

Riv. Mus. Sc. Nat. Bg; vol. 8° (1984)

FRANCO VALOTI (1), MARCO FERRAGUTI (2), STEFANO FERRARI (3) e  
GIOVANNI VAILATI (4)

---

Osservazioni istologiche su larve di Efemerotteri viventi in  
acque inquinate da sali di calcio.

---

Riassunto: Larve di diverse specie di Efemerotteri viventi in acque del fiume Brembo inquinate dallo scarico di una cava estrattiva di marmo sono state sottoposte all'analisi istologica mediante l'uso del microscopio ottico ed elettronico per evidenziare in esse la presenza di sali di calcio. I preparati istologici sono stati sottoposti a diversi metodi istochimici che hanno potuto evidenziare sulla superficie esterna e all'interno delle cellule intestinali la presenza di carbonati di calcio. Vengono fatte alcune considerazioni, in base ai risultati ottenuti, circa le condizioni di vita degli animali in questione.

Abstract: Larvae of different species of Ephemeroptera live in waters polluted by the dumpings of a marble quarry in the river Brembo (Bergamo, Italy). Many of them have been subjected to histological analyses with both optical and electronic microscope, in order to exhibit the presence of Calcium salts in them.

The histological preparations have been subjected to different histochemical methods, which did display on the outer surface of the intestinal cells - as well as inside them - the presence of Calcium carbonate.

On the ground of these results, some remarks are given about the living state of these animals.

Key words: larvae of Ephemeropters, Brembo, histological preparations, calcium salts.

---

- (1) (3) - Collaboratori esterni del Museo di Scienze Naturali  
(2) (4) - Professori associati del Dipartimento di Biologia  
dell'Università di Milano.

Nell'ambito degli studi sugli effetti delle varie sostanze inquinanti sulla vita acquatica, si sono sviluppate negli ultimi anni presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Milano ricerche tendenti a valutare le sostanze in questione anche in termini di alterazioni anatomiche, istologiche e teratologiche, oltre che in termini di mortalità, di alterazione della potenzialità riproduttiva e dell'accrescimento in animali acquatici.

Oltre alle sostanze inquinanti solubili in acqua vi è anche una categoria di sostanze che restano in sospensione e che danneggiano la vita acquatica in quanto, depositandosi ad esempio sugli organi respiratori o venendo ingerite, possono interferire con le normali funzioni vitali.

Ad esempio i residui della estrazione del marmo vengono riversati direttamente dalle cave nei fiumi ove restano in sospensione per diverse centinaia di metri e conferiscono alle acque un caratteristico aspetto lattescente.

In provincia di Bergamo, in località Camerata Cornello, nel fiume Brembo si riversa lo scarico di una cava di marmo contenente i residui delle varie lavorazioni e poiché in tale zona il fiume è abbastanza ricco di acque e la corrente è notevole, le acque inquinate in questione sono limitate ad una fascia di qualche metro di larghezza, ben delimitata per un lungo tratto prima di entrare in rapporto con il grosso della corrente.

L'aspetto di questa acqua è lattescente e tutti gli oggetti che vi sono immersi e che vi vengono a contatto anche momentaneamente restano ricoperti da una notevole patina bianca. Sorprendentemente in un'acqua di sifatte caratteristiche si è notato un abbondante popolamento di larve di Efemerotteri che non sembra subirne gli effetti.

Infatti la distanza che li separa dalle acque meno inquinate non costituirebbe per loro un ostacolo sufficiente per un loro insediamento in acque aventi caratteristiche tali da permettere migliori condizioni di vita e quindi maggiori possibilità di sopravvivenza.

Già nel corso di precedenti ricerche si era notato all'interno del tubo digerente di tali individui un enorme quantità di residui e frammenti di marmo; si è voluto quindi indagare con metodi istochimici e con l'ausilio del microscopio elettronico se tale sostanza subisse una trasformazione nell'attraversare il tubo digerente di questi animali e provocasse eventuali alterazioni istologiche.

#### MATERIALE E METODI

Per l'osservazione al microscopio ottico larve di Ecdyonurus helveticus, Eaton - Rhithrogena semicolorata, Curtis - Baëtis rhodani, Fictet - Baëtis gemellus, Eaton, sono state fissate in liquido di Carnoy e dopo 48 ore incluse in paraffina secondo le tecniche usuali (Beccari e Mazzi, 1966).

Le sezioni sono state condotte trasversalmente a 10 micron di spessore.

Come materiale di confronto sono state anche allestite sezioni di individui appartenenti alle stesse specie, prelevati circa un chilometro a monte della località in questione, dove le acque del fiume sono in condizioni più naturali.

Alcune sezioni venivano colorate con ematossilina di Herlich ed eosina, altre invece, per la rilevazione dei composti di calcio, sono state sottoposte alle seguenti analisi istochimiche:

colorazione con alizarina-solforata di sodio, precipitazione dei sali di calcio con acido solforico e formazioni di cristalli di gesso (solfato bivalente), reazione di conversione con acido pirogallico, microincenerizione e osservazione a luce polarizzata.

Per la microscopia elettronica larve di Ecdyonurus helveticus sono state fissate secondo la tecnica di Karnovsky (1965) in paraformaldeide e glutaraldeide.

Dopo il fissaggio della durata di circa 5 ore, i tessuti sono stati lavati in tampone fosfato e cacodilato 0,2 M a pH 7,2-7,4 per una notte, quindi sono stati postfissati per due ore in acido osmico all'1% tamponato con cacodilato 0,2 M a pH 7,2-7,4.

I campioni sono stati poi disidratati in scala crescente di etanolo; in alcool 25% sono stati precolorati con acetato di uranile all'1%.

Dopo un rapido passaggio in ossido di propilene i pezzi vengono inclusi in Epon-Araldite, quindi sezionati con ultramicrotomi LKB Ultratome I e III.

Le sezioni sono state raccolte su un retino senza membrana, colorate con citrato di piombo (Reynolds, 1963) e rinforzate con una membrana di carbone.

Sono state poi osservate e fotografate con un microscopio elettronico Kitachi Hu II, ES.

Sono state anche allestite sezioni semifini dei preparati, colorate con blu di metilene e safranina per l'osservazione al microscopio ottico.

#### OSSERVAZIONI

L'analisi dei diversi preparati allestiti con i metodi sopra esposti permettono di fare considerazioni in merito al problema delle condizioni di vita di tali animali in un simile mezzo ambiente.

Innanzitutto le diverse prove istochimiche effettuate e l'osservazione istologica consentono di affermare che ci si trova di fronte ad una vera e propria "impregnazione" da polvere di marmo su tutte le parti del corpo a contatto con l'ambiente esterno e cioè superficie esterna e tubo digerente (fig.2).

Per quanto riguarda la superficie esterna, la presenza di particelle di marmo si osserva a tutti i livelli tracheobranchie comprese (fig.3 e 4).

Questo reperto assume una certa importanza se si considera che le tracheobranchie sono gli organi respiratori delle larve degli Efemerotteri e di conseguenza appare incomprensibile o quantomeno difficile da spiegare come tali animali non manifestano un'apparente difficoltà a vivere in simili acque. Per quanto riguarda la presenza di residui di marmo all'interno del tubo digerente c'è da dire che esso è presente in quantità massiccia a tutti i livelli e l'allestimento di sezioni seriate ha permesso di verificare che non vi sono modiche evidenziate con i metodi sopracitati, subite dalla sostanza inquinante in questione nell'attraversare il tubo digerente. L'osservazione degli spodogrammi al microscopio polarizzatore ha permesso di rilevare all'interno delle cellule dell'epitelio intestinale la presenza di una notevole quantità di tali sostanza minerali (fig.5 e 6).

Le cellule dell'intestino medio di Ecdyonurus helveticus hanno una forma cilindrica, con nucleo in posizione basale. Sono provviste di un orletto striato molto spesso (anche 20 micron) e poggiano su di una membrana basale di circa 0,5 micron di spessore, che le separa dalla muscolatura sottostante; a livello della parte basale della cellula esistono numerose inflessioni citoplasmatiche. Il citoplasma è molto ricco di reticolo endoplasmico ruvido, in accordo con la loro funzione di secernere enzimi digestivi, e nella parte apicale si osservano, alla base dei microvilli, numerose vescicole di pinocitosi. I mitocondri sono molto più abbondanti nella parte apicale della cellula ed hanno una forma più o meno allungata con creste trasversali.

Distribuiti all'interno del citoplasma, con una densità maggiore all'apice della cellula, vi sono numerosi granuli di melanina.

La natura di questi granuli, oltre che per le caratteristiche morfologiche tipiche sia all'osservazione al microscopio ottico che al microscopio elettronico, è stata verificata mediante decolorazione per 48 ore con acqua ossigenata a 10 volumi, che agisce selettivamente sulla melanina (Beccari e Mazzi, 1966).

Gli individui viventi nelle acque inquinate dagli scarichi delle cave di marmo presentano, nella regione apicale delle cellule intestinali, numerosissime vescicole a lamelle concentriche denominate "sferiti", che hanno la stessa struttura di quelle descritte da Gouranton (1968) nell'intestino medio di Omotteri (fig.9).

Queste formazioni, segnalate anche da Wigglesworth (1965) in diverse specie di Insetti, e da Hubert (1979) in alcuni Diplópodi, oltre ai succitati Autori, rappresentano verosimilmente i granuli di sali di calcio evidenziati con la microincenerizione e le reazioni istochimiche.

Tali formazioni sono circondate da uno sviluppatissimo reticolo endoplasmico ruvido e sovente, a causa della loro durezza, sono rotte o espulse dalla lama dell'ultramicrotomo durante l'allestimento delle sezioni (fig.10).

Questi sferigli sono presenti in forme più o meno complesse corrispondenti, secondo Gouranton, ai diversi stadi di maturazione. Questi ultimi, secondo tale Autore, sono distribuiti nei vari livelli della cellula e i più evoluti si trovano nella parte più apicale.

Originatisi nella zona basale della cellula, a livello dell'ergastoplasma, i giovani sferiti presentano in posizione centrale strutture granulari molto dense agli elettroni; procedendo verso la parte più apicale della cellula compaiono nel loro interno strutture concentriche in cui si alternano bande chiare e bande scure (fig.11).

Successivamente il centro degli sferiti più evoluti si schiarisce, fino a che si osservano strutture quasi completamente vuote, provviste solamente di un involucro di materiale denso agli elettroni.

In Ecdyonurus non si riscontra una tale distribuzione, in quanto i vari stadi di maturazione degli sferiti sembrerebbero disposti a caso nella parte apicale della cellula.

Il significato di queste concrezioni calcaree appare chiaro se si pensa che esse, pur contenenti sostanze chimiche diverse sono state osservate anche nei tubi malpighiani degli Insetti e di altri Artropodi (Wigglesworth, Hubert), e che quindi rappresentano prodotti che devono essere eliminati. E' chiaro che, date le particolari condizioni di vita delle larve di Efemerotteri qui prese in considerazione, il calcio viene introdotto insieme alle altre sostanze durante l'assorbimento intestinale, deve essere in qualche modo isolato all'interno della cellula e, successivamente, eliminato. Il suo accumulo negli sferiti ha quindi probabilmente un significato di escrezione, dato che la degenerazione periodica delle cellule dell'epitelio intestinale comporterebbe la sua eliminazione. Per questa sostanza quindi le cellule intestinali funzionerebbero come "rene d'accumulo".

E' inoltre interessante il fatto che negli osteoclasti si osservano corpi residui con un contenuto ad alta densità, presentanti una struttura a lamelle concentriche (Scott, 1967). Pensando alla funzione di tali cellule, si può fare una analogia con quanto osservato nell'intestino delle larve degli Efemerotteri viventi in un ambiente ricco di sali di calcio: in tutti e due i casi ci si trova di fronte a cellule che in globano massivamente, per motivi nettamente diversi, grandi quantità di sali di calcio e che quindi devono provvedere alla loro eliminazione.

Osservazioni sulla biologia di tali animali hanno permesso di constatare che tali larve giungono regolarmente allo stato adulto e che questo particolare avvalorà l'ipotesi che in tali acque il loro ciclo vitale si può svolgere in modo apparentemente regolare.

Considerazioni diverse si possono fare invece se si considerano le larve degli Efemerotteri come un importante anello della catena alimentare di un fiume.

Infatti questi animali sono preda abituale di pesci più o meno importanti per i vari aspetti dell'economia di un fiume, quali ad esempio la trota. Riesce difficile infatti pensare come una trota possa cibarsi di prede così poco abituali dal punto di vista alimentare.

Quest'ultima considerazione potrebbe portare a questa conclusione: gli Efemerotteri viventi in tali acque hanno maggiore probabilità di sfuggire ai predatori in quanto

- 1) - vivono in acque inquinate dove un predatore pregiato ha meno possibilità di spingersi
- 2) - qualora giungesse a portata del predatore la presenza della polvere di marmo sulla sua superficie lo rende senz'altro meno appetibile.

Il vivere in tali condizioni potrebbe essere quindi inteso come maggior possibilità di sfuggire alla predazione.

#### B I B L I O G R A F I A

- BEADLE D.J. - "Structural differentiation in the mid-gut epithelium of the phasmid Carausius morosus Brunner" J.Ent.: 47, 71 (1972)
- BECCARI N., MAZZI V. - "Manuale di tecnica microscopica" Soc.Ed. Libreria, Como (1966)
- BERLESE A. - "Gli Insetti" Soc. Ed. Libreria, Milano (1909).
- EHRHARDT P. - "Magnesium und Calcium enthaltende Einschlusskörper in den Mitteldarmzellen von Aphiden" Experientia: 21, 337 (1965)
- GABE M. - "Techniques Histologiques" Masson ed. Paris (1968)
- GOURANTON J. - "Composition, structure, et mode de formation des concretions minerales dans l'intestin moyen des Homopteres Cercopides". J.Cell. Biol.: 37, 316 (1968)
- GRANDI M. - "Ephemeroidea". Ed. Calderini, Bologna (1960)
- GRASSE' P.P. - "Traité de Zoologie" tome IX Masson Ed., Paris (1949)
- HUBBERT M. - "Localization and Identification of Mineral Elements and Nitrogenous Waste in Diplopoda" in "Myriapod Biology". Acad. Press, London (1979)
- KARNOWSKY M.J. - "A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of hygh osmolarity for use in electron microscopy". J.Cell.Biol.: 27, 137 (1965)
- LISON L. - "Histochimie et cytochimie animales" Gauthier - Villars Ed. Paris (1960)
- REYNOLDS E.S. - "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy". J.Cell.Biol., 17, 89-106 (1963)
- SCOTT B.L. - "The Occurrence of Specific Cytoplasmic Granules in the Osteoclast". Ultr. Res.: 19, 417 (1967)

VALOTI F. - "Osservazioni su larve di Efemerotteri viventi in acque inquinate da sali di calcio".

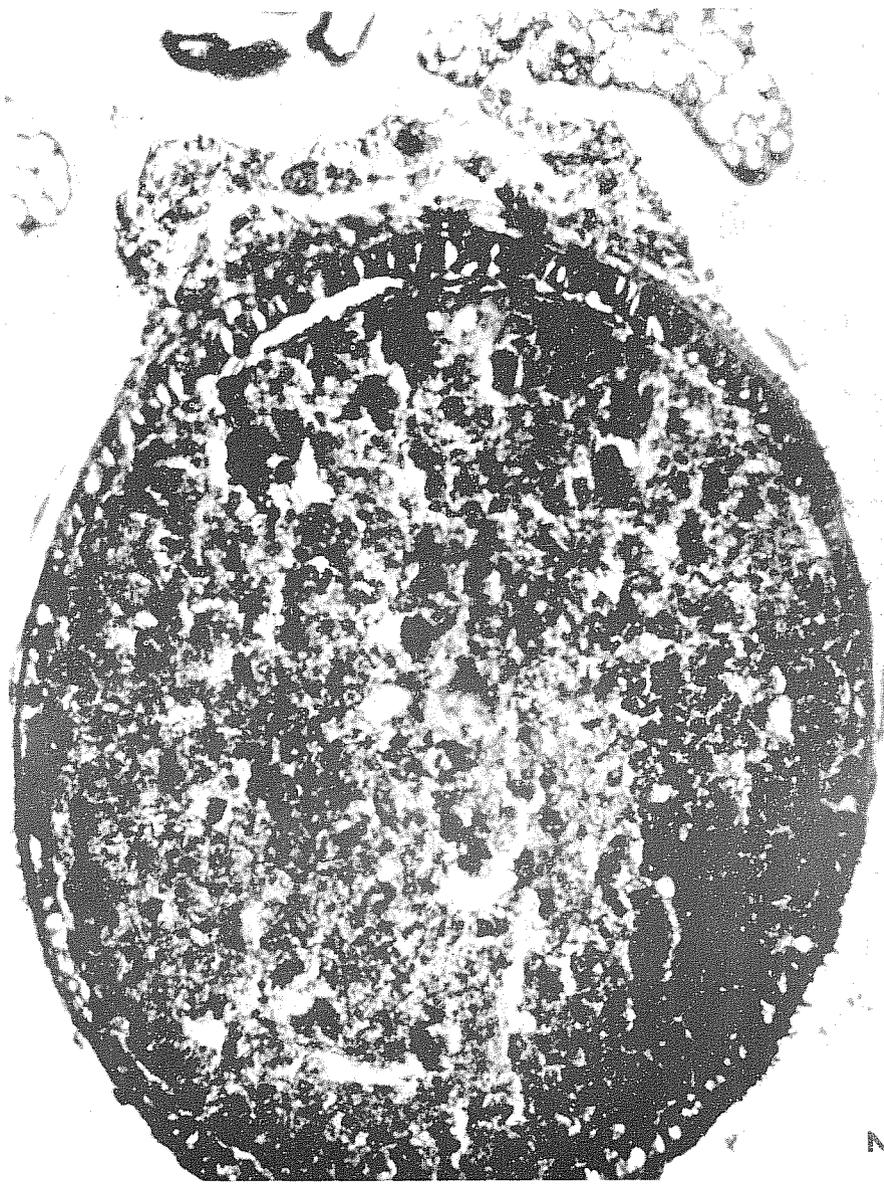
Tesi di laurea in Sc.Biol. Un. MI  
Ist. di Zoologia (1976)

WIGGLESWORTH V.B. - "Principles of insect physiology"  
Methuen Ed., London (1965)

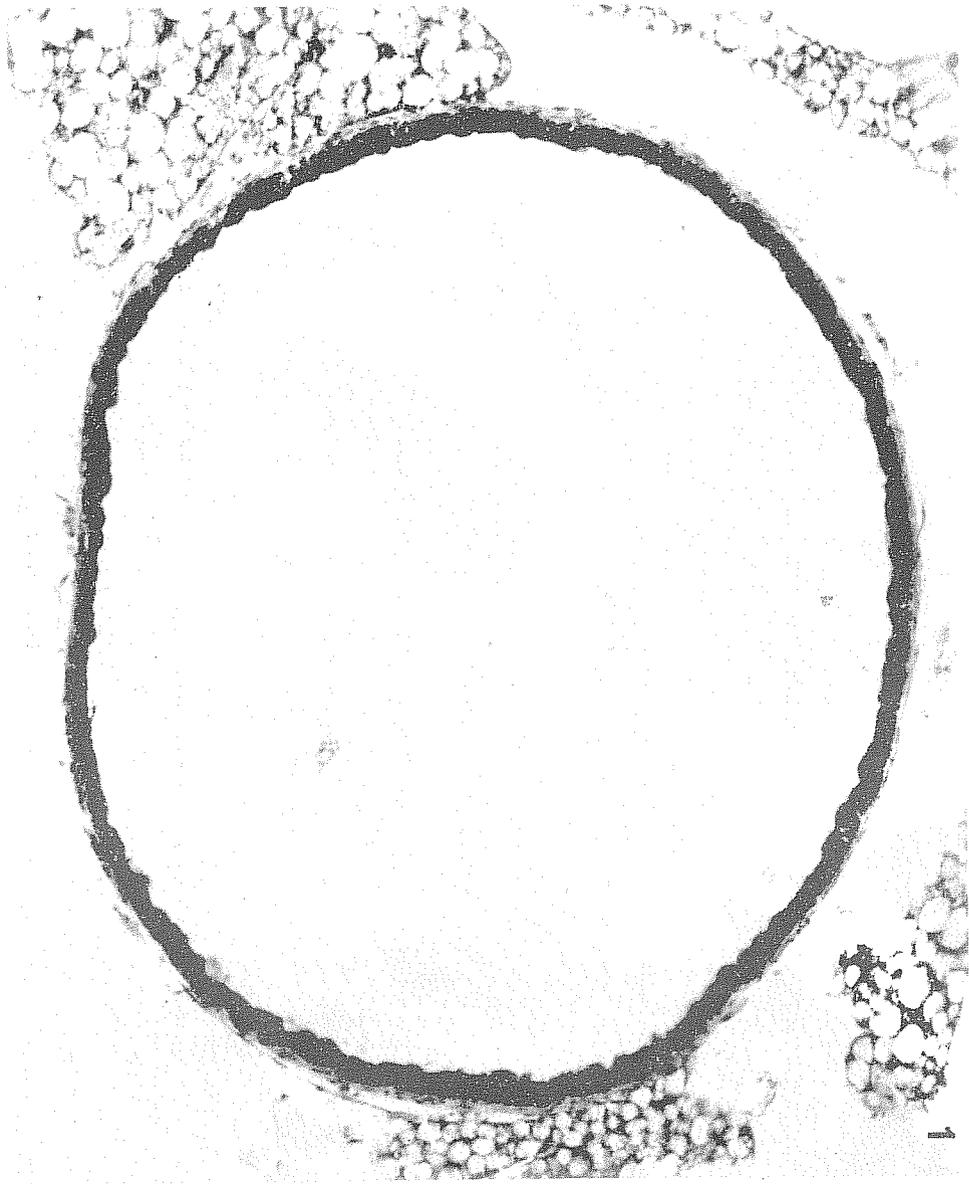
Consegnato mese di dicembre 1984

DIDASCALIE FIGURE

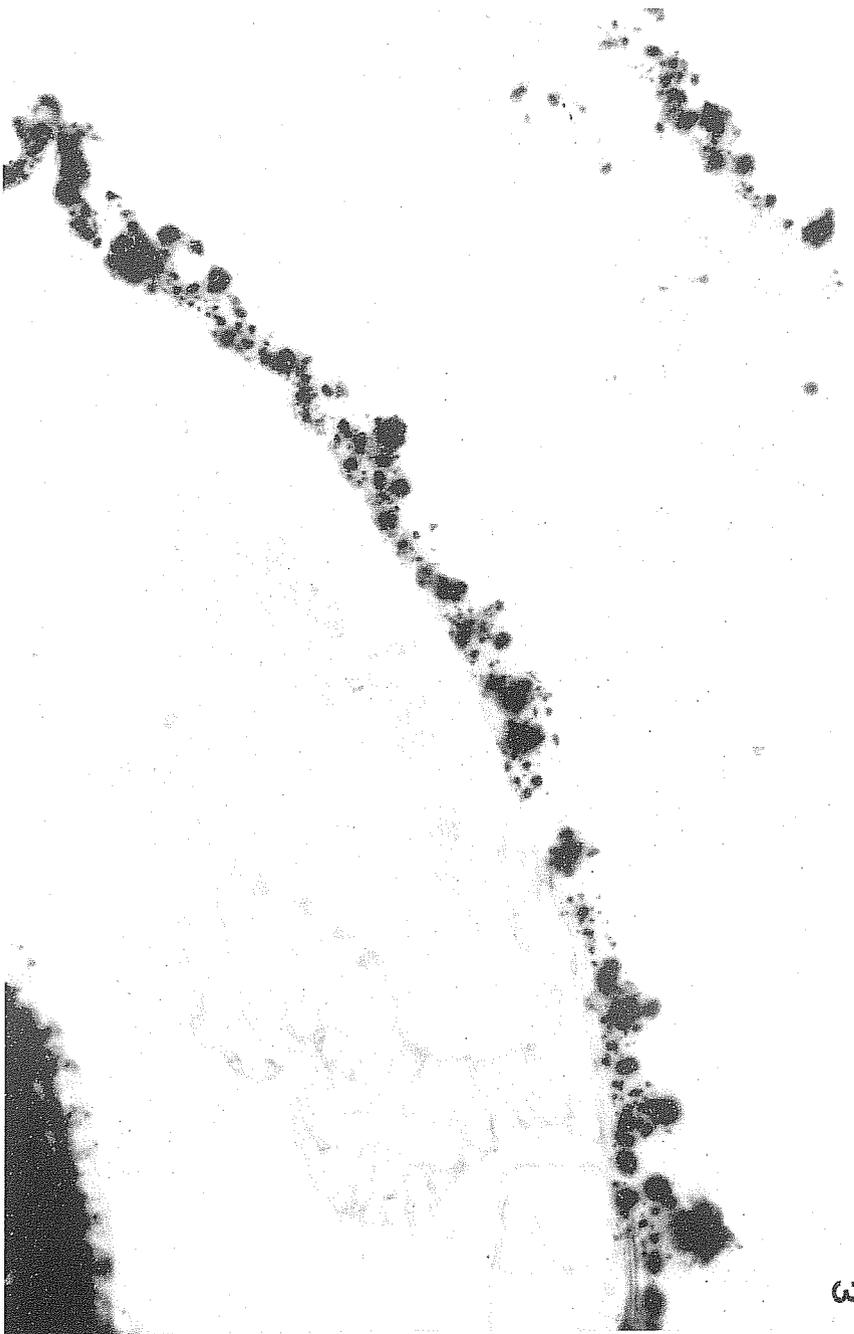
- Fig.1 - Sezione trasversale dell'intestino di una larva vivente in acque non inquinate. Colorazione ematosillina ed eosina(x250)
- Fig.2 - Sezione trasversale dell'intestino di una larva vivente in acque inquinate da sali di calcio. Il lume intestinale è occupato da una massa positiva alle reazioni istochimiche per il carbonato di calcio. Colorazione come sopra (x 250)
- Fig. 3 e 4 - La colorazione con Alizarina S-Na evidenzia la presenza di carbonato di calcio sulla superficie esterna e sulle tracheo-branche di questi animali (Fig.3:x50; Fig.4: x250)
- Fig.5 e 6 - Reazione con acido solforico e formazione di cristalli di gesso ( solfato di calcio bivalente). Questa reazione dimostra che il carbonato di calcio contenuto nell'intestino (fig.5) non ha subito trasformazioni chimiche (x300).
- Fig.7 - Sezione trasversale di una larva osservata in luce polarizzata dopo microincinerazione.Si nota la presenza di carbonati su tutte le strutture evidenziabili (x50)
- Fig.8 - Particolare dell'intestino osservato con le modalità della foto precedente. Oltre al contenuto intestinale sono fortemente positive le cellule dell'epitelio intestinale (x200)
- Fig.9 - Fotografia al microscopio elettronico della parte apicale delle cellule intestinali, nel cui citoplasma sono visibili numerosi sferiti di sali di calcio (x25.000)
- Fig.10 - In questa immagine al microscopio elettronico sono visibili diversi sferiti nei diversi stadi di maturazione (x40.000)
- Fig.11 - Particolare ingrandito di alcuni sferiti in cui sono bene evidenti gli strati concentrici secondo cui si depositano i sali di calcio in essi segregati (x85.000).



2

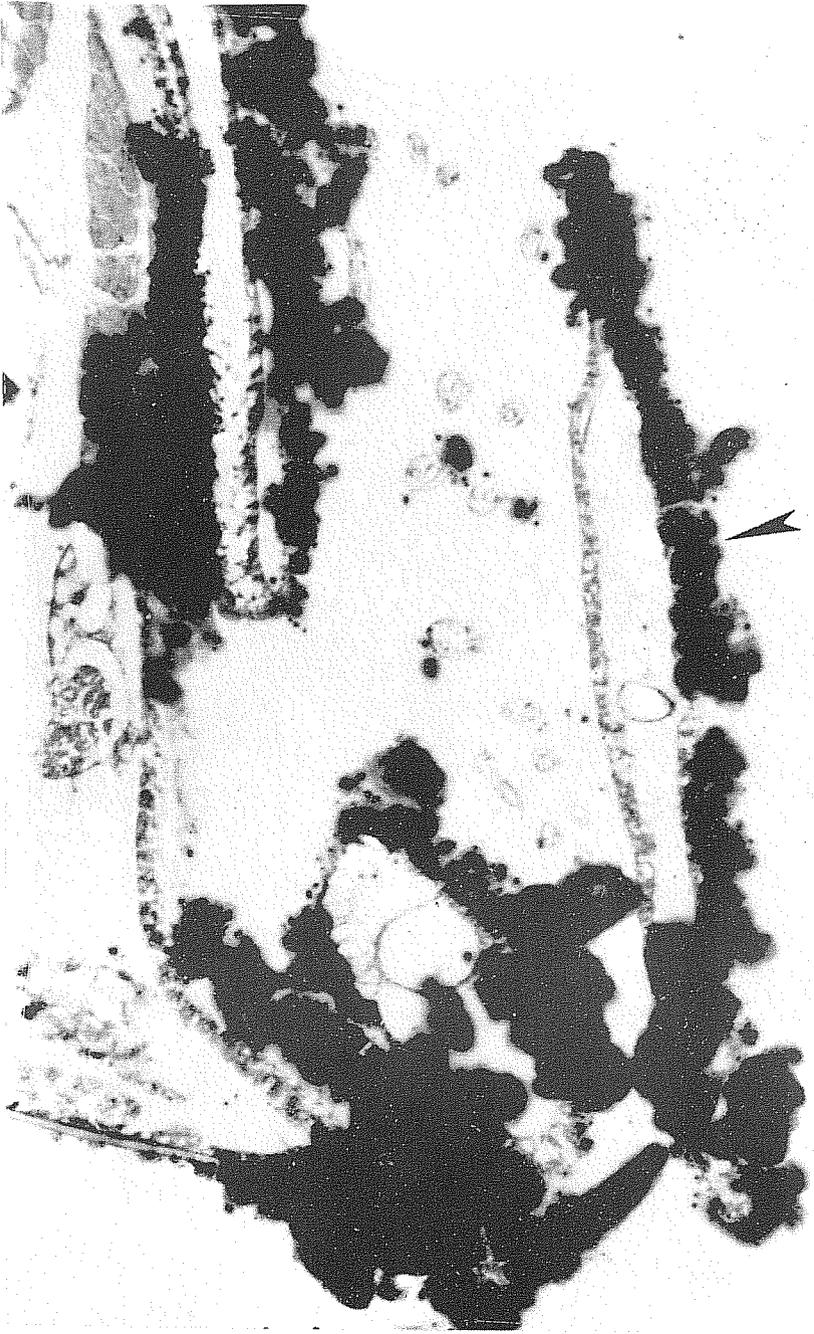


1



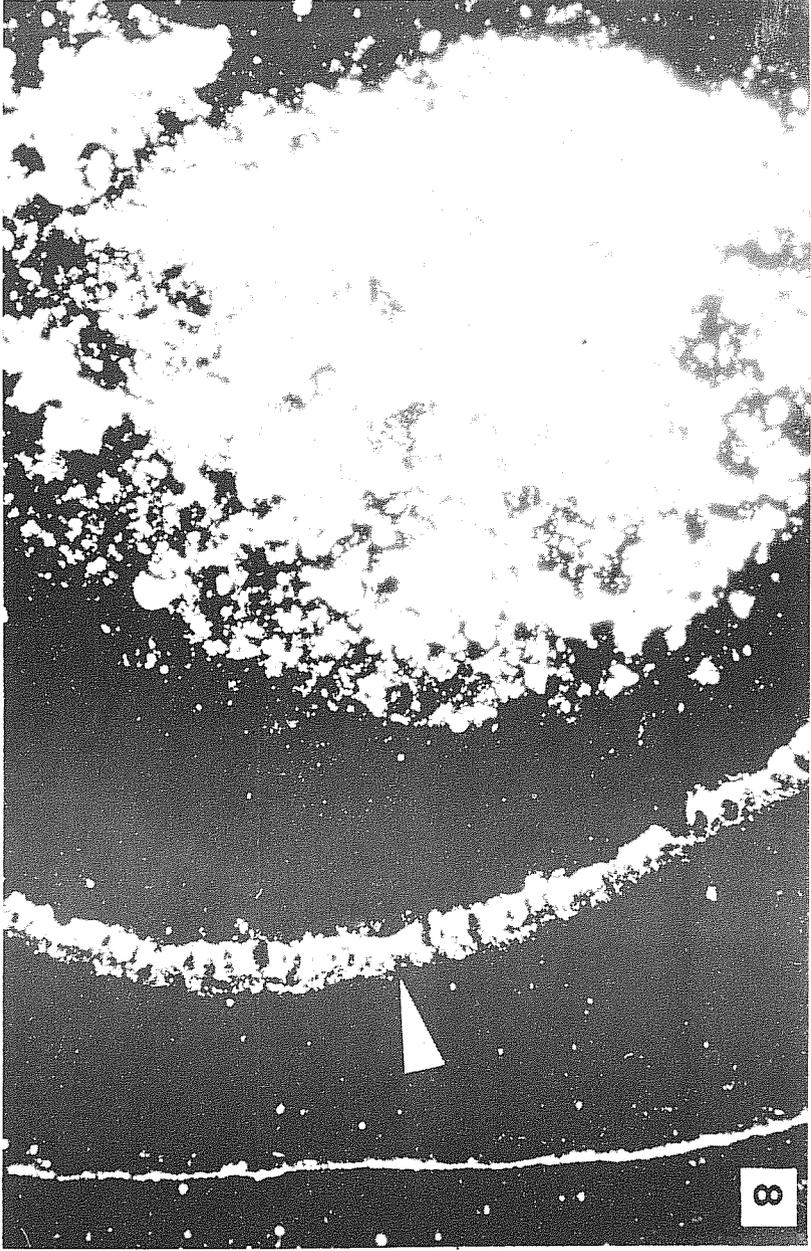
31

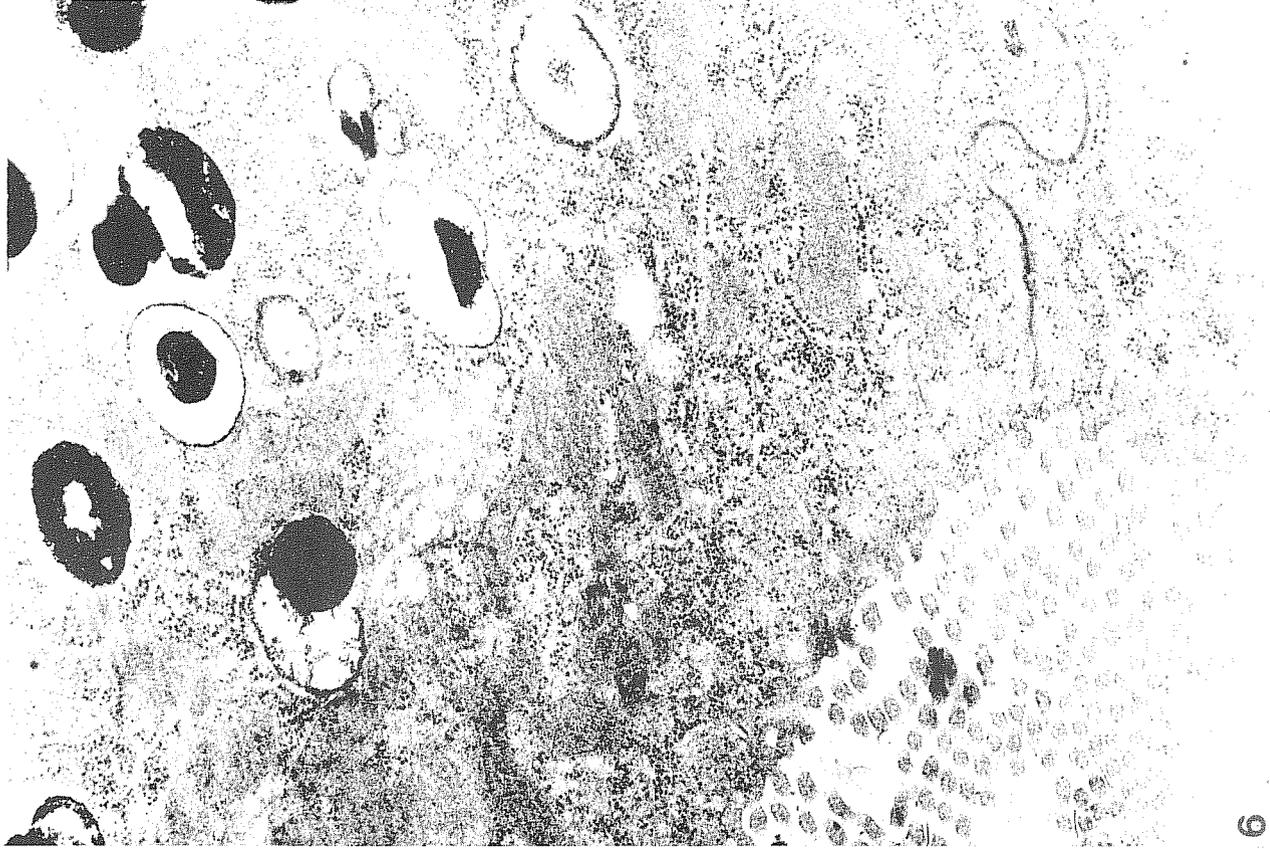
3



4







9

