

F. OSELLADORE, C. ANTONINI, M. CORNELLO, R. BOSCOLO BRUSÀ

ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale,
Loc. Brondolo - 30015 Chioggia (VE), Italia.
federica.oselladore@isprambiente.it

SPERIMENTAZIONE PRELIMINARE DI FISSATIVI ALTERNATIVI ALLA FORMALINA PER LA CONSERVAZIONE DI CAMPIONI DI MACROZOOBENTHOS MARINO

PRELIMINARY TESTING OF ALTERNATIVE FIXATIVES TO FORMALIN FOR PRESERVATION OF MARINE MACROZOOBENTHOS SAMPLES

Abstract - Three non-formalin-based fixatives (*FineFIX*, *Glyoxal* and *Ethanol*) to preserve marine macrozoobenthos samples were compared to find a suitable substitute to Formalin. Solutions were tested on Crustaceans and Polychaetes and evaluated according to specific time windows: 7, 15, 30, 60, 120 and 180 days. The considered variables included: color, wet weight, stiffness and resistance to shaking. Best results with Polychaetes were obtained using 40% *FineFIX* diluted in 60% *Ethanol*, while no significant differences were observed with Crustaceans using all the tested solutions.

Key-words: *benthos, fixatives, FineFIX.*

Introduzione - La Formalina è uno dei fissativi più comunemente usati nella conservazione dei campioni di macrozoobenthos, previa diluizione in acqua di mare (10%) e neutralizzazione con carbonato o borace (Castelli *et al.*, 2003). La nocività della sostanza per la salute umana è oramai assodata e l’Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC), a partire dal 2004, l’ha inserita nell’elenco delle sostanze considerate con certezza cancerogene per la specie umana. A tal riguardo nasce l’esigenza di non utilizzare più tale fissativo a scopo di conservazione dei campioni di macrozoobenthos marino. In questo lavoro sono state sperimentate tre soluzioni fissative alternative alla Formalina: il *FineFIX* (Milestone, Bergamo, Italia) diluito in Etanolo, il Giossale (un dialdeide) e l’Etanolo al 90%. L’utilizzo del *FineFIX* e del Giossale è già stato sperimentato principalmente in ambito istochimico (Stanta *et al.*, 2006; Iesurum *et al.*, 2006; Buesa, 2008) ma tali fissativi non risultano tuttora sperimentati per la fissazione e la conservazione specifica di campioni di benthos marino. Gli obiettivi di questa sperimentazione sono stati quelli di stabilire quale, tra *FineFIX*, Giossale ed Etanolo, potesse risultare valido come fissativo per campioni di macrozoobenthos, di definire la miglior concentrazione percentuale tra *FineFIX* ed Etanolo e di valutare le capacità di conservazione per periodi di tempo medio-lunghi.

Materiali e metodi - Sono stati esaminati 540 individui appartenenti ai gruppi dei Crustacea e Polychaeta (324 e 216 rispettivamente) reperiti, i primi, mediante un retino su aree lagunari dove erano presenti abbondanti comunità algali, i secondi acquistati in negozi specializzati data la difficoltà di reperirne in gran numero, della stessa specie e di dimensioni simili. In particolare gli organismi impiegati durante la sperimentazione sono stati: *Marphisa sanguinea* (Polychaeta: Eunicidae), *Nereis caudata* (Polychaeta: Nereididae), *Palaemon elegans* (Crustacea: Palaemonidae), *Gammarus aequicauda* (Crustacea: Gammaridae) e *Lekanesphaera hookeri* (Crustacea: Sphaeromatidae). Tali organismi sono stati conservati in Etanolo al 90%, in una soluzione di alcol etilico e *FineFIX* al 30%, 40%, 50% e 70%, in Giossale, e valutati secondo una scadenza temporale (7-15-30-60-120-180 giorni) che rispecchi le esigenze di conservazione dei campioni prima delle analisi e del riconoscimento in laboratorio. Le variabili considerate sono state: colore (su base colorimetrica e fotografica), peso

umido, rigidità degli organismi (secondo una scala a cinque livelli) e resistenza allo scuotimento (tramite l'utilizzo di un agitatore). Dopo aver valutato tali variabili si è proceduto al riconoscimento dell'individuo utilizzando le usuali chiavi dicotomiche.

Risultati - Dai primi risultati di questa sperimentazione, la variabile discriminante per la scelta della soluzione più adatta, sembra essere la rigidità degli organismi. Il peso umido e la resistenza allo scuotimento non hanno evidenziato particolari differenze tra le soluzioni. In merito alla colorazione sia i Policheti che i Crostacei hanno più o meno modificato il loro colore originario, passando da colorazioni marroni-rossastre a colori più chiari a seconda che fossero stati conservati in soluzioni con percentuale maggiore o minore di alcol. In linea generale i Crostacei hanno avuto una reazione piuttosto omogenea a tutte le concentrazioni e tipologie di sostanza utilizzata per tutti i periodi di tempo testati. I Policheti sono risultati di maggior interesse per quanto riguarda la discriminazione tra i fissativi; la soluzione più adatta alla loro conservazione è risultata FineFIX al 40% diluito in Etanolo. Inoltre, per periodi di conservazione prolungati, si sono dimostrate adatte anche le soluzioni con una maggiore percentuale di alcol (FineFix al 30% o Etanolo al 90%) sia per i Policheti che per i Crostacei. Risultati positivi per questo fissativo sono stati anche ottenuti nell'ambito di studi di patologia forense dove la fissazione di tessuti con il FineFIX risultava comparabile al materiale fissato in Formalina (Iesurum *et al.*, 2006). Il Gliossale, a differenza di quanto avviene in campo istochimico dove i sostituti non alcolici della Formalina a base di Gliossale vengono considerati come buone alternative alla Formalina (Buesa *et al.*, 2008), in questo studio non ha dimostrato buone capacità conservative rendendo gli organismi di consistenza gommosa e di difficile gestione per il riconoscimento. Inoltre durante la determinazione, il campione deve essere mantenuto sotto cappa aspirante dato il rischio di esposizione dell'operatore ai vapori del fissativo (cfr. scheda di sicurezza).

Conclusioni - Il confronto tra tre fissativi alternativi alla Formalina (FineFIX diluito in Etanolo, Gliossale ed Etanolo al 90%), testati su due specie di Policheti e tre di Crostacei, ha portato alla scelta del FineFIX come fissativo più adatto per la conservazione di campioni di macrozoobenthos marino. In particolare la soluzione contenente FineFIX al 40% ed Etanolo al 60% è risultata essere la migliore. Il proseguo di attività volte alla sperimentazione di fissativi alternativi all'utilizzo della Formalina nei laboratori, oltre a ridurre i costi di gestione e smaltimento dei campioni analizzati, potrà permettere di abbattere il rischio per gli operatori nelle varie fasi delle attività (dal trasporto dei campioni all'analisi in laboratorio).

Bibliografia

- BUESA R.J. (2008) - Histology without formalin? *Annals of Diagnostic Pathology*, **12**: 387-396.
- CASTELLI A., LARDICCI C., TAGLIAPIETRA D. (2003) - Il macrobenthos di fondo molle. In: Gambi M.C., Dappiano M. (eds), Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo. *Biol. Mar. Mediterr.*, **10** (Suppl.): 109-144.
- IESURUM A., BALBI T., VASAPOLLO D., CICOGNANI A., GHIMENTON C. (2006) - Microwave Processing and Ethanol-Based Fixation in Forensic Pathology. *Am. J. Foren. Med. Path.*, **27** (2): 178-182.
- STANTA G., POZZI MUCELLI S., PETRERA F., BONIN S., BUSSOLATI G. (2006) - A Novel Fixative Improves Opportunities of Nucleic Acids and Proteomic Analysis in Human Archive's Tissues. *Diagn. Mol. Pathol.*, **15** (2): 115-123.