UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE

FLORE
Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

Accumulo di microcistina nel gambero rosso della Louisiana, Procambarus clarkii: risultati preliminari.

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

Original Citation:

Accumulo di microcistina nel gambero rosso della Louisiana, Procambarus clarkii: risultati preliminari / E. TRICARICO; E. CASALONE; L. FIORAVANTI; F. GHERARDI; G. MASTROMEI; G. PARISI. - In: IL PESCE. - ISSN 0394-2929. - STAMPA. - 6:(2006), pp. 97-103.

Availability:

This version is available at: 2158/397336 since:

Terms of use:

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf)

Publisher copyright claim:

(Article begins on next page)

25 April 2024

Accumulo di microcistina nel gambero rosso della Louisiana, *Procambarus clarkii*: risultati preliminari

di Elena Tricarico, Enrico Casalone, Lorenzo Fioravanti, Francesca Gherardi, Giorgio Mastromei, Giuliana Parisi

Introduzione

Procambarus clarkii (*figura 1*), il gambero rosso della Louisiana, è considerato una specie invasiva (Gherardi 2006), in quanto minaccia la biodiversità delle acque interne italiane a causa dell'elevata competitività, del comportamento alimentare generalista, l'intensa predazione e la capacità di diffondere parassiti letali (Gherardi *et al.*, 1997 [a, b]). Inoltre, può produrre danni economici ingenti a causa dell'intensa attività di scavo che provoca la destabilizzazione degli argini (Gherardi, 2006) (*figura 2*).

Per contenerne la diffusione, a partire dal 1997 l'Ente Parco Regionale Migliarino - San Rossore - Massaciuccoli ne ha promosso la pesca nel lago di Massaciuccoli (Toscana, *figura 3*) e la conseguente commercializzazione (Cenni, 1997). Tuttavia, il lago è stato oggetto negli ultimi anni di fioriture del cianobatterio *Microcystis aeruginosa*, ascrivibili alla sua crescente eutrofizzazione (*figure 4, 5*). Nelle estati del 2002 e del 2004, fioriture particolarmente consistenti hanno indotto il blocco della pesca e il divieto di balneazione (Simoni *et al.*, 2004).

A determinate condizioni ambientali (pH e temperature elevate), *Microcystis* può dar luogo a fioriture tossiche. La tossina prodotta, la microcistina, è un eptapeptide a basso peso molecolare, presente comunemente nella forma LR (Bruno *et al.* 2004) (*figura 6*).

La microcistina è una epatotossina che può accumularsi in tutti gli organismi viventi, causare danni cellulari e manifestare attività di promotore tumorale (Bruno *et al.*, 2004). L'OMS (*Organizzazione Mondiale della Sanità*) ha imposto il limite di concentrazione della microcistina di 1 µg/l (rischio di intossicazione acuta) per il consumo di acque potabili provenienti da invasi eutrofizzati e contaminati dalla microcistina. È stato, inoltre, fissato a 0,04 µg/kg di peso corporeo del consumatore il limite per il consumo umano giornaliero TDI (*Threshold Daily Intake*) della tossina: una persona di 70 kg non deve, ad esempio, ingerire una dose giornaliera superiore ai 2,8 µg. Rilievi condotti a Massaciuccoli dall'Arpat (Simoni *et al.*, 2004) hanno mostrato l'accumulo di microcistina nei tessuti di *P. clarkii* con concentrazioni superiori ai limiti imposti, evidenziando quindi la pericolosità del consumo di questa specie.

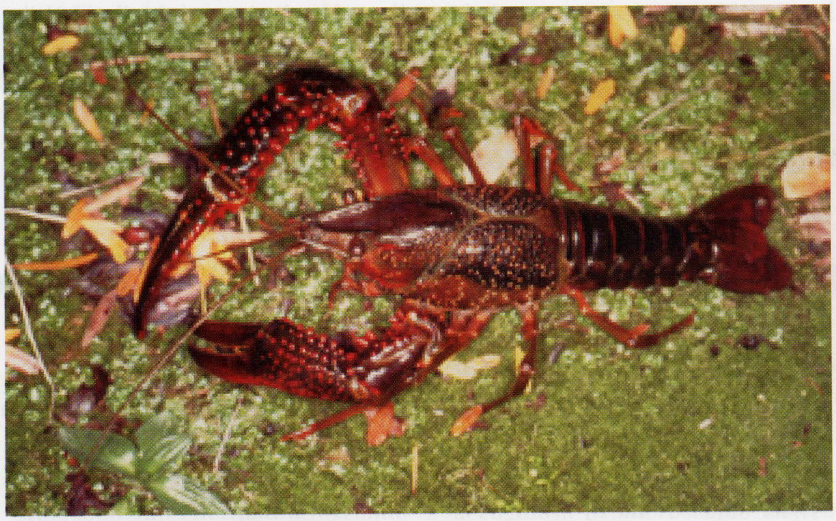

***Figura 1** – Il gambero rosso della Louisiana* Procambarus clarkii.

***Figura 2** – Crollo di un argine causato dall'attività di scavo di* Procambarus clarkii.

Figura 3 – Veduta aerea del Lago di Massaciuccoli.

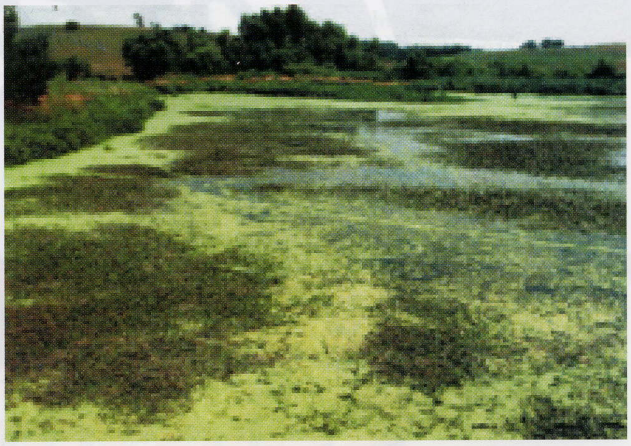

Figura 4 – Fioriture algali.

Il presente studio fa parte di un progetto più ampio (*"Valorizzazione a scopo alimentare del gambero alloctono naturalizzato nel lago di Massaciuccoli*, Procambarus clarkii"), frutto della collaborazione tra l'Università di Firenze e il Ce.S.I.T. (*Centro di Sviluppo Ittico Toscano*) su finanziamento della Regione Toscana. Obiettivi di questo lavoro erano quelli di:

1. mettere a punto un protocollo di indagine di relativamente facile attuazione e al tempo stesso affidabile per la misurazione della microcistina in *P. clarkii*;
2. evidenziare l'accumulo della tossina in questa specie nei diversi organi/tessuti;
3. individuare eventuali differenze tra sessi e tra classi di taglia.

Materiali e metodi

Il lavoro è stato condotto su un totale di 102 individui catturati nel lago di Massaciuccoli a ottobre del 2005, quando la massima concentrazione di microcistina rilevata nell'acqua era di 1,76 µg/l. Gli animali pescati sono stati immediatamente congelati, al fine di evitare l'alterazione dei tessuti e delle eventuali tossine accumulate. In laboratorio, per ogni esemplare, abbiamo misurato la lunghezza del cefalotorace e il peso e se ne è individuato il sesso. I gamberi sono stati sezionati per asportarne l'epatopancreas, lo stomaco, l'intestino e il muscolo addominale. L'estrazione e l'analisi della microcistina sono state effettuate utilizzando i metodi riportati da KRISHNAMURTHY *et al.* (1986) (sensibile per 0,1 ng di tossina per ml) e da MAGALHAES *et al.* (2001, 2003) e da noi modificati. In particolare, il muscolo addominale è stato da noi liofilizzato prima delle analisi e abbiamo utilizzato una pompa a vuoto per l'eluizione del campione su cartuccia *"C18-silica normal phase"* (*Phenomenex®*).

Alla fine dei vari passaggi di estrazione in metanolo ed esano previsti dal protocollo da noi seguito, l'analisi quantitativa di microcistina è stata effettuata utilizzando l'*EnviroGard® Microcystins Plate Kit* (*Strategic Diagnostic Inc.*). Il kit utilizza anticorpi policlonali in grado di legare sia la microcistina libera sia la microcistina coniugata ad un enzima reporter. Gli anticorpi, presenti in quantità limitanti, sono immobilizzati sul fondo dei pozzetti test. La microcistina presente nei campioni compete con la microcistina enzima-coniugata per gli anticorpi. L'eccesso di microcistina, coniugata e non, viene lavato via.

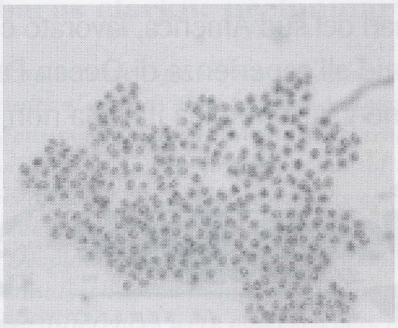

Figura 5 – Immagine di Microcystis aeruginosa *al microscopio elettronico.*

La reazione colorimetrica sviluppata dall'enzima coniugato alla microcistina rimasto nel pozzetto è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro (Immunella S) con filtro ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Il saggio spettrofotometrico è stato tarato utilizzando dei campioni a concentrazione nota di microcistina. Le densità ottiche fornite dallo spettrofotometro sono state successivamente trasformate in quantità di microcistina nel seguente modo:

- si è prima calcolato la percentuale di inibizione (% B_0) della reazione catalizzata dall'enzima reporter da parte della microcistina presente nel campione, % B_0 = [valore della densità ottica del campione oppure valore dei calibratori x100] / valore della densità ottica del controllo negativo, (più alta è B_0, meno microcistina è presente nel campione);
- i valori di B_0 calcolati per i calibratori sono stati messi in grafico su scala semilogaritmica contro la rispettiva concentrazione di microcistina;
- la concentrazione di microcistina nei campioni è stata estrapolata dal grafico usando i rispettivi valori di B_0 ed espressa in ng/ml;
- il valore ottenuto è stato poi rapportato al peso del campione ed è stata determinata la concentrazione di microcistina in ng/g.

Il confronto delle concentrazioni di microcistina nei vari organi/tessuti è stata effettuato utilizzando l'analisi della varianza di FRIEDMAN (statistica: Fr), seguita dal *Multiple*

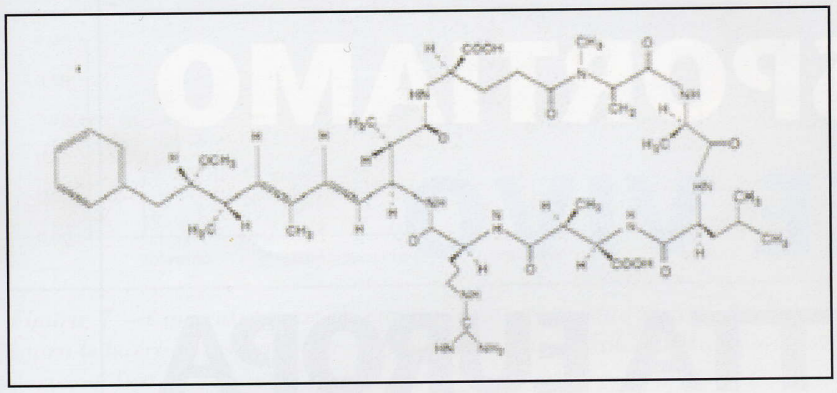

Figura 6 – Struttura chimica della microcistina-LR.

Comparisons Test; il test di MANN-WHITNEY (statistica: U) è stato usato per individuare eventuali differenze nelle concentrazioni tra sessi e classi di taglia (SIEGEL e CASTELLAN, 1988). Il livello di significatività per il quale l'ipotesi nulla veniva rigettata era $\alpha = 0,05$.

Risultati

Nonostante la limitata concentrazione di microcistina nell'ambiente, tutti gli organi/tessuti analizzati presentavano la tossina, anche se in concentrazioni basse (valori medi compresi tra 0,45 ng/g dell'intestino e 0,06 ng/g della parte edule dell'addome). L'intestino è risultato essere il maggior accumulatore di microcistina (Fr=18,60, df=3, P< 0,001; Multiple Comparisons Test: intestino>epatopancreas=stomaco> addome) (*figura 7*) . Non è stata osservata alcuna differenza tra maschi e femmine (intestino: U=6,5, P=0,76; stomaco: U=36, P=0,61; addome: U=11, P=0,81), tranne che nel caso dell'epatopancreas, il cui contenuto di microcistina era più alto nelle femmine (U=17,5, P=0,03). Per quanto riguarda le classi di taglia, gli individui di taglie inferiori presentavano una concentrazione di microcistina maggiore rispetto agli individui più grandi (intestino: U=0,00, P=0,04; epatopancreas: U=17,5, P=0,03; stomaco: U=0,00, P<0,0001; addome: U=0,00, P=0,02) in tutti gli organi/tessuti considerati.

Discussione

Le deboli fioriture dell'estate 2005 (massimo di 1,76 µg/l di microcistina rilevata nell'acqua del Lago contro i 5,49 µg/l dell'ottobre 2003) possono spiegare la bassa concentrazione di tossina rilevata nei gamberi. Al contrario, in presenza di fioriture consistenti gli organi/tessuti di *P. clarkii* avevano raggiunto livelli di tossicità estremamente elevati (1092 µg/kg) come rilevato da SIMONI *et al.* (2004).

In accordo a quanto riportato da VASCONCELOS *et al.* (2001), *Procambarus clarkii* accumula microcistina soprattutto nell'intestino e nell'epatopancreas. Il dato rassicurante è che nella parte edibile del gambero (il muscolo addominale) la tossina è stata riscontrata in quantità minimali (vedi anche VASCONCELOS *et al.* 2001). Al contrario, in altri crostacei quali i gamberetti d'acqua dolce *Palaemon modestus* e *Macrobranchium nipponensis*, nel 31% dei campioni di addome furono evidenziati livelli di microcistina superiori al limite imposto dalla OMS (CHEN e XIE, 2005).

L'intestino, l'organo che risulta il maggior accumulatore, spesso viene ingerito dal consumatore assieme all'addome. Tuttavia, l'asportazione del telson del gambero ne comporta la rimozione, escludendolo quindi dal consumo. Le analisi hanno dimostrato che la microcistina si accumula in concentrazioni maggiori negli animali di piccola taglia rispetto agli adulti. Gli animali di piccola taglia non sono comunque commercializzati. La differenza tra sessi riscontrata nell'epatopancreas può dipendere dal periodo in cui è stata effettuata la pesca degli esemplari da noi analizzati. A ottobre, infatti, le femmine intensificano la loro attività di alimentazione dopo un lungo periodo di digiuno durante la gestazione dei piccoli nelle tane (HUNER, 1988).

Dal momento che la maggior parte della tossina viene accumulata nell'intestino e nell'epatopancreas, ci sembra di poter escludere l'esi-

Accumulation of microcystin in the Louisiana crayfish, Procambarus clarkii: preliminary results

The Louisiana crayfish is considered an invasive species since it threatens the biodiversity of Italian inland waters. This article describes the results of a study that focused on the following objectives: 1. to develop a reliable research protocol relatively easy to implement for the measurement of microcystin in P. clarkii; 2. to detect the accumulation of the toxin in the diverse organs/tissues of this species; 3. to discover eventual differences between sexes and between size classes. The work was conducted on a total of 102 Louisiana crayfish caught in Lake Massaciuccoli in October 2005, when the maximum concentration of microcystin detected in the water was 1.76 µg/l. Despite the limited concentration of microcystin in the water, the toxin was present in all the organs/tissues analysed, even though in low amounts. The intestine proved to be the major accumulator of microcystin. No differences were observed between males and females, except in the case of the hepatopancreas, whose the microcystin content was higher in females. As for the size classes, the smaller crayfish had higher concentrations of microcystin compared to larger crayfish.

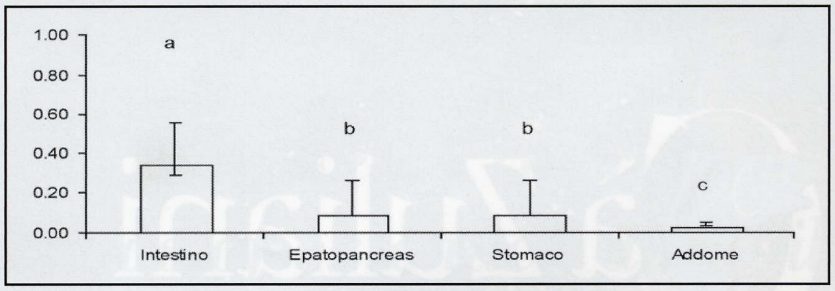

***Figura 7** – Concentrazione di microcistina nei tessuti/organi. Le lettere sopra le barre indicano la gerarchia ottenuta applicando il* Multiple Comparisons Test.

stenza di rischi significativi per la salute umana, qualora queste parti siano rimosse prima del consumo. Tuttavia, ulteriori studi risultano necessari per valutare le capacità di accumulo della tossina in seguito a fioriture pronunciate. Inoltre, permane il rischio di trasferimento e di magnificazione della tossina lungo la catena alimentare.

Elena Tricarico
Enrico Casalone
Lorenzo Fioravanti
Francesca Gherardi
Giorgio Mastromei
Dipartimento di Biologia Animale e Genetica "Leo Pardi", Università di Firenze
Giuliana Parisi[2]
Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università di Firenze

Bibliografia

Bruno M., Messineo V., Melchiorre S., Mattei D. – 2004, *Dinamica di specie algali tossiche nei laghi di Albano e Nemi*, Istituto Superiore Sanità, Rapporti ISTISAN 04/32.

Cenni M. – 1997, *Gli interventi per il risanamento del Lago di Massaciuccoli e del suo padule*, Lago di Massaciuccoli – 13 ricerche finalizzate – 2° Contributo, Ente Parco Regionale Migliarino San Rossore Massaciuccoli 13: 389-410.

Chen J., Xie P. – 2005, *Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, Palaemon modestus and Macrobrachium nipponensis, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China*, Toxicon 45: 15-625.

Gherardi F. – 2006, *Crayfish invading Europe: the case study of Procambarus clarkii*, Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, in stampa.

Gherardi F., Barbaresi S., Raddi A., Salvi G. – 1997 (a), *Distribuzione, diffusione, impatto sugli ecosistemi dulcaquicoli toscani del gambero alloctono Procambarus clarkii*, Technical Report N 1°, Regione Toscana.

Gherardi F., Barbaresi S., Raddi A., Salvi G. – 1997 (b), *Alien crayfish in Europe: The situation of Italy*, in: "The introduction of alien species in Europe – How to make the best of a bad situation?", International Workshop, Firenze.

Huner J.V. – 1988, *Procambarus in North America and elsewhere*, pp. 239-262, in D. M. Holdich & R. S. Lowery "Freshwater crayfish, Biology, management and exploitation", Timber Press.

Krishnamurthy T., Carmichael W.W., Sarver E.W. – 1986, *Toxic peptides from cyanobacteria (blue green algae). Isolation, purification and characterization of peptides from Microcystis aeruginosa and Anabaena flos-aquae*, Toxicon 24: 865-873.

Magalhaes V.F., Marinho M.M., Domingos P., Oliveira A.C., Costa F.M., Azavedo L.O., Azavedo S.M.F.O. – 2003, *Microcystins (cianobacteria hepatotoxins) bioaccumulations in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ)*, Toxicon 42: 289-295.

Magalhaes V.F., Soares M.R., Azavedo S.M.F.O. – 2001, *Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguà lagoon (Rio De Janeiro, Brazil): ecological implication and human healt risk*, Toxicon 39: 1077-1085.

Siegel S., Castellan N.J. junior. – 1988, *Nonparametric statics for the behavioral sciences*, New York: McGraw-Hill.

Simoni F., Di Paolo C., Lepri L., Del Chiaro L., Annarumma F., Ercolini P., Mancino A. – 2004, *Microcistina nelle acque e nell'ittiofauna di una zona umida della Toscana*, tratto da "Biologi Italiani", anno XXXIV-n. 2.

Vasconcelos V. M., Oliveira S., Oliva Teles F. – 2001, *Impact of a toxic and non-toxic strain of Microcystis Aeruginosa on the crayfish Procambarus clarkii*, Toxicon 39: 1461-1470.

Who – 1998, *Guidelines for drinking-water quality*. 2nd ed. Addendum to volume 2, Health Criteria and other supporting information, Geneva: World Health Organization.

Le praterie di Posidonia oceanica...

segue da pag. 94

mondo della pesca, delle imprese, della ricerca e degli enti pubblici, ma anche un modello per le altre regioni per far sì che l'Italia, una volta tanto non sia fanalino di coda nella ricerca applicata alla salvaguardia dell'ambiente. Infatti, durante il convegno di presentazione dei risultati del progetto, tenutosi a Gallipoli il 13 ottobre 2006, dalla dirigenza della Regione Puglia è emersa la volontà di proporre anche nelle opportune sedi comunitarie, sia a Bruxelles sia in Lussemburgo, questo modello come contributo al Libro Verde dell'Unione Europea sulla Politica Marittima che riguarda l'Unione stessa.

Michela Cariglia

Le foto sono state tratte dal DVD del progetto e gentilmente concesse dal COISPA – Tecnologia & Ricerca di Bari.