

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



Dottorato di Ricerca in Biologia Animale

(S.S.D. BIO-05)

XXIV Ciclo (2008-2011)

**Effetti dell'endosulfan sugli Anfibi:
uno studio morfologico e
comportamentale**

Dott.ssa Manuela LAVORATO

Coordinatore

Prof.ssa Maria Carmela CERRA

Docente Tutor

Prof.ssa Elvira BRUNELLI

Co-Tutor

Dott. Mathieu DENOËL

Dott. ssa Ilaria BERNABÒ

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

ABSTRACT	pag.	1
INTRODUZIONE	»	6
CAPITOLO I		
DECLINO DEGLI ANFIBI		
I.1. Principale cause ipotizzate	»	9
I.2. Anfibi come bioindicatori	»	12
I.3. Pesticidi e Anfibi	»	13
CAPITOLO II		
ENDOSULFAN		
II.1. Campo d'impiego e formulazione	»	17
II.2. Classificazione, status ed uso	»	17
II.3. Proprietà chimiche e fisiche	»	18
II.4. Degradazione e destino nell'ambiente	»	19
II.5. Residui e concentrazioni in natura	»	20
II.6. Bioaccumulo e biomagnificazione	»	23
II.7. Tossicità acuta	»	24
II.8. Tossicità cronica	»	24
II.9. Effetti su Invertebrati acquatici e Vertebrati	»	26
II.10. Effetti dell'endosulfan sugli Anfibi	»	28
CAPITOLO III		
SPECIE STUDIATE		
III.1. <i>Bufo bufo</i>	»	30
III.1.2. Tassonomia	»	31
III.1.3. Distribuzione	»	31
III.1.4. Habitat ed ecologia	»	31
III.1.5. Morfologia	»	33
III.1.6. Riproduzione e sviluppo	»	34

III.1.7. Larve di <i>Bufo bufo</i>	»	35
III.2. <i>Rana dalmatina</i>	»	36
III.2.1. Tassonomia	»	37
III.2.2. Distribuzione	»	37
III.2.3. Habitat ed ecologia	»	38
III.2.4. Morfologia	»	39
III.2.5. Riproduzione e sviluppo	»	39
III.2.6. Larve di <i>Rana dalmatina</i>	»	40

CAPITOLO IV

ORGANO TARGET

IV.1. Epidermide degli Anuri	»	42
IV.1.2. Epidermide larvale negli Anuri	»	43
IV.1.3. Epidermide negli adulti	»	46

CAPITOLO V

MATERIALI E METODI

V.1. Esperimenti di tossicità cronica su <i>Bufo bufo</i>	»	49
V.1.1. Larve: raccolta e mantenimento	»	49
V.1.2. Esposizione	»	50
V.1.3. Allestimento dei preparati per la microscopia e lettronica a trasmissione	»	51
V.2. Esperimenti <i>Rana dalmatina</i>	»	55
V.2.1. Larve: raccolta e mantenimento	»	55
V.2.2. Tossicità acuta: LC ₅₀	»	56
V.2.3. Tossicità cronica	»	57
V.2.4. Analisi comportamentale	»	59
V.2.5. Analisi statistica	»	64

CAPITOLO VI

RISULTATI

VI.1. Analisi ultrastrutturale dell'epidermide di <i>Bufo bufo</i> dopo esposizione cronica	»	66
VI.1.1. Esempjari di controllo	»	66
VI.1.2. Ultrastruttura dell'epidermide dopo 96 h di esposizione	»	68
VI.1.3. Ultrastruttura dell'epidermide dopo 14 giorni di esposizione	»	69
VI.1.4. Ultrastruttura dell'epidermide dopo 20 giorni di esposizione	»	70
Tavole	»	71
Legenda alle figure	»	79
VI.2. Tossicit� acute e cronica in girini di <i>Rana dalmatina</i>	»	81
VI.2.1. Tossicit� acute: LC ₅₀	»	81
VI.2.2. Tossicit� cronica	»	82
VI.2.2.1. Mortalit�	»	83
VI.2.2.2. Crescita e stadio di sviluppo	»	84
VI.2.2.3. Metamorfosi	»	87
VI.2.2.4. Deformit�	»	87
VI.2.2.5. Analisi comportamentale: attivit� di nuoto	»	88

CAPITOLO VII

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

VII.1. Ultrastruttura dell'epidermide di girini di <i>Bufo bufo</i>	»	103
VII.2.1. Tossicit� acute in <i>Rana dalmatina</i>	»	106
VII.2.2. Tossicit� cronica in <i>Rana dalmatina</i>	»	107
BIBLIOGRAFIA	»	110

*Alla mia famiglia
e a tutti coloro che
hanno sempre creduto in me...*

ABSTRACT

The declining amphibian population is a global phenomenon in conservation biology that has attracted the attention of many scientists (Russell *et al.*, 1995; Stallard, 2001; Sparling e Fellers, 2009). As for the majority of recent reductions in Earth biodiversity, the amphibian decline can also be attributed to direct human impact on the environment such as the use of pesticides and other chemical pollutants. Therefore, understanding the impacts of agrochemicals on amphibians is a challenging proposition. Amphibians are sensitive to the action of pollutants and they are considered excellent bioindicators of the environmental quality due to their biological, ecological and anatomical characteristics. For these reasons, amphibians are broadly used as typical targets in evaluating the effects of chemicals on aquatic and agricultural ecosystems (Schuyttema e Nebeker, 1996; Pollet e Bendell-Young, 2000; Venturino *et al.*, 2003; Bernabò *et al.*, 2008). Decreased species richness, reduced populations, and high deformity incidences have been reported in agroecosystems, which might be linked to the extensive use of pesticides (Berrill *et al.*, 1994, 1997; Bonin *et al.*, 1997; Knutson *et al.*, 2002; Davidson, 2004; Bridges *et al.*, 2004; Relyea, 2005). As outlined by Boone *et al.* (2005) there is a lack of data for many commonly used pesticides with regard to their effects on amphibians.

We chose endosulfan, an organochlorine globally used on a wide variety of crops and other sectors. The environmental persistence and toxicity of endosulfan forced several national authorities to ban it and to propose its inclusion as a persistent organic pollutant in the Stockholm convention (Kelly *et al.*, 2007; EPA, 2010).

Endosulfan reaches aquatic systems through direct application, as well as spray drift

and runoff from agricultural areas (Leonard *et al.*, 1999, 2000, 2001; Broomhall, 2002; Jergentz *et al.*, 2004) and levels in nature pose a risk to aquatic ecosystems. The last EPA (2010) report on endosulfan, highlights the need for further work to consider amphibians as model species. Previous studies on the effects of endosulfan on amphibians showed detrimental effects on survival, growth, development and metamorphosis, and even caused deformity, severe changes in gill morphology and behavioural alterations (Bernabò *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2009, 2010; Jones *et al.*, 2009; Shenoy *et al.*, 2009).

Therefore, we proposed to assess the effects of chronic exposure to ecologically relevant concentrations of endosulfan on two anuran species during larval development. In particular, we focused attention on the morphological endpoint evaluating the effects on *Bufo bufo* skin, to validate the hypothesis of our research group using a morphological approach in a toxicological study. Recently we demonstrated that environmentally relevant endosulfan concentrations (0.1, 0.05 and 0.01 mg/L) may affect *Bufo bufo* gills morphology and ultrastructure (Brunelli *et al.*, 2010). On this basis we proposed completing the study on endosulfan toxicity in *Bufo bufo* tadpoles evaluating the effects of the same sublethal concentrations on skin. In fact, the thin and permeable skin of amphibians directly interacts with all environmental constituents, including toxicants. Moreover there is a gap in literature on endosulfan effects on this target organ.

We also analyzed the effects of endosulfan on *Rana dalmatina* tadpoles. Firstly, we examined the short-term toxicity of endosulfan determining the LC₅₀ value and after this preliminary analysis we conducted a classical toxicological study evaluating the effects of sublethal concentrations of endosulfan (0.005, 0.01 and 0.05 mg/L) on

survival, growth, development, metamorphosis, deformities presence in *Rana dalmatina* tadpoles and, in collaboration with the University of Liege we applied new tools for evaluating behavioural patterns. For the first time we used video-tracking analyses to test the quantitative effect of endosulfan on the locomotion.

We exposed *Bufo bufo* tadpoles from Gosner stage 25 until stage 42 to a chronic static renewal system according to the experimental design and conditions of our previous studies (according to Brunelli *et al.*, 2010). and the epidermis was removed after 96 h, 14 and 20 days and analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM). Exposure to endosulfan caused a general defensive response by mucous secretion and the appearance of large secretory vesicles in *Bufo bufo* larval epidermis. The exposure to all concentrations, already after 96 h, caused an increase of intercellular spaces, alteration of the cell-cells interactions, cellular degeneration, in particular of the typical larval *bufonidae* cells (Riesenzellens). The epidermal-dermal junctions and the figures of Eberth in the basal layer, were completely lost at the end of exposure. Our results were successful in showing that environmentally relevant concentrations of endosulfan negatively affected the epidermis of *Bufo bufo* tadpoles after long-term exposure, resulting in ultrastructure modification in the treated animals compared to controls and that epidermal damage was strongly correlated with exposure time.

These results are consistent with our previous findings (Bernabò *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2010) concerning the morphological alteration pattern of the gill epithelium during long term exposure. We confirmed that the morphological approach is an useful tool in evaluating the effects of environmental contamination at sublethal levels in sensitive organisms like amphibians, and we supported the role of

amphibian skin as a good biomarker following pesticide exposure.

Rana dalmatina tadpoles were exposed to several nominal concentrations of endosulfan to assess the sensitivity of the species by estimating the LC₅₀ value at 96 h in a static exposure system. We found that the nominal 96 h LC₅₀ value was 0.074 mg/L. After this preliminary analysis, *Rana dalmatina* tadpoles were exposed to sublethal concentrations of endosulfan (0.005, 0.01, 0.05 mg/L) in a chronic static renewal system from Gosner stage 25 for the entire course of larval development.

Mortality, larval growth (mass), body length, development, time to metamorphosis and deformities presence were monitored regularly over the entire course of larval development. The behaviour (swimming activity) was recorded after 7, 14, 21 and 28 days of exposure and analyzed by a video-tracking software EhoVision 7 XT (Noldus Information Technology, The Netherlands). We analyzed behavioural traits such as: distance moved, velocity, immobility and space use.

Our results showed that long-term exposure to environmentally relevant concentrations of endosulfan impaired survival, larval growth, development, metamorphosis, swimming activity and caused severe morphological alteration in tadpoles exposed to 0.01 and 0.05 mg endosulfan/L (medium and high concentrations). With regards to the inhibition of metamorphosis in the highest concentrations, this has a profound implication in the light of amphibian decline. Instead, the lowest concentration of endosulfan (0.005 mg/L) did not cause any significant effects on growth, development and on swimming activity, although we have observed a slightly significant reduction in survival without decreasing the success of metamorphosis.

In natural environments, increased incidences of deformities, a reduced larval growth

could increase susceptibility to predation (Rohr *et al.*, 2003), delay metamorphosis or result in metamorphosis at a smaller size having negative effects on future fitness, growth and overwinter survival (Brodie and Formanowicz, 1983; Semlitsch *et al.*, 1988; Smith, 1987; Boone and Semlitsch, 2002; Altwegg and Reyer, 2003; Boone and James, 2003).

We used video-tracking analyses for the first time to test the quantitative effects of a pesticide on the behaviour of amphibians. And we observed that behavioural effects occurred from 7 days of exposure and tadpoles exposed to the medium and high concentrations of endosulfan exhibited several anomalies in swimming activity such as: shorter distance moved, slower speed, swirling, resting and different space use. Our findings are in agreement with the previous studies of our research group on endosulfan effects on *Bufo bufo* (Brunelli *et al.*, 2009) and, with the use of video-tracking analysis, we had advantages over standard visual methods. In fact we precisely quantified swimming activity anomalies. We demonstrated that quantitative ecotoxicology is thus a valuable tool to assess conservation concerns when other techniques cannot detect detrimental effects.

Our study thus confirms and extends the results of previous studies on the toxicity of this organochlorine pesticide in showing its possible role in amphibian decline.

INTRODUZIONE

Contaminazioni da inquinanti agrochimici, ed in particolar modo organoclorurati, sono state correlate con pattern spaziali di declino in numerose specie di Anfibi (Russell *et al.*, 1995; Stallard, 2001, Sparling e Fellers, 2009).

Gli Anfibi sono particolarmente sensibili all'azione dei contaminanti a causa delle loro caratteristiche biologiche ed ecologiche; possiedono, infatti, una pelle altamente permeabile, branchie ed uova che possono assorbire facilmente le sostanze chimiche, e possono essere a rischio sia nell'ambiente terrestre che in quello acquatico (Materna *et al.*, 1995). La maggior parte delle specie di Anfibi trascorre lo sviluppo embrionale e larvale negli ambienti acquatici spesso adiacenti alle zone coltivate, dove sono applicati i pesticidi, e possono essere, quindi, esposti ai contaminanti durante tali cruciali e delicate fasi. Per tali motivi sono anche considerati ottimi bioindicatori della qualità ambientale e del suo stato di salute. Inoltre, il crescente interesse della comunità scientifica per il declino delle popolazioni di Anfibi, ha messo in luce la necessità di indagare il potenziale impatto di sostanze chimiche inquinanti su questa importante classe di Vertebrati.

L'endosulfan, un organoclorurato utilizzato su una grande varietà di colture e in molti altri settori, può raggiungere i sistemi acquatici attraverso l'applicazione diretta, per dispersione o per deflusso dalle aree agricole (Leonard *et al.*, 1999, 2000, 2001; Broomhall, 2002; Jergentz *et al.*, 2004). Livelli di endosulfan al di sopra di 0.7 mg/L sono stati ritrovati in corpi d'acqua vicini alle zone agrocolturali (Ernst *et al.*, 1991) e, inoltre, data anche la sua elevata persistenza può essere altamente rischioso per gli ecosistemi acquatici. Esiste un'ampia letteratura che testimonia la tossicità

dell'endosulfan sugli organismi selvatici non-target, ed è stato dimostrato che l'insetticida è soprattutto tossico per gli organismi acquatici (Karim *et al.*, 1985; Romeo e Quijano, 2000; Leonard *et al.*, 2001; Hermann 2003; Swartz *et al.*, 2003).

Nel presente lavoro è stato, dunque, realizzato uno studio ecotossicologico per valutare gli effetti dell'endosulfan sugli Anfibi.

Un concetto base dell'ecotossicologia è che gli effetti deleteri sulla salute sono preceduti da cambiamenti subletali a livello molecolare, cellulare, fisiologico. L'analisi di tali marcatori può servire come prima indicazione della biodisponibilità dei contaminanti o del loro impatto sugli organismi, fornendo informazioni preziose sulle conseguenze di una esposizione prolungata ad un pesticida (Langston *et al.*, 2002). Pertanto sono stati valutati gli effetti di un'esposizione cronica a concentrazioni subletali di endosulfan su due specie di Anuri (*Bufo bufo* e *Rana dalmatina*) durante lo sviluppo larvale. In particolare, sono indagati gli effetti sulla morfologia dell'epidermide larvale di *Bufo bufo* per validare l'importanza dell'approccio morfologico come metodo di indagine ecotossicologica. Recentemente, infatti, il nostro gruppo di ricerca ha messo a punto l'utilizzo di tale approccio negli studi di ecotossicologia degli Anfibi (Bernabò *et al.*, 2008, 2011; Brunelli *et al.*, 2010) ed è stato dimostrato che concentrazioni subletali di endosulfan (0.1, 0.05 e 0.01 mg/L) provocano severe alterazioni morfologiche ed ultrastrutturali nell'apparato branchiale di *Bufo bufo* (Brunelli *et al.*, 2010). Partendo da questo razionale, al fine di avere un quadro completo della tossicità dell'endosulfan su tale specie, sono stati valutati gli effetti di queste stesse concentrazioni sull'epidermide larvale. L'epidermide degli Anfibi, infatti, interagisce direttamente con i costituenti ambientali ed è dunque vulnerabile nei confronti dei contaminanti. Nonostante ciò,

non esistono altri studi che considerano l'epidermide degli Anfibi come biomarker di esposizione ad endosulfan, eccetto un unico lavoro sugli effetti di un altro pesticida organoclorurato sull'epidermide di Anuri (Fenoglio *et al.*, 2009).

Nella seconda fase della nostra ricerca, sono stati eseguiti test di tossicità acuta su larve di *Rana dalmatina* al fine di accertare le concentrazioni di endosulfan che possono causare direttamente la morte del 50% degli individui (LC₅₀) e, dunque, la sensibilità di questa specie. In seguito, sono stati effettuati test cronici utilizzando concentrazioni di endosulfan rilevabili in natura (0.005, 0.01 e 0.05 mg/L) al fine di valutare la sopravvivenza, la crescita larvale, lo sviluppo, le caratteristiche alla metamorfosi e l'attività di nuoto. L'attività di nuoto, insieme ad altri pattern comportamentali, può essere considerata un ottimo indicatore di stress fisiologico, un rilevante parametro ecologico e un quantificabile biomarker utile per indagare gli effetti tossici (Semlitsch *et al.*, 1995; Rosenshield *et al.*, 1999; Scott e Sloman, 2004). In questo contesto, la ecotossicologia comportamentale è un settore emergente che può fornire strumenti validi per quantificare le risposte degli organismi esposti a contaminanti (Bromhall, 2005; Denoël *et al.*, 2010; Giusi *et al.*, 2010). Nonostante ciò, pochi studi hanno investigato gli effetti a livello comportamentale dei pesticidi negli Anfibi (Glennemeler e Denver, 2001; Rohr *et al.*, 2003, Brunelli *et al.*, 2009). In particolare, rispetto alla letteratura (Brunelli *et al.*, 2009), in collaborazione con l'Università di Liège, sono state utilizzate nuove metodiche per valutare gli effetti dell'endosulfan sull'attività di nuoto dei girini. Per la prima volta, infatti, è stato utilizzato il metodo del video-tracking per analizzare gli effetti quantitativi di una esposizione cronica ad endosulfan su diversi parametri dell'attività di nuoto quali: distanza percorsa, velocità, immobilità, e la capacità di utilizzare lo spazio.

CAPITOLO I

DECLINO DEGLI ANFIBI

La biodiversità è in declino a livello mondiale e gli Anfibi sono rappresentativi della generale perdita di popolazione e specie (Alford *et al.*, 2001; Wilson, 2002). Infatti, da decenni il declino delle popolazioni di Anfibi è divenuto un fenomeno globale di notevole importanza per la biologia della conservazione. Dal momento che i casi di declino interessavano molte aree diverse e distanti tra loro, durante il First World Herpetology Conference in Inghilterra, nel 1989, si è discusso per la prima volta dell'ipotesi di un "Global Amphibian Decline" (Barinaga, 1990; Blaustein, 1990; Pechmann *et al.*, 1991; Wake, 1991). Quasi due decenni dopo, nel 2008, il Global Amphibian Assessment ha riscontrato che quasi un terzo (32%) delle oltre 6200 specie di Anfibi note in tutto il mondo sono minacciate o estinte, tra queste 475 specie sono classificate come "critically endangered".

Le ipotesi finora formulate hanno contemplato fattori su scala locale e a livello globale. Effetti locali di origine antropica sono l'utilizzo di biocidi e pesticidi, di metalli pesanti ed agenti radioattivi, il rilascio di sostanze chimiche inquinanti nei corpi d'acqua, l'alterazione e la distruzione degli habitat, la captazione di corpi idrici per usi industriali ed agricoli, l'introduzione di competitori o predatori, il prelievo indiscriminato dalla natura per la terraristica o la medicina tradizionale. Mentre su vasta scala sono implicati i cambiamenti climatici e dell'atmosfera, comprendenti il buco dell'ozono ed il conseguente aumento delle radiazioni UV, l'effetto serra e l'innalzamento globale della temperatura e le piogge acide. Inoltre, si può supporre

che in molti casi si sia verificata un'interazione sinergica tra i vari fattori (Blaustein *et al.*, 2003).

I.1. Principale cause ipotizzate

Di seguito vengono riportate in breve le cause che gli studiosi hanno ipotizzato per spiegare il declino delle popolazioni di Anfibi.

❖ *Distruzione, alterazione e frammentazione dell'habitat*

La distruzione o modificazione dell'habitat è ritenuta una delle principali cause della perdita di biodiversità (Sala *et al.*, 2000) e della perdita sia del numero di specie di anfibi che della riduzione nella dimensione della popolazione (Alford e Richards, 1999). Infatti, la crescente globalizzazione, l'agricoltura intensiva ed i cambiamenti d'uso del suolo agricolo hanno stravolto l'assetto tradizionale di molti ambienti e territori dal punto vista ecologico e paesaggistico. Nell'ultimo secolo, inoltre è avvenuta la compromissione di molte zone umide a causa della bonifica per uso agricolo, per l'espansione urbanistica o a causa della captazione di corpi idrici per usi industriali ed agricoli. Grave fattore d'impatto si è rivelata la scomparsa, all'interno degli attuali agroecosistemi, degli ambienti umidi minori, quali pozze, stagni, acquitrini e piccole raccolte d'acqua artificiali, necessari per la sopravvivenza di molte specie di anfibi. Infine, devono essere considerati anche lo sfruttamento intensivo delle foreste e la conseguente frammentazione dell'habitat forestale, così come l'elevata frequenza di incendi soprattutto nel sud Europa (Scoccianti, 2001).

❖ *Acidificazione*

Le deposizioni acide e le attività umane hanno determinato un aumento del grado di acidità degli habitats che potrebbe essere una delle cause dei fenomeni di declino

osservati per alcune specie (Bradford *et al.*, 1992). Gli effetti dell'acidificazione sugli Anfibi riportati in letteratura comprendono elevata mortalità, diminuzione della crescita, la diminuzione del livello di attività, della capacità di alimentarsi e di sfuggire ai predatori, l'inibizione dello sviluppo delle uova e dell'attività riproduttiva, l'aumento della mortalità embrionale e larvale (Beebee *et al.*, 1989; Jung e Jagoe, 1995; Brodtkin *et al.*, 2003; Green e Peloquin, 2008).

❖ ***Radiazione ultravioletta***

La deplezione dello strato dell'ozono e il conseguente aumento delle radiazioni UV-B nell'atmosfera ha suscitato l'interesse verso una possibile relazione tra l'influenza dei raggi UV-B sulla sopravvivenza degli Anfibi e il declino delle popolazioni. Sono stati dimostrati, infatti, effetti negativi diretti su embrioni e larve di Anfibi (ritardo nella schiusa, malformazioni, morte, variazioni nel comportamento) e sugli individui metamorfosati e adulti (alterazioni retiniche e lesioni della cute) (Blaustein *et al.*, 1995, 1998; Ovaska *et al.*, 1997).

❖ ***Riscaldamento globale***

Gli Anfibi sono particolarmente sensibili ai cambiamenti ambientali avendo un'epidermide altamente permeabile e avendo un ciclo di vita bifasico: acquatico durante la fase larvale e prevalentemente terrestre nella fase adulta. Il riscaldamento globale e di conseguenza i cambiamenti nei regimi delle precipitazioni e nel grado di umidità dal suolo, rappresentano dunque, una minaccia per le specie di Anfibi. Nella riserva di Monteverde in Costa Rica, infatti, il riscaldamento globale è stato indicato quale causa di alcuni casi di declino (Pounds e Crump, 1994; Pounds *et al.*, 1999; Pounds, 2001; Pounds *et al.*, 2006).

❖ ***Invasioni di specie aliene***

Specie aliene introdotte in un habitat possono causare direttamente o indirettamente, cambiamenti nell'ecologia e nei processi biologici che regolano e caratterizzano gli ecosistemi. Per tale ragione, la diffusione di specie alloctone è stata ipotizzata quale causa di alcuni casi di declino delle popolazioni di Anfibi (Fisher e Schaffer, 1996; Knapp *et al.*, 2001).

❖ ***Patologie infettive***

Tra le cause di declino degli Anfibi è annoverata l'eziologia infettiva. Sono stati riscontrati vari casi di mortalità di massa di popolazioni di anfibi in diverse aree geografiche (Cunningham *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1998). Inoltre, l'interazione con altri fattori di stress ambientale ha contribuito in notevole misura al diffondersi di agenti patogeni abbassando la soglia di recettività degli Anfibi (Carey *et al.*, 1999; Carey, 2000).

❖ ***Sostanze chimiche inquinanti***

Gli effetti sull'ambiente di sostanze chimiche inquinanti, è considerata, come vedremo in dettaglio più avanti, una importante causa di declino delle popolazioni di Anfibi (Carey e Bryant 1995). Una grande varietà di contaminanti ha, infatti, effetti negativi su questa classe di vertebrati: pesticidi, erbicidi, fungicidi, fertilizzanti e numerosi altri (Blaunstein *et al.*, 1997; Bonin *et al.*, 1997; Sparling *et al.*, 2000; Boone e Bridge, 2003).

I.2. Anfibi come bioindicatori

Gli Anfibi sono una componente importante di molti ecosistemi e spesso costituiscono la più alta frazione di biomassa vertebrata, giocando un ruolo

importante sia come predatori che come prede all'interno delle dinamiche trofiche (Duellman e Trueb, 1986). Per tali motivi il declino delle popolazioni di Anfibi è un fenomeno che può avere implicazioni significative per l'equilibrio di molti ecosistemi.

Inoltre, gli Anfibi sono ormai riconosciuti come importanti bioindicatori dello stato di salute globale (Blaustein e Wake, 1995; Diamond, 1996) a causa delle loro caratteristiche ecologiche ed anatomiche in quanto conducono una duplice vita legata sia ad habitat terrestri che acquatici, per cui in entrambi gli ambienti possono essere esposti a fattori inquinanti, subendo l'effetto di numerose sostanze chimiche durante le delicate fasi di sviluppo larvale. Gli anfibi sono ritenuti anche particolarmente vulnerabili poichè possiedono una pelle altamente permeabile e branchie che possono facilmente assorbire sostanze chimiche dall'ambiente acquatico (Duellman e Trueb, 1986; Venturino *et al*, 2003).

I.3. Pesticidi e Anfibi

I pesticidi sono utilizzati in agricoltura per difendere le colture da parassiti, nonché da funghi e da erbe infestanti. Si tratta, infatti, di prodotti chimici usati per controllare, limitare e distruggere alcuni organismi viventi considerati nocivi. Sono composti di diverso tipo, ciascuno specifico per un determinato parassita. In base alla classe chimica i pesticidi possono rientrare nelle seguenti categorie: carbammati, organofosforati, piretroidi ed organoclorurati.

La FAO rivela che oltre 1.500 di nuovi pesticidi vengono introdotti ogni anno e, questo vasto uso implica la contaminazione di diversi comparti ambientali con relativi effetti, diretti ed indiretti, su specie non-target (fra cui l'uomo stesso) e sugli

ecosistemi. L'esposizione, diretta o indiretta, degli uomini a tali sostanze può avere effetti negativi quali disturbi particolarmente preoccupanti nei bambini, nelle persone anziane e nei lavoratori esposti spesso a tali sostanze (EPA, 2002).

Sul piano ambientale, i pesticidi possono causare la contaminazione dell'acqua, dell'aria o del suolo. Le molecole chimiche delle miscele possono disperdersi nell'aria e colpire l'organismo non-target. Inoltre, raggiungendo le falde acquifere o penetrando nel suolo possono provocare danni alle vegetazioni spontanee o agli insetti utili.

La contaminazione degli ambienti umidi e dei corpi idrici può avvenire direttamente per irrorazione del pesticida sui bacini acquiferi presenti nelle vicinanze delle zone coltivate, o indirettamente, a seguito di fenomeni di ruscellamento e dilavamento delle superfici trattate. L'intensità con cui avviene la contaminazione dipende da fattori diversi quali: tempo di persistenza e proprietà chimico-fisiche della sostanza utilizzata, forma di somministrazione, quantità e modo di impiego ma anche caratteristiche idrogeologiche dell'area e delle precipitazioni durante i periodi successivi all'applicazione (Scoccianti, 2001). I corpi idrici più piccoli e con scarsa possibilità di ricambio e di diluizione della sostanza dispersa, dovrebbero risultare più a rischio. Come già accennato, molte specie di Anfibi effettuano gran parte del loro sviluppo larvale in tali corpi d'acqua temporanei, vasche e altri microhabitat acquatici che sono frequentemente adiacenti alle zone agrocolturali sulle quali vengono applicati i pesticidi. Pertanto, il crescente interesse per il declino delle popolazioni di Anfibi, ha messo in luce la necessità di indagare il potenziale impatto di tali sostanze su questi animali. Numerosi studi di laboratorio e di campo hanno indagato gli effetti dei pesticidi sugli Anfibi confermando la grande sensibilità di

questa classe di Vertebrati (Bernabò *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2009; Relyea, *et al.*, 2001, 2004; Rohr *et al.*, 2003; Materna *et al.*, 1995). Inoltre, la maggior parte degli studi di ecotossicologia degli anfibi viene effettuata su uova e larve che rappresentano le fasi maggiormente a rischio e suscettibili all'azione di contaminanti, data la loro permanenza continua nell'ambiente acquatico.

Gli effetti determinati dall'esposizione ai pesticidi possono essere letali, subletali, diretti o indiretti. Oltre agli effetti nocivi che derivano dall'esposizione a concentrazioni elevate del pesticida, vengono valutati anche gli effetti subletali determinati da un'esposizione a concentrazioni relativamente basse, che provocano alterazioni a diversi livelli, generando gravi rischi per la sopravvivenza delle popolazioni. Gli effetti subletali includono alterazioni nella crescita, nello sviluppo e nel comportamento (Bridges, 1997, 2000). Queste anomalie nello sviluppo e nel comportamento possono alterare, di conseguenza, la sensibilità alla predazione (Bridges, 1999) e la competizione, determinando un decremento del successo riproduttivo (Bridge, 1999; Relyea e Mills, 2001; Boone e Semlitsch, 2002). I pesticidi possono causare, inoltre, un indebolimento del sistema immunitario rendendo gli Anfibi maggiormente sensibili ai parassiti, alle malattie e alle radiazioni UV (Blaustein *et al.*, 2003; Christin *et al.*, 2003; Gendron *et al.*, 2003). Alcuni composti possono invece interferire con il sistema endocrino (rientrando nei cosiddetti EDCs, endocrine disrupting chemicals) e causare danni sul normale sviluppo sessuale, portando a malformazioni sessuali o ad ermafroditismo (Hayes *et al.*, 2002b; Hayes *et al.*, 2003; Bernabò *et al.*, 2011). Infine, alcuni pesticidi possono colpire indirettamente gli Anfibi alterando le dinamiche della catena alimentare (Boone e Bridges, 2003).

CAPITOLO II

ENDOSULFAN

L'endosulfan (C₉H₆Cl₆O₃S; 6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxid) è un insetticida ed acaricida a vasto spettro, appartenente alla famiglia degli organoclorurati, utilizzato a livello mondiale su un'ampia varietà di colture.

L'endosulfan è stato introdotto sul mercato nel 1950 per sostituire altri organoclorurati fortemente inquinanti e dannosi per la salute e l'ambiente, quali il DDT e l'HCH (EFSA 2005). È stato, dunque, commercializzato in un periodo in cui la sensibilità ambientale e le conoscenze scientifiche circa il destino nell'ambiente e la tossicologia dei pesticidi era piuttosto scarsa. Oggi, nella letteratura scientifica, sono disponibili un gran numero di informazioni sull'endosulfan e su i suoi effetti sull'ambiente e sugli organismi; tra gli effetti sugli uomini si riportano disordini neuro-comportamentali, tossicità epatica e renale, alterazioni ematologiche, alterazioni del sistema immunitario e alterazioni degli organi riproduttivi (EFSA, 2005). Inoltre, negli ultimi decenni numerosi casi di avvelenamento e vari dossier hanno permesso di restringere o bandire l'uso di tale composto. Recentemente, è stata incluso tra i POPs (Persistent Organic Pollutant) a causa della sua persistenza ed elevata tossicità (Kelly *et al.* 2007; U.S.EPA, 2010). Purtroppo, nonostante le varie limitazioni, l'endosulfan è ancora largamente usato soprattutto nei Paesi in via di sviluppo.

II.1. Campo d'impiego e formulazione

L'endosulfan è utilizzato come insetticida e acaricida contro un gran numero di parassiti ed insetti. E' utilizzato su una grande varietà di vegetali e frutta: piante di agrumi, mandorlo, nocciolo, pomacee, pesco, vite, pomodoro, cucurbitacee con buccia non commestibili. E' impiegato su colture di riso, frutta, tè, caffè, cotone, cereali, soia, patata, barbabietola da zucchero, riso, cereali, mais, erba medica, trifoglio, lupinella, sul tabacco, floreali, ornamentali, forestali, pioppo e vivai, e nel controllo delle termiti e della mosca tsetse (Weber *et al.*, 2010; Broomhall, 2002).

Le formulazioni in cui è possibile trovare l'endosulfan variano dalla forma in microgranuli al liquido emulsionabile, per finire alle polveri bagnabile e secca. In commercio si può trovare sotto diversi nomi: Afidan, Beosit, Cyclodan, Devisulfan, Endocel, Endocide, Endosol, Hexasulfan, Hildan, Insectophene, Malix, Thiodan, Thimul, Thifor, e Thionex. Essendo compatibile con altri pesticidi, l'endosulfan si può trovare in miscele contenenti carbaryl, dimetoato, fosalone, malathion, metomil e paratio-metile.

II.2. Classificazione, status ed uso

L'Unione Europea e la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) classificano l'endosulfan nella categoria Ib come "Highly Hazardous".

L'endosulfan è stato definito dalla Stockholm Convention come persistent organic pollutant in quanto è persistente nell'ambiente, bioaccumulabile, può essere trasportato per lunghe distanze e causare effetti sulla salute umana e sull'ambiente (PAN, 2008). L'endosulfan è classificato come POP nella Convention on Long-range

Transboundary Air Pollution (LRTAP), ed è riconosciuto come Persistent Toxic Substance dall' United Nations Environment Programme (UNEP).

Nella Convenzione di Stoccolma del 5 Maggio 2011, i rappresentanti dei 127 paesi aderenti e riuniti a Ginevra, hanno deciso di vietare in tutto il mondo la vendita e l'uso dell'endosulfan. Per molti tipi di utilizzo, l'endosulfan verrà bandito entro un anno, ma l'uso su alcune colture verrà estromesso in 6 anni. Nel Luglio 2010, l'EPA ha firmato un Memorandum of Agreement con gli utilizzatori dell'endosulfan che comporterà la cancellazione volontaria e graduale di tutto l'uso dell'endosulfan negli Stati Uniti. Nonostante i molti divieti l'endosulfan è ancora largamente utilizzato in alcuni Paesi quali l'India, Cina, Israele, Brasile, e Sud Korea (Huang *et al.*, 2010; Enzemoyne *et al.*, 2010).

II.3. Proprietà chimiche e fisiche

Prodotto dalla reazione di Diels-Alder dell'esaclorociclopentadiene con il cis-butene1,4-diolo e seguente reazione dell'addotto con il cloruro di tionile, l'endosulfan è composto da due stereoisomeri e β -endosulfan (70% di α -endosulfan e 30% β -endosulfan) (Goebel *et al.*, 1982). L'isomero β è il composto più persistente (Weber *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010).

IUPAC	6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxid	
Chem. Abstracts	6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5,6,9,9-hexahydro-3-oxide	
Formula	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	
Massa molecolare	406.95 g/mol	
	α-endosulfan	β-endosulfan

Melting Point, °C	106 - 109	207 - 213
Solubility in water pH 5, at 25°C, mg/L	0.33	0.32
Vapour Pressure, Pa, 25 °C	1.9 E - 03	9.2 E - 05
Henry's Law constant Pa m³ mol⁻¹, at 20 °C	0.7 - 12.9	0.04 - 2.12
log K_{ow} at pH 5.1	4.63 - 4.74	4.34 - 4.79

Tab 2.1 Proprietà chimico- fisiche dell'endosulfan

II.4. Degradazione e destino nell'ambiente

L'endosulfan è rilasciato nell'ambiente principalmente a causa dell'abbondante uso come pesticida entrando a far parte di suolo, sedimenti e atmosfera (German Federal Environment Agency, 2007). La degradazione avviene per fotolisi, idrolisi, biodegradazione ed è strettamente dipendente dalle condizioni di pH, temperatura e dai microorganismi presenti nel terreno. Una volta nell'ambiente il destino dell'endosulfan è differente per i due isomeri e dipende dalle caratteristiche del mezzo in cui si deposita. Il principale prodotto di degradazione è l'endosulfan sulfato più stabile e persistente dei composti principali (WHO 1984; ATSDR, 2000).

La vita media dell'endosulfan β va dai 33 ai 376 giorni, della forma α va dai 7 ai 75 giorni. La vita media acquatica è molto più debole. Varia dalle 22 alle 27 h per la forma β e da 23 a 27 h per l'endosulfan α . I due isomeri sono semivolatili e tale caratteristica li rende sensibili alla volatilizzazione nell'atmosfera (Weber *et al.*, 2010). In generale, l'isomero β -endosulfan è molto più persistente dell' α -endosulfan; in condizioni di basso pH e anaerobiosi, la vita media di entrambi gli isomeri nel suolo può aumentare fino a 5 mesi (ATSDR 2000). L'EPA (2002) riporta: "Half-lives in acidic to neutral soils range from one to two months for α - endosulfan and from

three to nine months for β -endosulfan under aerobic condition. The estimated half-lives for the combined toxic residues (α - and β -endosulfan, endosulfan sulfate) ranged from roughly 9 months to 6 years”.

Nel suolo, i due isomeri sono metabolizzati dall'attività microbica in composti più persistenti, l'endosulfan solfato e l'endosulfan-diolo. L'endosulfan-diolo può degradarsi in endosulfan etere, endosulfan idrossietere e endosulfan lattone.

I due isomeri sono moderatamente persistenti sulla superficie delle foglie, dove si volatilizzano dopo qualche settimana (Sethunathan *et al.*, 2002). L'endosulfan solfato è il metabolita principale della degradazione dell'endosulfan nel suolo e nei sedimenti.

In acqua l'endosulfan ha una vita media da 30 a 200 giorni a seconda della quantità di ossigeno disciolto e del pH (ATSDR, 2000). Le sorgenti principali dell'endosulfan nell'acqua sono la dissoluzione nel vapore e i depositi umidi. L'isomero β e l'endosulfan solfato sono i più suscettibili alla dissoluzione per mezzo del vapore rispetto alla dissoluzione in acque di superficie durante il trasporto su lunga portata (Weber *et al.*, 2010; McConnel *et al.*, 1998). L'endosulfan può entrare a far parte dell'atmosfera dopo le applicazioni spray o per volatilizzazione dalla superficie delle acque o delle piante (Simonich e Hites 1995); entrando a far parte delle masse d'aria, può essere trasportato ad ampie distanze, in aree remote e lontane dalla sorgente di applicazione come in Artico (Gregor e Gummer 1989; Ahmad *et al.* 1995; German Federal Environment Agency 2007).

II.5. Residui e concentrazioni in natura

A causa della loro volatilità e persistenza nell'ambiente, gli organoclorurati vengono trasportati per lunghe distanze nell'atmosfera. Ad esempio, concentrazioni di

organoclorurati sono state rilevate in alcuni luoghi ad Hong Kong, dove in realtà, tali composti non venivano utilizzati (Huang *et al.*, 2010). Nel 2008 è stata rilevata la contaminazione di aria, acqua, piante e pesci nei parchi nazionali del U.S. dal National Parks Service. Molti di questi parchi sono lontani dalle aree in cui l'endosulfan è applicato (National Park service, 2008).

Dopo l'applicazione, l'endosulfan può fissarsi su particelle e persistere nel suolo e/o nei sedimenti o volatilizzarsi maggiormente quando il suolo è umido. Fino al 90% del pesticida che è stato spruzzato non raggiunge le colture e si ritrova nell'atmosfera. L'eliminazione dall'atmosfera dipende dalla reattività fotochimica dei composti e dai processi di deposizione secca e umida (Carriger *et al.* 2010 ; Schummer *et al.* 2010 ; LeNoir *et al.* 1999 ; McConnell *et al.* 1998).

L'endosulfan è uno degli insetticidi più comuni nelle acque di superficie negli Stati Uniti ed uno dei più comuni pesticidi organoclorurati nell'aria (Huang *et al.* 2010, Carriger *et al.*, 2010; Espin *et al.*, 2010 ; LeNoir *et al.*, 1999). La contaminazione degli ambienti acquatici può avvenire per scorrimento superficiale dai campi coltivati dopo l'applicazione o per deposizione dopo trasporto nell'atmosfera anche per lunghe distanze. Dati di monitoraggio effettuati in passato, hanno riportato la presenza di endosulfan in acque di laghi isolati del Nord America e in laghi montani di alta quota, sulle Alpi e sui Pirenei (UNEP, 2002). Tali dati dimostrano come, anche in zone lontane da quelle d'uso, l'endosulfan costituisca un grave pericolo di contaminazione a causa del trasporto atmosferico e della sua alta persistenza.

Secondo i criteri di valutazione della qualità delle acque dell'EPA, nella acque dolci il limite è di 0.22 µg/L (dopo esposizione acuta) e 0.0056 µg/L (dopo esposizione cronica) e di 0.034 µg/L 0.0087 µg/L rispettivamente dopo esposizione acuta e

cronica nelle acque salate (Nowell e Resek, 1994). Le guide linea che specificano i livelli accettabili per le acque dolci e salate sviluppate dall’Australian and New Zealand Environment and Conservation Council, decretano un livello di 0.01 µg/L. L’U.S. L’EPA raccomanda che i livelli di endosulfan in fiumi, laghi e corsi d’acqua non superi i 74 ppb (ATSDR, 2001).

Per il Directorate for Environmental Protection and for Chemicals of The Netherlands i limiti massimi permissibili sono riassunti in Tab. 2.2 (van de Plassche 1994).

Freshwater [µg/L]	Saltwater [µg/L]	Acquatic combined [µg/L]	Soil [mg/kg]
0.013	0.0004	0.0004	0.05
Bird [mg/kg food]	Mammal [mg/kg food]	Bird/mammal combined [mg/kg]	
8.1	0.68	0.68	

Tab. 2.2 Concentrazione massima permessa (MPC) per acque di superficie e suolo basata sugli effetti su uccelli e mammiferi

In realtà, i campionamenti di controllo hanno rilevato in natura concentrazioni eccedenti del 25% e più i limiti stabiliti (German Federal Environment Agency 2007).

“Reports of endosulfan residue in food, soil, air, water and body tissues are available from all parts of the globe” (IPEN 2004). Residui di endosulfan sono stati rilevati nell’aria, nell’acqua (di superficie, sotterranea e marina), nel suolo e nei sedimenti in India (UNEP 2002), in acqua e nei sedimenti in Ghana ed Australia (Ntow 2001; Leonard *et al.* 2001), in acque di fiume in Cina (Zhang *et al.* 2004), lagune in Spagna ed acque di superficie e sotterranee in Portogallo e Sud Africa (Cerejiera *et al.* 2003: Dalvie *et al.* 2003), in acque potabili, di superficie, sotterranee e marine in Sud

Africa (Fatoki e Awofolus 2004). In Honduras, Messico, Argentina, Giamaica, America Centrale e Caraibi, alcuni laghi, acque costiere e superficiali e ambienti umidi sono risultati contaminati (Gonzalez-Farias *et al.* 2002; Miglioranza *et al.* 2004). Alte concentrazioni di endosulfan sono state rilevate in campioni di corteccia di alberi raccolti in varie parti del mondo (Simonich e Hites 1995, 1997). Residui di endosulfan sono stati rilevati anche in campioni di cibo in diverse parti del mondo.

II.6. Bioaccumulo e biomagnificazione

Secondo l'EPA (2002) l'endosulfan può avere "a high potential to bioaccumulate in fish, and hence may affect animals higher up the food chain". I valori di BCF (measured bioconcentration factors) riportati in vari organismi acquatici variano in un ampio range (German Federal Environment Agency, 2007) da 1,400X fino a 11,000X (De la Cruz e Yarbrough, 1982; Toledo e Jonsson, 1992; Jonsson e Toledo, 1993).

Klemens e collaboratori nel 2003 hanno rilevato, all'interno di un'area protetta in Costa Rica, che l'endosulfan è il composto presente ai livelli più elevati in diverse specie di anfibi, tartarughe ed uccelli. L'endosulfan è stato riscontrato nel tessuto adiposo e nel sangue di orsi polari in Svalbard (il valore medio dell' α -endosulfan era di 3.8 ± 2.2 ng/g wet weight (min-max: 1.3-7.8 ng/kg) e 2.9 ± 0.8 ng/g per il β -endosulfan (min-max: 2.2-4.3 ng/g) (Gabrielsen *et al.*, 2004). Nonostante ciò, i dati riguardanti eventuali fenomeni di biomagnificazione sono ancora insufficienti (German Federal Environment Agency, 2007).

II.7. Tossicità acuta

Le proprietà tossicologiche dell'endosulfan sono ben documentate e numerosi sono i dati relativi ai suoi effetti acuti e cronici su animali da laboratorio e sugli uomini.

La tossicità acuta per via orale è più alta di quella per via dermica e per inalazione; la LD50 dell'endosulfan varia a seconda della via di somministrazione ma anche della specie, del veicolo e del sesso dell'animale. I valori riportati di LD50 orale variano da 18 a 160 mg/kg nel ratto, 7.36 mg/kg nel gatto e 77 mg/kg nel cane (Hoechst 1975, 1987, 1990). I valori di LD50 per via dermale, invece, nel ratto sono compresi tra 78 e 359 mg/kg (Smith, 1991). L' α -isomero è considerato più tossico del β -isomero (ATSDR, 2000).

Si conoscono numerosi casi di avvelenamento acuto da endosulfan. L'ingestione o l'introduzione per via aerea di elevate dosi di endosulfan può condurre a convulsioni e morte. Sintomi di avvelenamento includono iperattività, dispnea, apnea, perdita di coscienza, diarrea, nausea, vomito, insonnia, cianosi, tremori, perdita di equilibrio e mancanza di coordinazione ed epilessia (Sang e Petrovic 1999; ATSDR, 2000; Kutluhan *et al.*, 2003). L'endosulfan causa numerosi effetti neurotossici in uomini ed animali da laboratorio attraverso l'alterazione dei livelli di neurotrasmettitori (colpendo la sintesi, la degradazione e/o i tassi di rilascio e riassorbimento) e interferendo con i legami dei neurotrasmettitori con i loro recettori (EFSA, 2005).

II.8. Tossicità cronica

Una esposizione cronica ad endosulfan può arrecare danni al sistema endocrino, nervoso, circolatorio, riproduttivo, respiratorio, escretorio e sul feto in sviluppo (Naqvi e Vaishnavi, 1993; Paul & Balasubramaniam, 1997; Sinha *et al.*, 1997; Sang e Petrovic, 1999), e studi effettuati sia sugli animali che sull'uomo, hanno

evidenziato la possibilità di danni a carico di fegato, reni e testicoli (Vengateshwarlu *et al.*, 2000). Analisi sui topi hanno dimostrato un'over espressione nei macrofagi di i-NOS e citochine proinfiammatorie, con conseguente alterazione della risposta immunitaria (Han *et al.*, 2007). Recentemente, l'ospedale universitario San Cecilio di Granada ha portato avanti uno studio su un campione significativo di donne incinte, rilevando la presenza (insieme ad altri composti organoclorurati) di Diolo Endosulfan nella placenta; ciò lascia presumere un'elevata probabilità di insorgenza di problemi a carico dello sviluppo dei bambini nati dalle donne maggiormente esposte al pesticida (Fernandez *et al.*, 2007). Inoltre, residui dell'organoclorurato sono stati riscontrati all'interno del latte materno (Cerrillo *et al.*, 2005). Un altro studio, condotto dal California Department of Public Health del 2007, ha constatato che le donne che vivevano durante le prime otto settimane di gravidanza vicino ai campi agricoli in cui veniva utilizzato l'endosulfan o un altro pesticida organoclorurato, il dicofol, avevano maggiore possibilità di avere in seguito bambini affetti da autismo.

Esperimenti in vivo e in vitro suggeriscono un'azione mutagena, genotossica, clastogenica e di alterazione della cinetica cellulare (Yadav *et al.*, 1982; Pandey *et al.*, 1990; Chaudhuri *et al.*, 1999); dati raccolti sugli animali e quelli relativi all'uomo non hanno dato certezza sulla carcinogenicità del composto (EFSA, 2005; German Federal Environment Agency, 2007).

L'endosulfan è ritenuto anche un distruttore endocrino (Soto *et al.*, 1994); similmente al DDT è in grado, infatti, di competere con l'estradiolo per il legame con i recettori estrogenici determinando interferenze nei normali meccanismi di comunicazione cellulare e nella sintesi e nell'attività ormonale (Anderson *et al.*,

2000; Grumfeld e Jorgensen, 2004). Studi effettuati su bambini provenienti da un villaggio in Kasargod District, Kerala (India), riportano fenomeni di immaturità sessuale nei maschi dovuta ad una esposizione ad endosulfan (Saiyed *et al.*, 2003). Ciò presuppone che l'endosulfan possa provocare un ritardo nella maturità sessuale ed interferire con la sintesi degli ormoni sessuali. Inoltre, in animali da laboratorio si è osservata l'inibizione della sintesi di androgeni testicolari e danni renali e testicolari (Pandey *et al.*, 1990; Sang & Petrovic, 1999; Dalsenti *et al.*, 1999).

II.9. Effetti su Invertebrati acquatici e Vertebrati

L'endosulfan è altamente tossico per i Pesci e gli Invertebrati acquatici (Sunderam *et al.* 1992).

La LC₅₀ per diverse specie di gamberi varia da 0.04 e 17 µg/L. Il più basso valore di LC₅₀ a 96 h riportata per il crostaceo *Penaeus duorarum* è di 0.04 µg/L, per *Crangon septemspinosa* di 0.2 µg/L, mentre per altre specie di crostacei è più grande di 0.4 µg/L (Schimmel *et al.*, 1977). E' stata osservata l'inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi nel gambero tigrato nero (Sylvestre *et al.*, 2009) e sono stati osservati effetti solo a livello muscolare, ma non a livello branchiale. Tali invertebrati acquatici hanno mostrato una resistenza al pesticida minore rispetto ai pesci ed ai molluschi.

L'Endosulfan è da moderatamente ad altamente tossico per molte specie di uccelli; i valori di LD50 per via orale nell'anatra selvatica variano da 31 a 243 mg/kg, nei fagiani da 80 a 320 mg/kg (Hudson, 1984).

Nei mammiferi l'endosulfan colpisce il sistema nervoso tramite inibizione della neurotrasmissione e attivazione dei meccanismi colinergici, dopaminergici e

serotonergici. L'endosulfan provoca tossicità a livello delle gonadi e genotossicità (Kang *et al.*, 2008).

Lo scorrimento superficiale da zone agroculturali, nonostante il rispetto delle norme, ha provocato massicce morie di pesci in varie parti del mondo (EJF 2002, IPEN 2004). Nei pesci è stata osservata inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi dopo esposizione ad endosulfan, la distruzione del citocromo P450 microsomiale, alterazioni ultrastrutturali del reticolo endoplasmatico del fegato e proliferazione dei perossisomi (Rao e Ramaneswari, 2008). Numerosi effetti fisiologici, morfologici ed etologici sono riportati in letteratura a concentrazioni di endosulfan comprese tra 0.5 e 5 µg/L (Jauhar e Kulshrestha 1985; Sinha *et al.* 1991). Studi istologici hanno dimostrato effetti acuti sulle branchie con evidente infiammazione, necrosi e distacco dell'epitelio respiratorio (Zaccone *et al.* 1989; Jonsson e Toledo, 1993). Cambiamenti istopatologici nelle branchie, nel fegato e nel cervello sono stati riportati in pesci esposti in acque contaminate da endosulfan (Matthiessen e Roberts 1982). Dutta e collaboratori (2006) hanno riportato, attraverso analisi istopatologica, gravi alterazioni nella struttura dei testicoli in *Lepomis macrochirus*, dopo esposizione per due settimane a 0.1 µg/L di endosulfan. Un'esposizione a breve termine a concentrazioni subletali, in diverse specie di pesci, provoca una crescente attività di nuoto ed elevati livelli di glucosio nel sangue (Gopal *et al.* 1980; Singh & Srivastava 1981). Danni neuronali ed alterato comportamento motorio (iperattività) e di alimentazione (riduzione) sono stati ritrovati in *Thalassoma pavo* esposto a 1.3 µg/L di endosulfan (Giusi *et al.* 2005). In *Oryzias latipes* 0.01, 0.10, e 1,0 µg/L di endosulfan, dopo 24 h di esposizione alla schiusa, provocano effetti negativi sulla

crescita, sul comportamento e sulla performance riproduttiva (Gormley e Teather 2003).

II.10. Effetti dell'endosulfan sugli Anfibi

In questi ultimi anni, la tossicità dell'endosulfan sugli anfibi è stata supportata da numerosi studi che hanno dimostrato i suoi effetti negativi sulle differenti specie (Bernabò *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; Shenoy *et al.*, 2009).

La maggior parte degli studi più datati si è concentrata sulla tossicità acuta (Gopal *et al.* 1981; Vardia *et al.* 1984; Berrill *et al.* 1998). Gopal *et al.* (1981) riportano che l'endosulfan è più tossico per i girini di *Rana tigrina* esposti per 24 h che per *Clarias batrachus* e ninfee di *Enallagma* spp. Il valore della LC₅₀ dopo 96 h di esposizione ad endosulfan varia per le differenti specie; in girini di *Bufo melanostictus* risulta pari a 0.123 mg/L (Vardia *et al.*, 1984), per *Rana sylvatica*, *Rana clamitans* e *Bufo americanus* è compreso tra 0.03 - 0.4 mg/L (Berrill *et al.* , 1998), in *Bufo vulgaris* è pari a 0.73 mg/L (Enzemonye e Isioma, 2010). In *Bufo bufo* la LC₅₀ dopo 96 h è pari a 0.43 mg/L (Bernabò *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda la tossicità cronica, Rohr e collaboratori (2003a) hanno dimostrato in *Ambystoma barbouri* che un'esposizione a lungo termine a 10 e 100 µg/L di endosulfan può causare una diminuzione della sopravvivenza e della crescita delle larve, insieme a deformità degli arti, stress respiratorio ed alterazione del comportamento. In *Notophthalmus viridescens* basse dosi di endosulfan (5 ppb), alterando la morfologia delle ghiandole feromonali, interferiscono con i segnali ormonali e il successo riproduttivo (Park *et al.*, 2001; Park e Propper 2002). Effetti

genotossici sono stati riscontrati in larve di *Hyla pulchella* attraverso il test dei micronuclei (Lajmanovich *et al.*, 2005).

L'esposizione acuta e cronica a concentrazioni di endosulfan rilevabili in natura (0.001 - 0.2 mg/L) possono avere effetti negativi sulla sopravvivenza, la crescita, lo sviluppo, la metamorfosi, nonché causare gravi alterazioni morfologiche e comportamentali (Rohr *et al.*, 2003; Bernabò *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2009; 2010; Jones *et al.*, 2009; Sparling e Fellers; 2009).

Da un punto di vista morfo-funzionale è stato osservato che l'esposizione a breve e lungo termine ad endosulfan può indurre l'espressione dell'iNOS, l'isoforma della ossido nitrico ossidasi, e provocare severe alterazioni dell'apparato branchiale (Bernabò *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2010).

Inoltre, l'endosulfan può causare nei girini anche severe deformità quali: disfasia encefalica, edemi, malformazioni scheletriche, alterazioni della coda e depigmentazione (Berril *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 2000; Rohr *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2009). Gli studi che hanno analizzato gli effetti sul comportamento, hanno evidenziato che l'esposizione sia acuta che cronica ad endosulfan causa l'insorgenza di convulsioni, iperattività, immobilità e di conseguenza una minore attività trofica ed antipredatoria (Berril *et al.*, 1998; Sparling *et al.*, 2001; Broomhall e Shine, 2003; Brunelli *et al.*, 2009).

CAPITOLO III

SPECIE STUDIATE

Nel presente studio sono stati analizzati gli effetti dell'endosulfan su due specie di Anfibi, l'una appartenente alla famiglia *Bufo* e l'altra a quella dei *Rana*.

III.1. *Bufo bufo*: Rospo comune (Linnaeus, 1758)

Inquadramento sistematico	
Phylum	<i>Chordata</i>
Subphylum	<i>Vertebrata</i>
Classe	<i>Anphibia</i>
Ordine	<i>Anura</i>
Famiglia	<i>Bufo</i>
Genere	<i>Bufo</i>
Specie	<i>Bufo bufo</i>

Il rospo comune, tra le specie di anfibi più diffuse in Italia, è una specie opportunistica capace di colonizzare qualsiasi tipo d'ambiente, anche ad elevato impatto antropico. Negli ultimi decenni il numero di popolazioni si è ridotto in maniera significativa parallelamente al declino generale delle altre specie di anfibi e *Bufo bufo* è incluso nella red list dall' IUCN (2006) come least concern (LC). Tra i fattori responsabili di tale declino vi sono: l'elevato traffico automobilistico che provoca vere e proprie stragi durante le migrazioni riproduttive (Ferri, 2000); il rapporto sessi fortemente sbilanciato a favore dei maschi (da 5:1 sino a 20:1) che causa le ridotte dimensioni effettive di molte popolazioni (Castellano e Giacoma, 1990). Una forte diminuzione

delle popolazioni è stata osservata in Europa come risultato delle intense pratiche agricole e della perdita o alterazione dei siti di riproduzione (Pavignano e Giacoma, 1990; Carrier e Beebee, 2003).

III.1.2. Tassonomia

La specie è distinta in un certo numero di razze geografiche di dubbio valore sistematico. In Italia di solito sono riconosciute due sotto specie: *Bufo bufo bufo* (Linnaeus, 1758) presente in Europa continentale e *Bufo bufo spinosus* (Daudin, 1802) diffusa in tutta la regione mediterranea, inclusa l'area maghrebina

III.1.3. Distribuzione

Bufo bufo è una specie geonemica euro centrasiatrica-maghrebina diffusa in quasi tutta l'Europa (escludendo l'Irlanda e molte delle isole mediterranee), nel Nord dell'Eurasia, con popolazioni nell'Ovest dell'Asia e Nord Africa (Morocco, Algeria e Tunisia). In Europa, è presente nella maggior parte delle aree (includendo il Regno Unito, la Norvegia, Svezia e Finlandia). La specie si trova in un range di altitudine di 3000 m sopra il livello del mare. In Italia è presente un po' ovunque, ad eccezione della Sardegna e di alcune isole minori.

III.1.4. Habitat ed ecologia

È una specie diffusa su un'ampia fascia altitudinale, dal livello del mare fino ad altitudini medio-alte come 2200m (Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia 2006); in Calabria lo si può infatti trovare sia alla Foce della Fiumara Saraceno, a 2m sopra il livello del mare, che nella Macchialonga e nella Sila Grande ad altitudini di 1550m.

Si può, pertanto, considerare *Bufo bufo* una specie euriterma pur mostrante le preferenze per le quote basse e medio-alte (Tripepi *et al.*, 1999).

Bufo bufo è una specie opportunistica caratterizzata da un'elevata capacità di adattamento anche ad ambienti a forte impatto antropico; si adatta infatti a molteplici habitat, dai boschi di conifere, alle campagne, ai prati, ma lo si può incontrare anche in ambienti privi di acqua quali, ad esempio, zone aride incolte e boschi di macchia mediterranea nonché in città. Ad eccezione del breve periodo riproduttivo, il rospo comune conduce vita esclusivamente terrestre e si può ritrovare anche a due-quattro chilometri dal più vicino sito riproduttivo. Nel periodo riproduttivo, si trova in qualsiasi luogo umido (purché la temperatura dell'acqua sia tra gli 8°C e i 27°C); utilizza laghi, fiumi, stagni, pozze, acquitrini, vasche in cemento nonché torbiere e risaie. Predilige acque lentiche ma lo si può trovare anche in acque lotiche a corrente non troppo rapida. È attivo soprattutto nelle ore crepuscolari e notturne, e particolarmente con tempo piovoso o comunque molto umido; durante il giorno rimane nascosto in vari tipi di rifugi. Il suo range di temperatura va dai 10°C ai 20°C. Durante la stagione avversa, inverno o estate, *Bufo bufo* tende a cadere in uno stato di torpore che può durare da qualche mese ad alcune settimane, a seconda dell'altitudine. A tale scopo il rospo comune utilizza cavità naturali di vario tipo all'interno delle quali può compiere movimenti verticali a seconda dei gradienti termici che si instaurano; vengono utilizzate tane di micromammiferi, ceppaie marcescenti e tutto ciò che lo protegge dal rigore invernale e fa conservare un certo grado di umidità, come grotte, accumuli di detriti, ruderi (Scillitani *et al.*, 1996).

Gli adulti sono prevalentemente carnivori e si nutrono solo sulla terra ferma. Durante l'ibernazione, l'estivazione e la fregola digiunano. La loro dieta è composta da

vermi, molluschi, e soprattutto insetti. La cattura della preda avviene proiettando fulmineamente la lingua vischiosa in fuori e, se questa è di grossa taglia, viene ingoiata con l'aiuto degli arti anteriori (Tripepi *et al.*, 1999).

III.1.5. Morfologia

Dal punto di vista morfologico, *Bufo bufo* è tra i bufonidi europei quello di maggiori dimensioni. Il corpo è tozzo e la pelle verrucosa con una colorazione dorsale che può andare dal bruno giallastro o rossastro al grigio-olivastro, con macchie e venature scure, ed una colorazione ventrale bianco-grigiastra specie in corrispondenza delle cosce. Le parti inferiori possono presentare sia pigmentazione uniforme che variegata di marrone e nero. Gli occhi presentano pupilla orizzontale ellittica e iride rosso o rame variamente screziato di nero con pigmentazioni dorate o rossastre nel maschio. Le ghiandole parotidi risultano sviluppate ed è invece assente il sacco vocale. Per quanto riguarda il dimorfismo sessuale, le femmine mostrano maggiori dimensioni, spesso superiori ai 10 cm di lunghezza (in Italia centrale possono raggiungere i 15 cm e pesare più di 300 grammi), capo tanto largo quanto lungo, ghiandole parotidi più massicce, zampe anteriori poco robuste, ventre abbastanza arrotondato, turgido e resistente al tatto se rigonfio di uova, e presentano le prime 3 dita delle zampe anteriori sottili e senza callosità. Solitamente esse si recano all'acqua successivamente ai maschi e non tutte le femmine mature della popolazione sono riproduttive; per questo motivo solitamente i maschi sono molto più abbondanti. In ultimo, le femmine non vocalizzano. I maschi presentano invece dimensioni inferiori, di solito intorno ai 7-8 cm di lunghezza, e capo stretto e più lungo che largo. Le zampe anteriori sono piuttosto robuste all'avambraccio e sulle prime tre dita sono

presenti escrescenze cornee nerastre (che scompaiono al termine del periodo riproduttivo) mentre quelle posteriori sono più palmate. La pelle appare meno verrucosa. I maschi emettono sordi e chiocchianti vocalizzi, di solito in acqua, e attendono le femmine nei pressi del sito riproduttivo o le ricercano attivamente.

III.1.6. Riproduzione e sviluppo

Gli adulti di *Bufo bufo* iniziano ad abbandonare i propri rifugi in autunno, ma la loro migrazione definitiva si determina nel periodo appena antecedente la fregola che ha luogo tra febbraio e giugno con maggiore concentrazione nei mesi di marzo e aprile (in base alla latitudine e all'altitudine); l'attività del rospo comune è soprattutto notturna e legata al tempo umido (Sindaco *et al.*, 2006). I maschi attraggono le femmine emettendo dei suoni di richiamo e i luoghi in cui avviene l'accoppiamento sono rappresentati, generalmente, da stagni perenni con una profondità di circa 40 cm, ma che può arrivare anche fino ai 70 cm. Il luogo di riproduzione è rappresentato spesso dallo stagno nativo che il maschio raggiunge compiendo delle vere e proprie migrazioni e coprendo lunghe distanze. L'accoppiamento di questi anuri è di tipo ascellare; dal momento dell'accoppiamento a quello della deposizione possono passare diversi giorni durante i quali la competizione maschile si accentua, mentre la durata della deposizione può essere anche di varie ore. La femmina depone ovature sottoforma di 2 lunghi cordoni gelatinosi che aderiscono alla vegetazione acquatica in acque ferme o debolmente correnti. Il maschio aiuta la fuoriuscita del cordone con le zampe posteriori mentre la femmina si sposta spesso fermando alcuni tratti dell'ovatura alle piante acquatiche. Ciascuna ovatura contiene da 4000 a 6000 uova nere con diametro di 1.5-2 mm; se la temperatura è favorevole le uova si schiudono

dopo 2-3 settimane, e l'embrione rimane attaccato alla vegetazione tramite l'utilizzo di organi adesivi. Lo sviluppo larvale dura dai 2 ai 3 mesi e i girini misurano circa 7 mm quando iniziano la metamorfosi. Trascorsi tre mesi, essi lasciano l'acqua per intraprendere la vita sulla terraferma, sottoforma di minuscoli rospi di appena 2 cm di lunghezza. I maschi raggiungono la maturità sessuale intorno ai 3-4 anni mentre le femmine necessitano di 4-5 anni (Sindaco *et al.*, 2006).

III.1.7. Larve di Bufo bufo

Le larve degli Anfibi rappresentano gli stadi di sviluppo post-embrionali non riproduttivi, conducono vita acquatica, respirano attraverso branchie esterne e interne, e vanno incontro a processi metamorfici che le portano alla fase adulta. Fra i tre ordini di Anfibi, le larve degli anuri si discostano molto dagli stadi post-metamorfici dal punto di vista morfologico, fisiologico e trofico. Le larve di *Bufo bufo* si trovano generalmente nei torrenti, negli stagni, ed in raccolte d'acqua temporanee quali pozze o fossati; al contrario degli adulti hanno un regime alimentare fitofago-onnivoro. Questo tipo di alimentazione richiede la presenza di parti buccali specializzate e di un apparato digerente estremamente differenti rispetto a quelli che caratterizzano l'adulto. L'apparato boccale è munito di due file di sottili dentelli sul labbro superiore e tre su quello inferiore, i cheratodonti, derivati dall'ispessimento dell'epidermide, e di una ventosa che permette ai girini di aderire al substrato anche in presenza di correnti d'acqua.

Dopo la schiusa, i girini hanno un aspetto pisciforme con un corpo che rappresenta il 25/35% della lunghezza totale, con coda lunga, non molto alta ed arrotondata all'estremità. Con il procedere dell'accrescimento, gli arti si sviluppano diventando

funzionali solo verso il completamento della metamorfosi. Le parti superiori del corpo hanno una colorazione bruno-nerastra o nera mentre le parti inferiori presentano una colorazione tra il grigio e il nero (Tripepi *et al.*, 1999). Gli occhi del girino, privi di palpebra, sporgono lievemente, e le narici sono piuttosto ampie. Nella fase iniziale di sviluppo le larve di *Bufo bufo*, come le larve di tutti gli Anuri, possiedono branchie esterne anteriormente alle quali si trova una piega cutanea. Le branchie vengono poi incluse nella camera opercolare che si apre all'esterno attraverso lo spiracolo a forma di imbuto posto sul lato sinistro.

III.2. *Rana dalmatina*: Rana agile (Bonaparte, 1838)

Inquadramento sistematico	
Phylum	<i>Chordata</i>
Subphylum	<i>Vertebrata</i>
Classe	<i>Anphibia</i>
Ordine	<i>Anura</i>
Famiglia	<i>Ranidae</i>
Genere	<i>Rana</i>
Specie	<i>Rana dalmatina</i>

La rana agile è comune in Italia, ma sembra essere in costante declino nella maggior parte del paese e in tutto l'areale nonostante *R. dalmatina* sia inclusa nella red list dall'IUCN (2004) come least concern (LC).

Tra le cause di minaccia della specie sono riportate: la compromissione degli ambienti idonei, con la scomparsa delle zone umide e la frammentazione degli ambienti boschivi, le massicce introduzioni di ittiofana alloctona e la distruzione ed il

degrado dei siti di riproduzione (Razzetti *et al.*, 2000; Lanza *et al.*, 2006; Sindaco *et al.*, 2006). La diffusione, dunque, di una attività agricoltura intensiva che si accompagna spesso ad un impiego indiscriminato di pesticidi e diserbanti è una minaccia per questa specie. L'utilizzo, infatti, di ingenti quantità di concimi chimici, che non trattenuti nel suolo, raggiungono canali, fossati, piccoli invasi, sono la causa principale della spinta eutrofizzazione di questi ambienti acquatici che divengono inospitali per le larve della rana agile.

III.2.1. Tassonomia

Specie monotipica, *R. dalmatina* è una delle quattro specie di rane rosse presenti sul territorio italiano (le altre tre specie sono *R. temporaria*, *R. italica* e *R. latastei*). Si distingue da *R. temporaria* soprattutto per le minori dimensioni corporee, per l'aspetto più slanciato e per gli arti posteriori proporzionalmente più lunghi (l'articolazione tibio-tarsica supera la punta del muso quando l'arto è allungato in avanti lungo il fianco). Di aspetto più simile a *R. latastei*, si distingue da questa per la gola normalmente bianca a bianco-grigiastro, per il timpano più grosso e per la regione femorale spesso giallastra.

III.2.2. Distribuzione

L'area di distribuzione di *R. dalmatina* si estende dall'Europa occidentale, centrale e meridionale fino alla Turchia. I limiti di distribuzione sono rappresentati a occidente dalla Francia e dalla Spagna nord orientale (una popolazione isolata nella provincia basca di Vitoria), a settentrione dalla Danimarca, Svezia meridionale e Germania, a meridione dall'Italia peninsulare e dal Peloponneso, ad oriente dalla Penisola

Balcanica sino alla Tracia turca e all'Anatolia nord-occidentale e dall'Ucraina occidentale (Grossenbacher, 1997; Kuzmin, 1999; Sindaco *et al.*, 2006)

Nell'Italia peninsulare è praticamente ubiquitaria. Frequenta coltivi, prati, radure dei boschi di latifoglie, dal livello del mare sino a circa 1600 m di quota (Appennino Tosco-Emiliano, Parco d'Abruzzo). Nell'Italia settentrionale non si spinge al di sopra dei 600 m di quota, dove viene generalmente sostituita da *R. temporaria*, anche se sono noti alcuni siti riproduttivi a quote superiori ai 1000 m (Barbieri e Tiso, 1990).

III.2.3. Habitat ed ecologia

La rana agile è una specie tipicamente terragnola e la si rinviene in prati, incolti, radure e boschi di latifoglie e trascorre gran parte dell'anno fuori dall'acqua è infatti la rana europea dai costumi più spiccatamente terrestri. E' una specie ad ampia valenza ecologica, molto resistente all'aridità e può allontanarsi anche molto dall'ambiente acquatico anche in periodi molto secchi (Sindaco *et al.*, 2006). Ambienti d'acqua lenticia o debolmente corrente, come pozze temporanee, invasi, stagni e acquitrini costituiscono l'habitat della specie.

Di attività crepuscolare e, soprattutto, notturna, riempie le sere d'estate con il suo canto monotono e veloce. Agilissima saltatrice, copre distanze considerevoli con pochi balzi e, se inseguita, cerca scampo tuffandosi in acqua, dove si rivela un'ottima nuotatrice. La sua alimentazione è costituita da invertebrati appartenenti a vari gruppi di Artropodi: ragni, insetti e vermi che cattura per mezzo della lingua vischiosa. La rana agile, come la rana verde, ha moltissimi nemici naturali, tra cui è d'obbligo menzionare donnole, aironi, bisce d'acqua e lucci. Di solito condivide gli stessi ambienti vitali e riproduttivi di *Rana italica*, *Bufo bufo*, *Salamandra salamandra* e le

varie specie di *Triturus*. I siti riproduttivi sono costituiti da acque lentiche ubicate in ambienti planiziali, quali pozze temporanee, stagni, piccoli invasi e canali con vegetazione acquatica.

III.2.4. Morfologia

La Rana agile è un anuro di medie dimensioni che fa parte del gruppo delle cosiddette “Rane rosse”.

L’adulto presenta un muso appuntito, quasi triangolare ed il timpano risulta grande e ben visibile, posto molto a ridosso dell’occhio, ed inglobato in una macchia brunastra, molto scura che partendo dall’occhio si conclude all’altezza delle zampe posteriori, sul collo dell’animale. La colorazione varia dal bruno scuro al rosa carne, ma può risultare anche grigia o bruno-rossastra, con o senza macchie nere. Le parti ventrali sono bianche o giallastre e possono presentare macchiette scure; la regione inguinale e quella femorale sono spesso gialle. Le zampe sono caratterizzate da una bandatura brunastra. La lunghezza massima è di 9 cm nella femmina e 8 nel maschio. Il maschio ha arti anteriori più robusti, corpo più corto, palmatura dei piedi più estesa e, durante la fase riproduttiva, i tipici calli riproduttivi in corrispondenza del primo dito (Tripepi *et al.*, 1999).

III.2.5. Riproduzione e sviluppo

L’attività riproduttiva di *R. dalmatina* è precoce rispetto ad altri ranidi e ha luogo in febbraio-marzo, con temperature dell’acqua anche di 2-4°C (Vercesi *et al.*, 2000). Nelle stazioni montane il periodo degli accoppiamenti ha inizio più tardivamente ed è concentrato in un intervallo temporale più breve rispetto alle stazioni di bassa quota

(Fasola *et al.*, 2000; Sindaco *et al.*, 2006) I maschi, raggiunto il sito riproduttivo, caratterizzato da acque pressoché ferme e ricche di vegetazione, difendono il proprio territorio emettendo i loro flebili richiami, spesso sott'acqua, in attesa dell'arrivo delle femmine, le quali arrivano dopo poco con il ventre rigonfio di uova. L'amplesso dura diverse ore, alla fine delle quali la femmina sceglie un luogo sicuro per la deposizione che avviene prevalentemente di notte; ogni femmina depone da 600 a 2000 uova in masse sferiche. Gli ammassi vengono in un primo momento depositi attorno a rami sommersi, in un secondo tempo, gonfiandosi per assorbimento di acqua, tendono a galleggiare e possono ricoprirsi spesso di alghe verdi. Una volta deposte le uova, la femmina lascia presto la pozza tornando alla vita terricola, mentre i maschi rimangono spesso per più deposizioni (Sindaco *et al.*, 2006). In relazione alle condizioni ambientali, la schiusa avviene dopo 20-30 giorni e i girini completano la metamorfosi entro 2-3 mesi dalla deposizione.

III.2.6. Larve di Rana dalmatina

I girini di *Rana dalmatina* hanno colorazione da bruno chiaro a rossastra. Il ventre è macchiettato di colori ramati in un reticolo grigio, sono presenti macchie scure sul dorso. Le larve di questa specie possiedono delle espansioni caudali piuttosto accentuate e possono raggiungere la lunghezza (capo-apice coda) di circa 5-6 cm, di solito 4-5 cm. Lo spiracolo risulta più vicino all'estremità posteriore del corpo rispetto a quella anteriore; la coda è 2 volte più lunga del corpo, attenuata nella porzione distale e ad apice acutamente appuntito o submucronato. La cresta dorsale si estende sul dorso sino a livello dello spiracolo, presenta un profilo convesso ed è più alta di quella inferiore. Il colore delle creste

caudali va dal bianco al grigio con punteggiature bianche e bruno-grigiastre (Lanza, 1983).

La metamorfosi avviene di solito nei primi mesi estivi, ma può protrarsi fino a fine agosto in condizioni di estati fresche. I neometamorfosati sono lunghi circa 15-20 mm al momento dell'uscita dall'acqua e una volta riassorbita la coda cominciano subito a nutrirsi di piccoli Invertebrati come Efemenotteri, Ortotteri, piccoli Ragni e così via. Essi si mantengono per i primi mesi di vita presso lo stagno di origine o comunque in zone di piccole dimensioni ed umide. La maturità sessuale viene raggiunta in 2/3 anni e la longevità è di 5/6.

CAPITOLO IV

ORGANO TARGET

IV.1. Epidermide degli Anuri

La pelle degli Anfibi costituisce una superficie limite tra l'organismo e l'ambiente, consente all'individuo un certo grado di adattamento ai diversi habitat svolgendo, nel contempo, il compito di proteggere l'organismo da lesioni meccaniche ma anche da infezioni provocate dagli agenti patogeni e dal contatto con agenti fisici o chimici potenzialmente nocivi. Oltre ad assumere una funzione protettiva, l'epidermide ha inoltre, un ruolo importante nella respirazione, nel trasporto di acqua e ioni (Hylliard, 1999; Hylliard *et al.*, 1999; Takada e Hara, 1988.) e nella ricezione di stimoli provenienti dal mondo esterno essendo sede di numerose terminazioni nervose sensitive; non è, invece, particolarmente efficiente come barriera che limita la perdita di acqua per evaporazione ed è per questo che gli Anfibi richiedono un ambiente umido o acquatico dove vivere e riprodursi.

L'epidermide ricopre anche varie funzioni legate all'ecologia e allo sviluppo degli Anfibi (Heatwole e Barthalmys, 1994); le ghiandole presenti nella pelle assumono importanza nel riconoscimento del sesso, nel corteggiamento e in altri aspetti riguardanti la comunicazione chimica. Esse inoltre, producono e rilasciano sostanze tossiche per proteggere gli anfibi dai loro predatori (Barthalmus, 1994; Erspamer, 1994; Clarke, 1997). Anche il colore della pelle assume un'importante funzione nella comunicazione, nella regolazione della temperatura, nella protezione dai predatori.

L'apparato tegumentario degli Anfibi è una struttura complessa, dinamica ed altamente organizzata e la varietà di funzioni svolte dall'epidermide degli Anfibi, si riflette nelle sue complesse strutture cellulari ed extracellulari; alcune di esse sono presenti solo per un breve periodo di tempo, durante l'ontogenesi, altre si ritrovano per tutta la durata del ciclo vitale dell'animale (Harold, 1994). La sua struttura e sua funzione sono dunque necessarie per comprendere l'ecologia e il comportamento di questi animali.

L'epidermide si sviluppa dall'ectoderma dell'embrione e giace su una lamina basale costituita da sottili fibrille e sovrasta un derma di tessuto connettivo fibroso. Il derma sottostante ha origine da cellule mesenchimali, molte delle quali derivano dal dermatomo mesodermico dei somiti e dalle cellule della cresta neurale. Le cellule pigmentate e le ghiandole derivano dall'ectoderma e migrano nel derma durante lo sviluppo (Lindemann e Voulte 1976, Whithear 1977; Duellman e Trueb 1986; Fox 1986 a,b,c,1994).

L'epidermide degli Anfibi allo stadio larvale è ancora paragonabile, per alcuni aspetti, a quella degli Ittiopsidi, ma alla metamorfosi si modifica radicalmente acquistando le caratteristiche proprie della pelle di un Vertebrato a vita aerea.

IV.1.2. Epidermide larvale negli Anuri

Nella larva degli Anfibi, l'epidermide è costituita da 2-3 strati di cellule che poggiano su una membrana basale di tessuto connettivo. Con il progredire dello sviluppo il numero di strati cellulari aumenta fino a 5-6 durante la metamorfosi grazie alla divisione delle cellule dello strato germinativo (Fox, 1977).

Negli stadi larvali precoci le cellule superficiali sono munite di ciglia (Landstorm, 1977) che servono per il movimento cellulare di numerose gocce lipidiche che successivamente scompaiono.

L'epidermide larvale è costituita prevalentemente da due strati cellulari, lo strato più esterno è costituito da cellule apicali, anche dette pavimentose, lo strato più interno, è costituito dalle cellule basali che poggiano su una lamina di tessuto connettivo. In superficie le cellule e i loro nuclei risultano appiattiti, la membrana apicale è sollevata a costituire un complesso di microcreste. Materiale mucoso è contenuto in granuli presenti nelle cellule pavimentose che viene riversato all'esterno con funzione protettiva (Fox, 1974). Le cellule epidermiche più esterne sono connesse tra loro mediante giunzioni strette e/o intermedie.

Lo strato più interno è costituito da cellule basali di forma cuboidale o irregolare con citoplasma contenente un esteso reticolo endoplasmatico rugoso, ribosomi, mitocondri e un prominente complesso di Golgi associato a piccole vescicole lisce (Fox, 1974). Sono connesse tra loro mediante desmosomi. Le cellule basali sono presenti nella fase premetamorfica come precursori delle cellule germinative dell'adulto (Fox 1986; Robinson e Heintzleman 1987; Izutsu *et al.*, 1993).

Il margine inferiore delle cellule basali, a diretto contatto con la lamina basale di tessuto connettivo, sviluppa emidesmosomi (dispositivo giunzionale della cellula basale nei confronti del connettivo) da cui protendono i tonofilamenti (Weiss e Ferris, 1954).

Il ruolo di protezione meccanica è svolto dalla trama di filamenti di cheratina α ; durante lo sviluppo il numero di tonofilamenti aumenta e, nelle cellule basali, essi formano fasci spessi organizzati in "cappi" definiti figure di Eberth (Chapman e

Dawson 1961; Singer e Salpeter, 1961; Fox H., 1985) che negli Anuri raggiungono grandi dimensioni nella prometamorfosi. Le figure di Eberth, infatti, in *Bufo* differenziano e raggiungono la maggiore dimensione durante la prometamorfosi scomparendo poi durante il climax. Lo sviluppo dei tonofilamenti è in buona parte influenzato dagli ormoni tiroidei. Tali strutture, sembrano avere un ruolo di protezione nei confronti del tessuto sottostante e agire come stabilizzatore del movimento corporeo durante l'attività di nuoto oltre ad essere considerati come riserva di citocheratina durante la divisione cellulare

Nella parte apicale dell'epidermide larvale degli Anuri si trovano anche cellule specializzate le mitochondria rich-cells (MRC), cellule ricche di mitocondri, che hanno un ruolo fondamentale nella regolazione dell'equilibrio acido-base. Si distinguono due tipi: tipo I che contiene un grande nucleo, numerosi mitocondri intervallati da piccoli ammassi di vescicole; il tipo II presenta un citoplasma abbastanza elettrodenso e oltre ai mitocondri, contiene un sistema membranoso elaborato; la superficie apicale presenta ciuffi di microvilli. Entrambe le tipologie presentano un enzima, l'anidrasi carbonica (Lewinson, 1982).

Le cellule di Leydig sono cellule tipicamente larvali di cui è dubbia la presenza nelle larve di anuri adibite all'elaborazione di secreti; sono cellule abbastanza grandi, con forma rotonda presenti soprattutto a livello dell'epidermide del corpo, della coda e degli arti. Ciò nonostante nell'epidermide di *Bufo* allo stadio larvale sono state individuate delle "cellule giganti" (Pfeiffer, 1974) che mostrano similarità con le cellule di Leydig. Queste ghiandole unicellulari sono anche chiamate Riesenzellens e sono cellule presenti esclusivamente nell'epidermide larvale dei membri della famiglia *Bufo*nidae, caratterizzate da un voluminoso citoplasma lucente e granulare.

Sembra che tali cellule secernano sostanze di allarme dal citoplasma in situazioni di pericolo (Pfeiffer,1974; Kulzer, 1954). Alcuni studi suggeriscono che tali sostanze vengano secrete quando si ha danno epidermico (Pfeiffer,1974; Kulzer, 1954).

Altre cellule che si ritrovano nell'epidermide sono le cellule di Merkel presenti in tre ordini di Anfibi, sia allo stadio adulto che larvale e che dapprima venivano considerate meccanorecettori (Fox e Whitear, 1978). Tali cellule vennero osservate da Gottschaldt e VahleHinz i quali confermarono che le cellule di Merkel sono componenti dei meccanorecettori, essendo associate a fibre nervose.

IV.1.3. Epidermide negli adulti

Durante lo sviluppo larvale ed in particolare durante la metamorfosi, si verificano molteplici cambiamenti nella struttura dell'epidermide: specifiche componenti cellulari si differenziano, altre spariscono in quanto hanno specifiche funzioni per un breve periodo di tempo. Al completamento della metamorfosi, l'epidermide include la maggior parte delle componenti cellulari dell'epidermide e del derma.

Durante il processo di metamorfosi il numero degli strati epidermici aumenta e si forma uno strato superficiale cheratinizzato. La corneificazione è un processo di differenziazione terminale, detto citomorfosi cornea, e consiste in una serie di modificazioni morfo-funzionali della cellula che si trasforma in una sottile squama cornea, il cui citoplasma è costituito da una particolare classe di proteine, le cheratine, che ne garantiscono le caratteristiche meccaniche di resistenza; i cheratinociti differenziati, chiamati corneociti, si stratificano e conservano la proprietà di produrre muco.

Nell'adulto l'epidermide è tipicamente costituita da differenti strati in base alle caratteristiche morfologiche che i cheratinociti assumono durante il processo di differenziazione (Brown, 1981): strato basale; strato spinoso; strato granuloso e strato corneo.

Lo strato basale è lo strato più profondo dell'epidermide ed è composto da cellule colonnari che si connettono alle cellule adiacenti mediante i desmosomi. Queste cellule contengono pochi mitocondri, reticolo endoplasmatico rugoso ed un apparato del Golgi poco sviluppato.

Le cellule dello strato spinoso sono poliedriche, presentano reticolo endoplasmatico rugoso ed apparato del Golgi ben sviluppati e numerosi tonofilamenti, spesso raggruppati in fasci.

Lo strato granuloso include cellule per la maggior parte già appiattite con piccoli granuli localizzati sulla superficie cellulare.

Nello strato corneo le cellule sono ridotte a lamine e presentano un nucleo picnotico e scarsi organuli citoplasmatici. Negli Anfibi lo strato corneo è sottile, raramente più spesso di pochi strati di cellule; in questo modo la respirazione cutanea è ancora possibile e, contemporaneamente, è garantita la protezione contro l'essiccamento e le abrasioni con cui hanno a che fare tutti i vertebrati terrestri (Liem *et al.*, 2002).

Le MRCs scompaiono mentre aumenta il numero del corrispondente fenotipo adulto, le Flask cells; scompaiono le ghiandole unicellulari che vengono sostituite dalle ghiandole pluricellulari alveolari che si accrescono nello strato germinativo e si approfondano nel derma sottostante. Si tratta di ghiandole mucose (adempiono alla funzione di protezione) e ghiandole granulose (secernano sostanze tossiche) (Liem *et al.*, 2002).

Anche nello stadio adulto sono presenti le cellule di Merkel che sono in contatto con terminazioni nervose e possono generare un segnale elettrico che può essere elaborato come segnale tattile (Fox., 1974). Sono presenti inoltre macrofagi mesenchimali immigrati, leucociti, linfociti e melanociti.

La permeabilità della pelle all'acqua è variabile: è minore nelle specie strettamente acquatiche rispetto a quelle meglio adattate alla vita aerea, così come è minore nella larva rispetto all'adulto e, anche nell'adulto è relativamente bassa nelle fasi di vita acquatica mentre è elevata nelle fasi della vita terrestre.

CAPITOLO V

MATERIALI E METODI

Nella presente ricerca sono stati eseguiti due tipi di indagine tossicologica sulle larve di due specie di anuri. In *Bufo bufo* è stata eseguita l'analisi ultrastrutturale dell'epidermide larvale dopo esposizione cronica a concentrazioni subletali di endosulfan. In *Rana dalmatina* è stata rilevata dapprima la tossicità acuta dell'endosulfan, mediante determinazione della LC₅₀, e successivamente la tossicità cronica attraverso l'analisi degli effetti su pattern di crescita e comportamentali.

V.1. Esperimenti di tossicità cronica su *Bufo bufo*

V. 1.1. Larve: raccolta e mantenimento

Le ovature di *Bufo bufo* sono state prelevate dallo stagno permanente Lago della Paglia, situato nel comune di Fagnano Castello (CS) a 1082m slm. In laboratorio, lo stadio di sviluppo è stato determinato in base ad alcuni caratteri morfologici distintivi e in accordo con le apposite tavole cronologiche di sviluppo (Gosner, 1960). In tutti gli esperimenti eseguiti sono state scelte larve con branchie interne completamente opercolate (stadio di sviluppo 25). Prima dell'esperimento, le larve sono state mantenute per quattro giorni in acquari da 50 litri con acqua di rubinetto. La temperatura è stata mantenuta costante intorno ai $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ed i girini sono stati nutriti *ad libitum* con spinaci biologici bolliti (Rif. Bernabò *et al.*, 2008).

V.1.2. Esposizione

Il periodo di esposizione ha coperto l'intera fase di sviluppo larvale: dallo stadio 25 secondo Gosner (1960) fino allo stadio 46 (fine della metamorfosi e completo riassorbimento della coda). L'endosulfan (Chem Service Inc., West Chester, PA, USA purity 99%) è stato disciolto in acqua di rubinetto per ottenere le seguenti concentrazioni nominali: 0.01 mg/l (Bassa), 0.05 mg/l (Media) e 0.1 mg/l (Alta).

Le concentrazioni utilizzate si basano sui livelli di sensibilità delle larve di *Bufo bufo* ottenuti in test di tossicità acuta, precedentemente effettuati presso il nostro dipartimento (Bernabò *et al.*, 2008). La più bassa concentrazione testata è stata scelta, inoltre, perché corrispondente ai criteri di qualità delle acque di superficie stabilite dall'EPA per l'endosulfan (2001).

Dopo la fase di acclimatazione, 30 larve di dimensioni simili sono state trasferite, per ciascuna unità sperimentale, in acquari da 30 L. Il gruppo di controllo è stato mantenuto in acqua di rubinetto. Lo static-renewal test è stato usato come metodo di esposizione in accordo con le procedure standard (ASTM 1997). L'acqua è stata cambiata ogni 72 h; la concentrazione nominale di endosulfan durante questo intervallo di tempo rimane infatti costante a causa della elevata stabilità e della lunga vita media in acqua del composto (Miles e Moy 1979).

Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di laboratorio controllate: ciclo 12:12 h di buio-luce, pH medio di 7.3 e temperatura dell'acqua di $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. I girini sono stati alimentati con lattuga o spinaci biologici bolliti *ad libitum* tre volte alla settimana fino all'inizio della metamorfosi (Gosner stage 41). Al momento della comparsa delle zampe anteriori i girini sono stati rimossi dagli acquari di trattamento e trasferiti fino al completamento della metamorfosi in acqua-terrari allestiti in modo

tale che i girini avessero accesso ad un ambiente asciutto e all'acqua (acqua di trattamento).

V.1.3. Allestimento dei preparati per la microscopia elettronica a trasmissione

Nel presente lavoro, le metodiche standard riportate in letteratura (Scala *et al.*, 1995), adeguatamente corrette secondo le nostre esigenze, sono state eseguite per le operazioni relative all'allestimento dei preparati per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). L'allestimento dei preparati segue le seguenti tappe: il prelievo, la fissazione e la disidratazione, seguite dall' inclusione, il taglio e la colorazione .

Prelievo

Il prelievo dell'epidermide è stato effettuato dopo 96 ore, 14 e 20 giorni di esposizione a 0.01 mg/l, 0.05 mg/l e 0.1 mg/l di endosulfan. Parallelamente sono stati sacrificati gli esemplari del controllo per il confronto tra le condizioni basali e le condizioni sperimentali.

Per ogni gruppo sperimentale e tempo di esposizione sono stati scelti e osservati per la microscopia elettronica a trasmissione tre campioni.

Gli animali da sacrificare sono stati anestetizzati con MS 222 (tricaine methanesulphonate). Sono state utilizzate forbici e bisturi perfettamente puliti ed i campioni sono stati lavati con la soluzione di lavaggio (isotonica ed allo stesso pH dell'ambiente cellulare) per allontanare eventuali contaminanti, frammenti extracellulari, sostanze proteiche e polisaccaridi presenti sulla superficie del campione. Le fasi di prelievo, riduzione e lavaggio sono state effettuate nel minor tempo possibile per evitare modificazioni a carico della struttura cellulare. Le

dimensioni finali dei campioni sono state, come di norma, quelle compatibili con una buona penetrazione degli agenti chimici (circa 1 mm³).

Fissazione

La fase di fissazione del campione rappresenta la prima fase di modificazione artificiale dell'ambiente cellulare: permette che le strutture cellulari non vadano incontro a processi degenerativi, arresta le attività metaboliche della cellula ed immobilizza tutti i componenti molecolari e macromolecolari. I campioni sono stati sottoposti ad una fissazione primaria aldeidica seguita da una post-fissazione in tetrossido di osmio. La prima fissazione è stata eseguita utilizzando la glutaraldeide al 3%, veicolata da un tampone fosfato (fosfato monobasico e bibasico di sodio, 0.1 M, pH 7.2) che ha il vantaggio di mantenere il pH cellulare costante durante l'intero periodo di fissazione. La glutaraldeide garantisce una stabilizzazione sufficientemente rapida da evitare un'estrazione delle componenti cellulari da parte del veicolo. Per la post-fissazione è stato utilizzato il tetrossido di osmio all'1%, veicolato sempre da un tampone fosfato. Come soluzione di lavaggio (tra le due fissazioni e al termine della seconda fissazione) è stato ugualmente utilizzato il tampone fosfato in quanto ha il vantaggio di avere una composizione chimica simile a quella dei fluidi extracellulari.

Schema di fissazione	
Pre-fissazione	2h in glutaraldeide al 3% in tampone fosfato 0.1 a 4 °C
Lavaggio	3-4 passaggi di 30' in tampone fosfato 0.15 M
Post-fissazione	2h in OsO ₄ L 1% in tampone fosfato 0.1 a 4°C
Lavaggio	3-4 passaggi di 10' in tampone fosfato 0.15 M

Disidratazione

Nella fase di disidratazione vengono rimossi tutti i liquidi presenti nel tessuto. Nel caso della microscopia elettronica a trasmissione, i liquidi devono essere sostituiti con un solvente organico compatibile con la resina utilizzata nella fase di inclusione. Gli agenti disidratanti sono solventi organici ad elevata forza e, per questa ragione, è inevitabile un certo grado di coartazione ed estrazione dei costituenti cellulari. Al fine di evitare l'estrazione di qualche componente cellulare, la disidratazione deve essere effettuata in modo graduale e nel minor tempo possibile in relazione al tipo di tessuto ed alle sue dimensioni. Nel nostro caso, l'agente disidratante utilizzato è stato l'etanolo il quale, non essendo direttamente miscibile con le resine epossidiche, ha imposto l'impiego successivo di un solvente di transizione (ossido di propilene).

Schema di disidratazione	
Etanolo al 30%	2 di 5 minuti
Etanolo al 50%	2 di 5 minuti
Etanolo al 70%	2 di 5 minuti
Etanolo al 95%	2 di 5 minuti
Etanolo al 100 %	3 di 5 minuti

Infiltrazione o inclusione

L'inclusione consiste nella graduale sostituzione dell'agente disidratante con il mezzo di inclusione. I mezzi di inclusione consistono in monomeri di resine sintetiche, di ridotte dimensioni, capaci di impregnare completamente il tessuto. Come accennato, la procedura di inclusione in resina epossidica prevede l'utilizzo di un solvente di transizione quale l'ossido di propilene. Nel nostro studio è stata utilizzata una resina epossidica ottenuta dalla miscela di Epon 812 e Araldite (in

presenza di agenti acceleratori e induttori); successivamente la resina viene fatta polimerizzare, ottenendo il blocchetto di inclusione. Tutte le operazioni di inclusione sono state effettuate sotto cappa, mentre la polimerizzazione è stata condotta in stufa a 60°C.

Schema di inclusione	
Ossido di propilene	3 passaggi di 10 minuti
Ossido di propilene+resina (al 50%)	2 -6 ore (4°C)
Resina	Minimo 12 ore sotto cappa
Stazionamento in stufa	3 giorni a 60°C

Taglio e colorazione

I campioni inclusi in resina, prima di essere colorati, devono essere sottoposti ad una fase denominata “trimming” che consiste nella rimozione della resina in eccesso presente intorno al tessuto finché non si ottiene un blocco avente la forma di un tronco di piramide, con la faccia superiore a forma di trapezio e il campione immediatamente sottostante. Il sezionamento dei campioni inclusi viene effettuato mediante l’impiego dell’ultramicrotomo LKB Ultratome III. Vengono effettuate delle sezioni semifini destinate alla microscopia ottica, il cui spessore è di 1-2 µm, mentre le sezioni ultrasottili per la microscopia elettronica a trasmissione hanno uno spessore di circa 60-90 nm. Le sezioni semifini vengono utilizzate come sezioni “orientative” per localizzare, sul campione, la zona da dove ottenere poi le sezioni ultrasottili. Esse possono tuttavia essere utilizzate come elemento diagnostico sostituendo i preparati inclusi in paraffina (utilizzati in microscopia ottica tradizionale) e consentire di sfruttare al meglio il potere di risoluzione del

microscopio ottico. Le colorazioni utilizzate sono state due: la tecnica secondo Humphrey e Pittman (blu di metilene, azzurro II, fucsina basica) e la tecnica tribasica secondo Grimley. Le sezioni semifini sono state successivamente osservate al microscopio ottico LEITZ Dialux EB 20.

Dalle osservazioni effettuate sulle sezioni semifini sono state ricavate le ultrasottili che, adagate sulle apposite griglie (o retini), sono state sottoposte ad un trattamento di “colorazione”. La contrastazione avviene trattando i campioni con metalli pesanti in grado di fissarsi selettivamente alle differenti strutture sub-cellulari, con conseguente aumento dello scattering con il fascio elettronico del microscopio. Le sezioni ultrasottili subiscono quindi un doppio trattamento con acetato di uranile e citrato di piombo in soluzione al 2%. I sali di uranio si fissano in particolare agli acidi nucleici, evidenziando la cromatina nucleare ed i ribosomi mentre i sali di piombo potenziano l’azione dell’osmio e dell’uranio delineando l’ultrastruttura cellulare. Dopo il contrasto segue la fase di metallizzazione. Infatti, per aumentare la stabilità meccanica del campione e migliorarne la stabilità termica, i retini vengono rivestiti da una pellicola di carbone a bassa densità elettronica. L’operazione di rivestimento delle sezioni avviene per mezzo di speciali evaporatori che operano in condizioni di vuoto. Le sezioni così allestite sono state osservate al microscopio elettronico a trasmissione modello Zeiss EM 900.

V.2. Esperimenti *Rana dalmatina*

V.2.1. Larve: raccolta e mantenimento

Le ovature di *Rana dalmatina* sono state prelevate dagli stagni permanenti nella riserva naturale “Mangia e bevi” nella provincia di Cosenza (Calabria) (39°22'42"N, 16°05'58"E). In laboratorio, lo stadio di sviluppo è stato determinato in base ad

alcuni caratteri morfologici distintivi e in accordo con le apposite tavole cronologiche di sviluppo (Gosner, 1960). In tutti gli esperimenti eseguiti, sono state scelte larve con branchie interne completamente opercolate (stadio di sviluppo 25) dopo attento esame morfologico eseguito per mezzo di uno stereomicroscopio. Le ovature prelevate sono state mantenute in acquari riempiti con acqua di rubinetto. La temperatura è stata mantenuta costante intorno ai $18^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ed i girini sono stati nutriti *ad libitum* con spinaci biologici bolliti.

V.2.2. Tossicità acuta: LC₅₀

In questa fase del nostro studio si è proceduto esponendo i girini di *Rana dalmatina* a concentrazioni crescenti di endosulfan al fine di valutare la concentrazione letale a 96 h (LC₅₀). La concentrazione letale 50 (LC₅₀) rappresenta la concentrazione capace di provocare la morte del 50% della popolazione sperimentale in oggetto. Corrisponde alla mediana della distribuzione (normale) della sensibilità degli organismi e deve essere sempre riferita al tempo di esposizione (es. LC₅₀ 96 h).

L'endosulfan (Chem Service Inc., West Chester, PA, USA purity 99%) è stato disciolto in acqua di rubinetto per ottenere le seguenti concentrazioni nominali: 0.050, 0.060, 0.070, 0.080, 0.090, 0.10, 0.20, 0.30 mg/L. Per ogni set di esperimenti 10 individui, allo stadio 25 di Gosner e con dimensioni simili, sono stati scelti e trasferiti per ogni unità sperimentale in acquari da 15L. Gli animali di controllo sono stati mantenuti in acqua di rubinetto. In accordo con le procedure standard (ASTM 1997) è stato usato il sistema di esposizione statico, per i saggi di breve durata, in cui la serie di soluzioni con concentrazioni diverse non subisce ulteriori aggiunte di contaminante, di conseguenza nell'arco delle 96 ore l'acqua non è stata rinnovata. Durante gli esperimenti è stato mantenuto un ciclo 12:12 h di

luce-buio, un pH medio di 7.3, e temperatura dell'acqua di $18^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$. Durante l'esposizione gli animali non sono stati alimentati. Per ciascuna concentrazione testata, incluso il controllo, sono state eseguite 3 repliche.

La concentrazione letale per il 50% degli animali (LC_{50}) è stata determinata usando il Finney's Probit Analysis LC_{50} Determination Method (Finney 1971). Con questo metodo di elaborazione matematico-statistica, le curve di risposta/concentrazione (curva di tossicità) subiscono una linearizzazione con la trasformazione log-probit (trasformazione logaritmica delle ordinate (% incidenza). Utilizzando i dati trasformati (Probit) con i dati trasformati delle ascisse (Logit) le curve di tossicità vengono definite Log-Probit e si avvicinano molto a rette. Il log-probit risulta molto efficace nella parte centrale della curva risposta/concentrazione. I dati di mortalità sono stati raggruppati con un intervallo di confidenza del 95% e l'analisi è avvenuta mediante il software, sviluppato dall'EPA, LC_{50} Software Program Version 1.00 (1999).

V.2.3. Tossicità cronica

Il periodo di esposizione ha coperto l'intera fase di sviluppo larvale: dallo stadio 25 secondo Gosner (1960) fino allo stadio 46 (fine della metamorfosi e completo riassorbimento della coda).

L'endosulfan è stato disciolto in acqua di rubinetto per ottenere le seguenti concentrazioni nominali: 0.001 mg/L, 0.005 mg/L, 0.01 mg/L. Le concentrazioni utilizzate nei test cronici si basano sui livelli di sensibilità delle larve di *Rana dalmatina* ottenuti durante quelli acuti.

Dopo la fase di acclimatazione, 30 larve di dimensioni simili sono state trasferite, per ciascuna unità sperimentale, in acquari da 30 L. Il gruppo di controllo è stato

mantenuto in acqua di rubinetto. Lo static-renewal test è stato usato come metodo di esposizione in accordo con le procedure standard (ASTM 1997). Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di laboratorio controllate: ciclo 12:12 h di buio-luce, pH medio di 7.3 e temperatura dell'acqua di $18^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. I girini sono stati alimentati con spinaci biologici bolliti *ad libitum* tre volte alla settimana fino all'inizio della metamorfosi (Gosner stage 42) in cui i girini passano alla dieta carnivora. Al momento della comparsa delle zampe anteriori i girini sono stati rimossi dagli acquari di trattamento e trasferiti fino al completamento della metamorfosi in acquaterrari allestiti in modo tale che i girini avessero accesso ad un ambiente asciutto e all'acqua (acqua di trattamento).

Il periodo di trattamento è durato all'incirca 56 giorni, ovvero fino al momento in cui tutti i sopravvissuti avevano metamorfosato. Durante il periodo di esposizione cronica all'endosulfan, gli effetti subletali indotti sono stati valutati prendendo in considerazione i seguenti parametri: sopravvivenza, massa larvale (accrescimento in peso), lunghezza del corpo (bocca-ano/snout-vent length), stadio di sviluppo, sopravvivenza, massa e tempo alla metamorfosi, e presenza di deformità. Dopo aver registrato il peso corporeo iniziale, i girini sono stati pesati ogni 7 giorni; durante questa operazione sono stati asciugati con estrema delicatezza con carta assorbente e pesati al milligrammo nel minor tempo possibile per non provocare stress. Nello stesso momento è stata annotata la SV length mediante carta millimetrata.

Per determinare lo stadio di sviluppo, è stato esaminato una volta a settimana un sottocampione di animali per ciascun gruppo mediante l'utilizzo di uno stereomicroscopio. Per ogni individuo sono state registrate man mano la sopravvivenza, la massa alla metamorfosi, i giorni impiegati raggiungerla e

l'eventuale presenza di deformità. Durante il periodo di test è stato raccolto vario materiale fotografico mediante stereomicroscopio e mediante una fotocamera digitale Sony DSC F 707. Giornalmente sono state condotte delle osservazioni visuali durante il periodo di esposizione.

Tutti gli animali sopravvissuti al trattamento sono stati sacrificati con un'overdose di anestetico (MS-222 tricaine methanesulfonate).

V.2.4. Analisi comportamentale

Le osservazioni comportamentali al fine di valutare la performance di nuoto sono state eseguite dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di esposizione. Sono stati scelti 8 individui, in maniera casuale, da ciascuna unità sperimentale incluso il controllo e trasferiti singolarmente in contenitori bianchi, circolari, di 8 cm di diametro riempiti con acqua di rubinetto. Le registrazioni video sono state effettuate utilizzando una videocamera Sony Handycam DCR-DVD92E PAL; l'obiettivo è stato disposto perpendicolarmente al piano focale dove sono stati disposti contemporaneamente tutti gli esemplari scelti per l'osservazione (fig. 5.1 A). Dopo 30 minuti di acclimatazione, l'attività dei girini è stata ripresa per un totale di 15 minuti. In totale sono stati ripresi contemporaneamente 32 girini.

I video così ottenuti (fig. 5.1 B) sono stati processati automaticamente dal software Ethovision 7 XT (Noldus Information Technology, The Netherlands) adoperato presso "Le laboratoire d'Ethologie des Poissons et Amphibiens, Unité de Biologie du Comportement, Institut de Zoologie, Département des Sciences et Gestion de l'Environnement, Université de Liège". Ethovision è un programma di video-tracking e di analisi comportamentale che trasforma i soggetti in esame in pixels all'interno di

aree di detection (arene) costruite dall'operatore per mezzo del programma stesso e fornisce una posizione dei girini in un tempo definito (e.g. ogni 0.2 sec nel nostro set-up) (Noldus *et al.*, 2002).

L'arena è una regione dello schermo in cui Ethovision individua uno o più soggetti e con l'opzione "Multiple Arenas" si possono definire fino a 100 arene di detection permettendo al programma di analizzare più soggetti allo stesso tempo. L'arena setting contiene informazioni circa la taglia e la forma delle arene, punti di interesse, la calibrazione e il background dell'immagine. Nel presente studio le arene sono state costruite calibrando il diametro di 8 cm (corrispondenti al diametro reale dei contenitori utilizzati) (fig. 5.1 C).

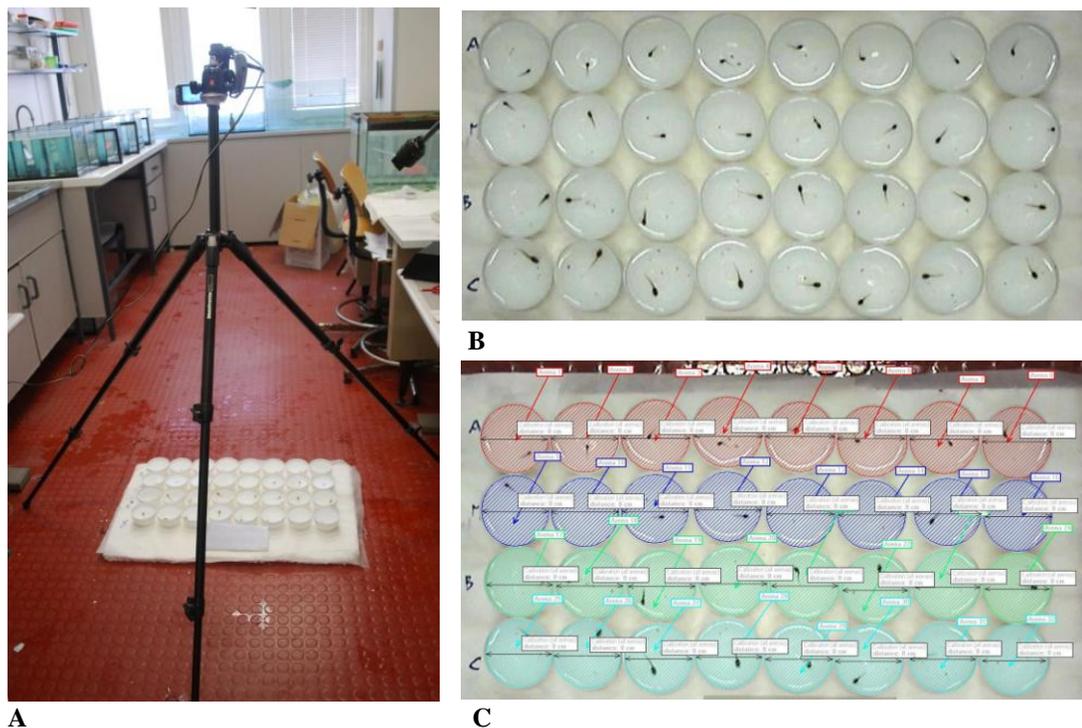


Fig.5.1. Metodologia di registrazione e detection. (A) Assetto della videocamera e dei contenitori di osservazione. (B) Immagine catturata dalla videocamera. (C) Design delle aree di detection mediante Ethovision.

Una volta determinate le aree di detection, sono stati stabiliti i parametri che permettono al programma di individuare e seguire i soggetti in esame.

Il detection setting del programma utilizzato contiene le seguenti sezioni (fig. 5.2).

- **Methods:** questa sezione contiene diverse metodiche da utilizzare per la detection dei soggetti, quali “dynamic subtraction”, “static subtraction” e “gray scaling”
- **Detection:** in cui si possono configurare i settings per la detection del soggetto
- **Subject identification:** viene utilizzata solo quando si vuole ottimizzare la detection di più animali, conoscendone la taglia.
- **Video:** dove si può selezionare il “Sample rate” ed il “Pixel smoothing”.
- **Subject Contour** in cui si può erodere il corpo del soggetto (in pixels) individuato, per ottimizzare la detection.

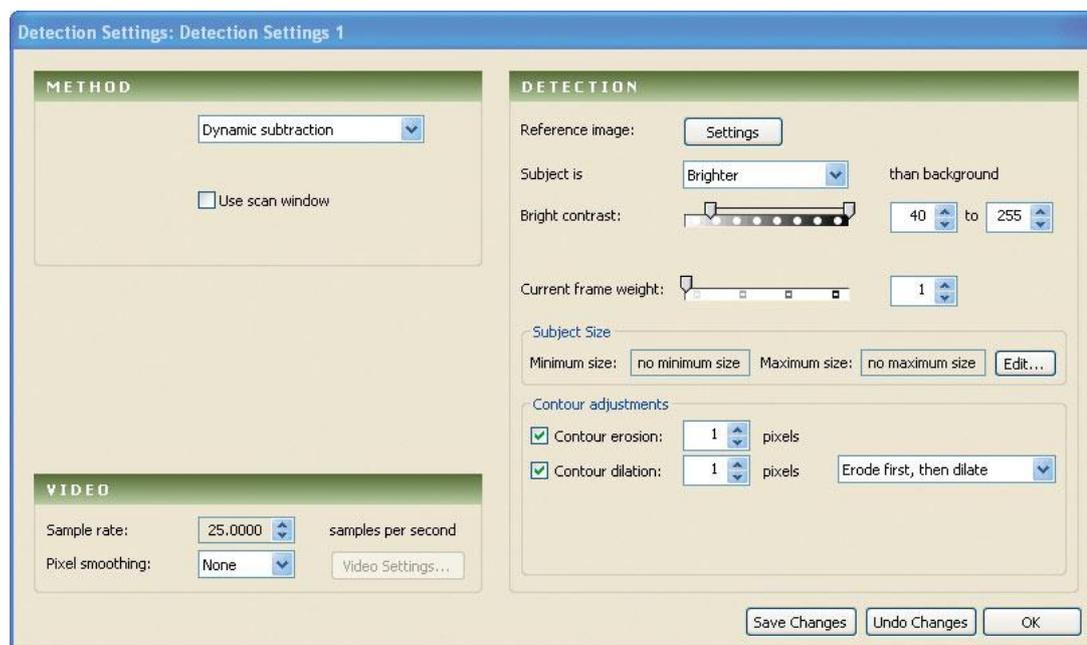


Fig. 5.2. Riquadro del detection setting in Ethovision.

Nell’immagine acquisita, il soggetto in esame viene identificato dal programma come un insieme di pixels. È importante che Ethovision possa distinguere tra il soggetto da seguire ed il background e per questo, tra i vari metodi disponibili, nel seguente studio è stato utilizzato il “gray scaling”. Utilizzando tale metodo, il background e la luce non devono variare durante l’esperimento dal momento che gli

animali differiscono dal background grazie alla gradazione di grigi che vengono impostati per identificare il soggetto. L'immagine video viene convertita in monocroma e ciascun pixel dell'immagine ha una scala di grigi, da 0 (nero) a 255 (bianco). Con il gray scaling si può definire il valore della scala di grigi per definire il soggetto in esame. I rimanenti valori di grigi vengono considerati come background. Nell'opzione video sono stati selezionati il "Sample rate" di 5000 samples per second, il "subject size" da 0 (taglia minima) a 12.500 (taglia massima), mentre non sono stati selezionati il "pixel smooting" ed il "contour erosion". Una volta impostati i vari parametri di detection si procede all'acquisizione dell'immagine.

Il software consente di scegliere tra differenti variabili comportamentali dipendenti.

Nel nostro caso sono state analizzate le seguenti variabili comportamentali:

- ❖ Distanza totale percorsa (cm)
- ❖ Durata della velocità (cm/s)
- ❖ Immobilità (s)
- ❖ Uso dello spazio definito da: distanza media percorsa dal bordo dell'arena (cm) e distanza media percorsa dal centro dell'arena (cm).

Distanza percorsa

La distanza percorsa (cm), definita anche come "distanza di viaggio", è stata utilizzata come misura generale dell'attività di nuoto del girino in 15 minuti di registrazione.

$$DM_n = \sqrt{(X_n - X_{n-1})^2 + (Y_n - Y_{n-1})^2}$$

DM_n = distanza percorsa dal soggetto n-1 (soggetto prima dello spostamento) al soggetto n (soggetto dopo lo spostamento) X_{n-1}, Y_{n-1} = X,Y coordinate del corpo del soggetto n, X_n, Y_n = X,Y coordinate del corpo del soggetto n-1.

Velocità

La velocità viene calcolata dal programma dividendo la distanza percorsa col tempo trascorso tra lo spostamento del soggetto n dal precedente n-1 ovvero (t_n+t_{n-1}). La velocità media (cm/s) è stata utilizzata come misura dell'attività di nuoto (Nilsson *et al.* 1993; Winberg *et al.* 1993).

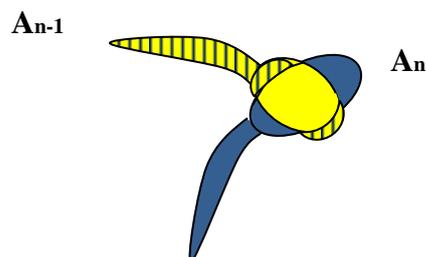
$$V_n = \frac{D M_n}{t_n + t_{n-1}}$$

V_n = velocità del soggetto n e DM_n = Distanza mossa dal soggetto n

Immobilità

La mobilità è una variabile discreta con tre possibili stati: highly mobile, mobile e immobile, dipendenti dal cambiamento di posizione dei pixels che definiscono il soggetto.

La mobilità è calcolata come: $M = \frac{C A_n}{A_{n-1} + A_n} \times 100$



$$C A_n = \blacksquare + \text{||||}$$

CAn è il cambiamento dell'area per il soggetto n, A_n è l'area per il soggetto n, e A_{n-1} l'area per il soggetto n-1 (ovvero il soggetto dopo lo spostamento).

Nel nostro studio la mobilità media è stata definita da i seguenti valori soglia: valore soglia del 20% per l'immobilità e del 60% per l'alta mobilità. La percentuale è stata misurata con la posizione dell'individuo in rapporto all'immagine precedente. Con una differenza del 20% tra le due immagini l'individuo è stato considerato come immobile, tra il 20% e il 60% come mobile, più del 60% di differenza come altamente mobile. Nel nostro caso le analisi statistiche sono state effettuate per valutare l'immobilità dei soggetti. Il programma identifica la percentuale del cambiamento nell'area del corpo per cui le statistiche vengono calcolate quando il soggetto viene considerato immobile.

Uso dello spazio

Per valutare la capacità di utilizzare lo spazio nell'arena sono state osservate due variabili:

- 1) Distance to zone: distanza media percorsa (cm) dal bordo dell'arena
- 2) Distance to point: distanza media percorsa (cm) dal centro dell'arena

Per calcolare la distanza del soggetto dal bordo dell'area di detection è stata utilizzata l'opzione "if in zone," per cui il massimo valore è stato ottenuto quando il soggetto si trovava al centro dell'arena. Nella variabile "distance to point", con l'opzione "Arena" è stata definita la distanza percorsa dai girini dal centro dell'arena.

V.2.5. Analisi statistica

Per l'analisi dei dati cronici, i seguenti test statistici sono stati effettuati con l'ausilio di Graph Pad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) adottando un livello di significatività di 0.05. Il Fisher's exact probability test è stato applicato per comparare la mortalità (il numero di girini sopravvissuti versus il numero di

morti) e il numero di individui metamorfosati (il numero che raggiunge la metamorfosi versus il numero iniziale) fra il gruppo di controllo ed i gruppi trattati con endosulfan. Per valutare gli effetti del pesticida sul body weight (massa larvale), la SV-length e lo stadio di sviluppo (Gosner, 1960) durante l'intero periodo di esposizione, il Kruskal–Wallis test è stata utilizzato separatamente per i periodi di osservazione, seguito dal Dunn's Multiple Comparison post test per le differenze fra i 3 trattamenti ed il gruppo di controllo. Il Mann-Whitney test è stato eseguito per calcolare il tempo impiegato per completare la metamorfosi (giorni).

I dati provenienti dalle osservazioni comportamentali sono stati normalizzati e analizzati con il software Statistica 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) adottando un livello di significatività di 0.05. Per ogni variabile comportamentale è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA) seguito dall' Unequal N HSD Post Hoc test, per il confronto con il gruppo di controllo.

CAPITOLO VI

RISULTATI

VI.1. Analisi ultrastrutturale dell'epidermide di *Bufo bufo* dopo esposizione cronica

L'epidermide, degli individui appartenenti al gruppo di controllo e degli esemplari trattati è stata analizzata per mezzo del microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

VI.1.1. Esempari di controllo

L'epidermide larvale di *Bufo bufo* è costituita da due strati cellulari che poggiano su una lamina basale di tessuto connettivo (fig. 1A). Lo strato epidermico più esterno è formato da cellule apicali o cellule pavimentose (PVCs) che nella porzione più esterna aderiscono l'una all'altra tramite giunzioni strette e/o intermedie (figg. 1A, B), più in profondità nello strato epidermico le cellule prendono contatto tra loro mediante desmosomi (fig. 1B).

Le cellule pavimentose presentano un nucleo tondeggiante o ovale e la superficie apicale è caratterizzata dalla presenza di microcreste (fig.1A). Nel citoplasma sub-apicale numerosi granuli di secrezione si distribuiscono in maniera regolare; da essi si origina lo strato mucoso presente sulla superficie epidermica (figg. 1A, C); sono presenti, inoltre, numerosi mitocondri, un apparato di Golgi ben sviluppato e reticolo endoplasmatico rugoso (RER) (fig. 1C)

Oltre alle cellule pavimentose nello strato più esterno sono riconoscibili a livello ultrastrutturale alcune cellule dal citoplasma scuro riconoscibili come mitochondria-rich cells (MRCs). Tali cellule specializzate sono caratterizzate dalla presenza di numerosi mitocondri e di lunghi microvilli sulla superficie cellulare; i mitocondri mostrano dimensioni più o meno costanti e sono di forma tondeggiante od ovoidale; all'interno (fig. 1D).

Le cellule basali presentano forma cuboidale o irregolare ed il loro citoplasma è caratterizzato da un esteso reticolo endoplasmatico rugoso, un prominente apparato di Golgi, ribosomi e mitocondri, le creste mitocondriali sono ben organizzate, numerose e di forma tubulare (figg. 2A, B).

Le cellule basali sono a diretto contatto con la lamina basale sottostante e l'adesione è mediata da emidesmosomi. Inoltre, dalla lamina basale protendono fibre di tonofilamenti organizzati in "cappi" definite "figure di Eberth". Nella figura 2C è evidenziata la relazione tra le figure di Eberth e la membrana plasmatica basale con cui prende contatto in determinati "punti di attacco" (fig. 2C). Si tratta di aggregati di fibre di cheratina che appaiono solo a livello basale.

Nello strato basale è possibile inoltre riconoscere cellule larvali, tipiche del genere *Bufo*, chiamate Riesenzellens (Rz); si tratta di ghiandole unicellulari tipiche dei membri della famiglia *Bufo* caratterizzate da un voluminoso citoplasma lucente e granulare contenente prodotti di secrezione (Quagliata *et al.*, 1991) ed avvolto da melanosomi. Nel citoplasma è osservabile la presenza di mitocondri (fig. 2D).

VI.1.2. Ultrastruttura dell'epidermide dopo 96 h di esposizione

Dopo 96 h di esposizione a 0.01 mg/L di endosulfan, l'organizzazione generale dell'epidermide viene mantenuta (fig. 3A). A livello giunzionale non sembrano evidenti fenomeni di degenerazione eccetto per un leggero ampliamento delle giunzioni, in particolar modo negli strati profondi (fig. 3C); i mitocondri appaiono regolari per forma e distribuzione ed è presente un'attiva secrezione di muco sulla superficie (figg. 3B, A). Le MRCs e le Riesenzellens osservate mostrano le caratteristiche tipiche già descritte per gli esemplari di controllo (figg. 3C, D).

Dopo 96 h di esposizione a 0.05 mg/L di endosulfan, è ancora possibile riconoscere in parte la tipica organizzazione in strati dell'epidermide. Tuttavia l'analisi ultrastrutturale rivela l'irregolarità della superficie cellulare in cui le microcreste delle cellule pavimentose appaiono allungate ed anastomizzate tra loro. E' evidente inoltre la comparsa di vescicole di secrezione (SV) di grandi dimensioni, spesso distribuite in clusters, più numerose soprattutto nelle cellule dello strato apicale (fig. 4A). Si assiste inoltre, ad un aumento degli spazi intercellulari soprattutto a livello degli strati più profondi dove le giunzioni risultano spesso alterate e sono facilmente osservabili i lembi di cellule adiacenti ormai privi di contatto giunzionale (figg. 4A, B). Nello strato basale è stata osservata una intensa degenerazione cellulare ed in particolare le Riesenzellens, con più frequenza rispetto agli altri tipi cellulari, mostravano frequenti eventi degenerativi (fig. 4B). Nel citoplasma delle cellule basali i mitocondri che mostrano profilo irregolare ed alterazione del sistema di microcreste; il RER appare frammentato e le cisterne sono spesso rigonfie. (fig. 4C).

Dopo 96 h di esposizione a 0.1 mg/L di endosulfan, è possibile individuare poche regioni epidermiche ancora ben conservate all'interno delle quali sono comunque

sempre riconoscibili elementi cellulari in degenerazione. La superficie cellulare è ricoperta da una fitta coltre mucosa che si origina dai granuli delle PVCs (fig. 5A).

I microvilli delle MRCs appaiono allungati ed anastomizzati (fig. 5B) ed è evidente l'ampliamento degli spazi intercellulari e la perdita di contatto giunzionale che coinvolge anche le cellule dello strato esterno senza, tuttavia, coinvolgere le giunzioni apicali (fig. 5A, C).

Questo fenomeno è particolarmente intenso nello strato basale e coinvolge oltre alle giunzioni tra cellule epidermiche anche gli emidesmosomi che garantiscono l'unione con il tessuto connettivo (fig. 6A). Le cellule basali infatti sono fortemente alterate ed intensi sono i processi degenerativi: il citoplasma appare fortemente vacuolato ed il sistema di endomembrane completamente disorganizzato (fig. 6A). Inoltre, sono evidenti ancora severe alterazioni a carico dei mitocondri (fig. 6A). Le tipiche figure di Eberth (fig. 6B) e le Riesenzellens appaiono spesso degenerate (fig. 6C). E' stata inoltre rilevata una maggiore presenza di macrofagi (fig. 6D).

VI.1.3. Ultrastruttura dell'epidermide dopo 14 giorni di esposizione

Dopo 14 giorni di esposizione, le alterazioni sono intense e si evidenziano già alla concentrazione più bassa. Il pattern degenerativo è simile nell'epidermide esposta a tutte e tre le concentrazioni di endosulfan.

Il fenomeno più evidente rilevato dall'analisi ultrastrutturale è stato la perdita di contatto giunzionale che raggiunge la superficie epiteliale conferendo all'intero tessuto un aspetto frammentato e disorganizzato (fig. 7A). Il profilo superficiale è fortemente irregolare per la presenza di ampie invaginazioni e non è più possibile riconoscere le microcreste, fuse tra loro per ampi tratti (fig. 7A). In alcuni punti, le

cellule appaiono fortemente appiattite e allungate in senso longitudinale e il citoplasma ed il suo contenuto sono a stento riconoscibili (fig. 7B). Il citoplasma di molte cellule presenta ampie lacune e sono frequentemente osservati nuclei in degenerazione (fig. 7C). I mitocondri assumono conformazioni atipiche (ad anello) con il collasso del sistema delle microcreste (fig. 7D) e le figure di Eberth appaiono frequentemente disperse nel citoplasma (fig. 7E).

VI.1.4. Ultrastruttura dell'epidermide dopo 20 giorni di esposizione

Dopo 20 giorni di esposizione, l'epidermide larvale degli esemplari esposti a tutte e tre le concentrazioni di endosulfan non mostra più la sua tipica struttura. Le cellule, ormai completamente degenerate, appaiono compattate in un unico strato; la degenerazione nucleare risulta intensa ed in nessun caso è possibile distinguere elementi cellulari integri (fig. 8A). Gli organuli cellulari e le figure di Eberth, sono ormai completamente disorganizzati ed in degenerazione (figg. 8B, C).

TAVOLA 1

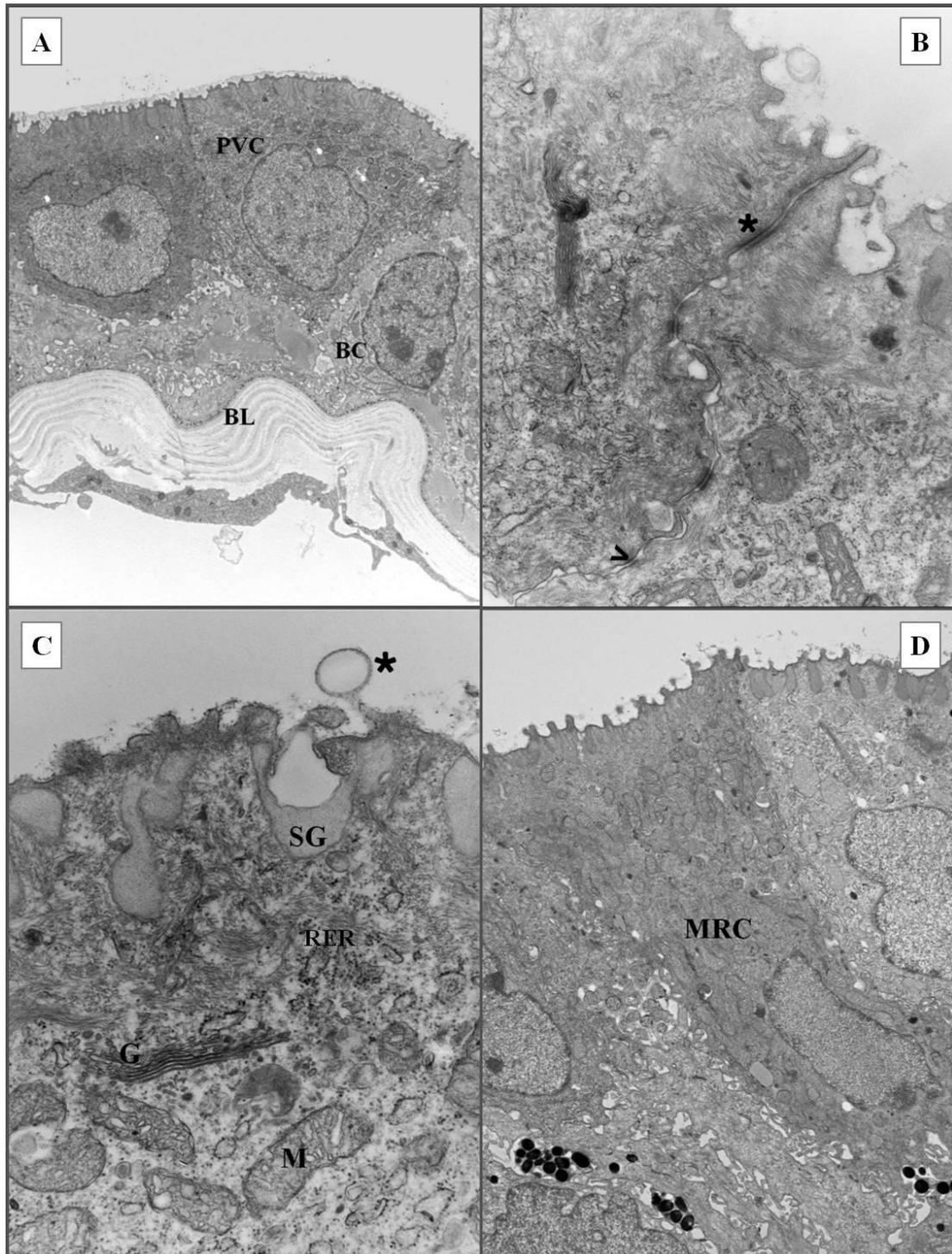


TAVOLA 2

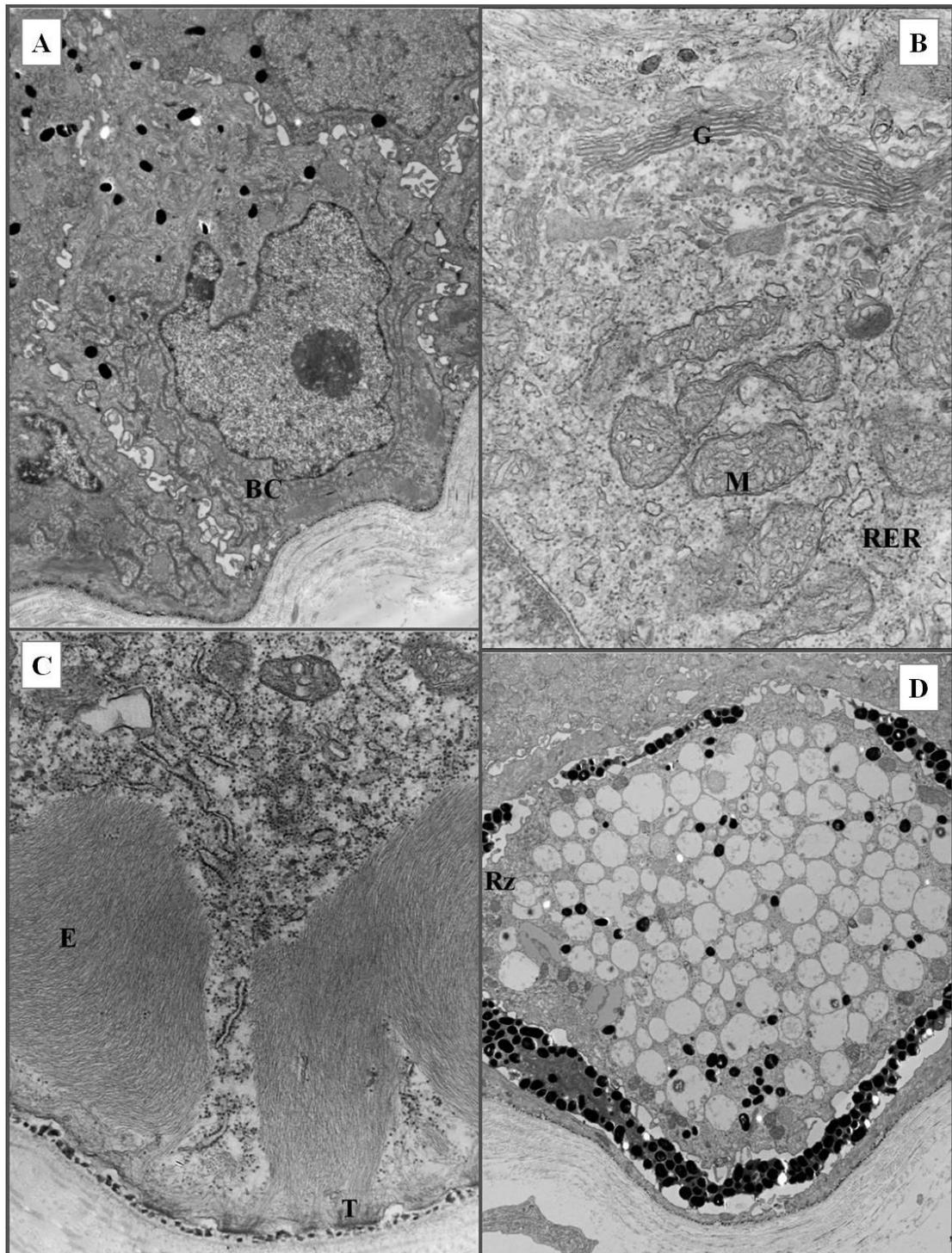


TAVOLA 3

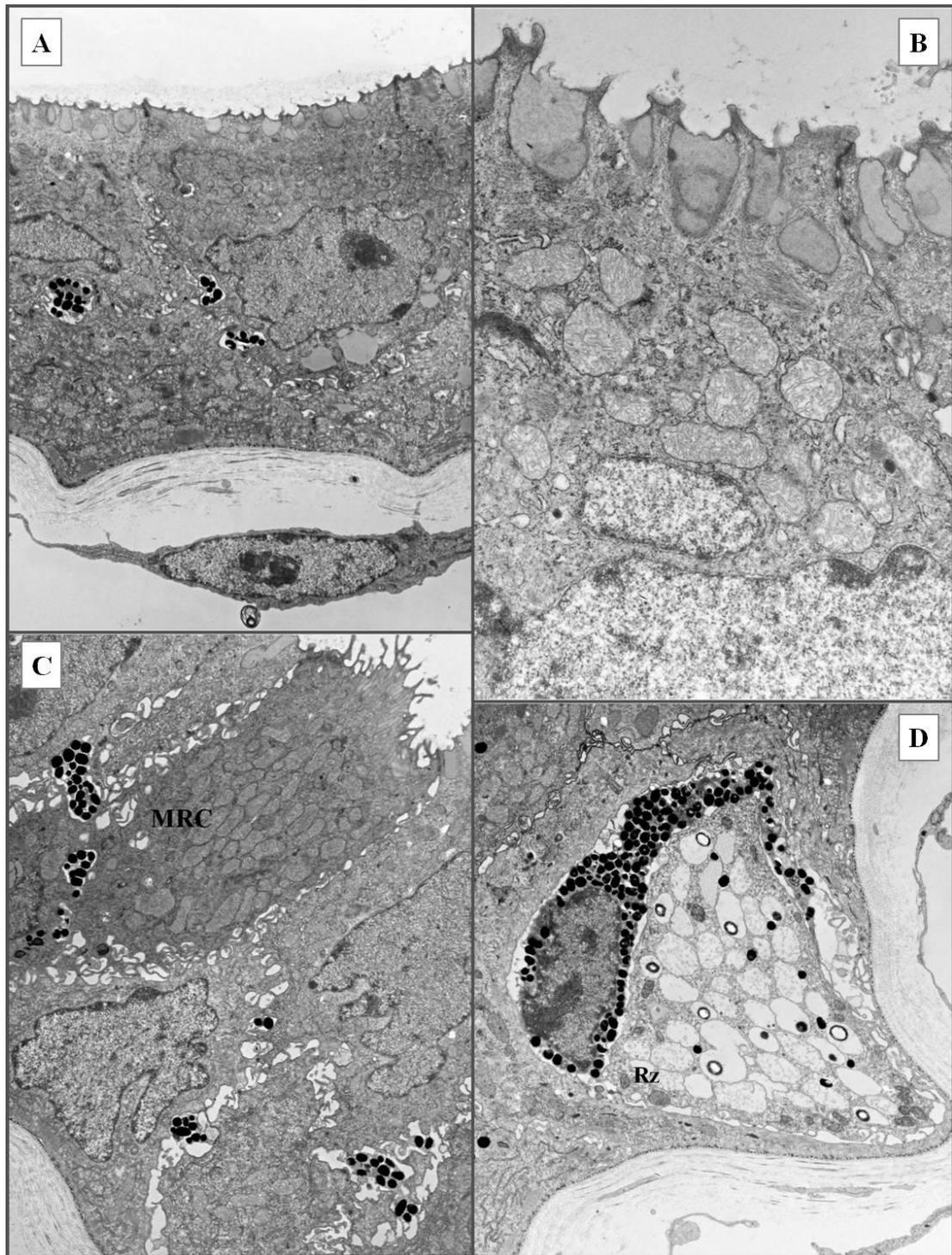


TAVOLA 4

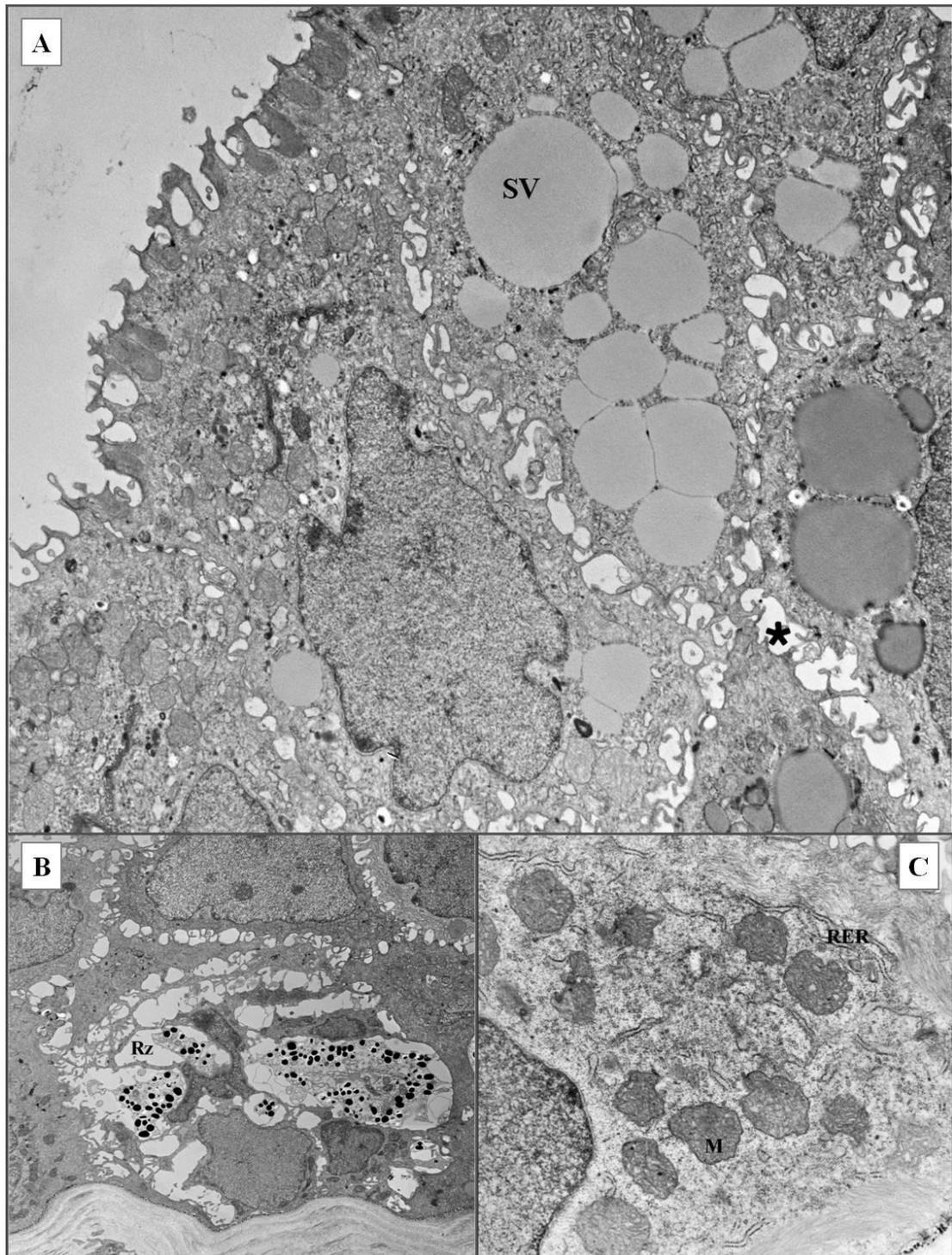


TAVOLA 5

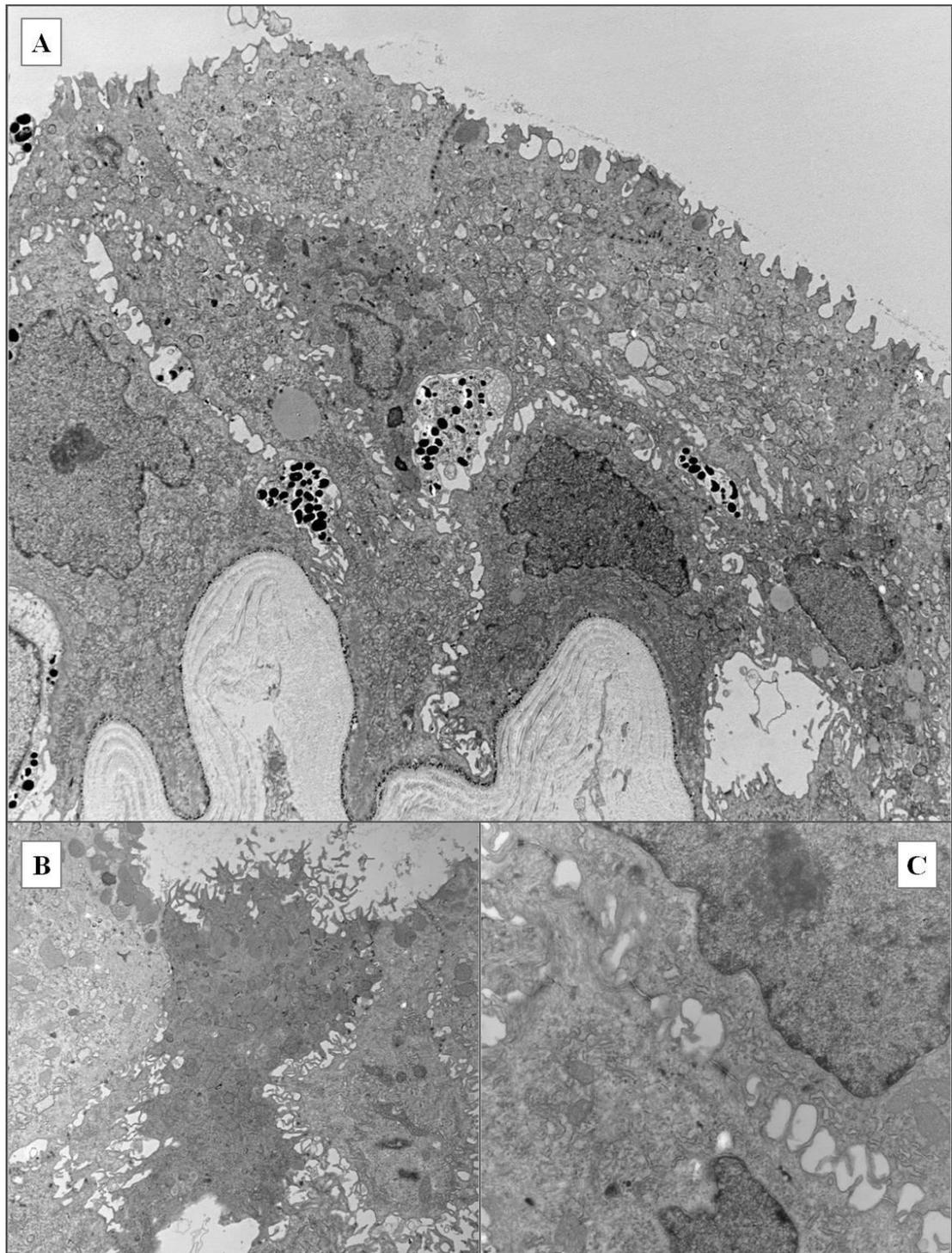


TAVOLA 6

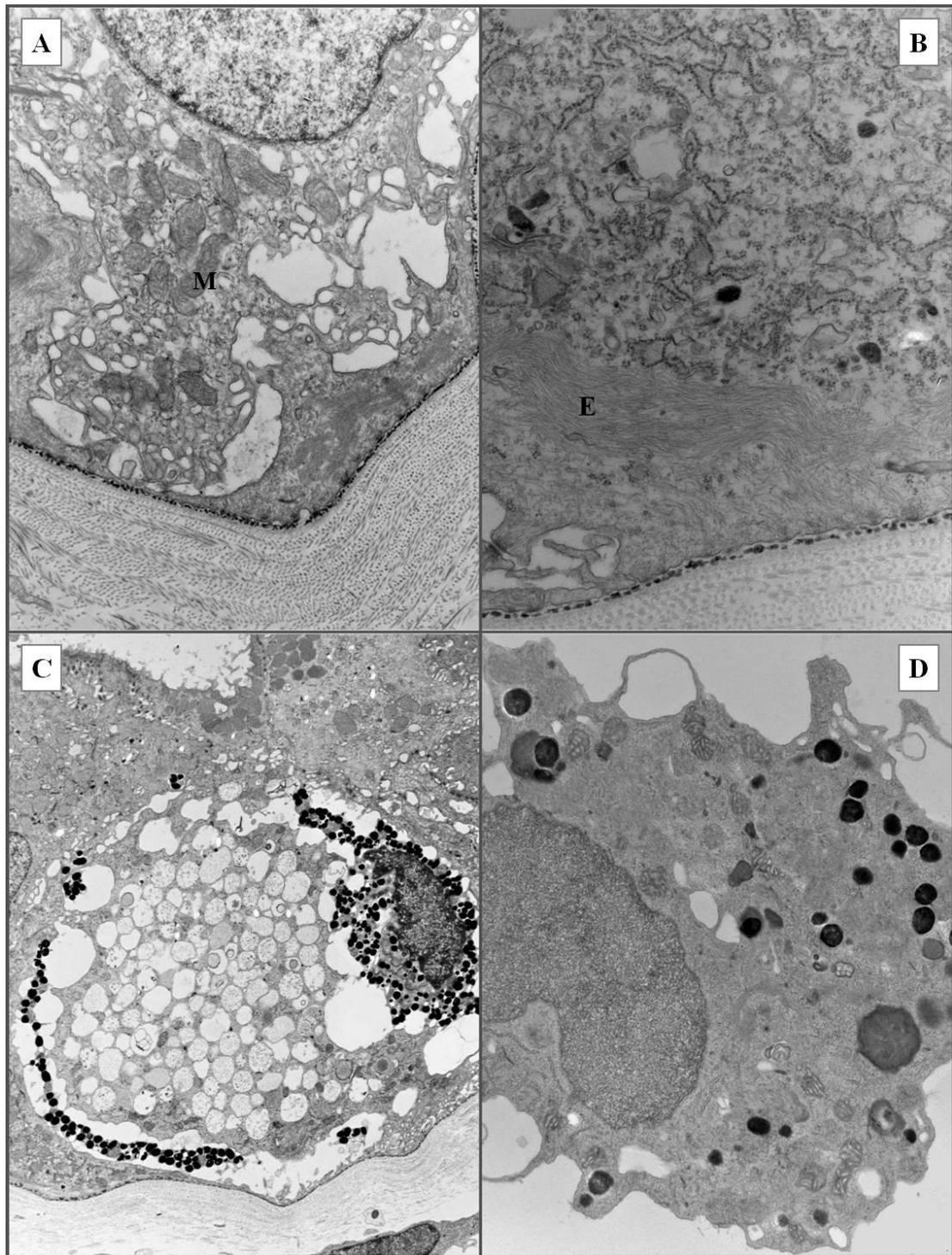


TAVOLA 7

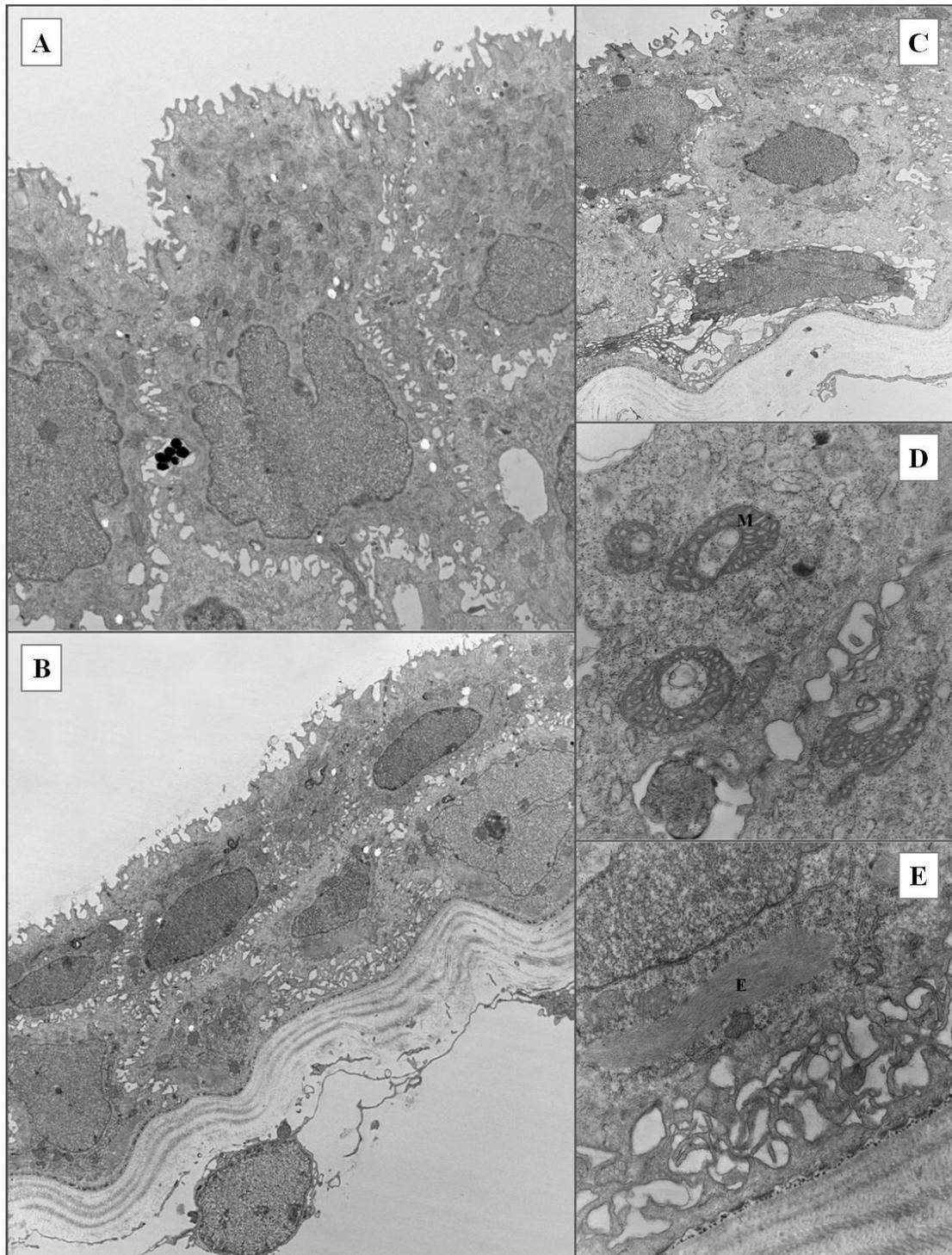
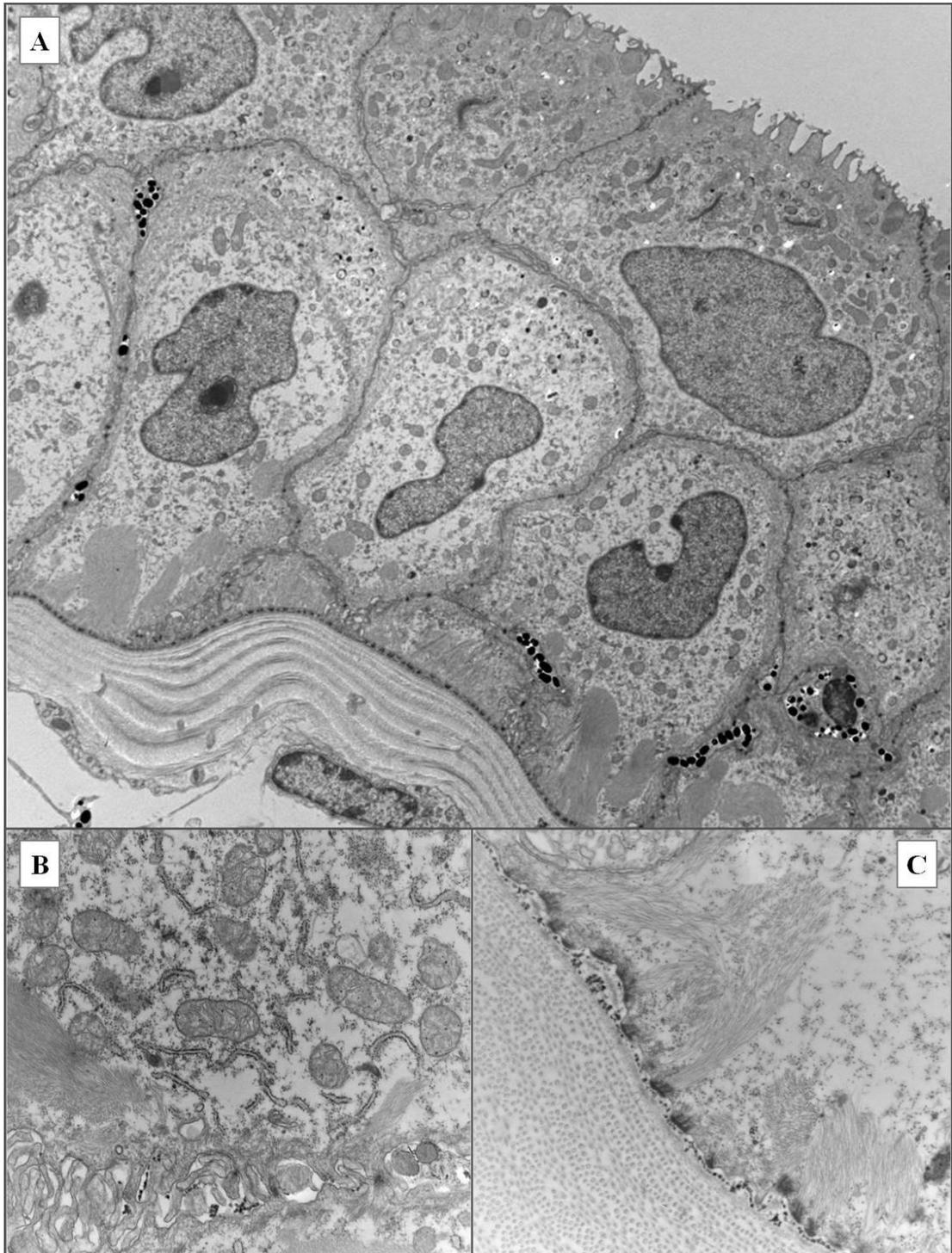


TAVOLA 8



LEGENDA DELLE FIGURE

Fig. 1. A. Ultrastruttura dell'epidermide larvale di *Bufo bufo*. Cellule pavimentose (PVCs) e cellule basali (BCs) giacenti su una lamina basale di tessuto connettivo (BL). 31500x. **B.** Regione apicale dell'epidermide di controllo. Le cellule pavimentose aderiscono tra loro mediante giunzioni strette e/o intermedie (*), nella parte più interna, mediante desmosomi (>). 20000x. **C.** Particolare di una cellula pavimentosa. La membrana plasmatica si solleva a formare le microcreste e nel citoplasma è possibile notare: mitocondri (M), reticolo endoplasmatico rugoso (RER), apparato di Golgi (G). Granuli di secrezione (SG) che secernano muco (*). 5000x. **D.** Mitochondria rich cell (MRC) caratterizzata da numerosi mitocondri e microvilli in superficie. 25000x.

Fig. 2. A. Cellula basale (BC) a contatto con la lamina basale. 5000x. **B.** Particolare del citoplasma di una cellula basale: mitocondri (M), reticolo endoplasmatico rugoso (RER), ribosomi ed apparato di Golgi (G). 25000x. **C.** Figure di Eberth (E) costituite dall'associazione di fibre ancorate alla lamina basale in "punti di attacco" (T). 25000x. **D.** Ghiandola unicellulare, Riesenzellen (Rz), caratterizzata da un citoplasma lucente e granulare, circondato da melanosomi. 4000x.

Fig. 3. A. Epidermide larvale di *B. bufo* dopo 96 h di esposizione a 0.01 mg/L di endosulfan. 3150x. **B.** Parte apicale dell'epidermide dopo 96 h di esposizione a 0.01 mg/L di endosulfan. I mitocondri mantengono la loro morfologia. 10000x. **C.** Dopo 96 h di esposizione 0.01 mg/L di endosulfan, le MRCs appaiono inalterate. 4000x. **D.** Dopo 96 h di esposizione 0.01 mg/L di endosulfan, le Rz appaiono inalterate. 5000x.

Fig. 4. A. Ultrastruttura dell'epidermide dopo 96 h di esposizione a 0.05 mg/L di endosulfan. Sono visibili: le vescicole secretorie (SV) distribuite in clusters, le microcreste delle PVCs allungate ed anastomizzate, un aumento degli spazi intercellulari (*). 5000x. **B.** Degenerazione cellulare e delle Rz nello strato basale dopo 96 h di esposizione a 0.05 mg/L di endosulfan. 4000x. **C.** Citoplasma di una cellula basale dopo 96h di esposizione a 0.05 mg/L. Sono evidenti l'alterazione mitocondriale ed il rigonfiamento del RER. 16000x.

Fig. 5. A. Epidermide dopo 96 h di esposizione a 0.1 mg/L. Si osserva la degenerazione cellulare, ampi spazi intercellulari e la superficie irregolare ricoperta da uno strato mucoso. 3150x. **B.** MRC dopo 96 h di esposizione a 0.1 mg/L. Si osserva l'allungamento dei microvilli. 5000x. **C.** Perdita di contatto cellulare nello strato esterno dell'epidermide dopo esposizione a 0.1 mg/L. 12500x.

Fig. 6. A. Dopo 96 h di esposizione a 0.1 mg/L si osserva l'alterazione delle giunzioni epiderma-derma e dei mitocondri (M) e la vacuolizzazione del citoplasma della cellula basale. 10000x. **B.** Dopo 96 h di esposizione a 0.1 mg/L di endosulfan le figure di Eberth (E) presentano una cui struttura disorganizzata. 20000x. **C.** Riesenzellen completamente degenerata dopo 96 h di esposizione a 0.1 mg/L di endosulfan. 3150x. **D.** Dopo 96 h di esposizione a 0.1 mg endosulfan /L si osserva una elevata frequenza di macrofagi. 10000x.

Fig. 7. A. Epidermide dopo 14 giorni di esposizione ad endosulfan (0.01 mg/L): si nota la perdita di contatto giunzionale, il profilo fortemente irregolare a causa della presenza di invaginazioni e la fusione delle microcreste. 5000x. **B.** Epidermide dopo 14 giorni di esposizione ad endosulfan (0.1 mg/L). Le cellule appaiono appiattite ed allungate. 3150x. **C.** Dopo 14 giorni di esposizione si osserva la degenerazione cellulare in tutto lo spessore epidermico, la presenza di ampie lacune citoplasmatiche e degenerazione nucleare (0.1 mg/L). 5000x. **D.** Mitocondri danneggiati con forme atipiche e collasso delle microcreste dopo 14 giorni di esposizione ad endosulfan (0.05 mg/L). 25000x. **E.** Fibre di Ebert disperse nel citoplasma dopo 14 giorni di esposizione ad endosulfan (0.01 mg/L). 25000x.

Fig. 8. A. Epidermide dopo 20 giorni di esposizione ad endosulfan (0.01 mg/L). Sono evidenti la forte degenerazione nucleare e cellulare. 2500x. **B.** Cellula basale dopo 20 giorni di esposizione ad endosulfan (0.05 mg/L). Si nota la completa disorganizzazione degli organelli citoplasmatici. 16000x. **C.** Figure di Eberth disorganizzate dopo 20 giorni di esposizione ad endosulfan (0.1 mg/L). 25000x.

VI.2. Tossicità acuta e cronica in girini di *Rana dalmatina*

Per valutare la sensibilità della specie al pesticida, sono stati dapprima effettuati test preliminari di tossicità acuta (LC_{50} a 96 h) e successivamente sono stati osservati gli effetti di tre concentrazioni subletali di endosulfan (0.05, 0.01, 0.005 mg/L) dopo esposizione cronica.

VI.2.1. Tossicità acuta: LC_{50}

Per calcolare la LC_{50} , i dati di mortalità sono stati raggruppati con un intervallo di confidenza del 95% utilizzando il metodo secondo Finney (1971). La concentrazione nominale alla quale avviene la morte dopo 96 h del 50% del campione trattato è risultata essere pari a 0.074 mg/L di endosulfan.

La relazione tra le concentrazioni di endosulfan e il tasso di mortalità, sono mostrate in tabella 6.1 in cui la morte nel campione, la morte prevista e quella stimata sono espresse in percentuale. La mortalità prevista è intesa come la mortalità attesa quando nel gruppo di controllo non si hanno morti, la mortalità stimata è quella che si avrebbe se il modello matematico e l'esperimento fossero esattamente coincidenti. In tabella 6.2 sono riportati i valori di LC_{50} stimati, con limite di confidenza calcolato al 95%, in accordo con il metodo Finney.

Concentration (mg/L)	Number exposed	Number of dead tadpoles	Death in the bioassay	Expected death	Estimating death
Control	30	1	0.0333	0.0000	0.0312
0.050	30	8	0.2667	0.2431	0.3299
0.060	30	13	0.4333	0.4151	0.4007
0.070	30	15	0.5000	0.4839	0.04766
0.080	30	17	0.5667	0.5527	0.5369
0.090	30	18	0.6000	0.5871	0.5894
0.10	30	22	0.7333	0.7248	0.6351
0.20	30	27	0.9000	0.8968	0.8710
0.30	30	27	0.9000	0.8968	0.9442

Tab. 6.1. Relazione fra le concentrazioni di endosulfan e il tasso di mortalità di *Rana dalmatina*.

Point	Concentration (mg/L)	95% confidence limits	
		Lower	Upper
LC 1.00	0.009	0.003	0.017
LC 5.00	0.017	0.007	0.027
LC 10.00	0.024	0.012	0.034
LC 15.00	0.030	0.016	0.040
LC 50.00	0.074	0.059	0.087
LC 85.00	0.184	0.145	0.279
LC 90.00	0.228	0.173	0.381
LC 95.00	0.315	0.222	0.611
LC 99.00	0.574	0.352	1.490

Tab. 6.2. Valori di LC₅₀ stimati e limiti di confidenza

VI.2.2. Tossicità cronica

Dopo aver individuato la LC₅₀, sono stati indagati gli effetti dell'esposizione cronica alle concentrazioni di 0.05, 0.01, 0.005 mg endosulfan/L durante lo sviluppo larvale.

Per valutare la tossicità cronica del pesticida, sono state analizzate: la sopravvivenza,

la massa larvale, lo stadio di sviluppo, massa e sopravvivenza alla metamorfosi, nonché la presenza di deformità durante il periodo di esposizione di 56 giorni. Inoltre, alterazioni comportamentali dell'attività di nuoto sono state analizzate dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di esposizione.

VI.2.2.1. Mortalità

L'esposizione ad endosulfan ha causato, rispetto al controllo, una mortalità altamente significativa nel gruppo esposto a 0.05 mg/L (high) ($p < 0.001$) a partire dal 28° giorno di trattamento ed alla fine dell'esperimento, nessuno dei girini esposti a tale concentrazione è sopravvissuto (fig. 6.1). Dopo 42 giorni di esposizione, nel gruppo esposto a 0.01 mg endosulfan /L (medium) è stata rilevata una significativa mortalità rispetto al controllo ($p < 0.05$ e $p < 0.001$). Nel gruppo esposto a 0.005 mg endosulfan/L (low) è stata riscontrato, dopo 42 giorni di trattamento, una mortalità leggermente significativa ($p < 0.05$) rispetto al gruppo di controllo (fig. 6.1).

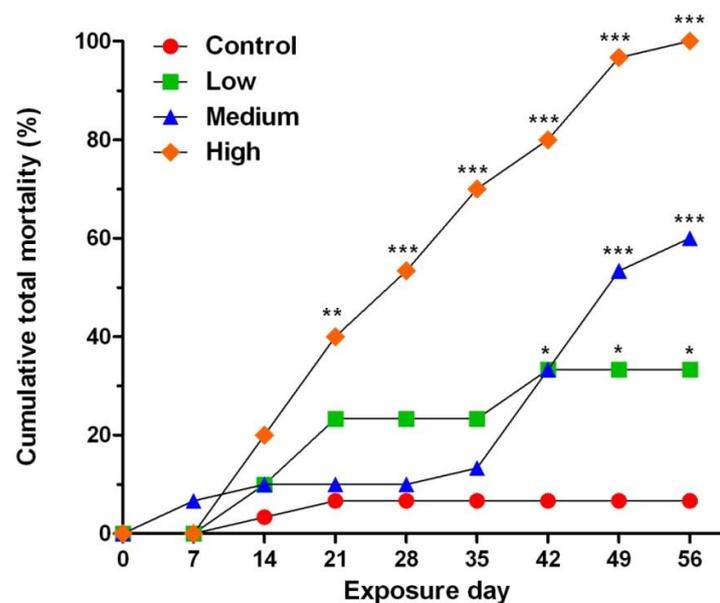


Fig. 6.1 Mortalità cumulativa (%) in *Rana dalmatina* durante il periodo di esposizione ad endosulfan (0.05, 0.01 e 0.005 mg/L) dallo stadio 25 al 46 secondo Gosner. Significatività rispetto al gruppo di controllo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Fisher's exact test). Le barre indicano la media \pm S.D.

VI.2.2.2. Crescita e stadio di sviluppo

Gli effetti dell'endosulfan sulla crescita sono stati valutati misurando il peso corporeo e la lunghezza bocca-ano.

Durante tutto il periodo di esposizione, l'endosulfan ha causato effetti significativi sulla massa e sulla lunghezza del corpo dei girini esposti a 0.01 e 0.05 mg endosulfan/L ($p < 0.001$) rispetto al gruppo di controllo (figg. 6.2, 6.3, 6.4). Invece, nel gruppo esposto a 0.005 mg endosulfan/L, è stata osservata una tendenza ad avere una minore massa e lunghezza corporea rispetto al gruppo di controllo solo al settimo giorno di esposizione ($p < 0.01$) (figg. 6.2, 6.3).

Durante il climax metamorfico una perdita di peso fisiologica è stata osservata sia nel gruppo di controllo che nel gruppo esposto alla più bassa concentrazione di endosulfan (figg. 6.2).

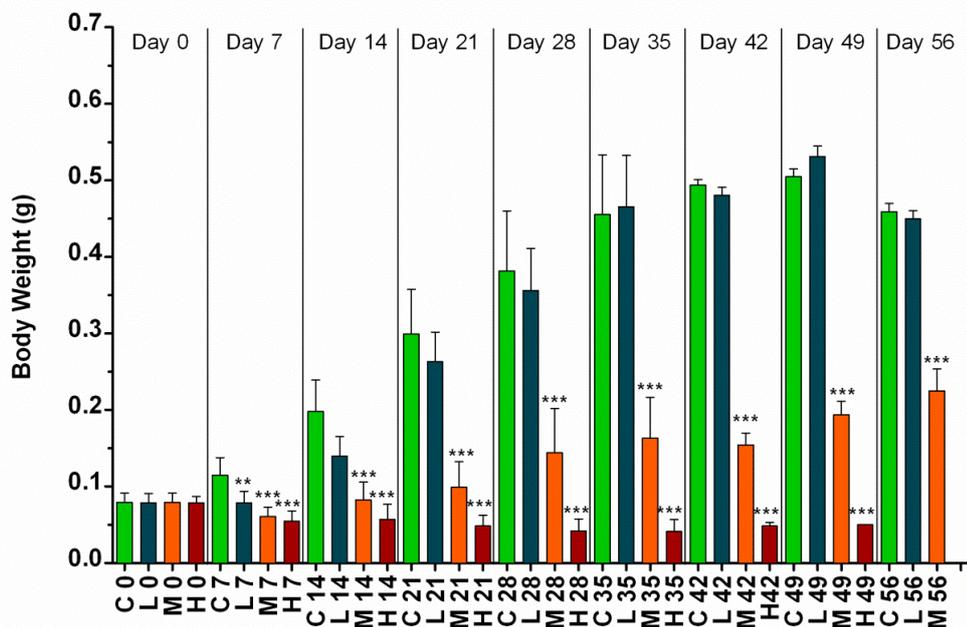


Fig. 6.2 Massa (g) dei girini di *Rana dalmatina* durante il periodo di esposizione ad endosulfan (0.05, 0.01, 0.005 mg/L) dallo stadio 25 al 46 di Gosner. Significatività rispetto al gruppo di controllo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test). Le barre indicano la media \pm S.D. H= 0.05 mg/L; M= 0.01 mg/L; L= 0.005 mg/L; C= controllo.

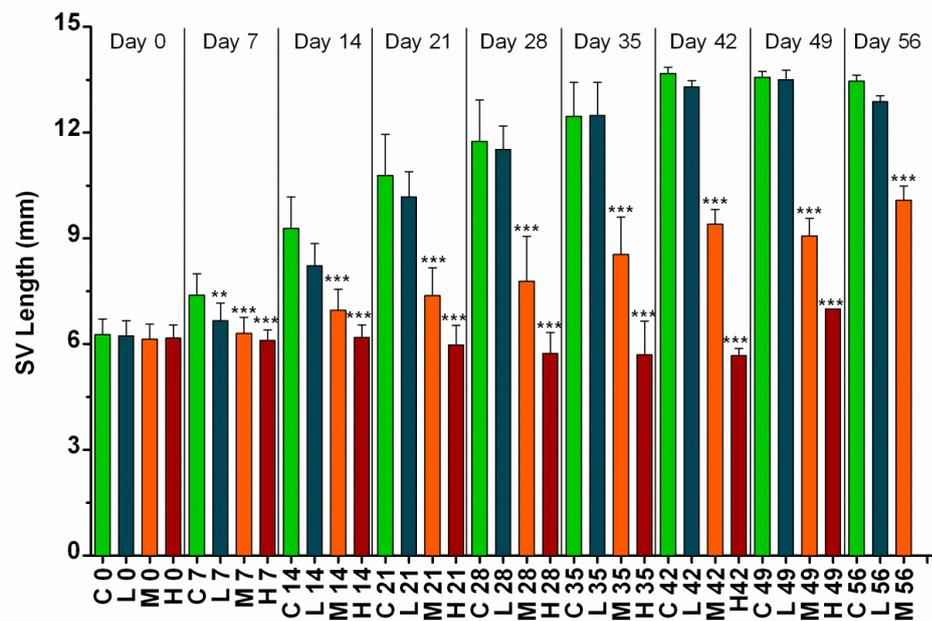


Fig. 6.3 Lunghezza SV (mm) dei girini di *Rana dalmatina* durante il periodo di esposizione ad endosulfan (0.05, 0.01, 0.005 mg/L) dallo stadio 25 al 46 di Gosner. Significatività rispetto al gruppo di controllo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test). Le barre indicano la media \pm S.D. H= 0.05 mg/L; M= 0.01 mg/L; L= 0.005 mg/L; C= controllo.



Fig. 6.4. Girini di *Rana dalmatina* esposti a 0.05 (H), 0.01 (M), 0.005 (L) mg endosulfan/L e girino del gruppo di controllo (C) dopo 28 giorni di esposizione.

Durante l'intero periodo di esposizione è stato rilevato un significativo ritardo nello sviluppo larvale nei girini esposti a 0.01 e 0.05 mg endosulfan/L ed in misura maggiore, a 0.05 mg endosulfan/L, ($p < 0.001$) (Figg. 6.5 e 6.6). I girini appartenenti a

questi due gruppi infatti, hanno subito un ritardo nello sviluppo o sono stati bloccati nella progressione dello stadio di sviluppo rispetto a quanto è stato osservato nel gruppo di controllo e nel gruppo esposto alla bassa concentrazione (Figg. 6.5 e 6.6).

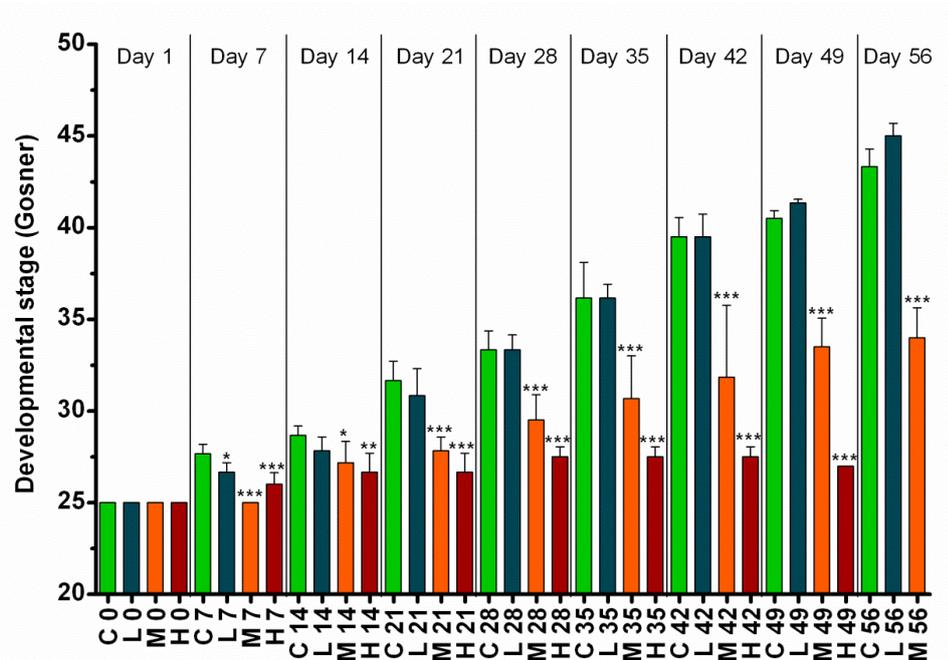


Fig. 6.5 Stadio di sviluppo (Gosner) dei girini di *Rana dalmatina* durante il periodo di esposizione ad endosulfan (0.05, 0.01 e 0.005 mg/L) dallo stadio 25 al 46 di Gosner. Significatività rispetto al gruppo di controllo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test). Le barre indicano la media \pm S.D. H= 0.05 mg/L; M= 0.01 mg/L; L= 0.005 mg/L; C= controllo.



Fig. 6.6 Girini esposti a 0.05(H), 0.01 (M), 0.005 (L) mg endosulfan /L e girino del gruppo di controllo (C) dopo 49 giorni di esposizione.

VI.2.2.3. Metamorfosi

Nessun individuo esposto alle due concentrazioni più elevate da noi testate ha raggiunto la metamorfosi. Soltanto i girini esposti a 0.005 mg endosulfan/L hanno raggiunto e completato con successo la metamorfosi così come i girini appartenenti al gruppo di controllo. Non sono state osservate differenze significative nella massa alla metamorfosi (vedi fig. 6.2) tra il gruppo esposto alla concentrazione più bassa di endosulfan ed il gruppo di controllo ma, i girini esposti a 0.005 mg endosulfan/L hanno impiegato un tempo significativamente minore ($p < 0.001$) per completare la metamorfosi (fig. 6.7).

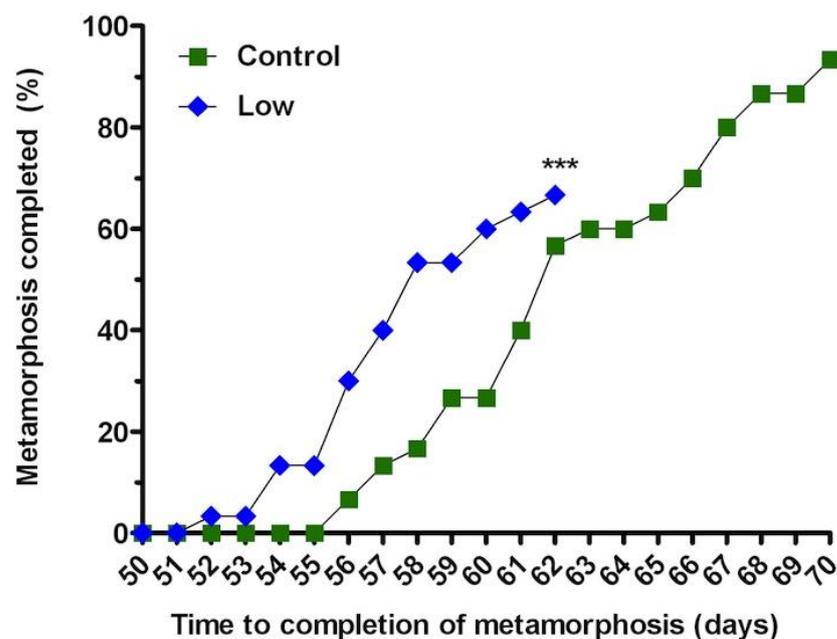


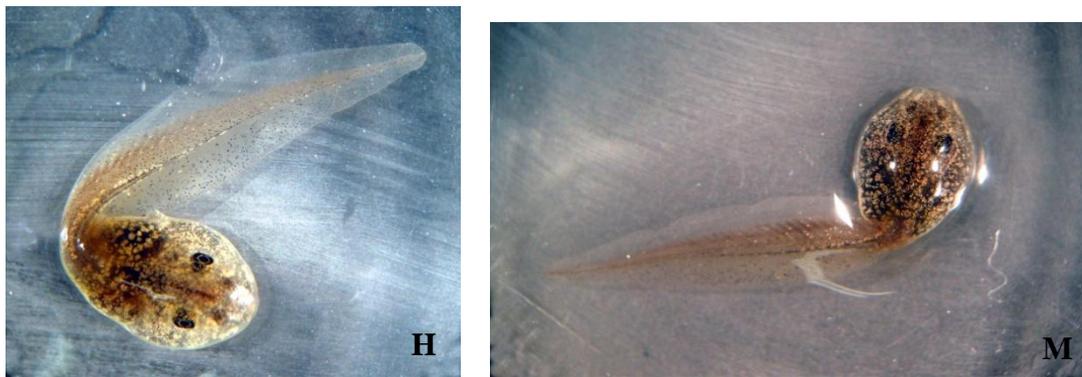
Fig. 6.7 percentuale di individui che completano la metamorfosi (%) e tempo impiegato per raggiungerla (giorni) nei girini esposti a 0.005 mg endosulfan/L e nei girini del gruppo di controllo. Significatività *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney test).

VI.2.2.4. Deformità

L'endosulfan ha causato deformità dopo solo 5 giorni di esposizione in alcuni individui esposti a 0.05 mg endosulfan/L e, dopo 19 giorni, l'incidenza delle

deformità è risultata del 100%. Anche nel gruppo esposto 0.05 mg endosulfan/L, dopo 11 giorni di esposizione, alcuni individui mostravano severe deformità. Le principali malformazioni osservate sono state: edema, coda ricurva o asimmetrica e deviazioni scheletriche (Figg. 6.8 e 6.9).

Negli individui esposti 0.005 mg endosulfan/L, non è stata osservata la presenza di deformità.



Figg. 6.8-9. Girini esposti a 0.05 (H) e 0.01 (M) mg endosulfan/L osservati mediante stereomicroscopio.

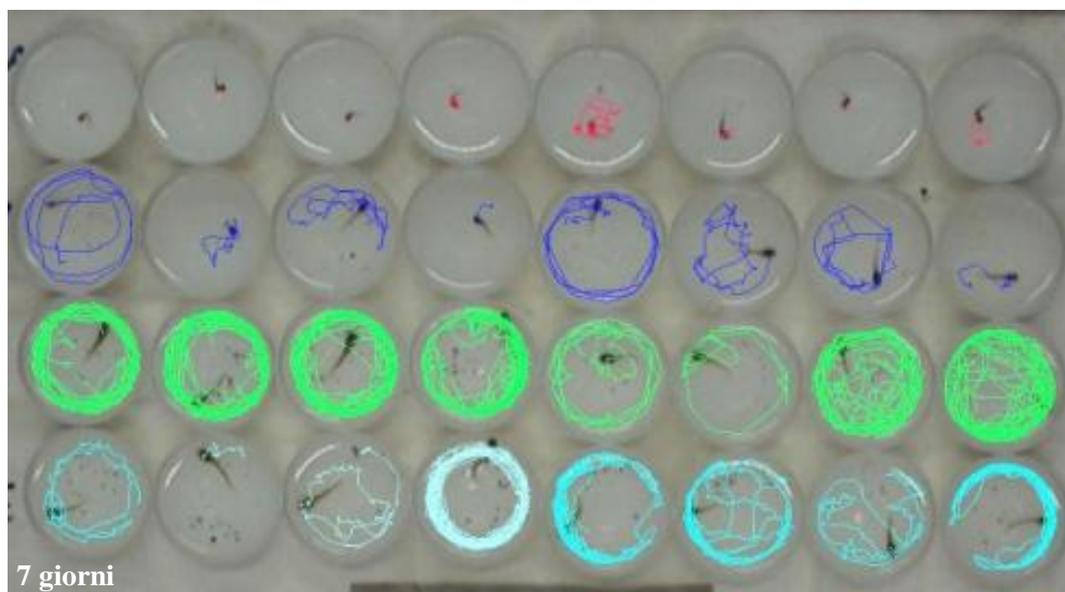
VI.2.2.5. Analisi comportamentale: attività di nuoto

Diversi parametri comportamentali quali la distanza totale percorsa, la velocità media, l'immobilità e l'uso dello spazio, sono stati analizzati per studiare gli effetti dell'esposizione cronica ad endosulfan sull'attività di nuoto.

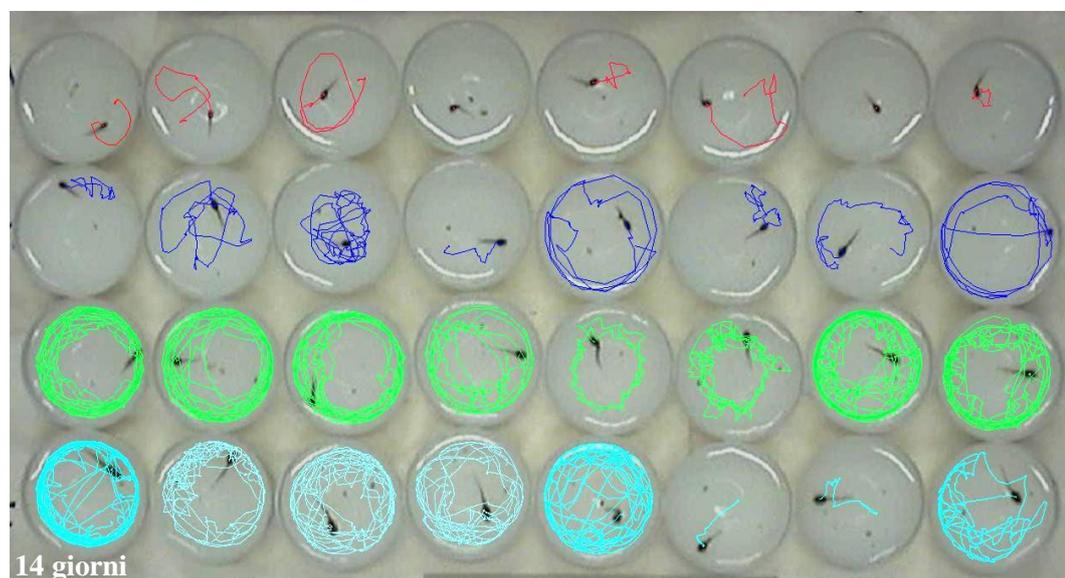
Mediante il software Ethovision è stato tracciato il percorso effettuato dai girini durante il periodo di registrazione dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di esposizione al pesticida (fig. 6.10 a,b,c,d).

È possibile osservare come, già dopo sette giorni di esposizione, vi siano differenze nel percorso ottenuto dai girini esposti a 0.05 e 0.01 mg endosulfan/L rispetto agli esemplari esposti a 0.005 mg endosulfan/L ed al controllo (fig.6. 10 a,b,c,d). Anche la mobilità dei girini esposti 0.01 ed in particolar modo a 0.05 mg endosulfan/L, è

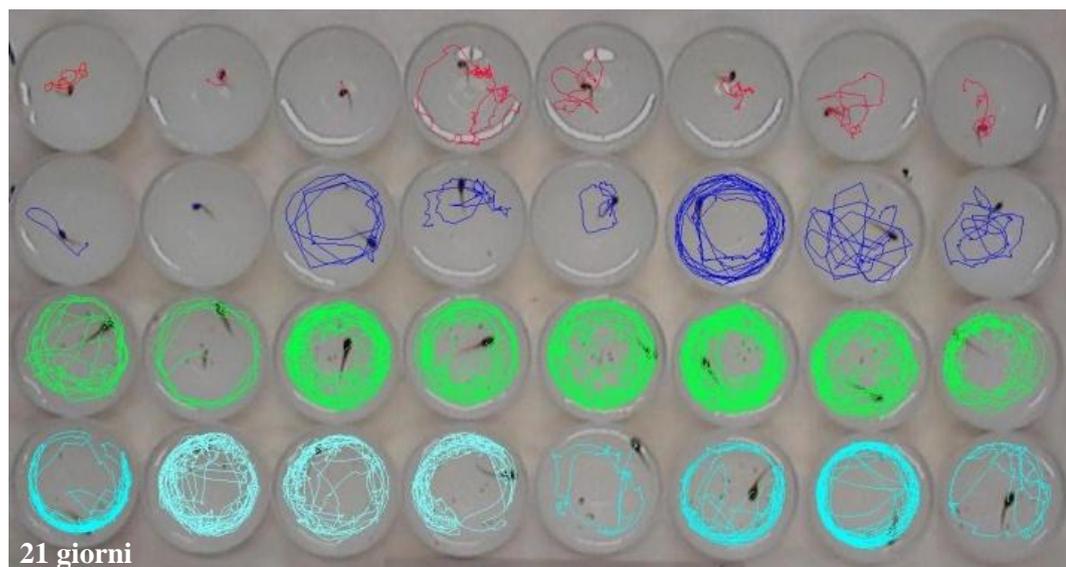
risultata notevolmente inferiore rispetto al controllo e al gruppo esposto a 0.005 mg endosulfan/L. Questo dato preliminare permette di avere un quadro generale dell'effetto del pesticida sull'attività di nuoto.



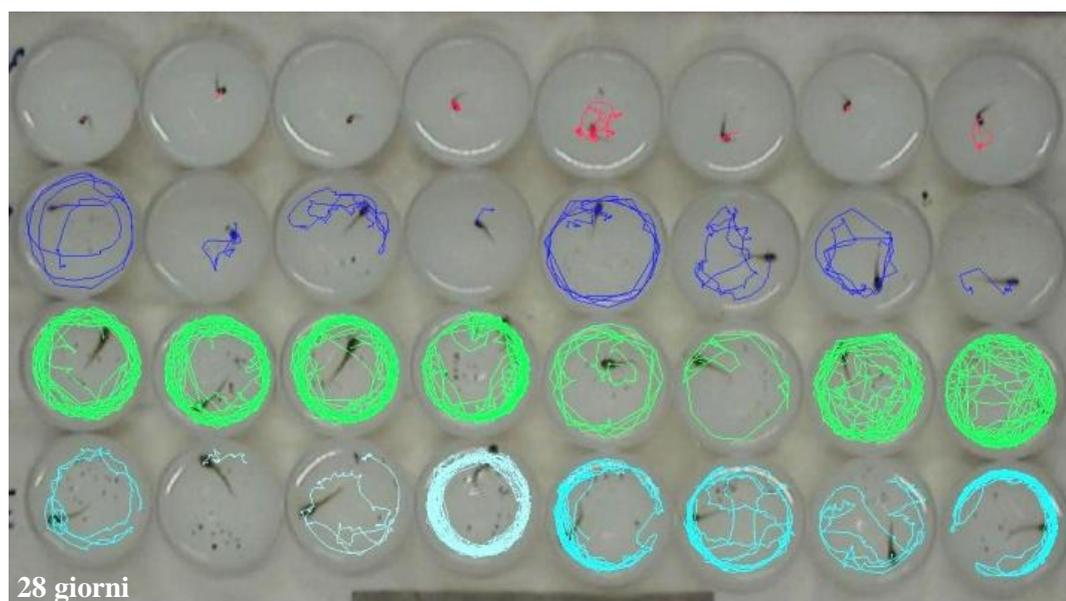
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 6.10 Track dei girini di *Rana dalmatina* ottenuti con Ethovision dopo 15 minuti di registrazione per i giorni di esposizione 7, 14, 21 e 28 (a, b, c, d). In rosso, blu, verde e celeste sono indicati, rispettivamente, i percorsi ottenuti dai girini esposti a 0.05, 0.01, 0.005 mg endosulfan/L e dal controllo.

Distanza percorsa

L'esposizione al pesticida ha mostrato effetti significativi sulla distanza totale (cm) percorsa dai girini durante l'intero periodo di analisi (fig.6.11a). Gli animali esposti alla più bassa concentrazione di endosulfan non differivano rispetto al controllo. Al contrario, i girini esposti a 0.01 e 0.05 mg endosulfan/L, hanno coperto distanze significativamente minori rispetto al gruppo di controllo già a partire dal settimo giorno di esposizione. In particolare, il gruppo esposto a 0.05 mg endosulfan/L presentava differenze molto significative rispetto al controllo durante tutti i test effettuati ($p < 0.001$). Una significativa variabilità nell'attività degli esemplari esposti a 0.01 mg endosulfan/L è stata osservata durante il periodo di esposizione ($p < 0.001$ al 7° giorno, $p < 0.05$ al 14° giorno, $p < 0.01$ al 21° giorno e $p < 0.05$ al 28° giorno).

Velocità

I soggetti esposti alle due concentrazioni più alte nuotavano con una velocità significativamente inferiore rispetto al controllo già a partire dal settimo giorno di esposizione (fig.6.11b). Nello specifico, il gruppo esposto a 0.05 mg endosulfan/L ha mostrato differenze altamente significative rispetto al controllo durante tutti i test ($p < 0.001$). Negli esemplari esposti a 0.01 mg endosulfan/L è stata rilevata una significativa variabilità nella velocità durante il periodo di esposizione ($p < 0.001$ al 7° giorno, $p < 0.05$ al 14° giorno, $p < 0.01$ al 21° giorno e $p < 0.05$ al 28° giorno). Al contrario, il gruppo esposto a 0.005 mg endosulfan/L non mostrava alcuna differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

Immobilità

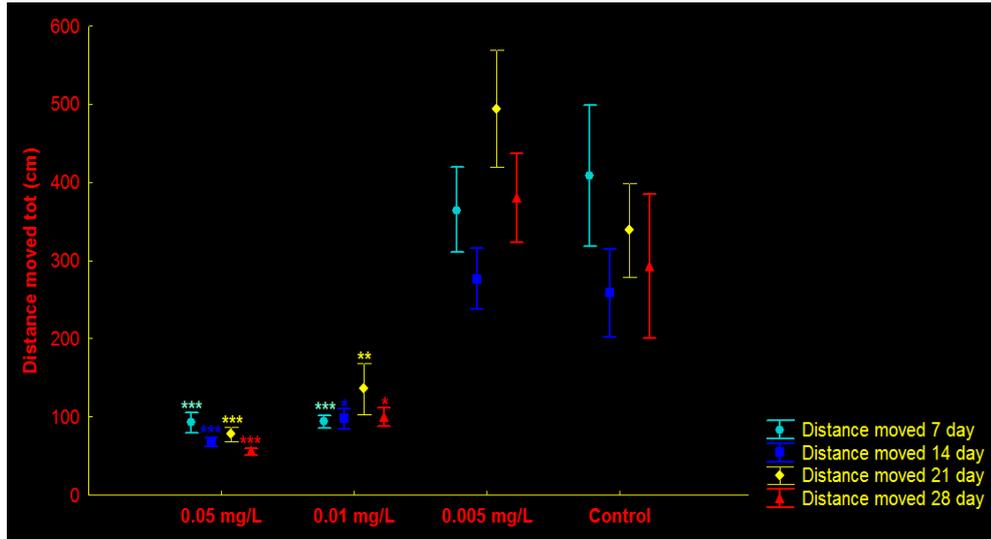
La mobilità dei girini esposti a 0.01 e 0.05 mg endosulfan/L è stata fortemente compromessa dal trattamento con endosulfan (fig.6.16c). Una significativa

immobilità (resting), è stata evidenziata già al settimo giorno di esposizione nei gruppi esposti alle due concentrazioni più alte e si è mantenuta in maniera significativa per tutto il periodo di test ($p < 0.001$ al 7° giorno, $p < 0.001$ al 14° giorno, $p < 0.001$ al 21° giorno e $p < 0.01$ al 28° giorno dopo esposizione a 0.05 mg/L; $p > 0.01$ al 7° giorno, $p < 0.01$ il 14° giorno, $p < 0.001$ il 21° giorno e $p < 0.01$ il 28° giorno dopo esposizione a 0.01 mg/L). Il gruppo esposto a 0.005 mg endosulfan/L, anche in questo caso, non ha mostrato alcuna differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

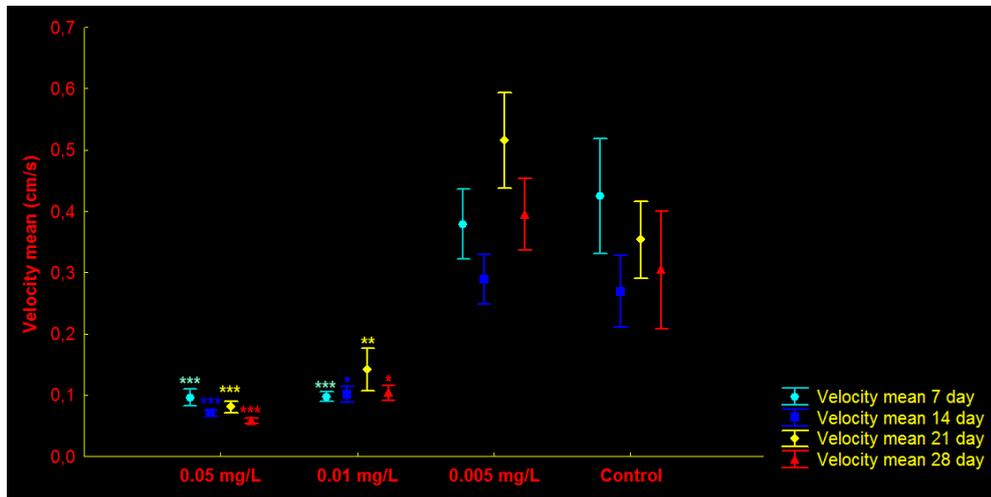
Uso dello spazio

Per valutare la capacità di utilizzo dello spazio nell'arena sono state considerate due variabili: la distanza media percorsa (cm) dal bordo dell'arena (distance to zone) e la distanza media percorsa (cm) dal centro dell'arena (distance to point). L'endosulfan ha inciso negativamente sulla capacità di utilizzare lo spazio nei girini esposti a 0.01 e 0.05 mg endosulfan/L e differenze significative rispetto al controllo sono emerse per entrambe le variabili analizzate durante tutto il periodo di test fatta eccezione per il 14° giorno di esposizione nel gruppo esposto a 0.01 mg endosulfan/L (figs.6.11d, 6.11e). La distanza dal bordo dell'arena è risultata significativamente differente rispetto al controllo nel gruppo esposto a 0.05 mg endosulfan/L ($p < 0.001$ al 7° giorno, $p < 0.05$ al 14° giorno, $p < 0.001$ al 21° giorno e $p < 0.001$ al 28° giorno) e nel gruppo esposto a 0.01 mg endosulfan/L ($p < 0.001$ al 7° giorno, $p < 0.001$ al 21° giorno e $p < 0.001$ al 28° giorno) (fig.6.11d). Anche per la distanza dal centro dell'arena, è stato riscontrato un andamento simile (0.05 mg endosulfan/L: $p < 0.001$ al 7° giorno, $p < 0.01$ al 14° giorno, $p < 0.001$ al 21° giorno e $p < 0.001$ al 28° giorno; 0.01 mg endosulfan/L: $p < 0.01$ al 7° giorno, $p < 0.05$ al 21° giorno e $p < 0.01$ al 28° giorno)

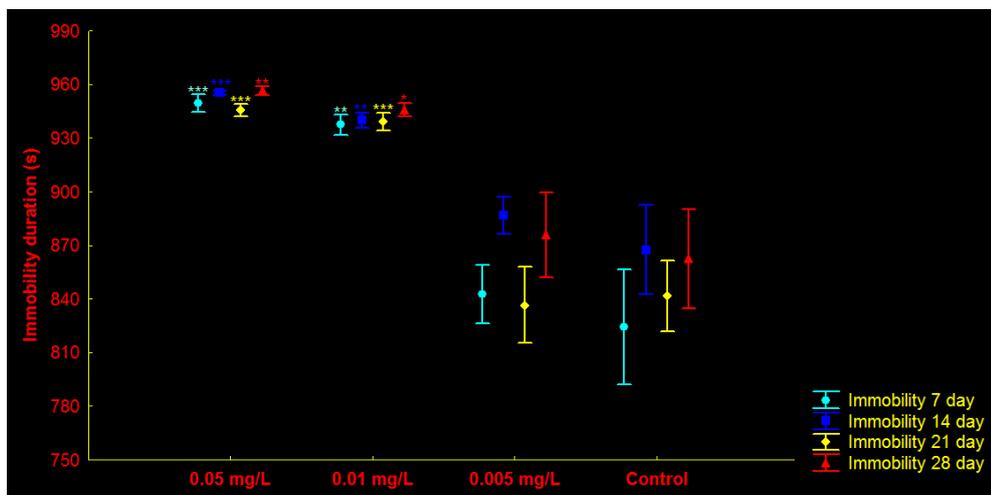
(fig.6.11e). Nelle figure 6.12-6.13 sono mostrati i percorsi ottenuti dai girini dei gruppi trattati e da quelli del gruppo di controllo per le due variabili considerate per indagare la capacità dell'uso dello spazio: "distance to zone" (fig. 6.12) e "distance to point" (fig.6.13) dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di esposizione. È stato osservato, dunque, che i girini esposti a 0.01 mg endosulfan/L ed, in particolar modo, a 0.05 mg endosulfan/L tendevano a rimanere per la maggior parte del tempo nella zona centrale dell'arena muovendosi in modo irregolare (fig. 6.12 a,b,c,d) rispetto al controllo e ai girini esposti a 0.005 mg endosulfan/L che, al contrario, mostrano movimenti abbastanza regolari e circolari, soprattutto nella zona periferica dell'arena durante tutto il periodo di esposizione (fig.6.13 a,b,c,d).



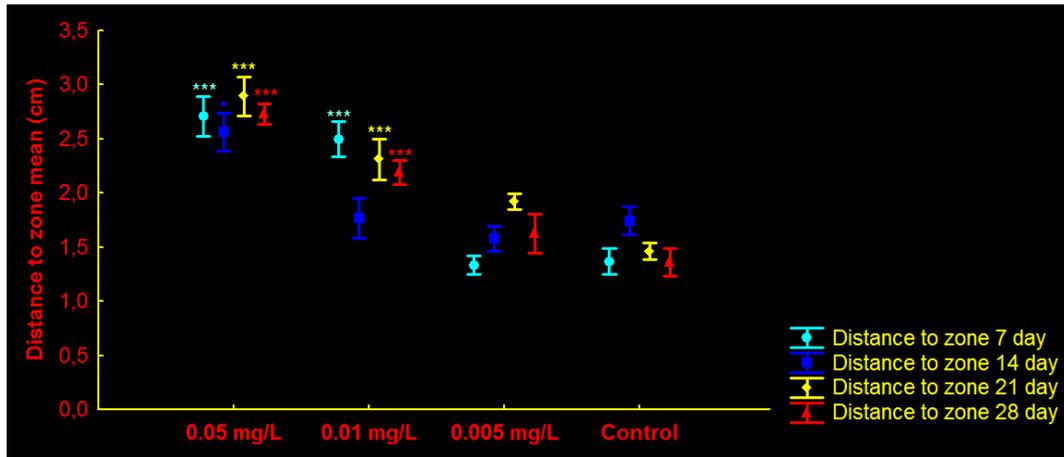
(a)



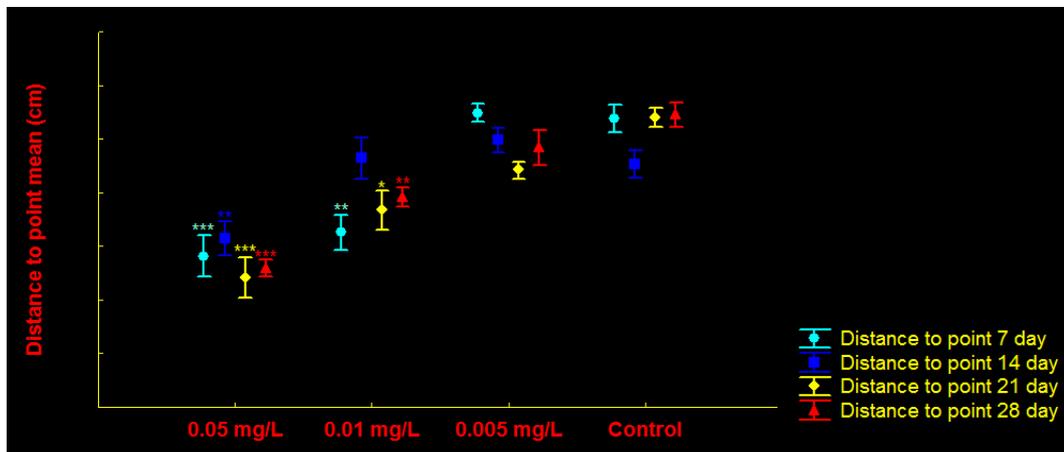
(b)



(c)

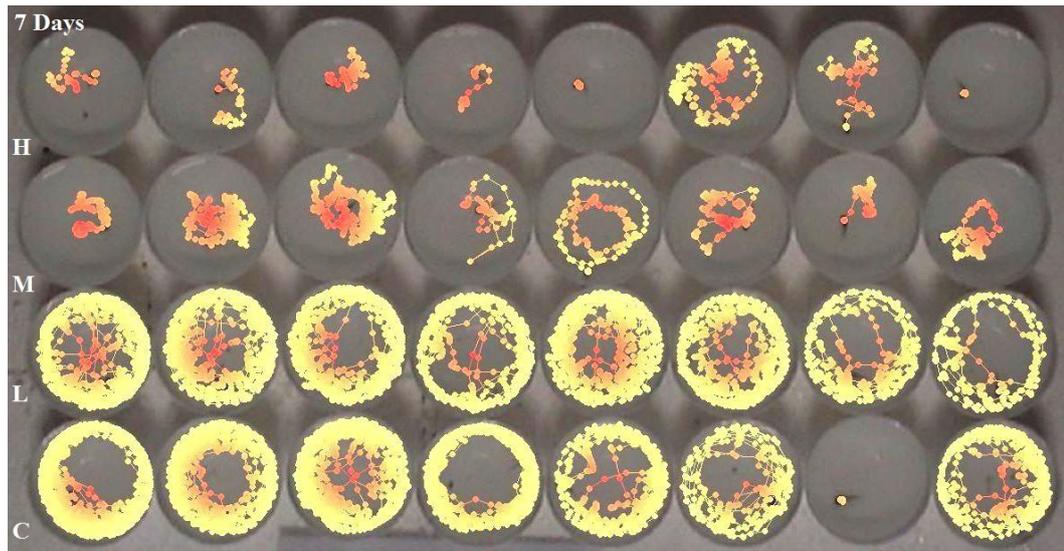


(d)

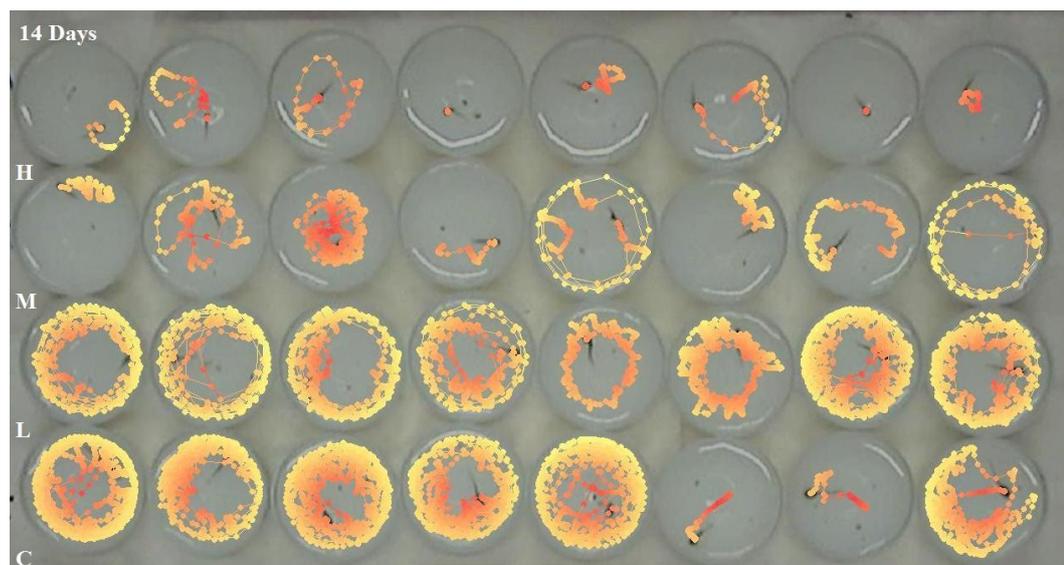


(e)

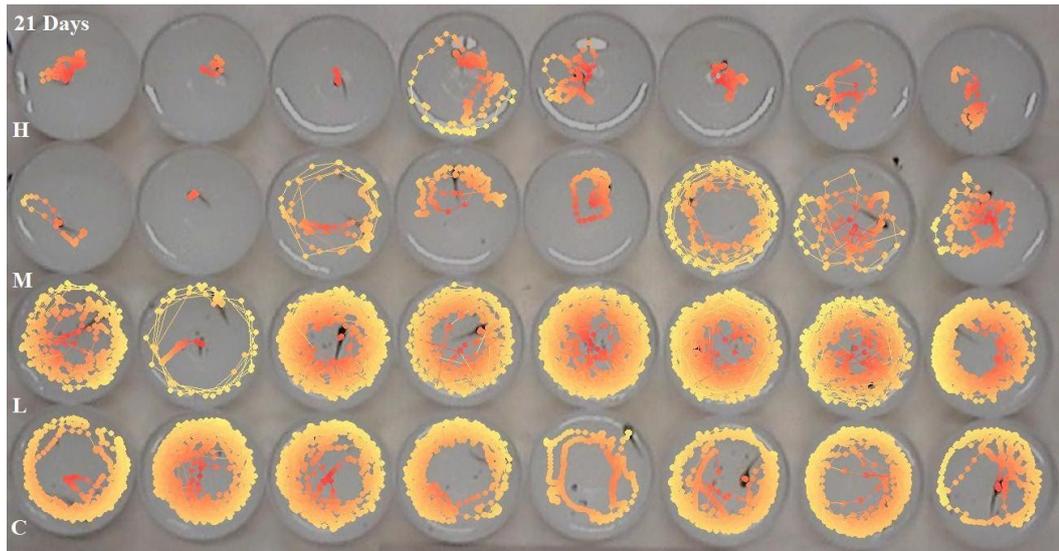
Fig.6.11. Distanza percorsa (a), velocità (b), immobilità, (c), distanza dal bordo dell'arena (d) e distanza dal centro dell'arena (e) dei girini di *Rana dalmatina* trattati (0.05 mg/L, 0.01 mg/L e 0.005 mg/L di endosulfan) e del controllo, rilevate con Ethovision dopo 7, 14, 21 e 28 giorni e analizzate mediante il programma Statistica. Sono mostrate la media \pm S.D. Significatività rispetto al gruppo di controllo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Post Hoc tests, Unequal N HSD).



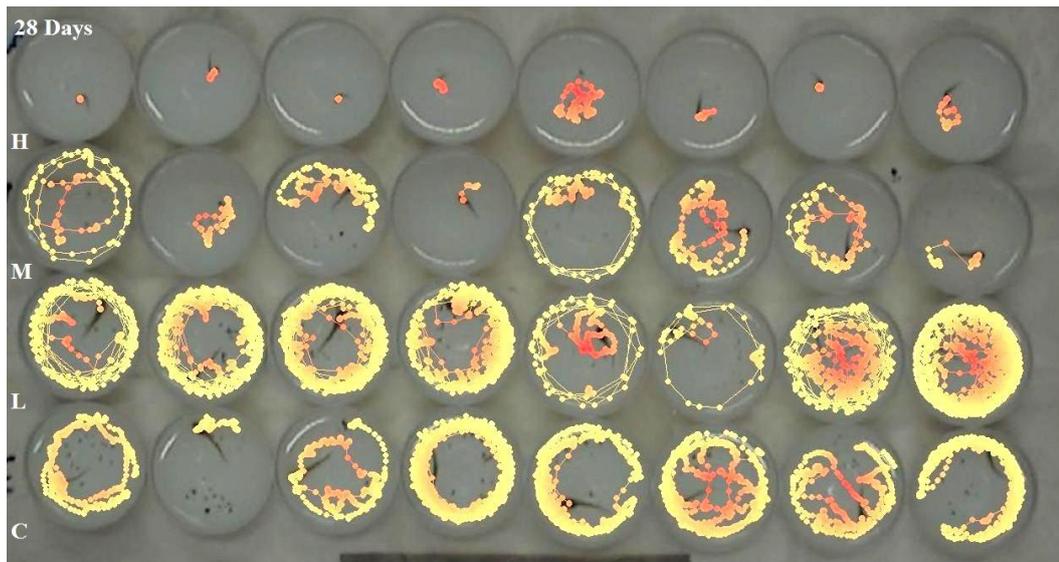
(a)



(b)

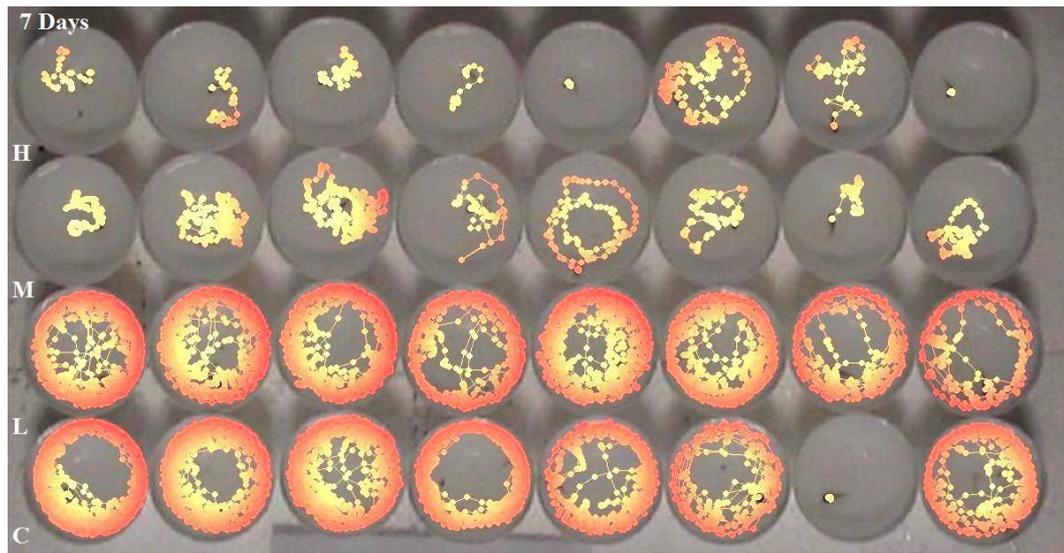


(c)

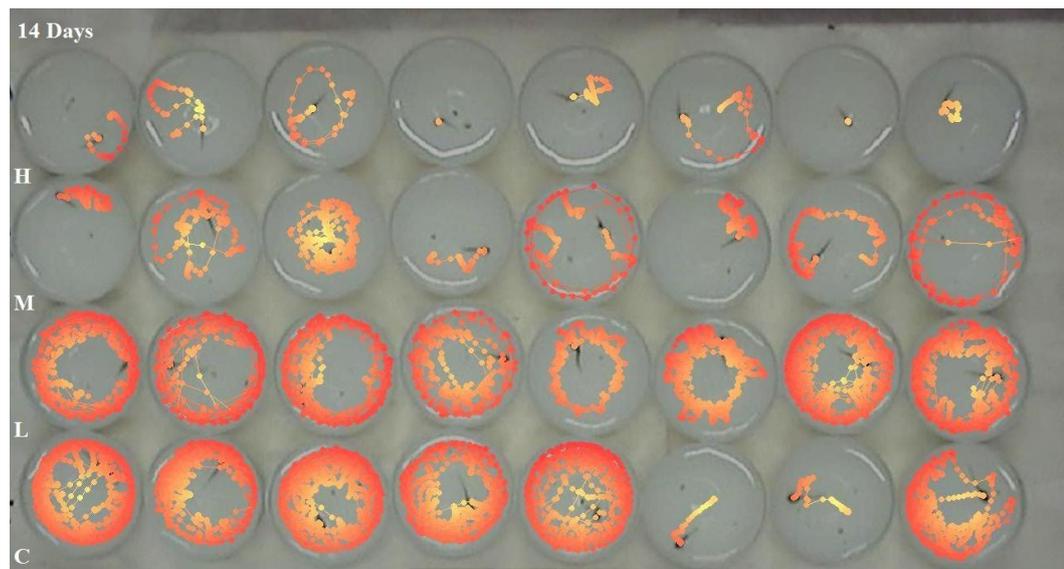


(d)

Fig.6.12 Variabile “distance to zone” dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di esposizione (a,b,c,d) in cui sono evidenziati i tracks relativi alla capacità di utilizzare lo spazio. La gradazione di giallo-rosso indica una minore/maggiore intensità del parametro analizzato; H= 0.05 mg endosulfan/L, M = 0.01 mg endosulfan/ L; L = 0.005 mg endosulfan/L e C = controllo.



(a)



(b)

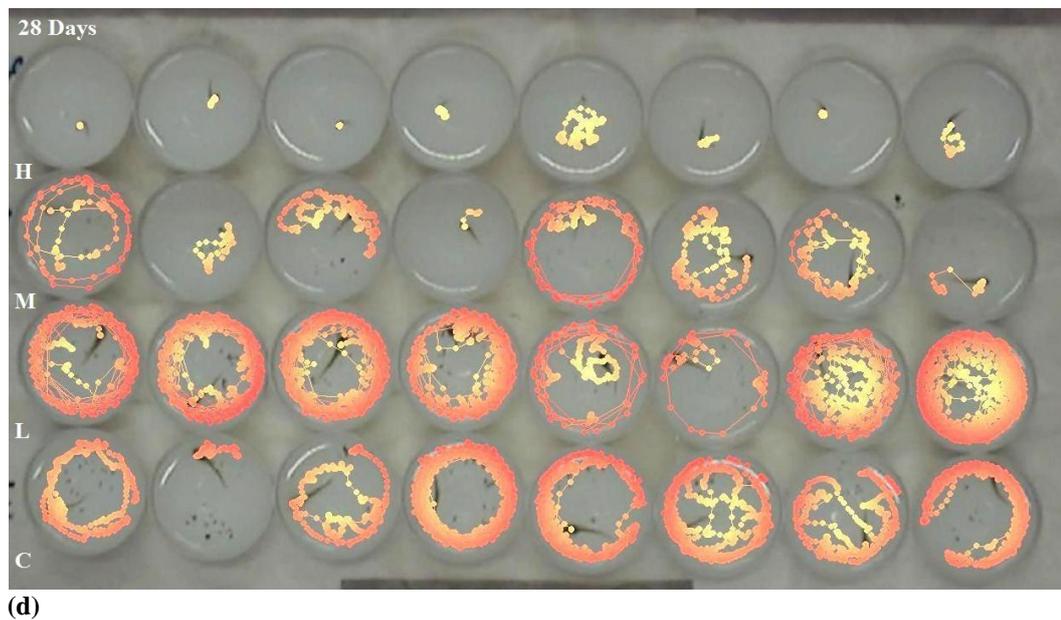


Fig.6.13 Variabile “distance to point” dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di esposizione (a,b,c,d) in cui sono evidenziati i tracks relativi alla capacità di utilizzare lo spazio. La gradazione di giallo-rosso indica una minore/maggiore intensità del parametro analizzato; H = 0.05 mg endosulfan/L, M = 0.01 mg endosulfan/L; L = 0.005 mg endosulfan/L e C = controllo.

Osservazioni visuali

Le osservazioni visuali sono state effettuate giornalmente per indagare, da un punto di vista qualitativo, il trend comportamentale dei girini di *Rana dalmatina* esposti alle differenti concentrazioni di endosulfan. Gli effetti sul comportamento degli animali sono stati osservati già il primo giorno di esposizione al pesticida in alcuni girini (2 esposti a 0.01 mg endosulfan/L, 1 esposto a 0.05 mg endosulfan/L) che erano soggetti a convulsioni. Il secondo giorno di esposizione, insieme al comportamento convulsivo, alcuni girini esposti ad entrambe le concentrazioni, mostravano delle irregolarità nell'attività di nuoto quali body twisting. L'associazione di movimenti convulsivi e di body twisting è stato definito "swirling" e, già dopo la prima settimana di esposizione, tutti i girini esposti alla più alta concentrazione di endosulfan ed alcuni esposti a 0.01 mg endosulfan/L, mostravano tale anomalia di comportamento.

Altre anomalie riscontrate nei girini esposti alle due concentrazioni più alte, già dalla prima settimana di esposizione, sono state: la posizione "a ventre su" e l'adagiamento sul fianco durante la fase di resting (fig.6.14).



Fig.6.14. Girini esposti a 0.05 mg/L di endosulfan. Sulla sinistra, girino adagiato sul fondo con il ventre su. Sulla destra, girino adagiato sul fianco.

Dopo la seconda settimana di esposizione, tutti i girini esposti a 0.05 mg endosulfan/L erano soggetti a swirling e mostravano la posizione “a ventre su” e l’adagiamento sul fianco, arrivando ad una completa immobilità dopo 20 giorni di esposizione. In tal caso, se mossi forzatamente, subivano lo “swirling”.

Durante la seconda settimana di esposizione i girini esposti a 0.01 mg endosulfan/L concentrazione di endosulfan iniziavano a mostrare una certa variabilità nel comportamento, alcuni girini mostravano le anomalie già descritte, altri sembravano reagire positivamente mantenendo un comportamento regolare, tuttavia, dopo un mese di esposizione la maggior parte dei girini mostravano swirling.

CAPITOLO VII

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'ampio utilizzo di pesticidi e diserbanti per finalità agricole rappresenta oggi uno dei problemi ecologici di maggior rilievo. La valutazione delle conseguenze sull'ecosistema può essere valutata utilizzando diversi approcci, tuttavia è importante considerare le modalità oltre che le quantità dell'immissione in particolar modo delle sostanze utilizzate in agricoltura (Houlahan e Findlay, 2003; Bridges *et al.*, 2004; Mann *et al.*, 2009).

E' noto infatti che le quantità di pesticida utilizzate variano con il variare delle attività agro-colturali e che spesso il prolungarsi di una esposizione a basse concentrazioni può sortire effetti di maggior rilievo rispetto ad una esposizione acuta nel breve periodo. Mimare un'esposizione cronica acquista quindi un'importante implicazione ecologica. Inoltre, per quanto riguarda gli ambienti acquatici cui le sostanze giungono oltre che per aspersione diretta anche per dilavamento e scorrimento superficiale, gli effetti sono strettamente correlati con le dimensioni del corpo idrico.

Per quanto riguarda il pesticida da noi utilizzato la sua emivita in acqua è compresa tra 35 e 150 giorni (EPA 2001) ed è pertanto molto probabile che esso raggiunga i corpi d'acqua durante la primavera-estate quando molte specie di anfibi si riproducono ed embrioni e larve si sviluppano.

Le conseguenze di una esposizione a concentrazioni di endosulfan rilevabili in natura (0.001 - 0.2 mg/L), possono gravemente alterare le dinamiche di popolazione negli

Anfibi influenzando negativamente la sopravvivenza, la crescita e lo sviluppo, la metamorfosi, deformità, alterazioni morfologiche e comportamentali (Rohr *et al.*, 2003; Bernabò *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; Sparling e Fellers, 2009).

Il presente lavoro ha inteso dunque valutare gli effetti di un'esposizione cronica a concentrazioni subletali di endosulfan su due specie di Anuri durante la fase larvale confermando che l'endosulfan può essere considerato una minaccia per le popolazioni di Anfibi.

VII.1. Ultrastruttura dell'epidermide di girini di *Bufo bufo*

Recentemente è stato dimostrato che concentrazioni subletali di endosulfan inducono alterazioni morfologiche ed ultrastrutturali nelle branchie di *Bufo bufo* (Bernabò *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2010). I nostri risultati hanno dimostrato che queste stesse concentrazioni producono effetti negativi anche sull'epidermide larvale. Le nostre osservazioni hanno mostrato una maggiore intensità delle alterazioni morfologiche ed ultrastrutturali all'aumentare del tempo di esposizione.

L'esposizione ad endosulfan ha indotto nell'epidermide un aumento della secrezione mucosa e la comparsa di vescicole secretrici di grandi dimensioni. In condizioni basali, la secrezione del muco presente nei granuli subapicali delle cellule pavimentose ha la funzione di facilitare lo scambio dei gas. (Kato e Kurihara, 1988).

L'eccesso di muco osservato durante il periodo di esposizione può essere considerato come un tentativo di difesa mirato a contenere l'ulteriore ingresso di contaminante; tale risposta è stata già osservata nell'epitelio branchiale di *Bufo bufo* dopo esposizione ad endosulfan (Bernabò *et al.*, 2008) e, per quanto riguarda i Pesci,

nell'epidermide di *Heteropneustes fossilis* esposto ad endosulfan (Zaccone *et al.*, 1989). Un'elevata secrezione di muco viene riscontrata anche in seguito a perturbazioni diverse dell'habitat acquatico facendo supporre che la maggiore attività di secrezione sia una risposta di tipo aspecifico allo stress. In ogni caso, l'eccesso di muco rende estremamente difficoltosi gli scambi respiratori provocando, in ultima istanza, un'aggravarsi delle condizioni di ipossia, come riportato in numerosi teleostei (Franklin, 1990). La presenza di vescicole di secrezione è stata precedentemente descritta nelle branchie di *Triturus vittatus* (Warburg e Rosenberg, 1997) e nell'epidermide ventrale di *Pelobates syriacus* (Rosenberg e Warburg, 1992, 1993). Queste vescicole tuttavia non sono state da noi riscontrate nell'epidermide degli esemplari di controllo e rappresentano quindi una risposta alla presenza dell'inquinante.

L'aumento degli spazi intercellulari, che appare dopo 96 h di esposizione e l'alterazione delle interazioni cellula-cellula, è uno dei meccanismi implicati nei fenomeni di degenerazione. In accordo con Lajamanovich e collaboratori (1998) l'aumento degli spazi intercellulari può riflettere l'afflusso di fluidi come risultato di una risposta infiammatoria all'endosulfan. Inoltre, è interessante notare che le giunzioni epidermide-derma nello strato basale risultano completamente compromesse alla fine del periodo di esposizione.

Le cellule basali subiscono severe alterazioni in seguito alla disorganizzazione delle figure Eberth; questi fasci di tonofilamenti sono tipici di questa tipologia cellulare, svolgono una funzione protettiva e agiscono come stabilizzatori del movimento; esse inoltre rappresentano una riserva di citocheratine da utilizzare durante la divisione cellulare (Fox, 1992). Alterazioni simili sono state osservate in *Rana kl. esculenta*

dopo esposizione ad heptachlor (Fenoglio *et al.*, 2009).

L'epidermide adulta si origina, alla metamorfosi, a partire dalle cellule basali (Yoshizato, 1992; Izutsu *et al.*, 1993; Kawai *et al.*, 1994; Tamakoshi *et al.*, 1998; Utoh *et al.*, 2000) e tale processo dipende dall'interazione tra le cellule basali ed il tessuto connettivo (Kawai *et al.*, 1994; Utoh *et al.*, 2000; Yoshizato, 2007). Pertanto i processi degenerativi da noi rilevati nelle larve potrebbero implicare conseguenze anche negli adulti interferendo con il normale rimodellamento dell'epidermide che avviene durante la metamorfosi.

I processi degenerativi nello strato basale hanno interessato anche le Riesenzellens, una tipologia cellulare tipica dell'epidermide della famiglia *Bufo*. Le Riesenzellens sono anche definite “cellule d'allarme” in quanto sono coinvolte nella risposta allo stress attraverso la secrezione di sostanze prodotte nel loro citoplasma; alcuni autori suggeriscono che la sostanza d'allarme viene rilasciata in seguito al danno epidermico (Kulzer 1954; Pfeiffer, 1974). Pertanto le alterazioni da noi osservate potrebbero essere poste in relazione al ruolo di segnalatore di questa cellula e precedere pertanto altre risposte cellulari. Il profilo degenerativo osservato, è confermato dalla frequente osservazione di macrofagi (van Deurs *et al.*, 1993).

I nostri risultati, in accordo con studi precedenti (Bernabò *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2010), dimostrano che l'approccio morfologico è un importante strumento per indagare gli effetti subletali di contaminanti ambientali confermandone la validità per la valutazione precoce del danno (Brunelli *et al.*, 2010).

VII.2.1. Tossicità acuta in *Rana dalmatina*

La concentrazione di endosulfan alla quale avviene la morte del 50% degli individui dopo 96 h è risultata 0.074 mg/L. In tabella 7.1 sono riassunti i dati di letteratura riguardanti la tolleranza all'endosulfan di alcune specie di anuri. Il confronto con questi dati è reso difficoltoso dalle diverse metodologie sperimentali utilizzate dagli autori (stadio scelto, percentuale di ingrediente attivo etc.). I valori di LC₅₀ sono molto differenti ed è evidente una grande variazione specie-specifica nella sensibilità. Le specie appartenenti alla famiglia *Bufo* sono meno sensibili (Vardia *et al.*, 1984; Berril *et al.*, 1998; Bernabò *et al.*, 2008), quelle appartenenti alla famiglia *Hyla* hanno una sensibilità intermedia (Jones *et al.*, 2009) mentre le specie appartenenti alla famiglia *Rana* sono quelle maggiormente sensibili (Gopal *et al.*, 1981; Berril *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2009).

Il valore di tossicità acuta per le larve di *Rana dalmatina* rientra nel range dei valori di tossicità riportati.

Species	Lethal concentrations	Exposure	Stage	Autors
<i>Rana tigrina</i>	0.0018 mg/L	96 h	larvae	Gopal <i>et al.</i> , 1981
<i>Bufo melanostictus</i>	0.123 mg/L	96 h	larvae	Vardia <i>et al.</i> , 1984
<i>Rana sylvatica</i> <i>Rana clamitans</i> <i>Bufo americanus</i>	0.03 - 0.4 mg/L	96 h	larvae	Berrill <i>et al.</i> , 1998
<i>Bufo bufo</i>	0.43 mg/L	96 h	larvae	Bernabò <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudacris crucifer</i> <i>Hyla versicolor</i> <i>Pseudacris regilla</i> <i>Rana clamitans</i> <i>Rana cascadae</i>	0.0032 - 0.12 mg/L	96 h	larvae	Jones <i>et al.</i> , 2009

Tab.7.1. Valore della LC₅₀ in Anfibi

VII.2.2. Tossicità cronica in *Rana dalmatina*

Gli effetti dell'endosulfan osservati in girini di *Rana dalmatina* possono avere importanti conseguenze in natura. Negli Anfibi é stato ben documentato che un basso tasso di crescita e di sviluppo durante gli stadi larvali può negativamente influenzare caratteristiche degli adulti legate alla fitness. (Berven e Gill 1983; Smith 1987; Semlitsch *et al.*, 1988).

Gli individui di *Rana dalmatina* esposti a 0.05 e 0.01 mg/L di endosulfan mostrano un'elevata mortalità, ritardo e blocco nella crescita e nello sviluppo e nessun individuo raggiunge la metamorfosi. I nostri risultati sono in accordo con precedenti studi secondo cui l'inibizione della crescita è uno dei più significativi effetti tossici sullo sviluppo larvale (Snawder e Chambers, 1990; Richards e Kendall, 2003). In natura, una riduzione della crescita può aumentare la suscettibilità nei confronti della predazione, ritardo alla metamorfosi ed avere effetti negativi sulla fitness (Brodie e Formanowicz, 1983; Semlitsch *et al.*, 1988; Smith, 1987; Boone e Semlitsch, 2002; Boone e James, 2003; Altwegg e Reyer, 2003).

Al contrario, la più bassa concentrazione di endosulfan (0.005 mg/L) non è stato osservato nessun effetto significativo sui parametri considerati, eccetto una riduzione nella sopravvivenza durante il climax metamorfico ed un più rapido completamento del processo di metamorfosi.

Il ridotto tasso di sopravvivenza osservato al climax è da porre in relazione ai complessi riarrangiamenti fisiologici e morfologici che inducono una maggiore sensibilità verso i fattori di stress agenti; diversi autori ritengono che l'accumulo di sostanze ad alta affinità per i lipidi, quali gli organoclorurati, possono causare quindi un aumento della mortalità quando vengono mobilizzati durante il riassorbimento

della coda (Fioramonti *et al.* 1997; Bridges, 2000). Inoltre, è stato dimostrato che gli ormoni tiroidei possono amplificare la tossicità di alcuni composti clorurati come ad esempio la diossina TCDD (Rozman, 1984). Gli ormoni tiroidei raggiungono alti livelli nei girini proprio durante la fase di climax metamorfico (Mondou e Kaltenbach 1979; Weil, 1986) e potrebbero incrementare dunque il rischio di effetti tossici da contaminanti clorurati per gli individui in tale momento cruciale (McKinney *et al.*, 1985; Kloas, 2002).

Il minor tempo impiegato per raggiungere la metamorfosi nei girini esposti a 0.005 mg/L di endosulfan può essere correlato con la plasticità già nota per gli Anfibi di rispondere ad alterazioni dell'ambiente acquatico anticipando il passaggio dalla vita acquatica a quella in ambiente subaereo (Bridge, 2000; Greulich e Pflugmacher, 2003).

L'esposizione ad endosulfan inoltre, ha prodotto deformità nei girini esposti alle due più alte concentrazioni e sono stati osservati edema, malformazioni scheletriche e deviazione della coda, come riportato in precedenti lavori (Kang *et al.* 2008; Brunelli *et al.* 2009; Berril *et al.* 1998 ; Harris *et al.* 2000; Rohr *et al.* 2003). E' interessante notare che le anomalie dell'attività di nuoto coincidono con la presenza di tali malformazioni avendo probabili ripercussioni sulla capacità dei girini di nutrirsi e causando dunque, una diminuzione della massa corporea e riducendo la sopravvivenza.

L'attività di nuoto può essere considerata come un importante indicatore di stress fisiologico ed un rilevante parametro ecologico (Rosenshield *et al.*, 1999; Semlitsch *et al.*, 1995).

Nonostante studi qualitativi siano stati condotti in precedenza sull'effetto

dell'endosulfan sugli Anfibi (Brunelli *et al.*, 2009, Enzemoyne e Tongo, 2010), il presente lavoro è il primo ad utilizzare il metodo del video-tracking per l'analisi comportamentale degli Anfibi esposti a pesticidi.

Con questa metodica abbiamo evidenziato che i girini esposti a 0.05 e 0.01 mg/L di endosulfan mostrano anomalie nell'attività di nuoto. Alterazioni di parametri quali velocità e distanza percorsa erano associati a movimenti irregolari quali movimenti convulsivi e body twisting (swirling) che si alternavano a momenti di completa paralisi confermando quanto riportato in precedenti studi (Berril *et al.*, 1998; Brunelli *et al.*, 2009).

Le conseguenze in natura di comportamenti quali attività lenta e irregolare, così come la posizione di resting (adagiamento sul fianco o col ventre su) potrebbero essere estremamente gravi esponendo gli individui ad una maggiore pressione predatoria (Relyea *et al.*, 2006., Jung e Jagoe, 1995). Inoltre, è noto che la quantità di tempo impiegato nel nuoto è in relazione diretta con il tempo dedicato all'attività di nutrizione (Horat e Semlitsch 1994) che a sua volta è direttamente correlata con la quantità di cibo assunto (Rist, 1994). Ne deriva un effetto negativo sul tasso di crescita e di sviluppo delle larve (Semlitsch, 1993).

Le nostre analisi comportamentali sono in accordo con i dati di letteratura (Brunelli *et al.*, 2009); tuttavia grazie all'utilizzo del video-tracking è stato possibile quantificare le anomalie comportamentali dimostrando l'utilità di questo strumento nella valutazione degli effetti dannosi dei pesticidi in larve di Anfibi.

BIBLIOGRAFIA

Ahmad N, Edge V, Rohas P, 1995. Aerial Transport of Endosulfan Proc. Annual Program Workshop, Minimising the Impact of Pesticides on the Riverine Environment, Sydney, 22-23 August 1995. Land and Water Resources Research and Development Corporation. Quoted in <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41>

Alford RA, Richards SJ, 1997. Lack of evidence for epidemic disease as an agent in the catastrophic decline of Australian rainforest frogs. *Conservation Biology*, 11:1,026–1,029.

Alford RA, Dixon PM, Pechmann JHK., 2001. Global amphibian population declines. *Nature* 414, 449–500.

Altwegg R, Reyer HU, 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* 57, 872–882.

Anderson HR., Vinggaard AM., Rasmussen TH., Gjermansen IM, Bonefeld, Jorgensen EC., 2000. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179:1-12.

ASTM, 1997. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. E 729-790. In American Society for Testing and Materials Standards, Philadelphia.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2000. Toxicological profile for endosulfan. Atlanta GA. USA.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2001. Endosulfan Fact sheet (ToxFAQs), US Dept of Health and Human Services, Public Health Services, Division of Toxicology, Atlanta Georgia.

Barbieri F, Tiso E, 1990. Le rane rosse del versante padano dell'Appennino settentrionale. Atti 53° Congresso Nazionale Unione Zoologica Italiana, Palermo. Boll.Zool., Modena, 57 (suppl.):56-57.

Barinaga M, 1990. Where have all the froggies gone? Science:24.

Barthalmus GT, 1994. Biological roles of amphibian skin sections. In Amphibian biology. Voll. The Integument, ed. Heatwole H. and Barthalmus G.T., 382-410. Chipping, New South Wales Australia: Surry Beatty and Sons.

Beebee TJC, Flower RJ, Stevenson AC, Patrick ST, Appleby PG, Fletcher C, Marsh C, Natkanski J, Rippey B, Batterbee RW. 1989. Decline of the Natterjack Toad *Bufo calamita* in Britain: Palaeoecological, Documentary and Experimental Evidence for Breeding Site Acidification. Biological Conservation 53:1-20.

Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H, 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. Proceedings National Academy of Science USA, 95: 9031-9036.

Bernabò, I., Brunelli, E., Berg, C., Bonacci, A., Tripepi, S., 2008. Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: Ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization. Aquat. Toxicol. 86, 447-387 456.

Bernabò I., Gallo L., Sperone E. ,Tripepi S. , Brunelli E., 2011. Survival, development, and gonadal differentiation in *Rana dalmatina* chronically exposed to chlorpyrifos. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology Volume 315A, Issue 5, pages 314–327.

Berrill M, Bertram S., McGillivray L, Kolohon M, Pauli, B, 1994. Effects of low concentrations of forest use pesticides on frog embryos and tadpoles. Environ. Toxicol. Chem. 13, 657–664.

Berrill M, Bertram S, Pauli B, 1997. Effects of pesticides on amphibian embryos and larvae. In: Green, D.M. (Ed.), Amphibians in Decline: Canadian Studies of a

Global Problem. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, St. Louis, MI, USA, pp. 233–245.

Berrill M, Coulson D, McGillivray L, Pauli B, 1998. Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environ Toxicol Chem* 17:1738-1744

Berven KA, Gill DE, 1983. Interpreting geographic variation in lifehistory traits. *Am. Zool.* 23:85-97.

Blaustein AR, 1990. Declining amphibian populations:a global phenomenon? *Bull Ecol. Soc. Am.* 71:127-128.

Blaustein AR, Wake DB, 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Sci. Amer.* 272:52-5.

Blaustein AR, Edmond B, Kiesecker JM, Beatty JJ, Hokit DG, 1995. Ambient ultraviolet radiation causes mortality in salamander eggs. *Ecological Applications* 5:740-743.

Blaustein AR, Kiesecker, JM, Hoffman, PD, Hays JB, 1997. The significance of ultraviolet-B radiation to amphibian population declines. *Reviews in Toxicology* 1, 147–165.

Blaustein AR, Kiesecker JM, Chivers DP, Hokit DG, MarcoA, Belden LK, Hatch AC, 1998. Effects of ultraviolet radiation on amphibians: field experiments. *American Zoologist* 38:799-812.

Blaustein AR, Romansic JM, Kiesecker JM, Hatch AC, 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distribution* 9:123-140.

Bonin J, DesGranges JL., Rodrigue J, Ouellet M., Gagne' F, Sharbel TF, Lowcock LA, 1997. Measuring the health of frogs in agricultural habitats subjected to pesticides. *Amphibians in decline: Canadian studies of a global problem* (ed. by D.M. Green), pp. 00–00. SSAR Press, St Louis, MO, 246–259

Boone MD, Semlitsch RD, 2002. Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. Ecological applications 12:307-316

Boone MD, Bridges CM, 2003. Effects of pesticides on amphibian populations. Pages 152-167 in R. D. Semlitsch, editor. Amphibian Conservation. Smithsonian Institution, Washington.

Boone, M.D., James, S.M., 2003. Interactions of an insecticide, herbicide, and natural stressors in amphibian community mesocosms. Ecol. Appl. 13, 829–841.

Boone MD, Bridges CM, Fairchild JF, Little EE 2005. Multiple sublethal chemicals negatively affect tadpoles of the green frog, *Rana clamitans*. Environ Toxicol Chem 24:1267–1272.

Bradford DF, Swanson C, Gordon MS, 1992. Effects of low pH and aluminium on two declining species of amphibians in the Sierra Nevada, California. Journal of Herpetology 26:323-327

Bridges CM, 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. Environmental Toxicology & Chemistry 16:1935-1939.

Bridges CM, 1999. Effects of a pesticide on tadpole activity and predator avoidance behavior. Journal of Herpetology 33:303-306.

Bridges CM, 1999b. Predator-prey interactions between two amphibian species: Effects of insecticide exposure. Aquatic Ecology 33:205-211.

Bridges CM, 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenocephala*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 39:91-96.

Bridges C, Little E, Gardiner D, Petty J, Huckins J 2004. Assessing the toxicity and teratogenicity of pond water in north-central Minnesota to amphibians Environ Sci Pollut Res 11:233–239.

- Brodie ED, Formanowicz DR, 1983.** Prey size preference of predators: Differential vulnerability of larval anurans. *Herpetologica* 39, 67–75.
- Brodin M, Vatnick I, Simon M, Hopey H, Butler-Holston K, Leonard M. 2003.** Effects of Acid Stress in Adult *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Zoology* 298A:16-22.
- Broomhall S, 2002.** The effects of endosulfan and variable water temperature on survivorship and subsequent vulnerability to predation in *Litoria citropa* tadpoles. *Aquat. Tox.* 61:243-250.
- Broomhall SD, 2004.** Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. *Journal of Applied Ecology*, 41, 105-113.
- Bromhall SD, 2005.** Measuring chemical impacts on amphibians: Ecotoxicity and behavioural data in governmental regulation. *Appl. Herpetol.* 2, 259-285.
- Brown D, Grosso A, de Sousa RC, 1981.** The amphibian epidermis. Distribution of mitochondria-rich cells and the effect of oxytocins.
- Brunelli E, Bernabo I, Berg C, Lundstedt-Enkel, K., Bonacci, a., Tripepsi, S., 2009.** Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 91(2): 135-142.
- Brunelli E, Bernabo I, Sperone E, Tripepi S., 2010.** Gill alterations as biomarkers of chronic exposure to endosulfan in *Bufo bufo* tadpoles. *Histol. Hispathol.* 25, 1519-1529.
- Carey C, Bryant CJ, 1995.** Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and declines of amphibian populations. *Environ. Health Perspect.* 103:13-17.
- Carey C, Cohen N, Rollins-Smith C, 1999.** Amphibian declines: an immunological perspective. *Dev. Comp. Immunol.*, 23:459-472.

- Carey C, 2000.** Infectious disease and worldwide declines of amphibian populations, with comments on emerging diseases in coral reef organisms and in humans. *Environ. Health Perspect.* 108:143-150.
- Carrier JA and Beebee TJC, 2003.** Recent, substantial, and unexplained declines of the common toad *Bufo bufo* in lowland England. *Biological Conservation* 111(3): 395-399.
- Carriger J, Gardinali P, Castro J, Rand G, 2010.** Endosulfan and its metabolite, endosulfan sulfate, in freshwater ecosystems of South Florida: a probabilistic aquatic ecological risk assessment. *Ecotoxicology*, 19, 879-900.
- Castellano S, Giacoma C, 1990.** Selezione sessuale in maschi di *Bufo bufo*. Atti VI Conv. naz. Ass. "A. Chigi", Torino (1989), Mus. reg. Sci. Nat. Torino 161-164.
- Cerejiera MJ, Viana P, Batista S, Pereira T, Silva E, Valerio MJ, Silva A, Ferreira M, Silva Fernandes AM, 2003.** Pesticide in Portuguese surface and ground water . *Water res.* 37:1055-63.
- Cerrillo I, Granada A, Lopez-Espinosa MJ, Olmos B, Jimenez M, Cano A, Olea N, Fatima Olea-Serrano M, 2005.** Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environ. Res.* 98:233-239.
- Chapman G B., Dawson, 1961.** Fine structure of the larval anural epidermis with special reference to the figures of Ebert. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 10: 425.
- Chaudhuri K, Selvaraj S, Pal AK, 1999.** Studies on the genotoxicology of endosulfan in bacterial system. *Mutat. Res.* 439:63-67.
- Christin MS, Gendron D, Andree P, Brousseau L, Menard J, Marcogliese David, Cyr D, Ruby S, Fournier M, 2003.** Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environmental Toxicology & Chemistry* 22:1127-1133.
- Clarke BT, 1997.** The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning, potential medical applications. *Biol Rev* 72:365-379.

Cunningham AA, Langton TES, Bennett PM, Lewin JF, Drury SEN, Gough RE, Macgregor SK, 1996. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 351:1539-1557.

Dalsenti PR, Dallegrave E, Mello JR, Langloh A, Oliveira TR, Faqi AS, 1999. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation; Hum. Exp. Toxicol. 18:583-589.

Dalvie MA, Cairncross E, Solomon A, London L, 2003. Contamination of rural surface and ground water by endosulfan in farming areas of the Western Cape, South Africa. Environmental Health: A Global Access Science Source 2:1-15, Publisher: BioMed Central.

Davidson C, Bradley Shaffer H, Jennings MR, 2002. Spatial Tests of the Pesticide Drift, Habitat Destruction, UV-B, and Climate-Change Hypotheses for California Amphibian Declines. Conservation Biology, 16:1588-1601

Davidson C, 2004. Declining downwind: Amphibian population declines in California and historic pesticide use. Ecol. Appl. 14:1892-1902.

De la Cruz AA, Yarbrough JD, 1982. The role of aquatic weeds in maintaining surface water quality. Proj.No. A-134-MS, U.S.D.I, Water Resour. Res. Inst., Mississippi State Univ. (1982), quoted from AQUIRE Database of U.S. EPA.

Denoël M, Bichot M, Ficetola GF, Delcourt J, Ylief MY, Kestemont P, Poncin P, 2010. Cumulative effects of a road de-icing salt on amphibian behavior. Aquat. Toxicol. 99, 275-280.

Diamond JM, 1996. Conservation biology. A-Bombs against amphibians. Nature, 383:386-387.

Duellmann WE, Trueb L, 1986. Biology of Amphibians. McGraw-Hill Book Company, New York.

Dutta HM, Misquitta D, Khan S, 2006. The Effects of Endosulfan on the Testes of Bluegill Fish, *Lepomis macrochirus*: A Histopathological Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51:149-156.

Eddins D, Cerutti D, Williams P, Linney, E, Levin ED, 2010. Zebrafish provide a sensitive model of persisting neurobehavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure: comparison with nicotine and pilocarpine effects and relationship to dopamine deficits. Neurotoxicol. Teratol. 32, 99–108.

EFSA (European Food Safety Authority) 2005. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to endosulfan as undesirable substance in animal feed. In EFSA Journal 234:1-29.

EJF Environmental Justice Foundation 2002. End of the Road for Endosulfan: A Call for Action Against a Dangerous Pesticide. London, UK.

EPA, 2002. Endosulfan RED Facts. EPA-738-F-02-012 Ernst WR, Doe JK, Julien G, Hennigar P, 1991. Toxicity to aquatic organisms of off-target deposition of endosulfan applied by aircraft. Environ Toxicol Chem 10:103-14.

Ernst WR, Doe JK, Julien G, Hennigar P, 1991. Toxicity to aquatic organisms of off-target deposition of endosulfan applied by aircraft. Environ Toxicol Chem 10:103-14"

Ersparmer V, 1995. Bioactive secretions of the amphibian integument. In Amphibian Biology, Vol.1 The Integument (H.Heatwole and G.T. Barthalmus, Eds.) pp. 178-350. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, NSW.

Espín S, Martínez-López E, Gómez-Ramírez P, María-Mojica P, García-Fernández AJ, 2010. Assessment of organochlorine pesticide exposure in a wintering population of razorbills (*Alca torda*) from the southwestern Mediterranean. Chemosphere, 80, 1190-1198.

Ezemonye L, TONGO I, 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). Chemosphere, 81, 214-217.

- Ezemonye LI, Ikpesu TO, Tongo I 2010.** Distribution of endosulfan in water, sediment and fish from Warri river, Niger delta, Nigeria. *African Journal of Ecology*, 48, 248-254.
- Fasola M, Annichini I, Veroli A, 2000.** Anfibi di un gradiente geografico padano. In: Giacoma, C. (Ed.), *Atti del I Congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica*, Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino, Torino, 1996, pp. 493-497.
- Fatoki OS, Awofolus OR, 2004.** Levels of organochlorine pesticide residues in marine, surface, ground and drinking water from eastern Cape Province in South Africa. *J. Environ. Sci. Health* 39:101-114.
- Fenoglio C, Grosso A, Boncompagnia E, Gandinib C, Milanesia G, Barnia S, 2009.** Exposure to heptachlor: Evaluation of the effects on the larval and adult epidermis of *Rana kl. esculenta*. *Aquatic Toxicology* 91 151–16.
- Fernandez MF, Olmos B, Granada A, López-Espinosa MJ, Molina- Molina MJ, Fernandez JM, Cruz M, Olea-Serrano F, Olea N, 2007.** Human exposure to endocrine disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ. Health Perspect.*
- Ferri V, 2000.** Una strategia regionale di conservazione degli Anfibi: il “Progetto Rospi Lombardia” (pp. 767-772)- in Giacoma C. (ed.), *Atti I Congresso Nazionale Societas Herpetologia Italica*, Torino (1996), Mus.reg. Sci. Nat. Torino, 821 pp.
- Finney DJ, 1971.** Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, New York, p 668.
- Fioramonti E, Semlitsch RD, Reyer HU, Fent K, 1997.** Effects of triphenyltin and pH on the growth and development of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:1940-1947.
- Fisher GM, Schaffer HB, 1996.** The decline of amphibians in California’s Great Central Valley. *Conservation Biology*, 10:1387-1397.

- Fox H, 1974.** The epidermis and its degeneration in the larval tail and adult body of *Rana temporanea* and *Xenopus laevis* (Amphibia: Anura). *Journal of Zoology* (London), 174:217-235.
- Fox H, 1977.** The anural tadpole skin: changes occurring in it during metamorphosis and some comparisons with that of the adult. Pp.269-289.
- Fox H, Whitear M, 1978.** Observation on Merkel cells in amphibians. *Biologie Cellulaire* 32:223-232.
- Fox H., 1985.** Changes in amphibian skin during larval development and metamorphosis. Pp 59-84. In "metamorphosis" by M. Balls and M. Brownes. Oxford University Press, Oxford.
- Fox H, 1985.** The tentacles of *Ichthyophis*(Amphibia: Caecilia) with special reference to the skin. *J.Zool., London (A)* 205:223-34.
- Fox, H. 1986.** Epidermis. In *Biology of the Integument 2: Vertebrates* (Eds J. Bereiter-Hahn, A. G. Matoltsy & K. SylviaRichards), pp. 79–80. Springer Press, Berlin.
- Fox H, 1986a.** Dermal glands. In *Biology of the integument, vol 2. Vertebrates. III. The skin of amphibia*, ed Hahn J.B. , Matoltsy A.G., Richards K.S. 116-35. New York: Springer-Verlag.
- Fox H, 1986b.** Dermis. In *Biology of the integument, vol 2. Vertebrates. III. The skin of amphibia* ed Hahn J.B., Matoltsy A.G., Richards K.S. 115-15. New York: Springer-Verlag.
- Fox H, 1986c.** Epidermis. In *Biology of the integument, vol 2. Vertebrates. III. The skin of amphibia* ed Hahn J.B., Matoltsy A.G., Richards K.S. 78-110. New York: Springer-Verlag.
- Fox H ,1992.** Figures of Eberth in the amphibian larval epidermis.*J Morphol.* Apr;212(1):87-97.

Fox H, 1994. The structure of the integument. In Amphibian Biology. Vol.1. The integument, ed. Heatwole H., Barthalmus G.T. 1-32. Chipping Northon, New South Wales, Australia: Surrey Beatty and Sons.

Franklin GE, 1990. Surface ultrastructure changes in the gills of sockeye salmon (Teleostei: *Oncorhynchus nerka*) during seawater transfer: comparison of successful and unsuccessful seawater adaptation. J. Morphol. 206:13-23.

Gendron AD, Marcogliese DJ, Barbeau S, Christin MS, Brousseau P, Ruby S, Cyr D, Fournier M, 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. Oecologia 135:469-476.

German Federal Environment Agency. Umweltbundesamt, Dessau February 2007. Endosulfan. Draft Dossier prepared in support of a proposal of endosulfan to be considered as a candidate for inclusion in the Annexes to the Stockholm Convention.

Giusi G, Facciolo RM, Alò R, Carelli A, Madeo M, Brandmayr P, Canonaco M, 2005. Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the Ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via distinct cerebral histamine receptor subtypes. Environ. Health Perspect. 113:1522-1529.

Giusi G, Alo R, Crudo M, Di Vito A, Facciolo RM, Canonaco M, 2010. Environmental stressors and neurobiological features of marine teleosts: Histamine receptors as targets. Crit. Rev. Toxicol. 40, 620-632.

Glennemeler KA, Denver RJ, 2001. Sublethal Effects of Chronic Exposure to an Organochlorine Compound on Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) Tadpoles. Environmental Toxicology. Volume 16, Issue 4.

Goebel H, Gorbach S, Knauf W, Rimpau RH, Huttenbach H, 1982. Properties, effects, residues and analytics of the insecticide endosulfan. Residue rev 83:1-174.

Gonzalez-Farias F, Gisneros Estrada X, Fuentes Rui ZC, Diaz Gonzalez G, Botello AV, 2002. Pesticides distribution in sediments of tropical coastal lagoon

adjacent to an irrigation district in northwest Mexico. Environ. Technol. 23:1247-56.

Gopal K, Anand M, Khanna RN, Misra D, 1980. Endosulfan induced changes in blood glucose of catfish, *Clarias batrachus*. J Adv Zool 1:68-71.

Gopal K, Khanna RN, Anand M, Gupta GSD, 1981. The acute toxicity of endosulfan to freshwater organism. Toxicol. Lett. 7:453-456.

Gormley KL, Teather KL, 2003. Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54:330-338.

Gosner KL, 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, 16:183-190.

Green LE, Peloquin JE. 2008. Acute Toxicity of Acidity in Larvae and Adults of Four Stream Salamander Species (*Plethodontidae*). Environmental Toxicology and Chemistry 27:2361-2367.

Gregor DJ, Gummer WD, 1989. Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Canadian Arctic snow. Environ Sci Technol 23:561-65.

Greulich K, Pflugmacher S, 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. Aquatic Toxicology 65:329-336.

Grossenbacher, 1997: *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. In: Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe, p. 134–135. Gasc, J.-P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, J., Dolmen, D., Grossenbacher, Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martinez Rica, J.P., Maurin, H., Oliveira, M.E., Sofianidou, T.S., Veith, M. and Zuiderwijk, A., Eds., Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.

Grumfeld HT, Bonefeld-Jorgensen EC, 2004. Effects of invitro estrogen pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels. Toxicol. Lett. 1,151:467-80.

Han EH, Hwang YP, Kim HG, Jeong HG, 2007. Inflammatory effect of endosulfan via NF- κ B activation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355:860-865.

Harold H., 1994. *Amphibian Biology. Vol. I The integument.* Surrey Beatty e Sons.

Harris ML, 2000. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 64, 263.

Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A, 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives* 111:568-575.

Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A, 2002b. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:5476-5480.

Heatwole H, Barthalmus G.T, 1994. *Amphibian biology Vol.1 The Integument.* Chipping Northon, New South Wales, Australia: Surrey Beattu and Sons.

Hermann M, 2003. Endosulfan Preliminary Dossier; www.unece.org/env/popsxg/docs/2000-2003/dossier-endosulfan-may03

Hoechst, 1987. Endosulfan, active ingredient technical (code HOE 02671 OI ZD97 0003): 30-Day feeding study in adult male Wistar rats. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt, Germany. Project no. 87.0129. unpublished study.

Hoechst, 1975. Beta-endosulfan pure (analysis GOE 1495): Acute oral toxicity in female SPF-Wistar rats. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt, Germany. Doc #A05270. unpublished study

Hoechst, 1990. Summary and evaluation of the toxicity data for endosulfan - substance technical. (code: HOE 002671) Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt, Germany. Report no. 90.0848. unpublished study.

- Horat P, Semlitsch RD, 1994.** Effects of predation risk and hunger on the behaviour of two species of tadpoles. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 34:393-401.
- Houlahan JE, Findlay CS, 2003.** The effects of adjacent land use on wetland amphibian species richness and community composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 60:1078–1094.
- Huang DY, Peng PA, XU YG, Sun CX, Deng HM, Deng YY, 2010.** Distribution, regional sources and deposition fluxes of organochlorine pesticides in precipitation in Guangzhou, South China. *Atmospheric Research*, 97, 115-123.
- Hudson RH, Tucker RK, Haegele, 1984.** Handbook of acute toxicity of pesticides to wildlife, Resource Publication 153. U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC, pp 6-54.
- Hylliard SD, Van Driessche W, 1991.** Development of aldosterone-stimulation of short circuit current across frog larval skin. *Journal of Comparative Physiology.* B161: 257-263.
- Hylliard SD, 1999.** Behaviour, Molecular and Integrative Mechanism of Amphibian Osmoregulation. *Journal of Experimental Zoology.* 283:662-674.
- IPEN Pesticide Working Group Project 2004.** Usha S. and Harikrishnan V. R. Endosulfan - Fact sheet and Answers to Common Questions.
- IUCN, 2004.** The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/58584/0>
- Izutsu Y, Kaiho M, Yoshizato K, 1993.** Different distribution of epidermal basal cells in the anuran larval skin correlates with the skin's region-specific fate at metamorphosis. *J. Exp. Zool.* 267, 605–615.
- Jauhar I, Kulshrestha SK, 1985.** Histopathological effects induced by sublethal doses of Sevin and Thiodan on the gills of *Channa striatus* Bl. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 13:395-400.

- Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R, 2004.** Runoff-related Endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near Buenos Aires, Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 345–352.
- Jones KD, Hammond JI, Releya RA, 2009.** Very highly effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.28, No 9, pp. 1939-1945.
- Jonsson CM, Toledo MCF, 1993.** Acute Toxicity of Endosulfan to the Fish *Hyphessobrycon bifasciatus* and *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24:151-155
- Jung RE, Jagoe CH, 1995.** Effects of low pH and aluminum on body size, swimming performance, and susceptibility to predation of green frog (*Hyla cinerea*) tadpoles. *Can J Zool* 73:2171-2183.
- Kang HS, Park CJ and Gye MC, 2008.** Effect of Carbaryl on Survival and Development in *Bombina orientalis* (Boulenger) Embryos *Bulletin of environmental contamination and toxicology* Volume 81, Number 3, 262-265, DOI: 10.1007/s00128-008-9475-9
- KanG H, Gye M, Kim M, 2008.** Effects of endosulfan on survival and development of *Bombina orientalis* (Boulenger) embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, 262-265.
- Karim AA, Haridi AA, el Rayah EA, 1985.** The environmental impacts of four insecticides on non target organisms in the Gezira Irrigation Scheme canals of Sudan. *J. Trop. Medic. Hyg*: Vol 88, ISS 2, P 161-8
- Kato S, Kurihara K, 1988.** Electron microscopic studies of the external gill epithelium of the salamander, *Hynobius dunni* Tago, followed throughout larval life. *Okajimas Folia Anat. Japan.* 65:177-202
- Kawai,A., Ikeya, J., Kinoshita, T.,Yoshizato, K., 1994.** Athree-stepmechanism of action of thyroid hormone and mesenchyme in metamorphic changes in anuran larval skin. *Dev. Biol.* 166, 477–488.

Kelly BC, Ikonomou MG, Blair JD, Morin AE, Gobas F, 2007. Food web-specific biomagnification of persistent organic pollutants. *Science* 317, 236-239.

Klemens JA, Wieland ML, Flanagin VJ, Frick JA, Harper RG, 2003. A cross taxa survey of organochlorine pesticide contamination in a Costa Rica Wet land. *Environmental pollution* 122:245-51.

Kloas W, 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *Int Rev Cytol* 216:1-57.

Knapp RA, Matthews KR, Sarnelle O, 2001. Resistance and resilience of alpine lake fauna to fish introductions. *Ecological Monographs* 71:401-421.

Knutson MG, Richardson NWB, Reineke DM, Gray BR, Parmelee JR, Weick SE, 2002. Amphibian reproductive success as an indicator of habitat quality in agricultural farm ponds. Farm ponds as critical habitats for native amphibians: Final report. Submitted to the Legislative Commission on Minnesota Resources, St. Paul, Minnesota. U.S. Geological Survey, Upper Midwest Environmental Sciences Center. La Crosse, Wisconsin, USA.

Kulzer E, 1954. Untersuchungen über die Schreckreaktion der Erdkrottenkaulquappen (*Bufo bufo* L.). *Z. Vergl. Physiol.* 36: 443-463.

Kutluhan S, Akhan G, Gulterkin F, Kurdoglu E, 2003. Three cases of recurrent epileptic seizures caused by endosulfan. *Neurol. India.* 51:102-3.

Kuzmin, 1999. The amphibian of former Soviet Union. Pensoft, Sofia, 538 pp.

Lajmanovich RC, Izaguirre MF, Casco VH, 1998. Paraquat tolerance and alteration of internal gill structure of *Scinax nasica* tadpoles (Anura: Hylidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34:364-369

Lajmanovich RC, Cabagna M, Peltzer PM, Stringhini GA, Attademo AM, 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* 587:67-72.

Landstorm U, 1977. On the differentiation of prospective ectoderm to a ciliated cell pattern in embryos of *Ambistoma mexicanum*. Journal of embryology and experimental morphology 41:23-32.

Langston WJ, Chesman B., Burt GR, Pope ND, McEvoy, J, 2002. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? Mar. Environ. Res. 53, 263–293.

Lanza B, 1983. Anfibi e rettili (Amphibia, Reptilia). Guida per il riconoscimento delle specie animali dell'acque interne italiane, 27. Collana del progetto finalizzato "Promozione della qualità dell'ambiente" C.N.R., Roma.

Leonard AW, Hyne RV, Lim RP, Chapman, JC, 1999. Effect of endosulfan runoff from cotton fields on macroinvertebrates in the Namoi River. Ecotoxicol. Environ. Saf. 42, 125–134."

Leonard, A.W., Hyne, R.V., Lim, R.P., Pablo, F., Van den Brink, P., 2000. Riverine endosulfan concentrations in the Namoi River, Australia: link to cottonfield runoff and macroinvertebrate population densities. Environ. Toxicol. Chem. 19, 1540–1551.

Lenoir JS, McConnell LL, Fellers GM, Cahill TM, Seiber JN, 1999. Summertime transport of current-use pesticides from California's Central Valley to the Sierra Nevada Mountain Range, USA. Environmental Toxicology and Chemistry, 18, 2715-2722.

Leonard AW, Hyna RV, Leigh KA, Le J, Beckett R, 2001. Fate and toxicity of endosulfan in Naomi River water and bottom sediments. J.Environ.Qual. 30:750-9.

Lewinson D, Rosenberg M, Warburg MR, 1982. Mitochondria-rich cells in salamander larva epidermis; Ultrastructural description and carbonic anydrase activity. Biology of the Cell, 46: 75-84.

Liem K.F, Bemis WE, Walker WF, Grande L, 2002. Anatomia comparata dei vertebrati, Edises, Napoli.

Lindemann B, Voûte C, 1976. Structure and function of the epidermis. In: Frog Neurobiology (R. Llinás, W. Precht, eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 169-21.

Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP, 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*: 157; 2903-2927.

Materna EJ, Rabeni CF, Lapoint TW, 1995. Effects of the synthetic pyrethroid insecticide, esfenvalerate, on larval leopard frogs (*Rana spp*). *Environ. Toxicol. Chem.* 14:613-622

Matthiessen P, Roberts RJ, 1982. Histopathological changes in the liver and brain of fish exposed to endosulfan insecticide during tsetse fly control operations in Botswana. *J Fish Dis* 5:153-159.

McConnell LL, Lenoir J, Datta S, Seiber JN, 1998. Wet deposition of current-use pesticides in the Sierra Nevada mountain range, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 1908-1916.

McKinney JD, Chae K, Oatley JS, Blake CCF, 1985. Molecular interactions of toxic chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans with thyroxine binding prealbumin. *J. Med. Chem.* 28:375-381.

Miglioranza KS, Aizpun de Moreno JE, Moreno VJ, 2004. Land based sources of marine pollution: organochlorine pesticide in stream system. *Environ Sci Pollut Res Int* 11:227-32."

Miles JRW, Moy P, 1979. Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23:13-19.

Mondou PM, Kaltenbach JC, 1979. Thyroxine concentrations in blood serum and pericardial fluid of metamorphosing tadpoles and of adult frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39:343-349.

Muschal M, 2001. Central and north west regions' water quality program: 1999-2000 report on pesticides monitoring. Department of Land and Water Conservation NSW.

PAN, 2008. Stockholm Convention Secretariat for use by the POPs Review Committee (POPRC), Pesticide Action Network"

Naqvi SM, Vaishnavi C, 1993. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide in non-target animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 105:347-361.

National Park Service, 2008. Western Airborne Contaminants Assessment Project.

Noldus LPJJ, Spink, AJ, Tegelenbosch RAJ, 2002. Computerised video tracking, movement analysis and behaviour recognition in insects. *Comput. Electr. Agric.* 35, 201–227.

Nowell LH, Resek EA, 1994. National standards and guidelines for pesticides in water, sediment, and aquatic organisms: application to water-quality assessments. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 140, 1–164

Ntow J, 2001. Organochlorine Pesticides in water, sediments, crops and human fluids in a farming community in Ghana. *Arc. Env. Contam. Toxicol.* 40:557-563.

Oktay C, Gokten E, Bozdmir N, Soyuncus, 2003. Unintentional toxicity due to endosulfan: a case report of two patients and characteristics of endosulfan toxicity. *Vet. Hum. Toxicol.* 45:318-20.

Ovaska K, Davis TM, Flamarique IN, 1997. Hatching success and larval survival of the frogs *Hyla regilla* and *Rana aurora* under ambient and artificially enhanced solar ultraviolet radiation. *Can. J. Zool.*, 75:1081-1088.

PAN (Pesticide Action Network) International, 2008. Provision of information to the Stockholm Convention Secretariat for use by the POPs Review Committee (POPRC).

Pandey N, Gundevia F, Prem AS, Ray PK, 1990. Studies on the genotoxicity of endosulfan, an organochlorine insecticide, in mammalian germ cells. *Mutat. Res.* 242:1–7.

Park D, Hempleman SC, Propper CR, 2001. Endosulfan exposure disrupts pheromonal systems in the Red-Spotted Newt: A mechanism for subtle effects of environmental chemicals. *Environ. Health Perspectives* 109, 669-673.

Park D, Propper CR, 2002. Endosulfan Affects Pheromonal Detection and Glands in the Male Red-Spotted Newt, *Notophthalmus viridescens*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69:609-616.

Paul V, Balasubramaniam E, 1997. Effects of single and repeated administration of endosulfan on behaviour and its interaction with centrally acting drugs in experimental animals: A mini review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3:151-157.

Pavignano I, Giacoma C, 1990. Una valutazione ecologica dello stato di conservazione delle zone umide minori della pianura Piemontese. *Atti VI Conv. naz. Ass. "A. Chigi", Torino (1989), Mus. reg. Sci. Nat. Torino* 91-104.

Pechmann JHK, Scott DF, Semlitsch RD, Caldwell JP, Vitt LJ, Gibbons W, 1991. Declining Amphibian Populations: the problem of separating human impacts from natural fluctuations. *Science* 245:892-895.

Pfeiffer W, 1974. Pheromones in fish and amphibia. In: Birch ME, ed. *Pheromones*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam: 269-296.

Pollet I, Bendell-Young LI, 2000. Amphibians as indicators of wetland quality in wetlands formed from oil sands effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* Volume 19, Issue 10, pages 2589–2597.

Pounds JA, Crump ML, 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, 8:72-85.

Pounds JA, Fogden PC, Campbell JH, 1999. Biological responses to climate change on a tropical mountain. *Nature*, 398:611-615.

Pounds JA, 2001. Climate and amphibian declines. *Nature* 410:639-640.

Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Cosuegra JA, Fogden PL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Santiago SR, Sanchz-Azofeifa GA, Still CJ, Young. BE, 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439:161–167.

Quagliata S, Malentacchi C, Delfino C, Brunasso AMG, Delfino G, 2006. *CARYOLOGIA* Vol. 59, no. 2: 187-206.

Rao L, Ramaneswari K, 2008. Influence of endosulfan and monocrotophos exposure on the activity of NADPH cytochrome C reductase (NCCR) of *Labeo rohita* (Ham). *Journal of environmental biology*, 29, 183-185.

Razzetti E, Bonini L, Cresta P, 2000. Conservazione di Anfibi e Rettili nel parco di Portofino (Genova, Italia nord-occidentale) – Atti 2° Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica, Praia a Mare (CS) (1998), *Riv. Idrobiol.*, Perugia, 38 (1999): 333-340.

Relyea RA, 2004. Synergistic impacts of malathion and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1080-1084.

Relyea RA, Mills N, 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2491-2496

Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* 15, 618–627."

Relyea RA, Hoverman JT, 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems

Richards SM, Kendall RJ, 2003. Physical effects of Chlorpyrifos on two stages of *Xenopus laevis*. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66, 75–91"

- Rist L, 1994.** Feeding time, food consumption, and growth efficiency of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* tadpoles. M. Sc. thesis, University of Zurich, Zurich.
- Robinson DH, Heintzelman MB, 1987.** Morphology of ventral epidermis of *Rana catesbeiana* during metamorphosis. *Anat. Rec.* 217, 305–317.
- Rohr JR, Elskus AA, Shepherd BS, Crowley PH, McCarthy TM, Niedzwiecki JH, Sager T, Sih A, Palmer BD, 2003.** Lethal and sublethal effects of atrazine, carbaryl, endosulfan, and octylphenol on the streamside salamander, *Ambystoma barbouri*. *Environ Toxicol Chem* 22:2385-2392.
- Romeo F, Quijano MD, 2000.** Risk assessment in a third-world reality: an endosulfan case history, *Int. J. Occup. Environ. Health* 6:312-317.
- Rosenberg, M., Warburg, M.K., 1993.** The ventral epidermis of *Pelobates syriacus* (Anura; Pelobatidae). *Isr. J. Zool.* 39, 235–243.
- Rosenberg M, Warburg MK, 1992.** Ultrastructure and histochemistry of ventral epidermis in *Pelobates syriacus* (Anura; *Pelobatidae*) tadpoles. *Biol. Struct. Morphogen.* 4, 164–170.
- Rosenshield ML, Jofre' MB, Karasov WH, 1999.** Effects of polychlorinated biphenyl 126 on green frog (*Rana clamitans*) and leopard frog (*Rana pipiens*) hatching success, development, and metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:2478-2486
- Rozman K, Rozman T, Greim H, 1984.** Effects of thyroidectomy and thyroxine on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72: 372-376.
- Russell RW, Hecnar SJ, Haffner GD, 1995.** Organochlorine pesticide residues in Southern Ontario spring peepers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14: 815-817.
- Saiyed H, Dewan A, Bhatnagar V, 2003.** Effect of Endosulfan on Male Reproductive Development, *Environ. Health Perspect.*, 111:1958–1962.

Sala OE, Chapin FSI., Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Hubersanwald E, Huenneke LR, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, Poff NL, Sykes MT, Walker BH, Walker M, Wall DH, 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287: 1,770–1,774.

Sang S, Petrovic S, 1999. Endosulfan. A Review of its Toxicity and its Effects on the Endocrine System WWF (World Wild Life Fund, Canada).

Scala C, Pasquinelli G, Cenacchi G, 1995. Microscopie in biologia e medicina. Clueb Editore, Bologna.

Schimmel SC, Patrick JM, Wilson AJ, 1977. Acute toxicity to and bioconcentration of endosulfan by estuarine animals. In: *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, edited by F L Mayer and J L Hamelink. ASTM Special Technical Publication, STP 634, 241-252.

Schummer C, Mothiron E, Appenzeller BMR, Rizet AL, WennigR, Millet M, 2010. Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France. *Environmental Pollution*, 158, 576-584.

Schuyttema GS, Nebeker AV, 1996. Amphibian toxicity data for water quality criteria chemicals. EPA/600/R-96/124, U.S. EPA, NHEERL/ WED, Corvallis, OR.

Scillitani G, Rizzi V, Gioisa M, 1996. Atlante degli Anfibi e dei Rettili della provincia di Foggia. Monografie del Museo Provinciale di Storia Naturale. V. 1 Gitto Editore. pp.120.

Scoccianti C, 2001. Amphibia: aspetti di ecologia della conservazione. Editore Guido Persichino Grafica, Firenze.

Scott GR, Sloman KA, 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369-392.

- Semlitsch, RD, Scott DE, Pechmann JHK, 1988.** Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. Ecology 69, 184–192.
- Semlitsch RD, 1993.** Adaptive genetic variation in growth and development of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. Evolution 47:1805-1818.
- Semlitsch RD, Foglia M, Mueller A, 1995.** Short-term exposure to triphenyltin affects the swimming and feeding behaviour of tadpoles. Environ Toxicol Chem 14:1419-1423.
- Sethunathan N, Megharaj M, Chen Z, Singh N, Kookana RS, Naidu R. 2002.** Persistence of endosulfan and endosulfan sulfate in soil as affected by moisture regime and organic matter addition. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 68, 725-731.
- Shenoy K, Cunningham BT, Renfroe JW, Crowley PH, 2009.** Growth and survival of northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles exposed to two common pesticides. Environ Toxicol Chem. 2009 Jul;28(7):1469-74.
- Silvestre F, Scippo M, Thome J, Phuong N, Kestemont P, TU H, 2009.** Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Ecotoxicology and environmental safety, 72, 1463-1470.
- Simonich SL, Hites RA, 1995.** Global distribution of persistent organochlorine compounds. Science 269:1851-54
- Simonich SL, Hites RA, 1997.** Relationship between socio-economic indicators and concentrations of Organochlorine Pesticides in Tree Bark. Environ. Sci. Technol. 31:999-1003.
- Sindaco R, Doria G, Razzetti E, Bernini F, 2006.** Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia. Societas herpetologica italica.

- Singer M, Salpeter M, 1961.** Regeneration in vertebrates: the role of wound epithelium in Growth in Living System ed M. X. Zarrow. Basic Book Inc. New York. Pp: 277-311.
- Singh NN, Srivastava AK, 1981.** Effects of endosulfan on fish carbohydrate metabolism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 5:412-417.
- Sinha N, Lal B, Singh TP, 1991.** Effect of endosulfan on thyroid physiology in the freshwater catfish *Clarias batrachus*. *Toxicology* 67:187-197.
- Sinha N, Narayan R, Saxena DK, 1997.** Effect of endosulfan on the testis of growing rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 58:79-86.
- Smith AG, 1991.** Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr., Eds. Academic Press Inc., New York, NY, 6-3.
- Smith DC, 1987.** Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date of metamorphosis. *Ecology* 68:344-50.
- Snawder JE, Chambers JE, 1990.** Critical time periods and the effect of tryptophan in malathion induced developmental defects in *Xenopus* embryos. *Life Sci.* 46, 1635–1642.
- Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C, 1994.** The Pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogensensitive cells. *Environ. Health Perspectives* 102:380-383.
- Sparling, DW, Linder G, Bishop CA, eds, 2000.** *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola, FL Boone, M.D., Bridges, C.M. (2003) The problem of pesticides: implications for amphibian populations. *Amphibian conservation* (ed. by R.D. Semlitsch). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Sparling DW, Fellers FM, McDonnell L, 2001.** Pesticides and amphibian population declines in California, Usa. *Environ. Toxic. Chem.* 7:1591-1595.

Sparling DW, Fellers GM, 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 28, No. 8, pp. 1696–1703.

Stallard RF, 2001. Possible environmental factors underlying amphibian decline in Easter Puerto Rico: analysis of U.S. government data archives. *Conservation Biology*, 15: 943-953

Sunderam RIM, Cheng DMH, Thompson GB, 1992. Toxicity of endosulfan to native and introduced fish in Australia. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:1469-1476.

Swartz CP, Donnelly KC, IslamZadeh A, Rowe GT, Rogers WJ, Paletnikov GM, Mekhtiev AA, Kasimov R, McDonald TJ, Wickcliffe JK, Presley BJ, Bickham JW, 2003. Chemical Contaminants and their Effects in fish and wildlife from the industrial zone of Sumgayit, Republic of Azerbaijan, *Ecotoxicology* 12:509-21.

Takada M, 1985. Differentiation of the active sodium transport system during metamorphosis of *Rana catesbeiana* skin in relation to cadmium and amiloride-induced responses. *Japanese Journal of Physiology*, 35 : 525-534.

Takada M., Hara K., 1988. T3 induced differentiation of the electromotive force related to active ion transport across the skin of the neotenus urodele, *Ambystoma mexicanum*.

Tamakoshi T, Oofusa K, Yoshizato K, 1998. Visualization of the initiation and sequential expansion of the metamorphic conversion of anuran larval skin into the precursor of adult type. *Dev. Growth Differ.* 40, 105–112.

Toledo MCF, Jonsson CM, 1992. Bioaccumulation and elimination of endosulfan in zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Pest. Sci.* 36:207-211.

Tripepi S, Serroni P, Brunelli E, 1999. Guida atlante degli Anfibi della provincia di Cosenza. Pellegrini Editore, Cosenza pp119.

US Environmental Protection Agency (EPA), 1999. LC50 Software Program, Version 1.00. Center for Exposure Assessment Modeling (CEAM) Distribution Center.

U.S.EPA, 2010. Endosulfan: 2010 environmental fate and ecological risk assesment. United States Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, p. 299.

US Environmental Protection Agency (EPA) 2001. Overview of endosulfan: Risk assessment, July 26, 2001. United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances.

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances- Europe- Regional Report –Chemicals- Global Environment Facility.

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances–Indian Ocean Regional Report – Chemicals– Global Environment Facility (UNEP – GEF).

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances-Mediterranean- Regional Report – Chemicals- Global Environment Facility.

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances- Central America and the Caribbean- Regional Report –Chemicals- Global Environment Facility.

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances- North America- Regional Report – Chemicals- Global Environment Facility.

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances Arctic Regional Report Chemicals. Regional report, December 2002 <http://www.chem.unep.ch/pts/regreports/North%20America%20full%20report.pdf>

- US Environmental Protection Agency (EPA) 2002.** Reregistration Eligibility Decision for Endosulfan. Case No. 0014. office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.
- Utoh R, Asahina K, Suzuki K, Kotani K, Obara M, Yoshizato K, 2000.** Developmentally and regionally regulated participation of epidermal cells in the formation of collagen lamella of anuran tadpole skin. *Dev. Growth Differ.* 42, 571–580.
- Van Deurs B, Holm PK, Sandvig K, Hansen SH, 1993.** Are caveolae involved in clathrin-independent endocytosis? *Trends Cell Biol*, 3 (8), 249-51. PubMed 14731741
- Vardia HK, Rao PS, Durve VS, 1984.** Sensitivity of toad larvae to 2,4-D and endosulfan pesticides. *Arch Hydrobiol.* 100:395-400
- Vengateshwarlu K, Suryarao K, Srinivas V, Sivaprakash K, Jagannadharao N R, Mythilai A, 2000.** Endosulfan Poisoning: A Clinical Profile. *J. Assoc. Physicians India* 48:323-325.
- Venturino A, Rosenbaum E, Caballero de Castro A, 2003.** Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8:167-186.
- Vercesi A, Bernini F, Barbieri F, 2000.** La sintopia di *Rana Dalmatina* e *Rana latastei* nei boschi planiziali del fiume Ticino: aspetti della biologia riproduttiva (pp.353-358) – In: Giacoma C. (ed.), *Atti I Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica*, Torino (1996), Mus. Reg. Sci. Nat., Torino, 821.
- Wake DB, 1991.** Declining amphibian populations. *Science* 253:60.
- Warburg MK, Rosenberg M, 1997.** Structure of gill epithelium in *Triturus vittatus* larvae. *Ann. Anat.* 179:57-64.
- Weber J, Halsall CJ, Muir D, Teixeira C, Small J, Solomon K, Hermanson M., Hung, H. & Bidleman, T. 2010.** Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Science of The Total Environment*, 408, 2966-2984.

Weil MR, 1986. Changes in plasma thyroxine levels during and after spontaneous metamorphosis in a natural population of the green frog *Rana clamitans*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62:8-12.

Weiss P, Ferris W, 1954. Electron micrographs of larval amphibian epidermis. *Exp Cell Res* 6:546-549."

WHO (World Health Organisation), 1984. Endosulfan. Environmental Health Criteria 40. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland

Wilson EO, 2002. The future of life. Knopf, New York.

Withear M, 1977. A functional comparison between the epidermis of fish and of amphibians. In *Comparative biology of skin*. Symp. Zool. Soc. London, No.39,ed. R.I.C. Spearman, 291-313. New York: Academic Press.

Yadav AS, Vashishat RK, Kakar SN, 1982. Testing of endosulfan and fenitrothion for genotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 105:403-407.

Yoshizato K, 1992. Death and transformation of larval cells during metamorphosis of anura. *Dev. Growth Differ.* 34, 607–612.

Yoshizato K, 2007. Molecular mechanism and evolutionary significance of epithelial–mesenchymal interaction in the body- and tail-dependent metamorphic transformation of anuran larval skin. *Int. Rev. Cytol.* 269, 213–260.

Zaccone G, Fasulo S, Lo Cascio P, Ainis L, Ricca MB, Licata A, 1989. Effects of chronic exposure to endosulfan on complex carbohydrates and enzyme activities in gill and epidermal tissue of the freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Arch. Biol. (Bruxelles)* 100:171-185.

Zhang ZL, Zhang ZuLin, Huang Jun, Huang J, Yu Gang YG, Hong HS, Hong HuaSheng, 2004. Occurrence of PAHs, PCBs, and organochlorine pesticides in the Tonghui River of Beijing, China. *Environ. Pollut.* 130:249-61.

