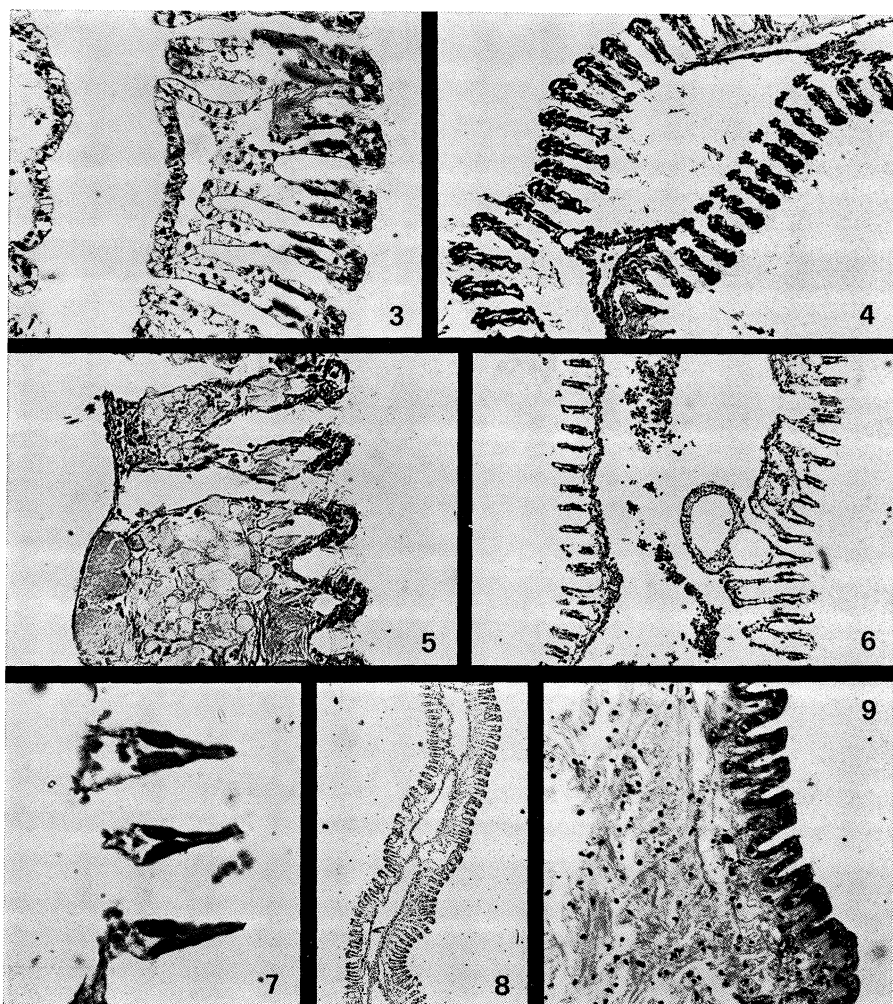
Il mantello di *Anodonta* è risultato essere costituito da un epitelio esterno formato da una sola fila di cellule di media altezza, con vistoso nucleo centrale, prive di ciglia (fig. 9): detto epitelio presenta tre grossi solchi presso il bordo dell'organo che formano le caratteristiche tre pieghe dei Lamellibranchi. Fra le cellule di questo epitelio sono inseriti dei mucociti che appaiono come cellule piuttosto allungate con un grosso nucleo centrale. Vi è stata una certa difficoltà a determinare la posizione dei mucociti, quasi sempre P.A.S. negativi, sia fra le pieghe che lungo il resto del bordo esterno: gli esami fatti su diversi individui hanno dato spesso risultati contrastanti.

Il mantello presenta anche un epitelio interno (fig. 10), formato da

---

<sup>1</sup> Non meno di 60 giorni.

<sup>2</sup> Citato dal GRASSÉ.



- Fig. 3 - Filamenti di branchie normali di *Anodonta cygnea*; col. e.e.; X 400.
- Fig. 4 - Struttura di branchie normali di *Anodonta cygnea*; col. e.e.; X 250.
- Fig. 5 - Struttura di branchie normali di *Anodonta cygnea*; col. e.e.; X 400.
- Fig. 6 - Struttura branchiale di *Anodonta cygnea* trattata con soluzione di  $\text{CuSO}_4$  a forte concentrazione; col. e.e.; X 400.
- Fig. 7 - Filamenti branchiali di *Anodonta cygnea* trattata con soluzione di  $\text{CuSO}_4$  a forte concentrazione; col. e.e.; X 400.
- Fig. 8 - Struttura, dall'aspetto normale, di branchie di *Anodonta cygnea* trattata con soluzione di ammoniaca a concentrazione sub-letale; col. e.e.; X 63.
- Fig. 9 - Sezione di mantello di *Anodonta cygnea* non trattata; col. P.A.S.; X 320.

cellule cilindriche con nucleo allungato piuttosto basale, munite di ciglia: inizialmente questo epitelio si solleva in tante estroflessioni.

Compreso fra i due epiteli c'è poi un tessuto connettivo, nettamente separato dagli epiteli per mezzo di una trama di fibre compatte. Il connettivo appare denso ad una estremità del mantello, vicino alle pieghe, e lasso man mano che ci si allontana dalla suddetta posizione (fig. 11). In esso sono presenti dei mucociti nei pressi dell'epitelio interno ed un grande numero di cellule vescicolose sempre P.A.S. negative. Appaiono spesso anche elementi che assomigliano a cellule adipose: non sono stati fatti però esami specifici (fig. 12).

Diamo ora alcune notizie su come si presenta il mantello degli animali trattati. Nessuna variazione per quanto riguarda i bivalvi vissuti con l'acqua dell'acquedotto. Per tutti gli altri, indipendentemente dalla sostanza usata e dalla concentrazione della stessa, cioè anche nel caso che le dosi fossero elevate così da portare a morte l'individuo in breve tempo, le alterazioni del mantello sono risultate assai più ridotte rispetto a quelle verificatesi nelle branchie: solo nel 10% degli animali esaminati si sono manifestate alterazioni inerenti quasi esclusivamente all'epitelio interno (fig. 13). Le cellule di quest'ultimo risultano più appiattite, e in pochi casi si verificano delle lesioni al tessuto. Questi danni sono più frequenti per gli animali trattati con l'ammoniaca (figg. 11, 12, 14, 15).

Si è accennato precedentemente all'uso della colorazione Okamoto-Uzman per la rilevazione del rame: questo metodo è stato adoperato per gli animali trattati con solfato di rame a varie concentrazioni. I risultati sono stati praticamente nulli, cioè non si è evidenziata la presenza dei granuli tipici nei tessuti degli organi esaminati. Dopo numerosi tentativi ultimamente si è pensato di esaminare le branchie e il mantello di animali sottoposti al trattamento con solfato di rame a concentrazioni basse, subletali, sacrificandoli dopo 3 o 4 giorni, senza attendere cioè i tempi lunghi. Qualche risultato vi è stato, anche se modesto.

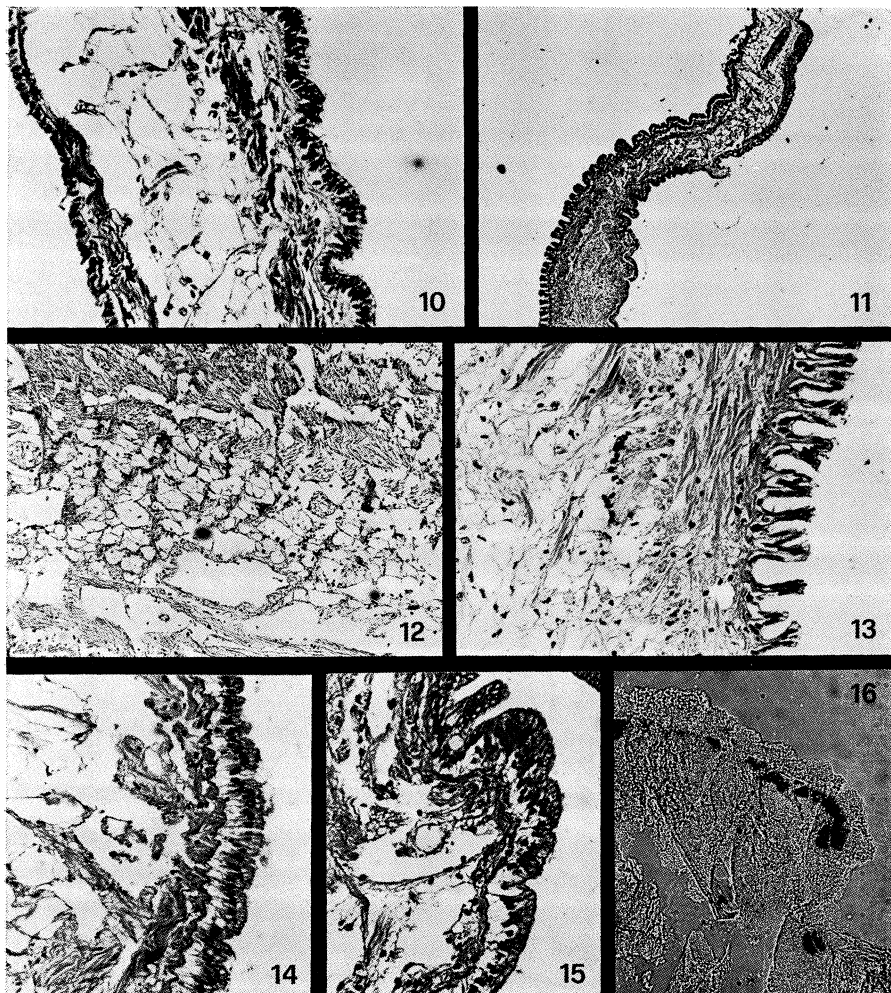
## CONCLUSIONI

L'*Anodonta cygnea* è un bivalve che può vivere in condizioni ambientali anche molto difficili, opponendo a queste condizioni una resistenza molto elevata, superiore a quella offerta da altri molluschi come *Limnaea stagnalis* o *Teodoxus fluviatilis* (dati non pubblicati) o *Dreissena polymorpha*. Anche la sua adattabilità ad acque del tutto diverse da quelle del suo ambiente naturale ne è una prova.

Fra le sostanze utilizzate per gli esperimenti, il solfato di rame è risultato il più nocivo: per fortuna il Benaco dovrebbe essere scarsamente interessato da immissioni di tale composto; è più facile rinvenire scarichi fognari con presenza di ammoniaca.

L'indagine istologica ha mostrato che le branchie sono gli organi più





- Fig. 10 - Sezione di mantello di *Anodonta cygnea* non trattata; col. e.e.; X 400.
- Fig. 11 - Struttura normale di mantello di *Anodonta cygnea* trattata con soluzione di P a bassa concentrazione; col. e.e.; X 63.
- Fig. 12 - Struttura interna del mantello di *Anodonta cygnea* trattata con soluzione di  $\text{NH}_3$  a bassa concentrazione; col. e.e.; X 160.
- Fig. 13 - Sezione di mantello di *Anodonta cygnea* trattata con soluzione di  $\text{NH}_3$  ad elevata concentrazione; col. e.e.; X 400.
- Fig. 14 - Epitelio interno del mantello di *Anodonta cygnea* trattata con soluzione di  $\text{CuSO}_4$  a media concentrazione; col. e.e.; X 400.
- Fig. 15 - Epitelio interno del mantello di *Anodonta cygnea* trattata con soluzione di  $\text{CuSO}_4$  ad elevata concentrazione; col. e.e.; X 400.
- Fig. 16 - Probabili granuli di Cu nel tessuto mantellare di *Anodonta cygnea*; col. Okamoto-Uzman; X 400.

facilmente attaccabili, mentre il mantello resiste meglio, o forse semplicemente più a lungo, all'azione delle sostanze inquinanti. In ogni caso modificazioni stabili dei tessuti compatibili con la vita, in conseguenza delle peggiorate condizioni non sono state evidenziate a livello di microscopia ottica e nei tempi brevi delle indagini effettuate.

Le prove con l'acido rubeanico per il rame potrebbero fare ipotizzare un processo metabolico a carico del solfato di rame, ma, a parte che può entrare in gioco la resistenza individuale, non documentabile, fra individui diversi, questa ipotesi necessita di altre prove.

## BIBLIOGRAFIA

- BARBATO G., 1980 - *La resistenza della Dreissena polymorpha (Pall.) al trattamento con sostanze inquinanti le acque del Benaco*. Quaderni della Civica Stazione Idrobiologica di Milano, n. 6, 93-105.
- BOLOGNANI FANTIN A.M., VIGO E., GERVASO M.V., 1969 - *La mucinogenesi nei molluschi. VI. Caratteristiche dei tipi cellulari presenti nel piede e nel mantello di alcune specie di lamellibranchi*. Riv. Istoch. norm. pat. 15, 345-370.
- EISLER R., WEINSTEIN M.P., 1967 - *Changes in metal composition of the quahaug clam, Mercenaria mercenaria, after exposure to insecticides*. Chesapeake Sci. 8 (4): 253-258.
- EISLER R., 1969 - *Acute toxicities of insecticides to marine decapod crustaceans*. Crustaceana: 16 (3): 302-310.
- EISLER R., 1970 - *Latent effects of insecticide intoxication to marine molluscs*. Hydrobiologia vol. 36, 3-4, 345-352.
- GRASSÉ P., 1960 - *Traité de zoologie - Tome V*, Masson - Paris.
- MARCHETTI R., 1969 - *Orientamenti per una moderna impostazione delle ricerche di tossicologia degli animali acquatici*. Quaderni de «La ricerca scientifica»; 58; 521-546.
- ZYLSTRA U., 1972 - *Histochemistry and ultrastructure of the epidermis and the subepidermal gland cells of the freshwater snails Lymnaea stagnalis and Biomphalaria pfeifferi*. Z. Zellforsch. 130, 93-134.