



Il biomonitoraggio tramite biomarker e organismi sentinella

Dott. Filippo Donnini

Dottorando di ricerca in Scienze Ambientali Gestione e Tutela del territorio

Laboratorio di Fisiologia e Biochimica Ambientale

Università di Bologna sede di Ravenna

contenuti

- biomonitoraggio ambientale
- biomarker
- organismi sentinella
- procedure analitiche
 - **progettazione della campagna**
 - **raccolta e preparazione degli organismi**
 - **stabilità delle membrane lisosomiali**
 - **accumulo di lipidi neutri e lipofuscine nei lisosomi**
- campagne di biomonitoraggio e risultati (highlights)

Il biomonitoraggio ambientale

approccio classico

Il problema dell'inquinamento ambientale è stato per anni affrontato valutando il tipo, la quantità e in taluni casi la tossicità teorica dei singoli composti chimici.

difficoltà pratiche

- sorgenti di inquinamento puntiformi o diffuse e spesso discontinue
- sostanze immesse nell'ambiente spesso subiscono trasformazioni difficilmente prevedibili
- masse d'acqua sono in continuo movimento e le caratteristiche dell'ambiente repentinamente modificate
- inquinanti possono avere effetti sinergici deleteri, pur essendo presenti ciascuno a bassa concentrazione

Il biomonitoraggio ambientale

Il biomonitoraggio tramite biomarker

Recentemente è stato sviluppato un nuovo metodo di indagine per valutare gli effetti dell'inquinamento sulla componente biologica dell'ecosistema il cui obiettivo è VALUTARE LO STATO FISIOLOGICO DEGLI ORGANISMI CHE LO POPOLANO.

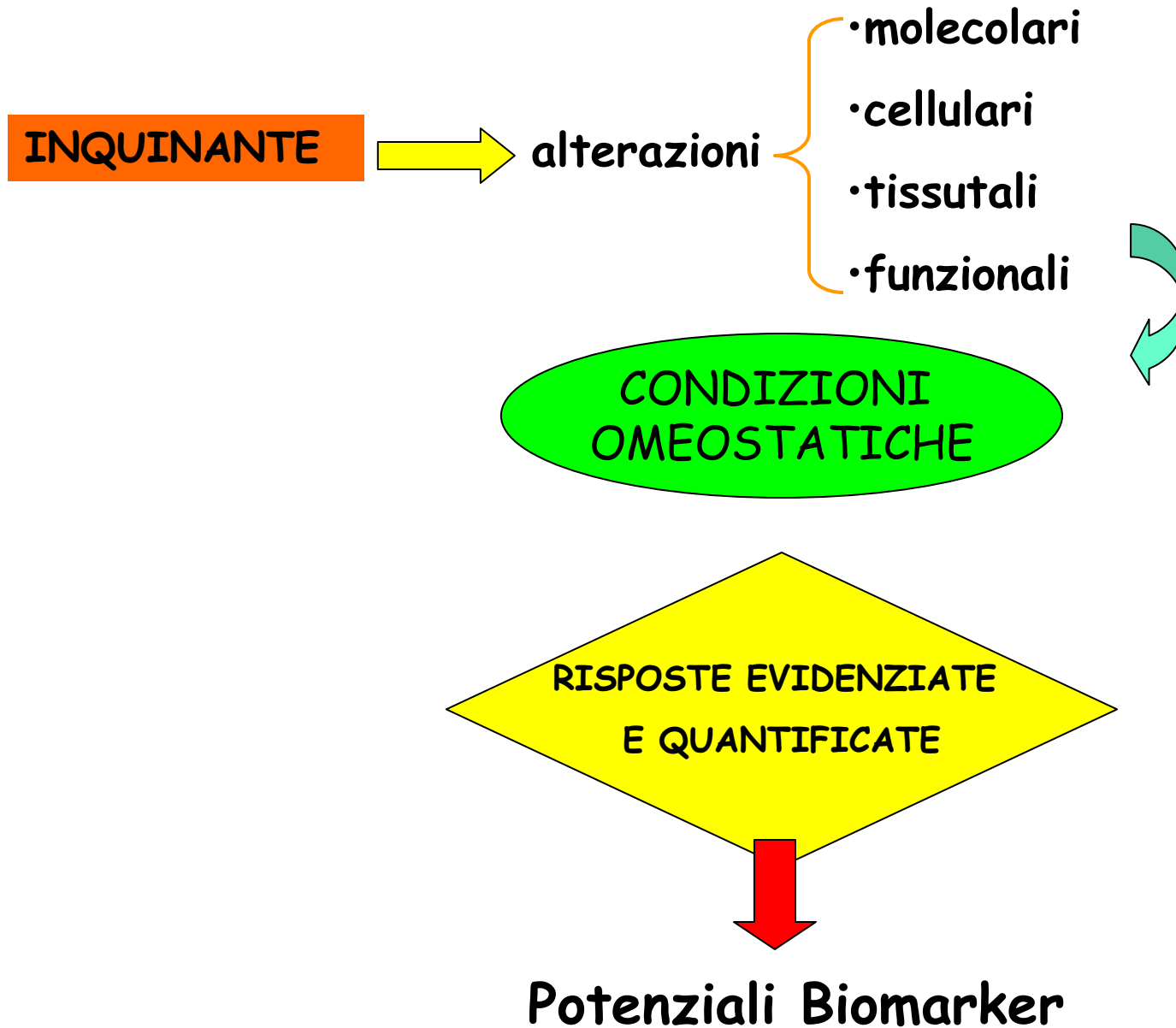
In ecosistemi inquinati le sostanze tossiche alterano lo stato di salute degli organismi provocando una "sindrome da stress", cioè un' alterazione misurabile dello stato fisiologico indotta da un cambiamento ambientale.

La sindrome da stress può essere opportunamente quantificata mediante l'utilizzo d'opportuni indici, noti con il termine di "biomarker".

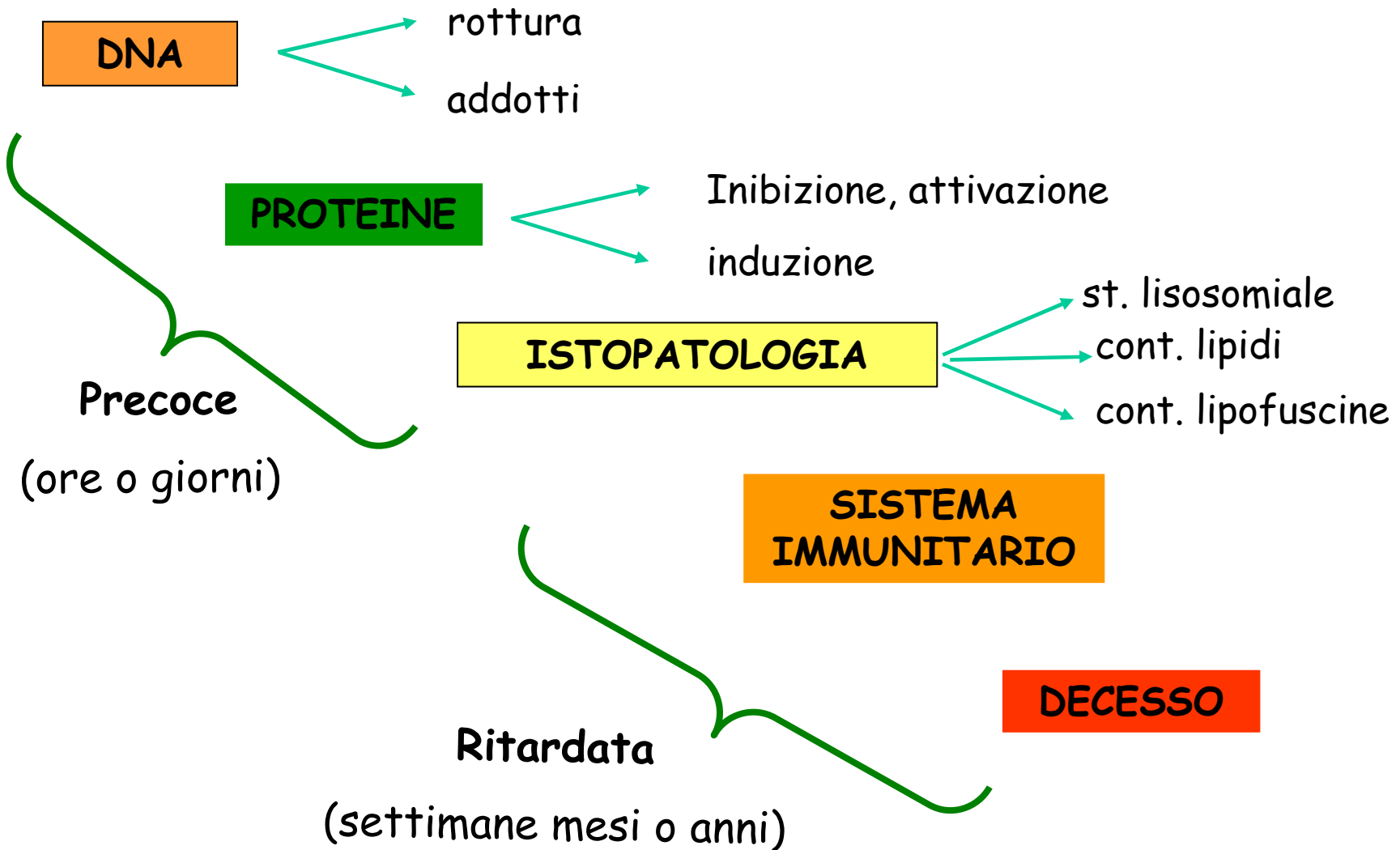
Caratteristiche principali

- Risposte precoci
- Integra gli effetti di miscele di contaminanti
- Mostra effetti anche se l'inquinante non è più presente
- Può segnalare la classe di inquinanti

Il biomonitoraggio ambientale - PRINCIPIO DEL METODO



Il biomonitoraggio ambientale - Gerarchia della risposta dei biomarker



I Biomarker

definizione

alterazioni molecolari, fisiologiche o citologiche conseguenti ad uno stato di stress

biomarker specifici (alterazioni correlate in maniera specifica ad un fattore di stress)

- o Attività dell'acetilcolinesterasi (- da pesticidi)
- o Livelli di metallotioneine (+ da metalli pesanti)

biomarker generici (alterazioni non correlate in maniera specifica ad un fattore di stress)

- o Stabilità delle membrane lisosomiali
- o Accumulo di lipidi neutri
- o Accumulo di lipofuscine

Organismi sentinella

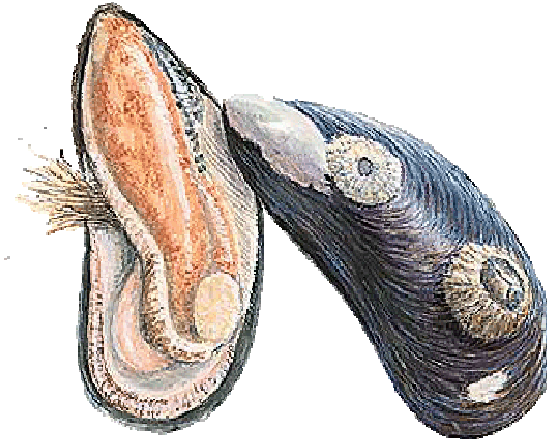
definizione

Per organismi "sentinella" si intendono tutti quegli organismi che, mediante risposte identificabili a condizioni di stress, forniscono informazioni sulla qualità dell' ambiente

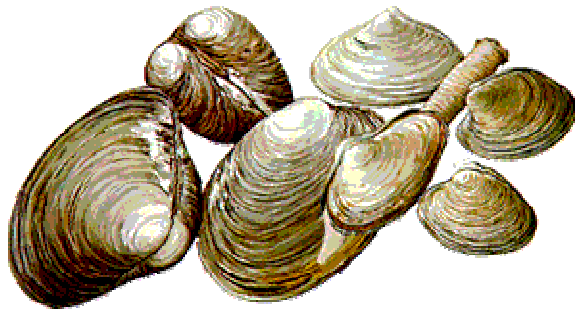
caratteristiche principali

- Sensibili all'ambiente contaminato ma resistenti in ambienti di scarsa qualità
- Ampiamente diffusi e relativamente semplici da maneggiare
- Sviluppano risposte sufficientemente rapide e ripetibili
- Discreta conoscenza della fisiologia e delle risposte adattative

Organismi sentinella



Cozze:
Mytilus galloprovincialis



Vongole:
Chamelea gallina ("poverazze")
Tapes philippinarum ("filippina")



Ostriche:
Crassostrea gigas
Ostrea edulis

procedure analitiche: progettazione della campagna

Utilizzo di organismi
RESIDENTI



Individuazione di siti di prelievo con potenziali criticità

Individuazione di un sito di controllo negativo

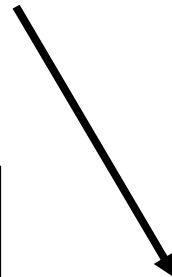
Individuazione di un sito di controllo positivo



Pro

Meno difficoltà di prelievo
nessuna preparazione per il trapianto (gabbie, reti, pali ecc...)

Possibilità di monitorare temporalmente la stessa popolazione



Contro

Possibili modificazioni fisiologiche in risposta a situazioni critiche

Diversi siti=diverse popolazioni=diverse risposte



1. Prelievo di mitili in un sito fortemente contaminato (Arriluze - Bilbao)

procedure analitiche: progettazione della campagna

Utilizzo di organismi TRAPIANTATI

Individuazione di una popolazione in buono stato di salute in tutti i parametri

Prelievo del pool - 1a analisi sui tessuti (Tempo 0)

Dallo stesso pool divisione in più gruppi da trapiantare nei vari siti da indagare (30gg)

Pro

Stesse condizioni fisiologiche degli organismi (possibilità di confrontare le risposte nei vari siti)

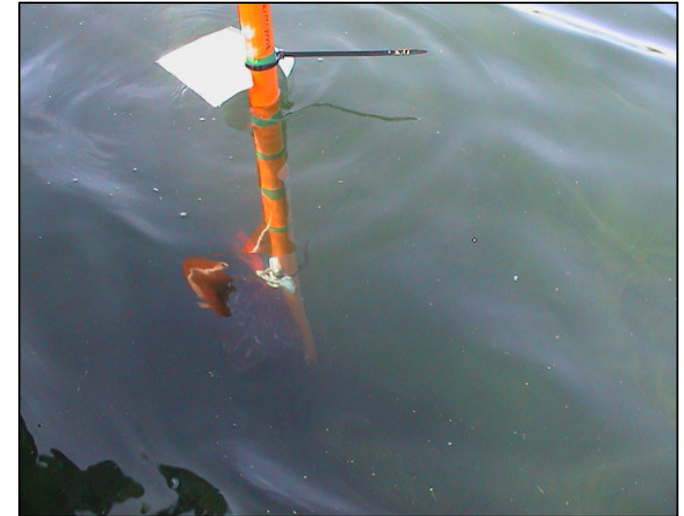
Maggiore sensibilità a inquinamento (no "assuefazione")

Contro

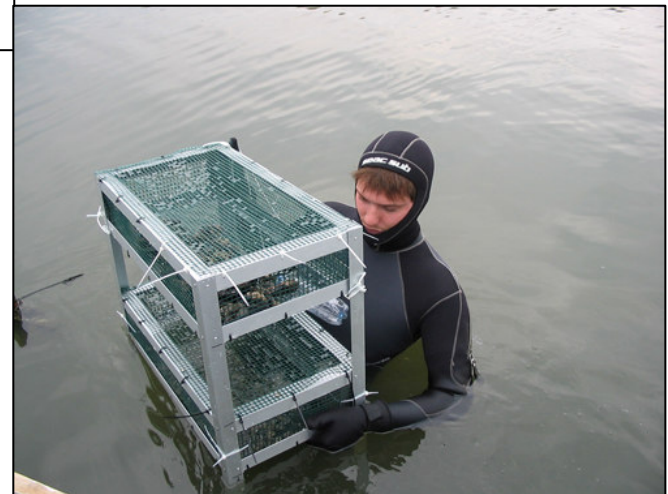
Interferenza (rumore di fondo) nelle risposte degli organismi provocata da cambiamento dell'ambiente nel momento del trapianto



1. Preparazione dei pool



2. Trapianto con calza e palo



3. Trapianto con gabbia a 2 compartimenti

procedure analitiche: raccolta e preparazione degli organismi

Trasporto e dissezione degli organismi

tenere in un contenitore umido e fresco e "stressare" meno possibile

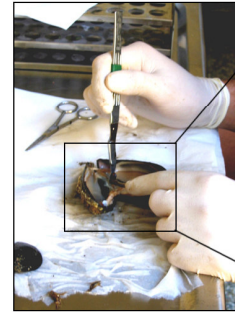
prelevare i tessuti prima possibile

lavorare sui tessuti sempre tenendoli su ghiaccio

appena prelevati e preparati i tessuti vanno ghiacciati e riposti a -80°C

tessuti utilizzati: **BRANCIE, GHIANDOLE DIGESTIVE, MANTELLO/GONADI**

Sezionamento di un mitilo per prelevare branchie e ghiandola digestiva



Branchie

Mantello/
Gonadi

Ghiandola
digestiva

1. Sezionamento di *Mytilus galloprovincialis*



2. Prelievo di branchie



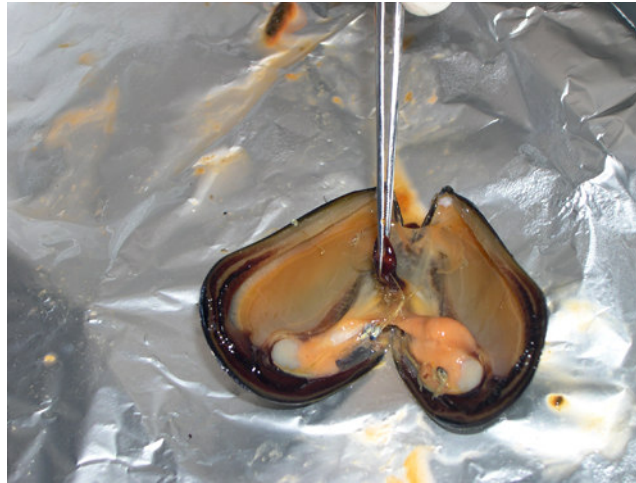
3. Prelievo di ghiandola digestiva



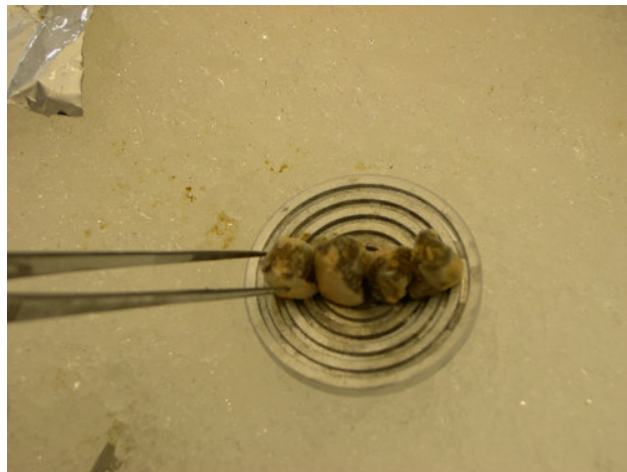
4. Congelamento dei tessuti in azoto liquido

procedure analitiche: raccolta e preparazione degli organismi

Preparazione dei "chucks"



1. Prelievo delle ghiandole digestive



2. Posizionamento sul supporto (chuck)

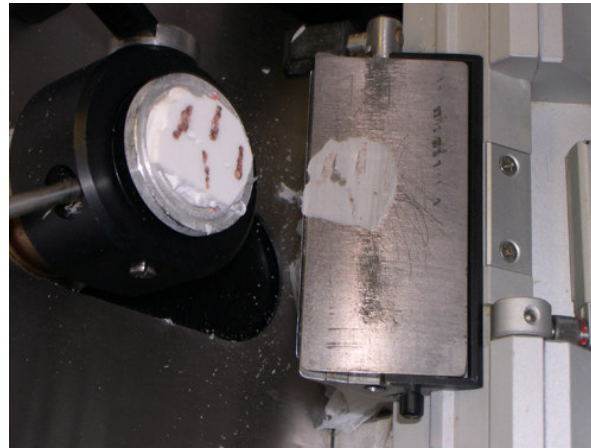


3. Immersione in esano raffreddato con azoto liquido

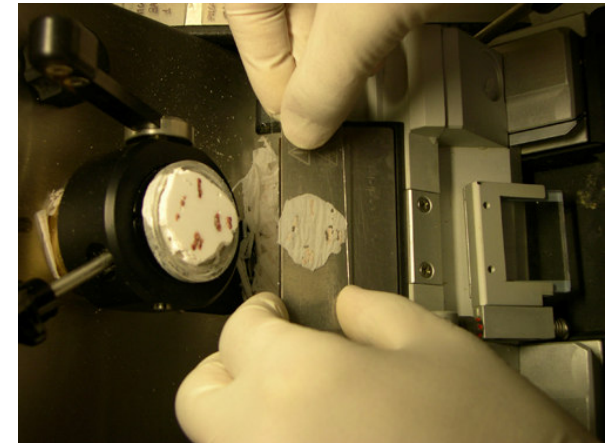
procedure analitiche: preparazione dei vetrini



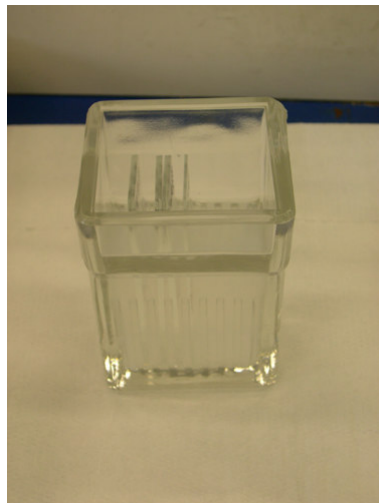
a. Posizionamento nel criostato (-30°C)



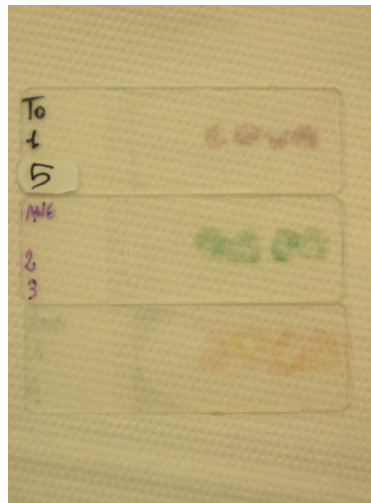
b. Fettine di 10µm di spessore



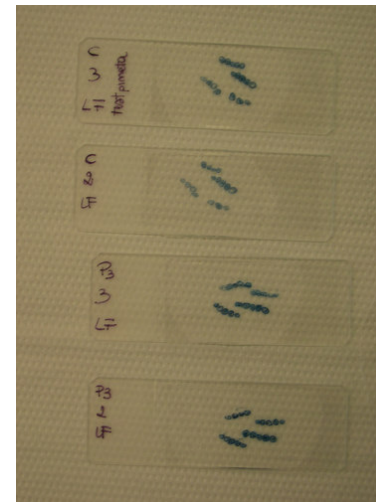
c. trasferimento delle sezioni su vetrino



d. Inserimento in "hellendal" per le colorazioni



e. Esempi di colorazioni su ghiandole di mitilo



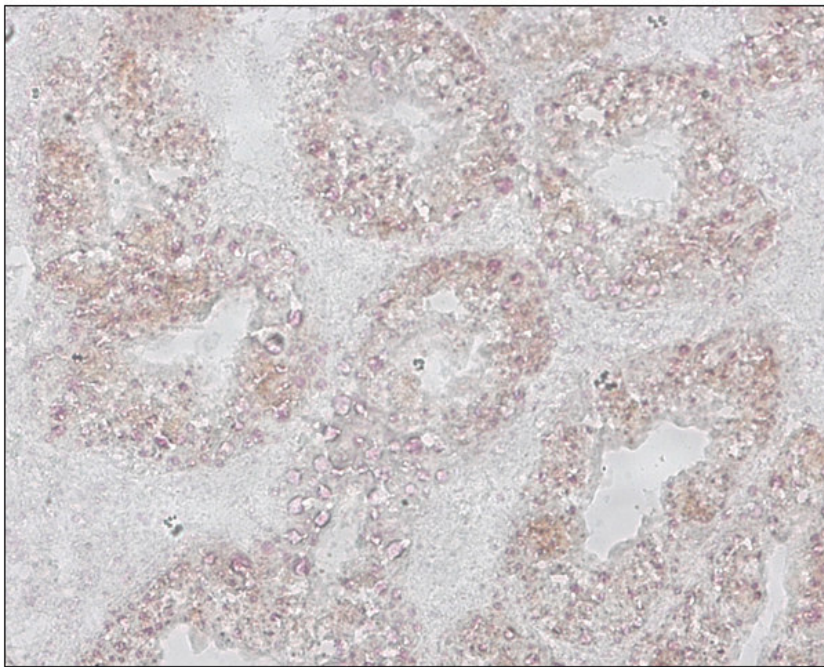
f. Rivelazione di lipofuscine nei vermi

procedure analitiche: **stabilità delle membrane lisosomiali**

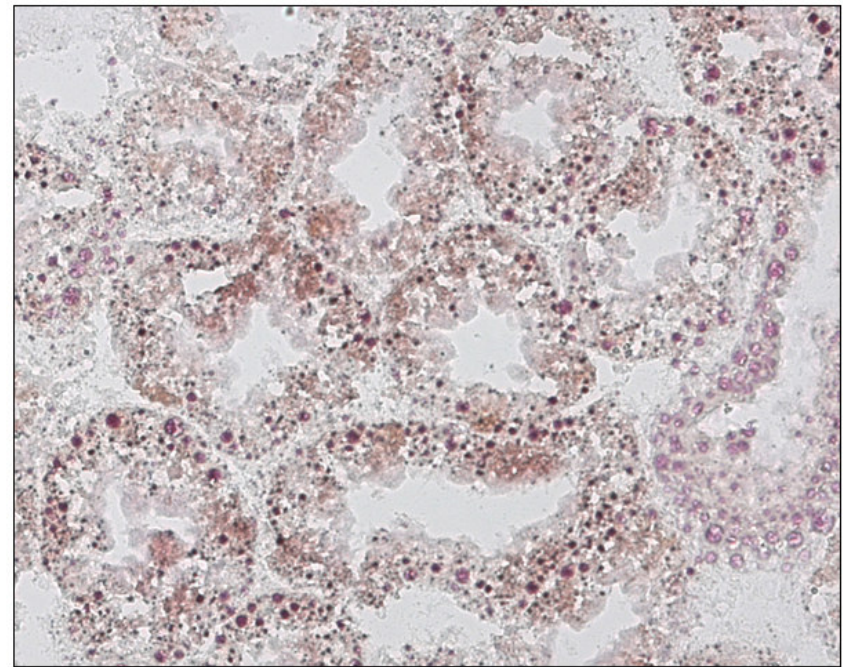
Principio del metodo

Rivelazione istochimica dell'attività dell'enzima lisosomiale *N*-acetyl- β -hexosaminidasi. Valutazione del tempo di labilizzazione della membrana lisosomiale con conseguente permeabilità al substrato (naphtol AS-BI *N*-acetyl- β -glucosaminide), reazione enzimatica rivelata con colorante (Fast Violet).

Sezioni di ghiandole digestive



a. membrana NON destabilizzata



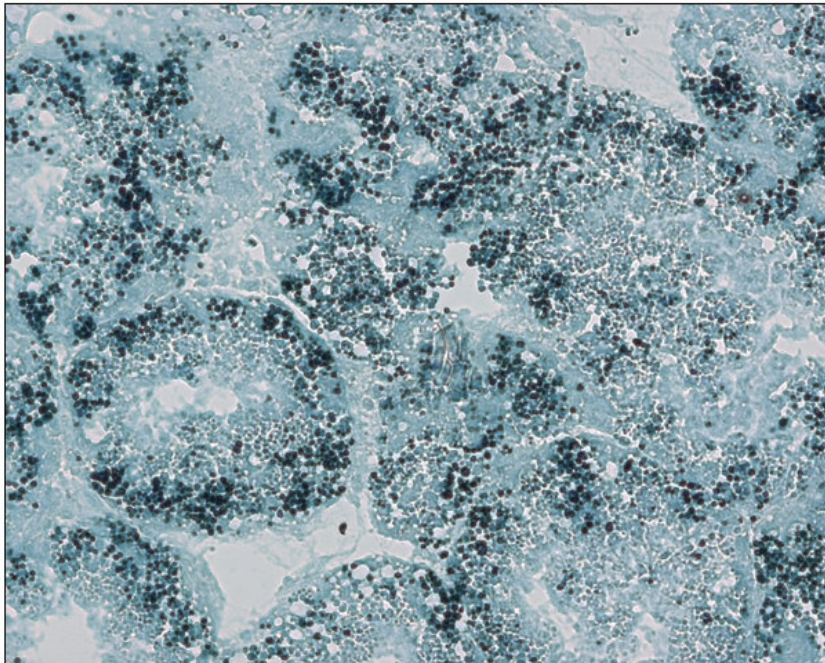
b. membrana destabilizzata

procedure analitiche: contenuto di lipofuscine nei lisosomi

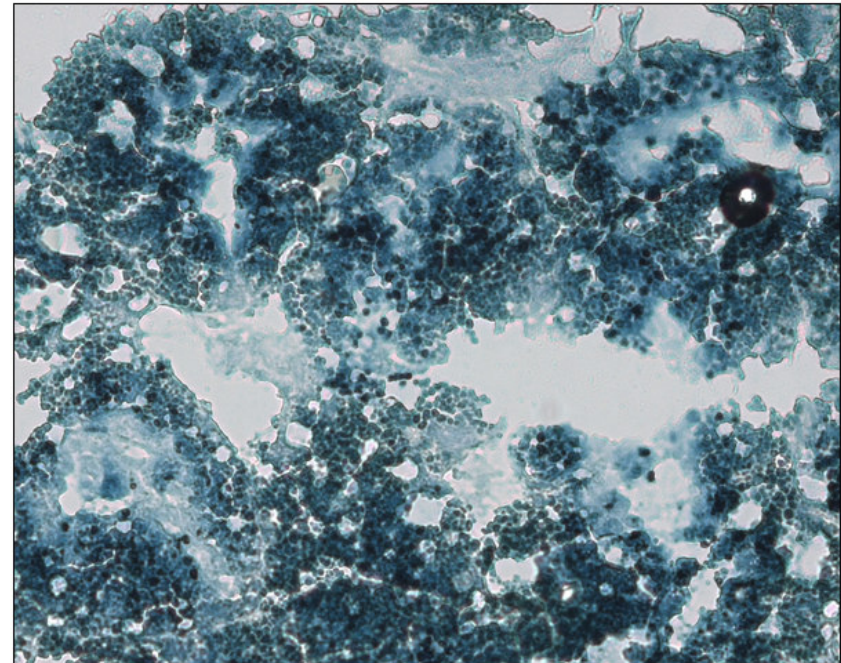
Principio del metodo

Colorazione istochimica delle lipofuscine con la reazione di Schmorl (riduzione di $\text{Fe}(\text{KCN})_6$ in presenza di FeCl_3).

Sezioni di ghiandole digestive (in evidenza le lipofuscine colorate in verde/blu)



a. mitilo di controllo



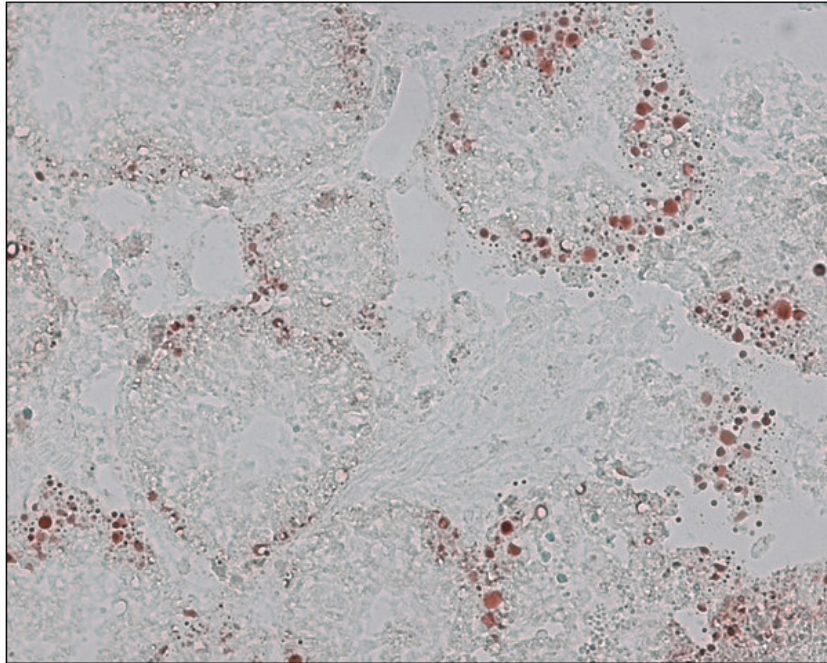
b. mitilo trapiantato

procedure analitiche: contenuto di lipidi neutri insaturi nei lisosomi

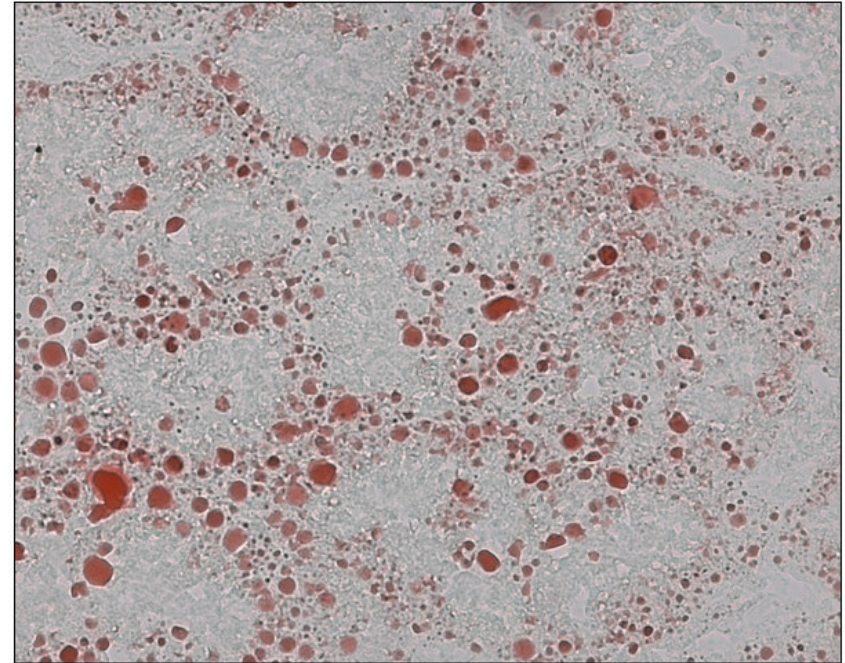
Principio del metodo

Colorazione istochimica dei lipidi con uno specifico colorante lipofilico (Oil Red O)

Sezioni di ghiandole digestive (in evidenza i lipidi neutri insaturi in rosa)

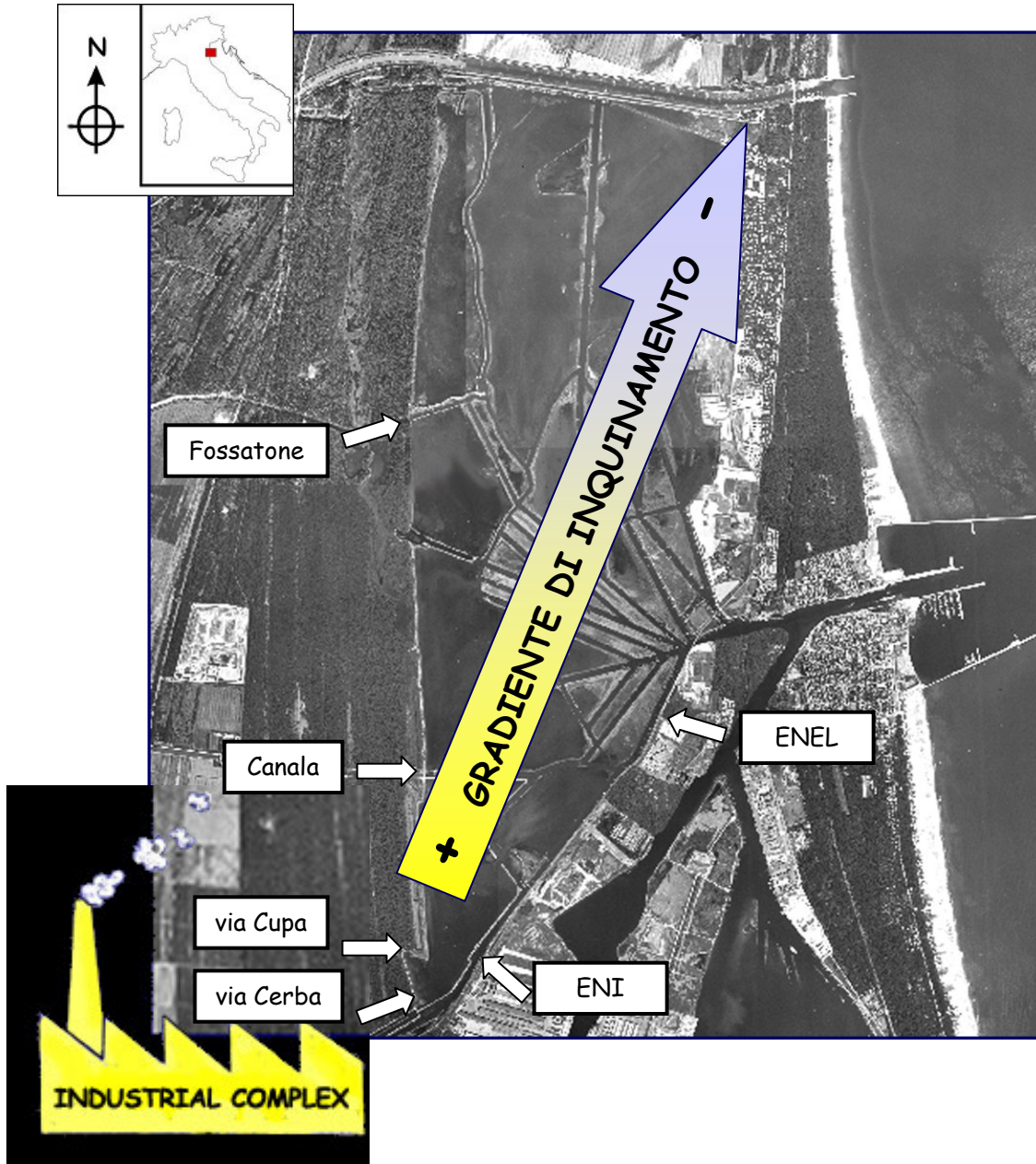


a. mitilo di controllo



b. mitilo trapiantato

Risultati- la Pialassa Baiona



Generale

- estensione: 1000 ha
- aree semisommerse (chiari) e canali (1-5 m)
- flussi H₂O dolce controllati
- trattato di Ramsar
- Protocollo d'intesa (Comune RA, Parco del Delta del Po, CIRSA, ARPA Ra, AUSL Ra)

Negli anni '50 - '70

- Hg (decine di tonnellate)
- IPA, PVC, PVA

Oggi

- acque di scolo di centri abitati
- acque di scolo agricole e da allevamenti zootecnici
- scarichi industriali depurati

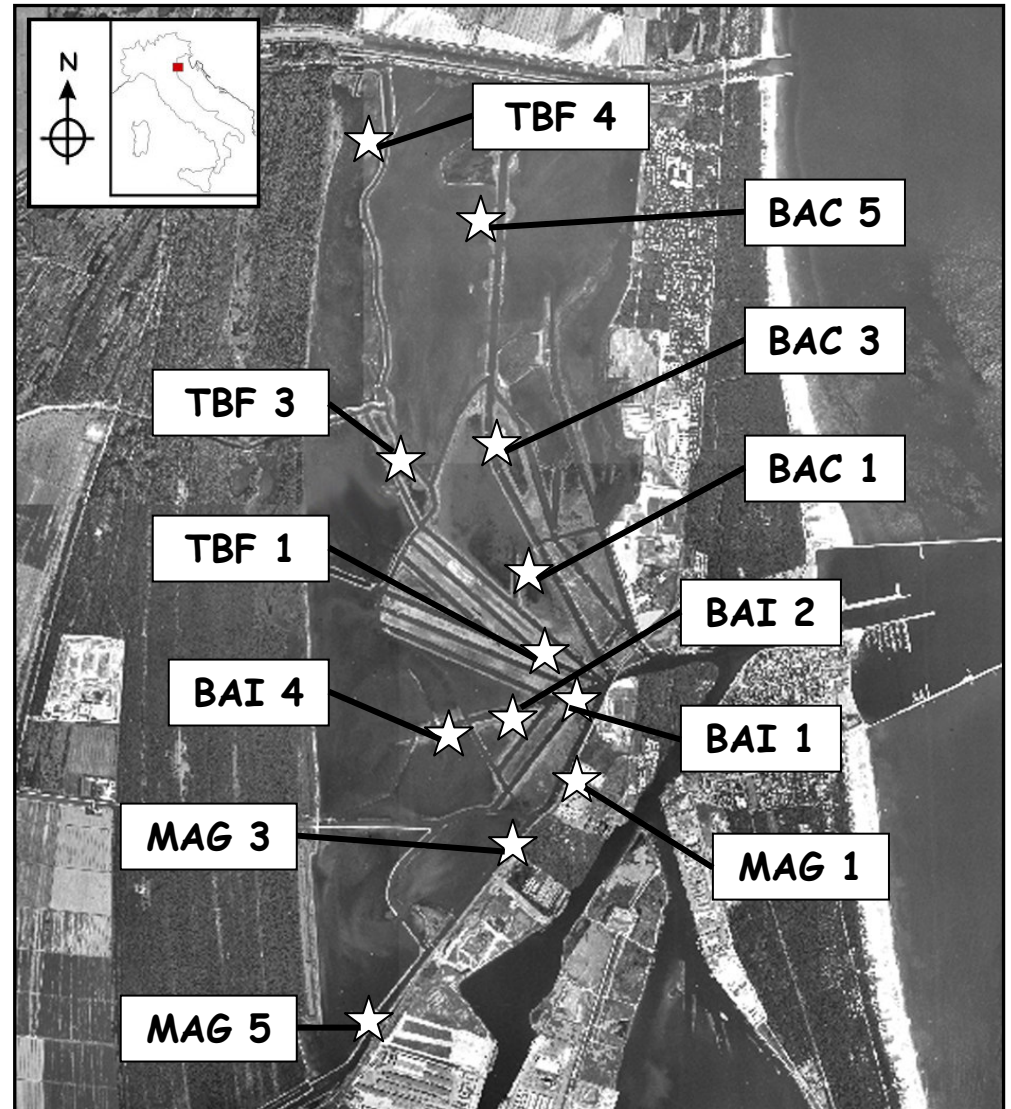
Risultati- Siti di campionamento in Pialassa Baiona

Siti di campionamento

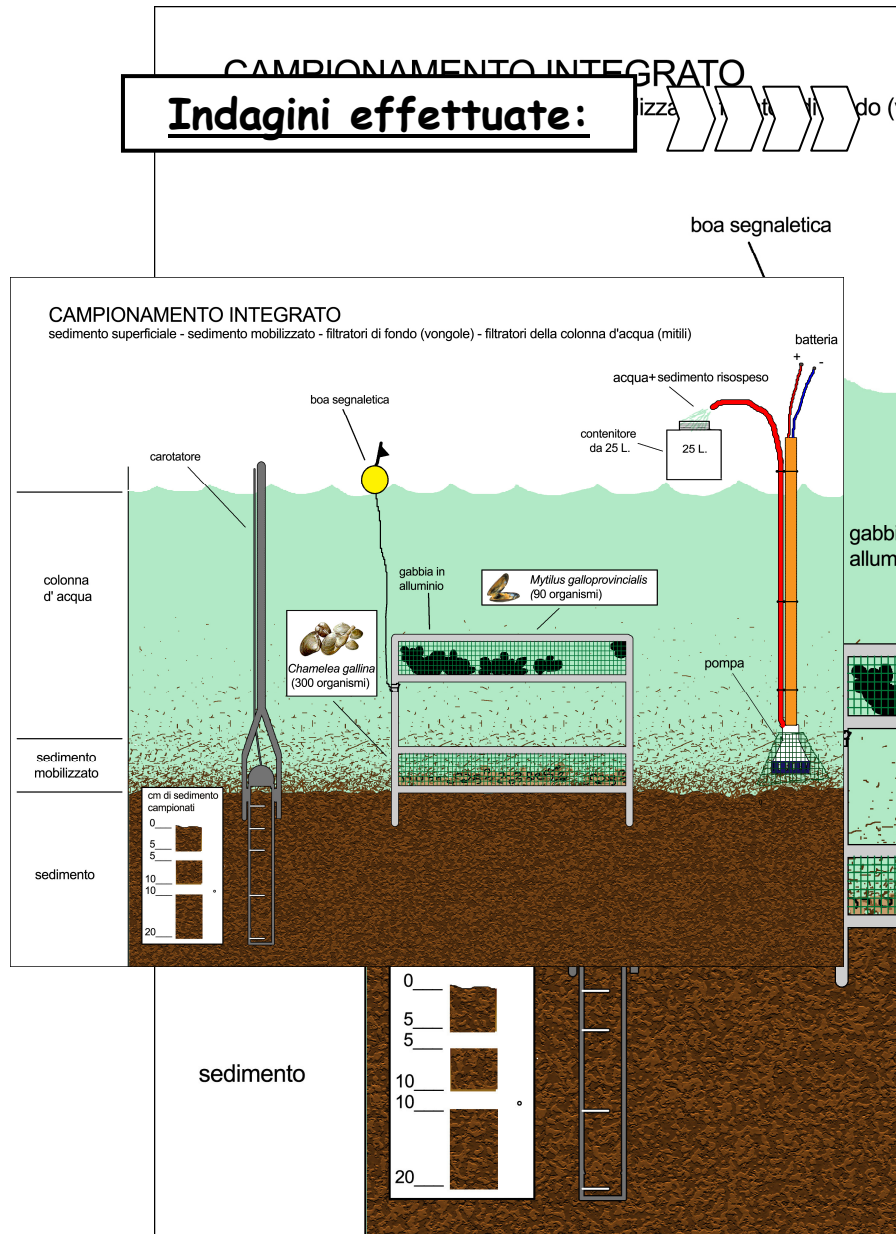
- Nei canali (~2 m profondità)
- DGPS positioning
- 12 stazioni scelte
- Cozze e vongole (*Chamelea gallina*) trapiantati per 30gg
- Vongole (*Tapes philippinarum*) residenti

2002 - 2005

- 5 campagne di biomonitoraggio
- 200-1200 organismi analizzata ogni volta
- batterie di 5-8 biomarker
- integrazione con analisi chimiche e geochimiche



Risultati- Stazione di campionamento integrato



Sedimento superficiale (0-5 cm)

- contaminazione da metalli
- contaminazione da IPA

Sedimento mobilizzato

- contaminazione da metalli
- contaminazione da IPA (analisi in corso)

Organismi (Mytilus galloprovincialis)

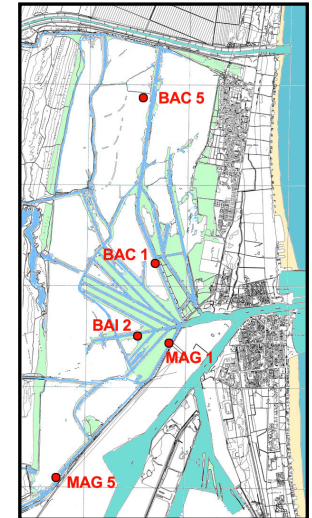
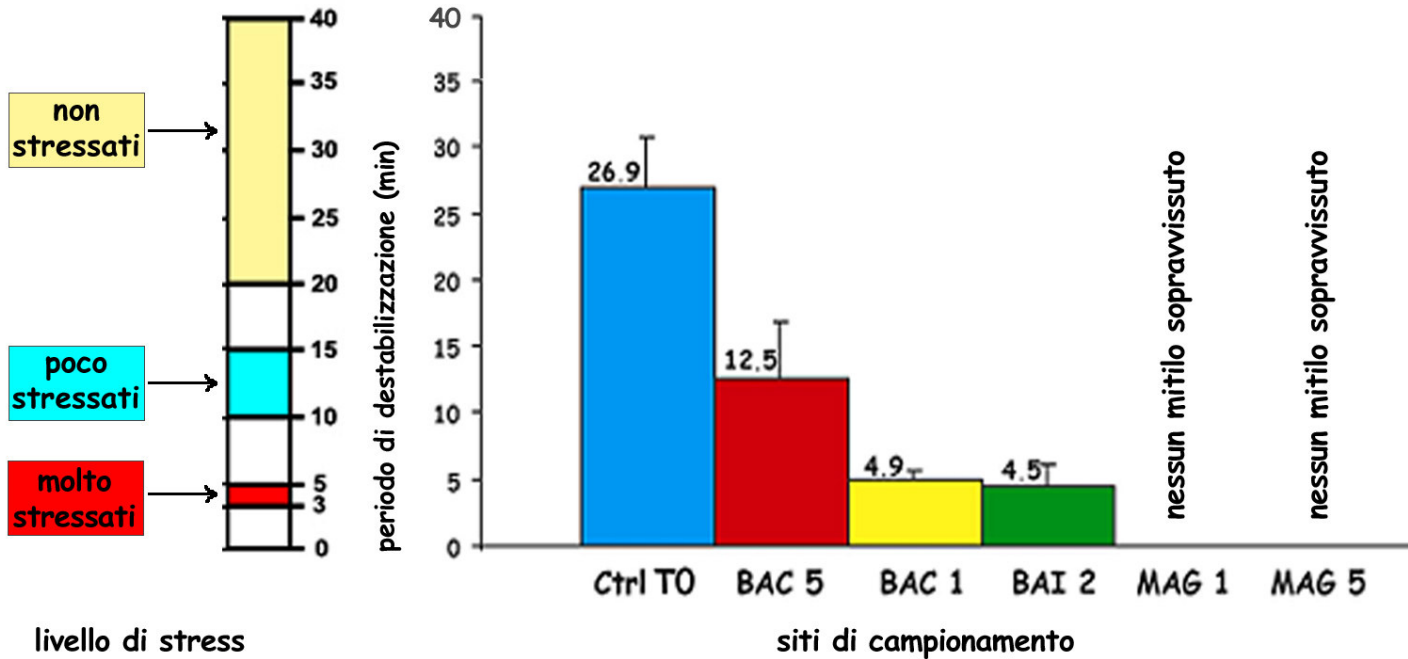
- bioaccumulo di metalli
- bioaccumulo di IPA (analisi in corso)
- batteria di biomarker

stabilità della membrana lisosomiale
 accumulo di lipidi neutri insaturi
 accumulo di lipofuscine
 espressione delle hsp70
 attività dell' acetilcolinesterasi
 contenuto di metallotioneine

Risultati- rilevazione del gradiente di inquinamento

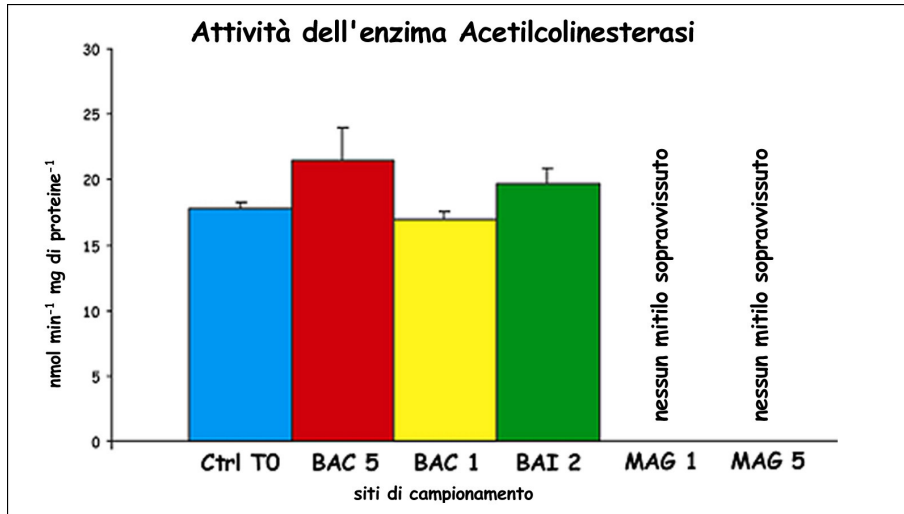
Campagna settembre 2003

Stabilità delle membrane lisosomiali

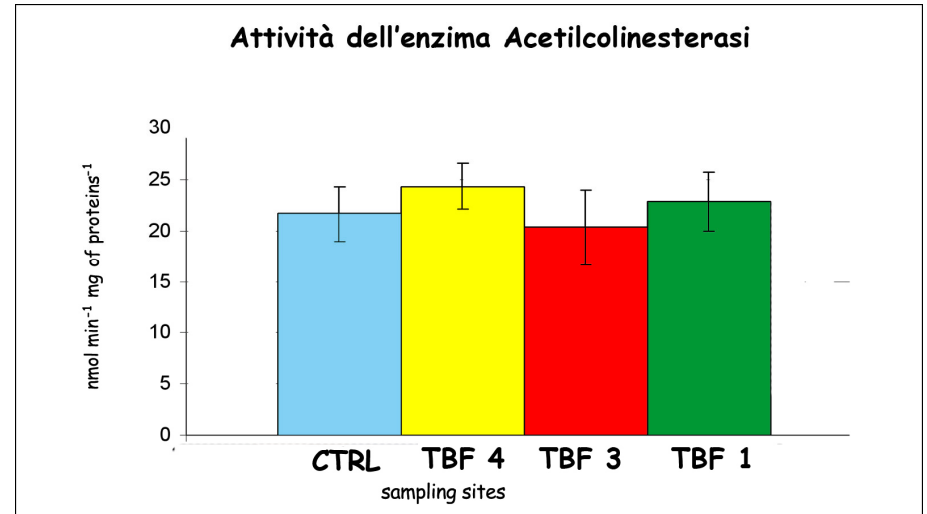


Risultati- residui pericolosi di pesticidi nella laguna?

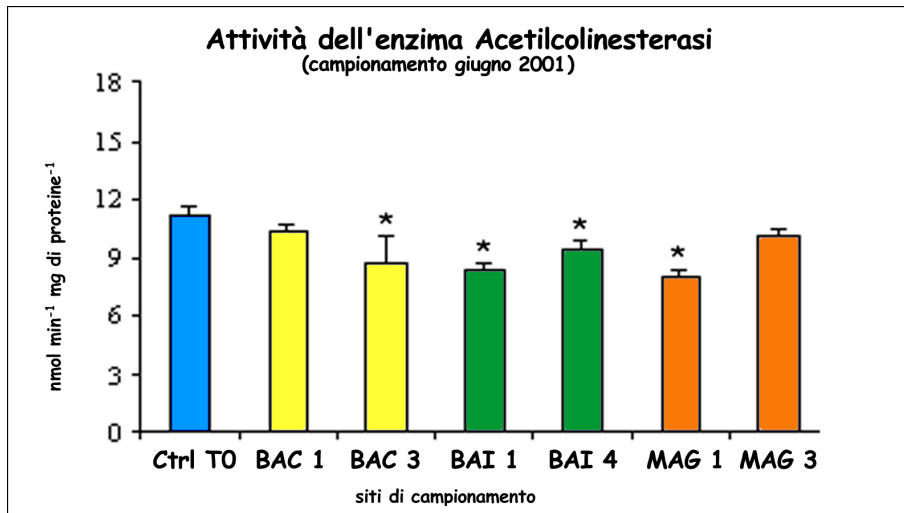
Sept/Oct 2003



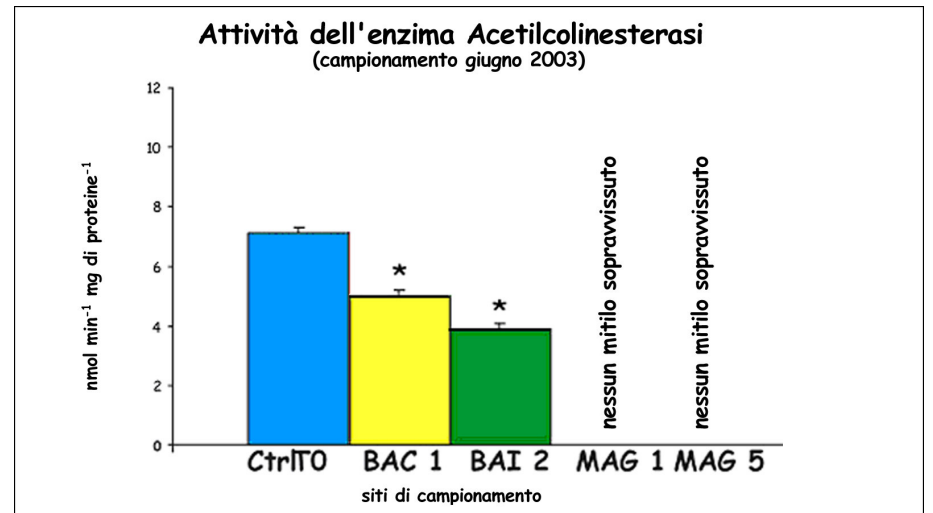
October 2005



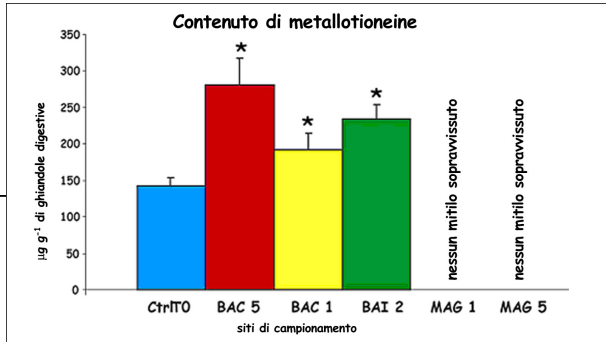
June 2001



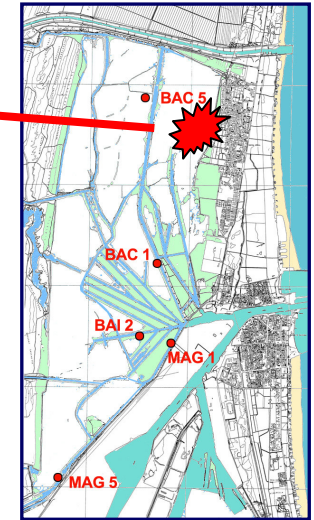
June 2003



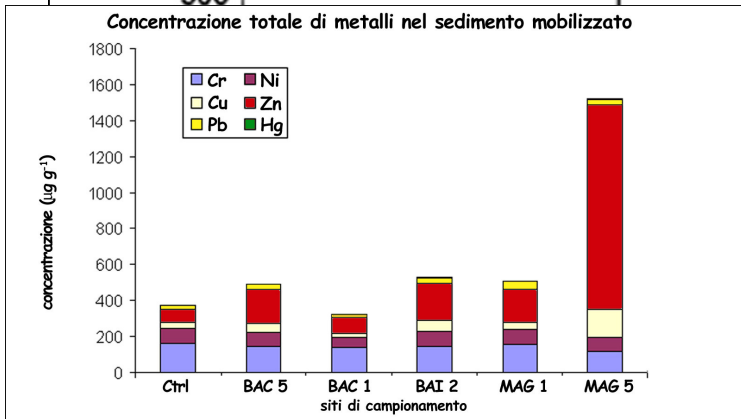
Risultati- concentrazioni pericolose di metalli nella laguna?



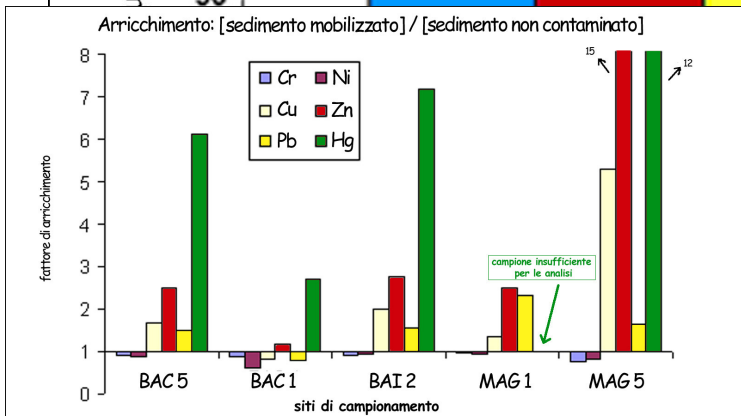
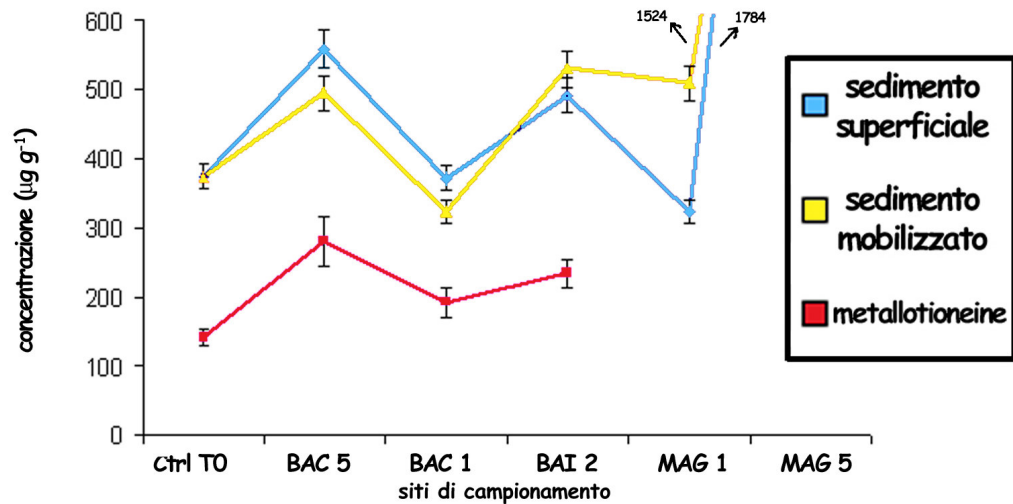
Sito di accumulo fanghi contaminati



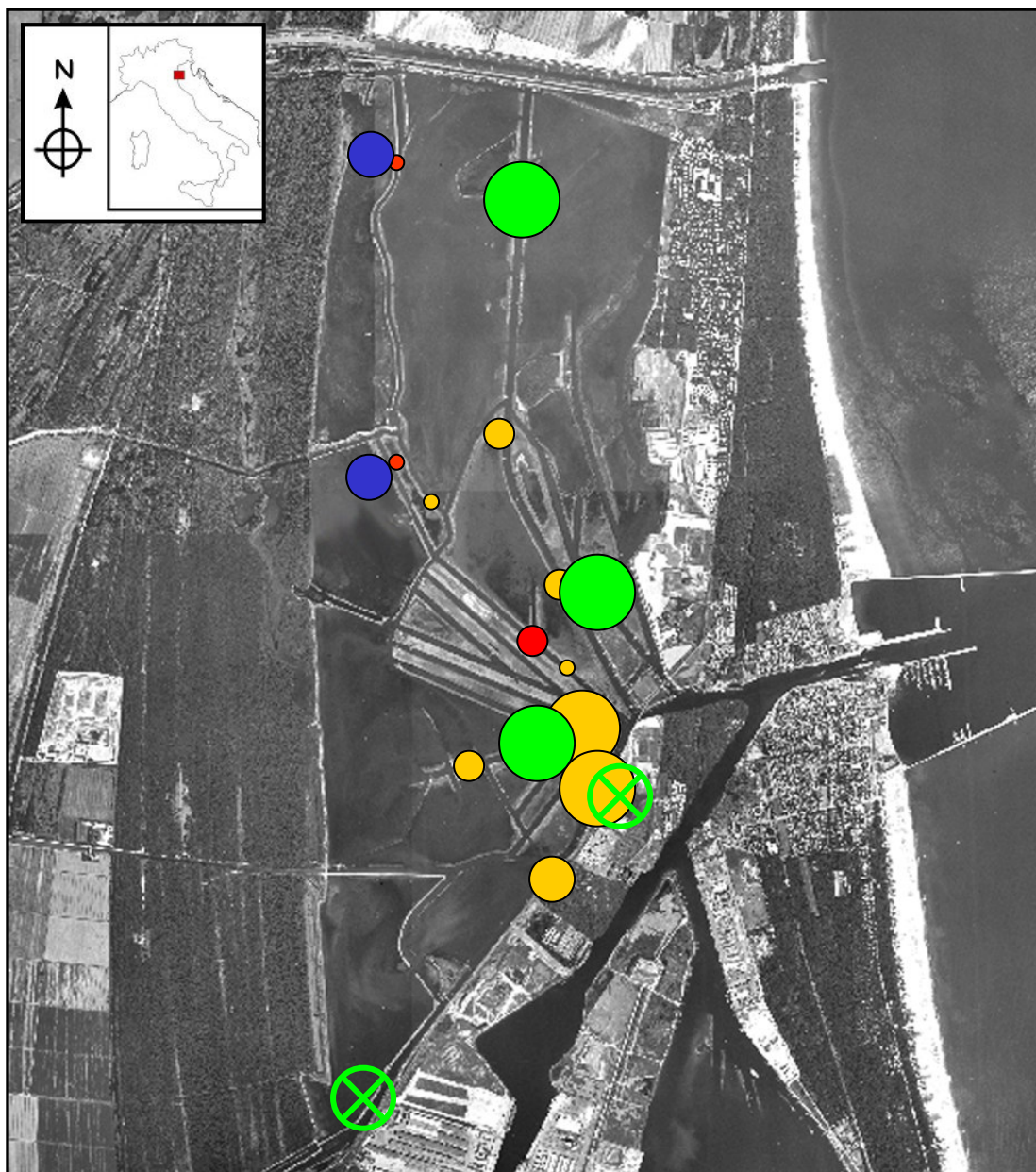
di metalotioneine



Confronto tra la concentrazione di metalli totali nel sedimento (µg g⁻¹) e il contenuto di metalotioneine nei mitili (µg g⁻¹)



Risultati-batteria di biomarker/stato di salute dell'ambiente (serie temporale)



Legenda:

2002	●
=	
2003	●
=	
2004	●
=	
2005	●
=	

Numero di biomarker espressi / stato di salute dell'ambiente:

○	= 0 (ottimo)
○	= 1 (buono)
○	= 2 (discreto)
○	= 3 (mediocre)
○	= 4/+ (pessimo)
⊗	= non sopravvissuti

Per:

- **Informazioni aggiuntive**
- **Tirocinio**
- **Tesi triennale o specialistica**

Filippo Donnini filippo.donnini@unibo.it

Elena Fabbri elena.fabbri@unibo.it

fine