

Università degli Studi di
Trieste – A.A. 2020-2021



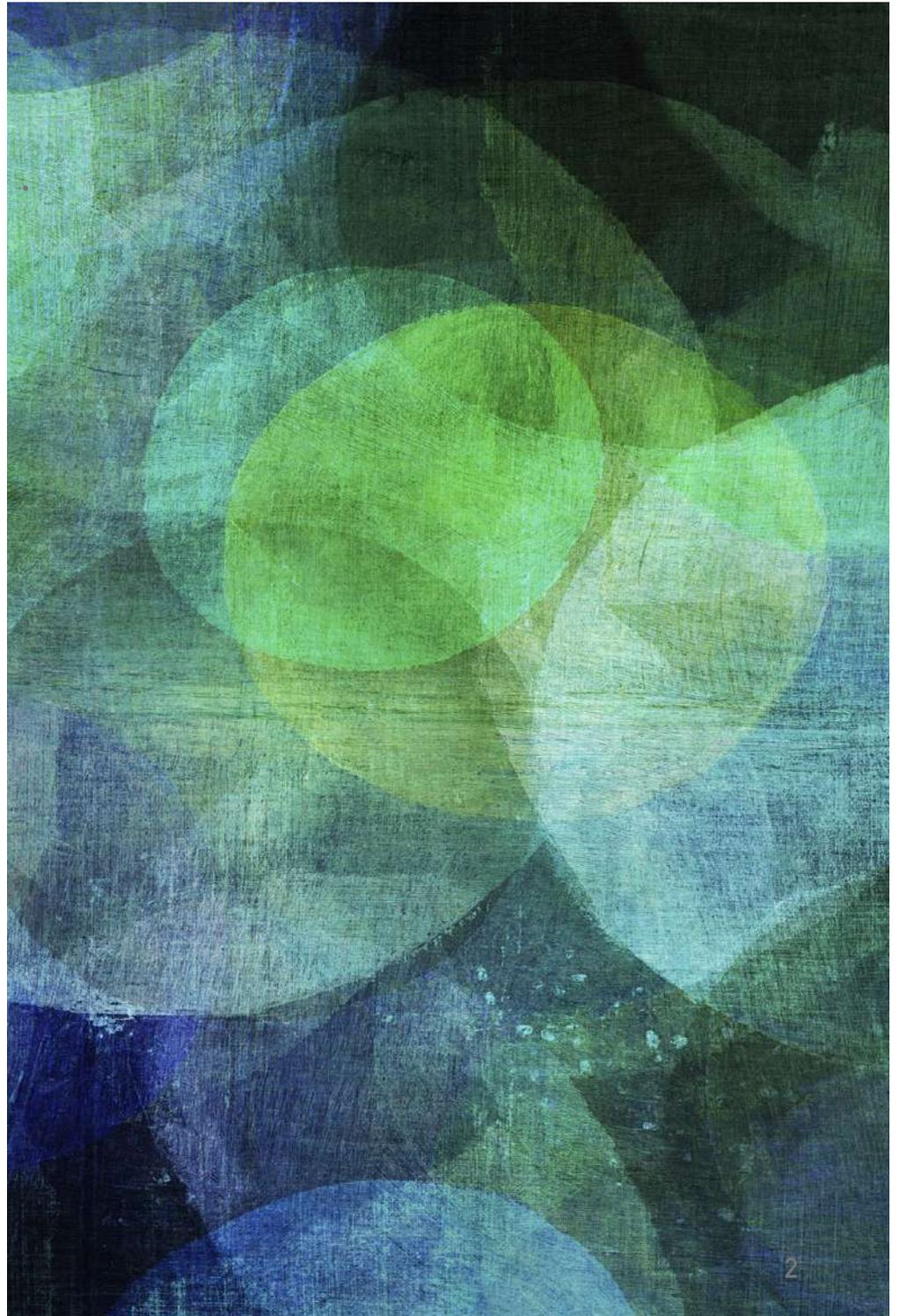
Prof. Monia Renzi (BIO/07)

mrenzi@units.it

Previsione dell'esposizione e stima del rischio

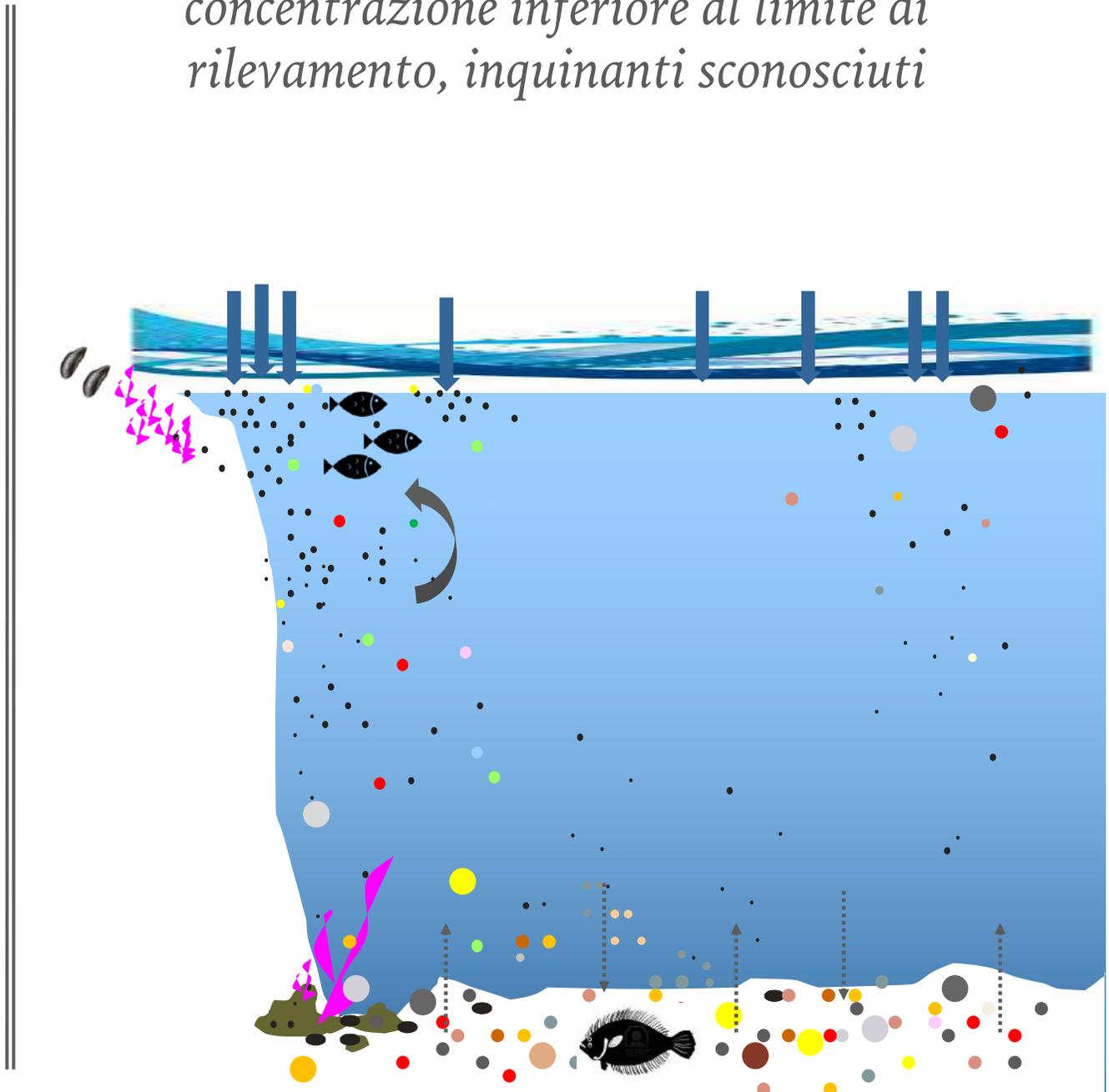
.. . . .

- ❖ Il monitoraggio ambientale
- ❖ Gli indicatori biologici
- ❖ Indici Biotici
- ❖ Biomarkers
- ❖ Approcci integrati



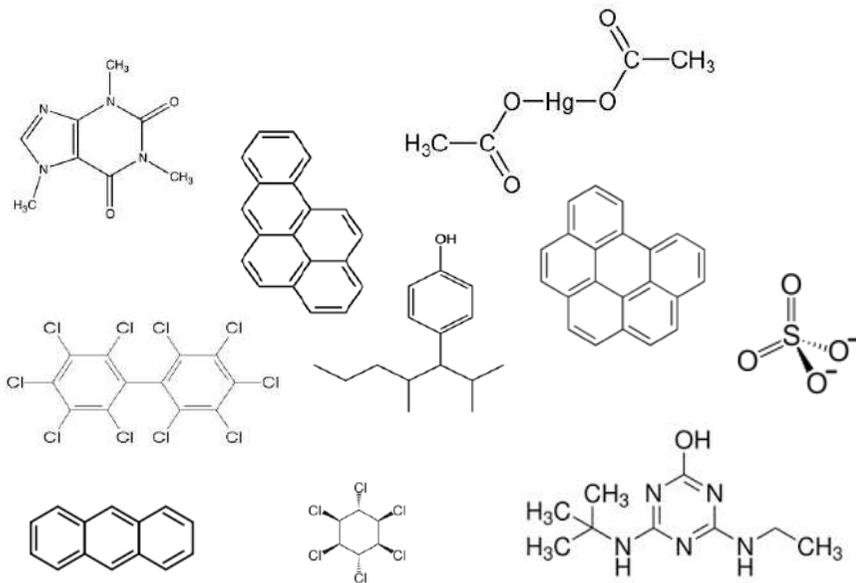
*Migliaia, miscele complesse,
concentrazione inferiore al limite di
rilevamento, inquinanti sconosciuti*

- *Arsenic*
- *Lead*
- *Mercury*
- *Cadmium*
- *Copper*
- *Zinc*
- *Other metals*
- *PAHs*
- *PCBs*
- *PCDDs*
- *PCDFs*
- *DTT, lindane, dieldrin*
- *HCB trans-nonachlor*
- *Other pesticides*
- *TBT*
- *Other organotin compounds*
- *BPA*
- *APs/APEs*
- *BFRs*
- *Other plasticizers*
- *PPCPs*
- *Micro and nanoplastics*
- *Unknown*

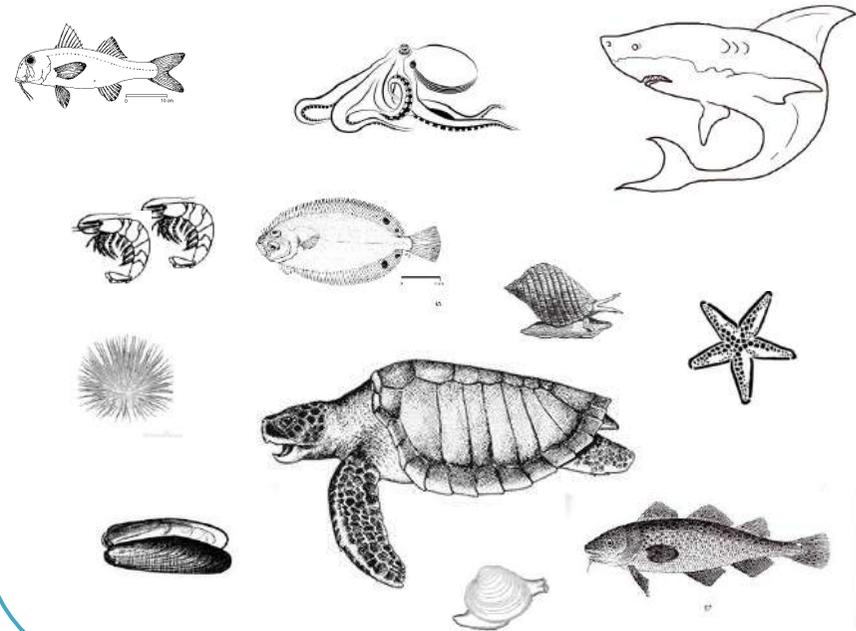


Molteplici livelli di complessità

Contaminanti chimici



Organismi marini



Forma chimica - Biodisponibilità
Distribuzione nelle matrici marine
Patterns di accumulo
Biodisponibilità intracellulare

Preferenze alimentari
Capacità Metabolica
Escrezione - bioaccumulo
Mobilizzazione dai tessuti

La domanda: «Quale è lo strumento migliore per valutare gli impatti ecotossicologici?»

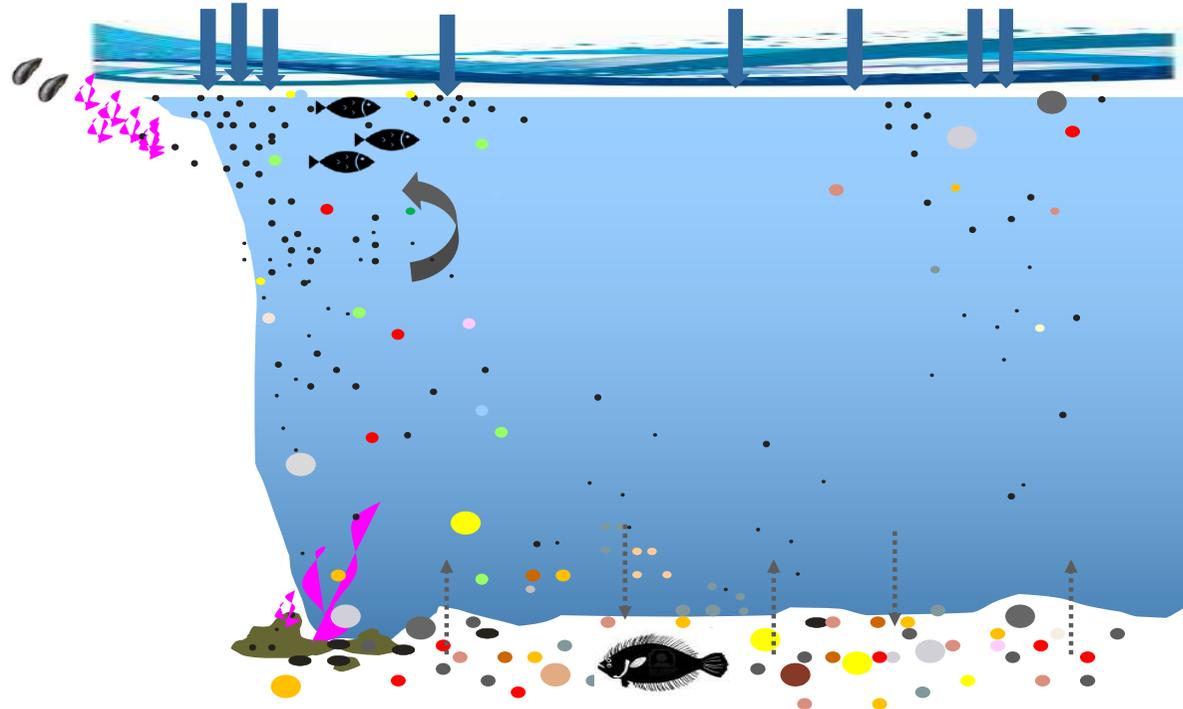


La scelta tra i possibili strumenti:

- Modelli di distribuzione
- Modelli tossicologici
- Analisi chimica delle matrici ambientali
- Biomarkers
- Saggi ecotossicologici
- Indici di biodiversità

Accertare che le concentrazioni di contaminanti negli ecosistemi marini siano a livelli che non danno luogo a effetti di inquinamento

Marine Strategy Framework Directive (2008/56/EC)



Si ma ?
come fare ?

Biomonitoraggio

Il monitoraggio dell'inquinamento mediante l'uso di organismi viventi prende il nome di BIOMONITORAGGIO; si basa sulle variazioni ecologiche indotte dall'inquinamento.



Tali variazioni possono manifestarsi su tre livelli diversi:

- ✓ accumulo delle sostanze inquinanti negli organismi;
- ✓ modificazioni morfologiche o strutturali degli organismi;
- ✓ modificazioni nella composizione delle comunità animali e vegetali.

Questo approccio integra sia gli effetti combinati di diverse classi di inquinanti, sia i livelli di esposizione degli organismi su vaste aree.

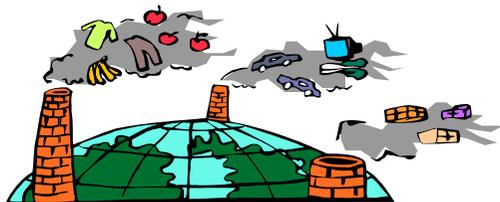
I vantaggi sono legati soprattutto alla capacità di alcuni organismi di fungere da "integratori" di dati e dai bassi costi dell'approccio rispetto alle analisi chimiche tradizionali.

Obiettivi del Biomonitoraggio

Il biomonitoraggio rappresenta una strategia che cerca di conseguire i seguenti obiettivi:



- Valutare in grado di contaminazione di un'area in modo integrato nel tempo tenendo conto anche di effetti multipli e interattivi



- Evidenziare gradienti spaziali e temporali su base locale e tra aree geograficamente distanti



- Stimare la biodisponibilità degli inquinanti



- Valutare gli effetti sull'intera comunità (impatto su biodiversità)

Organismi viventi come strumento

```
graph TD; A[Organismi viventi come strumento] --> B[Bioindicatore (sensibile)]; A --> C[Bioaccumulatore (tollerante)];
```

Bioindicatore (sensibile)

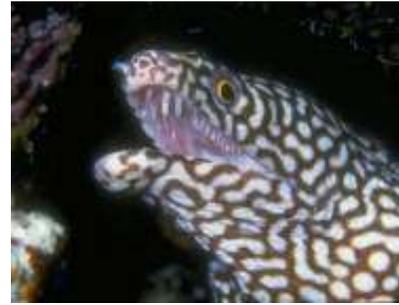
A species that gives information about the environmental quality by some detectable reactions

Foundamental unity of the ecosystem able to give reponses on the environmental quality

Bioaccumulatore (tollerante)

A species thah accumulate detectable amount of contaminants

BIOINDICATORI ANIMALI



Indicatori biologici a livello di comunità

Più specie insieme possono essere utilizzate come bioindicatori quando l'inquinamento determina variazioni misurabili a livello di ecosistema o di comunità.

In questo caso gli effetti misurabili sono:

1. Alterazioni nelle *check-list*; tassonomiche - **scompaiono specie più sensibili mentre sopravvivono quelle più tolleranti**;
2. Variazioni nella biomassa;
3. Variazioni nei rapporti di indici biologici.

Si possono individuare varie principali tipologie di indici che si basano sulla tolleranza all'inquinamento di specie indicatrici o sulla ricchezza in specie e sulla abbondanza.



Fondi duri



Fondi mobili



Fondi duri e mobili



Esempio applicativo: Impiego dei macroinvertebrati di fondo mobile come bioindicatori nella laguna di Orbetello



Prelievo di sedimenti mediante bennata e setacciatura dei campioni di sedimento per l'analisi del benthos.

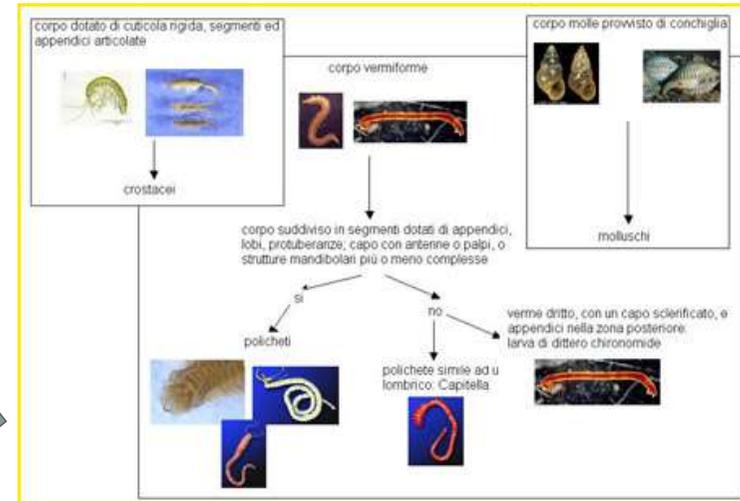
Le particelle di sedimento vengono rimosse con acqua marina corrente avendo cura di non danneggiare gli organismi presenti.

Gli organismi ripuliti vengono trasferiti in contenitori e fissati per le successive determinazioni tassonomiche.

Esempio applicativo: Impiego dei macroinvertebrati di fondo mobile come bioindicatori nella laguna di Orbetello



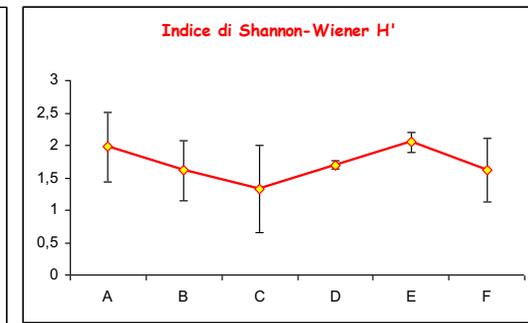
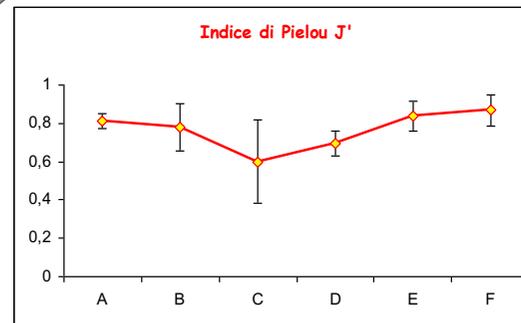
Identificazione delle specie al microscopio



Classificazione delle specie mediante chiavi dicotomiche

| Phylum | Classe | Ordine/Famiglia | Specie |
|----------|------------|-----------------|--|
| Onidaria | Anthozoa | Actiniidae | <i>Paranemoria cinerina</i> (Contarini, 1884) |
| Mollusca | Gastropoda | Trochidae | <i>Gibbula orlana</i> (Salis Marschall, 1973) |
| Mollusca | Gastropoda | Cerithiidae | <i>Cerithium vulgatum</i> Bruguière, 1792 |
| Mollusca | Gastropoda | Neokeningiidae | <i>Naticidae</i> sp. |
| Mollusca | Gastropoda | Hydrobiidae | <i>Hydrobia acuta</i> (Draparnaud, 1805) |
| Mollusca | Gastropoda | Nassariidae | <i>Cylope neritica</i> (Linnaeus, 1758) |
| Mollusca | Gastropoda | Mitridae | <i>Mitra cornicula</i> (Linnaeus, 1758) |
| Mollusca | Gastropoda | Bullidae | <i>Bulla</i> sp. |
| Mollusca | Bivalvia | Cardidae | <i>Cerastoderma glaucum</i> (Poiret, 1789) |
| Mollusca | Bivalvia | Veneridae | <i>Tapes decussata</i> (Linnaeus, 1758) |
| Mollusca | Bivalvia | Semelidae | <i>Abra ovata</i> (Philippi, 1836) |
| Annelida | Polychaeta | Orbiniidae | <i>Phylo foetida</i> (Claparède, 1870) |
| Annelida | Polychaeta | Spionidae | <i>Maldoceras fuliginosus</i> (Claparède, 1870) |
| Annelida | Polychaeta | Cirratulidae | <i>Cirratifaria filiera</i> (Delle Chiaje, 1808) |
| Annelida | Polychaeta | Capitellidae | <i>Capitella capitata</i> (Fabricius, 1780) |
| Annelida | Polychaeta | Capitellidae | <i>Heteromastus filiformis</i> (Claparède, 1824) |
| Annelida | Polychaeta | Capitellidae | <i>Paracapitella incerta</i> Fauvel, 1913 |
| Annelida | Polychaeta | Capitellidae | 1 specie indeterminata |
| Annelida | Polychaeta | Arenicolidae | <i>Arenicola claperedi</i> (Levinsen, 1884) |
| Annelida | Polychaeta | Ophelidae | <i>Arenicola cirratosa</i> Philippi, 1865 |

Elaborazione di liste tassonomiche



Calcolo degli indici di abbondanza e ricchezza specifica

BIOINDICATORI VEGETALI



Alcune specie vegetali terrestri sono in grado di rilevare anomalie geologiche e contaminazione dei suoli, altre specie possono fornire informazioni sulla qualità dell'aria mentre le fanerogame marine sono utilizzate come indicatori della qualità ambientale in aree costiere.

Impiego dei licheni come bioindicatori

- alterazione della clorofilla e riduzione della fotosintesi;
- riduzione della vitalità ed alterazione della forma e del colore del tallo;
- riduzione della fertilità;
- diminuzione della copertura delle specie;
- alterazione della comunità lichenica;
- riduzione del numero totale di specie nel tempo;
- riduzione del numero totale di specie nello spazio

I licheni presentano tutte le caratteristiche di un buon bioindicatore.

Gli effetti indotti dall'inquinamento ambientale sono:



Impiego della *Posidonia oceanica* come bioindicatore della qualità marina

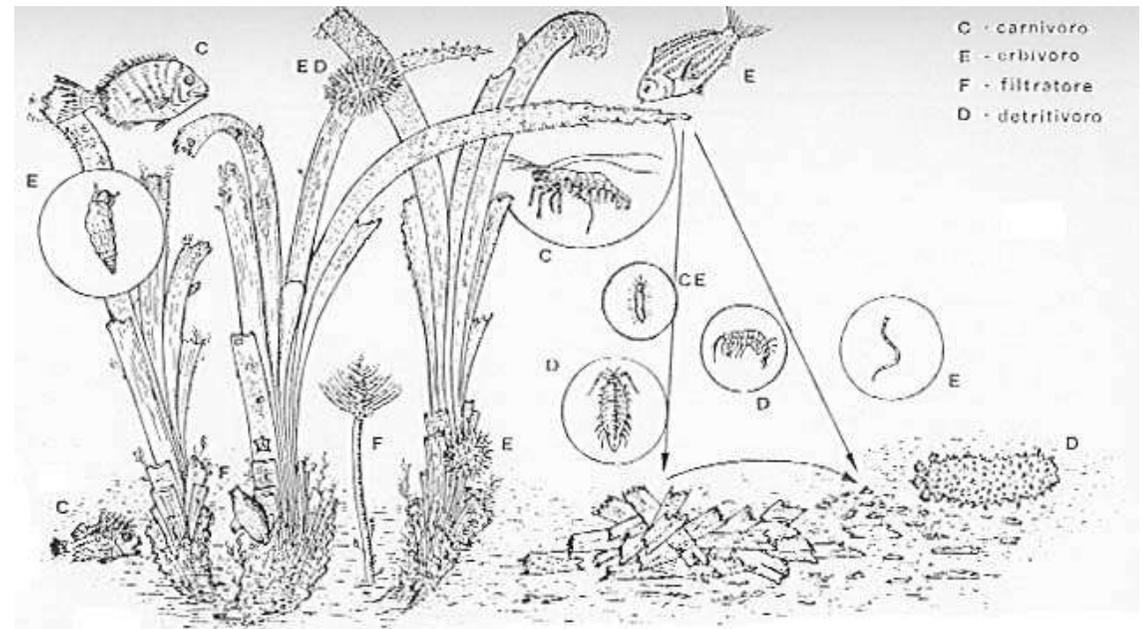
Le praterie di *Posidonia oceanica* rappresentano una delle biocenosi di maggior rilievo ecologico del Mediterraneo



La sostanza organica prodotta costituisce una fonte di cibo diretta e indiretta per numerosi organismi ed il punto di partenza di una complessa rete trofica.

La *P. oceanica* rappresenta un accumulatore di energia, che viene poi trasmessa ai livelli trofici superiori dell'ecosistema (erbivori, consumatori secondari, ecc.) attraverso le foglie, gli epifiti algali e il detrito fogliare.

Le praterie di *P. oceanica* sembrano presentare la più alta produttività primaria dei popolamenti mediterranei sia di biomassa vegetale che animale.



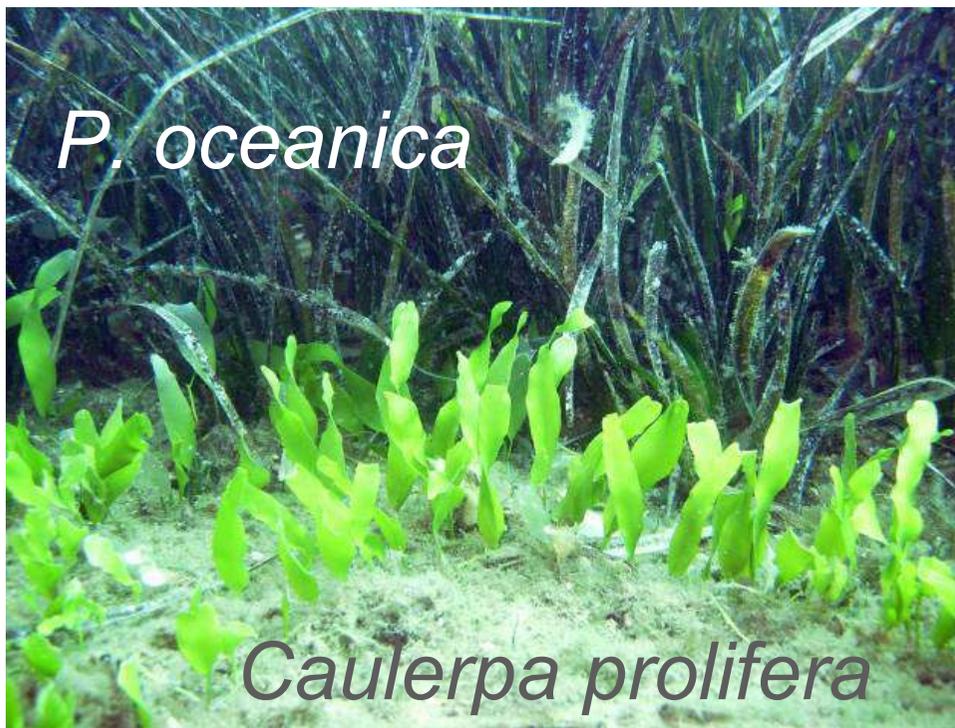
Impiego della Posidonia oceanica come bioindicatore della qualità marina

Posidonia oceanica risente in modo particolare delle variazioni della qualità dell'ambiente, in particolare risulta sensibile a:

- inquinamento chimico;
- incremento della torbidità delle acque;
- incremento dell'eutrofizzazione;
- alterazioni del regime idrodinamico;
- alterazione del regime naturale di sedimentazione;
- insulti meccanici (ancoraggi e/o reti a strascico).

La *P. oceanica* è ritenuta un eccellente indicatore della qualità dell'ambiente





P. oceanica

Caulerpa prolifera

Possono essere impiegati come indici biologici:

- 1- la copertura percentuale delle praterie;
- 2- il substrato di impianto;
- 3- la densità fascicolare (n. fasci/m²);
- 4- densità relativa – densità assoluta corretta per il fattore percentuale di ricoprimento;
- 5- la percentuale di rizomi ortotropi e plagiotropi;
- 6- lo scalzamento dei rizomi;
- 7- i rapporti di copertura *P. oceanica* /altre specie algali

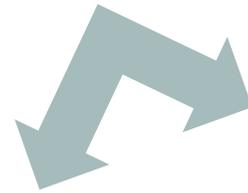
L'analisi fenologica e lepidocronologica condotta sui fasci e sulle scaglie permette di considerare anche i seguenti indicatori biologici:

1. Numero di foglie per fascio;
2. Lunghezza e larghezza media delle diverse classi di foglie;
3. La percentuale di tessuto bruno presente sulle foglie adulte ed intermedie;
4. Il coefficiente **A** per le foglie adulte, per le intermedie e totale;
5. L'indice di superficie fogliare (Leaf Area Index o L.A.I.);
6. La produzione primaria fogliare per fascio (**P**) g/fascio/anno calcolata secondo la formula proposta da Pergent e Pergent – Martini (1991), Pergent-Martini e Pergent (1994), Pergent et al. (1995);
7. La produzione fogliare per unità di superficie (espressa in g/m²) = densità fascicolare * **P**;
8. La produzione dei rizomi (in g/fascio/anno) = media dei valori di produzione dei segmenti annuali di rizoma.

Indicatori biologici a livello di specie

Biomonitoraggio

- **bioaccumulatori** - in grado di assimilare dall'ambiente e tollerare elevate concentrazioni di contaminanti per la valutazione quantitativa dei livelli di contaminanti (es. anguilla);
- **bioindicatori** - specie sensibili alla contaminazione ambientale per la valutazione quantitativa o semi-quantitativa degli effetti dell'esposizione (es. riccio di mare).



passivi - specie autoctone dell'area di studio.

attivi - specie per le quali sono possibili procedure standard di coltivazione, impianto ed esposizione.

Caratteristiche di un buon bioindicatore

- ▶ **La rilevanza:** gli organismi scelti debbono essere ecologicamente significativi;
 - ▶ **L'affidabilità:** la specie deve essere ampiamente distribuita, comune e facile da campionare per facilitare confronti tra siti anche distanti;
 - ▶ **La vigoria:** la specie non deve essere troppo sensibile all'inquinamento;
 - ▶ **La rispondenza:** l'organismo deve mostrare delle risposte misurabili e correlabili alla intensità dell'insulto chimico;
 - ▶ **La riproducibilità:** la specie prescelta deve presentare le stesse risposte agli stessi livelli di inquinanti in siti differenti.
- ✓ Ciclo biologico noto e ben documentato, buone conoscenze specifiche relativamente ad anatomia, fisiologia ed ecologia della specie;
 - ✓ Facilità di identificazione della specie e dei sintomi;
 - ✓ Scarsa mobilità e longevità sufficiente a rilevare gli effetti dell'esposizione; uniformità genetica;
 - ✓ Periodo di latenza ridotto tra esposizione e comparsa dei sintomi;
 - ✓ Reperibilità in tutte le stagioni.

Effetti considerati a livello di individuo

I principali effetti considerati a livello di individuo possono essere:

1. variazioni morfologiche;
2. variazioni della vitalità;
3. alterazioni della sintesi proteica;
4. anomalie genetiche



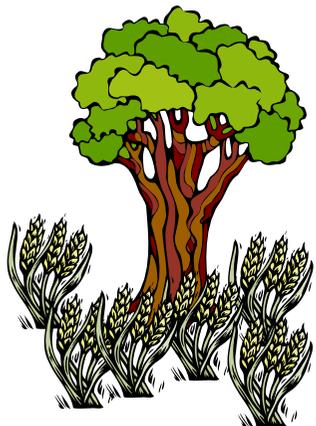
L'esposizione acuta o cronica degli organismi ad una o più sostanze chimiche determina una serie di risposte biologiche che possono essere quantificate e correlate all'ampiezza della perturbazione.

Vi sono due tipi principali di danno che possono essere considerati:

- **sintomi acuti**, spesso reversibili, causati normalmente da brevi esposizioni a concentrazioni molto elevate di dati inquinanti;
- **danni cronici**, dovuti generalmente ad esposizioni prolungate a concentrazioni relativamente basse di inquinanti.

Scala spaziale dei bioindicatori

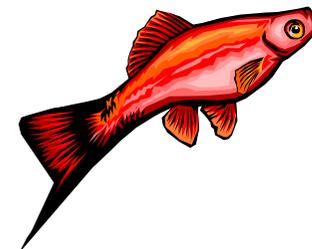
È l'area geografica che l'organismo bioindicatore occupa per espletare tutte le sue attività biologiche all'interno della sua nicchia spaziale realizzata.



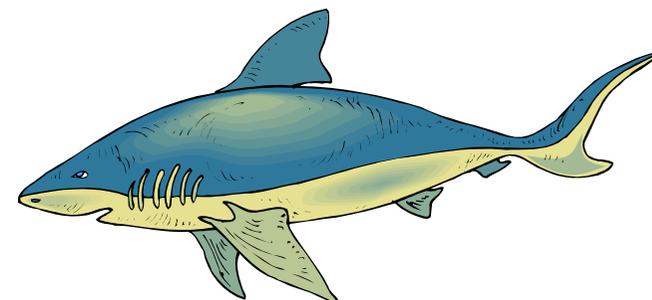
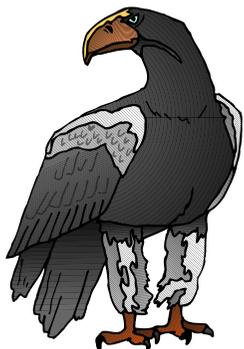
• *Indicatori spot*



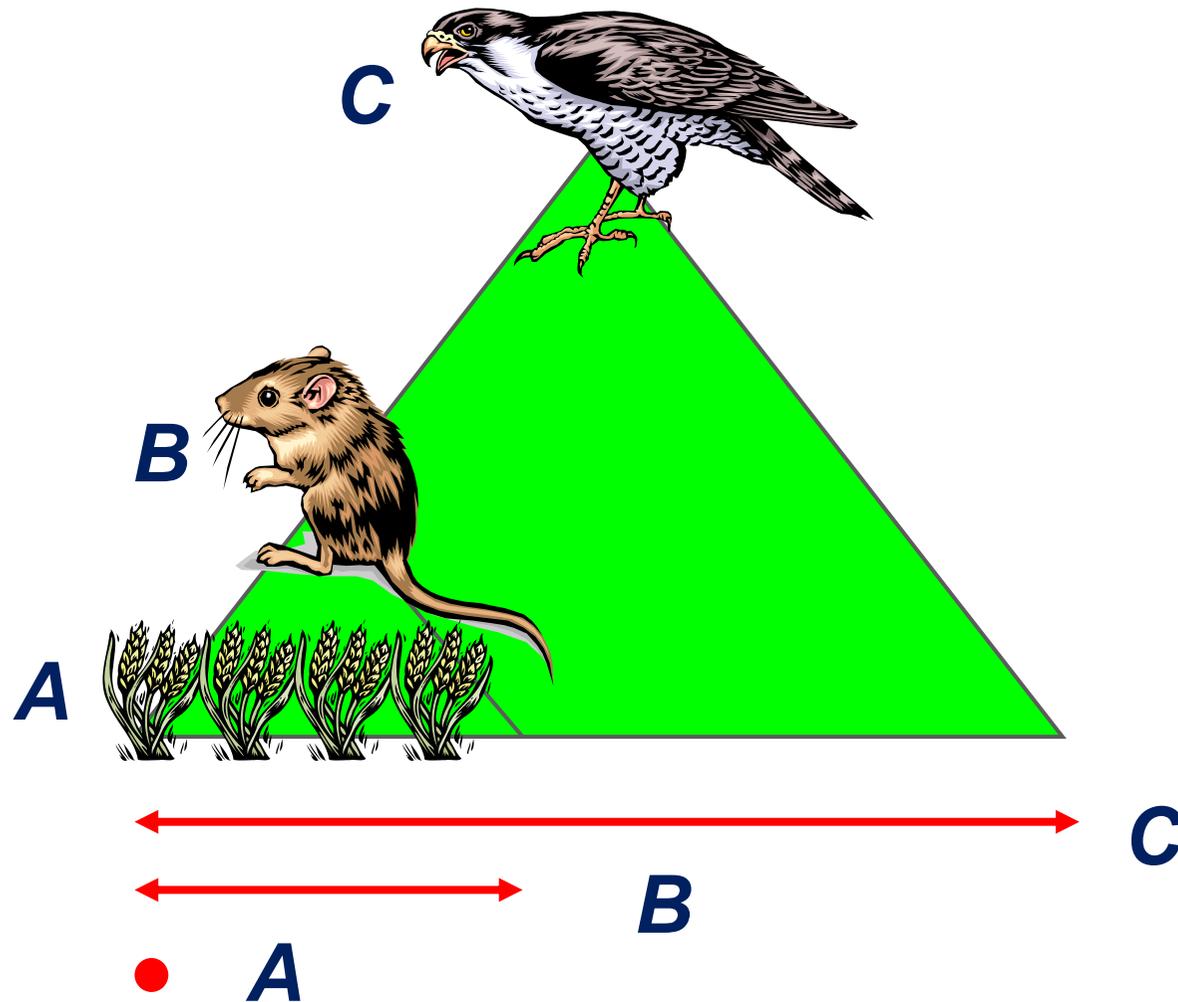
• *Indicatori locali
(scala media)*



• *Indicatori di larga scala*

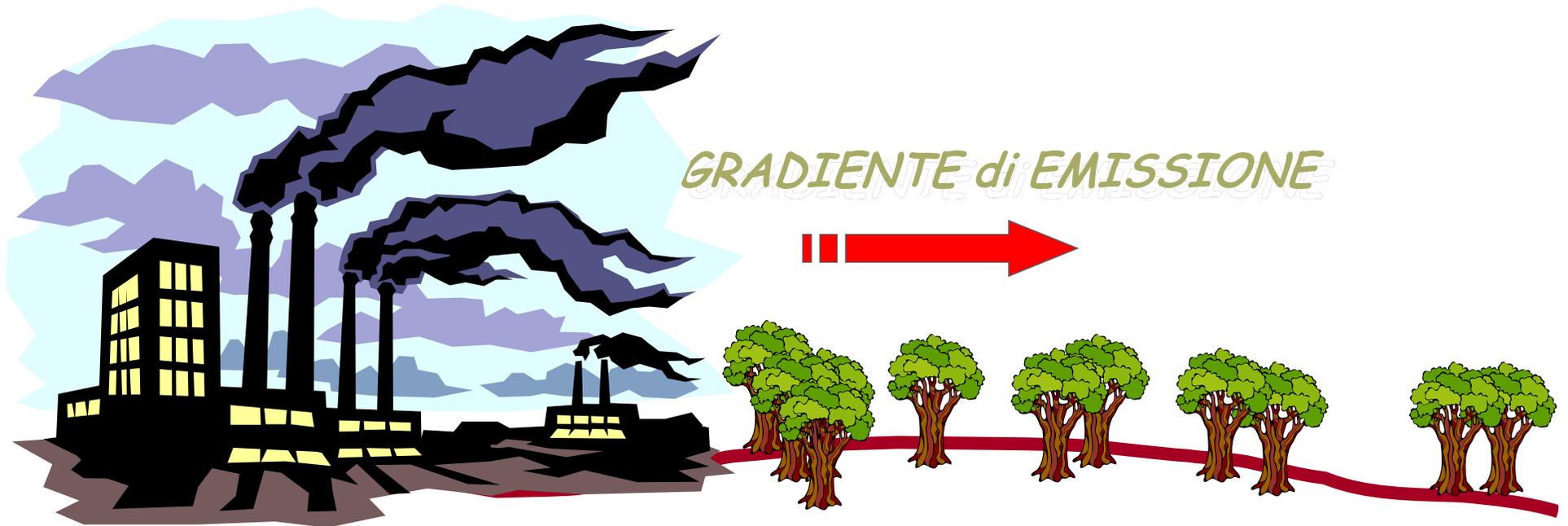


AREA INTEGRATA IN RELAZIONE AL RUOLO ECOLOGICO DEL BIOINDICATORE



Indicatori spot

*Integrazione temporale della qualità ambientale in
un'area geografica*



- *Muschi*
- *Licheni*
- *Funghi*
- *Piante*
- *Invertebrati sedentari*

Distribuzione su base geografica regionale



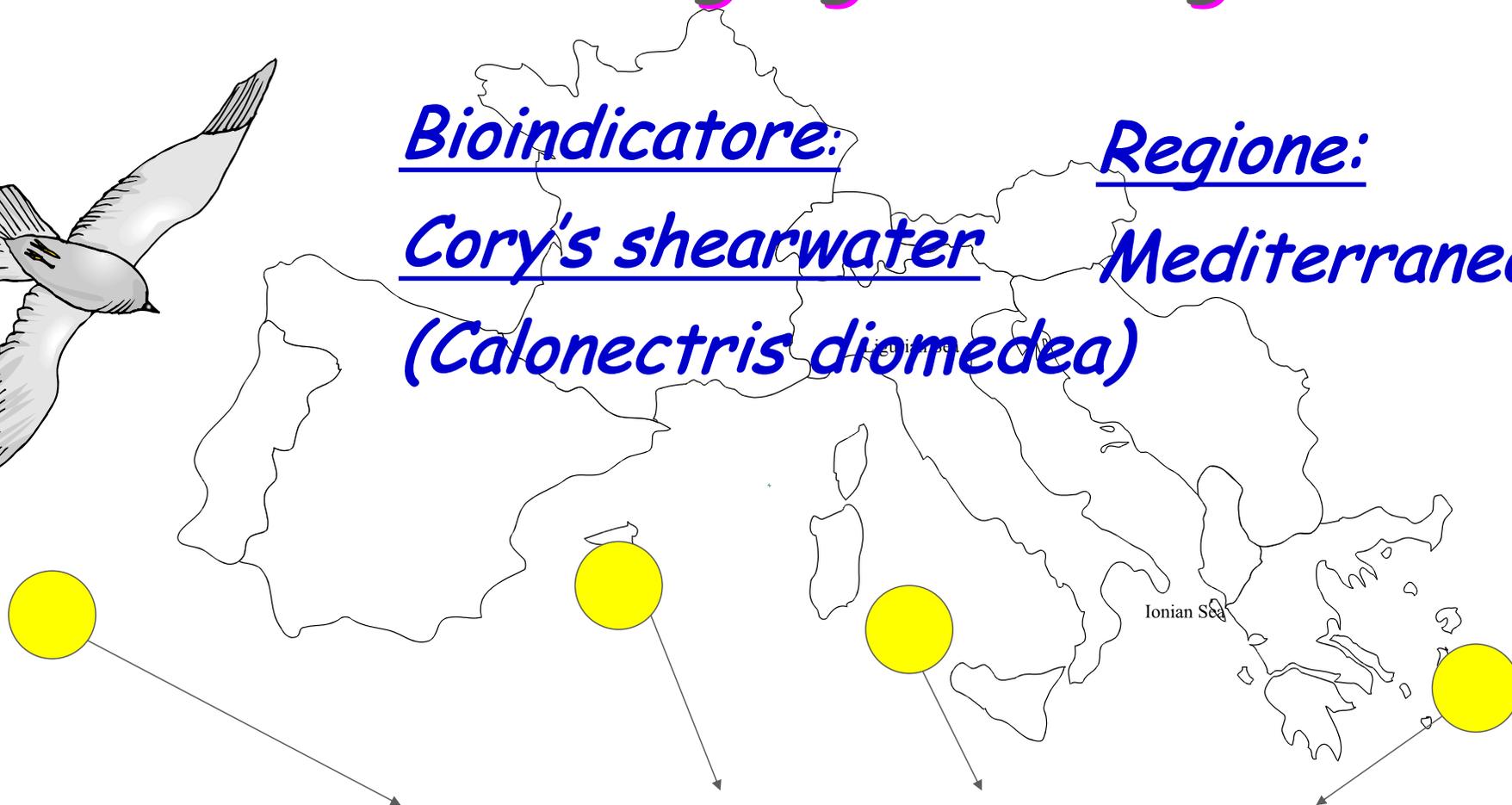
Bioindicatore:

Cory's shearwater

(*Calonectris diomedea*)

Regione:

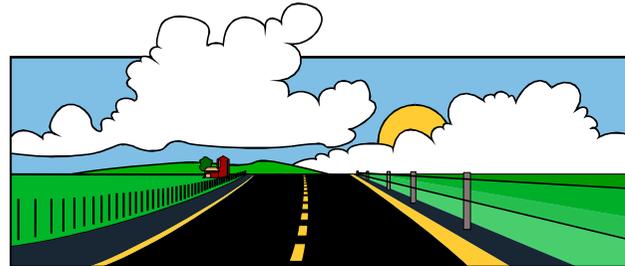
Mediterraneo



| | | | | |
|------------------|----------|---------|----------|----------|
| Mercurio mg/kg | 12(2.2) | 49(23) | 86(40) | 74(50) |
| PCBs microg/kg | 2.2(0.9) | 44(16) | 8.2(4.2) | 3(1) |
| pp'DDE microg/kg | 1(0.6) | 10(4.0) | 4.1(2.8) | 3.7(1.8) |
| Thickness micron | 385(18) | 330(24) | 308(16) | 324-318 |

Contaminazione ambientale

*Distribuzione di Pb
In ecosistema
stradale*

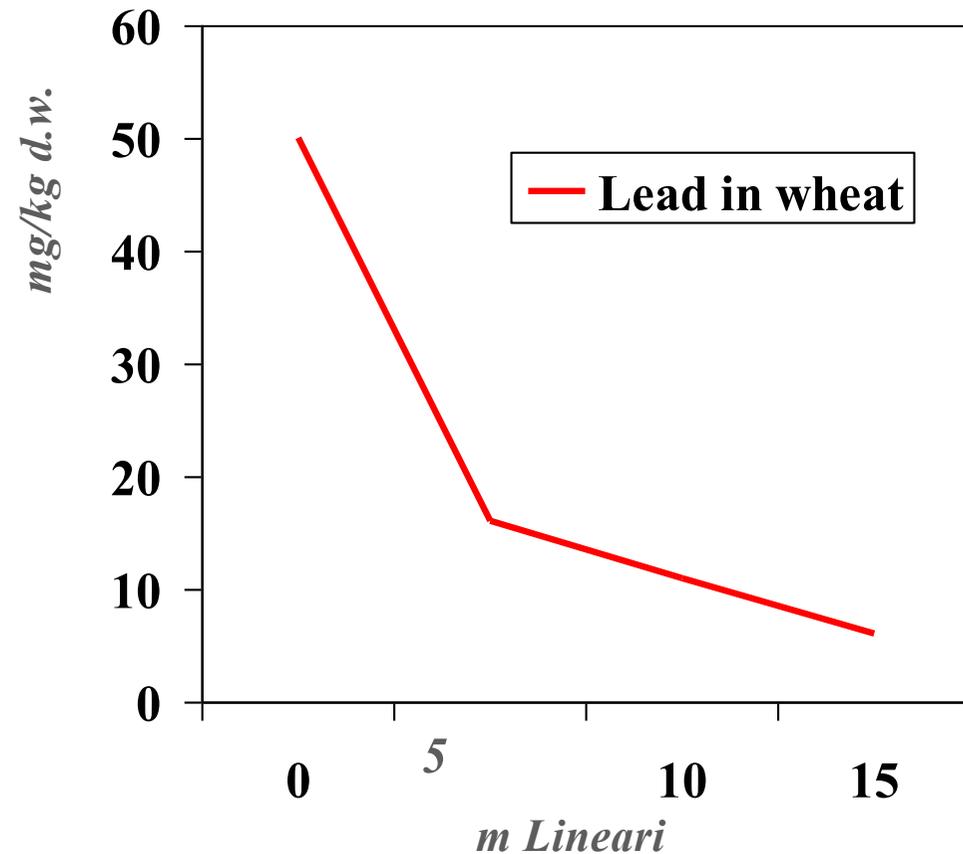


BIOINDICATORI:

*Wheat (*Triticum sp*)*

*Snail (*Cerनुella virgata*)*

*Decadimento del Pb/m
lineari 2-5%*

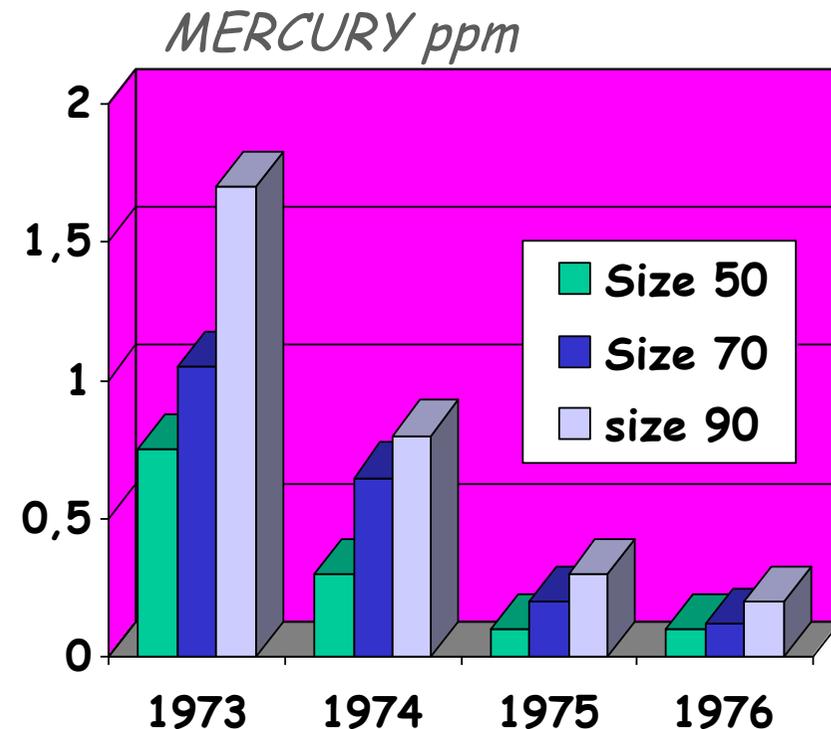


Leonzio et al. 1987

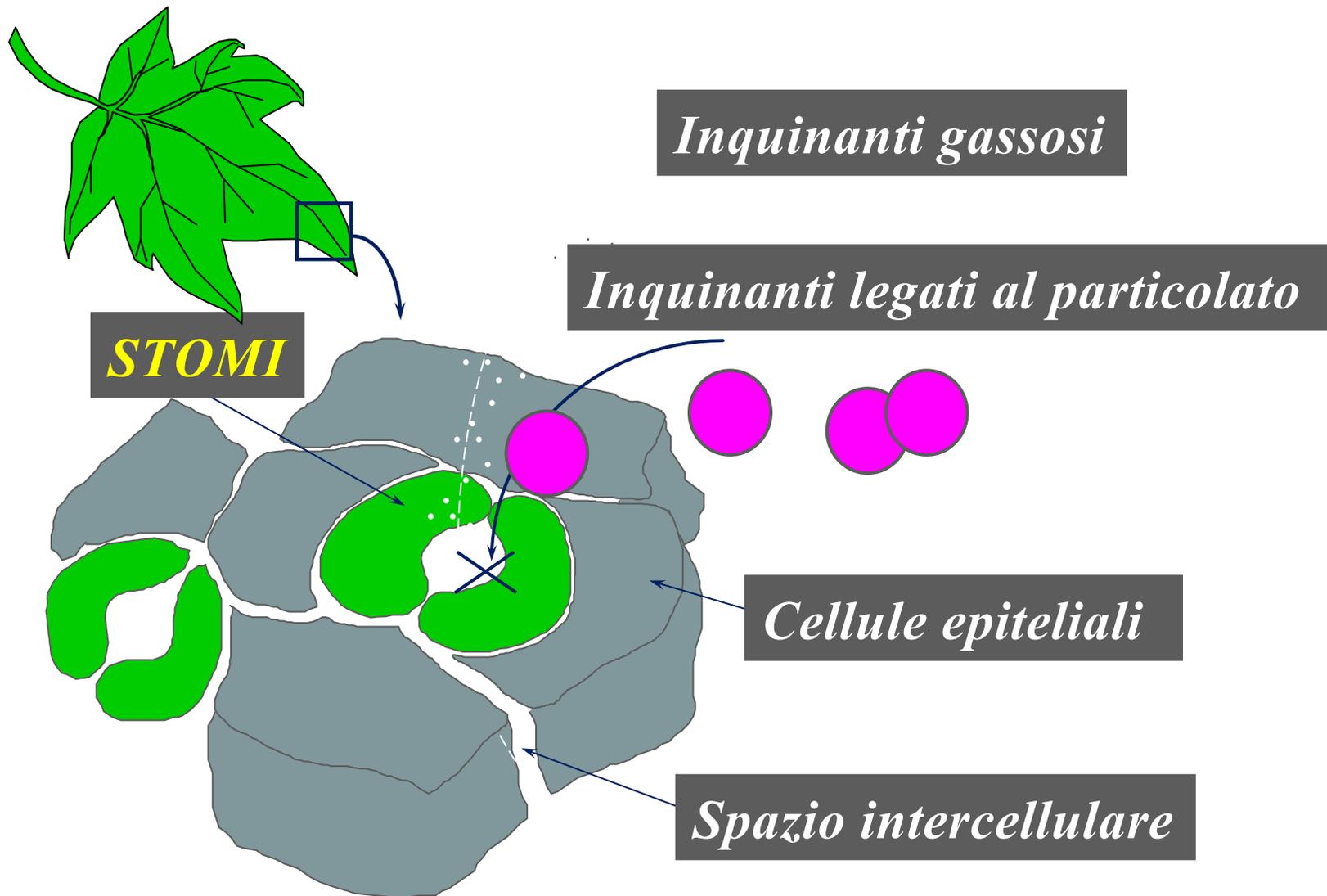
Recupero ambientale

*Decontaminazione per mercurio
nel mitilo di acqua dolce *Unio elongatulus*
in un fiume del monte Amiata*

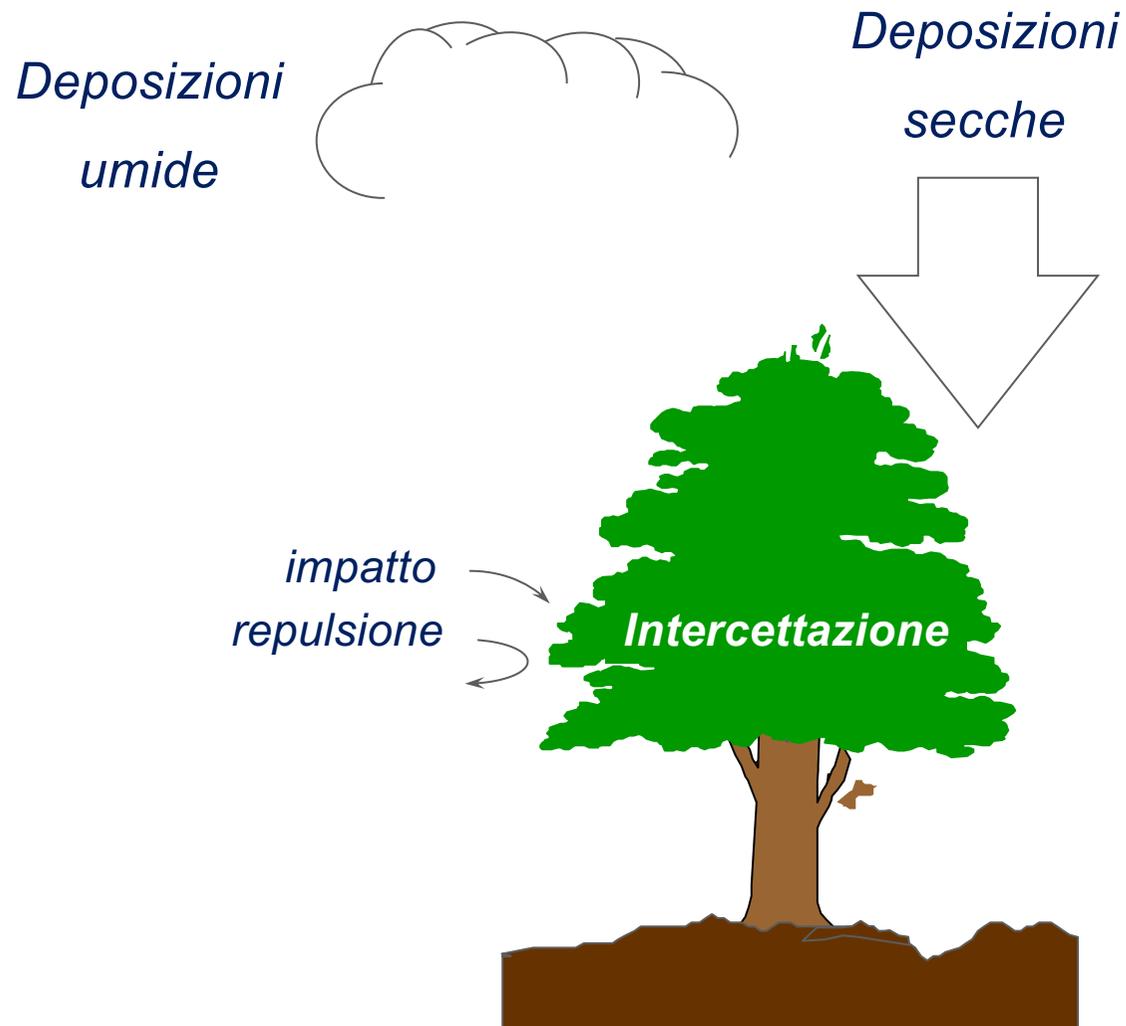
*Andamento temporale
del bioaccumulo*



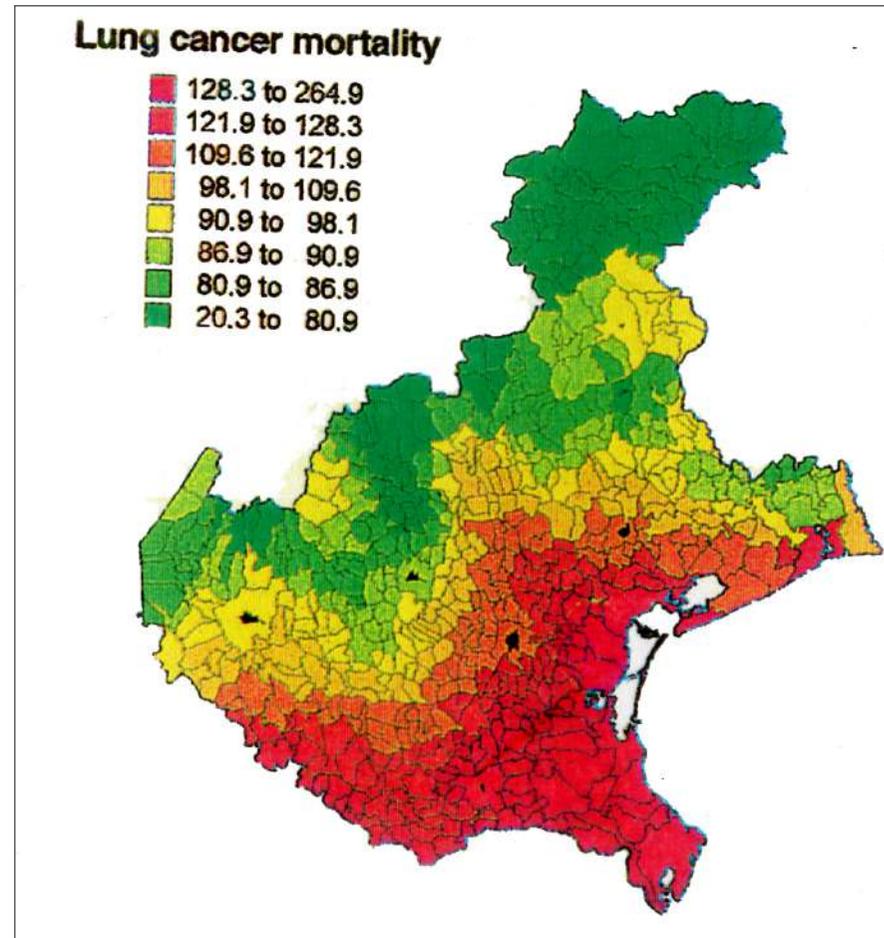
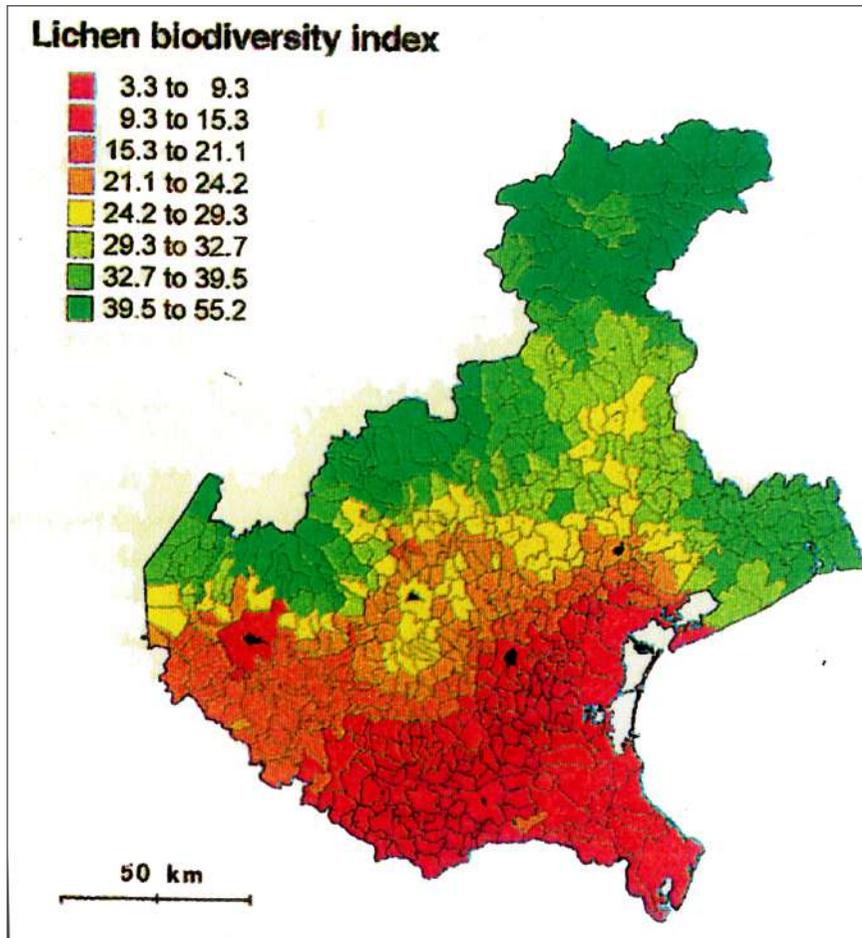
Contatto tra gli inquinanti atmosferici e le piante



Deposizione di contaminanti persistenti



Costruzione di mappe della qualità ambientale



La «rivoluzione» del MUSSEL WATCH



Mytilus galloprovincialis

In pratica si tratta di un *biomonitor* capace di testimoniare la presenza di uno spettro ampissimo di contaminanti, incluse le tossine algali e gli agenti patogeni.

Il bioindicatore “eccellente” proposto da Goldberg nel 1973.

Definito “mussel watch” proprio per la sua potenzialità di bioindicatore

Specie sessile in grado di fornire indicazioni su scala locale

Le sue caratteristiche di filtratore lo rendono particolarmente esposto ai contaminanti intrappolati nel particolato ed a quelli che si concentrano nel *micro-layer* dell'interfaccia acqua-aria.



Questi organismi sono i bioindicatori più utilizzati fino ad oggi nei programmi di biomonitoraggio in molte Regioni del mondo.

Strategie di campionamento

► INDIVIDUI APPARTENENTI A POPOLAZIONI NATURALI

Strutture artificiali (es. piloni, catenarie, pali ecc.)

Campionare in modo da selezionare almeno 150 individui di taglia compresa tra il 70-90% della media delle taglie massime osservate.

Periodo di esposizione: deve coincidere con il periodo di massima maturazione presunta in quanto geograficamente diverso.

Periodo di campionamento: includere i periodi di minore o maggiore accrescimento gonadico da definire preliminarmente su base locale (es. letteratura, dati di mitilicoltori o *pre-survey in situ*) mantenendosi comunque nel periodo gennaio-marzo e agosto-ottobre.

► INDIVIDUI TRAPIANTATI

Se è difficile il reperimento di organismi naturali si possono trapiantare i mitili.

I mitili sono raccolti da popolazione naturale in sito controllo oppure da allevamento e sono traslocati per 4 settimane nelle aree da monitorare, compresa l'area di controllo.

Gli organismi da trapiantare dovranno essere in numero compreso tra 200 e 300 individui di taglia omogenea e compresa tra il 70-90% delle dimensioni massime della popolazione.

Gli organismi possono essere posti in reste di nylon, plastica o di acciaio inox fissate ad una profondità di 1-5 m e almeno +1 m dal fondo.

Trattamento dei campioni

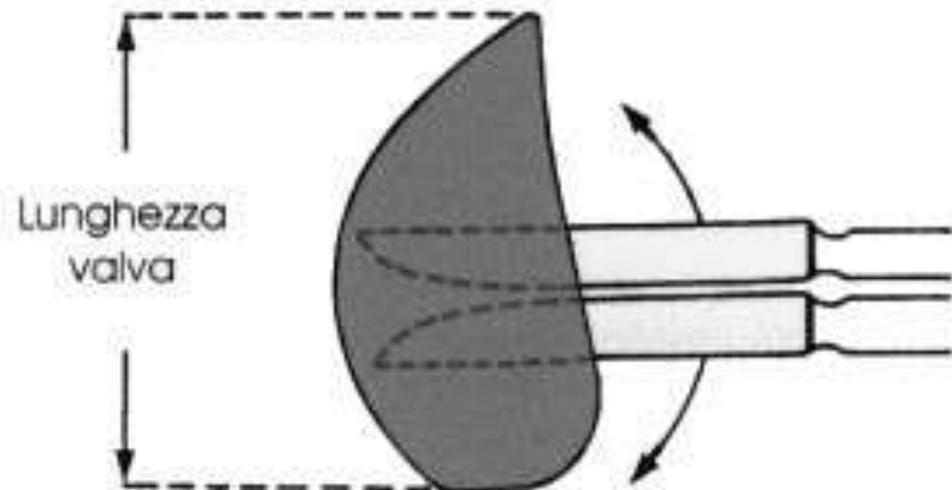
ATTIVITÀ PRELIMINARI

- Ripulire gli organismi da eventuali incrostazioni presenti sulle valve, rimuovendo il materiale estraneo con un coltello pulito
- **Estrarre il bisso dalle valve chiuse**
- Lavare ciascun esemplare con acqua distillata o con acqua di mare pulita
- **Annotare i parametri biometrici (lunghezza e peso) degli organismi destinati alle analisi**
- Usare un secondo coltello pulito: inserirlo fra le valve dove estrude il bisso ed aprirle con delicatezza tagliando il muscolo adduttore posteriore
- **Assicurarsi che il bisso sia stato eliminato completamente**
- Prelevare i tessuti di interesse e pesare organi e pool (se effettuati)

CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Raccogliere la parte molle di almeno 30 organismi

- **Bioaccumulo** - congelati a -20°C o refrigerati ($+4^{\circ}\text{C}$, massimo 24 ore)
- Va raccolta la parte molle di almeno 30 organismi (suddivisi in 3 repliche con i tessuti di 10 animali)



Principali limitazioni del «*mussel watch*», inefficacia nel:

- ✓ determinare gli effetti dell'inquinamento a carico delle varie componenti che costituiscono la comunità ecologica.
- ✓ valutare il rischio ambientale, di riconoscere cioè quali effetti siano a carico dell'ecosistema.
- ✓ evidenziare i meccanismi biologici in grado di segnalare la sensibilità e selettività di questi organismi all'esposizione ai composti inquinanti (concetto di biomarcatore o *biomarker*).



In ecosistemi inquinati, le sostanze tossiche alterano lo stato di salute degli organismi provocando una “sindrome da stress”, cioè un’alterazione misurabile dello stato fisiologico indotta da un cambiamento ambientale.

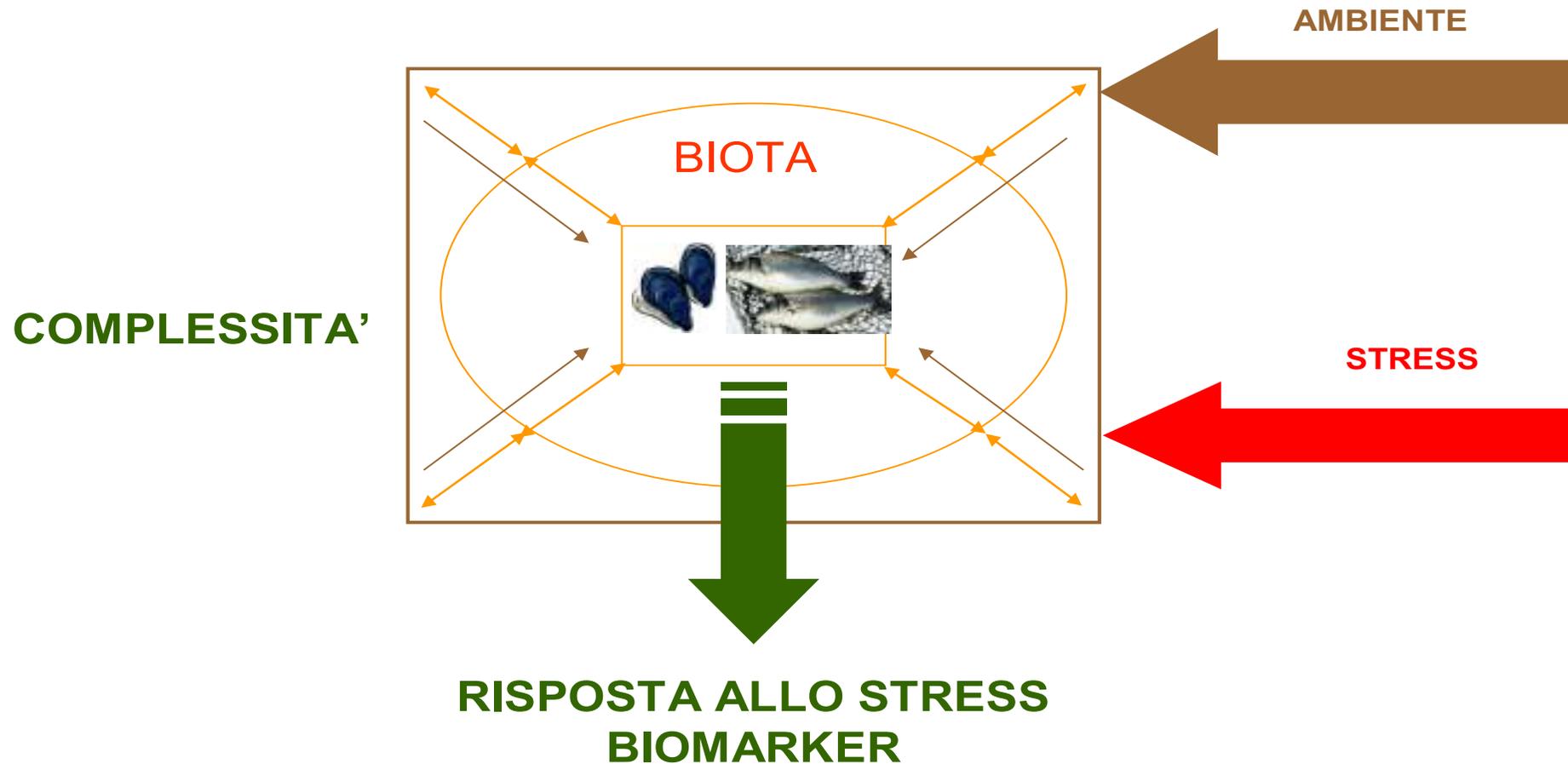
La sindrome da stress può essere opportunamente quantificata mediante l’utilizzo dei biomarkers.

L’analisi dei biomarkers è volta alla valutazione dello stato fisiologico degli organismi che popolano un ecosistema al fine di determinare gli effetti dell’inquinamento sulla componente biologica dell’ecosistema stesso.



La necessità di valutare esposizione ed effetti: i *biomarkers*

“..quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione) la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti” (NRC 1990)



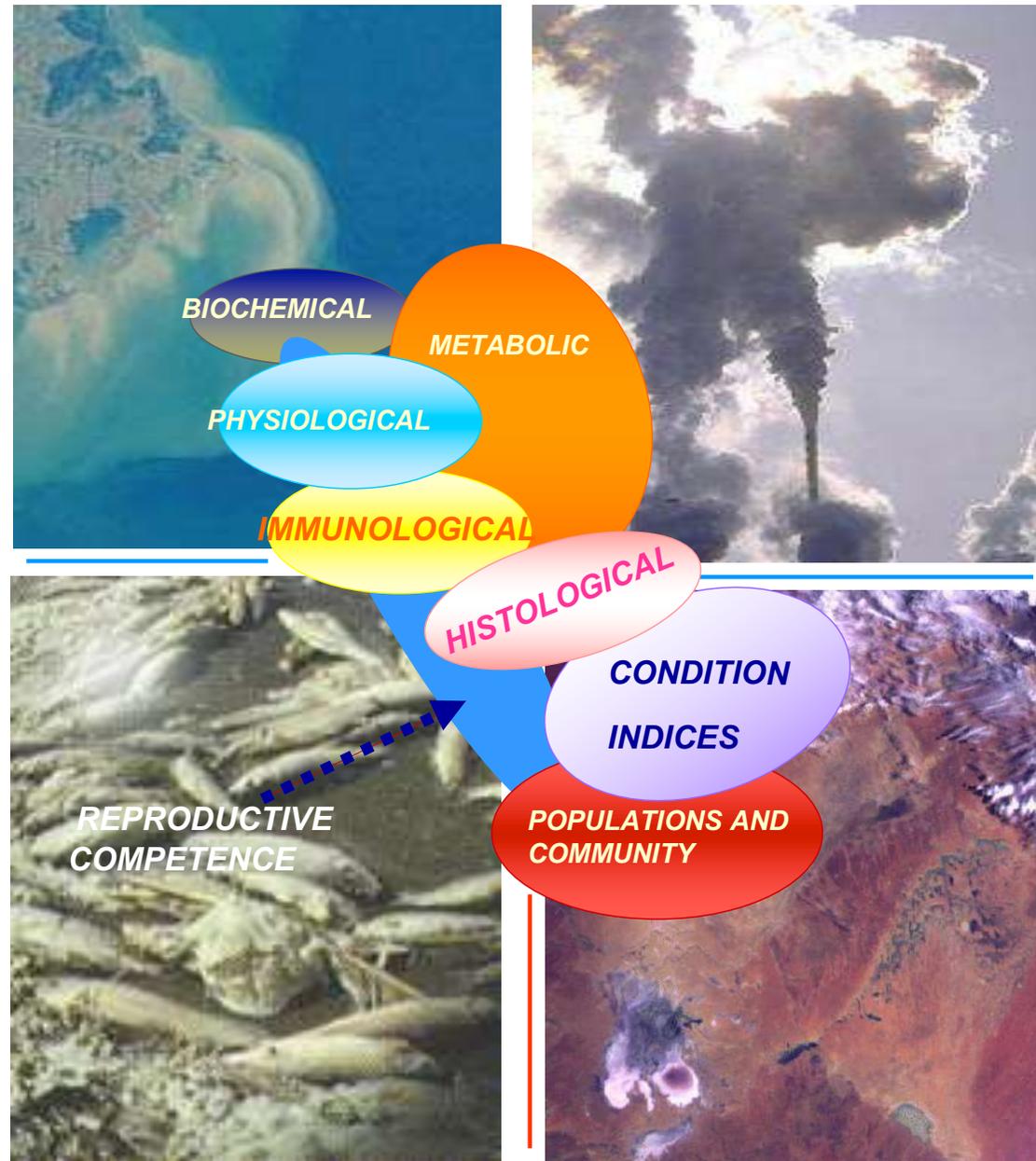
È possibile trovare varie definizioni di Biomarker.

BIOMARKER: è una molecola, solitamente di natura proteica, che identifica un particolare stato biologico e viene utilizzato in vari ambiti disciplinari, quali la medicina, la paleontologia e la tossicologia.

**RISPOSTE
A BREVE
TERMINE**

In ecotossicologia, i biomarkers vengono utilizzati generalmente per valutare l'esposizione di un organismo a sostanze ambientali che possono potenzialmente arrecare un danno.

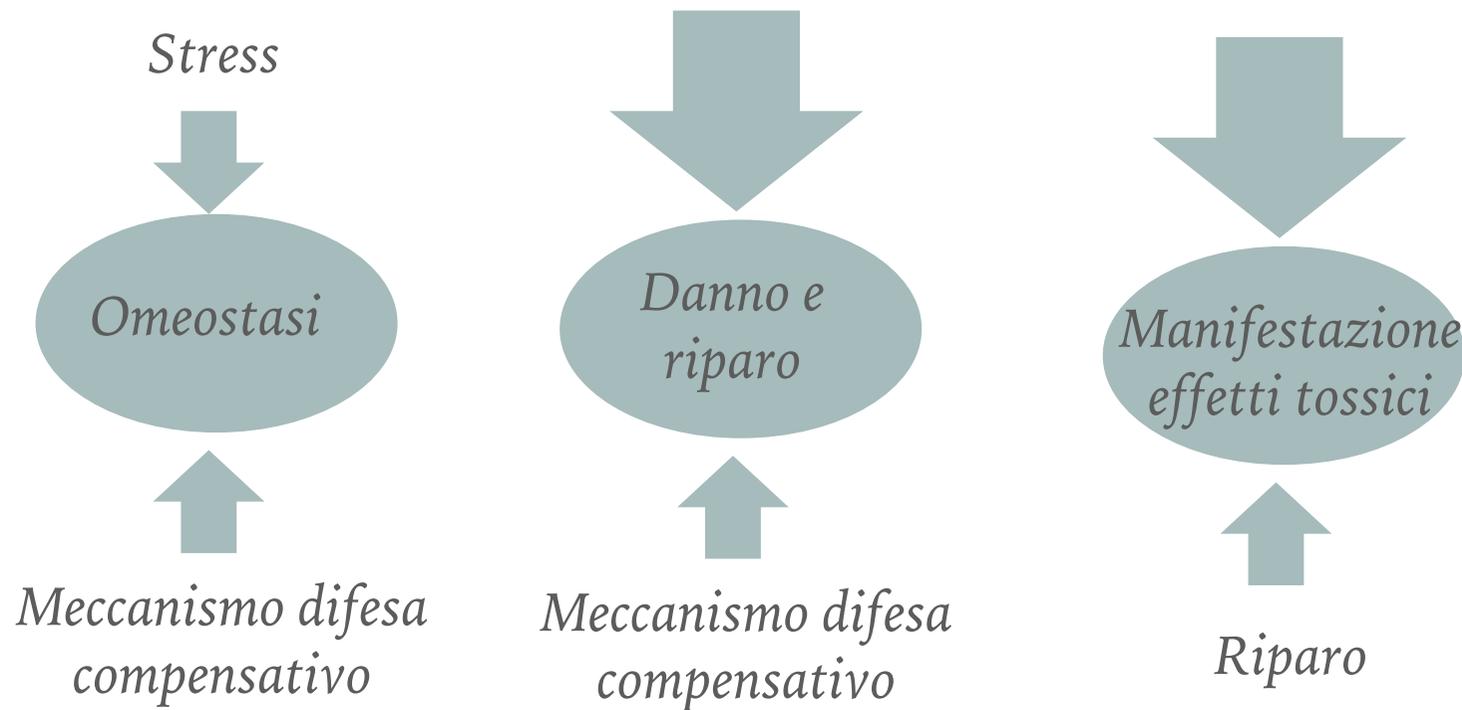
BASSA RILEVANZA ECOLOGICA



**RISPOSTE A
LUNGO
TERMINE**

ALTA RILEVANZA ECOLOGICA

Utilizzando i biomarker non otteniamo la valutazione quantitativa dei livelli del composto tossico cui l'organismo è sottoposto, ma la determinazione del "livello di salute" in cui l'organismo si trova, nel suo passaggio dallo stato d'omeostasi alla malattia (McCarthy & Shugart, 1990; McCarthy et al., 1990).



«Risposta biologica alle sostanze chimiche che permette di misurare l'esposizione o talvolta, l'effetto tossico» (Walker et al., 1996).

Esistono due tipologie di biomarkers: biomarkers di esposizione e di effetto; dall'inibizione dell'AchE (acetilcolinesterasi) nel sistema nervoso degli animali fino alla riduzione di spessore del guscio delle uova degli uccelli.

Perché i biomarkers

- Rapidi
- Robusti
- Informativi
- Rappresentano effetti a diversi livelli biologici
- Generali e specifici
- Risposte precoci
- Rilevano l'effetto sinergico dei contaminanti
- Rilevano gli effetti anche dopo che è scomparsa la causa
- Semplici
- Rapporto costo/beneficio ottimo

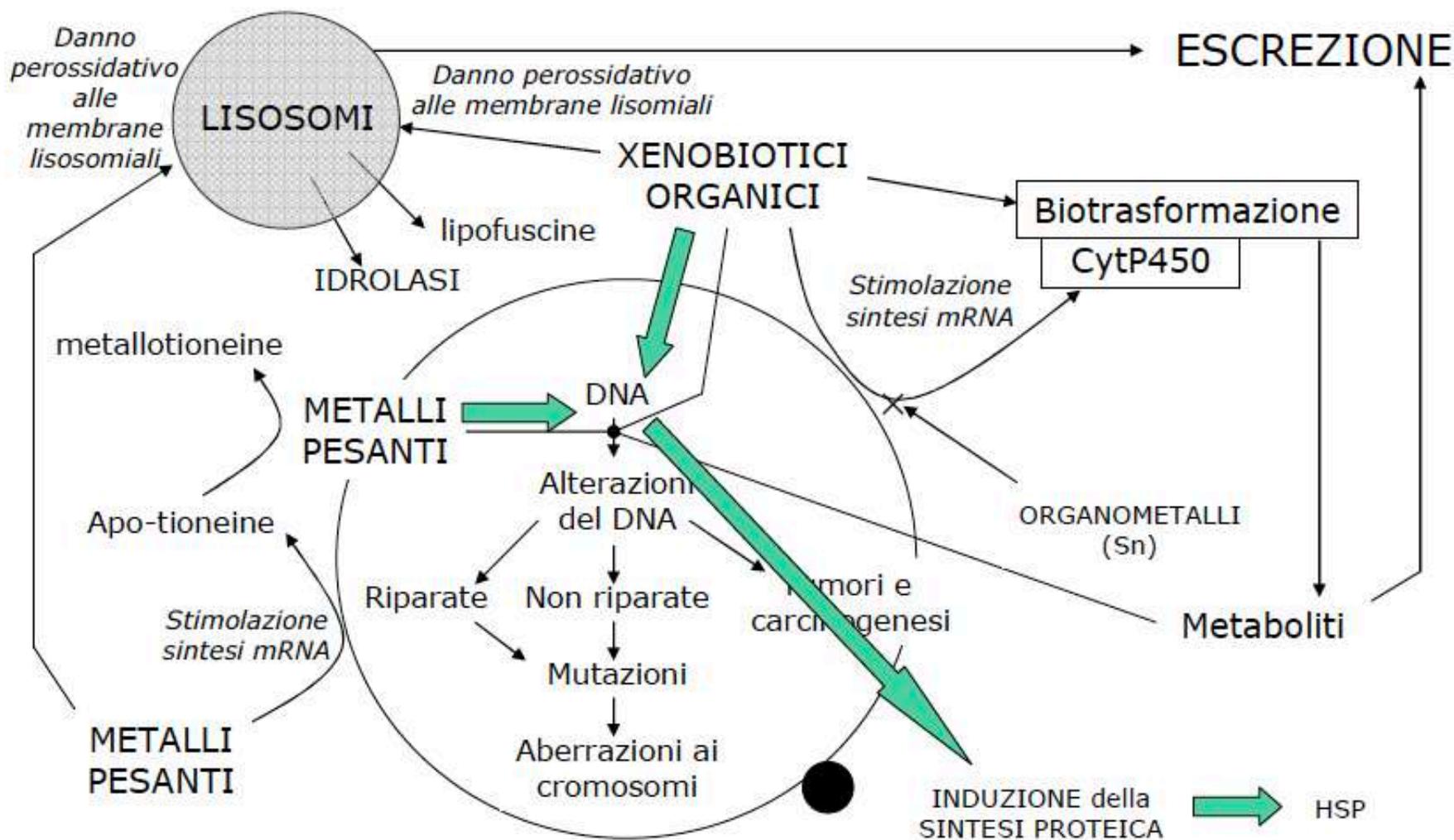
Misura funzionale dell'esposizione ad agenti stressori espressa a livello sub-organismico, fisiologico, comportamentale.

(McCarthy and Munkittrick, 1996)

- Influenza delle condizioni ambientali e stagionali sulla fisiologia degli organismi
- Variabilità biologica alta legata a: Età, genere, stato riproduttivo, stadio di sviluppo, dieta, isoenzimi

- Biomarkers generali
 - Sono indice di una alterazione generale dell'ambiente.
- Biomarkers specifici
 - Sono la risposta ad uno specifico inquinante.
- Batteria di biomarkers
 - Insieme di biomarcatori in grado di dare risposte integrate.

Effetto sinergico di inquinanti



Effetti sub-letali:

Alterazione al DNA (genotossicità)

- Formazione di addotti
- Danneggiamento
- Test dei micronuclei

Alterazione del sistema immunitario

- Fagocitosi
- Conteggio emociti
- Ossido di azoto
- Linfociti
- Saggi batterici

Alterazioni morfologiche

- Stabilità lisosomale
- Modificazioni strutturali dei lisosomi
- Proliferazione di perossisomi
- Accumulo lipidi neutri
- Accumulo lipofuscine

Alterazioni biochimiche

- Stress ossidativo

Catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GPx e Se-GPX), glutatione reduttasi (GR), stato redox del glutatione, glutatione totale (GSH)

- Perossidazione lipidica

Malonaldeide (MDA), sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS)

- Biotrasformazione e trasporto

Enzimi di fase I (ossidasi a funzione mista)
Enzimi di fase II

- Sistemi di protezione cellulare

Metallotioneine (MT)
Heat-shock proteins (HPS)

- Neurotossicità

Inibizione dell'acetilcolinesterasi (AChE)

- Metabolismo energetico

- Stress ossidativo

Enzima superossido dismutasi (SOD)

Catalizza la seguente reazione



È un enzima antiossidante per la gran parte delle cellule esposte all'ossigeno.

Favoriscono la dissociazione dell'anione superossido in ossigeno molecolare e in perossido di idrogeno, mediante reazioni di ossido-riduzione.

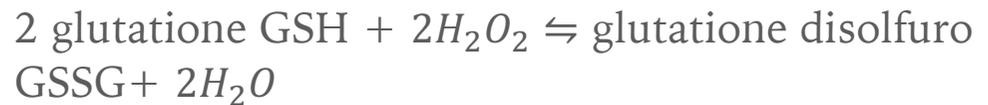
La SOD ha la funzione nella cellula di protezione dalla tossicità dell'anione superossido.

Enzima glutazione S-transferasi (GST)

Catalizza la coniugazione di riduzione dalla forma ridotta del glutazione (GSH) al substrato xenobiotico che è necessario alla detossificazione delle cellule.

Enzima glutazione perossidasi (GPx)

È una ossidoreduttasi che catalizza la seguente reazione:



Questo enzima è associato al danno ossidativo al DNA.

Se viene rilevato negli organismi un livello di perossidasi basso, significa che l'organismo in vita ha dovuto affrontare una situazione di stress che fisiologicamente ha consumato l'enzima per permettere all'organismo di produrre GSSG.

Enzima glutazione reduttasi (GR)

È l'enzima che catalizza la reazione di ritorno dal glutazione disolfuro al glutazione, con l'aiuto del cofattore NADPH.



- Stress ossidativo

Enzima catalasi (CAT)

E' un enzima coinvolto nella detossificazione della cellula dalle specie reattive dell'ossigeno.

Catalizza la seguente reazione:



È un enzima piuttosto stabile.

Il meccanismo molecolare nello specifico non è ancora noto.

La catalasi può anche ossidare diverse tossine, come la formaldeide, l'acido formico, e l'alcol. Per fare questo utilizza il perossido di idrogeno.

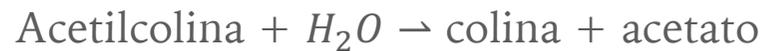
La catalasi si trova nel perossisoma. Tutti gli animali utilizzano la catalasi in tutti gli organi, con concentrazioni particolarmente elevati nel fegato.

Sono presenti anche nei vegetali.

- Neurotossicità

Enzima acetilcolinesterasi (AtCh)

È un enzima della classe idrolasi che catalizza la reazione seguente:



Le tossine naturali possono compromettere la corretta funzionalità di questo enzima. L'enzima può essere inibito da inibitori che impediscono la degradazione dell'acetilcolinesterasi e questo porta un aumento della quantità dell'acetilcolina.

- Perossidazione

Perossidazione lipidica (LPO)

È un processo dovuto ai radicali liberi contenenti ossigeno molecolare presenti nella cellula. I lipidi vengono ossidati dall'ossigeno molecolare e questo provoca una reazione a catena, in quanto i lipidi, essendo privi di un elettrone, tendono a sottrarlo ad altre molecole, fino ad arrivare alla sottrazioni di elettroni dal nucleo e, quindi, dal DNA.

Nel caso di una forte presenza di radicali liberi, le cellule vengono coinvolte massivamente in tutto l'organismo.

*La scelta di specie “giuste” e non
“comode”: le “keystone species”*



Esempi di biomarkers correlati a contaminanti



Imposex nei molluschi



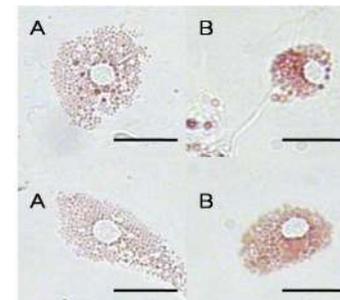
Formazione di micronuclei nelle cellule di pesci e mitili



Intersesso nei pesci



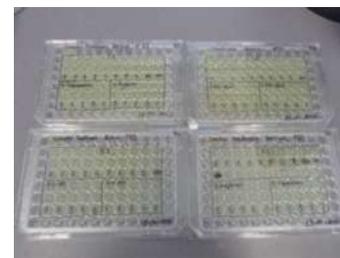
Alterazioni larvali



Destabilizzazione delle membrane lisosomiali nel pesce e nel mitilo



Parassitosi



Attivazione/inibizione di recettori molecolari

Approccio Ecotossicologico Integrato (AEI)

Fornire strumenti per predire le conseguenze future e valutare lo stato di salute di un ecosistema, nel quale sono presenti, oltre alle **perturbazioni, fluttuazioni naturali nelle variabili misurate**, è un problema complesso che non può essere risolto con analisi monodimensionali o che riguardano un solo livello ecologico.



Gli obiettivi dell'AEI:

- Identificare le classi di inquinanti presenti in un determinato ambiente
- Valutare gli effetti delle loro interazioni con le componenti biologiche.
- Fornire risposte dose-dipendenti: proporzionalità delle risposte osservate rispetto ai livelli di inquinamento dell'ambiente naturale.

Approccio Ecotossicologico Integrato (AEI)

BIO - FASE

Risposte allo stress
Biomarker di esposizione
Biomarker di effetto

AChE

Inibizione

MFO

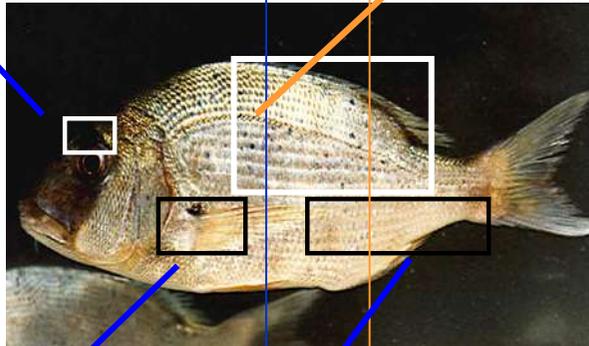
HSP

Induzione

GSI – Gonadosomatic index

GONADI

Maturazione e sviluppo gameti



CHEMI-FASE

Residui di contaminanti
nei tessuti

HCB

Stress

DDT

Tossico - ED

PCB

Tossici - ED

IPA

Cancerogeni - ED

METALLI

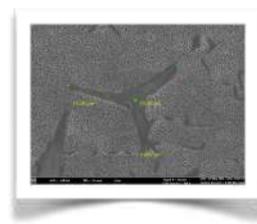
Tossici

Hg, Zn, As, ecc

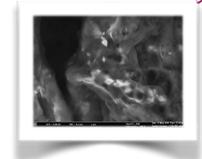
Effetti molecolari

- Trascrittomica
- Proteomica
- Metabolomica
- Epigenetica
- Genotyping

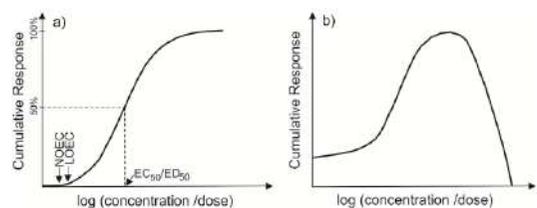
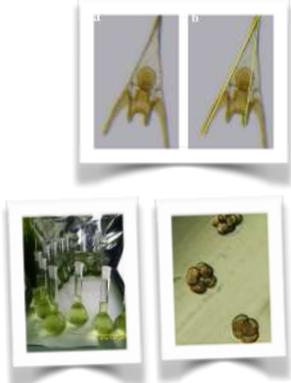
Effetti a livello cellulare



Effetti a livello tissutale/organi



Indicatori di stress precoce



Risposte ecotossicologiche in vitro/vivo su specie test standardizzate e non

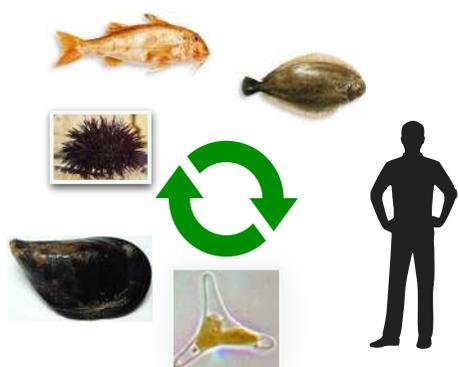
Contaminanti di nuova generazione

- Liquidi ionici
- Ritardanti di fiamma
- PBDE
- Farmaceutici
- Composti fluorurati
- Sottoprodotti di disinfezione
- Glifosato
- Cianotossine
- Cosmetici, muschi e fragranze
- Semivolatili
- Plastificanti e loro metaboliti
- Pesticidi neonicotinoidi
- Sostanze chimiche per il trattamento del legname
- Nanoparticelle
- Microplastiche
- Medicinali veterinari

“Nature is not only more complex than we think...
... It is more complex than we can think”

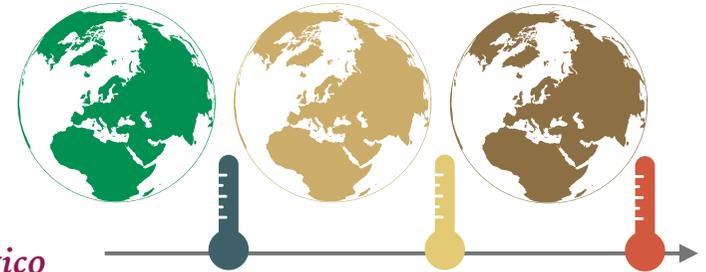
Perché utilizzare l'ecotossicologia come strumento per interpretare le dinamiche ecologiche?

Egler FE, The Way of Science. A philosophy of Ecology for the Layman, 1970



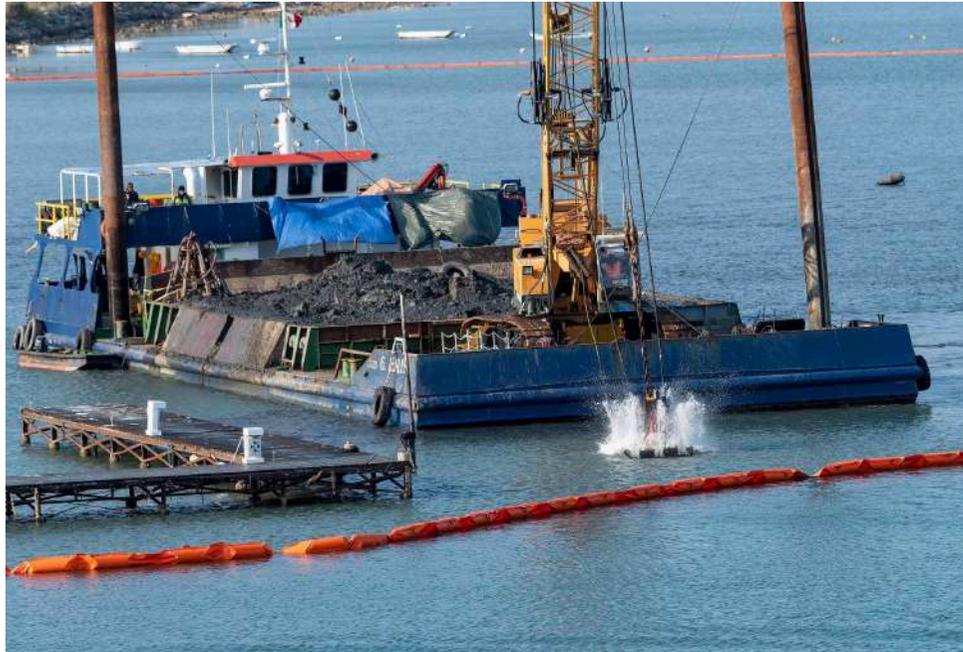
Effetti a livello di rete trofica

Effetti in condizioni ecologiche di stress



Effetti a livello ecologico

Approccio ecotossicologico integrato: Monitoraggio del dragaggio del porto di Talamone

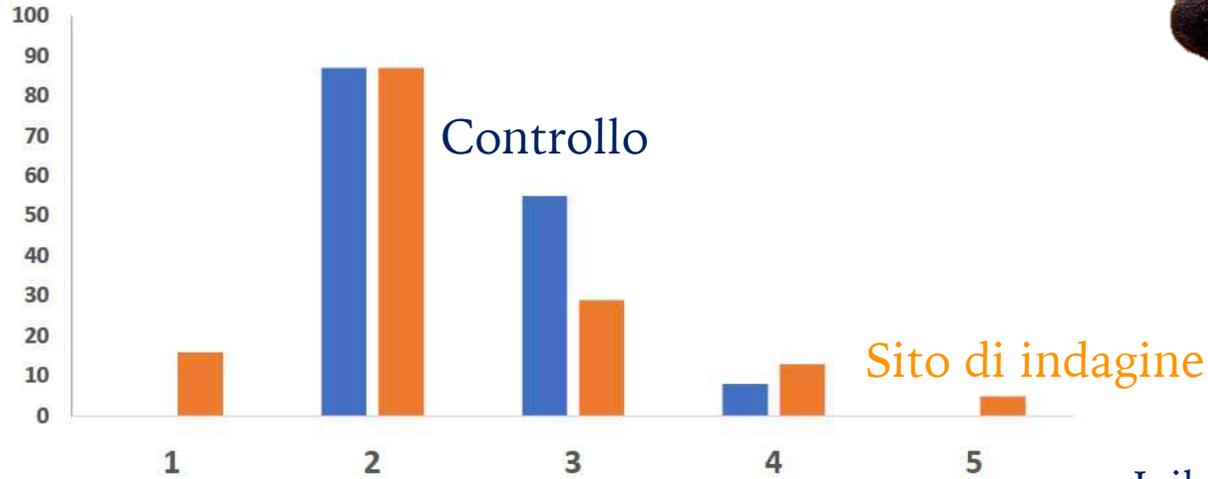


| Biomarkers da stress | Acronimo | Metodo | Indicatore | Unità di misura |
|---------------------------|-----------|----------------|--|-----------------|
| Rilascio del rosso neutro | RN | IO-RN-rev00 | Stress generico (alterazione dei lisosomi) | Minuti |
| Superossido dismutasi | SOD | IO-SOD-rev00 | Stress ossidativo - superossido | Unità/mL |
| Glutazione-S-transferasi | GST | IO-GST-rev00 | Stress ossidativo - glutatione | nmol/µg*min |
| Perossidazione lipidica | LPO | IO-LPO-rev00 | Danno della membrana cellulare | Unità/mg |
| Catalasi | CAT | IO-CAT-rev00 | Stress ossidativo - perossido di idrogeno | nmol/min*mg |
| Attività colinesterasica | AiCh | IO-AiCh_rev00 | Neurotossicità | nmol/min*mg |
| Carbonilazione proteica | Prot_carb | IO-PROTC_rev00 | Ossidazione proteica | µmol/mg |

| Analisi chimica | | | LOQ |
|--|--|-------|------|
| Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) | EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2017 | µg/kg | 1.0 |
| Composti organostannici (Mono-, Di- e Tri-butilstagno) | ICRAM Metodologie analitiche di riferimento (2001) - Appendice 1 | µg/kg | 1.0 |
| Fitofarmaci | EPA 3545A 2007 + EPA 8270E 2017 | µg/kg | 0.1 |
| Arsenico | EPA 3051 A 2007 + EPA 6010 D 2014 | mg/kg | 0.5 |
| Cadmio | UNI EN 16174-2012 +UNI EN 16171-2016 | mg/kg | 0.03 |
| Cromo Totale | EPA 3051 A 2007 + EPA 6010 D 2014 | mg/kg | 1.0 |
| Rame | EPA 3051 A 2007 + EPA 6010 D 2014 | mg/kg | 1.0 |
| Mercurio | UNI EN 16174-2012 +UNI EN 16171-2016 | mg/kg | 0.03 |
| Nichel | EPA 3051 A 2007 + EPA 6010 D 2014 | mg/kg | 1.0 |
| Piombo | EPA 3051 A 2007 + EPA 6010 D 2014 | mg/kg | 1.0 |
| Zinco | EPA 3051 A 2007 + EPA 6010 D 2014 | mg/kg | 1.0 |

Tabella 7 - Distribuzione numerica per classe di taglia per controllo (MC) e sito di indagine (MI)

| Campione | I Classe | II Classe | III Classe | IV Classe | V Classe | Totale Individui |
|----------|----------|-----------|------------|-----------|----------|------------------|
| MC | 0 | 87 | 55 | 8 | 0 | 150 |
| MI | 16 | 87 | 29 | 13 | 5 | 150 |



Zn
AO 89-131 mg/kg p.f.
PO 199-202 mg/kg p.f.

Pb
AO <1,0-1,4 mg/kg p.f.
PO 2,0-2,2 mg/kg p.f.

Cu
AO 7,0-10,5 mg/kg p.f.
PO 21,7-31,8 mg/kg p.f.

IPA
AO 20-59 µg/kg p.f.
PO 14-166 µg/kg p.f.

Attenzione ai C > 12

Rilascio del Rosso Neutro
Stress = tempi brevi

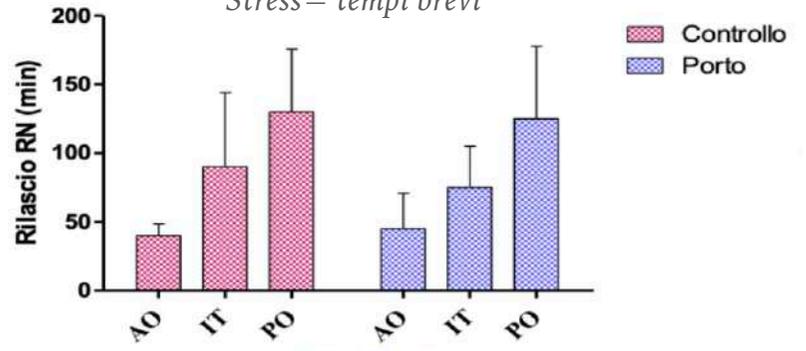


Figura 32 - Rosso neutro

Tabella 24 - Risultati dell'analisi statistica (ANOVA a due vie).

| Source of Variation | Sum-of-squares | Mean square | F | % of total variation | p value summary | Significativity |
|---------------------|----------------|-------------|--------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Sito | 112,5 | 112,5 | 0,0629 | 0,27 | 0,8143 | ns |
| Fase | 21700 | 10850 | 7,387 | 52,91 | 0,0152 | * |
| SitoXFase | 300 | 150 | 0,1021 | 0,73 | 0,9041 | ns |
| Residual | 11750 | 1469 | | | | |

Inibizione
AtCh

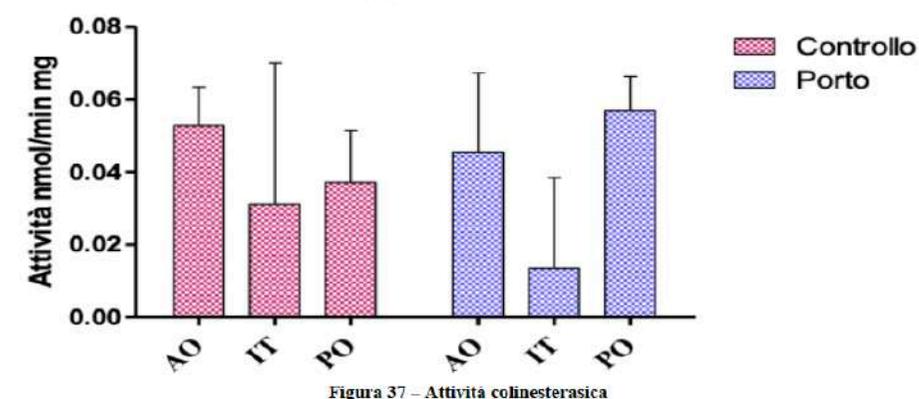


Figura 37 - Attivita colinesterasica

Tabella 29 - Risultati dell'analisi statistica (ANOVA a due vie)

| Source of Variation | Sum-of-squares | Mean square | F | % of total variation | p value summary | Significativity |
|---------------------|----------------|-------------|---------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Location | 0,0000133 | 0,0000133 | 0,01533 | 0,13 | 0,9074 | ns |
| Time | 0,002695 | 0,001348 | 4,183 | 27,28 | 0,0571 | ns |
| LocXTime | 0,001121 | 0,0005605 | 1,740 | 11,35 | 0,2359 | ns |
| Residual | 0,002578 | 0,0003222 | | | | |

Danno alle membrane cellulari degli ematociti (emolinfa)

Indicatore di neurotossicità

Superossido dismutasi
Stress ossidativo da superossido

Stress = induzione

Perossidazione lipidica
Danno alla membrana cellulare

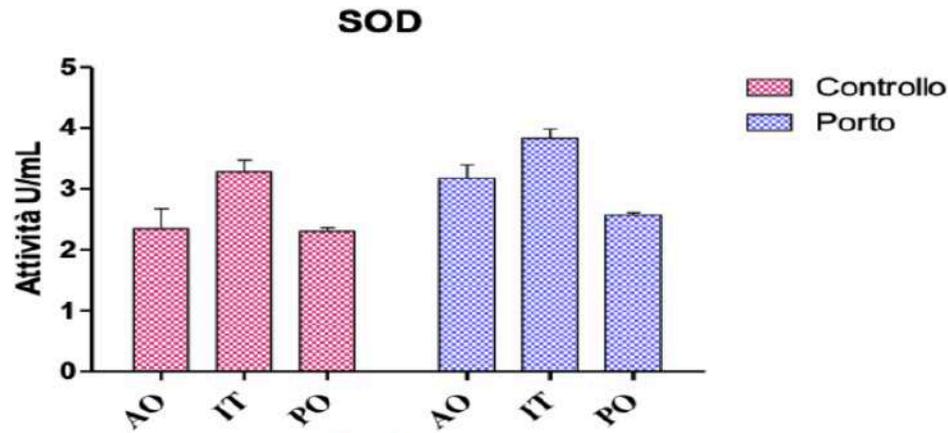


Figura 33 – Superossido-dismutasi

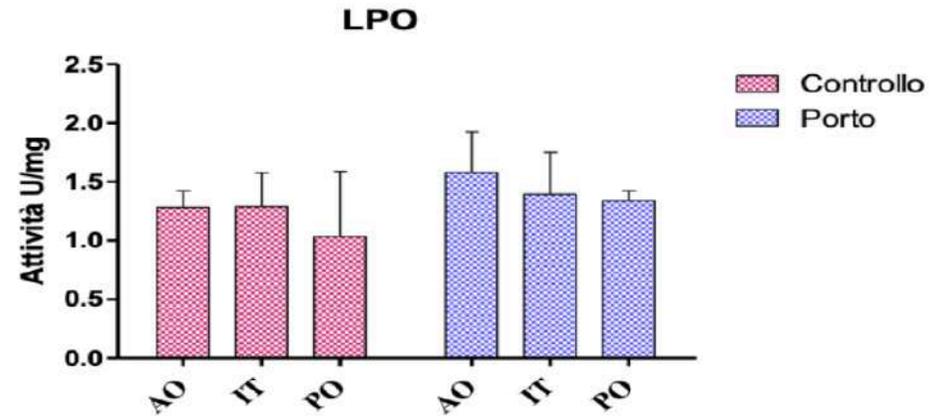


Figura 35 – Perossidazione lipidica

Tabella 25 – Risultati dell'analisi statistica (ANOVA a due vie)

| Source of Variation | Sum-of-squares | Mean square | F | % of total variation | p value summary | Significativity |
|---------------------|----------------|-------------|-------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Sito | 1,361 | 1,361 | 24,92 | 22,38 | 0,0075 | ** |
| Fase | 4,026 | 2,013 | 69,66 | 66,21 | <0,0001 | *** |
| SitoXFase | 0,2439 | 0,1219 | 4,22 | 4,01 | 0,0561 | ns |
| Residual | 0,2312 | 0,0289 | | | | |

Tabella 27 – Risultati dell'analisi statistica (ANOVA a due vie)

| Source of Variation | Sum-of-squares | Mean square | F | % of total variation | p value summary | Significativity |
|---------------------|----------------|-------------|--------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Location | 0,2465 | 0,2465 | 2,0000 | 13,69 | 0,2302 | ns |
| Time | 0,1860 | 0,0930 | 0,8902 | 10,33 | 0,4476 | ns |
| LocXTime | 0,0387 | 0,0194 | 0,1853 | 2,15 | 0,8344 | ns |
| Residual | 0,8360 | 0,1045 | | | | |

Carbonilazione proteica, formazione di gruppi carbonilici di ossidazione proteica

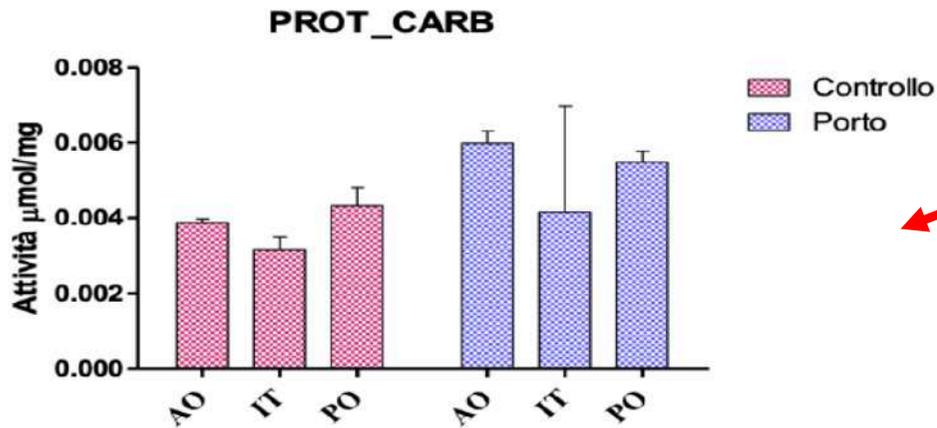
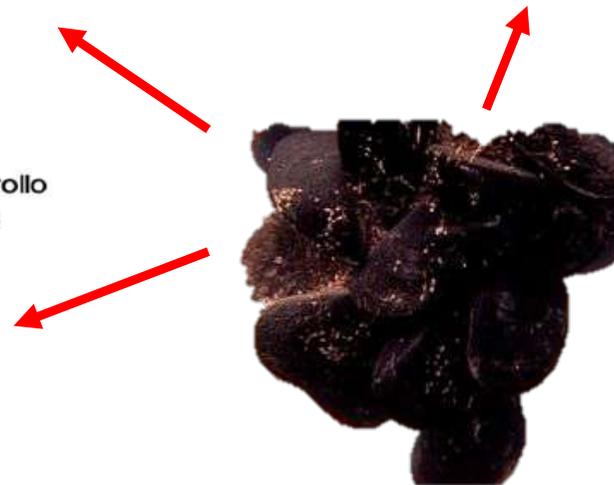
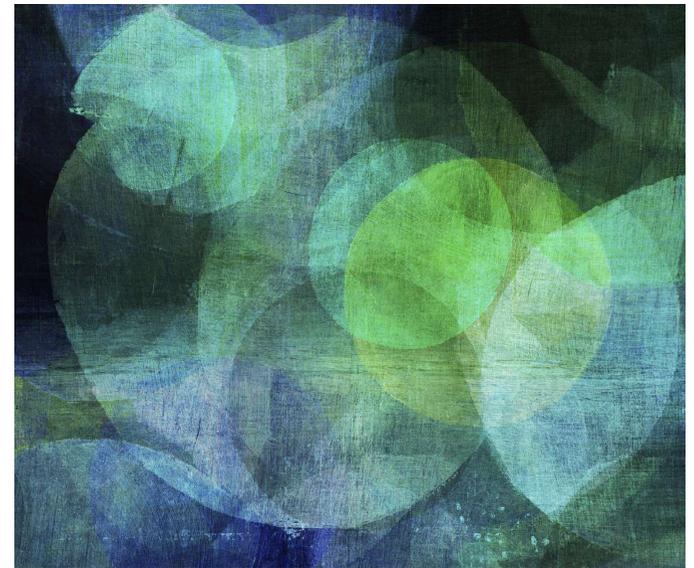
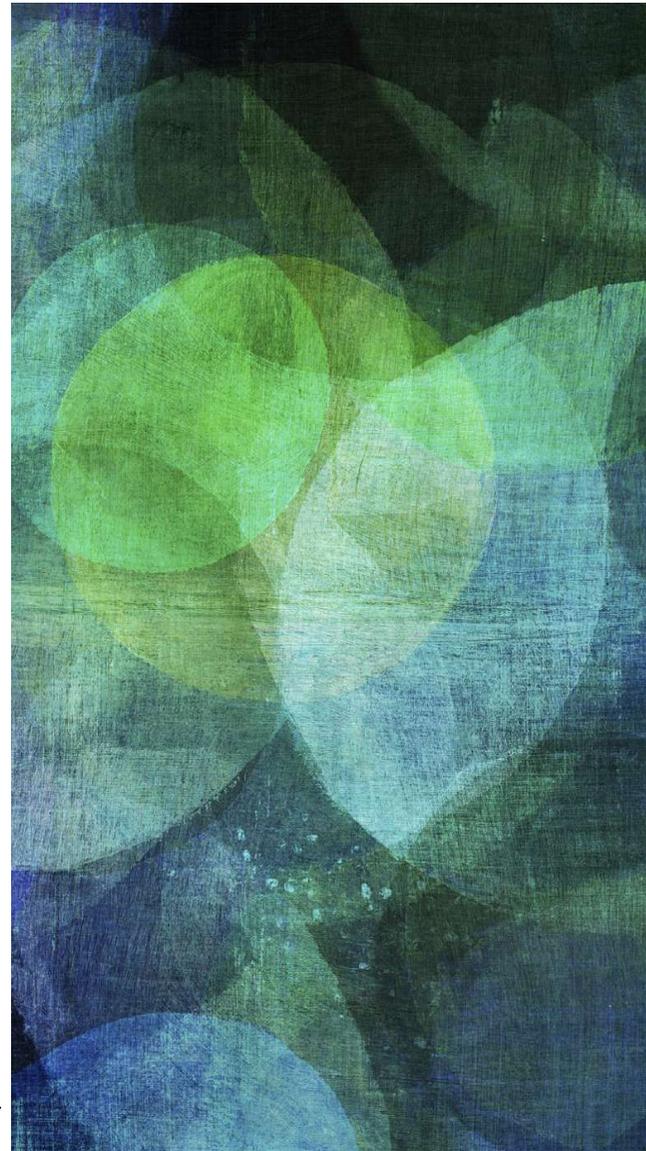


Figura 38 – Carbonilazione proteica

Tabella 30 – Risultati dell'analisi statistica (ANOVA a due vie)

| Source of Variation | Sum-of-squares | Mean square | F | % of total variation | p value summary | Significativity |
|---------------------|----------------|--------------|--------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Location | 0,000006007 | 0,000006007 | 4,503 | 31,08 | 0,1679 | ns |
| Time | 0,000004177 | 0,000002089 | 1,448 | 21,62 | 0,3364 | ns |
| LocXTime | 0,0000007049 | 0,0000003524 | 0,2444 | 3,65 | 0,7941 | ns |
| Residual | 0,000005768 | 0,000001442 | | | | |





DOMANDE??