
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ROMEO IMBERTI, GIOVANNI VAILATI

Effetto di alcune sostanze inquinanti sullo sviluppo embrionale di *Xenopus*

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 56 (1974), n.4, p. 635–639.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_56_4_635_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

SIMAI & UMI

<http://www.bdim.eu/>

Zoologia. — *Effetto di alcune sostanze inquinanti sullo sviluppo embrionale di Xenopus* (*). Nota di ROMEO IMBERTI e GIOVANNI VAILATI, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — Embryos of *Xenopus laevis* were treated in the first development stages with foul water holding salts of heavy metals (Zn, Cd) and with sodium alkylbenzenesulphonate (LAS) at concentrations 1, 2, 5, 10, 20 mg/l. The treatment lasted at most for six days and the surviving embryos were subjected to histological observation.

With both treatments in several embryo's organs appear considerable malformations, these are: neural tube occlusion, pronephric tubule dilatation, somite increase and epidermis proliferations.

INTRODUZIONE

Le numerose indagini condotte negli ultimi decenni da diversi Autori sulla tossicità delle acque inquinate hanno avuto prevalentemente lo scopo di determinare l'influenza delle sostanze inquinanti sulla mortalità e, in misura molto minore, sulla potenzialità riproduttiva, sullo sviluppo larvale (Marchetti, 1965), sull'accrescimento e sulla struttura di alcuni organi di animali acquatici (Marchetti, 1969), mentre non si hanno dati circa l'azione di tali sostanze su di una fase molto delicata della vita degli animali quale lo sviluppo embrionale. Tutte queste indagini inoltre sono riferite ai Pesci (cfr. Marchetti, 1965), mentre sugli Anfibi non esiste alcuna informazione.

Dato l'interesse che può destare una ricerca condotta in tal senso, sia da un punto di vista pratico che strettamente biologico, sono in corso indagini sull'effetto di acque inquinate e di alcune sostanze inquinanti sui primi stadi dello sviluppo embrionale di animali acquatici.

Vengono qui esposti i primi risultati di una indagine condotta principalmente mediante due categorie di sostanze inquinanti: i sali dei metalli pesanti e i detergenti.

La presente ricerca, più che un contributo allo studio dei problemi dell'inquinamento, vuole essere un primo passo per cercare un orientamento nella scelta delle sostanze da provare, delle loro concentrazioni attive e delle fasi dello sviluppo embrionale più sensibili all'azione di tali sostanze.

Come materiale da trattare è stato scelto lo *Xenopus laevis* (Daudin), anfibio anuro, per la facilità di ottenerne embrioni in laboratorio e perché oggetto di numerose ricerche di embriologia sperimentale in corso presso l'Istituto di Zoologia di Milano. Come acque inquinate sono state usate quelle del torrente

(*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università Statale di Milano.

(**) Nella seduta del 20 aprile 1974.

Riso, affluente del fiume Serio, perché notoriamente contaminate da metalli, soprattutto zinco e cadmio; inoltre è stato usato l'alchilbenzensolfonato sodico (LAS) abbondantemente usato nella fabbricazione di detersivi.

MATERIALI E METODI

Prima di effettuare il trattamento degli stadi precoci si è determinata su stadi larvali di diverse settimane di età la tossicità delle sostanze in questione in termini di mortalità.

Embrioni di *Xenopus laevis* agli stadi di tarda blastula e di giovane gastrula (stadi 9 e 10 secondo Nieuwkoop e Faber) sono stati messi in acqua prelevata dal torrente Riso e diluita, data l'alta tossicità verificata sugli stadi larvali, in ragione 1 : 1 e 1 : 2 con acqua di rete avente le seguenti caratteristiche: durezza 220 mgCaCO₃/l, cloruri 2,1 mgCl⁻/l, solfati 1,9 mgSO₄⁻/l, pH 7.

L'acqua del torrente Riso è stata analizzata per i metalli con spettrofotometria di assorbimento atomico; i risultati dell'analisi sono stati i seguenti: 80 mg Zn/l, 0,42 mg Cd/l, 0,3 mg Mn/l, 0,02 mg Cu/l.

Raggiunto lo stadio 35 alcune larve sono state fissate in liquido di Smith (Rugh, 1952), le rimanenti venivano fissate in liquido di Bouin in tempi successivi fino ad un massimo di 6 giorni. Dopo disidratazione con alcool le larve sono state incluse in paraffina secondo le tecniche usuali (cfr. Beccari e Mazzi, 1966) e sezionate trasversalmente a 10 μ di spessore; le sezioni venivano colorate con ematossilina di Ehrlich ed eosina.

Per quanto riguarda il trattamento con LAS (alchilbenzensolfonato sodico a catena alchilica lineare con C₁₂ prevalente), embrioni di *Xenopus* agli stadi 10, 22 e 30 sono stati posti nelle concentrazioni 1, 2, 5, 10, 20 mg/l e, dopo fissazione a tempi diversi, sottoposti alle tecniche istologiche come nel caso precedente. Le concentrazioni di LAS sono espresse come prodotto attivo.

In totale sono stati trattati 108 embrioni. Come controlli sono stati usati embrioni posti in acqua di rete e in acqua del fiume Serio prima della confluenza col torrente Riso.

Stadi di sviluppo considerati:

- stadio 9: tarda blastula;
- stadio 10: inizio della gastrulazione;
- stadio 22: placode acustico-circa 10 somiti-lunghezza 2 mm.;
- stadio 30: bottone codale-primo movimento-circa 25 somiti-lungh. 3 mm.;
- stadio 35: circa 35 somiti-lunghezza 5-6 mm.

Trattamento con acqua del torrente Riso. L'acqua prelevata dal torrente Riso ha provocato in tutti gli embrioni trattati allo stadio di gastrula per 6 giorni imponenti malformazioni di diversi organi; tali malformazioni si osservano sia negli embrioni trattati con la diluizione 1 : 1 che con la diluizione 1 : 2.

Il tubo neurale si presenta con le pareti notevolmente ispessite, soprattutto a livello del diencefalo e del midollo spinale; si osservano casi di completa ostruzione del canale dell'ependima (Tav. I, fig. 2; Tav. II, fig. 8; Tav. III, fig. 13). Per quanto riguarda l'abbozzo degli organi di senso è frequente negli occhi l'ispessimento della retina (Tav. I, fig. 2). In alcuni casi il cristallino si presenta ingrossato; si è proceduto a calcolarne il volume nei trattati con cristallino ingrandito e nei controlli; questo è $582.000 \pm 22.000 \mu^3$ per i trattati e $394.000 \pm 62.000 \mu^3$ per i controlli. Le otocisti appaiono spesso molto dilatate (Tav. I, fig. 3).

L'epidermide è ispessita e frequentemente si osservano proliferazioni cellulari dello strato esterno; sono pure presenti vescicole a livello di tale strato, le cui cellule sono per lo più disposte a palizzata (Tav. III, figg. 10, 11, 12, 14).

Per quanto riguarda gli organi di origine mesodermica le malformazioni sono meno frequenti; i somiti tuttavia possono presentare casi di ingrossamento dovuto ad un aumento in volume delle fibre muscolari (Tav. II, fig. 8; Tav. III, figg. 10 e 13) e i tubuli del pronefro sono spesso enormemente dilatati (Tav. II, figg. 8 e 9), così pure la cavità celomatica (Tav. II, fig. 8).

L'epitelio del pavimento del faringe è ispessito in quasi tutti i trattati (Tav. I, figg. 2 e 3). Non si osservano malformazioni evidenti a livello degli altri organi di origine endodermica.

Negli embrioni fissati a 3 giorni dall'inizio del trattamento in entrambe le diluizioni le malformazioni sono molto meno evidenti e frequenti; gli unici organi che manifestano una reazione al trattamento sono l'epidermide e il tubo neurale.

Trattamento con LAS. Tutte le concentrazioni usate si sono dimostrate in grado di indurre malformazioni negli embrioni trattati. Oltre la concentrazione di 2 mg/l la mortalità è elevata; tuttavia si sono potuti trattare per un giorno embrioni allo stadio 22 nelle concentrazioni di 5 e 10 mg/l, mentre la sopravvivenza degli stadi larvali più avanzati in queste ultime concentrazioni è stata di poche ore.

Gli embrioni trattati con le concentrazioni di 1 e 2 mg/l risentono del trattamento anche solo dopo un giorno; le malformazioni però sono più evidenti negli embrioni trattati con LAS almeno per 5 giorni. Alle alte concentrazioni (5 e 10 mg/l) gli embrioni vengono letteralmente disgregati dall'azione del tensioattivo e i sopravvissuti presentano malformazioni che a volte alterano completamente i rapporti spaziali tra i singoli organi.

Il LAS induce nei trattati le stesse malformazioni osservate negli embrioni che si sono sviluppati nelle acque del torrente Riso (Tav. I, figg. 4 e 5; Tav. II, fig. 7).

CONSIDERAZIONI

La risposta dell'embrione sembra essere uguale anche partendo da sostanze nettamente diverse quali un tensioattivo e metalli; l'azione di tali sostanze sullo sviluppo embrionale, in base ai risultati sino ad ora ottenuti, sembrerebbe quindi aspecifica.

Pur essendo i risultati sopra esposti del tutto preliminari, appare sufficientemente chiara l'azione delle sostanze usate sullo sviluppo embrionale. Tale azione che, come si è prima accennato, non parrebbe legata alla natura delle sostanze usate, si manifesta a livello di organi di primaria importanza per la vita dell'embrione quali ad esempio il tubo neurale, il pronefro e i somiti, alterando profondamente la loro struttura e pregiudicando seriamente la vita dello stesso e quindi dell'adulto.

In base a questi risultati si è potuto intanto accertare che il LAS anche a basse concentrazioni (1 mg/l) agisce in maniera determinante sullo sviluppo embrionale dello *Xenopus*. Al presente non sembra che il trattamento influisca di più su alcuni stadi piuttosto che su altri e le ricerche in corso avranno come scopo principale una risposta a questo quesito.

Ringraziamo il prof. Roberto Marchetti per i suggerimenti dati durante lo svolgimento della presente ricerca.

LAVORI CITATI

- BECCARI N. e MAZZI V. (1966) - *Manuale di tecnica microscopica*, Soc. Ed. Libr. VI Ed. Como.
 MARCHETTI R. (1965) - *The toxicity of nonylphenol ethoxylate to the development stages of the rainbow trout: Salmo gairdnerii Rich.* « Jour. Appl. Biol. », 55, 425.
 MARCHETTI R. (1965) - *Revue critique des effets des détergents synthétiques sur la vie aquatique*, « Stud. Rev. gen. Fish. Coun. Medit. », 26, 1.
 MARCHETTI R. (1969) - *Orientamenti per una moderna impostazione delle ricerche di tossicologia degli animali acquatici*, Quad. « La ricerca scient. », 58, 521.
 NIEUWKOOP P. e FABER J. (1956) - *Normal table of Xenopus laevis*, North Holland Publ. Co. Amsterdam.
 RUGH. R. (1952) - *Experimental Embriology*, Burgess Pub. Comp. Minneapolis, Min.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

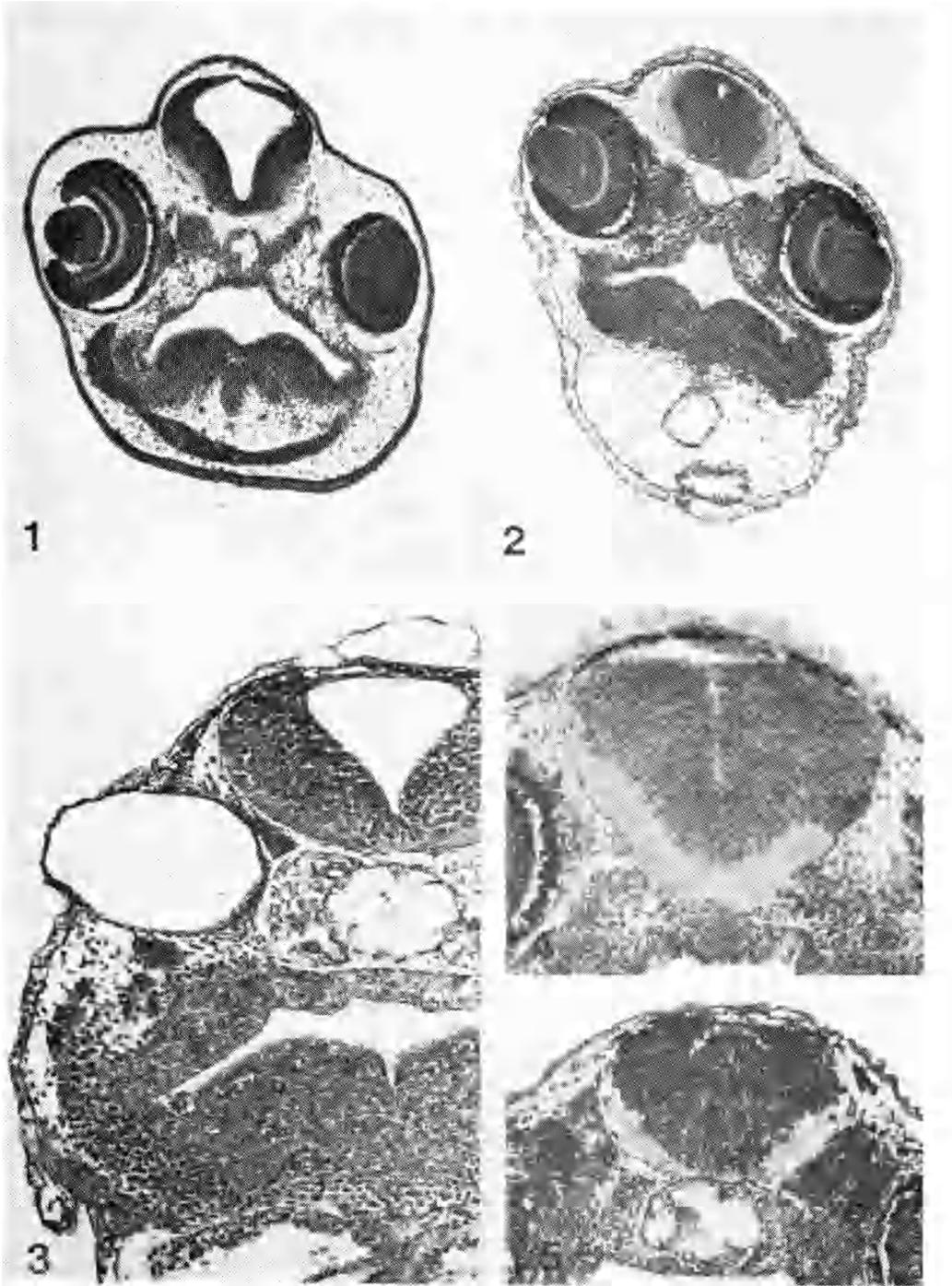
TAVOLA I.

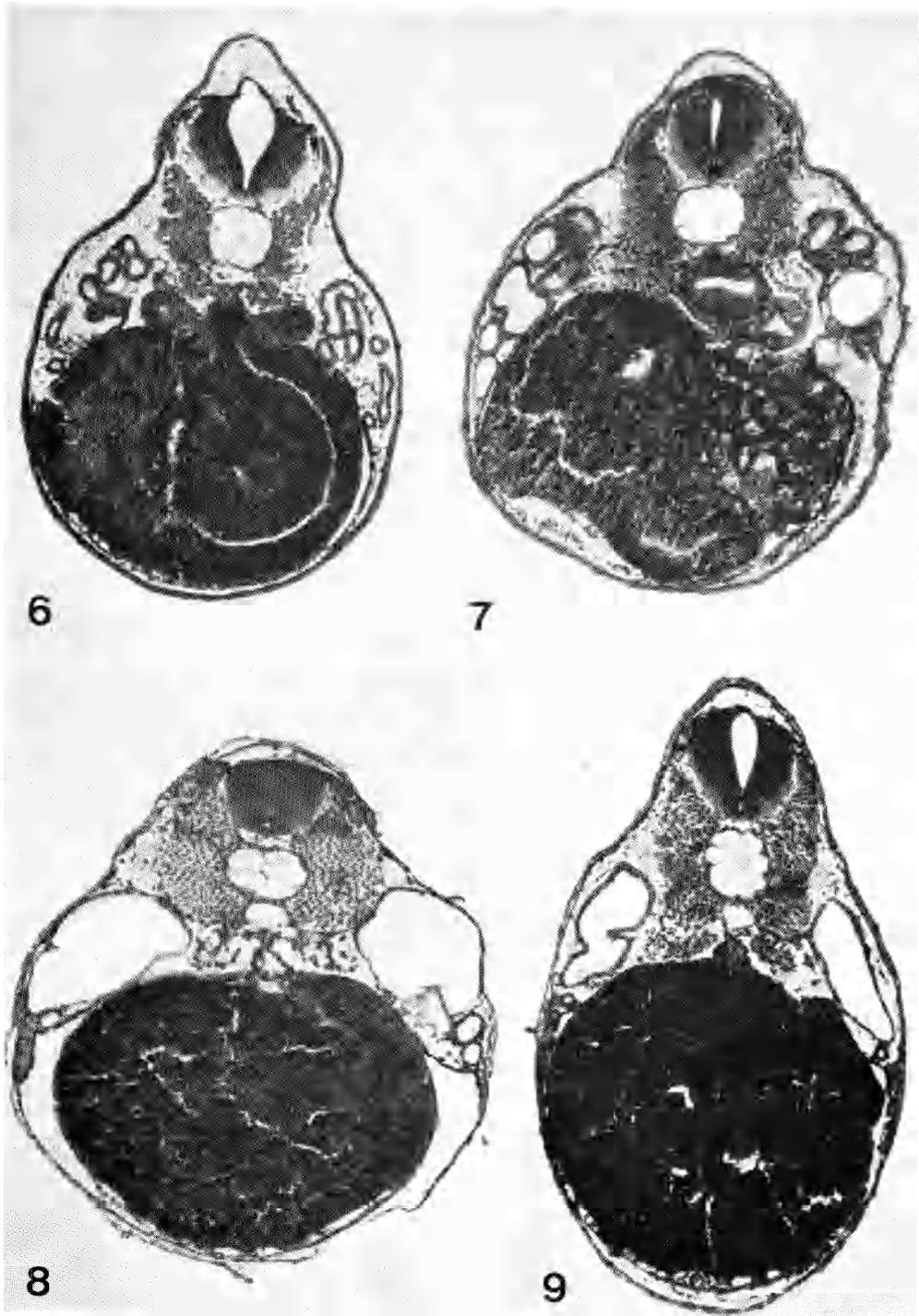
- Fig. 1. - Embrione controllo. Sezione trasversale condotta a livello degli occhi. ($\times 120$).
 Fig. 2. - Trattamento per 6 giorni con acqua del torrente Riso diluita 1 : 2; inizio del trattamento allo stadio 9. Ispessimento delle pareti del diencefalo, della retina e dell'epitelio del faringe. ($\times 120$).
 Fig. 3. - Trattamento per 6 giorni con acqua del torrente Riso diluita 1 : 1; inizio del trattamento allo stadio 9. Dilatazione dell'otocisti e ispessimento dell'epitelio del faringe. ($\times 240$).
 Figg. 4 e 5. - Trattamento per 7 giorni con LAS 1 mg/l; inizio del trattamento allo stadio 30. Particolare del diencefalo occluso. ($\times 240$).

TAVOLA II.

($\times 120$)

- Fig. 6. - Embrione controllo. Sezione trasversale condotta a livello dei tubuli del pronefro.
 Fig. 7. - Trattamento per 5 giorni con LAS 1 mg/l; inizio del trattamento allo stadio 30. Dilatazione dei tubuli del pronefro.
 Fig. 8. - Trattamento per 6 giorni con acqua del torrente Riso diluita 1 : 1; inizio del trattamento allo stadio 9. Occlusione del tubo neurale, enorme dilatazione dei tubuli del pronefro e della cavità celomatica, ingrossamento dei somiti.
 Fig. 9. - Trattamento per 6 giorni con acqua del torrente Riso diluita 1 : 2; inizio del trattamento allo stadio 9. Dilatazione dei tubuli del pronefro e ingrossamento dei somiti.





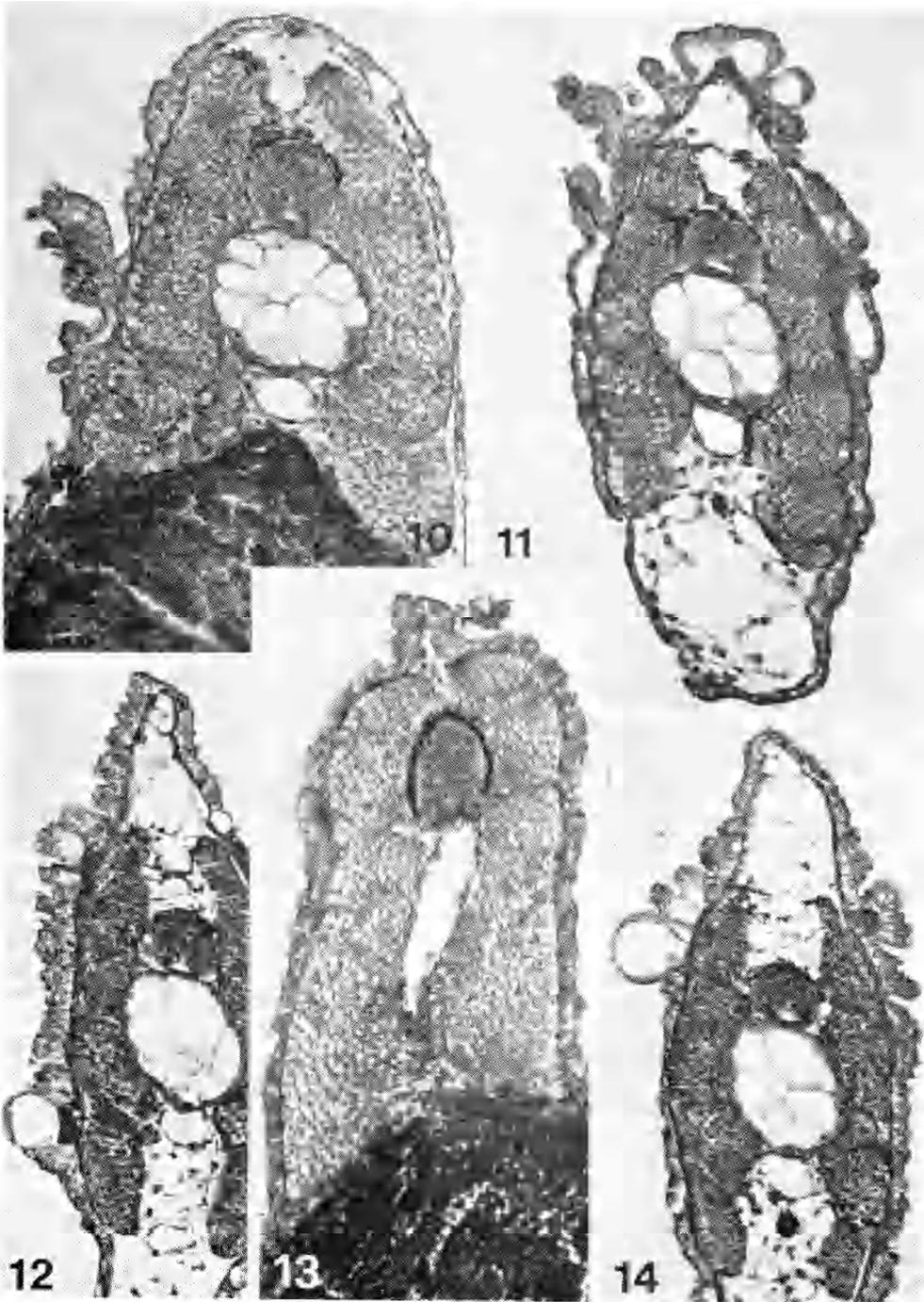


TAVOLA III.

(×240)

- Fig. 10. – Trattamento per 6 giorni con acqua del torrente Riso diluita 1 : 1; inizio del trattamento allo stadio 9. Ingrossamento dei somiti e proliferazioni dello strato esterno dell'epidermide.
- Fig. 11. – Trattamento per 5 giorni con acqua del torrente Riso diluita 1 : 1; inizio del trattamento allo stadio 9. Vescicole e ispessimento dell'epidermide.
- Figg. 12 e 14. – Trattamento per 6 giorni con acqua del torrente Riso diluita 1 : 2; inizio del trattamento allo stadio 9. Vescicole e proliferazioni dello strato esterno dell'epidermide.
- Fig. 13. – Trattamento per 6 giorni con acqua del torrente Riso diluita 1 : 2; inizio del trattamento allo stadio 9. Ingrossamento dei somiti, ispessimento dell'epidermide e occlusione del midollo spinale.