

# SAGGIO DI FECONDAZIONE CON IL RICCIO DI MARE *PARACENTROTUS LIVIDUS* (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA): CONFRONTO TRA ACQUA NATURALE E ACQUA RICOSTITUITA



## PARACENTROTUS LIVIDUS SPERM CELL TEST: COMPARISON BETWEEN NATURAL AND ARTIFICIAL SEAWATER



S. Lera, S. Tendi, D. Sartori

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale,  
Gruppo Operativo Livorno, Viale N. Sauro 4, 57100 Livorno  
s.lera@icram.org

### Introduzione

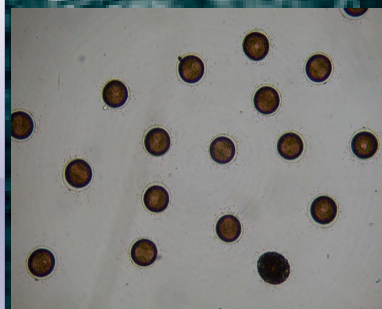
Il saggio biologico di fecondazione con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) è giunto quasi alla fine del lungo processo di standardizzazione grazie alla collaborazione tra vari laboratori italiani, che ha portato alla stesura di un protocollo definitivo e condiviso. Le guide ASTM (1995, 2004) ed i protocolli US EPA (1994, 1995) che descrivono il test di fecondazione con specie presenti sulle coste degli Stati Uniti e del Canada, lasciano la possibilità di utilizzare l'acqua naturale opportunamente filtrata o l'acqua ricostituita. Lo scopo del presente lavoro è di effettuare il test di fecondazione utilizzando sia acqua di mare naturale che ricostituita, al fine di poter confrontare i risultati e valutare eventuali discordanze.

### Materiali & Metodi

Il saggio consiste nell'esporre un numero definito di gameti maschili per 1 h ad una sostanza tossica o ad una matrice acquosa complessa di cui si vuole valutare la tossicità. Successivamente vengono aggiunte le uova e dopo 20 minuti il test viene bloccato con l'aggiunta di formalina. Il rapporto sperma:uova adottato è di 15.000:1 con 1.000 uova in 10 ml di soluzione test. Al termine delle prove vengono conteggiate le uova fecondate e calcolate le percentuali di fecondazione corrispondenti alle diverse diluizioni della matrice acquosa complessa testata (Lera et al., 2006).

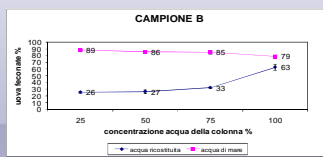
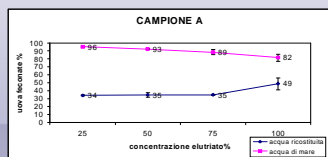
Il confronto tra l'acqua naturale ricostituita è stato effettuato utilizzando un controllo negativo, un controllo positivo (soluzione standard di  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$  per assorbimento atomico) alle concentrazioni di 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96  $\mu g/l$ , e due matrici acquose (elutriato e acqua di mare tal quale).

Nel caso dei campioni ambientali, le matrici acquose sono state preparate a partire dalle due acque differenti. Sono state effettuate tre prove nei mesi tra marzo e maggio. La differenza o meno tra i due trattamenti è stata valutata tramite ANOVA e mediante i valori di EC50 relativi all'utilizzo della sostanza tossica di riferimento.



### Elaborazione Dati

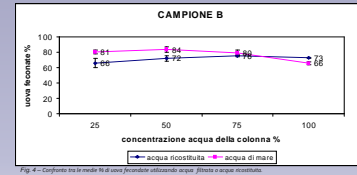
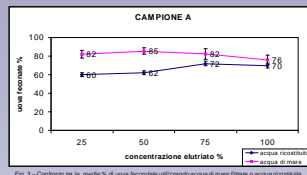
Nella prima prova, relativamente alle due matrici acquose impiegate, i valori percentuali di fecondazione ottenuti utilizzando acqua ricostituita, sono risultati < 50%, indicano che questa ha effetti negativi sulla fecondazione. Al contrario, l'utilizzo di acqua di mare filtrata ha fatto registrare sempre valori di fecondazione > 79%.



L'ANOVA conferma la differenza significativa tra le due acque per le due matrici testate con  $p < 0,05$ . Risultati opposti si hanno invece nella seconda prova, in cui il tasso di fecondazione è più alto utilizzando acqua ricostituita piuttosto che acqua naturale. Ancora una volta l'analisi statistica conferma la differenza significativa tra le due acque ( $p < 0,05$ ). Nell'ultima prova, dai dati raccolti saggiando i due campioni, si può dire che l'utilizzo di acqua di mare filtrata garantisce un tasso di fecondazione maggiore rispetto all'acqua ricostituita, come già si era verificato nella prima prova.

L'ANOVA conferma a ancora la differenza significativa tra i due trattamenti. Se consideriamo ora i risultati ottenuti per la sostanza tossica di riferimento, si ha la conferma dell'esito delle prove sui campioni ambientali; infatti anche per il rame l'analisi statistica conferma la differenza significativa tra i due trattamenti, con  $p < 0,05$ .

I valori di EC50 ottenuti nelle tre prove con il rame variano da un minimo di 20,08  $\mu g/l$  (seconda prova con acqua ricostituita) a un massimo di 47,43  $\mu g/l$  (prima prova con acqua marina filtrata). Tali valori concordano con quanto riportato in letteratura da Lera e Pellegrini (2006) in un lavoro con *P. lividus* in cui il range dell'EC50 varia tra 22,25  $\mu g/l$  e 41,86  $\mu g/l$ . Altri autori riportano valori di EC50 che variano nel range da 39  $\mu g/l$  a 71  $\mu g/l$ , ma il saggio è eseguito con un numero assoluto maggiore di gameti, fatto che fa diminuire la sensibilità del test (Volpi Ghirardini e Arizzi Novelli, 2001).



### Conclusioni

Il saggio di spermiossicità con *P. lividus* sviluppato in parallelo con acqua marina filtrata e acqua ricostituita ha prodotto effetti molto diversi sulla fecondazione per ogni tipo di matrice acquosa. Due prove su tre hanno dato risultati migliori utilizzando di acqua marina naturale; tuttavia si possono riscontrare dei limiti anche nell'utilizzo di questo tipo di acqua. In effetti l'acqua proveniente da un ambiente naturale, anche se prelevata dallo stesso sito, può presentare caratteristiche chimiche diverse: le correnti infatti possono essere responsabili dell'apporto di sostanze tossiche provenienti da sorgenti lontane. Purtroppo la variabilità dei dati raccolti non permette nessuna conclusione definitiva. Ulteriori prove sperimentali sono quindi necessarie per definire la metodica.

### Bibliografia

- ASTM (1995) - Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. E 1563-98, Philadelphia, PA.
- ASTM (2004) - Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. E 1563-98, Philadelphia, PA.
- LERA S., MACCHIA S., PELLEGRINI D. (2006) - Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. Environ. Monit. Assess., 122: 101-109.
- LERA S., PELLEGRINI D. (2006) - Evaluation of the fertilization capability of *Paracentrotus lividus* sea urchin stored gametes by the exposure to different aqueous matrices. Environ. Monit. Assess., 119: 1-13.
- US EPA (1994) - Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to marine and estuarine organisms. 600/4-91-136. Cincinnati, Ohio.
- US EPA (1995) - Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to West Coast marine and estuarine organisms. 600/R-95/136. Cincinnati, Ohio.
- 95) - Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. E 1563-95, Philadelphia: 1029-104VOLPI GHIRARDINI A., ARIZZI NOVELLI A. (2001) - A sperm cell toxicity test procedure for the Mediterranean species *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). Environ. Tech., 22: 439-445.