

Università degli Studi di Padova

Corso di Laurea Magistrale in Scienze della Natura

Elaborato di Laurea

**TOSSICITA' DEI FLUORURI DISCIOLTI IN ACQUA
E LORO EFFETTI SULLA GAMETOGENESI DI
Branchiura sowerbyi, Beddard (OLIGOCHAETA,
TUBIFICIDAE)**

*Fluoride toxicity and its effects on gametogenesis of
Branchiura sowerbyi, Beddard (Oligochaeta, Tubificidae)*

Relatore: Prof.ssa Sandra Casellato, Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott.ssa Stefania Del Piero, Dipartimento di Biologia

Laureanda: Valeria Covre

Anno Accademico: 2011/2012

Ai miei nonni, Giacomo e Angelo.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 I fluoruri e i loro effetti.....	1
1.2 Gli Oligocheti come indicatori di inquinamento delle acque.....	2
2. <i>Branchiura sowerbyi</i>	4
2.1 Classificazione.....	5
2.2 Filamenti branchiali.....	5
2.3 Sete.....	6
2.4 Sistema circolatorio.....	7
2.5 Sistema alimentare.....	7
2.6 Apparato riproduttivo.....	8
2.6.1 <i>Ovari e oogenesi</i>	9
2.6.2 <i>Testicoli e spermatogenesi</i>	10
2.6.3 <i>Ciclo riproduttivo</i>	12
2.7 Habitat.....	14
3. SCOPO DELLA TESI.....	15
4. MATERIALI E METODI.....	16
4.1 Prelievo e acclimatazione.....	16
4.2 Impostazione degli esperimenti.....	17
4.2.1 <i>Test acuti</i>	18
4.2.2 <i>Test cronici a medio termine</i>	20
4.3 Metodi di analisi.....	21
4.3.1 <i>Rilevamento del Fluoro nei tessuti biologici</i>	21
4.3.2 <i>Rilevamento del Fluoro nel sedimento</i>	22
4.3.3 <i>Analisi statistica dei dati</i>	22
4.4 Test cronico a lungo termine per valutare gli effetti sulla gametogenesi... 23	
4.4.1 <i>Analisi aggiuntive</i>	25

5. RISULTATI	25
5.1 Test acuti	25
5.2 Test cronici a medio termine	30
5.3 Test cronico a lungo termine per valutare gli effetti sulla gametogenesi... 34	
5.3.1 <i>Analisi aggiuntive</i>	40
6. DISCUSSIONE.....	41
6.1 Test acuti e cronici a medio termine.....	41
6.2 Test cronico a lungo termine per valutare gli effetti sulla gametogenesi... 44	
7. CONCLUSIONI.....	45
8. RINGRAZIAMENTI	49
9. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	51

1. INTRODUZIONE

1.1 I fluoruri e i loro effetti

Il Fluoro fa parte della famiglia dei gas alogeni ed è il tredicesimo elemento più abbondante sulla superficie terrestre. Il Fluoro si trova sempre associato ad altri elementi, soprattutto silicati, ed è perciò un costituente di molti minerali presenti nelle rocce, soprattutto magmatiche. In acqua il Fluoro è comunemente presente sottoforma di ioni fluoruro F^- . La presenza di Fluoro sulla superficie terrestre deriva dalla risalita di fluidi geotermici e dal processo di erosione delle rocce, perciò la sua concentrazione naturale dipende dall'entità di questi fenomeni. La concentrazione media di Fluoro nelle acque è di 0.1-0.3 mg/l (in ambienti vulcanici può raggiungere i 0.5-1.0 mg/l), ma sta aumentando a causa dell'attività umana (CHLUBEK, 2003), soprattutto dal cattivo smaltimento dei prodotti di rifiuto, dall'uso intensivo di composti fluorurati in agricoltura, dove vengono utilizzati come pesticidi, e nell'industria, dove vengono utilizzati per la produzione di refrigeranti, materiali isolanti e ignifughi (WEINSTEIN & DAVIDSON, 2004), e come prodotto di scarto della lavorazione dell'alluminio nelle fonderie (METCALFE-SMITH *et al.*, 2003). Gli effetti tossici dovuti all'esposizione ai fluoruri sono stati analizzati da molti ricercatori, sia su specie animali che su specie vegetali: in particolare, una review di CAMARGO (2003) focalizza gli effetti tossici dei fluoruri sugli organismi acquatici, e mette in evidenza come i valori di tossicità siano significativamente diversi tra classi, famiglie, generi e specie. Inoltre, anche popolazioni differenti della stessa specie possono rispondere in maniera diversa all'esposizione a questi contaminanti (RODRIGUEZ & REYNOLDS, 2011). Il Fluoro interagisce con svariati processi cellulari, molti dei quali sono coinvolti nei meccanismi di segnalazione tra cellule (BARBIER *et al.*, 2010). Il principale effetto tossico del Fluoro è dovuto alla sua interazione con gli enzimi: inibendone l'attività causa l'interruzione di importanti processi metabolici, come la glicolisi e la sintesi proteica (KESSABI, 1984). Provocando l'inibizione degli enzimi antiossidanti, inoltre, rende gli organismi maggiormente vulnerabili all'attacco dei radicali liberi, generando una sorta di stress ossidativo che a lungo andare può danneggiare le membrane cellulari e causare l'apoptosi

della cellula (BARBIER *et al.*, 2010). Il Fluoro è in grado di alterare anche l'espressione genica, comportandosi da agente mutageno in grado di produrre aberrazioni cromosomiche. Altri effetti del Fluoro riguardano l'inibizione della respirazione cellulare (con conseguente riduzione nella produzione di ATP), la modificazione del rilascio di acetilcolina durante le trasmissioni nervose, l'alterazione del traffico vescicolare all'interno delle cellule, l'inibizione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi, la sottoregolazione del sistema antinfiammatorio, la riduzione della fertilità maschile e la proliferazione di cellule tumorali (BARBIER *et al.*, 2010). Nei vertebrati il maggior quantitativo di Fluoro si trova in zone ricche di calcio (ossa e denti), con il quale esso forma dei complessi. In questi organismi causa una malattia detta fluorosi, la quale, bloccando l'attività degli osteoclasti, causa osteoporosi e danneggiamento ai denti (BARBIER *et al.*, 2010). L'effetto citotossico del Fluoro, perciò, si osserva in tutti i tipi cellulari, ma la risposta dipende dal tempo di esposizione all'inquinante, dalla sua concentrazione e dal tipo di cellula interessata (BARBIER *et al.*, 2010), nonché dalla specie presa in considerazione. Per gli organismi acquatici la tossicità del Fluoro dipende anche dalla durezza dell'acqua e dalla sua temperatura: le specie che vivono in acque dolci e caratterizzate da un basso contenuto ionico sono più vulnerabili rispetto a quelle che vivono in acque dure o salate, perché in queste ultime il Fluoro forma dei complessi con altri ioni e la sua biodisponibilità viene ridotta (NEUHOLD & SIGLER, 1962; PIMENTEL & BULKLEY, 1983) e inoltre si ha un effetto tossico minore in acque fredde rispetto a quelle calde (WALLIS *et al.*, 1996).

1.2 Gli Oligocheti come indicatori di inquinamento delle acque

Indagini di tossicologia acquatica che hanno avuto come oggetto gli Oligocheti sono state pubblicate fin dagli anni '60. Non sono presenti studi precedenti, a causa della mancanza di chiavi tassonomiche a livello specifico all'interno della classe (RODRIGUEZ & REYNOLDSON, 2011). I primi studi sono stati puramente descrittivi e riguardavano associazioni tra le specie ritrovate e il grado di disturbo ambientale. Negli anni successivi c'è stata una graduale evoluzione negli approcci utilizzati per comprendere le risposte degli ecosistemi acquatici agli stress antropogenici, approcci che includono studi sulle popolazioni e sulle comunità,

nuovi tipi di analisi dei dati, attraverso l'uso della statistica multivariata, e studi sul bioaccumulo (RODRIGUEZ & REYNOLDSON, 2011). Oggi la ricerca si sviluppa essenzialmente con due approcci metodologici differenti:

- 1) ricerche di laboratorio che prevedono l'utilizzo dei tradizionali metodi tossicologici, in cui gli organismi da testare vengono esposti allo xenobiotico disciolto in acqua per condurre esperimenti del tipo dose/risposta;
- 2) ricerche ecologiche, condotte in campo, in cui la popolazione o le comunità sono il *focus* principale delle analisi.

Negli ultimi anni si sta sviluppando anche un nuovo approccio che prevede l'uso di microcosmi, per ricreare in laboratorio delle condizioni quanto più possibile simili a quelle presenti nell'ambiente naturale.

Gli Oligocheti costituiscono una grande parte della macrofauna presente negli ecosistemi acquatici, sono ampiamente distribuiti e tollerano un vasto range di condizioni chimico-fisiche e ambientali (CHAPMAN, 2001). Per questi motivi possono essere di grande utilità in studi tossicologici ed ecologici. Non tutti, però, rispondono in maniera uguale ai contaminanti: molto dipende dal tipo di inquinante preso in considerazione, dalla specie esaminata, dalla presenza di altri tipi di sostanze che possono agire come interferenti o creare sinergie e dalle condizioni ambientali locali, che a volte possono modificare la genetica della comunità e la loro sensibilità (RODRIGUEZ & REYNOLDSON, 2011).

Gli Oligocheti, essendo detritivori, sono esposti agli inquinanti anche attraverso l'ingestione di sedimento contaminato e possono essere utilizzati per valutare la tossicità degli xenobiotici in esso adsorbiti (INGERSOLL *et al.*, 1995). La loro presenza, inoltre, soprattutto per quanto riguarda i Tubificidi, è in grado di influenzare i processi fisici, chimici e microbiologici nello strato più superficiale del sedimento a causa della loro azione di bioturbazione, e di accelerare il rilascio di sostanze inquinanti nella colonna d'acqua sovrastante (KIKUCHI & KURIHARA, 1982). Le attività di *burrowing*, di alimentazione, di deposizione di pellets fecali sulla superficie del sedimento e di respirazione contribuiscono tutte a questo processo. KARICKHOFF & MORRIS (1985), esaminando gli effetti prodotti dalle due specie *Limnodrilus hoffmeisteri* e *Tubifex tubifex* sul sedimento, hanno notato come il rilascio di inquinanti nell'acqua sia 4-6 volte più elevato in presenza di

bioturbazione, e questo fenomeno rende i contaminanti biodisponibili per un tempo maggiore a tutti gli organismi acquatici. Accumulando sostanze tossiche nel loro corpo, inoltre, gli Oligocheti risultano nocivi anche per gli animali che se ne nutrono, contribuendo al trasferimento di queste sostanze a livelli superiori della catena alimentare (biomagnificazione). Il loro contributo per la comprensione degli effetti ecologici e fisiologici indotti dagli inquinanti non può perciò essere trascurato.

2. *Branchiura sowerbyi*

Branchiura sowerbyi è un Oligochete Tubificide acquatico di colore rosso scuro (dovuto alla presenza di emoglobina nel sangue) caratterizzato dall'aver dimensioni relativamente grandi e dei filamenti branchiali negli ultimi segmenti del corpo, caratteristiche che permettono una facile identificazione di questa specie, unica del suo genere (Fig. 1).

Ha una lunghezza che varia tra circa 20 mm negli esemplari più giovani e circa 185 mm negli esemplari adulti (LOBO & ALVES, 2011) e un diametro corporeo di 1-2 mm. E' formato in media da circa 120 segmenti, che possono arrivare a 170 negli individui più grandi (BEDDARD, 1892).



Fig. 1: un esemplare di *Branchiura sowerbyi*.

(http://www.hydra-institute.com/de/ifah/Gewaesseroekologie/Aquatische%20Neozoen_Steckbriefe.php)

2.1 Classificazione

Dominio: Eukaryota
Regno: Animalia
Phylum: Annelida
Classe: Clitellata
Sottoclasse: Oligochaeta
Ordine: Haplotaxida
Sottordine: Tubificina
Famiglia: Tubificidae
Sottofamiglia: Branchiurinae
Genere: *Branchiura*
Specie: *sowerbyi*

(Fonte: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=182695>)

2.2 Filamenti branchiali

La caratteristica peculiare di questa specie, assente nelle altre specie di Tubificidi, è la presenza di filamenti branchiali nella parte posteriore del corpo (Fig. 2). Ogni segmento in quest'area ne ospita un paio, che si estendono dorsalmente e ventralmente dalla linea mediana del corpo. Il numero dei filamenti varia da individuo a individuo e in media i più giovani ne possiedono un numero minore. La lunghezza di questi filamenti è di circa 2 mm e diminuisce verso il limite posteriore del corpo. Ogni filamento è ricoperto da una fine cuticola, al di sotto della quale si trovano l'epidermide, i vasi sanguigni e uno strato di fibre muscolari, responsabili della loro contrazione. L'asse centrale è occupato da una cavità celomatica che non è però in comunicazione con quella presente nel corpo dell'animale: tra le due è presente una membrana elastica che diventa alternativamente concava e convessa, seguendo le contrazioni del vaso sanguigno dorsale (BEDDARD, 1892). La sua funzione è probabilmente quella di bloccare l'ingresso di qualsiasi sostanza solida all'interno del lume dei filamenti branchiali. *B. sowerbyi* vive infossata nel fango, con la parte anteriore all'interno del sedimento e quella posteriore che fuoriesce e che pratica continui movimenti oscillatori per la respirazione. Ogni singolo filamento branchiale, in più, è in

grado di muoversi indipendentemente, estendendosi e retraendosi (BEDDARD, 1892). Il suo stile di vita la rende molto visibile e di conseguenza vulnerabile alla predazione: per questo motivo in questa specie si sono evoluti dei meccanismi neuronali che le permettono di attuare una rapida azione di fuga all'interno del sedimento. Questi meccanismi comprendono lo sviluppo di un apparato sensorio molto sensibile in grado di rilevare vibrazioni del substrato, spostamenti d'acqua e contatti da parte di possibili predatori, e lo sviluppo di fibre nervose molto grandi in grado di condurre rapidamente gli stimoli e di causare una risposta muscolare del tipo tutto-o-nulla (DREWES & ZORAN, 1989).



Fig. 2: particolare dei filamenti branchiali di *Branchiura sowerbyi*.

2.3 Sete

In posizione dorsale e ventrale, tranne nel primo segmento, sono presenti delle sete organizzate in fasci e utilizzate per la locomozione, che differiscono tra loro sia nella forma che nelle dimensioni. Sono presenti due tipi principali di sete: capilliformi e uncinati, queste ultime semplici, bifide o dentate. Per quanto riguarda i fasci dorsali, RAPOSEIRO *et al.* (2009) riportano un numero di 4 sete capilliformi (in diminuzione andando verso la parte posteriore del corpo) e un numero variabile di sete uncinati da semplici a bifide, mentre STEPHENSON (1930), SPENCER (1932) e GRABOWSKI & JABLOŃSKA (2009) riportano un numero minore di sete capilliformi per fascio dorsale. Per quanto riguarda invece i fasci ventrali, sono presenti solamente 10-11 sete uncinati e nessuna seta capilliforme

(STEPHENSON, 1930; GRABOWSKI & JABLONSKA, 2009; RAPOSEIRO *et al.*, 2009). Il numero di sete per fascio dorsale non può essere considerato di importanza tassonomica, in quanto è variabile da individuo a individuo. In generale, comunque, individui più grandi hanno un maggior numero di sete rispetto agli individui più piccoli (SPENCER, 1932).

2.4 Sistema circolatorio

I principali vasi sanguigni di *B. sowerbyi* sono quello dorsale e quello ventrale, connessi a livello dell'esofago, nell'undicesimo segmento, dal vaso sanguigno circumesofageo (BEDDARD, 1892). Questi vasi decorrono per tutta la lunghezza del corpo, inizialmente separati dall'intestino e successivamente in contiguità tra di loro. Il vaso sanguigno ventrale, nella regione delle branchie, si divide in più diramazioni e forma dei loop che decorrono all'interno di ogni branchia (SPENCER, 1932). E' presente anche un esteso network di capillari, costituiti da un gran numero di vasi longitudinali collegati da vasi trasversali (BEDDARD, 1892). Nei segmenti nono e decimo, inoltre, sono presenti due paia di cuori (SPENCER, 1932).

2.5 Sistema alimentare

In posizione anteriore è presente una cavità boccale, o prostomio, che segna l'inizio del tratto alimentare di questa specie. Nell'undicesimo segmento si trova l'esofago (BEDDARD, 1892) e successivamente ha inizio il tratto intestinale, convoluto e riconoscibile anche ad occhio nudo attraverso l'epidermide semitrasparente, in quanto appare scuro a causa della presenza di sedimento al suo interno. Questa specie, infatti, ne ingerisce grandi quantità, estraendo sostanza organica, batteri e microparticelle per la sua alimentazione. Il tipo di alimentazione adottato causa anche un continuo rimescolamento dei primi 10 cm circa di sedimento: questo, dopo l'ingestione, viene infatti escreto sulla superficie sottoforma di pellets fecali.

2.6 Apparato riproduttivo

B. sowerbyi è una specie ermafrodita e presenta sia gonadi maschili che femminili nello stesso individuo ma non attua l'autofecondazione: vi è un accoppiamento tra due individui che consiste nello scambio solamente di gameti maschili. Sono presenti due paia di gonadi, testicoli e ovari, che sono localizzate rispettivamente nei segmenti 9 e 11. Nel decimo segmento sono presenti un paio di spermateche a forma di pera (HIRAO, 1973), che hanno la funzione di immagazzinare gli spermatozoi del copulante in attesa della sfilatura del bozzolo, una struttura chitinoso, secreta dal clitello, che conterrà sia le uova prodotte dall'individuo che gli spermatozoi del copulante e nella quale avviene la fecondazione vera e propria. I pori degli ovidotti si trovano tra i segmenti undicesimo e dodicesimo, mentre i pori maschili e le aperture delle spermateche si trovano sulla superficie ventrale del clitello (HIRAO, 1973). Negli individui immaturi le gonadi hanno dimensioni piccole, mentre in quelli maturi sono molto più grandi: in questi ultimi i testicoli misurano $470 \times 350 \mu\text{m}$ e gli ovari $480 \times 550 \mu\text{m}$ (CASELLATO *et al.*, 1987). Gli individui maturi, inoltre, hanno dimensioni corporee maggiori, con una lunghezza di 15 cm circa e un diametro di 2 mm (HIRAO, 1973). Le gonadi mature sono facilmente visibili anche ad occhio nudo, in quanto si presentano come delle masserelle biancastre che traspaiono dalla cuticola corporea semitrasparente dell'animale. Il clitello, un ispessimento dell'epidermide funzionale alla riproduzione e presente solo nel periodo riproduttivo, occupa 3 segmenti, dal decimo al tredicesimo (HIRAO, 1973) (Fig. 3 A e B).

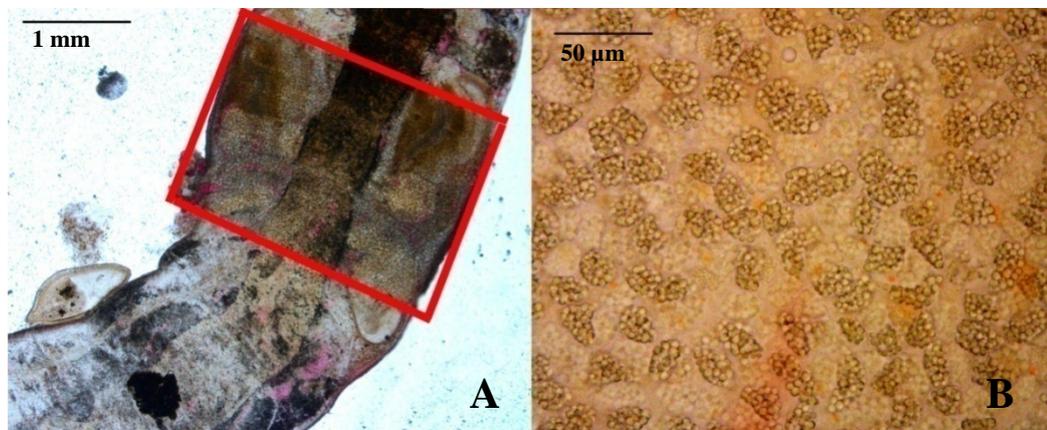


Fig. 3: **A)** segmenti occupati dal clitello; **B)** ingrandimento della superficie del clitello, in cui sono visibili le ghiandole serigene.

2.6.1 Ovari e oogenesi

Gli ovari hanno una forma conica, con la parte più stretta collegata al setto tra i segmenti 10 e 11, e la parte più larga che si estende liberamente nel celoma (URBISZ *et al.*, 2010); sono inoltre polarizzati e si possono individuare diverse zone caratterizzate da cellule germinali, raggruppate in cisti, a stadi diversi e progressivi di maturazione. Ogni cellula presente nella cisti è collegata, tramite un ponte citoplasmatico, ad un citoforo centrale (ŚWIĄTEK *et al.*, 2009), un ispessimento della membrana plasmatica che ha una funzione di supporto e di sincronizzazione dello sviluppo delle cellule germinali (CASELLATO *et al.*, 1987). Solamente l'ultima divisione mitotica delle cellule germinali è seguita da una citochinesi completa, che causa la loro separazione dal citoforo (URBISZ *et al.*, 2010). Gli oogoni che portano a termine la meiosi e completano lo sviluppo sono pochi, mentre i restanti cessano la meiosi e si trasformano in cellule nutritive, che hanno la funzione di supportare gli oogoni e gli oociti in accrescimento con macromolecole e organelli cellulari (URBISZ *et al.*, 2010). Gli oogoni e gli oociti liberi nel celoma, inoltre, entrano in contatto con i vasi sanguigni dell'animale, che trasportano alle cellule germinali in via di sviluppo glicogeno e goccioline lipidiche. In questa fase viene accumulata la maggior parte del tuorlo, che si presenta come globuli proteici elettrondensiti. Le cellule uovo completamente sviluppate sono molto grandi (circa 1,5 mm), contengono un'enorme quantità di tuorlo e sono visibili nei segmenti dal dodicesimo al diciannovesimo. L'organizzazione generale degli ovari ricorda quella degli Irudinei, con l'eccezione delle specie della famiglia Piscicolidae (FERNÁNDEZ *et al.*, 1992; SPALEK-WOLCZYŃSKA *et al.*, 2008; ŚWIĄTEK, 2008). La differenziazione in zone dell'ovario è presente anche nel Lumbricide *Dendrobaena veneta*, ma in questa specie il citoforo non è particolarmente sviluppato come in *B. sowerbyi* (SIEKIERSKA, 2003). La struttura prominente di quest'ultimo, invece, ricorda quella presente nelle specie della famiglia Glossiphonidae (FERNÁNDEZ *et al.*, 1992; ŚWIĄTEK, 2005, 2006).

2.6.2 Testicoli e spermatogenesi

I testicoli si presentano come delle masse di cellule di forma sferica o poligonale (HIRAO, 1973). Lo sviluppo degli spermatozoi passa attraverso diversi stadi. Lo stadio iniziale è quello spermatogoniale primario: le cellule, che hanno una forma a pera, sono riunite in gruppi di 8 in una struttura sferica simile ad una cisti, e sono poste attorno ad un citoforo centrale (Fig. 4). Queste cisti hanno un diametro di circa 30-40 μm . Dopo la prima divisione mitotica spermatogoniale, in cui non vi è accrescimento cellulare, si formano cisti da 16 cellule di spermatogoni secondari, che sono grandi circa 50-60 μm (Fig. 4). Successivamente avviene un'altra divisione e si formano cisti di 32 cellule di spermatociti primari (Fig. 4). Il citoforo diventa molto grande grazie ad un ingente trasferimento di citoplasma durante la divisione: una funzione del citoforo, infatti, è quella di immagazzinare il citoplasma superfluo (STANG-VOSS, 1972, MARTINUCCI *et al.* 1977, JAMIESON, 1981). Morule di spermatociti secondari a 64 cellule si formano dopo la prima divisione meiotica, e misurano circa 55-60 μm (Fig. 5). Successivamente, con la seconda divisione meiotica, si formano morule da 128 cellule di spermatidi del diametro di 60-65 μm (Tab. 1); in questo stadio comincia a formarsi la coda dei futuri spermatozoi, i quali però restano ancora attaccati al citoforo attraverso la testa, con la coda che protende radialmente verso l'esterno (Fig. 5). Una volta raggiunta la maturazione, gli spermatozoi si distaccano dal citoforo mediante continui movimenti della coda, e viaggiano nel celoma pronti per essere immagazzinati nelle vescicole seminali; il citoforo, invece, si riduce e degenera. Nei testicoli si ritrova solamente lo stadio spermatogoniale, mentre tutti gli altri stadi si ritrovano nel celoma e nelle vescicole seminali, che si trovano nei segmenti dal nono al diciassettesimo.

N° di cellule	Stadio	Diametro
8 cellule	Spermatogoni primari	30-40 μm
16 cellule	Spermatogoni secondari	50-60 μm
32 cellule	Spermatociti primari	50-60 μm
64 cellule	Spermatociti secondari	55-60 μm
128 cellule	Spermatidi	60-65 μm

Tab. 1: riepilogo delle principali fasi della spermatogenesi in *B. sowerbyi*.

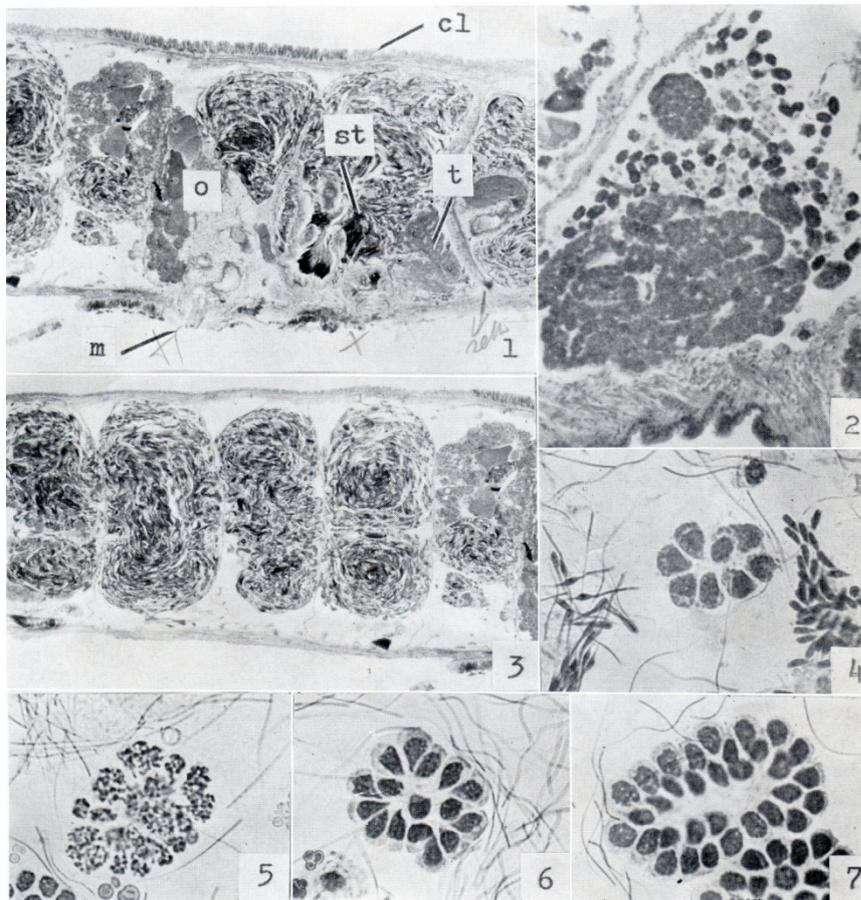


Fig. 4: **1)** Sezione a livello del clitello (**cl** = epitelio clitellare, **m** = pori maschili, **o** = ovario, **st** = spermateche, **t** = testicoli); **2)** Sezione a livello dei testicoli, che mostra le varie dimensioni dei citofori; **3)** Sezione a livello delle vescicole seminali; **4)** Spermatogoni primari in gruppi di 8 cellule nelle vescicole seminali; **5)** Premetafase della prima divisione spermatogonale; **6)** Spermatogoni secondari in gruppi di 16 cellule; **7)** Spermatociti primari in gruppi di 32 cellule (HIRAO, 1973)

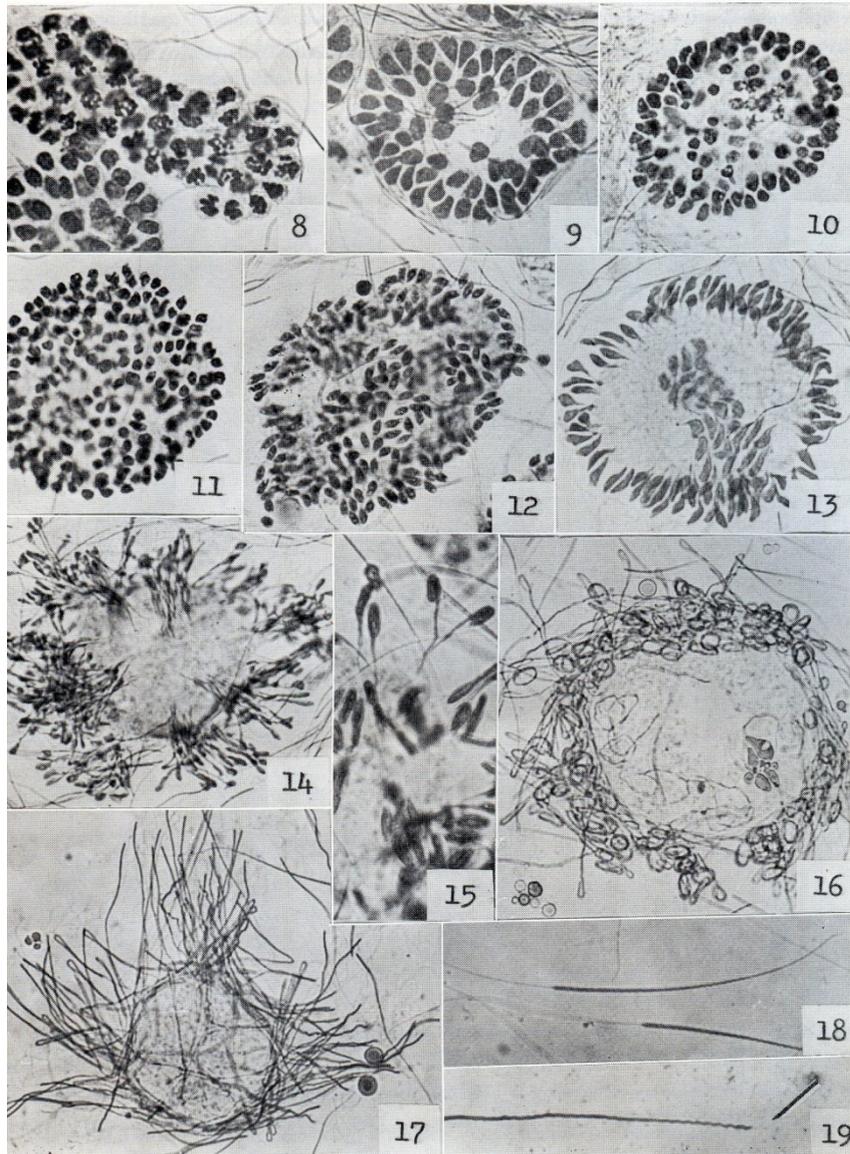


Fig. 5: 8) metafase della divisione degli spermatociti primari; 9) spermatociti secondari; 10) metafase della divisione degli spermatociti secondari; 11) nuclei compatti degli spermatidi; 12) 128 spermatidi; 13) spermatidi alla periferia del citoforo; 14) allungamento del nucleo degli spermatidi; 15) ingrandimento del nucleo degli spermatidi; 16) nuclei degli spermatidi; 17) spermatidi con code che si estendono radialmente verso l'esterno; 18) spermatozoi maturi; 19) spermatozoi maturi (HIRAO, 1973).

2.6.3 Ciclo riproduttivo

Ogni popolazione di *B. sowerbyi* ha un proprio ciclo riproduttivo, che è influenzato dall'ambiente in cui si trova, soprattutto dalla temperatura e dall'ossigeno disciolto (ASTON, 1966). L'accoppiamento e la deposizione delle uova avvengono quando la temperatura è superiore ai 22°C, con un optimum a 25°C. Inoltre, questa specie si riproduce preferenzialmente in acque a debole

corrente (CARROLL & DORRIS, 1972). In generale, il periodo riproduttivo dura circa 4-5 mesi: nel mese di marzo-aprile compaiono i primi individui clitellati, che hanno una lunghezza di 11-12 cm (CASELLATO, 1984) e tra maggio e luglio tutti gli individui diventano maturi e pronti per deporre i bozzoli, che hanno dimensioni di 2-4 mm (ASTON, 1968) e contengono un numero variabile di uova (Fig. 6). Dalla deposizione dei bozzoli alla loro schiusa trascorrono circa 10-20 giorni (LOBO & ALVES, 2011): i nascituri crescono rapidamente durante le prime 3 settimane, ma poi il loro peso si stabilizza (NASCIMENTO & ALVES, 2008). Solitamente qualche uovo degenera, soprattutto se il bozzolo ne contiene molti: queste uova degenerate vengono utilizzate come fonte di cibo dai piccoli in corso di sviluppo (CASELLATO, 1984). Il ciclo vitale si completa in un anno, ossia i giovani emersi dai bozzoli deposti in primavera/estate raggiungono la maturità sessuale a partire da marzo dell'anno successivo (ASTON, 1968). In inverno, perciò, la popolazione di *B. sowerbyi* è formata da individui lunghi 8-9 cm aventi un apparato sessuale completo ma senza clitello e da individui immaturi di 4-6 cm di lunghezza, mentre in piena estate (agosto) la popolazione è formata da individui giovani appena nati e lunghi 2-4 cm e da individui adulti che hanno appena effettuato la riproduzione, i quali si presentano senza clitello e, inoltre, sono più piccoli e meno numerosi rispetto alla popolazione primaverile (CASELLATO, 1984). Durante il periodo riproduttivo si osserva infatti un calo del peso dovuto all'uso delle risorse energetiche per la produzione di uova (MARCHESE & BRINKHURST, 1996; DUCROT *et al.*, 2007; KOOIJMAN, 2000) e aumenta anche la mortalità (PODDUBNAYA, 1958). PIANKA & PARKER (1975) hanno notato anche che individui con un'efficienza riproduttiva sopra la media sono in grado di generare un gran numero di discendenti, ma questo causa un aumento della mortalità e riduce il tasso riproduttivo per l'anno successivo. Terminata la riproduzione vi è una regressione parziale degli organi riproduttivi, accompagnata da un riassorbimento completo di spermateche e sacchi spermatici: i primi segni di degenerazione compaiono a luglio, appena prima della deposizione dei bozzoli, e si manifestano dapprima nei testicoli, che degenerano in maniera maggiore rispetto agli ovari (CASELLATO *et al.*, 1987). Il periodo di massima regressione coincide con l'autunno: i testicoli si riducono ad una dimensione di 200x70 μm e gli ovari ad una dimensione di 250x100 μm .

All'inizio dell'inverno le gonadi entrano in un periodo di quiescenza che dura circa 2 mesi, per poi riprendere la loro attività verso la fine di febbraio (CASELLATO *et al.*, 1987).



Fig. 6: bozzoli di *Branchiura sowerbyi*. All'interno si possono vedere le uova.

2.7 Habitat

Questa specie vive comunemente in ambienti acquatici tropicali e temperati caratterizzati dall'aver una temperatura relativamente alta (REYNOLDS, 1987), un alto contenuto di sostanza organica (ASTON, 1973; ASTON & MILNER, 1981) e un flusso d'acqua lento (DJUKIC, 1983). Nelle regioni più fredde si ritrova in acque riscaldate artificialmente, come scarichi industriali caldi, o in fonti di acque termali (ASTON, 1968; BRINKHURST & JAMIESON, 1971; CASELLATO, 1984; MANN, 1958). Questa specie è stata scoperta per la prima volta da Frank E. Beddard nel 1892 all'interno del fango contenuto nella vasca della pianta acquatica *Victoria regia* dei Giardini della Società Botanica Reale, al Regent Park di Londra, Inghilterra. Successivamente si scoprì che *B. sowerbyi* è in realtà originaria dell'Asia tropicale e sub-tropicale ed è stata introdotta in quasi tutti i continenti (TIMM, 1980), ad eccezione dell'Antartide, grazie all'intervento dell'uomo: l'importazione di piante acquatiche asiatiche e di pesce da allevamento (PAUNOVIC *et al.*, 2005) ha causato l'espansione del suo habitat naturale, fenomeno che ora è accentuato anche dal cambiamento globale delle temperature (NEHRING, 1998; STACHOWICZ *et al.*, 2002). La dispersione di *B. sowerbyi* è stata

molto rapida, probabilmente agevolata dalla presenza di reti di canali artificiali e dalla dispersione dei bozzoli attraverso gli escrementi degli uccelli (PAUNOVIC *et al.*, 2005). La sua presenza è stata infatti documentata in numerosissimi paesi. Come ogni altra specie non indigena, essa potrebbe essere in grado di disturbare le relazioni esistenti all'interno delle comunità bentoniche e, di conseguenza, avere anche un impatto sulla catena alimentare degli ecosistemi acquatici. In aree particolarmente sensibili, inoltre, la sua dispersione potrebbe diventare una minaccia alla biodiversità locale.

Grazie all'alta produttività annuale, alla sua facile identificazione, alle sue dimensioni relativamente grandi che forniscono biomassa sufficiente per eseguire test sul bioaccumulo, e alla sua capacità di resistere bene a variazioni di temperatura e ossigeno disciolto, che le permettono di avere un tasso di mortalità relativamente basso, *B. sowerbyi* può essere allevata facilmente sia per condurre esperimenti tossicologici (NAQVI, 1973; CHAPMAN *et al.*, 1982; CHATTOPADHYAY & KONAR, 1985; HOSSAIN *et al.*, 1987; CASELLATO & NEGRISOLO, 1989; MULLICK & KONAR, 1991; CASELLATO *et al.*, 1992; MARCHESE & BRINKHURST, 1996; BHUNIA *et al.*, 2000), sia perché risulta di grande interesse commerciale come alimento per pesci.

3. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa ricerca è di valutare gli effetti tossici dei fluoruri sull'Oligochete *Branchiura sowerbyi*, analizzandone il tasso di mortalità e il bioaccumulo, inteso come la concentrazione dell'inquinante presente nei tessuti dell'animale. Quest'ultima analisi risulta molto utile per determinare la capacità di questa specie di regolare l'assorbimento e l'eliminazione, sia attraverso l'escrezione che mediante trasformazione metabolica, dei fluoruri e, quindi, per determinare la sua resistenza. Inoltre, si è voluto valutare come anche concentrazioni relativamente basse di questo inquinante ambientale, che nel breve-medio termine non provocano effetti letali, possano avere, nel lungo

termine, un effetto negativo sulla gametogenesi e sulla riproduzione di questa specie.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Prelievo e acclimatazione

Gli individui di *Branchiura sowerbyi* utilizzati negli esperimenti sono stati prelevati all'Orto Botanico di Padova, dove vivono e si riproducono nelle vasche della ninfea *Victoria cruziana* (Fig. 7). Queste vasche sono alimentate da un'acqua termale proveniente da una falda a 300 m di profondità, la quale sgorga ad una temperatura costante per tutto l'anno, rendendo minimo il range di variazione durante l'anno. L'acqua di queste vasche, infatti, varia tra i 17°C nella stagione invernale e i 26°C nella stagione estiva, diversamente dalle temperature delle più comuni acque superficiali, le quali risentono maggiormente delle variazioni climatiche e dell'intensità della radiazione solare. Questa caratteristica, in concomitanza con la presenza di grandi quantitativi di sostanza organica, rendono l'ambiente adatto allo sviluppo di questa specie. La popolazione di *B. sowerbyi* presente all'Orto Botanico è stata monitorata per molti anni (CASELLATO, 1984; CASELLATO *et al.*, 1987) al fine di analizzarne il ciclo biologico e riproduttivo.

Dalle stesse vasche, sono stati prelevati anche acqua e sedimento nel quale *B. sowerbyi* vive e di cui si nutre, in modo da ricreare in laboratorio delle condizioni ottimali per l'acclimatazione degli animali e lo svolgersi degli esperimenti. Gli individui prelevati sono stati quindi collocati, con acqua e sedimento originali, all'interno di cristallizzatori di vetro da 1 litro e lasciati acclimatare per una settimana in condizioni di ossigenazione e temperatura controllate.



Fig. 7: vasca dell'Orto Botanico dalla quale sono stati prelevati gli individui di *Branchiura sowerbyi* utilizzati negli esperimenti.

4.2 Impostazione degli esperimenti

Sono stati allestiti quattro esperimenti a breve termine (test acuti di 96 ore), due a medio termine (test cronici di 18 giorni) e uno a lungo termine (test cronico di 5 mesi), con l'obiettivo di studiare gli effetti letali e sub-letali del Sodio Fluoruro (NaF).

Per i test acuti e cronici a medio termine, sono stati predisposti 3 replicati (A, B e C) ognuno con 5 individui in una soluzione di 400 ml di acqua e NaF (NaF, pro analysis, Merck, FRG), all'interno di cristallizzatori di vetro di 13 cm di diametro. Per il test cronico di 5 mesi, sono stati allestiti 3 microcosmi con 20 individui ciascuno in piccoli acquari di 30x30 cm.

Nei test in cui era previsto l'uso del sedimento, questo è stato prima controllato per evitare l'immissione di altri individui di *B. sowerbyi* o di altre specie che avrebbero alterato le condizioni sperimentali. L'ossigenazione è stata fornita tramite il collegamento ad un sistema di areazione con rubinetti regolabili, e la temperatura è stata monitorata quotidianamente con un termometro a mercurio. I cristallizzatori sono stati successivamente coperti con delle lastre di plexiglass per evitare che l'evaporazione alterasse le concentrazioni sperimentali.

La vitalità e la recettività degli individui è stata monitorata quotidianamente: nel caso dei test in assenza di sedimento, gli animali sono stati osservati e leggermente stimolati con una pinzetta morbida direttamente nei cristallizzatori, mentre nel caso dei test in presenza di sedimento gli individui sono stati prelevati, isolati singolarmente in un piccolo contenitore con acqua originale dell'Orto Botanico, e a quel punto controllati. La scarsa mobilità, la ritardata risposta agli stimoli e l'autotomia della porzione caudale degli animali, sono stati considerati come segni di stress indotti dall'esposizione al fluoruro, mentre l'immobilità, insieme al cambiamento nella colorazione, hanno indicato la morte. Gli individui morti sono stati di volta in volta rimossi dai cristallizzatori e conservati in provette contenenti formaldeide al 4% per le successive analisi biochimiche. Alla fine degli esperimenti, anche gli individui rimasti vivi sono stati prelevati e messi in formaldeide per la conservazione e l'analisi dei tessuti.

4.2.1 Test acuti

Sono stati eseguiti 4 test acuti della durata di 96 ore: due a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e due a $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Per ciascuna temperatura, un esperimento è stato condotto in presenza di uno strato di 1 cm circa (125 g) di sedimento (Fig. 8), l'altro in sola acqua (Fig. 9). Gli individui sono stati sottoposti alle concentrazioni sperimentali di 80 mg/l, 160 mg/l, 320 mg/l e 640 mg/l di NaF e sono stati predisposti anche i triplicati del controllo (stesse condizioni, ma senza Fluoro aggiunto).

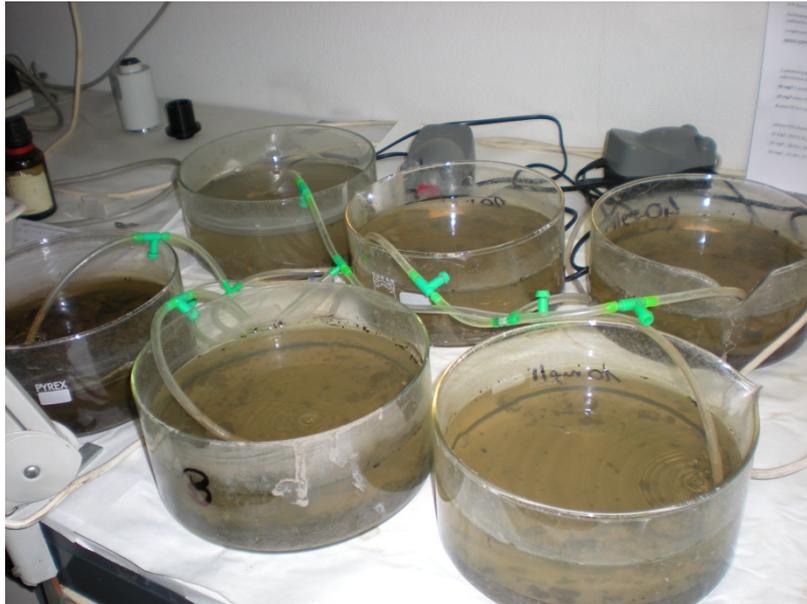


Fig. 8: cristallizzatori predisposti per condurre i test acuti in presenza di sedimento.

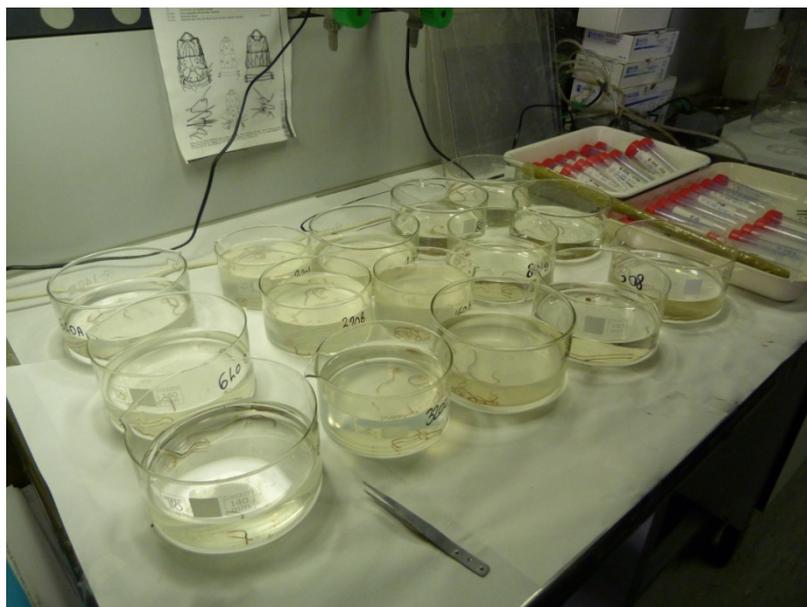


Fig. 9: cristallizzatori predisposti per condurre i test acuti in assenza di sedimento.

L'esperimento a $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ è stato condotto all'interno del laboratorio di Ecologia del Benthos del Dipartimento di Biologia, a temperatura costantemente monitorata, mentre quello a $17 \pm 0.5^\circ\text{C}$ è stato condotto in una cella fredda termostata. Quotidianamente, dopo il controllo degli individui, sono stati trascritti il numero di morti e le anomalie morfologiche e comportamentali osservate. La mortalità è stata convertita in percentuale per calcolare il valore di concentrazione alla quale muore il 50% della popolazione (LC_{50} , con un livello di

confidenza della media al 95%) attraverso l'analisi multifattoriale dei probit (MPA; software SAS ver. 9.1.3) (LEE, 1991). Le concentrazioni comprese tra il valore in cui non è stata riscontrata mortalità (NOEC: no observed effect concentration) e il valore più basso in cui questa si è verificata (LOEC: lowest observed effect concentration) sono state prese come riferimento per la scelta delle concentrazioni da utilizzare nei test cronici a medio-lungo termine. Sono stati presi in considerazione solo i valori di NOEC e LOEC derivanti dal test a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ eseguito in presenza di sedimento, sia perché i test cronici a medio-lungo termine sono stati eseguiti esclusivamente in presenza di sedimento, sia perché gli stessi valori derivanti dallo stesso test a $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ hanno riportato lo zero come valore di NOEC, che non può essere accettato.

4.2.2 Test cronici a medio termine

Sono stati eseguiti 2 test cronici di 18 giorni ciascuno: uno a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e l'altro a $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, entrambi in presenza di sedimento (Fig. 10). Gli individui sono stati sottoposti a concentrazioni sperimentali di 80 mg/l, 120 mg/l e 160 mg/l di NaF, oltre al controllo. Durante i test, gli animali sono stati controllati tutti i giorni e gli individui morti sono stati rimossi e conservati in formaldeide. Oltre ad analizzare il contenuto di Fluoro nei tessuti biologici e nel sedimento, per questi test sono state svolte anche delle analisi in itinere aggiuntive sull'acqua, con l'obiettivo di capire il grado di diminuzione del Fluoro all'interno dei cristallizzatori: ogni 6 giorni sono stati prelevati 10 ml di acqua dai cristallizzatori, combinati con 10 ml di TISAB III e, dopo aver atteso 24 ore per la stabilizzazione della forza ionica, la concentrazione residua di Fluoro è stata letta con un elettrodo iono-selettivo ISE F800 (da 0.02 mg F⁻/l a saturazione, accuratezza 0.1%, WTW).

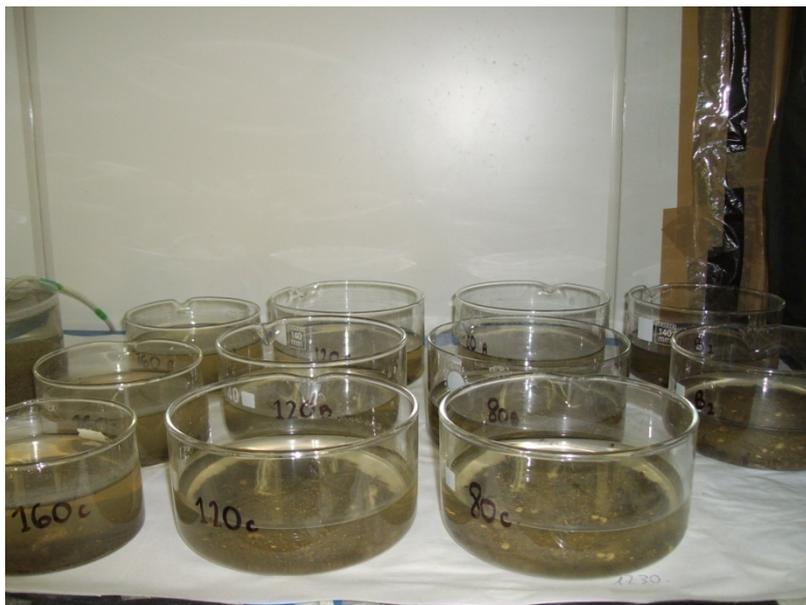


Fig. 10: cristallizzatori predisposti con una soluzione di acqua e NaF in presenza di sedimento per l'esecuzione dei test cronici.

4.3 Metodi di analisi

4.3.1 Rilevamento del Fluoro nei tessuti biologici

Il rilevamento del Fluoro nei tessuti biologici di *B. sowerbyi* è stato eseguito utilizzando la metodica descritta da MALDE *et al.* (2001). A 0.5 g di campione biologico sono stati aggiunti 5 ml di NaOH (8M) all'interno di crogioli in nickel che successivamente sono stati posizionati in stufa a 60°C. Una volta seccati, i campioni sono stati trasferiti in muffola per 16 ore a 200°C e subito dopo a 525°C per altre tre ore. Al campione lasciato raffreddare qualche minuto, sono stati aggiunti 10 ml di acqua distillata. A questo punto è stato riscaldato nuovamente in stufa a 60°C per favorire la dissoluzione dell'NaOH. Dopo circa 2 ore, il campione è stato trasferito all'interno di un piccolo contenitore di plastica e portato a pH 7.5 con l'aggiunta di HCl. Il campione è stato poi trasferito in una provetta falcon da 50 ml, portato a volume con acqua distillata e lasciato immobile qualche ora per permettere la sedimentazione della cenere sul fondo. Dalla soluzione chiarificata sono stati successivamente prelevati 10 ml di surnattante e trasferiti in un'altra provetta con 10 ml di TISAB III, per la stabilizzazione della forza ionica. Il giorno seguente i campioni sono stati

analizzati usando un elettrodo iono-selettivo ISE F800 (da 0.02 mg F⁻/l a saturazione, accuratezza 0.1%, WTW).

I valori di bioaccumulo, espressi inizialmente in mg/l, sono stati successivamente convertiti in µg/g di peso secco.

4.3.2 Rilevamento del Fluoro nel sedimento

Il rilevamento del Fluoro all'interno del sedimento è stato eseguito utilizzando la metodica descritta da MCQUAKER & GURNEY (1977). Alla fine degli esperimenti, i campioni di sedimento sono stati fatti seccare in stufa a 105°C e successivamente omogeneizzati attraverso l'uso di un mortaio in ceramica. Una volta macinati finemente, sono stati passati attraverso un setaccio a maglie di 150 µm, pesati e, dopo aver prelevato 0.5 g, è stata aggiunta acqua distillata all'interno di crogioli in nikel. Dopo aver aggiunto 5 ml di NaOH (16M), il campione è stato messo in stufa per un'ora a 150°C per permettere al composto di solidificarsi. Successivamente è stato trasferito per mezz'ora in muffola preriscaldata a 300°C e portata a 600°C al momento dell'inserimento del campione. Dopo aver fatto raffreddare il campione, sono stati aggiunti 10 ml di acqua distillata nei crogioli e questi sono stati rimessi in stufa. Una volta dissolto l'NaOH, la soluzione è stata portata, con l'aggiunta di HCl, a pH 8.5, trasferita in una beuta da 100 ml, portata a volume con acqua distillata e filtrata con un filtro Whatman n°40 (8µm). Dopo l'aggiunta di TISAB III in rapporto 1:1 col campione, questo è stato lasciato 24 ore a temperatura costante per la stabilizzazione della forza ionica. Il giorno seguente, i campioni sono stati analizzati usando l'elettrodo iono-selettivo. I valori ottenuti esprimono la quantità di Fluoro nel campione di sedimento e sono stati quindi convertiti in ppm.

4.3.3 Analisi statistica dei dati

Per ricavare i valori di LC₅₀ con un livello di confidenza della media al 95% è stato utilizzato il software SAS (versione 9.1.3) (LEE, 1991). Per valutare la significatività statistica delle relazioni tra i valori di bioaccumulo e concentrazione di NaF, temperatura e presenza/assenza di sedimento, è stata utilizzata l'analisi

della varianza (ANOVA), eseguita con il software R (versione 2.15.0). La linearità delle relazioni, infine, è stata valutata con la regressione lineare semplice utilizzando il metodo dei minimi quadrati, mediante l'uso del programma Microsoft Office Excel 2007.

4.4 Test cronico a lungo termine per valutare gli effetti sulla gametogenesi

Per valutare gli effetti dei fluoruri sul ciclo riproduttivo di *B. sowerbyi*, sono stati allestiti, all'interno di 3 acquari dalle dimensioni di 30 x 30 cm, dei microcosmi, con acqua e sedimento originali, per ricreare in laboratorio delle condizioni quanto più possibile simili all'ambiente naturale (Fig. 11).



Fig. 11: microcosmi allestiti per condurre il test a lungo termine finalizzato alla ricerca di possibili effetti negativi dei fluoruri sulla gametogenesi di *Branchiura sowerbyi*.

Le concentrazioni sperimentali di NaF utilizzate per questo test sono state di 15 mg/l e 30 mg/l, che sono dalle 50 alle 100 volte maggiori rispetto alla concentrazione naturale di Fluoro nelle acque, ed è stato predisposto anche un controllo senza Fluoro aggiunto. Ogni acquario è stato riempito con 10 l di soluzione e successivamente è stato aggiunto uno strato di sedimento originale di 10 cm sul fondo. All'interno di ogni acquario sono stati poi posizionati 20

individui di *B. sowerbyi*. La densità di popolazione degli individui all'interno degli acquari è stata di 220 ind/m², grosso modo corrispondente a quella dell'ambiente di origine della popolazione. Questi individui sono stati preventivamente selezionati in modo da utilizzare solo quelli appartenenti alla coorte degli individui al loro secondo anno di vita, che si sono già riprodotti l'anno precedente. Questi sono facilmente identificabili dalla coorte dei giovani di circa 1 anno, che raggiungono per la prima volta la maturità sessuale, perché sono di maggiori dimensioni (lunghezza 9-12 cm vs 5-6 cm).

L'esperimento è iniziato alla fine di febbraio 2012, periodo nel quale la rigenerazione degli ovari e dei testicoli si è completata e inizia la formazione delle cisti spermatogoniali e degli oogoni (CASELLATO, 1984; CASELLATO *et al.*, 1987) e si è concluso a metà luglio, periodo in cui la deposizione dei bozzoli si completa.

Ogni settimana è stata prelevata acqua all'Orto Botanico per rinnovare la soluzione all'interno dei microcosmi al fine di mantenere costante la concentrazione di NaF nel tempo. Periodicamente è stato aggiunto del sedimento originale, in modo da garantire la giusta quantità di sostanza organica per la sopravvivenza degli individui.

A periodi ravvicinati (circa quindicinalmente) sono stati eseguiti dei controlli sullo stato di avanzamento della gametogenesi maschile e femminile, sia degli animali negli acquari, trattati e non, sia di quelli della vasca originale dell'Orto Botanico per avere un termine di confronto con la popolazione originale. Per le osservazioni allo stereomicroscopio ottico, si è reso necessario anestetizzare gli individui da esaminare con qualche goccia di etanolo al 70%, per limitarne la grande mobilità e, una volta posizionati su una capsula petri, sono stati tagliati i primi 20 segmenti dal prostomio con una micro-forbicina. I segmenti isolati contenenti l'apparato sessuale per intero sono stati messi su un vetrino e leggermente pressati con un coprioggetto per far fuoriuscire il liquido celomatico contenente le cellule germinali maschili e femminili. I vetrini sono stati poi osservati al microscopio ottico Leica DMR (software utilizzato: LAS, Leica Application Suite; fotocamera utilizzata: Leica HQ DFC480) e sono state fatte foto dei particolari più significativi.

4.4.1 Analisi aggiuntive

Mensilmente sono state eseguite delle analisi aggiuntive riguardanti l'ossigeno disciolto, il contenuto di Fluoro nell'acqua e nel sedimento e il contenuto di sostanza organica, sia per l'acqua e il sedimento presenti nelle vasche originali dell'Orto Botanico, sia per quelli presenti negli acquari sperimentali (microcosmi). Le analisi dell'ossigeno disciolto sono state eseguite secondo il metodo di Winkler (STRICKLAND & PARSONS, 1968), mentre le analisi della sostanza organica sono state eseguite secondo il metodo di GAUDETTE *et al.* (1974).

Il contenuto di Fluoro nell'acqua è stato analizzato seguendo la stessa procedura descritta per le analisi sull'acqua eseguite per i test cronici, mentre il contenuto di Fluoro nel sedimento è stato analizzato secondo la metodologia di MCQUAKER & GURNEY (1977) precedentemente descritta.

5. RISULTATI

5.1 Test acuti

I valori di mortalità riscontrati indicano che *B. sowerbyi* ha un'alta tolleranza nei confronti del Sodio Fluoruro, soprattutto a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$: confrontando le percentuali di mortalità ottenute si può notare come quelle a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ siano più basse rispetto a quelle a $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, sia per i test con sedimento, sia per quelli senza sedimento (Tabb. 2 e 3; Figg. 12 e 13).

Concentrazioni sperimentali di NaF	Senza sedimento	Con sedimento
0 mg/l (controllo)	0.00%	0.00%
80 mg/l	22.00%	0.00%
160 mg/l	44.00%	11.00%
320 mg/l	100.00%	78.00%
640 mg/l	100.00%	100.00%

Tab. 2: valori di mortalità in % per i test acuti a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Concentrazioni sperimentali di NaF	Senza sedimento	Con sedimento
0 mg/l (controllo)	0.00%	0.00%
80 mg/l	0.00%	13.00%
160 mg/l	93.00%	20.00%
320 mg/l	93.00%	73.00%
640 mg/l	100.00%	100.00%

Tab. 3: valori di mortalità in % per i test acuti a 22±0.5°C.

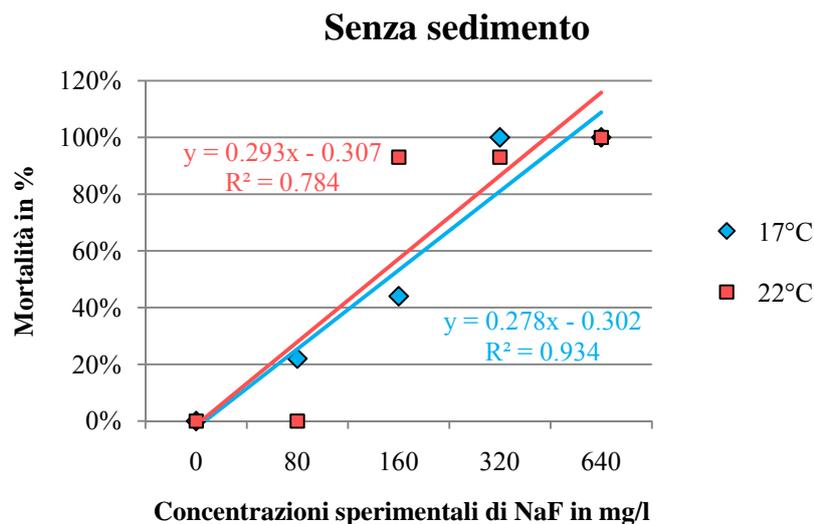


Fig. 12: confronto della mortalità nei test acuti a 17±0.5°C e 22±0.5°C senza sedimento.

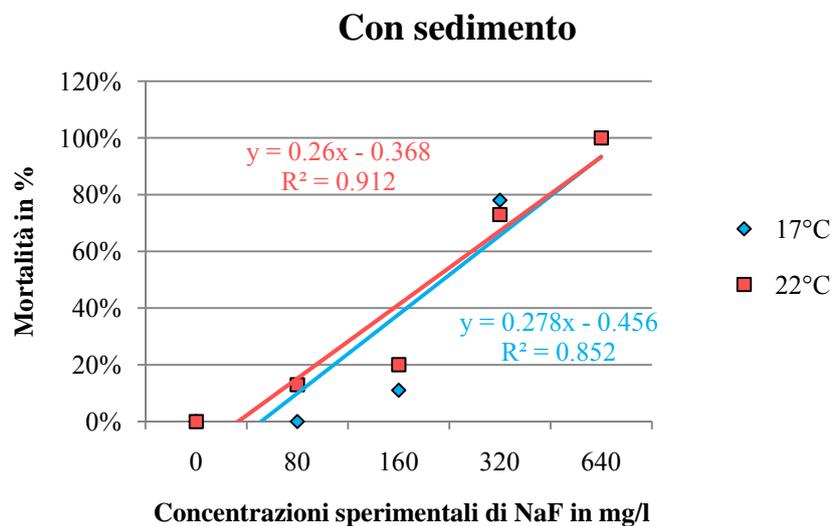


Fig. 13: confronto della mortalità nei test acuti a 17±0.5°C e 22±0.5°C in presenza di sedimento.

La mortalità, inoltre, si riduce in presenza di sedimento, sia per i test condotti a $17\pm 0.5^\circ\text{C}$ sia per quelli a $22\pm 0.5^\circ\text{C}$ (Figg. 14 e 15): a $17\pm 0.5^\circ\text{C}$ l'LC₅₀ varia tra 91.286 mg F/l per gli animali in acqua pura e 267.63 mg F/l per il test con sedimento, mentre a $22\pm 0.5^\circ\text{C}$ l'LC₅₀ varia tra 61.68 mg F/l e 80.07 mg F/l (Tab. 4).

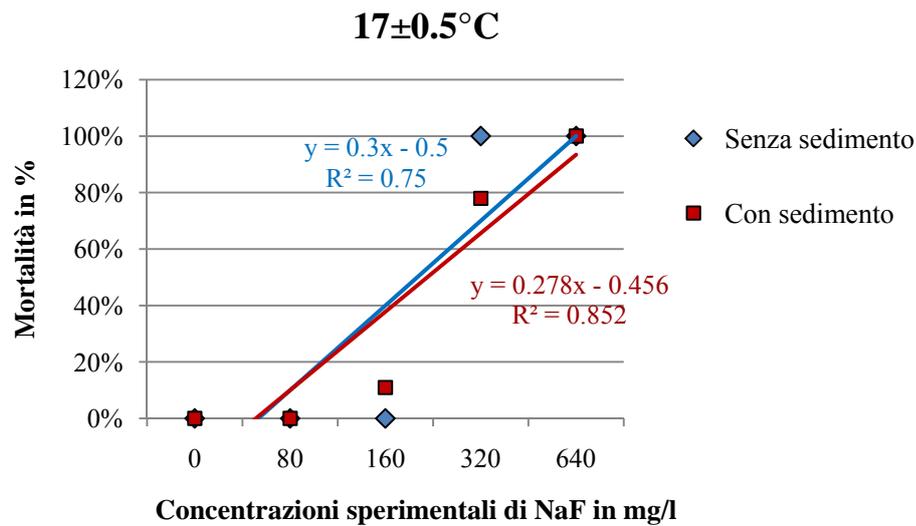


Fig. 14: confronto della mortalità nei test acuti a $17\pm 0.5^\circ\text{C}$ con e senza sedimento.

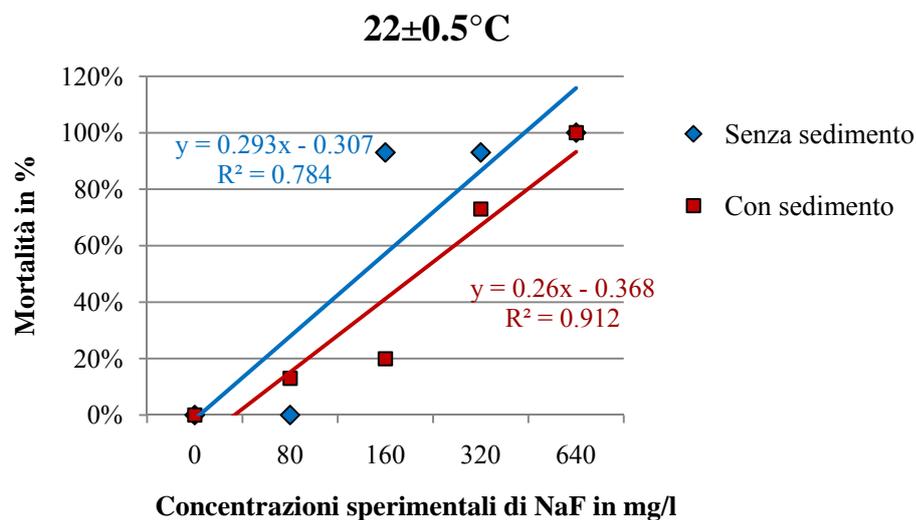


Fig. 15: confronto della mortalità nei test acuti a $22\pm 0.5^\circ\text{C}$ con e senza sedimento.

T°C	17±0.5°C	17±0.5°C	22±0.5°C	22±0.5°C
Sedimento	presente	assente	presente	assente
LC₅₀ (mg F/l) 96h	267.63	91.29	80.07	61.68
Intervallo di confidenza al 95% della media	257.75-277.51	84.5-98.05	62.101-111.55	47.83-90.11

Tab. 4: valori di LC₅₀ per i test acuti a 17±0.5°C e 22±0.5°C in presenza e assenza di sedimento.

I range principali per il NOEC (no effect concentration) e il LOEC (lowest effect concentration) di questa specie variano tra 80 mg F/l in assenza di sedimento a 160 mg F/l in presenza di sedimento.

La capacità di bioaccumulare Fluoro nei tessuti cresce all'aumentare della concentrazione di NaF (ANOVA, p<0.001). I valori di bioaccumulo, come accade per la mortalità, sono influenzati dalla presenza di sedimento: gli animali trattati con sedimento accumulano una quantità maggiore di Fluoro rispetto a quelli in acqua pura, sia per i test a 17±0.5°C che per quelli a 22±0.5°C (Fig. 16 e 17).

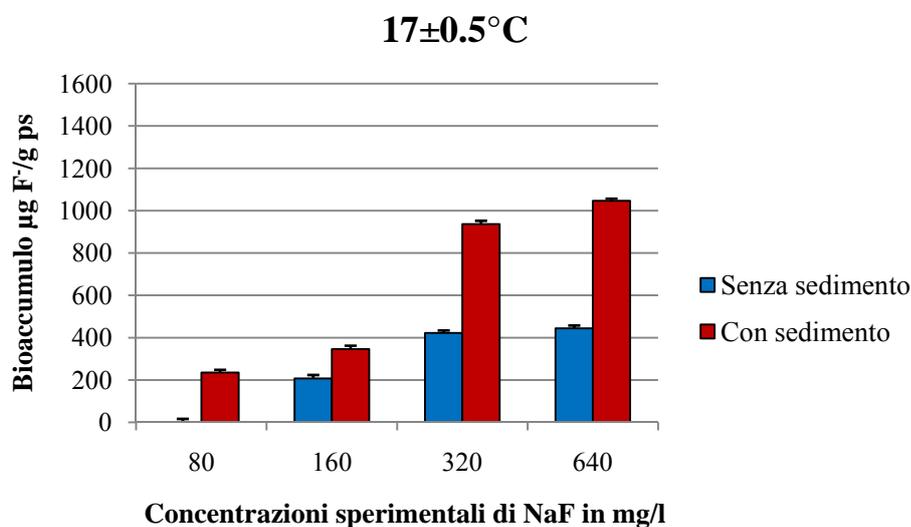


Fig. 16: confronto del bioaccumulo nei test acuti a 17±0.5°C con e senza sedimento.

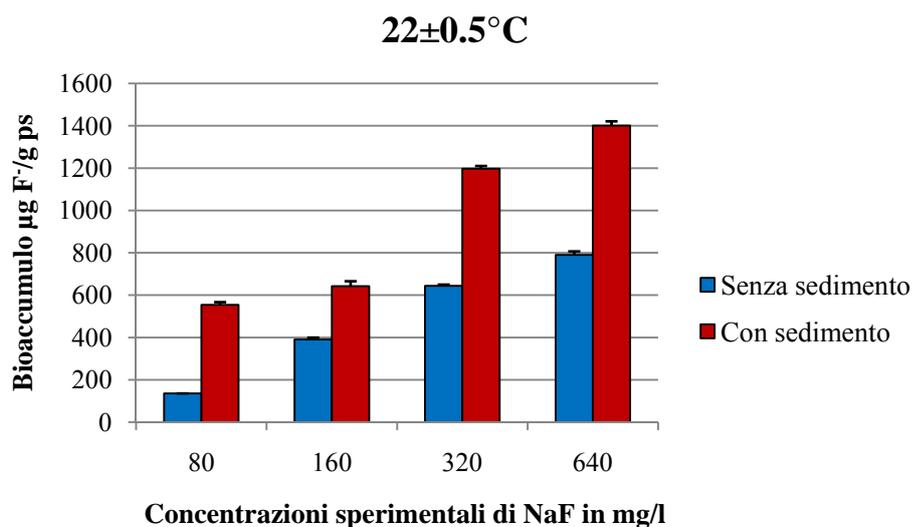


Fig. 17: confronto del bioaccumulo nei test acuti a 22±0.5°C con e senza sedimento.

Il bioaccumulo viene influenzato anche dalla temperatura: gli animali trattati a 22±0.5°C accumulano nel loro corpo una quantità maggiore di Fluoro rispetto a quelli trattati a 17±0.5°C (Figg. 18 e 19).

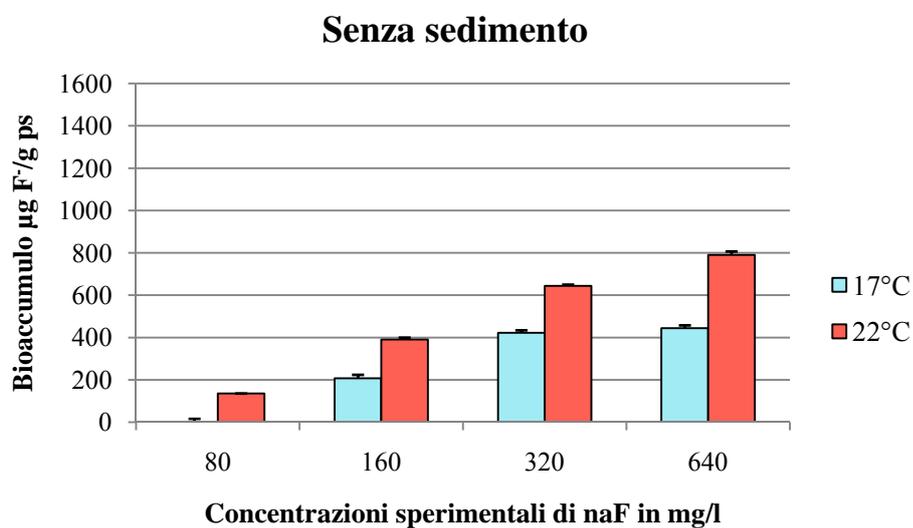


Fig. 18: confronto del bioaccumulo nei test acuti senza sedimento a 17±0.5°C e 22±0.5°C.

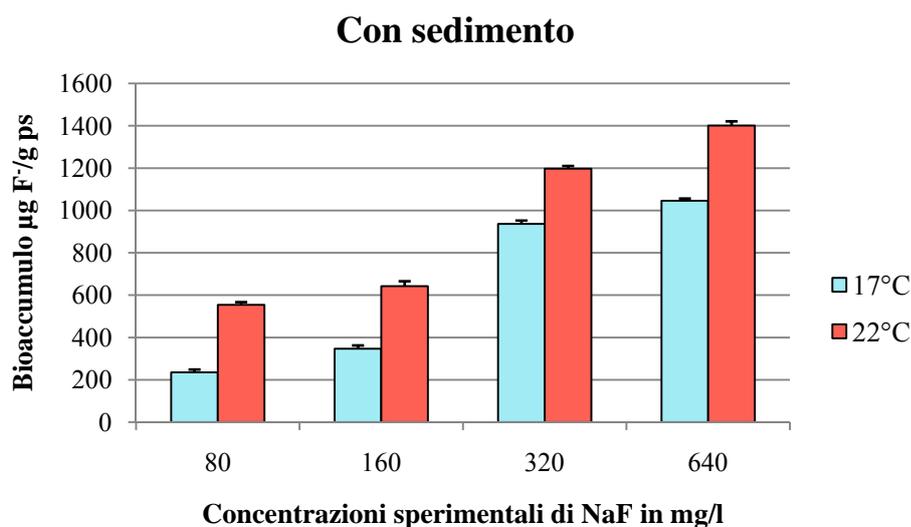


Fig. 19: confronto del bioaccumulo nei test acuti con sedimento a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

5.2 Test cronici a medio termine

I valori di mortalità ottenuti nel test a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ sono molto diversi da quelli ottenuti nel test a $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (Tab. 5): nel primo test si è avuto lo stesso valore di mortalità per tutte le concentrazioni sperimentali di NaF (6.67%), mentre nel secondo i valori di mortalità sono aumentati proporzionalmente col crescere della concentrazione. Risulta molto evidente, in questo caso, l'influenza della temperatura sulla tossicità del Sodio Fluoruro in *B. sowerbyi*.

Concentrazioni sperimentali di NaF	17°C	22°C
0 mg/l (controllo)	0.00%	0.00%
80 mg/l	6.67%	26.66%
120 mg/l	6.67%	40.00%
160 mg/l	6.67%	53.33%

Tab. 5: valori di mortalità in % per i test cronici a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Per il test a $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, la percentuale di mortalità cresce dell'1.3% per ogni 10 mg/l di NaF in più ($r=0.98$) (Fig. 20).

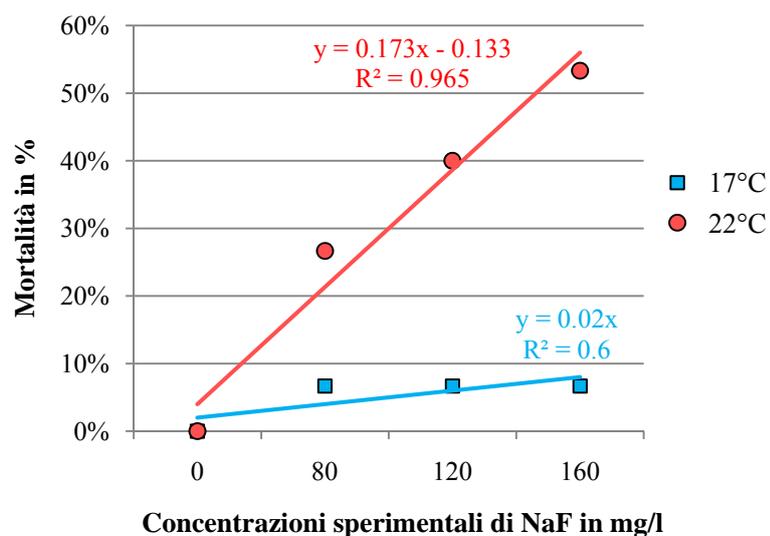


Fig. 20: confronto della mortalità nei test cronici a 17±0.5°C e 22±0.5°C.

I valori di bioaccumulo aumentano all'aumentare della concentrazione di NaF (ANOVA, $p < 0.001$), e sono molto più elevati nel test a 22±0.5°C (Fig. 21): l'esposizione di *B. sowerbyi* a 160 mg F/l ha dato come risultato una differenza del 40.25% nel valore di bioaccumulo per le due temperature.

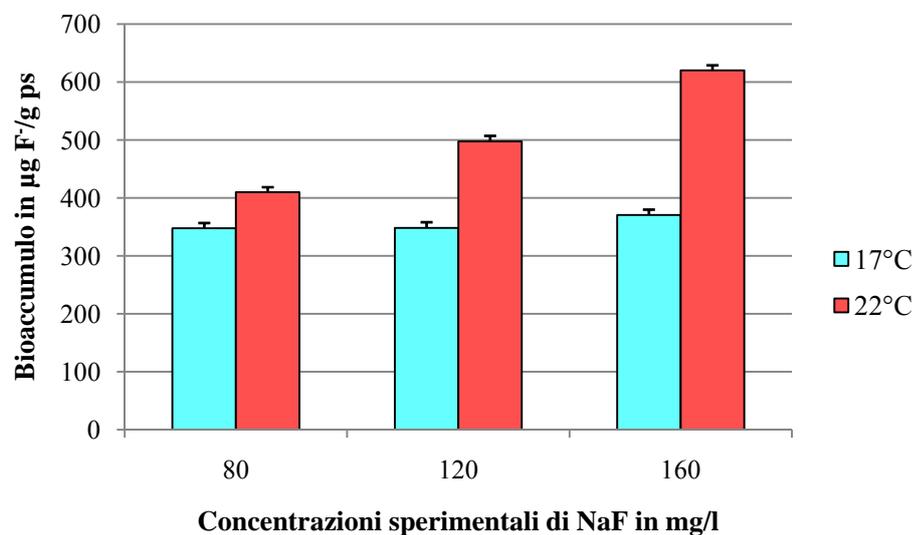


Fig. 21: confronto del bioaccumulo nei test cronici a 17±0.5°C e 22±0.5°C.

A 22±0.5°C è risultata molto evidente anche la grande capacità di adsorbimento di Fluoro da parte del sedimento (Fig. 22), che è risultata proporzionale alla

concentrazione sperimentale di NaF (ANOVA, $p < 0.01$). I maggiori picchi sono stati a $722 \mu\text{g F}^-/\text{g}$ per il test a $17 \pm 0.5^\circ\text{C}$ e $815 \mu\text{g F}^-/\text{g}$ per il test a $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

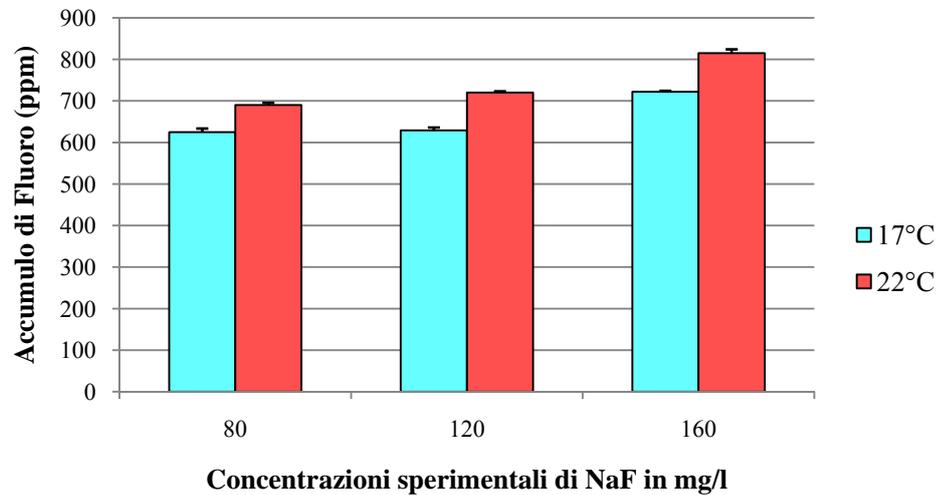


Fig. 22: accumulo di Fluoro nel sedimento dopo 18 giorni, a $17 \pm 0.5^\circ\text{C}$ e $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

L'analisi dell'acqua mostra come i fluoruri vengano assorbiti rapidamente sia dagli animali che dal sedimento. Il maggior decremento di Fluoro è avvenuto dopo 6 giorni dall'inizio dell'esperimento: a $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$, per la concentrazione sperimentale di 80 mg/l , c'è stato un decremento del 26% di Fluoro nell'acqua, mentre a $17 \pm 0.5^\circ\text{C}$ c'è stato un decremento solo del 13.31%. La temperatura, anche in questo caso, è in relazione con il decremento della concentrazione di Fluoro (Fig. 23).

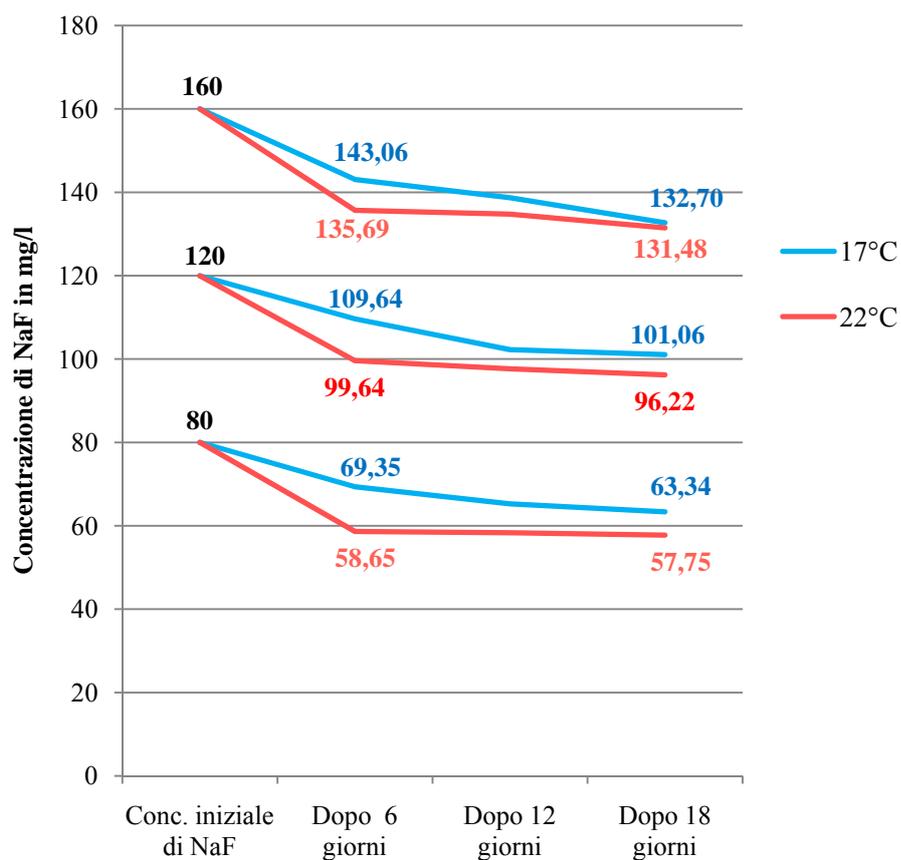


Fig. 23: depauperamento nel fluoro nell'acqua dopo 6,12 e 18 giorni dall'inizio dell'esperimento, a $17\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Prima della morte degli individui, inoltre, in entrambi gli esperimenti si è osservata autotomia della parte posteriore del corpo, causata dallo stress e dalla tossicità indotti dal fluoruro (Fig. 24).



Fig. 24: segmenti posteriori autotomizzati di *Branchiura sowerbyi*.

5.3 Test cronico a lungo termine per valutare gli effetti sulla gametogenesi

Alla fine di febbraio gli individui di *B. sowerbyi* utilizzati nel test avevano delle dimensioni di circa 9-12 cm e possedevano tutti delle gonadi mature: testicoli e ovari, trascorso il periodo di regressione dell'apparato sessuale, erano aumentati di dimensione e si presentavano come delle masserelle biancastre che trasparivano dalla parete corporea dell'animale. Attraverso l'analisi al microscopio ottico, inoltre, erano visibili anche cisti di spermatogoni in stadio precoce (4-8 cellule) e oogoni ancora attaccati all'ovario (Fig. 25). Non vi era ancora evidenza di un clitello ben sviluppato, manifestazione visibile solamente dopo un mese, sia nel gruppo di controllo che negli individui trattati.



Fig. 25: particolare dell'ovario di *Branchiura sowerbyi*.

Nel gruppo di controllo, le prime cisti di spermatogoni a 16 cellule (Fig. 26 A), delle dimensioni di 22 μm, sono comparse all'inizio di marzo, ma negli individui trattati sono state ritrovate solamente all'inizio di aprile, evidenziando fin d'ora un ritardo di maturazione nella linea germinale maschile. Al contrario, i primi oogoni singoli liberi nel celoma, delle dimensioni di 51 μm (Fig. 26 B), sono stati ritrovati a fine marzo, in tutti gli individui, sia per quelli trattati che per quelli del gruppo di controllo. Questi, nei mesi successivi, hanno iniziato ad ingrandirsi (diametro di circa 56 μm) e ad accumulare globuli proteici di tuorlo al loro interno (Fig. 27).



Fig. 26: cisti di spermatogoni a 16 cellule (A) e un oogonio libero nel celoma (B).



Fig. 27: oocita di *Branchiura sowerbyi* in stadio più avanzato di maturazione.

Le prime cisti a 32 cellule di spermatociti primari (diametro di 42 μm) (Fig. 28) sono comparse ad inizio aprile nel gruppo di controllo, ma negli individui trattati sono comparse solamente a fine mese. Le prime uova mature (Figg. 29 e 30) sono state ritrovate contemporaneamente a fine aprile sia nel gruppo di controllo che negli individui trattati a 30 mg F/l, ma in quelli trattati a 15 mg F/l sono comparse inspiegabilmente con un ritardo di un mese.



Fig. 28: cisti a 32 cellule di spermatociti primari in *Branchiura sowerbyi*.

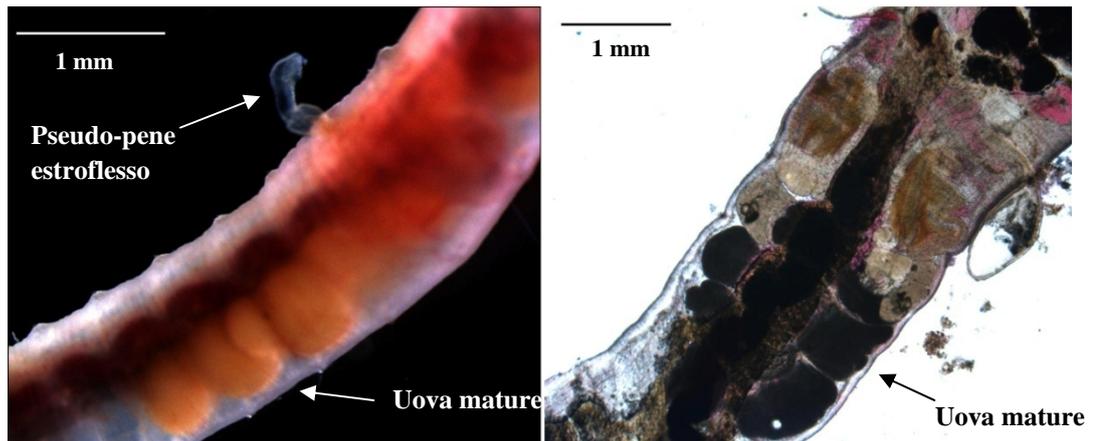


Fig. 29: uova mature all'interno del corpo di *Branchiura sowerbyi*.



Fig. 30: cellula uovo di *Branchiura sowerbyi*.

Nel gruppo di controllo, durante il mese di maggio, le cisti appartenenti alla linea germinale maschile sono diventate più numerose e sono apparse anche quelle a 64 cellule di spermatociti secondari e le prime a 128 cellule di spermatidi (diametro di 60 µm), nelle quali risultano evidenti le code dei futuri spermatozoi che si estendono radialmente dal citoforo (Fig. 31). Negli individui trattati, le prime cisti di spermatidi sono state ritrovate un mese più tardi, ma esse erano molto meno numerose e in più deformate (Fig. 32).

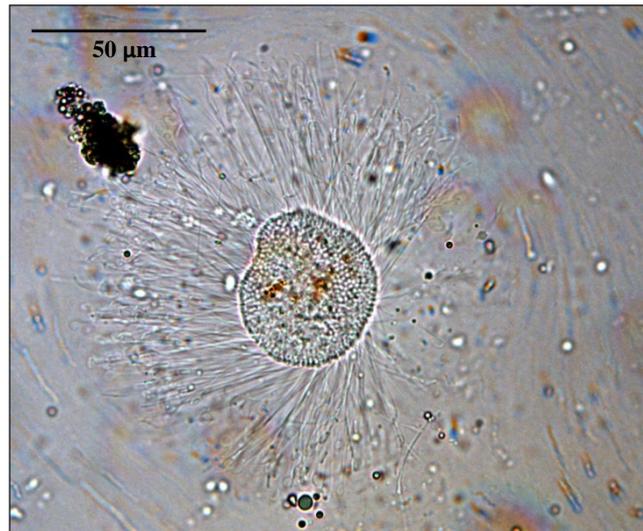


Fig. 31: cisti a 128 cellule di spermatidi in *Branchiura sowerbyi*: sono visibili le code dei futuri spermatozoi che si estendono radialmente dal citoforo.



Fig. 32: cisti di spermatidi anomala e deformata ritrovata negli individui di *Branchiura sowerbyi* trattati a 30 mg F/l.

A inizio giugno, nel gruppo di controllo, sono stati ritrovati i primi spermatozoi liberi (Fig. 33) e sempre durante questo mese, sono state ritrovate all'interno del corpo, a livello dei tubuli seminiferi, degli spermatozeugmi: anche in altre specie di Tubificidi sono stati descritti questi “pacchetti” di spermatozoi maturi (BRAIDOTTI & FERRAGUTI, 1982) che durante l'accoppiamento vengono trasferiti nelle spermateche dell'individuo copulante. In *B. sowerbyi* non è stata finora documentata la presenza degli spermatozeugmi e questa risulta pertanto una prima osservazione. Negli individui osservati, le spermateche risultavano ancora vuote,

talvolta con del sedimento all'interno (Fig. 34), a prova del fatto che la copulazione non era ancora avvenuta.



Fig. 33: spermatozoi liberi di *Branchiura sowerbyi*.

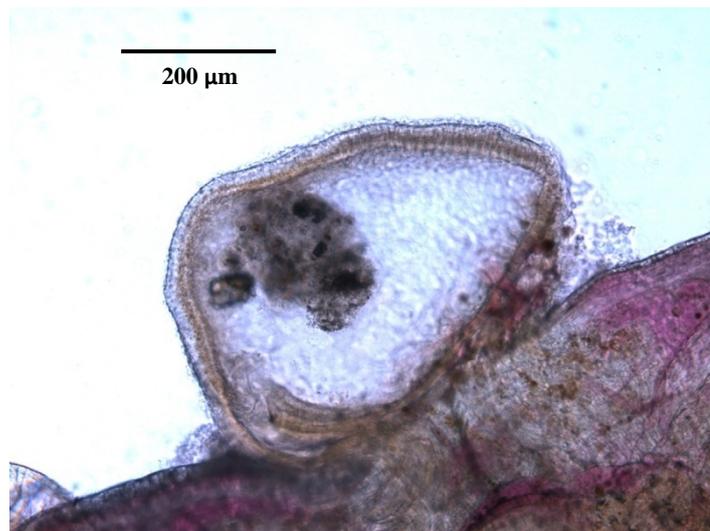


Fig. 34: spermateca vuota (senza spermatozeugmi) di *Branchiura sowerbyi* con sedimento all'interno.

Gli oociti del gruppo di controllo, sia nel mese di maggio che in quello di giugno, hanno continuato il loro sviluppo, accumulando una gran quantità di tuorlo, aumentando sia di dimensioni che di numero. Tale accrescimento non è però stato riscontrato negli individui trattati, che hanno sempre presentato un numero esiguo di uova mature. All'inizio di luglio sono comparsi i primi spermatozeugmi all'interno delle spermateche degli individui del gruppo di controllo (Fig. 35), ad

indicare che la copulazione era avvenuta. Negli individui trattati non sono mai stati osservati spermatozoi liberi, e le spermateche, perciò, sono sempre rimaste vuote. Inoltre, gli individui trattati hanno mostrato, nel tempo, una riduzione sia nelle dimensioni che nel peso corporei (Fig. 36).

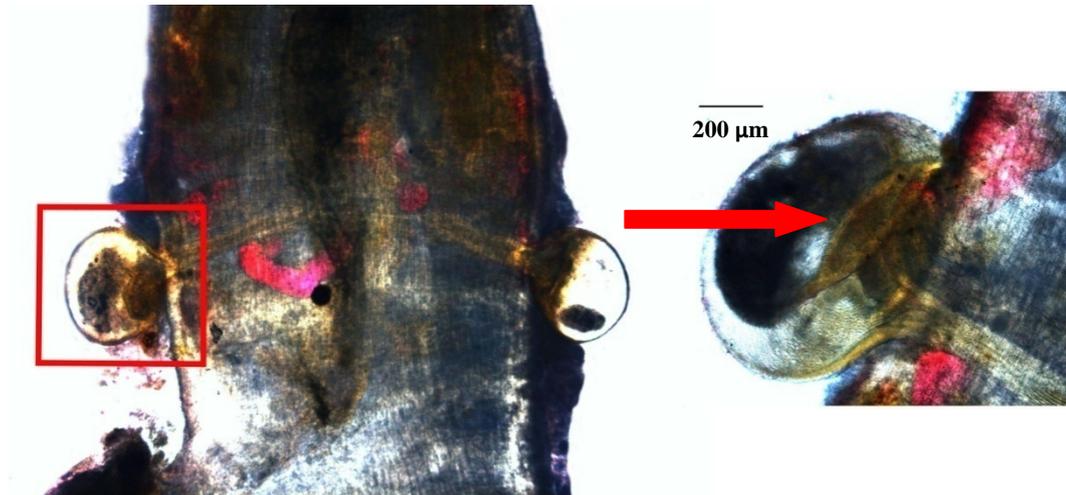


Fig. 35: spermatozeugma all'interno della spermateca di *Branchiura sowerbyi*.



Fig. 36: confronto tra un individuo di *Branchiura sowerbyi* del gruppo di controllo (a sinistra) e un individuo trattato a 15 mg F/l (a destra).

5.3.1 *Analisi aggiuntive*

L'analisi dell'ossigeno disciolto dell'acqua dell'Orto Botanico ha riportato valori piuttosto bassi, dell'ordine di 4-5 mg/l. Di conseguenza, l'ossigenazione negli

acquari sperimentali è stata regolata per mantenere un livello quanto più possibile simile a quello della vasca originale.

I valori di sostanza organica riscontrati nel sedimento degli acquari sono risultati leggermente superiori a quelli presenti nelle vasche dell'Orto Botanico (4.0% vs. 3.6%) ma comunque molto simili tra di loro.

Il Fluoro contenuto nel sedimento delle vasche originali presenti all'Orto Botanico è risultato avere una concentrazione di 2.5 ppm. Il sedimento contenuto negli acquari in laboratorio, invece, ha avuto un contenuto di Fluoro maggiore rispetto a quello sperimentale: in media ci sono 4.5 mg/l di Fluoro in più, dovuti all'adsorbimento dell'inquinante da parte del sedimento. La concentrazione di Fluoro nel sedimento dell'acquario con 15 mg F⁻/l è aumentata dai 2.59 ppm iniziali a 95.87 ppm, mentre quella dell'acquario con 30 mg F⁻/l ha raggiunto i 122.01 ppm. Gli animali, quindi, sono stati esposti ad una concentrazione di Fluoro maggiore rispetto a quella sperimentale.

Anche l'analisi dell'acqua presente negli acquari ha rivelato un contenuto di Fluoro leggermente maggiore: 20 mg F⁻/l anziché 15 mg F⁻/l e 34 mg F⁻/l invece di 30 mg F⁻/l. Questo effetto è dovuto al costante rilascio, nella colonna d'acqua soprastante, del Fluoro immagazzinato nel sedimento.

6. DISCUSSIONE

6.1 Test acuti e cronici a medio termine

Gli esperimenti effettuati dimostrano chiaramente che i fluoruri inorganici hanno un effetto tossico per *B. sowerbyi*. Risultano particolarmente evidenti gli effetti della temperatura e quelli legati alla presenza o assenza del sedimento. I dati ottenuti indicano che temperature più alte sono in grado di accentuare la tossicità dei fluoruri: un aumento di temperatura, infatti, accelera il tasso metabolico e questo fenomeno si traduce in un più rapido assorbimento dei fluoruri e un maggior avvelenamento dell'animale (ANGELOVIC *et al.*, 1961). L'effetto della temperatura si riscontra analizzando sia i valori di bioaccumulo, sia quelli della

mortalità: per ogni concentrazione sperimentale di NaF si sono ottenuti valori di mortalità in percentuale diversi e, attraverso l'analisi dei probit, i valori dell'LC₅₀ per gli animali esposti a 22±0.5°C sono risultati minori rispetto a quelli ottenuti per gli animali esposti a 17±0.5°C, sia per i test in presenza di sedimento, che per quelli senza sedimento, ad indicare che a temperature maggiori il 50% degli individui trattati muore a concentrazioni minori. I valori di bioaccumulo, inoltre, sono risultati più alti negli esperimenti condotti a 22±0.5°C, sia acuti che cronici. Questi dati indicano che ad alte temperature *B. sowerbyi* diventa meno tollerante ai fluoruri. Anche NAQVI (1973), in uno studio sulla tolleranza di questa specie a diversi insetticidi, ha evidenziato come la tossicità sia influenzata dalla temperatura. Questa specie, comunque, rispetto ad altri invertebrati, risulta molto resistente: un lavoro di CAMARGO (2003) riporta e compara i risultati di test condotti per valutare la tossicità dei fluoruri, e riporta valori di LC₅₀ (96 h) per le specie di acqua dolce compresi tra 17 mg F⁻/l nel tricottero *Hydropsyche bronta* (Arthropoda, Insecta) a 45 mg F⁻/l nel tricottero *Chimarra marginata* (Arthropoda, Insecta). GONZALO *et al.* (2010), in uno studio sul crostaceo *Dikerogammarus villosus*, inoltre, hanno riportato un valore di LC₅₀ (96 h) di 5.8 mg F⁻/l, che rende questa specie una delle più sensibili ai fluoruri disciolti nelle acque. *B. sowerbyi* resiste a concentrazioni di Fluoro molto più alte: i valori di LC₅₀ ottenuti nei test acuti a 22±0.5°C sono due volte maggiori rispetto a quelli osservati per alcune specie di *Hydropsyche* (Arthropoda, Insecta) (CAMARGO *et al.*, 1992) e, in assenza di sedimento, i valori di LC₅₀ indicano che il 50% della popolazione muore ad una concentrazione di 61.68 mg F⁻/l, valore che è stato ottenuto recentemente anche per il bivalve *Dreissena polymorpha* (DEL PIERO *et al.*, 2012). I valori ottenuti nei test acuti a 17±0.5°C, invece, sono molto simili all'LC₅₀ del crostaceo *Daphnia magna* (Arthropoda, Branchiopoda) (METCALFE-SMITH *et al.*, 2003), che è considerato uno degli invertebrati meno sensibili (DAVE, 1984).

Anche il sedimento, come la temperatura, gioca un ruolo chiave nel determinare la sensibilità di *B. sowerbyi* ai fluoruri inorganici: confrontando i valori di bioaccumulo, sia per i test acuti che per i test cronici a medio termine, si può notare come quelli derivanti dai test condotti in presenza di sedimento siano molto più alti rispetto agli altri. Il sedimento, come riportato da vari autori (NAQVI,

1973; CHAPMAN *et al.*, 1982; CASELLATO & NEGRISOLO, 1989), oltre a rendere le condizioni più naturali e meno stressanti, è in grado anche di adsorbire una parte dell'inquinante e, di conseguenza, ne riduce la biodisponibilità e limita gli effetti tossici negli organismi esposti. Questo fenomeno, però, è valido solamente nel breve termine. In realtà *B. sowerbyi* si alimenta all'interno del sedimento; DUCROT (2007) evidenzia chiaramente che una parte del cibo ingerito da questa specie è proprio sedimento puro. Nei test eseguiti, perciò, oltre all'assorbimento di Fluoro attraverso la parete corporea, vi è un ulteriore assorbimento causato dall'ingestione di sedimento contaminato, e maggiore è la durata del test, maggiore risulta anche la quantità di Fluoro assorbita attraverso il cibo ingerito: questo fenomeno spiega la differenza riscontrata nei valori di bioaccumulo tra i test acuti e i test cronici a medio termine. Molti ricercatori (VOLPARIL & MAYER, 2000; WESTON *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2000), inoltre, considerano l'ingestione di sedimento contaminato una delle maggiori fonti di avvelenamento da xenobiotici. Comunque, analizzando i valori di mortalità ottenuti dai test acuti, è evidente che la mancanza di sedimento costituisce una forma in più di stress per l'animale: le percentuali di mortalità, infatti, sono risultate più alte nei test condotti in assenza di sedimento rispetto a quelli in cui il sedimento era presente.

Un altro dato che è interessante rimarcare è che dall'analisi dell'acqua utilizzata nei test cronici a medio termine, risulta un decremento della concentrazione di NaF più accentuato durante i primi 6 giorni, soprattutto per il test a 22°C, a riprova del fatto che la temperatura gioca un ruolo importante sull'assorbimento del Fluoro.

Durante l'esecuzione dei test, è stato osservato spesso il fenomeno di autotomizzazione della parte posteriore del corpo di *B. sowerbyi*. MORGAN & MORGAN (1990) hanno notato che le sostanze tossiche si accumulano preferenzialmente in questa parte del corpo. Considerando che questa specie è in grado di rigenerare i segmenti mancanti, l'eliminazione di queste sostanze attraverso l'autotomizzazione, potrebbe perciò rappresentare un'alternativa "economica" per l'autodepurazione (RODRIGUEZ & REYNOLDSON, 2011).

6.2 Test cronico a lungo termine per valutare gli effetti sulla gametogenesi

Gli individui trattati, sia a 15 mg/l che a 30 mg/l, hanno evidenziato un ritardo nella maturazione, che è risultato particolarmente evidente nella linea germinale maschile. Inoltre, i loro tempi di maturazione non sono risultati sincroni: accanto ad individui in uno stato più avanzato di maturazione, sono stati ritrovati anche individui molto regrediti, senza clitello e senza le tipiche masserelle biancastre che testimoniano la presenza di testicoli e ovari maturi. Questa disomogeneità non è stata riscontrata nel gruppo di controllo, i cui individui hanno sempre mostrato uno sviluppo continuo e normale nel tempo. Gli individui trattati non hanno mai presentato un numero elevato né di oociti né di cisti maschili e nell'ultimo mese la linea germinale maschile sembra essersi bloccata allo stadio di spermatociti secondari. Nonostante siano state ritrovate delle cisti di spermatidi, queste si sono rivelate anormali e molto deformate e nelle settimane seguenti non hanno progredito con lo sviluppo. Sembra evidente, dunque, che i fluoruri possano in qualche modo svolgere un'azione negativa soprattutto sulla gametogenesi della linea maschile.

Non è presente nessuno studio riguardante gli effetti dei fluoruri sulla gametogenesi degli Oligocheti acquatici, ma vi sono molti lavori che riportano un effetto non trascurabile di questi xenobiotici sulla gametogenesi e sulla fertilità di mammiferi, soprattutto topi, ratti e conigli. Anche il report del Consiglio Nazionale delle Ricerche del 2006 ha evidenziato come alte concentrazioni di fluoruri abbiano un effetto avverso molto marcato sulla riproduzione e sullo sviluppo (BATAINEH & NUSIER, 2006). Similmente ai risultati ottenuti con questo test, anche molti altri autori hanno riportato osservazioni analoghe riguardo il ritardo di maturazione delle cellule germinali maschili (KOUR & SINGH, 1980; GHOSH *et al.*, 2002), la loro scarsa densità (BATAINEH & NUSIER, 2006; REDDY *et al.*, 2007) e la presenza di strutture anormali (PATI & BHUNYA, 1987). Alcuni hanno riscontrato anche una perdita completa della spermatogenesi (SUSHEELA & KUMAR, 1991; KOUR & SINGH, 1980), a conferma del fatto che i fluoruri hanno un effetto inibitorio su questo processo. JHALA *et al.* (2004) in simili esperimenti, hanno riportato uno sviluppo anormale anche nella linea germinale femminile di topi esposti ai fluoruri. Lo stress ossidativo è associato al danneggiamento delle

strutture riproduttive (AHOTUPA & HUHTANIEMI, 1992) e l'intossicazione da parte dei fluoruri è associata proprio all'induzione di stress ossidativo (INKIELEWICZ-STEPNIAK & CZARNOWSKI, 2010). I fluoruri, inoltre, sono in grado anche di inibire molti degli enzimi che sono coinvolti nella crescita cellulare e nella sintesi proteica (HOLLAND, 1979) e sono in grado di interagire con molti meccanismi cellulari di segnalazione, alterandone la funzionalità (BARBIER *et al.*, 2010). Questi possono essere dei motivi in grado di spiegare le anomalie riscontrate nella gametogenesi di *B. sowerbyi* sottoposta ai fluoruri, ma non è da escludere un possibile effetto dovuto alle condizioni sperimentali, anche se in base ai valori riscontrati di sostanza organica e ossigeno disciolto non si possono identificare come fonti di stress la mancanza di cibo e di ossigeno.

7. CONCLUSIONI

Branchiura sowerbyi si è dimostrata una specie molto tollerante nei confronti dei fluoruri, soprattutto a basse temperature. E' in grado di accumulare una gran quantità di Fluoro nei tessuti e il tasso di bioaccumulo, oltre ad essere proporzionale alla concentrazione di Fluoro, dipende anche dalla temperatura e risulta maggiore a temperature più elevate. E' risultato evidente anche il ruolo del sedimento come aggravante la tossicità: questa specie, vivendo e alimentandosi al suo interno, assume il contaminante anche attraverso il cibo ingerito e inoltre, provocando bioturbazione, è in grado di riportare in soluzione i contaminanti adsorbiti, rendendoli nuovamente biodisponibili.

L'esperimento sulla gametogenesi ha messo in evidenza come concentrazioni relativamente basse di fluoruri, che non hanno alcun effetto nel breve-medio termine, possano invece essere nocive nel lungo termine, ostacolando la maturazione dei gameti e impedendo, perciò, la riproduzione. Non essendo presente nessun altro lavoro riguardante gli effetti dei fluoruri sulla gametogenesi degli Oligocheti, e considerando che, grazie alla loro abbondanza, essi vengono ampiamente utilizzati come indicatori per valutare gli effetti degli inquinanti sugli

ecosistemi acquatici, risulta evidente la necessità di ricerche più approfondite riguardo queste importanti risposte fisiologiche.

Questa specie, infine, come molti altri Oligocheti, rappresenta gran parte della dieta di altri invertebrati e vertebrati acquatici, soprattutto pesci; la sua grande capacità di bioaccumulo può essere perciò considerata un rischio ambientale, con effetti tossici, dovuti al fenomeno di biomagnificazione, anche per le specie che si trovano a livelli superiori lungo la catena alimentare.

8. RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la Prof.ssa Sandra Casellato, relatrice di questa tesi, per la grande disponibilità avuta nei miei confronti, per avermi trasmesso passione e curiosità riguardo tutti gli argomenti toccati in questa tesi, e per essersi fidata di me, del mio lavoro e delle mie capacità.

Desidero ringraziare anche la Dott.ssa Stefania Del Piero, correlatrice di questa tesi, per la cortesia e per il sostegno dimostratomi, nonché per tutto l'aiuto fornitomi durante l'internato e la stesura di questo elaborato.

Un sentito ringraziamento va al Dott. Luciano Masiero per avermi aiutata nelle analisi di laboratorio, trasmettendomi entusiasmo e l'opportunità di beneficiare delle sue conoscenze scientifiche.

Ringrazio anche Renzo Mazzaro per il suo valido supporto durante le analisi al microscopio e nell'elaborazione delle immagini.

Desidero inoltre ringraziare il mio ragazzo Mattia per avermi saputa ascoltare con pazienza e prontamente incoraggiare nei momenti per me più difficili.

Un ringraziamento, ultimo ma non meno importante, va infine ai miei genitori Raffaella e Andrea, a mia sorella Anna, a mia zia Carmen e a mia nonna Bianca che mi hanno sempre sostenuta, sia moralmente che economicamente, e hanno creduto in me, permettendomi di raggiungere questo importante traguardo.

9. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Ahotupa M., Huhtaniemi I., 1992. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally criptorchid rat testis. *Biology of Reproduction*, **46**:1114-1118.

Angelovic J. W., Sigler W. F., Neuhold J. M., 1961. Temperature and fluorosis in rainbow trout. *Water Pollution Control Federation*, **33**: 371-381.

Aston R. J., 1966. Temperature relations, respiration and burrowing in *Branchiura sowerbyi* Beddard (Tubificidae, Oligochaeta). In: Carroll J. H., Dorris T. C., 1972. The life history of *Branchiura sowerbyi*. *American Midland Naturalist*, **87** (2): 413-422.

Aston R. J., 1968. The effect of temperature on the life cycle, growth and fecundity of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Journal of Zoology*, **154**: 29-40.

Aston R. J., 1973. Field and experimental studies on the effects of a power station effluent on Tubificidae (Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia*, **42**: 225-242.

Aston R. J., Milner A. G. P., 1981. Conditions required for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture*, **26**: 155-160.

Barbier O., Arreola-Mendoza L., Del Razo L. M., 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, **188**: 319-333.

Bataineh H. N., Nusier M. K., 2006. Impact of 12-week ingestion of Sodium Fluoride on aggression, sexual behavior, and fertility in adult male rats. *Research Report Fluoride*, **39** (4): 293-301.

Beddard F. E., M. A., 1892. A new branchiate Oligochaete (*Branchiura sowerbyi*). *Quarterly Journal of Microscopical Science*, **33**: 325-341.

Bhunja F., Saha N. C., Kaviraj A., 2000. Toxicity of Thiocyanate to fish, plankton, worm and aquatic ecosystem. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **64**: 197-204.

Braidotti P., Ferraguti M., 1982. Two sperm types in the spermatozeugmata of *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta). *Journal of Morphology*, **171**: 123-136.

Brinkhurst R. O., Jamieson B. G. M., 1971. *Aquatic Oligochaeta of the world*. Oliver & Boyd, Edinburgh, 860 pp.

Camargo J. A., 2003. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere*, **50**: 251-264.

Camargo J. A., Ward J. V., Martin K. L., 1992. The relative sensitivity of competing hydropsychid species to fluoride toxicity in the Cache la Poudre River

(Colorado). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **22**: 107-113.

Carroll J. H., Dorris T. C., 1972. The life history of *Branchiura sowerbyi*. *American Midland Naturalist*, **87** (2): 413-422.

Casellato S., 1984. Life-cycle and karyology of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, **115**: 65-69.

Casellato S., Aiello R., Negrisola P. A., Seno M., 1992. Long-term experiment on *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae) using sediment treated with LAS (Linear Alkylbenzene Sulphonate). *Hydrobiologia*, **232**: 169-173.

Casellato S., Martinucci G., Zoja M., 1987. Ultrastructural features of gametogenesis during the life cycle in *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, **155**: 145-154.

Casellato S., Negrisola P., 1989. Acute and chronic effects of an anionic surfactant on some freshwater tubificid species. *Hydrobiologia*, **180**: 243-252.

Chapman P. M., 2001. Utility and relevance of aquatic Oligochaetes in Ecological Risk Assessment. *Hydrobiologia*, **463**: 149-169.

Chapman P. M., Farrell M. A., Brinkhurst R. O., 1982. Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology*, **2**: 47-67.

Chattopadhyay D. N., Konar S. K., 1985. Acute and chronic effects of Linear Alkyl Benzene Sulfonate on fish, plankton and worm. *Environment & Ecology*, **3** (2): 258-262.

Chlubek D., 2003. *Fluoride in medicine, biology and toxicology*. Borgis LTD, Warsaw, 118 pp.

Dave G., 1984. Effects of fluoride on growth, reproduction and survival in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **78C**: 425-431.

Del Piero S., Masiero L., Casellato S., 2012. Influence of temperature on fluoride toxicity and bioaccumulation in the non-indigenous mollusk *Dreissena polymorpha* Pallas, 1769. *Environmental Toxicology and Chemistry*, in press.

Djukic N., 1983. Prilog proucavanju zastupljenosti vrste *B. sowerbyi* Beddard (1892). *Il Simpozijum o fauni SR Srbije*, Zbornik radova, Beograd, pp. 63-66.

Drewes C. D., Zoran M. J., 1989. Neurobehavioral specializations for respiratory movements and rapid escape from predators in posterior segments of the tubificid *Branchiura sowerbyi*. *Hydrobiologia*, **180** (1): 65-71.

Ducrot V., Pèry A. R. R., Quéau H., Mons R., Lafont M., Garric J., 2007. Rearing an estimation on life-cycle parameters of the tubificid worm *Branchiura sowerbyi*: application to ecotoxicity testing. *Science of the Total Environment*, **384**: 252-263.

- Fernández J., Tellez V., Olea N., 1992. Hirudinea. In: Harrison F. W., Gardiner S. L. (eds): *Microscopic anatomy of invertebrates*. Wiley-Liss, New York, **7**: 323-394.
- Gaudette H. E., Wilson R. F., Toner L., Folger D. W., 1974. An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *Journal Sedimentary Petrology*, **44**: 249-253.
- Ghosh D., Das (Sarkar) S., Maiti R., Jana D., Das U. B., 2002. Testicular toxicity in Sodium Fluoride treated rats: association with oxidative stress. *Reproductive Toxicology*, **16**: 385-390.
- Gonzalo C., Camargo J. A., Masiero L., Casellato S., 2010. Fluoride toxicity and bioaccumulation in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894): a laboratory study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **85**: 472-475.
- Grabowski M., Jabłońska A., 2009. First records of *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892 (Oligochaeta: Tubificidae) in Greece. *Aquatic Invasions*, **4** (2): 365-367.
- Hirao Y., 1973. Spermatogenesis in a freshwater Oligochaete, *Branchiura sowerbyi* Beddard. *Mem. Wakayama prefect. Univ. Med.*, **3**: 55-62.
- Holland R. I., 1979. Fluoride inhibition of protein synthesis. *Cell Biology International Reports*, **3**: 701-705.
- Hossain MD. M., Ghatak D. B., Konar S. K., 1987. Acute toxicity of a non-ionic detergent Ekaline FI and organic pesticide DDVP to fish, plankton and worm. *Environment & Ecology*, **5**(4): 778-781.
- Ingersoll C. G., Ankley G. T., Benoit D. A., Brunson E. L., Burton G. A., Dwyer F. J., et al., 1995. Toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants using freshwater invertebrates: a review of methods and applications. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**: 161-166.
- Inkielewicz-Syepniak I., Czarnowski W., 2010. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 1607-1611.
- Jhala D. D., Nair S. B., Chinoy N. J., 2004. Reversible toxicity of fluoride and arsenic in ovary of mice. *Fluoride*, **37** (2): 71-79.
- Jamieson B. G. M., 1981. *The ultrastructure of the Oligochaeta*. Academic Press, London; New York, 462 pp.
- Karickhoff S. W., Morris K. R., 1985. Impact of Tubificid Oligochaetes on pollutant transport in bottom sediments. *Environmental Science & Technology*, **19**: 51-56.
- Kessabi M., 1984. Métabolisme et biochimie toxicologique du fluor: une revue. *Revue de Médecine Veterinaire*, **135**: 497-510.

- Kikuchi E., Kurihara Y., 1982. The effects of the Oligochaete *Branchiura sowerbyi* Beddard (Tubificidae) in the biological and chemical characteristics of overlying water and soil in a submerged ricefield soil system. *Hydrobiologia*, **97**: 203-208.
- Kooijman S. A. L. M., 2000. *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 444 pp.
- Kour K., Singh J., 1980. Histological finding of testes following fluoride ingestion. *Fluoride*, **13**: 160-162.
- Lee G., 1991. *Multifactor probit analysis*. Gulf Breeze, FL, USA: US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory.
- Lee B. G., Griscom S. B., Lee J. S., Choi H. J., Kohn C. H., Luoma S. N., Fisher N. S., 2000. Influences of dietary uptake and reactive species on metal bioavailability from aquatic sediments. *Science*, **287**: 282-284.
- Lobo H., Alves R. d. G., 2011. Reproductive cycle of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Naididae: Tubificinae) cultivated under laboratory conditions. *Zoologia*, **28** (4): 427-431.
- Malde M. K., Bjorvatn K., Julshamn K., 2001. Determination of fluoride in food by the use of alkali fusion and fluoride ion-selective electrode. *Food Chemistry*, **73**: 373-379.
- Mann K. H., 1958. Occurrence of an exotic Oligochaete *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892, in the river Thames. *Nature*, **182**: 732.
- Marchese M. R., Brinkhurst R. O., 1996. A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassays tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia*, **334**: 163-168.
- Martinucci G. B., Felluga B., Carli S., 1977. Development and degeneration of cytophorus during spermiogenesis in *Eisenia foetida* (Sav.). *Bollettino di Zoologia*, **44**: 383-398.
- McQuaker N., Gurney M., 1977. Determination of total fluoride in soil and vegetation using an alkali fusion-selective ion electrode technique. *Analytical Chemistry*, **49**: 53-56.
- Metcalf-Smith J. L., Holtze K. E., Sirota G. R., Reid J. J., De Solla S. R., 2003. Toxicity of aqueous and sediment-associated fluoride to freshwater organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22** (1): 161-166.
- Morgan J. E., Morgan A. J., 1990. The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissues of the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from one uncontaminated and four polluter soils. *Oecologia*, **84**: 559-566.

- Mullick S., Konar S. K., 1991. Combined influence on heavy metals, petroleum products, detergents, pesticides and fertilizers on the worms *Branchiura sowerbyi*. *Environment & Ecology*, **9** (4): 1032-1037.
- Naqvi S., M., Z., 1973. Toxicity of twenty-three insecticides to a tubificid worm *Branchiura sowerbyi* from the Mississippi delta. *Journal of Economic Entomology*, **66**: 70-74.
- Nascimento H. L. S., Alves R. d. G., 2008. Cocoon production and hatching rates of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta: Tubificidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **25** (1): 16-19.
- Nehring S., 1998. Establishment of termophilic phytoplankton species in the North Sea: biological indicators of climatic changes?. *Journal of Marine Science*, **55**: 818-823.
- Neuhold J. M., Sigler W. F., 1962. Chlorides affect the toxicity of fluoride in rainbow trout. *Science*, **135**: 732-733.
- Pati P. C., Bhunya S. P., 1987. Genotoxic effect of an environmental pollutant, Sodium Fluoride, in mammalian in vivo test system. *Caryologia*, **40**: 79-87.
- Paunovic M., Miljanovic B., Simic V., Cakic P., Djikanovic V., Jakovcev-Todorovic D., Stojanovic B., Veljkovic A., 2005. Distribution of non-indigenous tubificid worm *Branchiura sowerbyi* (Beddard, 1892) in Serbia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **3**: 91-97.
- Pianka E. R., Parker W. S., 1975. Age-specific reproductive tactics. *The American Naturalist*, **109**: 453-464.
- Pimentel R., Bulkley R. V., 1983. Influence of water hardness on fluoride toxicity to rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2**: 381-386.
- Poddubnaya T. D., 1958. Some data on the multiplication of the Tubificidae. *CR Akademi des Sciences de URSS*, **120**: 422-424.
- Raposeiro P. M., Ramos J. C., Costa A. C., 2009. First record of *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892 (Oligochaeta: Tubificidae) in Azores. *Aquatic Invasions* **4** (3): 487-490.
- Reddy P. S., Pushpalatha T., Reddy P. S., 2007. Suppression of male reproduction in rats after exposure to Sodium Fluoride during early stages of development. *Naturwissenschaften*, **94**: 607-611.
- Reynoldson T. B., 1987. The role of environmental factors in the ecology of tubificid oligochaetes-an experimental study. *Holarctic Ecology*, **10**: 241-248.
- Rodriguez P., Reynoldson T. B., 2011. *The Pollution Biology of Aquatic Oligochaetes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 261 pp.
- Siekierska E., 2003. The structure of the ovary and oogenesis in the earthworm, *Dendrobaena veneta* (Annelida, Clitellata). *Tissue & Cell*, **35**: 252-259.

- Spalek-Wolczyńska A., Klag J., Bielecki A., Świątek P., 2008. Oogenesis in four species of *Piscicola* (Hirudinea, Rynchobdellida). *Journal of Morphology*, **269**: 18-28.
- Spencer W. P., 1932. A gilled Oligochaete *Branchiura sowerbyi* new to America. *Transactions of the American Microscopical Society*, **51** (4): 267-272.
- Stachowicz J. J., Fried H., Osman R. W., Whitlatch R. B., 2002. Biodiversity, invasion resistance and marine ecosystem function: reconciling pattern and process. *Ecology*, **83**: 2575-2590.
- Stang-Voss C., 1972. Ultrastrukturen der zellularen Autophagie. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Spermatiden von *Eisenia foetida* (Annelidae) während der cytoplasmatischen Reduktionphase. *Z. Zellforsch*, **127**: 580-590.
- Stephenson J., 1930. *The Oligochaeta*. Oxford University Press, 978 pp.
- Strickland J. D. H., Parsons T. R., 1968. *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research of Canada, Ottawa, 311 pp.
- Susheela A. K., Kumar A., 1991. A study of the effect of high concentrations of fluoride on the reproductive organs of male rabbits, using light and scanning electron microscopy. *Journals of Reproduction & Fertility*, **92**: 353-360.
- Świątek P., 2005. Oogenesis in the leech *Glossiphonia heteroclita* (Annelida, Hirudinea, Glossiphonidae). I. Ovary structure and previtellogenic growth of oocytes. *Journal of Morphology*, **266**: 309-318.
- Świątek P., 2006. Oogenesis in the leech *Glossiphonia heteroclita* (Annelida, Hirudinea, Glossiphonidae). II Vitellogenesis, follicular cell structure and egg shell formation. *Tissue & Cell*, **38**:263-270.
- Świątek P., 2008. Ovary cord structure and oogenesis in *Hirudo medicinalis* and *Haemopis sanguisuga* (Clitellata, Annelida): remarks on different ovaries organization in Hirudinea. *Zoomorphology*, **127**: 213-226.
- Świątek P., Kubrakiewicz J., Klag J., 2009. Formation of germ-line cysts with a central cytoplasmic core is accompanied by specific orientation of mitotic spindles and partitioning of existing intercellular bridges. *Cell and Tissue Research*, **337**: 137-148.
- Timm T., 1980. Distribution of aquatic oligochaetes. In: Brinkhurst R. O., Cook D. G., Eds.. *Aquatic Oligochaete Biology*, Plenum Press, New York and London, 529 pp.
- Urbisz A. Z., Krodkiewska M., Świątek P., 2010. Ovaries of Tubificinae (Clitellata, Naididae) resemble ovary cords found in Hirudinea (Clitellata). *Zoomorphology*, **129** (4): 235-247.
- Volparil I. M., Mayer L. M., 2000. Dissolution of sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons into the lugworm's (*Arenicola marina*) digestive fluids. *Environmental Science and Technology*, **34**: 1221-1228.

Wallis P., Gehr R., Anderson P., 1996. Fluorides in wastewater discharges: toxic challenges to the St. Lawrence River biological community. *Water Quality Research Journal of Canada*, **31**: 809-838.

Weinstein L. H., Davidson A., 2004. *Fluorides in the environment. Effects on plants and animals*. CABI Publishing, UK, 297 pp.

Weston D. P., Penry D. L., Gulmann L. K., 2000. The role of ingestion as a route of contaminant bioaccumulation in a deposit-feeding polychaete. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **16**: 1287-1294.

http://www.hydra-institute.com/de/ifah/Gewaesseroekologie/Aquatische%20Neozoen_Steckbriefe.php

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=182695>