



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

(DiSIT)

SEDE DI ALESSANDRIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE AMBIENTALI**

**(ACQUE INTERNE E AGROSISTEMI)**

**XXVI ciclo (2010-2013)**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Sviluppo ed utilizzo di nuovi metodi  
ecotossicologici per lo studio della qualità  
di corpi idrici lenticici e lotici**

Coordinatore:

Prof. Giorgio MALACARNE

Responsabile scientifico:

Prof. Aldo VIARENGO

Candidata:

Dott.ssa Daniela Governa

# INDICE

1. Introduzione .....	1
1.1. L'inquinamento .....	2
1.1.1. L'inquinamento delle acque dolci .....	3
1.2. I metalli pesanti .....	6
1.2.1. Il mercurio .....	8
1.3. Gli inquinanti organici persistenti .....	10
1.3.1. Il DDT.....	12
1.4. Ecotossicologia.....	15
1.4.1. Il biomonitoraggio .....	16
1.4.1.1. I biomarker.....	18
1.5. Il <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	22
1.5.1. Il <i>Dictyostelium discoideum</i> come organismo modello in ecotossicologia.....	26
1.6. <i>Unio pictorum</i> .....	28
1.6.1. <i>Unio pictorum</i> come bioindicatore in ecotossicologia .....	30
1.7. L'analisi di rischio ecologico .....	31
2. Scopo del lavoro .....	34
3. Materiali e metodi .....	37
3.1. Test con il batterio bioluminescente <i>Vibrio fischeri</i> .....	38
3.2. Test con l'alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	39
3.3. Test con il crostaceo cladocero <i>Daphnia magna</i> .....	41
3.4. Test con l'oligochete bentonico <i>Lumbriculus variegatus</i> .....	42
3.5. <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	43
3.6. <i>Unio pictorum</i> .....	62
3.7. Indagini ecotossicologiche ed ecologiche nelle aree interessate dalle acque della galleria di scolo di Gavorrano .....	70

3.7.1. Campionamento.....	70
3.7.2. Test biologici.....	71
3.7.3. Campionamento biologico e applicazione dell'Indice Biotico Esteso (I.B.E.) .....	76
3.8. Analisi statistica .....	83
<b>4. Risultati .....</b>	<b>84</b>
4.1. Uso di <i>Dictyostelium discoideum</i> come organismo modello per la valutazione degli effetti biologici indotti da DDT e Hg <sup>2+</sup> in studi di campo e di laboratorio .....	85
4.1.1. Esperimenti di campo .....	87
4.1.2. Esperimenti di laboratorio .....	93
4.1.3. Discussione .....	117
4.2. Biodisponibilità di inquinanti organici e inorganici nelle acque di un corpo idrico lentico: utilizzo di <i>Unio pictorum</i> per la determinazione del bioaccumulo e dei conseguenti effetti biologici .....	121
4.2.1. Biomarker di stress .....	122
4.2.2. Biomarker di stress ossidativo.....	125
4.2.3. Biomarker di esposizione .....	127
4.2.4. Sistema esperto di integrazione dei dati .....	128
4.2.5. Discussione .....	129
4.3. Valutazione basata sull'approccio Triad del rischio ambientale di ecosistemi lotici contaminati da inquinanti inorganici.....	132
4.3.1. Analisi chimiche .....	134
4.3.2. Analisi ecotossicologiche .....	136
4.3.3. Indagini ecologiche.....	148
4.3.4. Determinazione del rischio ambientale .....	153
4.3.5. Discussione .....	155
<b>5. Conclusioni.....</b>	<b>159</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>165</b>

*Ringraziamenti*.....189

*Allegati*.....192

# ***1.Introduzione***

## 1.1. L'inquinamento

L'inquinamento può essere definito come ogni forma di alterazione delle caratteristiche chimiche, biologiche o fisiche delle matrici ambientali (aria, acqua o suolo) che determini variazioni nell'equilibrio degli ecosistemi danneggiando le specie viventi che lo popolano sino, in casi estremi, a metterne in pericolo la sopravvivenza e nuocere alla salute dell'uomo.

Sin dagli anni Settanta del XX secolo, con il crescente sviluppo demografico, industriale, e urbanistico, la problematica dell'inquinamento ha assunto dimensioni preoccupanti ed è divenuta di grande interesse pubblico: molti enti nazionali ed internazionali hanno così iniziato ad adottare strategie volte alla salvaguardia dell'ambiente, con l'obiettivo principale di tutelare la salute dell'uomo e conservare le risorse naturali consentendone un adeguato utilizzo.

Tuttavia l'inquinamento è un fenomeno di difficile contenimento, dovuto solo in minima parte a cause di tipo naturale (incendi boschivi, eruzioni vulcaniche, terremoti etc.): il contributo maggiore deriva infatti da attività antropiche che rilasciano nell'ambiente sostanze estranee alla composizione naturale e in concentrazioni che eccedono le naturali capacità auto-depurative di un determinato comparto ambientale. Tali attività possono essere classificabili come domestiche (riscaldamento e produzione di rifiuti), biologiche (rifiuti organici), industriali (in particolare i settori chimico, petrolchimico, cartario, metallurgico ed energetico), agricole (uso di fertilizzanti e pesticidi, deiezioni animali) e di relazione (trasporto di vario tipo). Esse determinano in maniera diversa i seguenti tipi di inquinamento:

- atmosferico, causato principalmente dalle emissioni derivanti dal traffico auto-veicolare, dal riscaldamento domestico, dagli impianti termici industriali e da quelli di incenerimento rifiuti;
- del suolo, che ha sostanzialmente le stesse fonti di quello dell'aria (contaminanti atmosferici che ricadono sul terreno) a cui si aggiungono gli usi indiscriminati di fertilizzanti e pesticidi e le attività industriali;
- acquatico, attribuibile a scarichi urbani, agricoli e industriali con un contributo notevole dal dilavamento dei suoli.

La dispersione degli inquinanti nelle diverse matrici ambientali viene governata da complessi fenomeni di trasporto come ad esempio quelli convettivi (causati da gradienti di pressione), diffusivi (dipendenti da gradienti di concentrazione) e radiativi (dipendenti da

differenze di temperatura), nonché dagli equilibri termodinamici e dalle reazioni chimiche che si realizzano al contatto dei contaminanti con aria, suolo e/o acqua. La tossicità può dipendere dalla loro intrinseca natura, che può renderli non biodegradabili e pertanto inalterati nel tempo, dalla concentrazione, che può subire aumenti anche passando da un anello all'altro della catena trofica, oppure può essere dovuta a modificazioni che essi subiscono in particolari condizioni ambientali.

Occorre inoltre ricordare che l'alterazione dell'ambiente, generalmente imputabile al rilascio di sostanze tossiche naturali o di sintesi (inquinamento chimico), può anche essere causata dalla immissione di microorganismi patogeni quali batteri, virus, parassiti (inquinamento biologico), e di energia termica, sonora ed elettromagnetica (inquinamento fisico).

### **1.1.1. L'inquinamento delle acque dolci**

Le acque dolci costituiscono una piccola percentuale (circa 3%) dell'acqua presente sulla superficie terrestre e comprendono sia corpi idrici lentici composti da acque ferme come quelle dei laghi, degli stagni e delle paludi interne, sia corpi idrici lotici ossia acque correnti come i fiumi ed i torrenti.

Nelle acque dolci, come in tutti gli ecosistemi, si instaurano relazioni complesse tra la componente abiotica e quella biotica e si stabiliscono le appartenenze ai vari livelli della catena trofica a seconda della disponibilità delle fonti energetiche. Gli organismi autotrofi producono sostanze organiche che vengono utilizzate dagli erbivori, come ad esempio molluschi, larve di insetti e alcuni pesci; i detritivori (crostacei, larve di insetti, etc.) si nutrono di frammenti vegetali, spoglie di animali morti e residui delle attività umane che sono trasportate dall'azione dilavante delle piogge e dagli scarichi urbani. Sia gli erbivori che i detritivori rappresentano il cibo per i carnivori; infine per ultimi, ma non meno importanti, ci sono i batteri e i funghi decompositori che grazie alla degradazione e trasformazione dei resti animali e vegetali ri-immettono nel ciclo della materia le sostanze mineralizzate e utilizzabili così dalle piante e da tutti gli altri organismi autotrofi.

Le acque dolci sono una risorsa molto importante per l'uomo che le utilizza per funzioni biologiche e per lo svolgimento di svariate attività, in primis quelle agricole (irrigazione) e a seguire quelle industriali, civili e domestiche. E' pertanto fondamentale mantenerne un elevato standard qualitativo come affermato già nel 1968 dalla Carta Europea dell'Acqua (Consiglio d'Europa) il cui art.3 dichiara: "alterare la qualità dell'acqua significa nuocere

alla vita dell'uomo e degli altri esseri viventi che da essa dipendono. L'acqua nella natura è un mezzo vitale che ospita organismi benefici i quali contribuiscono a mantenerne la qualità. Contaminandola, rischiamo di distruggere questi organismi, alterando così il processo di autodepurazione e modificando in maniera sfavorevole e irreversibile questo mezzo vitale. Le acque di superficie e le acque sotterranee devono essere preservate dalla contaminazione. Ogni scadimento importante della qualità o della quantità di un'acqua corrente o stagnante rischia di essere nocivo per l'uomo e per gli altri esseri viventi animali e vegetali.” Tale convinzione trova applicazione, dal punto di vista della legislazione europea, nella Direttiva 2000/60/CE che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, e nei numerosi organismi internazionali come ad esempio l'EPA (Environmental Protection Agency), che svolge un'azione mirata alla definizione dei limiti di tolleranza di molti inquinanti, in particolare dei pesticidi. Per quanto riguarda le leggi italiane sull'inquinamento delle acque, la legge Merli del 1976, prima legge organica nazionale sulla tutela delle acque dall'inquinamento, è stata sostituita dal D.Lgs. 152/99 che combinava la salvaguardia delle acque e dell'ambiente fissando limiti molto severi per la presenza di inquinanti, limiti ripresi poi dal D.Lgs. 152/2006 (Testo Unico Ambientale). Con quest'ultimo decreto si è cercato di regolamentare lo smaltimento nelle acque di reflui di origine urbana, rurale e industriale che costituiscono le principali cause dell'inquinamento acquatico. I reflui di origine urbana provengono da abitazioni, uffici, attività commerciali etc. e contengono sostanzialmente residui di cibo, detersivi, carta, prodotti finali del metabolismo umano, oli minerali, nonché terriccio, asfalto e materiali vari provenienti dalla sede stradale. I reflui di provenienza rurale sono dovuti alle pratiche agricole e all'allevamento animale e contengono elevate concentrazioni di concimi, fitosanitari, antiparassitari, deiezioni animali. Gli scarichi industriali sono rappresentati dagli scarti di produzione delle diverse attività industriali e spesso contengono composti particolarmente tossici quali metalli pesanti e inquinanti organici clorurati.

In seguito ai fenomeni di trasferimento di inquinanti tra le differenti matrici ambientali, la contaminazione dei corsi d'acqua superficiali è anche legata all'inquinamento atmosferico. Le sostanze gassose presenti nell'aria si trasferiscono alle acque superficiali a seconda della loro solubilità, mentre il particolato solido atmosferico raggiunge il suolo e le acque per effetto sia della deposizione solida sia di quella umida. In seguito a successivi fenomeni di dissoluzione, le sostanze (per es., metalli pesanti, SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>) che compongono il particolato sono disperse nelle acque determinandone il livello di contaminazione. Le piogge acide



sono un tipico esempio di tale fenomeno che provoca una sensibile variazione del pH delle acque superficiali con conseguente alterazione di numerosi processi biologici e chimici.

L'immissione di sostanze tossiche in ambiente acquatico comporta un esteso ventaglio di possibili conseguenze dirette ed anche indirette (es. abbassamento del contenuto di ossigeno disciolto e conseguente anossia) che possono essere più o meno gravi a seconda della specifica tipologia di inquinante immesso e delle caratteristiche del corpo idrico. Infatti il comportamento, la distribuzione, il destino, la degradazione degli inquinanti dipendono sia dalle loro specifiche caratteristiche chimico-fisiche sia da quelle del sistema acqua/sedimento ricevente, che determinano in ultimo le concentrazioni di sostanza cui i diversi organismi sono esposti. Il trasporto degli inquinanti in forma disciolta dà luogo a diluizione e diffusione nella colonna d'acqua, mentre l'adsorbimento su particolato determina un legame degli stessi ai solidi sospesi ed alla frazione solida dei sedimenti. Questi ultimi, nel caso di contaminanti persistenti, andranno a costituire nel tempo serbatoi di accumulo ("hot spot") di sostanze tossiche ed anche fonti durevoli di emissione nel corpo idrico rappresentando una sorgente rilevante di contaminazione anche qualora le cause primarie di inquinamento siano state eliminate e le concentrazioni di contaminanti nella colonna d'acqua rispettino gli standard di qualità ambientale. Per questo motivo lo studio degli effetti dell'inquinamento in ambiente acquatico non può prescindere da un'analisi approfondita della matrice sedimentaria.

Tra i maggiori rappresentanti, sia per tossicità che per diffusione, dei 248.000 potenziali inquinanti presenti nell'ambiente (American Chemical Society, 2010), emergono nelle acque dolci i metalli pesanti e gli inquinanti organici persistenti.

## 1.2. I metalli pesanti

Con il termine metalli pesanti ci si riferisce ad elementi chimici della tavola periodica che presentano le seguenti caratteristiche:

- densità superiore ai 5,0 g/cm<sup>3</sup>
- numero atomico maggiore di 20
- comportamento prevalentemente cationico
- bassa solubilità dei loro idrati
- spiccata attitudine a formare complessi
- affinità verso i solfuri

Per gli elementi senza isotopi stabili, le masse atomiche indicate sono quelle degli isotopi più stabili o più comuni.

**elementi del blocco F**

57 La Lantanio 138,90547	58 Ce Cerio 140,116	59 Pr Praseodimio 140,90768	60 Nd Neodimio 144,242	61 Pm Promezio (145)	62 Sm Samaro 150,36	63 Eu Eurio 151,964	64 Gd Gadolmio 157,25	65 Tb Terbio 158,92535	66 Dy Dissorio 162,500	67 Ho Olio 164,93032	68 Er Erbio 167,259	69 Tm Tulio 168,93421	70 Yb Itterbio 173,054	71 Lu Lutezio 174,967
89 Ac Attinio (227)	90 Th Torio 232,03806	91 Pa Protattinio 231,03688	92 U Uranio 238,02891	93 Np Netunio (237)	94 Pu Plutonio (244)	95 Am Americio (243)	96 Cm Curio (247)	97 Bk Berkelio (247)	98 Cf Californio (251)	99 Es Einsteinio (252)	100 Fm Fermio (257)	101 Md Mendelevio (258)	102 No Nobelio (259)	103 Lr Lawrencio (262)

Fig.1. Tavola periodica degli elementi: evidenziati alcuni esempi di metalli

I metalli pesanti sono componenti naturali della crosta terrestre, la cui mobilitazione avviene principalmente ad opera dell'uomo, con accumulo nella biosfera, ingresso nella catena alimentare e conseguenti gravi rischi per gli esseri viventi. Le fonti antropiche che ne causano il rilascio nell'ambiente sono legate ad attività di lavorazione dei minerali, al rilascio non controllato di rifiuti o scarti industriali, alla presenza di miniere dismesse, al dilavamento dei terreni agricoli o anche all'effetto della pioggia acida che, penetrando nei terreni, può mobilitare i metalli pesanti facilitandone il convogliamento nei corsi d'acqua, nei laghi, nei fiumi e nei corpi idrici sotterranei. Rispetto agli inquinanti organici, i metalli pesanti hanno come caratteristica quella di non poter essere distrutti e di bioaccumularsi nei tessuti biologici degli animali e dell'uomo (Kabata et Pendias, 1992).

Dal punto di vista biologico i metalli pesanti possono essere distinti in essenziali e tossici non essenziali: i primi sono richiesti dall'organismo e sono coinvolti in molteplici funzioni fisiologiche e comprendono ad esempio il ferro indispensabile per l'emoglobina del sangue, lo zinco importante per la funzione di molti enzimi, il rame, il cui fabbisogno è dell'ordine dei milligrammi e altri elementi necessari in quantità molto minore (nell'ordine dei microgrammi) come il vanadio, il cromo, il manganese, il cobalto, il selenio e il molibdeno. Per essi esistono valori di concentrazione intracellulare ottimali al di sotto dei quali l'organismo entra in sofferenza mentre se superati diventano dannosi. Elementi come Hg e Pb, non presentano invece alcuna funzione biologica finora conosciuta e vengono quindi definiti tossici in quanto tali a qualunque concentrazione.

Quando i contaminanti metallici, penetrando nelle cellule, eccedono le capacità omeostatiche, tendono a causare una sindrome da stress che può determinare risposte fisiologiche a livello molecolare, cellulare e tissutale (Viarengo et al., 1991).

La tossicità dipende in larga misura dalla loro capacità di:

- ❖ inattivare enzimi in seguito al legame di cationi metallici ai gruppi sulfidrilici delle proteine;
- ❖ inattivare le macromolecole biologiche come conseguenza della sostituzione di ioni o interazione con gruppi funzionali;
- ❖ incrementare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e indurre stress ossidativo (Ercal et al., 2001) con conseguenze quali la perossidazione lipidica (Viarengo et al., 1990);
- ❖ causare, come nel caso del mercurio, genotossicità e danni cromosomici (Snow, 1992; Bolognesi et al., 1999) per interazione diretta con il materiale genetico ed anche mediante meccanismi ROS-dipendenti;
- ❖ indurre un incremento del calcio libero intracellulare compromettendo i sistemi di omeostasi del calcio (Verboost et al., 1989; Viarengo et Nicotera, 1991) o causando un rilascio reversibile di  $\text{Ca}^{2+}$  da riserve intracellulari (McNulty et Taylor, 1999; Burlando et al., 2003a);

Per contrastare tali effetti gli organismi mettono in atto meccanismi di detossificazione che includono il legame a ligandi solubili, come le metallotioneine, proteine ricche in gruppi sulfidrilici che legano metalli essenziali e non essenziali (Viarengo et al., 2000) e il glutathione, la compartimentalizzazione tramite segregazione nei lisosomi e la co-precipitazione in granuli di calcio insolubile: granuli di fosfato, pirofosfato o concrezioni Cu:S (Viarengo et Nott, 1993; Dameron et Harrison, 1998).

### 1.2.1. Il mercurio

Il mercurio è un elemento naturale ritrovabile in aria, acqua e suolo. Esiste in diverse forme: la forma elementare, che dà origine a vapori leggermente solubili in acqua ma è facilmente trasportabile in atmosfera, il mercurio inorganico, che include sali in due stati ionici diversi ( $\text{Hg}^+$  e  $\text{Hg}^{++}$ ) che se solubili in acqua sono biodisponibili e considerati tossici (Boening DW., 1999), e il mercurio organico, che comprende composti in cui si lega a strutture contenenti atomi di carbonio (metil, etil, fenil o gruppi simili). Il comportamento biologico, la farmaco-cinetica e il significato clinico delle varie forme di mercurio varia con la struttura chimica (Bernhoft, 2011).

Le principali sorgenti naturali di mercurio sono le emissioni per volatilizzazione dalla superficie della crosta terrestre, dai corpi lacustri e marini, da superfici ricoperte di vegetazione, da vulcani, incendi boschivi e sorgenti geotermiche. Per quanto la valutazione sia estremamente difficoltosa si stima che la produzione annua di mercurio da sorgenti naturali ammonti a  $265\text{t anno}^{-1}$  (Axenfeld et al., 1991). Le emissioni antropiche derivano da diverse attività. Il mercurio ha una vasta gamma di usi nelle applicazioni militari, nelle batterie, in medicina e in odontoiatria (Boening DW., 1999). Le industrie chimiche, i produttori di apparecchiature elettriche, vernici e legno da macero sono tra i maggiori consumatori di mercurio, pari al 55% del consumo totale. La combustione di carburanti fossili è un'altra fonte di mercurio; alcuni composti di tale metallo sono stati inoltre usati in agricoltura, specialmente come fungicidi. Sebbene l'uso industriale di mercurio sia stato ridotto negli anni recenti grazie a strette regolamentazioni, alte concentrazioni sono ancora presenti nei sedimenti associati a applicazioni industriali di mercurio (Klaassen et al., 1986).

Secondo la World Health Organisation (World Health Organisation, 1991) la maggior esposizione al mercurio per l'uomo deriva da degassamento di mercurio da amalgame dentali, ingestione di pesce contaminato o esposizione occupazionale.

Si tratta di un metallo pesante la cui tossicità è nota, specialmente in seguito ai disastri della Baia di Minamata in Giappone (Environmental Health Department, 2002), dove negli anni '50 vennero riportati moltissimi casi di bambini nati con gravi problemi neurologici a causa dell'ingestione da parte delle madri di pesce altamente contaminato con metilmercurio, e in Iraq dove negli anni '70 vi fu una epidemia a causa del consumo di semi trattati con composti organici del mercurio (Bakir et al., 1973; Skerfving et Coplestone, 1976; Clarkson, 1981). Il mercurio può causare danni a livello molecolare,

cellulare, tissutale, attraverso diversi meccanismi, come l'alterazione dell'omeostasi del calcio, del potenziale di membrana, della sintesi proteica e del meccanismo eccitatorio mediato da amminoacidi nel sistema nervoso centrale (Yee et Choi; 1996). Danno mitocondriale, perossidazione lipidica, compromissione dei microtubuli (National Research Council, 2000) e accumulazione neurotossica di serotonina, aspartato e glutammato sono tutti meccanismi di neurotossicità del metilmercurio (Yee S., Choi BH., 1996). Nel tempo sia il metilmercurio che il mercurio elementare sottoforma di vapore sono trasformati, nel cervello, in mercurio inorganico e si legano a macromolecole contenenti gruppi sulfidrilici (National Research Council, 2000). Sia il metilmercurio che il mercurio inorganico si legano ad amminoacidi quali cisteine ed a proteine con diverso peso molecolare contenenti tioli (glutazione, albumine etc.). Si ritiene che il legame e la dissociazione di questi complessi mercurio-tiolati controlli il movimento del mercurio e i suoi effetti tossici nel corpo umano (Clarkson TW., 2002).

Il mercurio è accumulato dai pesci, dagli invertebrati, dai mammiferi, e dalle piante acquatiche e la concentrazione tende ad aumentare passando dal livello trofico di base a quelli superiori (fenomeno della biomagnificazione). I tessuti dei mammiferi marini presentano la più alta concentrazione di mercurio di tutti gli organismi marini mentre gli invertebrati generalmente presentano una percentuale del metallo più bassa. La speciazione del mercurio è di grande importanza nel determinare l'assorbimento del metallo da acqua e suolo. Il mercurio inorganico risulta la specie predominante nell'ambiente ma subisce spesso fenomeni di metilazione negli ecosistemi acquatici ad opera di batteri divenendo così più facilmente accumulabile dagli organismi. Occorre tenere presente che una aliquota notevole di mercurio si lega anche ai sedimenti e alla materia organica: ne consegue una ridotta biodisponibilità per gli organismi. Effetti tossicologici includono danni all'apparato riproduttivo, inibizione della crescita, anomalie dello sviluppo e risposte comportamentali alterate. L'esposizione a basse concentrazioni di mercurio può non provocare mortalità direttamente, ma può ritardare la crescita aumentando così il rischio di predazione; inoltre può provocare effetti notevoli sulla riproduzione interferendo con i primi stadi di sviluppo degli embrioni (NOAA's Ocean Service, 2005).

### 1.3. Gli inquinanti organici persistenti

Gli inquinanti organici persistenti (POPs) sono composti organici altamente stabili utilizzati come pesticidi in agricoltura e nel settore industriale, o generati involontariamente come sottoprodotti di combustione o processi produttivi. Le sostanze riconosciute come POPs (Ritter et al., 1995) possono essere suddivise in tre categorie:

- *pesticidi* (aldrin, clordano, clordecone, DDT, dieldrin, endrin, eptacloro, esclorobenzene, esaclorocicloesano, mirex e toxafene);
- *prodotti industriali* (PCB ed esabromobifenile);
- *sottoprodotti non desiderati* (diossine, furani e alcuni IPA come il benzo(a)pirene, il benzo(b)fluorantene, il benzo(k)fluorantene, l'indeno[1,2,3-*cd*]pirene).

I POPs hanno proprietà chimico-fisiche che li caratterizzano e sono la causa di numerosi problemi per l'ambiente, in particolare per la fauna e per la salute dell'uomo:

- *trasporto su lunghe distanze*

- tensione di vapore < 1000 Pa
- evidenza sperimentale della presenza in zone fredde e remote del mondo (Cotham et Bidleman, 1991)

- *persistenza*

- hanno tempi di semivita molto lunghi nell'aria, suolo, sedimenti ed acqua; ad es. nel suolo i tempi di dimezzamento della concentrazione per il pesticida DDT variano tra 10-15 anni, per l'insetticida fogliare endrin più di 12 anni, per il fungicida esaclorobenzene sono compresi tra i 2.7 e i 22.9 anni (Ritter et al., 1995)

- *bioaccumulo*

- fattore di bioaccumulo (BAF) > 5000
- fattore di bioconcentrazione (BCF) > 5000
- log KOW > 5

- *elevata tossicità*

- composti lipofili bioaccumulabili nei tessuti lipidici.

Come risultato di queste proprietà, vi è una crescente preoccupazione relativa agli effetti tossici di questi composti sul biota, anche a dosi ambientali estremamente basse in particolare per quanto riguarda le specie rappresentative degli alti livelli della catena alimentare. I POPs possono indurre disfunzioni del sistema immunitario, disturbi della sfera riproduttiva, disordini neurologici e anomalie comportamentali (ATSDR, 2003). Alcuni di questi prodotti chimici, come ad esempio il DDT e il suo metabolita DDE, i PCB

e le diossine come la TCDD (Colborn et al., 1993; Keice et al. 1995, Birnbaum et Fenton, 2003; Binelli et al., 2004), sono infatti interferenti endocrini e possono compromettere lo sviluppo sessuale maschile ed avere attività estrogenica interferente con gli ormoni sessuali. Inoltre i POPs possono avere effetti mutageni e cancerogeni. Nella classificazione IARC, (International Agency for Research on Cancer) la 2,3,7,8-TCDD è classificata nel Gruppo 1 essendo sicuramente cancerogena per l'uomo (IARC, 1997). I PCB sono classificati nel Gruppo 2A (probabile cancerogeno) mentre clordano, clordecone, DDT, eptacloro, HCH, lindano, mirex, HCB, polibromobifenili e toxafene sono classificati nel Gruppo 2B (possibili cancerogeni umani). Per gli altri congeneri delle diossine, tutti i furani, l'aldrin, il dieldrin e l'endrin non c'è una sufficiente evidenza sperimentale perché possano essere considerati cancerogeni (Gruppo 3). Tra gli IPA considerati POPs nel Protocollo UNECE (UNECE, 1998), il Benzo(a)pirene è classificato come "probabilmente" cancerogeno per l'uomo (Gruppo 2A) mentre il benzo(b)fluorantene, il benzo(k)fluorantene e l'indeno[1,2,3-*cd*]pirene come "possibilmente" cancerogeni per l'uomo (Gruppo 2B) (Spezzano et al., 2004).

La Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti, entrata in vigore nel 2004 e a cui hanno già aderito 150 paesi compresi gli stati membri dell'Unione Europea, fornisce il quadro, basato sul principio di precauzione, atto a garantire l'eliminazione, in condizioni di sicurezza, e la diminuzione della produzione e dell'uso di tali sostanze, nocive per la salute umana e per l'ambiente. Tale Convenzione riguarda 12 POPs prioritari tra cui ritroviamo il diclorodifeniltricloroetano (DDT).

### 1.3.1. Il DDT

Il DDT e i suoi metaboliti primari, DDE e DDD (fig. 2 e 3), sono sostanze di sintesi e non sono presenti in natura (WHO, 1979).

Identità chimica	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDD
Nome IUPAC	1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano;	1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etilene;	1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano;
Altri nomi	4,4'-DDT; dicloro-difenil-tricloroetano; 1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil tricloroetano)	4,4'-DDE; diclorodifenil-dicloroetano; 1,1'(2,2-dicloroetilidene)bis (4-clorobenzene)	4,4'-DDD; 1,1-bis(4-clorofenil)-2,2-dicloroetano; tetraclorodifeniletano
Formula bruta	$C_{14}H_9Cl_5$	$C_{14}H_8Cl_4$	$C_{14}H_{10}Cl_4$
Struttura chimica			
CAS	50-29-3	72-55-9	72-54-8
NIOSH RTECS	KJ3325000	KV9450000	KI0700000
OE	602-045-00-7	n.d.	n.d.
EINECS	200-024-3	n.d.	n.d.
Proprietà chimico-fisiche	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDD
Peso molecolare	354,49	318,03	320,05
Aspetto	Cristalli incolori, polvere bianca	Solido cristallino bianco	Cristalli incolori, polvere bianca
Densità	0,98-0,99 g/cm <sup>3</sup>	1,506 g/cm <sup>3</sup>	1,385 g/cm <sup>3</sup>
Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua Log $K_{ow}$	6,91	6,51	6,02
Punto di fusione	109°C	89°C	109-110°C
Punto di ebollizione	Si decompone	336°C	350°C
Solubilità in acqua	0,025 mg/l @ 25°C	0,12 mg/l @ 25°C	0,090 mg/l @ 25°C
Solubilità in solventi organici	Leggermente solubile in etanolo, molto solubile in etere etilico e acetone	Lipidi e la maggior parte dei solventi organici	n.d.
Tensione di vapore	$1,60 \cdot 10^{-7}$ @ 20°C, torr	$6,0 \cdot 10^{-6}$ @ 25°C, torr	$1,35 \cdot 10^{-6}$ @ 25°C, torr
Fraresi di rischio	R40	n.d.	n.d.
Fraresi di sicurezza	-	n.d.	n.d.

Fig.2. Identità chimica e proprietà chimico-fisiche del *p,p'*-DDT e dei suoi metaboliti *p,p'*-DDE e *p,p'*-DDD (immagine tratta da Turci et al., 2010).

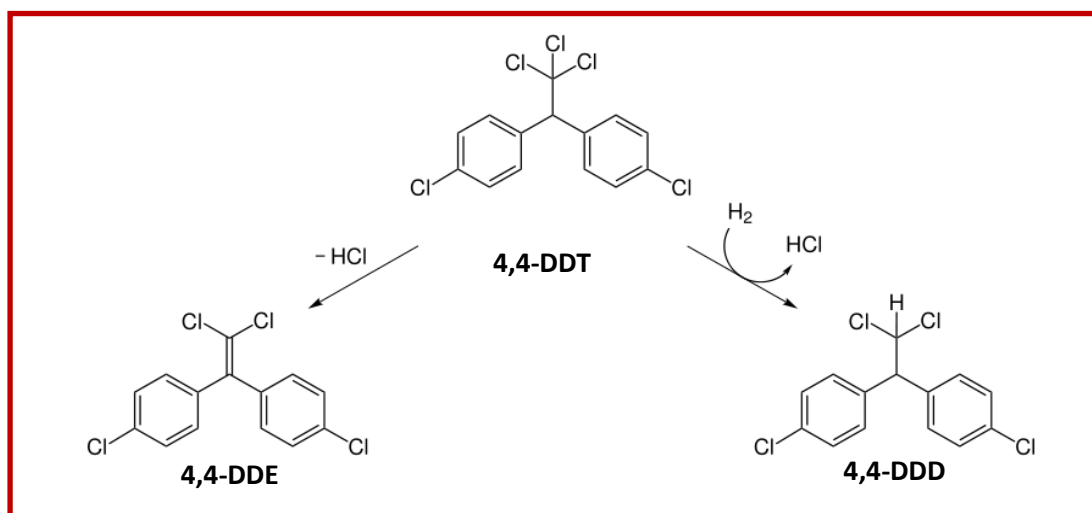


Fig.3. Ingrandimento delle formule di struttura del 4,4-DDT, 4,4-DDD, 4,4-DDE.



Il DDT è un organoclorurato che fu sintetizzato nel 1874 dal chimico austriaco Othmar Zeidler e le cui proprietà come pesticida furono scoperte nel 1939 dal chimico svizzero Paul Hermann Müller vincitore, per questa scoperta, del Premio Nobel per la Medicina (ATSDR, 2002; Turusov et al., 2002). Storicamente, il DDT fu rilasciato nell'ambiente durante la sua produzione, formulazione e l'uso estensivo come pesticida. Anche il DDD fu usato come pesticida, ma meno diffusamente rispetto al DDT. Il DDE deriva principalmente dalla degradazione del DDT.

Si stima che siano state prodotte a livello mondiale circa 2,6 milioni di tonnellate di DDT, utilizzato per combattere malattie veicolate dagli insetti come la malaria e il tifo oltre che in campo agricolo, in particolare sul cotone (Spezzano, 2004). L'uso indiscriminato di tale composto ha causato notevoli problemi all'ambiente, resi noti all'opinione pubblica grazie al libro "Primavera silenziosa" di Rachel Carson, scritto nel 1962, in cui l'autrice constatava il maggior silenzio nei campi primaverili, rispetto ai decenni passati, dovuto alla diminuzione del numero di uccelli canori provocato dall'utilizzo massiccio di insetticidi, ed in particolare del DDT. Il DDT è infatti altamente tossico per i volatili e gli effetti più significativi sono stati riscontrati sulla riproduzione in quanto tale sostanza, e in misura maggiore il suo metabolita DDE, sono risultati implicati nella riduzione dello spessore delle pareti delle uova di uccelli rapaci che si nutrono di pesci, come ad esempio i falchi (Ratcliffe, 1967, 1970; Pearce et al., 1979) causandone un declino della popolazione. Alcune evidenze sperimentali suggeriscono che il meccanismo coinvolto nella riduzione dello spessore della parete delle uova sia un'inibizione della sintesi di prostaglandine e dell'uptake del calcio nella mucosa della ghiandola del guscio delle uova (Lundholm, 1987; 1993; 1997). Numerosi studi hanno dimostrato che il DDT e i suoi metaboliti possono agire da distruttori endocrini (Keith, 1997; Longnecker et al., 1997; Lundholm, 1997; Halldin et al., 2005; Binelli et al., 2004). Vi sono evidenze sperimentali del fatto che il DDE è un antagonista dei recettori di androgeni e vi è l'ipotesi che possa interagire in maniera additiva o sinergica con altri inquinanti considerati distruttori endocrini (Keice, 1995; Jobling, 1995; Ramamoorthy et al., 1996; de Solla, 1998; Podreka, 1998).

La tossicità del DDT è elevata per quanto riguarda gli invertebrati acquatici e i pesci mentre nei mammiferi si evidenziano maggiormente effetti cronici dovuti a tale contaminante; è importante evidenziare che vista l'elevata affinità di tale composto per i tessuti adiposi noi tutti possediamo qualche molecola di DDT (fino a circa 3ppm per adulto). L'effetto principale di tale contaminante si esplica sia per l'uomo che per gli animali a carico del sistema nervoso: si ritiene che le molecole del DDT formino dei

complessi con le macromolecole lipoproteiche delle membrane dei neuroni, inibendo la trasmissione degli impulsi nervosi (Spezzano, 2004).

Per quanto riguarda la cancerogenicità è stato dimostrato che il trattamento dei topi con il DDT induce tumori al fegato in maniera dose-dipendente (Turusov et al., 1973) e che l'esposizione combinata al DDE e DDD ne aumenta l'incremento e la precocità di comparsa (Tomatis et al., 1974; 1975). Vi sono inoltre studi che indicano nell'uomo un incremento di rischio di cancro al pancreas dopo esposizione al DDT (Garabrant et al., 1992; Frizek et al., 1997) e un aumento dell'incidenza di cancro al fegato e mieloma multiplo dopo esposizione occupazionale a tale sostanza tossica (Brown et al., 1997; Cocco et al., 1997). Tuttavia studi successivi confermano solo un incremento di rischio di mortalità per cancro al fegato associato ad elevate concentrazioni di DDE nel tessuto adiposo (Cocco; 2000).

Nella prima metà degli anni '70 l'Agenzia per la Protezione Ambientale (USEPA) ne vietò l'utilizzo negli Stati Uniti d'America. Tale divieto si estese in breve tempo a molti altri paesi, inclusa l'Italia; nell'Unione Europea il DDT è vietato dal 1986. La Convenzione di Stoccolma stabilisce che fanno eccezione situazioni particolari per le quali è concesso l'impiego del DDT come controllo di vettori specialmente nelle zone a rischio malaria.

Nell'idrosfera il DDT può entrare in seguito alla deposizione umida e secca dall'atmosfera e per trasferimento diretto di gas, dagli scarichi di acque reflue industriali e fognarie, per *runoff* da sorgenti non puntiformi. Una parte del composto può rivolatizzarsi o bioconcentrarsi negli organismi acquatici e bioaccumularsi nella catena alimentare giungendo fino all'uomo. Nei sedimenti inoltre può rimanere adsorbito per più di 100 anni (Gajski et al., 2012).

Come risultato della sua persistenza ambientale e dei notevoli quantitativi utilizzati, molti individui sono ancora esposti al DDT ed ai suoi metaboliti (Waliszewski et al., 1999a, b; Yanez et al., 2002; Diaz-Barriga et al., 2002) ed è per questo motivo che sono tuttora effettuati numerosi studi per valutarne i potenziali effetti tossici.

## 1.4. Ecotossicologia

Gli inquinanti rilasciati nell'ambiente sono stati valutati per diversi anni solamente da un punto di vista chimico, rilevandone anche piccolissime concentrazioni (dell'ordine dei pico-nanogrammi) e cercando di studiarne la potenziale pericolosità sulla base delle caratteristiche strutturali e del comportamento una volta immessi nell'ambiente, ma poche informazioni erano disponibili circa gli effetti di tali xenobiotici sugli organismi viventi che popolano i diversi ecosistemi. La necessità di colmare questa lacuna si è delineata con la crescente consapevolezza che i soli dati chimici non erano sufficienti per poter determinare il rischio ambientale di un ecosistema e stabilire le azioni da intraprendere per tutelare la salute degli organismi e quindi, in un'ottica più generale, salvaguardare la qualità della vita dell'uomo.

A tale scopo si è affermata una nuova disciplina scientifica, l'ecotossicologia, termine utilizzato per la prima volta da Truhaut nel 1969 (Truhaut, 1977) e la cui prima vera definizione viene data nel 1978 in "Principles of Toxicology": l'ecotossicologia riguarda gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici sugli organismi viventi, in particolare su popolazioni e comunità all'interno di definiti ecosistemi; essa comprende anche lo studio delle modalità di diffusione di questi agenti e le loro interazioni con l'ambiente (Blutler G., 1978).

Si tratta di una scienza multidisciplinare che applica allo studio degli effetti delle sostanze tossiche sugli ecosistemi i principi e metodi delle seguenti discipline scientifiche:

- *tossicologia*, che studia le sostanze, naturali o sintetiche, che hanno o possono avere il significato di veleni per la loro capacità di agire più o meno dannosamente sull'organismo;
- *ecologia*, che fornisce indicazioni sui processi che regolano la struttura e funzione delle popolazioni e delle comunità e le interazioni tra la componente biotica e abiotica;
- *chimica ambientale* che studia il destino degli inquinanti nell'ambiente (movimento, trasporto e trasformazioni).

L'approccio ecotossicologico, previsto anche dalla legislazione vigente (D.lgs. 152/99 e successivi aggiornamenti), fornisce indicazioni atte a impedire l'eventuale rilascio nell'ambiente di qualsiasi sostanza che possa causare danni e/o morte degli organismi.

Nella pratica, tali indicazioni contribuiscono a regolamentare le fonti (restrizioni e limiti per le emissioni), fornendo standard di qualità per l'ambiente (quantità massime consentite nei comparti ambientali che tengano conto di possibili trasformazioni in sottoprodotti) e gli organismi (limiti di esposizione).

Inizialmente l'ecotossicologia si inseriva nella gestione del rischio ambientale in un'ottica unicamente retrospettiva, attualmente invece la prospettiva è soprattutto di tipo predittivo, utilizzando il biomonitoraggio come strumento previsionale per la valutazione del rischio ambientale.

### 1.4.1. Il biomonitoraggio

Il biomonitoraggio può essere definito come il regolare e sistematico impiego di organismi al fine di valutare lo stato di "salute" dell'ambiente (Cairns, 1990).

Gli organismi che vengono utilizzati possono essere:

- bioindicatori che in presenza di inquinanti subiscono variazioni rilevabili dello stato naturale che possono portare a modificazioni morfologiche, fisiologiche, danni al patrimonio genico o morte degli stessi;
- bioaccumulatori in grado di sopravvivere alla presenza di un determinato contaminante, assimilato dalle matrici ambientali, accumulandolo e permettendone una identificazione e una quantificazione tramite analisi chimiche.

I bioindicatori vengono utilizzati per diversi tipi di biomonitoraggio, che differiscono per finalità e modalità di impiego degli organismi.

Il primo è costituito dai saggi ecotossicologici "classici" che misurano la tossicità di una sostanza individuando la dose alla quale essa è capace di produrre uno o più effetti negli organismi tenuti in condizioni controllate, nelle quali siano note la concentrazione del composto tossico e la durata dell'esposizione.

Tali saggi consentono di ottenere importanti parametri quali:

- **NOEC** (Not Observed Effect Concentration) rappresenta la concentrazione, tra quelle analizzate, per la quale non sono state registrate alterazioni del parametro ("endpoint") misurato rispetto al campione di controllo;
- **LOEC** (Low Observed Effect Concentration) rappresenta la concentrazione minore, tra quelle studiate, per la quale sia stata registrata una alterazione del parametro misurato rispetto al campione di controllo;
- **EC<sub>x</sub>** (Effect Concentration of X%) rappresenta il valore di concentrazione, estrapolato dalla curva di dose-effetto ottenuta dall'interpolazione dei dati, corrispondente ad un effetto pari a X% rispetto al campione di controllo (es. EC<sub>50</sub> rappresenta la concentrazione di composto per la quale, nelle condizioni

sperimentali standard, gli organismi mostrano una alterazione del parametro pari al 50% rispetto al campione di controllo).

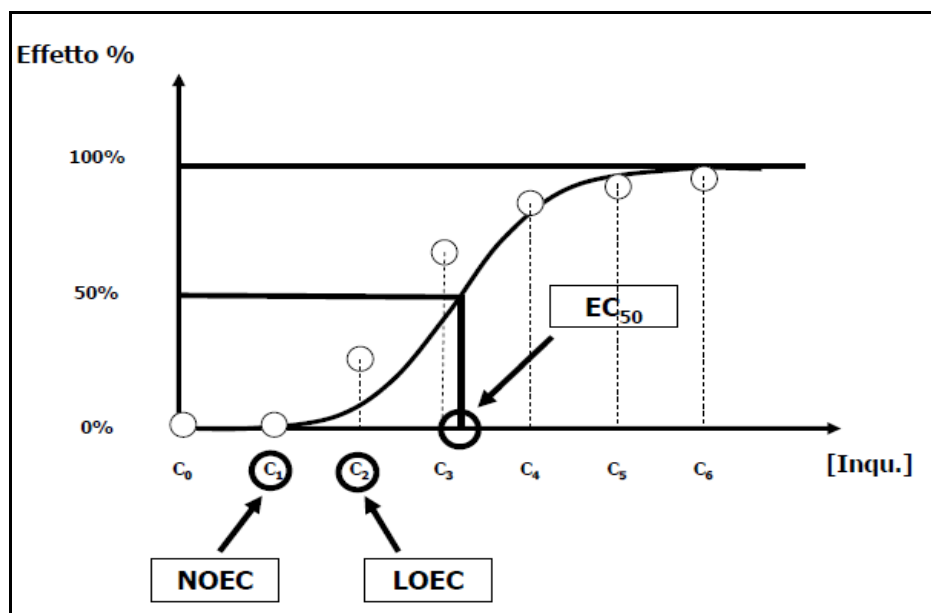


Fig. 3. Curva dose-effetto con indicate NOEC, LOEC e EC<sub>50</sub>.

Uno dei primi endpoint comunemente misurato nei saggi è il tasso di mortalità, test di tossicità acuta (misurato in un breve lasso di tempo, inferiore al tempo di replicazione dell'organismo) che permette di ottenere il parametro LC<sub>50</sub>, ossia la concentrazione di sostanza tossica che causa la morte del 50% degli organismi ad essa esposti. Un tipico esempio di test acuto di questo tipo è quello effettuato sul crostaceo cladocero *Daphnia magna* dopo incubazione con l'inquinante/campione per 24 ore. Altri test acuti possono considerare il variare di parametri fisiologici come ad esempio l'inibizione della bioluminescenza del batterio *Vibrio fischeri*. L'importanza di conoscere l'effetto delle sostanze tossiche anche sulle generazioni successive e di comprendere gli effetti di un'esposizione prolungata nel tempo, ha portato allo sviluppo di test cronici che prevedono l'incubazione degli organismi con gli inquinanti per tempi uguali o superiori a quello necessario per riprodursi. Un esempio è il test che valuta l'inibizione del tasso di crescita dell'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, effettuato dopo 72 ore di contatto con i contaminanti.

L'impiego congiunto di test di tossicità acuta e cronica ha sicuramente permesso di incrementare il valore predittivo dei saggi ecotossicologici, ma per una comprensione più dettagliata degli effetti dei contaminanti sugli organismi a dosi subletali è necessario un approccio differente. Per tale motivo si è delineato un secondo tipo di biomonitoraggio che

può essere condotto esponendo i bioindicatori alle matrici ambientali di cui si intende valutare la qualità sia in condizioni controllate di laboratorio, sia direttamente in campo, e rappresenta un'innovazione nel campo dell'ecotossicologia: si basa sull'utilizzo dei cosiddetti biomarker.

#### **1.4.1.1. I biomarker**

Si definisce biomarker la variazione di una risposta biologica (molecolare, cellulare, fisiologica o comportamentale) che può essere correlata all'esposizione e/o all'effetto tossico di composti inquinanti (Peakall, 1994).

I biomarker, a differenza dei saggi classici, permettono di seguire l'evolversi della "sindrome di stress" indotta dai contaminanti in un organismo in quanto forniscono indicazioni sullo stato di salute di un individuo nel suo complesso ed a vari livelli di organizzazione biologica (molecolare, subcellulare, cellulare, di tessuto, organo, individuo) e fungono pertanto da segnale di alterazioni (early warning signals) a più alti livelli ecologici (popolazione, comunità, ecosistema). E' infatti importante ricordare che ad ogni incremento di complessità biologica corrisponde un aumento della rilevanza ecologica e del tempo di risposta nonché della difficoltà di collegare quest'ultima ad uno specifico contaminante (fig.4). Quindi sebbene sia chiaramente riconosciuto che la massima preoccupazione è relativa alla salute della popolazione/comunità/ecosistema/uomo, tali livelli di organizzazione biologica sono in genere troppo complessi e lontani dagli eventi causali per essere utilizzati per sviluppare strumenti per la diagnosi e previsione precoce delle conseguenze dello stress ambientale (Depledge et al., 1993).

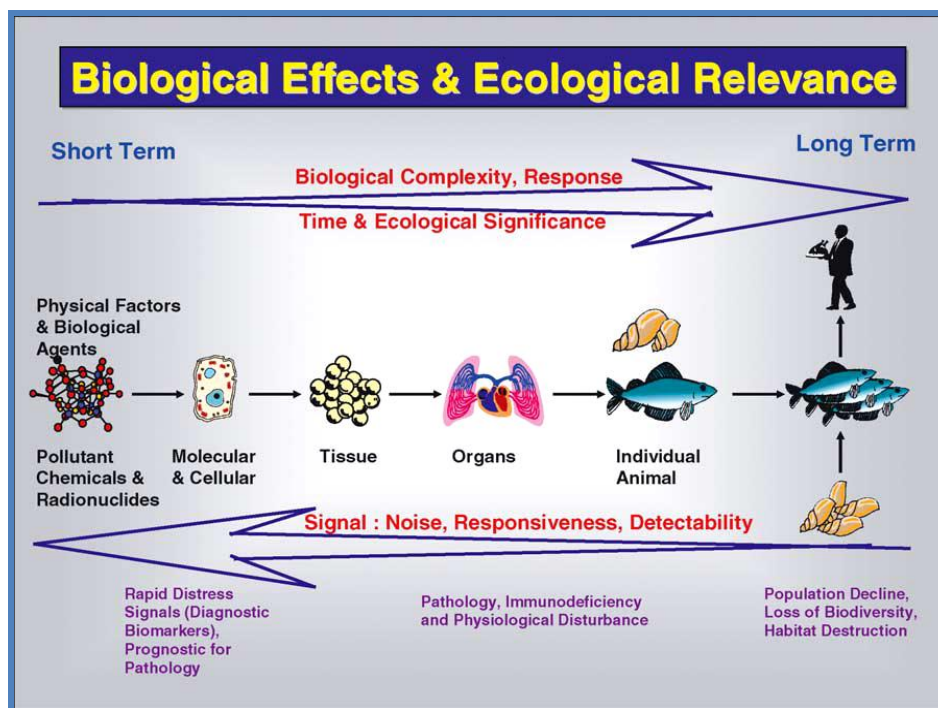


Fig.4. Rappresentazione diagrammatica della relazione tra i segnali di stress ambientali, la detectabilità e la rilevanza ecologica (Bayne et al., 1985; Moore, Simpson 1992; Moore et al., 1994; Moore, 2002).

Generalmente un programma di biomonitoraggio include:

- biomarker che sono sensibili allo stress a livello molecolare e cellulare;
- biomarker che valutano il danno degli inquinanti a livello tissutale;
- biomarker che valutano lo stress a livello di organismo dando informazioni sulla potenziale capacità di sopravvivenza degli animali così come sulla loro performance riproduttiva. Questi sono essenziali per correlare gli effetti degli inquinanti sugli individui ai possibili cambiamenti a livello di popolazione (Viarengo et al., 2007).

In base alla loro specificità di risposta nei confronti di agenti inquinanti (Bayne et al., 1986; Moore et Lowe, 1985) i biomarker sono suddivisibili in:

- biomarker di “stress”, ossia parametri che indicano lo stato di stress generale di un organismo e non sono riconducibili a una specifica classe di inquinanti (ad es. stabilità delle membrane lisosomiali, accumulo di lipidi neutri e lipofuscine, danni del DNA *etc.*)
- biomarker di esposizione, ossia alterazioni direttamente rapportabili a una classe di inquinanti (ad es. l’accumulo di metallotioneine rapportabile a stress indotto dalla presenza di metalli pesanti e l’inibizione dell’attività dell’acetilcolinesterasi dovuta a pesticidi organofosforati; Viarengo et al., 2007).

Il biomonitoraggio basato sull'utilizzo di biomarker presenta notevoli vantaggi rispetto ad altre metodologie di indagine poiché essi:

- ❖ forniscono una risposta immediata degli effetti tossici della frazione realmente biodisponibile dei contaminanti, che può essere impiegata per evitare danni maggiori all'ecosistema;
- ❖ possono evidenziare gli effetti additivi, sinergici o antagonistici della miscela di composti alla quale è sottoposto l'organismo;
- ❖ possono segnalare la classe di inquinanti che provocano la sindrome di stress;
- ❖ evidenziano gli effetti di un inquinamento anche se l'inquinante non è più rilevabile con le tecniche chimico-fisiche;
- ❖ informano rapidamente circa l'entità della tossicità della matrice;
- ❖ possono rendere noto in tempo reale l'esito positivo di eventuali azioni di risanamento;

I biomarker costituiscono una strategia di biomonitoraggio a basso costo se utilizzati in un approccio a due livelli, che prevede l'impiego nel primo livello definito di screening di biomarker altamente sensibili quale la stabilità delle membrane lisosomiali (SML) e di un "endpoint" ad alto livello di organizzazione biologica come ad esempio il tasso di mortalità o di riproduzione, e nel secondo prevede l'uso dell'intera "batteria di biomarker" nei siti in cui è stata accertata l'alterazione della SML o in ogni caso del biomarker utilizzato quale "early-warning signal" (Viarengo et al., 2007).

La scelta dei biomarker da utilizzare in un programma di biomonitoraggio è importante quanto la selezione dei bioindicatori, detti anche organismi modello in quanto devono possedere determinate caratteristiche:

- sensibilità agli inquinanti;
- capacità di manifestare con gradualità lo stress indotto dalla presenza di concentrazioni crescenti di sostanze tossiche;
- ampia distribuzione nell'area di indagine;
- scarsa mobilità;
- facilità nell'allevamento e nella manipolazione;
- ciclo vitale conosciuto e di durata adeguata;
- biochimica e fisiologia dell'organismo sufficientemente noti;
- uniformità genetica.

In particolare per il biomonitoraggio delle acque dolci, oltre agli organismi classicamente utilizzati dall'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (quali il batterio *Vibrio*



*fischeri*, l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, il crostaceo *Daphnia magna* e per i sedimenti l'oligochete bentonico *Lumbriculus variegatus*), sono state recentemente sviluppate, presso il Dipartimento di Scienze ed Innovazione Tecnologica (DiSIT) dell'Università di Alessandria, batterie di biomarker che utilizzano come organismi modello il protozoo *Dictyostelium discoideum* e il bivalve *Unio pictorum*.

### 1.5. Il *Dictyostelium discoideum*

Il *Dictyostelium discoideum* è una piccola ameba coloniale cosmopolita (10-20µm di diametro) che vive nello strato di terriccio e foglie in decomposizione del sottobosco e nella pellicola d'acqua che circonda le particelle del suolo, nutrendosi di batteri e di lieviti. Dal punto di vista sistematico la posizione di *D. discoideum* è stata a lungo incerta a causa delle caratteristiche dell'organismo che lo avvicinano sia al Regno dei Funghi sia al Regno dei Protisti (Patterson et Sogin, 1992). Avendo caratteristiche morfologiche comuni ai funghi, secondo criteri della nomenclatura micologica è stato incluso tra le muffe mucillaginose della divisione *Myxomycota*, classe *Dictyosteliomycetes*, ordine *Dictyosteliaes* (Carlile et Watkinson, 1996). Per quanto riguarda l'organizzazione, la riproduzione e il ciclo vitale, si avvicina molto di più ai protozoi unicellulari ameboidi, tanto che la più recente classificazione scientifica, proposta da T. Cavalier-Smith *et al.* (2004), inserisce la specie *D. discoideum* nel regno *Protozoa*, subregno *Sarcomastigota*, phylum *Amoebozoa*, subphylum *Conosa*, infraphylum *Mycetozoa*, classe *Stelamoebea*, ordine *Dictyosteliida*, famiglia *Dictyosteliidae* e genere *Dictyostelium*.

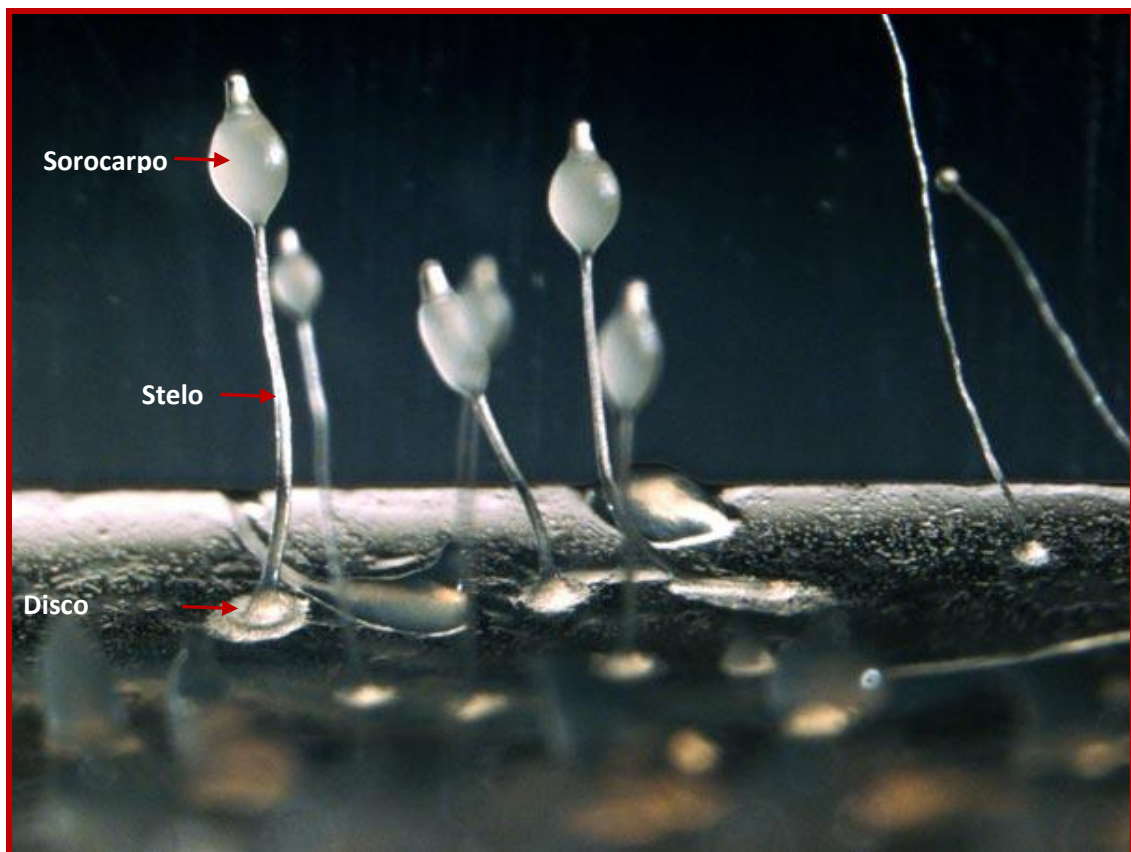
Negli ecosistemi fluviali e lacustri i protozoi costituiscono un importante anello della catena alimentare: essi sono predati da piccoli organismi e forme larvali di invertebrati e, a loro volta, sono consumatori di batteri permettendo di raccordare l'anello dei produttori primari a quello dei consumatori secondari. Dal punto di vista evolutivo, sono gli organismi che per primi hanno raggiunto la complessità morfo-funzionale tipica della cellula eucariote (nucleo cellulare ben definito, organuli cellulari e citoplasma organizzato in estesi sistemi di membrane) e presentano una vasta gamma di risposte adattative che li rendono adatti per lo studio di differenti problemi biologici. A questo proposito, il *Dictyostelium discoideum* è un ottimo esempio di protozoo che, per le sue caratteristiche peculiari, è da molto tempo un organismo modello nella ricerca biologica. E' infatti stato utilizzato per la comprensione di differenti meccanismi quali:

- la trasduzione del segnale (Chubb et Insall, 2001) e la differenziazione cellulare, processi ampiamente rappresentati nel ciclo cellulare;
- i vantaggi e i rischi della cooperatività rispetto ad uno stile di vita unicellulare;
- le funzioni del citoscheletro actomiosinico (Noegel et Schleicher, 2000) e l'associata motilità chemiotattica delle cellule non muscolari (Parent, 2004; Willard et Devreotes, 2006; Veltman, Keizer-Gunnik et van Haastert, 2008);

- i meccanismi cellulari della fagocitosi (Maniak, 2002; Duhon et Cardelli, 2002); il *D. discoideum* cattura infatti chemotatticamente batteri che consuma tramite endocitosi, un processo che si è conservato durante l'evoluzione ed è usato come meccanismo di difesa da parte del sistema immunitario animale contro l'invasione di patogeni microbici. *Legionella pneumophila* è il patogeno intracellulare le cui interazioni con *D. discoideum* sono state maggiormente studiate (Solomon et Isberg, 2000; Haegele, Kohler, Merkert et al., 2000).
- le basi molecolari di malattie mitocondriali e neurodegenerative (Barth, Le et Fisher, 2007).

Si tratta quindi di un organismo semplice, ma che presenta aspetti complessi evidenziabili già nel suo ciclo vitale, che prevede l'alternarsi di una fase unicellulare e di una pluricellulare in risposta a condizioni ambientali avverse quali lo stress da mancanza di nutrimento. Lo stadio vegetativo, in presenza di batteri e lieviti, è costituito da piccole amebe mononucleate (denominate myxamoebae) costituite ciascuna dal citoplasma, da un singolo nucleo aploide con sei cromosomi e da un vacuolo contrattile, attraverso il quale questi organismi sono in grado di espellere l'acqua in eccesso. In questa fase le amebe si moltiplicano per scissione binaria e si nutrono di batteri mediante endocitosi, che avviene anche grazie all'emissione di prolungamenti citoplasmatici, detti pseudopodi. Durante questa fase del ciclo vitale, esse mostrano scarsi segni di cooperazione e ogni piccolo protozoo vive indipendentemente dagli altri. Queste amebe, infatti, si respingono reciprocamente per effetto di una sostanza da loro stesse prodotta e rilasciata all'esterno, evitando, in questo modo, di concentrarsi in un'unica zona impoverendola di risorse (Carlile et Watkinson, 1996). Una volta esauriti i nutrienti, le myxamoebae che prima si respingevano, entrano in una condizione di "affamamento" (starvation), uno stato critico a cui esse rispondono in maniera immediata con l'avvio di un processo differenziativo e l'acquisizione di capacità aggregative. Migliaia di myxamoebae, quindi, si aggregano, mantenendo però la loro individualità, a formare un ammasso dall'aspetto caratteristico che si comporta come un individuo multicellulare. La formazione di tale struttura, la cui grandezza può variare notevolmente sino a contenere un massimo di  $10^5$  cellule ed essere visibile a occhio nudo, avviene grazie alla secrezione da parte di alcune amebe di un importante "secondo messaggero" coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale all'interno delle cellule viventi: l'adenosin monofosfato ciclico (cAMP) (Firtel, 1996; Loomis, 1998). Esso, interagendo con un recettore presente sulla superficie cellulare delle amebe circostanti, induce tre risposte: la chemotassi, ossia il movimento a seconda della presenza di cAMP, la generazione e la secrezione di ulteriore cAMP per trasmettere il

segnale e l'avvio del programma di sviluppo. L'ammasso formatesi sviluppa un'estremità rivolta verso l'alto dando luogo ad una struttura pedunculata, nota come "pseudoplasmodio", che è in grado di spostarsi tramite un movimento strisciante assumendo un aspetto simile a quello di una lumaca. Essa risponde con un'acuta sensibilità ai gradienti di temperatura estremamente deboli ed una bassa intensità direzionale di luce (Fischer et al., 1997; Fischer, 2001). Ciò consente all'organismo di spostarsi sulla superficie del suolo in cerca del posto migliore ove interrompere la migrazione e iniziare, se persistono le condizioni di affamamento, lo stadio finale di morfogenesi: la culminazione, fase che porta alla formazione del corpo fruttifero che consiste in un disco basale, uno stelo formato da cellule vacuolate e, sulla sommità dello stesso, un'espansione globulare denominata sorocarpo contenente le spore (fig. 5).



**Fig.5.** Corpo fruttifero di *Dictyostelium discoideum* (immagine tratta da National Geographic Daily News, "Smallest farmers found? Amoebas carry, plant seeds" – modificata) .

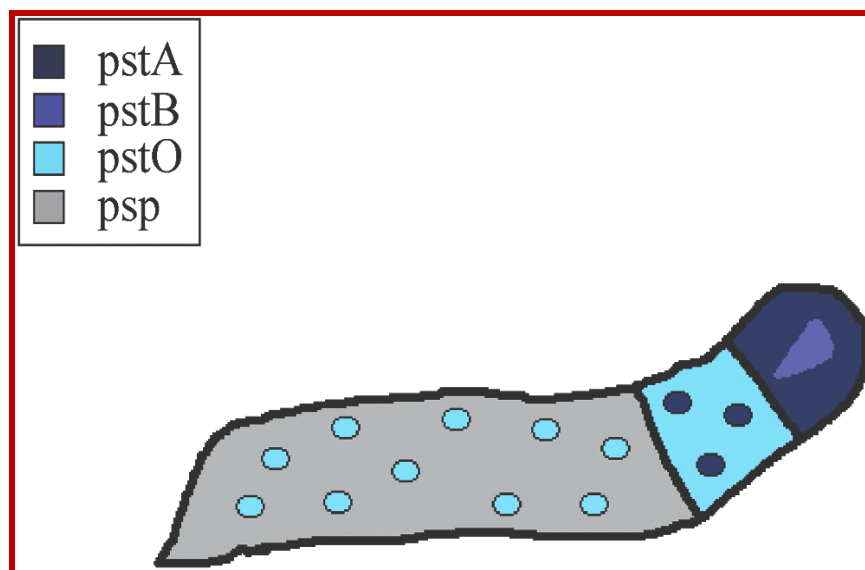
La formazione dello stelo e delle spore è possibile grazie ad una differenziazione cellulare che avviene all'interno dello pseudoplasmodio che dà origine a cellule denominate prepeduncolari o "prestalk" e presporulari o "prespore" (Williams, 2006) che, come

implica il nome, sono destinate a formare rispettivamente lo stelo e le spore del corpo fruttifero.

Le cellule “prestalk” (pst) sono localizzate nella regione anteriore dello pseudoplasmodio e secernono una guaina di cellulosa indispensabile per conferire rigidità allo stelo (Blanton, 1993). Possono essere ulteriormente suddivise in differenti sottotipi a seconda dell’espressione dei patterns di geni che sono preposti alla differenziazione cellulare delle prestalk (Jermyn et al., 1989):

- le pstA che sono le cellule presenti nella porzione più anteriore;
- le pstB che costituiscono una sorta di nucleo centrale (Jermyn et Williams, 1991) nella porzione occupata dalle pstA;
- le pstO che sono presenti nella zona situata immediatamente dopo quella occupata dalle pstA.

Le cellule presporulari (psp) sono invece presenti nella regione posteriore. Si tratta di cellule che nel sorocarpo diventano sferiche e si circondano di una parete, differenziandosi in spore mature (George et al., 1972; Raper, 1984). In fig. 6 sono indicati i tipi cellulari che compongono lo pseudoplasmodio.



**Fig.6. Rappresentazione grafica dello pseudoplasmodio con indicati i tipi cellulari presenti nelle diverse parti che lo compongono (immagine tratta da “The Versatile *Dictyostelium discoideum*”, R. Gomer et D. Brazill, 2003).**

Mentre le cellule dello stelo vanno incontro ad una forma di morte cellulare programmata, le singole spore, se presenti condizioni favorevoli quali la disponibilità di nutrienti, germineranno e le amebe emergenti ricominceranno nuovamente il ciclo.

L'intero programma di differenziazione e morfogenesi nel *Dictyostelium discoideum* (fig.7) ha luogo in un periodo di 24 ore dall'inizio della mancanza di nutrienti e può essere indotto in modo sincronizzato e riproducibile anche in laboratorio per ottenere una grande popolazione cellulare semplicemente eliminando il cibo.

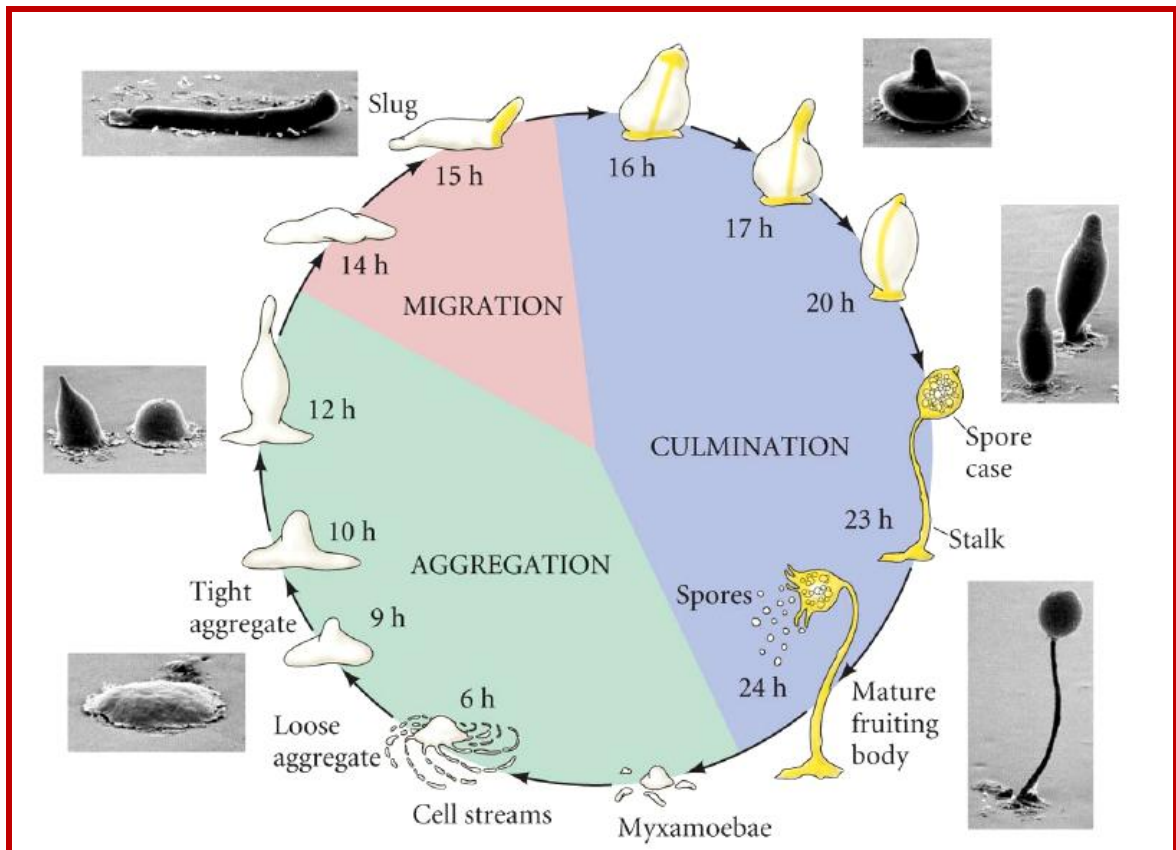


Fig.7. Ciclo vitale di *Dictyostelium discoideum* (immagine tratta da Gilbert S.F., *Developmental biology* – Seventh edition; 2003).

### 1.5.1. Il *Dictyostelium discoideum* come organismo modello in ecotossicologia

Il *Dictyostelium discoideum*, nella fase di myxamoeba, riveste un ruolo di eccellenza nella valutazione della tossicità ambientale in quanto il suo impiego come organismo bioindicatore presenta i seguenti vantaggi:

- ❖ è facilmente allevabile in laboratorio;
- ❖ il ciclo vitale è perfettamente riproducibile;

- ❖ gli effetti tossici degli inquinanti non vengono ridotti dall'interposizione di tessuti e liquidi organici in quanto si tratta di una singola cellula esposta direttamente al mezzo esterno;
- ❖ le risposte ottenute sono immediate e di relativa facile interpretazione;
- ❖ i meccanismi fisiologici di risposta alle contaminazioni ambientali possono essere considerati tipici delle cellule eucariotiche.

Per tutti questi motivi, l'ameba sociale *D.discoideum* rappresenta un'importante strumento scientifico recentemente utilizzato per rilevare gli effetti degli inquinanti organici e inorganici in campioni di suolo e di acqua (Dondero et al., 2006).

La batteria di biomarker messa a punto su tale organismo presso il DiSIT prevede la valutazione di endpoint ecotossicologici ad alto livello di organizzazione biologica e di parametri subletali per rilevare le risposte più sensibili ai contaminanti. Solitamente in un programma di biomonitoraggio si valutano la vitalità cellulare e il tasso di replicazione, che permettono di avere un'indicazione degli effetti precoci che gli inquinanti inducono sugli esseri viventi prima che il danno da essi provocato si ripercuota a livello di popolazione, e la stabilità delle membrane lisosomiali (SML) e il tasso di endocitosi che sono tipici biomarker di stress nelle cellule eucariotiche (Moore, 2002; Moore et al., 2004). Il primo parametro (SML) misura l'alterazione della funzione lisosomiale correlata ad un incremento del tasso catabolico cellulare (Moore et Viarengo, 1987; Sforzini et al., 2008; Moore et al., 2012) mentre il secondo parametro valuta il cambiamento nel ruolo fisiologico della plasmamebrana che risulta essere il primo bersaglio degli inquinanti (Moore et al., 2007).

Tuttavia per comprendere maggiormente nel dettaglio il meccanismo di azione dei numerosi composti tossici presenti nell'ambiente la suddetta batteria di biomarker deve essere implementata: parte di questo lavoro di ricerca ha proprio riguardato lo sviluppo di nuovi biomarker sull'ameba *D. discoideum* in modo da poter seguire così l'evolversi della "sindrome di stress" indotta da contaminanti nelle amebe e ottenere un quadro il più possibile completo dei danni indotti dai contaminanti in tali organismi.

### 1.6. *Unio pictorum*

*Unio pictorum* è un mollusco bivalve di acqua dolce appartenente al phylum *Mollusca*, classe *Bivalvia*, ordine *Unionoidea*, famiglia *Unionidae*, genere *Unio*. Si tratta di una specie ampiamente distribuita in Europa e in Russia che vive sul fondo di grandi fiumi, canali, laghi e bacini a lento scorrimento nelle zone di pianura. Spesso tali organismi risultano difficilmente visibili per l'abitudine di infossarsi nel substrato lasciando emergere solo i sifoni inalanti sia per respirare che per filtrare l'acqua, meccanismo attraverso cui trattengono le particelle alimentari e gli organismi planctonici sospesi nella colonna d'acqua. Esternamente presentano una conchiglia con valve di colore giallo-brunastro di forma ovale e allungata (fig.8) connesse da un legamento; internamente consistono di branchie per respirare, un tubo digerente per la trasformazione dei prodotti alimentari, un grosso piede muscolare per la locomozione e il tessuto del mantello che produce il guscio. Sono prive di bisso ma secernono una sostanza collosa utile per fissarsi al substrato.



**Fig.8.** Immagine di *Unio pictorum*.



Il particolare ciclo ontogenetico di questi bivalvi coinvolge i pesci in un temporaneo rapporto di parassitismo: generalmente a sessi separati, dalle loro uova si sviluppano numerosissime larve, dette glochìdi, dotate di una coda appiccicosa che serve loro per attaccarsi ai pesci mentre vengono trasportate dalla corrente; trovato un ospite, la larva si incista nella sua pelle vivendo da parassita, finché, dopo alcune settimane, si trasforma in un piccolissimo bivalve che si stacca dal pesce lasciandosi cadere sul fondo e iniziando così la sua vita da organismo libero (fig. 9). I pesci più frequentemente adottati come ospiti sono i Ciprinidi e i Gasterosteidi, quali il comune spinarello.

Dal punto di vista ecologico, i molluschi hanno un grande valore. Elemento vitale nella catena alimentare, si nutrono di alghe, batteri e particelle organiche e sono un importante alimento per la preziosa fauna dei consumatori secondari. Come importanti filtratori naturali (possono filtrare diversi litri di acqua in un giorno), migliorano la qualità dell'acqua rimuovendo le particelle e le sostanze inquinanti in sospensione e contribuendo pertanto a renderla più adatta per gli usi umani. La caratteristica di filtratore rende i molluschi ottimi bioindicatori per lo studio della qualità di ecosistemi acquatici fluviali e lacustri.

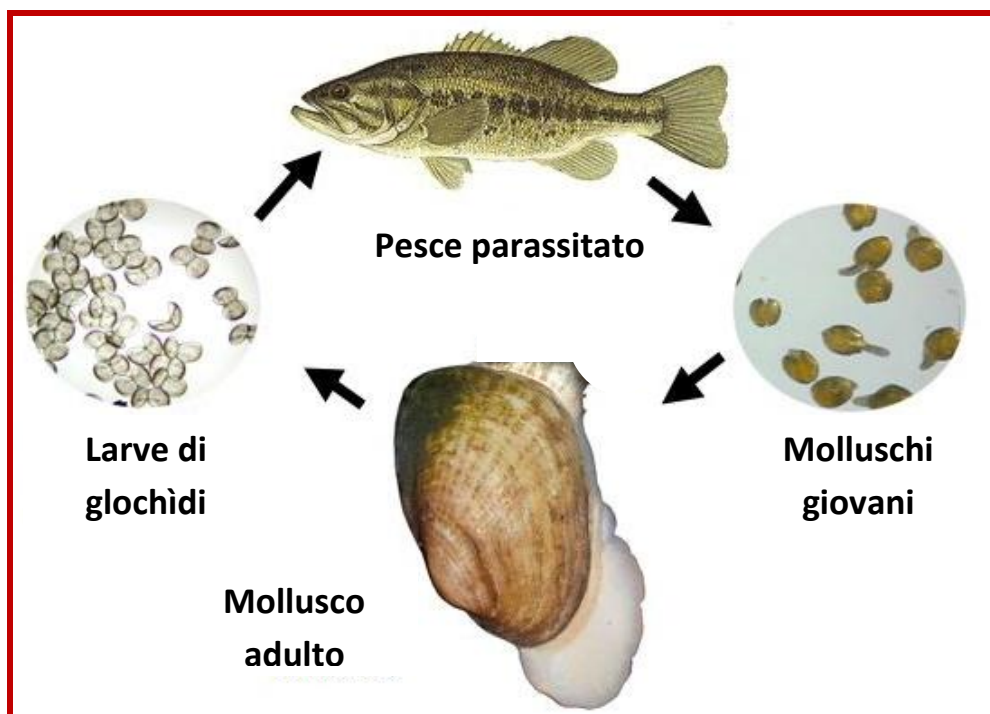


Fig.9. Immagine rappresentativa del ciclo vitale di *Unio pictorum*.

### 1.6.1. *Unio pictorum* come bioindicatore in ecotossicologia

Il biomonitoraggio prevede molto spesso l'utilizzo di bioindicatori, come *U. pictorum*, che vengono direttamente stabulati nei siti di cui si intende valutare il grado di inquinamento, permettendo così di determinare qual è lo stress indotto dai contaminanti negli esseri viventi esposti, in concomitanza dei parametri ambientali caratterizzanti l'area di indagine. Si utilizzano animali stabulati perché il limite principale nelle applicazioni in campo dei bivalvi di acqua dolce è dovuto alla variabilità biologica nelle risposte legata alla differenza di età e di stadio riproduttivo degli organismi in situ. L'utilizzo di bivalvi in gabbia risolve tale problema oltre a quelli dovuti alle caratteristiche idrologiche ed idrochimiche ed a fattori abiotici e biotici che possono influenzare la distribuzione delle specie, il bioaccumulo dei contaminanti e le risposte dei biomarker (Bauer et al., 1991; Cossu et al., 2000; Arbuckle et Downing, 2002; Andral et al., 2004; Viarengo et al., 2007; Štambuk et al., 2009).

I molluschi hanno diverse caratteristiche, come un'ampia distribuzione, la filtrazione come modalità di alimentazione, uno stile di vita sessile e la capacità di accumulare contaminanti che li rendono organismi favoriti per stimare il livello di inquinamento ambientale e la biodisponibilità di diversi tipi di inquinanti (Ravera, 2001; Roméo et al., 2003; Andral et al., 2004; Bocquene' et al., 2004; Pampanin et al., 2005; Amiard et al., 2006; Lehtonen et al., 2006; Viarengo et al., 2007). In risposta a stress ambientali essi mostrano un range di risposte fisiologiche, istologiche e molecolari che includono anomalie morfologiche, alterazioni dello stato redox, induzione di rotture al DNA etc. (Pavlica et al., 2001; Binelli et al., 2007; Bolognesi et al., 2004; Rocher et al., 2006; Coffinet et al., 2008; Klobučar et al., 2008). Per questi motivi molluschi come gli unionidi di acqua dolce sono stati proficuamente adoperati sia in indagini di laboratorio che di campo (Gaglione et Ravera, 1964; Riccardi et Ravera, 1989; Doyotte et al., 1997; Cossu et al., 2000; Petushok et al., 2002; Lemiere et al., 2005; Labieniec et Gabryelak, 2007; Štambuk et al., 2008, 2009).

In particolare in questo lavoro di ricerca una batteria di biomarker applicata a *U. pictorum* è stata utilizzata per determinare gli effetti biologici di contaminanti organici e inorganici presenti nelle acque di un corpo idrico lentico.

## 1.7. L'analisi di rischio ecologico

I dati ecotossicologici derivanti dal biomonitoraggio e comprendenti, come già descritto nei paragrafi 1.4.1 e 1.4.1.1., sia gli effetti sui classici endpoint di alto livello quali mortalità e riproduzione, che indicano gli effetti degli inquinanti a livello di organismo (Spurgeon et al., 1994), sia quelli sui parametri fisiologici subletali, ossia i biomarker, che permettono di seguire l'evolversi della "sindrome di stress" negli organismi (Dagnino et al., 2007; Viarengo et al., 2007), sono fondamentali ma non sufficienti per determinare il rischio ecologico di un sito contaminato da una miscela di sostanze tossiche. Per poter eseguire una valutazione esaustiva occorre infatti applicare un approccio multidisciplinare finalizzato ad un'analisi corretta delle complesse interazioni tra gli inquinanti e l'ambiente mediante la valutazione di diversi parametri che possano descrivere e convertire il livello reale di esposizione ai contaminanti e gli effetti nocivi sull'ambiente in una specifica situazione di allarme (Chapman, 1990). Per tale motivo i risultati dei test ecotossicologici devono essere integrati con quelli delle analisi chimiche ed ecologiche: si tratta del cosiddetto approccio Triad, ormai ampiamente utilizzato per la valutazione del rischio ambientale di suoli, acque dolci e aree marine costiere (Chapman et al., 2005; Jensen et al., 2006; Dagnino et al., 2008).

L'approccio Triad si inserisce nell'ambito dell'analisi di rischio ecologico (ERA), definito come la pratica di determinare la natura e la probabilità di effetti di azioni antropiche su animali, piante e ambiente (SETAC, 1997). Mediante tale metodo vengono assemblate le informazioni fornite dalle analisi chimiche, che permettono di determinare la concentrazione dei contaminanti nelle matrici ambientali, quelle derivanti dai test ecotossicologici, relative agli effetti tossici della frazione realmente biodisponibile di singoli contaminanti e delle loro miscele, e quelle dei dati ecologici che forniscono indicazioni dirette sulla struttura e funzione della comunità e pertanto danno informazioni in relazione agli effetti dei contaminanti sull'ecosistema (Crumbling et al., 2001), ossia permettono di valutare il declino della biodiversità.

Gli "output" delle linee Triad sono eterogenei e sono caratterizzati da una diversa rilevanza nella determinazione dei danni all'ecosistema, a seconda della capacità di svelare direttamente gli effetti negativi che possono causare su di esso. Per integrarli nel modo corretto è stato pertanto sviluppato, presso il DiSIT, un Sistema Esperto di integrazione e interpretazione dei dati (EDSS) per la determinazione di un indice di rischio ambientale di un ecosistema. Per comparare e unire i risultati ottenuti, EDSS calcola 3 sub-indici di

rischio in una scala da 0-1 combinando i risultati ottenuti da ciascuna disciplina: Indice di Rischio Chimico (ChemRI), Indice di Rischio Ecotossicologico (EtoxRI), Indice di Rischio Ecologico (EcoRI). In un successivo step di integrazione, EDSS pesa i sub-indici sulla base della loro efficacia nel delineare direttamente le deviazioni dall'equilibrio dell'ecosistema e infine conclude la procedura di assemblaggio stimando l'Indice di Rischio Ambientale (EnvRI) (Dagnino et al., 2008).

EnvRI, indice di rischio ambientale, è quindi calcolato dalla media pesata dei sub-indici ChemRI, EtoxRI ed EcoRI, secondo la seguente formula:

$$EnvRI = \frac{(wf_{ChemRI} * ChemRI + wf_{EtoxRI} * EtoxRI + wf_{EcoRI} * EcoRI)}{(wf_{ChemRI} + wf_{EtoxRI} + wf_{EcoRI})}$$

Nella procedura di integrazione, a ciascun indice viene attribuito un coefficiente di peso (*wf*) (tabella 1).

Indice	Tipo di parametro	Fattore di peso	Valore di default
<i>ChemRI</i>	Concentrazione totale di inquinanti	<i>wf<sub>CHEM</sub></i>	1.0
<i>EtoxRI</i>	Saggi ecotossicologici	<i>wf<sub>ETOX</sub></i>	1.5
<i>EcoRI</i>	Concentrazione totale di inquinanti	<i>wf<sub>ECO</sub></i>	2.0

**Tabella 1. Fattore di peso di ciascun indice utilizzato per il calcolo dell'EnvRI.**

Al fine di sfruttare completamente le evidenze ottenute dai test del Triad, EDSS integra separatamente i risultati ottenuti dagli “early-warning signals” in un Indice di Vulnerabilità Biologica (BVI). Esso a sua volta deriva da due sub-indici, variabili tra 0-1, che sono l'Indice di Stress dei Biomarker (BSI) e il ChemRI. Un ulteriore indice, molto importante, è l'Indice di Genotossicità (GTI) che deriva dall'unione dei risultati dei biomarker di genotossicità effettuati su differenti organismi modello: essi possono segnalare la presenza di contaminanti in grado di alterare l'integrità del DNA e/o indurre danni cromosomici. In figura 10 vengono rappresentati i diversi indici, BSI, GTI, EtoxRI e EcoRI sulla base di come si pongono in risposta allo stress ambientale e alla rilevanza ecologica.

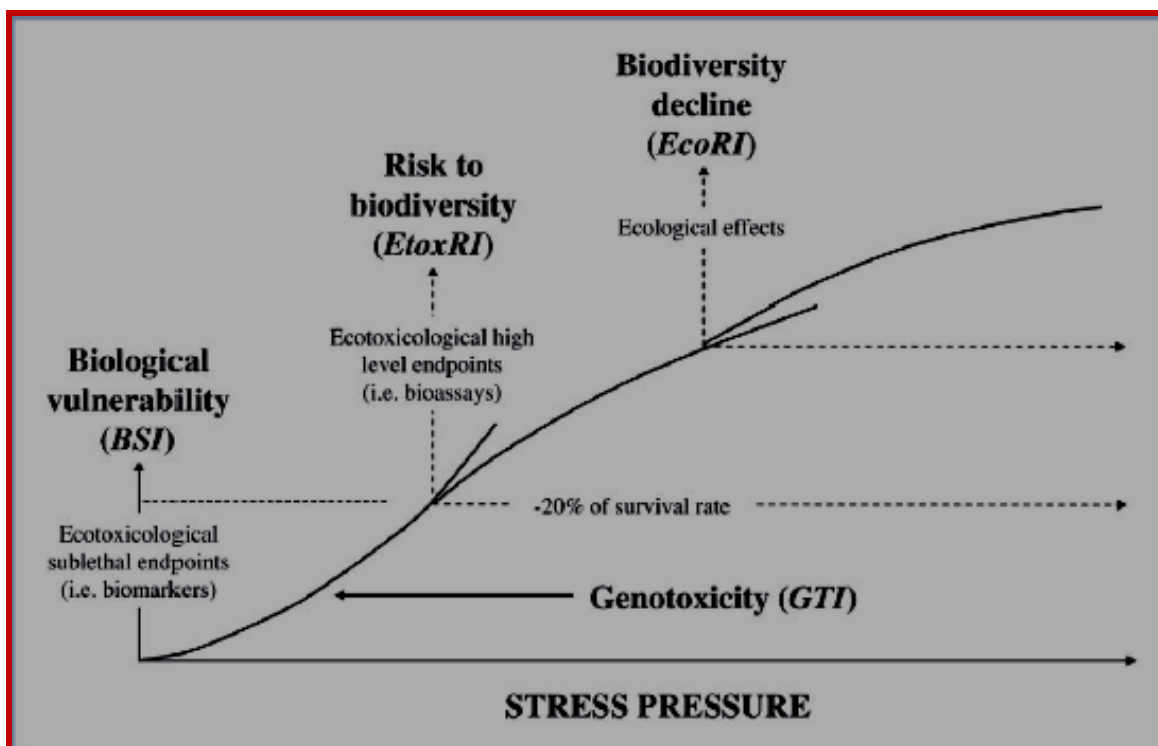


Fig.10. Differenti parametri biologici rilevabili in seguito a contaminazione ambientale e relativi indici utilizzati nell'analisi di rischio ecologico (immagine tratta da Dagnino et al., 2008).

L'obiettivo dell'ERA è quello di verificare in quale misura un basso valore dell'EnvRI indica realmente un ecosistema inalterato (minimi effetti a livello di popolazione-comunità) e, a tale proposito, l'indice di vulnerabilità biologica può essere utile per dare una valutazione corretta. Infatti un basso valore di EnvRI e un alto valore di BVI dovrebbero precisare che, sebbene né i saggi biologici né le indagini ecologiche mostrino alterazioni rilevanti indotte dall'inquinamento, le popolazioni e le comunità dell'ecosistema sono potenzialmente stressate.

L'approccio Triad è stato applicato in numerosi programmi di monitoraggio ambientale; nello specifico, in questo lavoro di ricerca è stato utilizzato per la determinazione del rischio ambientale di un corpo idrico superficiale impattato dalle acque di drenaggio di una miniera dismessa.

## ***2. Scopo del lavoro***

L'attività di ricerca ha riguardato la valutazione della tossicità di inquinanti organici ed inorganici presenti in sedimenti e/o acque superficiali di un corpo idrico lentico e di un lotico al fine di stabilire i possibili effetti che tali contaminanti esplicano sugli esseri viventi.

Come noto, i sedimenti possono accumulare nel tempo gli inquinanti che giungono nel corpo idrico; di questi contaminanti è la frazione biodisponibile che può produrre effetti dannosi sugli organismi esposti e pertanto la biodisponibilità risulta essere un parametro fondamentale per una valutazione oggettiva del rischio ecologico di un ambiente acquatico. Il primo corpo idrico di cui è stata valutata la tossicità dei sedimenti è il Lago Maggiore. La potenziale tossicità dell'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti di due siti del Lago è stata valutata sia mediante test ecotossicologici comunemente utilizzati da A.R.P.A. per acque dolci superficiali (inibizione del tasso di motilità del crostaceo cladocero *Daphnia magna*, della bioluminescenza del batterio *Vibrio fischeri* e del tasso di crescita dell'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*) e sedimenti (inibizione della sopravvivenza dell'oligochete bentonico *Lumbriculus variegatus*), sia tramite una batteria di biomarker applicata all'ameba sociale *Dictyostelium discoideum*. Su quest'ultimo organismo è stato effettuato come primo approccio un test acuto che prende in considerazione quale endpoint di alto livello la mortalità; successivamente sono stati valutati gli effetti a livello di riproduzione (test cronico) ed infine sono state studiate le variazioni di parametri subletali mediante una batteria di biomarker quali stabilità delle membrane lisosomiali, tasso di endocitosi, danno al DNA e frequenza dei micronuclei.

Successivamente sono stati valutati gli effetti delle sostanze tossiche principalmente presenti nei sedimenti del Lago ossia una miscela denominata DDX costituita da tre inquinanti organici persistenti, il DDT ed i suoi metaboliti DDD e DDE e l'effetto del mercurio ( $Hg^{2+}$ ) utilizzando negli esperimenti le concentrazioni che sono risultate presenti, in base alle analisi chimiche, nel sedimento contaminato pari a 732.5ppb per il DDX e 7.8ppm per il  $Hg^{2+}$ . Lo scopo è stato stabilire gli effetti biologici che tali sostanze potrebbero avere se fossero totalmente biodisponibili.

Oltre alla batteria di biomarker applicata allo studio della tossicità dei sedimenti, l'attività di ricerca ha riguardato la messa a punto di nuovi biomarker per investigare in modo più approfondito alcuni aspetti relativi al potenziale meccanismo d'azione di DDX e  $Hg^{2+}$  in *D. discoideum*, specialmente in relazione alla generazione di stress ossidativo cellulare ed al potenziale danno ossidativo al DNA.

Infine per poter stabilire gli effetti sinergici, additivi o antagonistici dei diversi inquinanti, sono stati valutati il tasso di sopravvivenza e di replicazione delle amebe esposte alla miscela DDX+ Hg<sup>2+</sup>.

La tossicità di inquinanti organici e inorganici presenti nei sedimenti e nelle acque del Lago Maggiore è stata inoltre valutata mediante l'utilizzo del mollusco bioindicatore *Unio pictorum*. Sono stati effettuati studi esponendo direttamente i bivalvi per 28 giorni in diversi siti e sono stati valutati parametri fisiologici comprendenti biomarker di stress e di esposizione in cellule (emociti) e tessuti (branchie e ghiandola digestiva) dei molluschi. I dati ottenuti sono stati poi integrati mediante un Sistema Esperto ed è stato stabilito così il livello di stress raggiunto dagli organismi in seguito ad esposizione nei differenti siti.

Un'altra fase dell'attività di ricerca ha previsto la determinazione mediante approccio Triad del rischio ambientale di un corpo idrico superficiale lotico, Fosso Rigiolato, che raccoglie le acque di drenaggio di una miniera dismessa, Gavorrano, presente nel sud della Toscana e contaminata prevalentemente da metalli, quali ferro e manganese, e da solfati. Per analizzare l'impatto delle varie sostanze inorganiche sul biota del corpo idrico rappresentante il primo recettore delle acque di miniera è stata applicata un'ampia batteria di test ecotossicologici, atta a valutare sia la tossicità delle acque superficiali che dei sedimenti; inoltre è stata analizzata la struttura della comunità di macroinvertebrati bentonici mediante determinazione dell'indice biotico esteso (I.B.E.). I dati ecotossicologici ed ecologici sono stati integrati con i dati chimici mediante un Sistema Esperto di Supporto alle Decisioni (EDSS) precedentemente sviluppato nel nostro dipartimento; in tal modo è stato possibile ricavare l'indice di rischio ambientale di eco-vulnerabilità del corpo idrico superficiale Fosso Rigiolato.



### ***3. Materiali e metodi***

### 3.1. Test con il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri*

Il metodo presentato, utilizzato nei laboratori ARPA deriva dai seguenti riferimenti bibliografici:

- “Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti”, Notiziario dei metodi analitici, IRSA – CNR, ISSN:0392-1425, 1996.
- Metodo ISO 11348-1:1998. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent bacteria test) – Part 1: Method using freshly prepared bacteria. ISO, Geneva, Switzerland.
- Metodo ISO 11348-3:1998. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria. ISO, Geneva, Switzerland.
- Guzzella L., Mingazzini M., 1994. Biological assaying of organic compounds in surface waters. *Water Science and Technology* 30:113-124.

Il test prevede la valutazione della tossicità acuta di una matrice acquosa e/o estratti acquosi di matrici solide mediante determinazione dell'inibizione della bioluminescenza emessa da batteri gram negativi appartenenti alla specie *Vibrio fischeri*, ceppo NRRL-B-11177, inibizione che può essere causata dal contatto con agenti tossici. Il *Vibrio fischeri* è un batterio marino in grado di emettere luce di colore blu-verde con una lunghezza d'onda massima pari a 430nm, purché sia presente ossigeno. La sequenza di reazioni che provoca l'emissione di luce è associata alla catena respiratoria di trasporto di elettroni ed è catalizzata dall'enzima luciferasi (ossigenasi a funzione mista connessa alla membrana cellulare) per ossidare simultaneamente la luciferina (un'aldeide ciclica contenente più di otto atomi di carbonio) e la riboflavina 5-P. Il meccanismo chimico e cinetico della reazione bioluminescente è stato descritto da Hastings e Gibson nel 1963 (Hastings J.W. et Gibson L.H., 1963).

### Metodica

Il test per essere validato richiede l'utilizzo come controllo di laboratorio di una soluzione denominata Standard fresh water (SFW) costituita da 2% di NaCl, e come controllo negativo di una soluzione costituita da 3,5-diclorofenolo ( $C_6H_4Cl_2O$ ).

I campioni di acqua dolce da analizzare sono stati corretti osmoticamente con l'aggiunta di 2% di NaCl.

I ceppi batterici liofilizzati della specie *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 sono stati riattivati con 100µl di soluzione ricostituente per un periodo di 30 minuti alla temperatura di 4°C. Tali batteri sono stati successivamente diluiti in rapporto 1:5 con la SFW e incubati per altri 15' in uno dei pozzetti del lumenometro MICROTOX aventi temperatura costante di 15°C.

Per ogni replica in una provetta di vetro sono stati introdotti:

- 1ml di campione (nel caso del controllo 1ml di SFW mentre nel caso del controllo negativo 1ml di 3,5-diclorofenolo)
- 50µl di batteri

Dopo 15' di esposizione alla temperatura di 15°C è stata registrata la bioluminescenza emessa dai batteri mediante il lumenometro MICROTOX.

Il test di screening è considerato valido se l'inibizione indotta negli organismi esposti alla soluzione usata come controllo negativo ( $C_6H_4Cl_2O$ ) risulta > 50%.

### **3.2. Test con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata***

Il metodo presentato, utilizzato nei laboratori ARPA deriva dai seguenti riferimenti bibliografici:

- UNI EN ISO 692:2005. Prova di inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari.
- ISO 8692:2004. Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO, Geneva, Switzerland.
- OECD 201:2002. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Draft Revised Guideline, July 2002). OECD, Paris, France.
- USEPA OPPTS 850.5400:1996. Algal toxicity, Tiers I and II. US EPA, United States of America.

Il test valuta la tossicità cronica di un campione acquoso e/o estratti acquosi di matrici solide verificando l'inibizione percentuale della crescita di cellule della specie *Pseudokirchneriella subcapitata*.

### Metodica

Il test prevede l'utilizzo come controllo di laboratorio per la validazione del saggio di una soluzione standard derivante dall'unione di 4 soluzioni madre di Sali:

- soluzione 1: 1.5 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 1.2 g/l MgCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O, 1.8 g/l CaCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, 1.5 g/l MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, 0.16 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- soluzione 2: 64 mg/l FeCl<sub>3</sub> \* 6H<sub>2</sub>O, 100 mg/l Na<sub>2</sub>EDTA \* 2H<sub>2</sub>O
- soluzione 3: 185 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 415 mg/l MnCl<sub>2</sub> \* 4H<sub>2</sub>O, 3 mg/l ZnCl<sub>2</sub>, 1.5 mg/l CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O, 0.01 mg/l CuCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, 7 mg/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O
- soluzione 4: 50 g/l NaHCO<sub>3</sub>

Per 1 litro di soluzione di controllo occorrono:

- 10ml di soluzione 1
- 1ml di soluzione 2
- 1ml di soluzione 3
- 1ml di soluzione 4

Verificare che il pH rientri nel range 7.9-8.3.

Nei saggi sono state utilizzate colture algali di *Pseudokirchneriella subcapitata* in fase di crescita esponenziale (derivante da inoculo di 2-4 giorni).

Per ogni replica nella piastra multipozzetto sono stati introdotti:

- 2ml di campione (soluzione standard per il controllo);
- 20µl di inoculo algale con concentrazione di  $1 \cdot 10^6$  cell/ml

Per i campioni da testare sono stati inoltre aggiunti 26µl di una soluzione di sali concentrata costituita da:

- 20µl di soluzione 1
- 2µl di soluzione 2
- 2µl di soluzione 3
- 2µl di soluzione 4

L'incubazione è stata condotta per  $72 \pm 2$  ore in cella termostata a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  a luce continua ( $8000 \pm 2000$  lux). L'incremento algale è stato stimato mediante conta globuli ("camera di Burkner"). La densità cellulare del controllo dopo 72h deve essere almeno 67

volte superiore a quella iniziale pari a circa  $1 \cdot 10^4$  cell/ml affinché il test possa essere considerato valido.

### 3.3. Test con il crostaceo cladocero *Daphnia magna*

Il metodo applicato deriva dai seguenti riferimenti bibliografici:

- OECD 202:1984. *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test (Updated Guifrlinr, adepte 13<sup>th</sup> April 2004). OECD, Paris, France.
- ISO 6341:1996. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. ISO, Geneva, Switzerland.

Gli organismi di *Daphnia magna* per la conduzione degli allevamenti derivano da ephippi provenienti dal laboratorio “Biological Research an Aquatic Pollution LABRAP” di Ghent- Belgium.

Gli allevamenti vengono rinnovati annualmente.

Il test valuta la tossicità acuta di un campione acquoso e/o estratto acquoso di matrice solida considerando l’immobilizzazione di *Daphnia magna* dopo 24h di contatto.

#### Metodica

Come controllo di laboratorio, utilizzato per la validazione del saggio, è stata utilizzata la soluzione standard derivante dall’unione di 4 soluzioni madre:

- 11.76 g/l di  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 4.93 g/l di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 2.59 g/l di  $\text{NaHCO}_3$
- 0.23 g/l di KCl.

Sono stati prelevati 25ml da ciascuna delle 4 soluzioni madre e sono stati portati a volume di 1litro. Se necessario si aggiusta il pH a  $7.8 \pm 0.2$  con l’impiego di soluzioni di NaOH o HCl.

La soluzione così ottenuta deve rispondere ai seguenti requisiti:

- pH  $7.8 \pm 0,2$
- durezza totale 250 mg/l + 25 mg/l (espressa come  $\text{CaCO}_3$ )
- rapporto molare Ca/Mg prossimo a 4:1
- concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 7mg/l

Nei saggi sono stati utilizzati organismi di *Daphnia magna* di età inferiore alle 24 ore corrispondenti almeno alla terza generazione (utilizzare daphnidi da madri di almeno 21 giorni).

Per ogni replica nel cristallizzatore sono introdotti:

-50ml di campione da analizzare

-10 daphnidi

L'incubazione viene condotta per 24 ore in stanza termostata a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . con fotoperiodo di 16 ore di luce (circa. 1000 lux) e 8 ore di buio.

Al termine del periodo di esposizione i contenitori sono stati sottoposti a leggera agitazione e sono stati contati gli organismi immobili; sono stati ritenuti tali quelli incapaci di effettuare spostamenti entro 15 secondi anche se riescono ancora a muovere le antenne. Il saggio deve essere ripetuto se nel controllo gli organismi immobili risultano superiori al 10%.

### **3.4. Test con l'oligochete bentonico *Lumbriculus variegatus***

Il metodo utilizzato deriva dal seguente riferimento: OECD, 2006. Guideline for testing of chemicals. Sediment-water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.

Gli esperimenti condotti per valutare la vitalità di *L. variegatus*, esposto ai sedimenti del Lago Maggiore, sono stati effettuati in 5 repliche per sedimento.

#### Sincronizzazione:

1. per ciascuna replica, sono stati scelti 10 individui adulti non danneggiati;
2. gli organismi sono stati posti su un vetrino o su una piastra Petri con una goccia d'acqua di coltura e tagliati a metà con un bisturi;
3. la parte posteriore degli animali è stata trasferita in un contenitore contenente acqua di coltura;
4. trascorsi 10-14 giorni necessari per la rigenerazione, i vermi rigenerati della stessa taglia e attivi sono stati utilizzati per il test.

#### Metodica

La durata del test è stata di 28 giorni. Per il test sono stati utilizzati dei becker di vetro Pyrex da 250 ml con 6cm di diametro al cui interno lo strato di sedimento deve essere di 2cm e il rapporto sedimento: acqua di 1:4. Sono stati adoperati sistemi statici, senza cambio dell'acqua, con areatore. Il pH dell'acqua superficiale deve essere compreso tra 6 e 9, la temperatura necessaria è di circa  $20^\circ\text{C}$ , il fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Il cibo (*Urtica dioica*) è stato fornito prima dell'aggiunta del sedimento.

Al termine dell'incubazione, gli animali sono stati recuperati dal sedimento con una pipetta pasteur. Sono stati quindi contati gli animali vivi. Gli organismi vengono considerati morti quando presentano segni di decomposizione e non reagiscono a stimoli meccanici.

### **3.5. *Dictyostelium discoideum***

#### **3.5.1. Coltura di *Dictyostelium discoideum* e riproducibilità del ciclo di sviluppo in laboratorio**

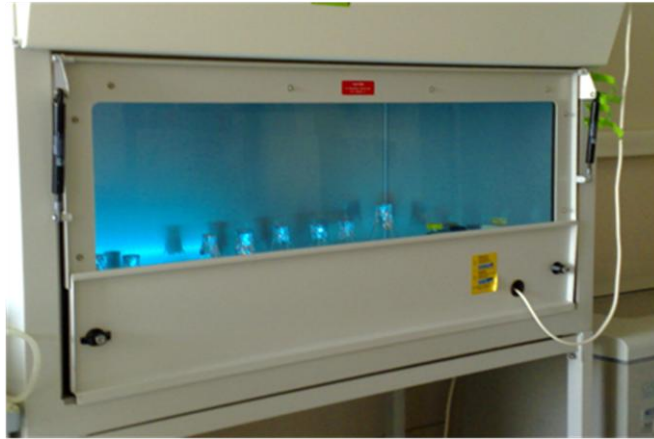
In condizioni sperimentali di laboratorio è possibile riprodurre le due fasi del ciclo di sviluppo di *Dictyostelium discoideum*:

- la prima, nota come fase moltiplicativa, è inducibile allevando le amebe, sottoforma di cellule isolate (myxamoebae), in un mezzo di coltura axenico (denominato terreno AX-2) che ne permette la riproduzione asessuale per scissione binaria al fine di ottenere una popolazione numerosa;
- la seconda, indicata come fase differenziativa, è inducibile allevando le myxamoebae su piastre d'agar e prevede la loro aggregazione, in seguito ad esaurimento delle risorse nutritive, a formare il corpo fruttifero, costituito dalle cellule dello stelo e dalle spore, differenti sia per morfogenesi che per capacità di sviluppo.

#### **3.5.2. Allevamento di *Dictyostelium discoideum* in brodo di coltura AX-2 MEDIUM**

In condizioni di sterilità (utilizzando una cappa laminare a flusso sterile, fig.1) sono stati posti in una beuta (sterilizzata in stufa a 180°) con capacità pari a 100ml:

- 30ml di AX-2 MEDIUM (terreno di coltura)
- 120µl (4µl/ml) di tetraciclina (2.5mg/ml in etanolo 96%) che previene eventuali contaminazioni e non interferisce con il ciclo vitale dei protozoi, secondo il metodo modificato di Watts e Ashworth (1970) (Swan et al., 1977)
- un ottavo dei corpi fruttiferi prelevati mediante anse sterili da una piastra Petri (9cm di diametro) contenente Agar N.



**Fig.1. Cappa laminare a flusso sterile.**

Le beute contenenti le cellule sono state poste in un incubatore orbitale (Sanyo Gallenkamp, Plc. Loughborough, UK; fig.2) e mantenute in agitazione ad una velocità di rotazione di 180rpm (*revolution per minute* – giri al minuto) e ad una temperatura ottimale per la loro crescita, ossia 21°C.

Le cellule devono raggiungere una concentrazione pari a  $2-3 \times 10^6$  cells/ml corrispondente alla fase logaritmica di crescita; se tale valore viene superato occorre effettuare opportune diluizioni.



**Fig.2. Incubatore orbitale (Gallenkamp).**



### 3.5.3. Il mezzo di coltura AX-2

Il terreno di coltura in cui viene fatto crescere il *Dictyostelium discoideum* è denominato AX-2 MEDIUM ed è costituito da:

<b>Peptone</b>	14,3g/l
<b>Estratto di lievito</b>	7,15g/l
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> oppure Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0,491g/l
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,486g/l
<b>Maltosio</b>	18g/l

Il volume è portato ad 1l con H<sub>2</sub>O milliQ e il pH deve essere 6.5-6.7.

Il terreno AX-2 ha la capacità di inibire l'aggregazione cellulare nella fase logaritmica di crescita (Swan et al., 1977); essa può avvenire trasferendo le cellule su una piastra priva di batteri.

La crescita delle amebe avviene con ritmo duplicativo di circa 8 ore e necessita che il mezzo di coltura venga precedentemente autoclavato (121°C per 15 minuti) (Schwalb et Roth, 1970).

### 3.5.4. Preparazione della soluzione fisiologica PAS

La soluzione fisiologica PAS (*Page's amoebae saline solution*) è stata preparata aggiungendo 5ml di “soluzione 1” a 5ml di “soluzione 2”, portando il volume ad 1l con H<sub>2</sub>O milliQ.

La “soluzione 1” contiene in ½l di H<sub>2</sub>O milliQ:

<b>NaCl</b>	12g
<b>MgSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O</b>	0,4g
<b>CaCl<sub>2</sub>*6H<sub>2</sub>O</b>	0,6g

La “soluzione 2” contiene in ½l di H<sub>2</sub>O milliQ:

<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	14,2g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	13,6g

Il pH finale deve essere compreso tra 6 e 8 e la soluzione ottenuta è stata autoclavata (121°C per 15 minuti).

### 3.5.5. Preparazione del terreno Agar N

Il terreno Agar N è stato preparato utilizzando un tampone fosfato Sorensen 1X (17mM, pH 6) ottenuto diluendo Sorensen 50X; quest'ultimo è composto da:

<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	24,965g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro oppure Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>*2H<sub>2</sub>O</b>	3,550g  4,45g

Il volume è portato a 250ml con H<sub>2</sub>O milliQ.

20ml di Sorensen 50X portato a 1000ml di volume con H<sub>2</sub>O milliQ costituiscono il Sorensen 1X.

Nella soluzione Sorensen 1X sono sciolti:

<b>Agar difco</b>	20g/l
<b>Glucosio</b>	1g/l
<b>Peptone</b>	1g/l

Il terreno così preparato è stato trasferito in autoclave e sterilizzato a 121°C per 15' e successivamente 25ml sono stati posti in capsule Petri (9cm di diametro) sotto cappa laminare a flusso sterile e lasciati raffreddare. Le capsule sono poi state chiuse con una pellicola (*parafilm*) e conservate in frigorifero a 4°C capovolte.

### 3.5.6. Allevamento su piastra di *Dictyostelium discoideum*

In laboratorio le amebe possono essere allevate su piastra priva di nutrienti in modo da indurre la transizione dalla fase vegetativa a quella differenziativa che culmina con la formazione del corpo fruttifero. Le piastre possono essere conservate a 4°C per alcuni mesi e pertanto si ottiene in questo modo una riserva di *D.discoideum* oltre che una verifica delle qualità delle colture in mezzo AX-2.

Le cellule sono state seminate su piastre di Agar N contenenti un monostrato batterico di *E.coli* (ceppo B2) per evitare che la totale mancanza di nutrienti all'inizio della fase di differenziamento cellulare possa determinare uno stress fisiologico tale da influire negativamente sullo sviluppo delle stesse (Marin, 1976). Quando i batteri sono stati tutti

consumati, le amebe iniziano la fase di aggregazione e passano attraverso gli stadi tipici dello sviluppo.

Sulle suddette piastre, sotto cappa a flusso, sono state trasferite 6 gocce da 40µl di coltura AX-2, con densità di  $2-3 \cdot 10^6$  cells/ml controllando che le cellule fossero omogeneamente sospese nel brodo e distribuendo le gocce uniformemente sull'agar. Le piastre seminate sono state incubate in camera umida a temperatura ambiente, circa 22/25°C, per 3 giorni (Swan et al., 1977). Al termine dello sviluppo, le piastre sono state chiuse con il parafilm e conservate a 4°C capovolte.

### 3.5.7. Allevamento di *Escherichia coli* in brodo di coltura LB

Il brodo di coltura Luria Bertani (LB) (Luria et al., 1955; Lennox et al., 1955; Luria et al., 1960) è il terreno di coltura standard utilizzato per *E.coli* ed è stato ottenuto sciogliendo in 1000ml di H<sub>2</sub>O milliQ:

<b>Tryptone</b>	10g/l
<b>Estratto di lievito</b>	5g/l
<b>NaCl</b>	10g/l

Il brodo viene successivamente autoclavato a 121°C per 15' e conservato a temperatura ambiente.

Il ceppo B2 di *E.coli* è stato inoculato, mediante ansa sterile, in provette (*falcon*) da 15ml contenenti 3ml di brodo, e la coltura è stata fatta crescere per una notte in agitazione costante (210rpm) a 37°C.

### 3.5.8. Allevamento di *Escherichia coli* su piastra

Sono stati prelevati 70µl di coltura di *E.coli* B2 cresciuta in brodo di coltura e seminati sulle piastre di terreno Agar N. Mediante ansa ad L sterile, i batteri sono stati distribuiti sul substrato in modo da ottenere un monostrato uniforme, importante per avere una crescita di *D.discoideum* omogenea e ottavi di piastra da seminare in AX-2 equivalenti tra loro. Le piastre sono state lasciate in incubazione per una notte e dopo essere state chiuse con il parafilm sono state conservate a 4°C capovolte.

### 3.5.9. Preparazione dell'acqua interstiziale da sedimento

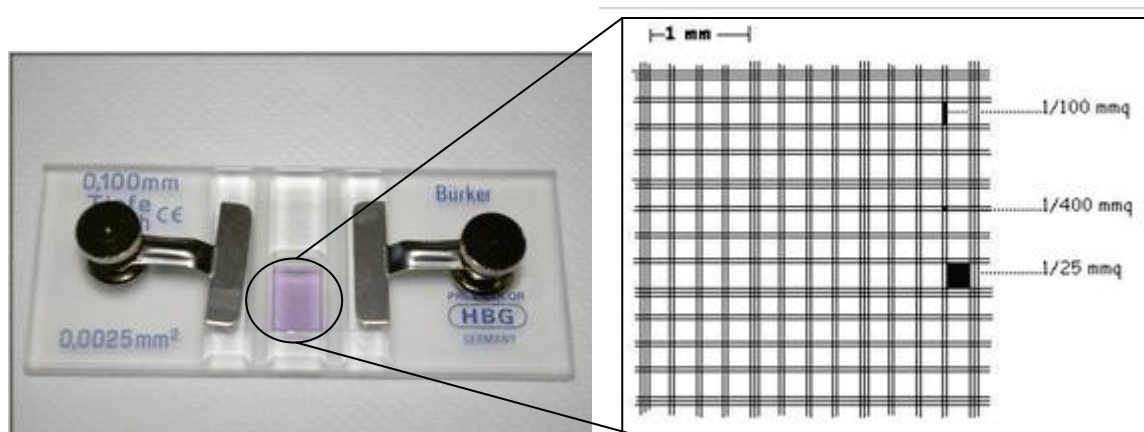
I sedimenti prelevati nel Lago Maggiore sono stati centrifugati a 3000rpm per 30' a 4°C per ottenere l'acqua interstiziale, in accordo con la metodica descritta da APAT 2002 (RTI CTN\_SSC 2/2002).

La fase liquida ottenuta è aliquotata e stoccata a -20°C fino all'analisi.

### 3.5.10. Preparazione delle crescite di *Dictyostelium discoideum*

La quantità di cellule idonea per i test, per 4ml di campione da analizzare (25% AX2 medium + 75% PAS o campione), è di  $3 \cdot 10^6$  cellule ( $0,75 \cdot 10^6$  cells/ml). Il monitoraggio della crescita delle cellule si esegue prelevando dalle colture aliquote da 10 $\mu$ l e contando il numero delle cellule poste su apposita camera di conteggio o camera di Burker (fig. 3).

In base al numero dei campioni da analizzare, si preleva la quantità necessaria dal mezzo di coltura contenente le cellule, e si centrifuga a 500g, per 5' a 4°C. Si ottiene, così, la quantità di cellule da utilizzare nei test.



**Fig.3.** Camera di conteggio o *camera di Burker*. Sulla superficie della camera ci sono 2 zone, ognuna è incisa da linee che formano un reticolo. Questo riquadro è formato da  $3 \cdot 3 = 9$  quadrati, ciascuno è poi suddiviso in  $4 \cdot 4 = 16$  quadratini. Il riquadro corrisponde ad un volume di  $0,1 \mu$ l. Il valore ottenuto va trasformato in n° di cellule al ml, ovvero moltiplicato per  $10^4$ . Si contano le cellule che si trovano all'interno di un riquadro individuato da margini con tripla linea.

### 3.5.11. Incubazione di *Dictyostelium discoideum*

Le cellule sono state risospese nel campione da analizzare (acqua interstiziale) o in PAS addizionata del contaminante (25% AX2 medium + 75% PAS o campione) e incubate in condizioni controllate (temperatura 21°C e agitazione di 180rpm) per 3h oppure 24h. Nello studio effettuato in questo lavoro di ricerca sono stati utilizzati come inquinanti il mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) alla concentrazione di 7.8ppm e una miscela, denominata DDX (solubilizzata con una quantità di DMSO pari allo 0.5%), con concentrazione finale di 732,5ppb e costituita da:

- 4,4-DDT alla concentrazione di 23,43ppb
- 4,4-DDD alla concentrazione di 535,07ppb
- 4,4-DDE alla concentrazione di 174,00ppb

Le concentrazioni utilizzate fanno riferimento a quelle riscontrate, mediante analisi chimiche, nel sedimento contaminato del Lago Maggiore oggetto di studio.

### 3.5.12. I test biologici

Di seguito sono riportate le metodiche dei test utilizzati per valutare gli effetti tossici dell'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti e dei contaminanti DDX e Hg<sup>2+</sup> sull'ameba sociale *Dictyostelium discoideum*

#### 3.5.12.1. Mortalità cellulare

##### Principio del metodo

Questo test, eseguito in accordo con il metodo descritto da Dondero et al. (2006), permette di stimare quantitativamente il numero di cellule che muoiono come conseguenza dell'effetto tossico degli inquinanti: più quest'ultimo è marcato e maggiore sarà il tasso di mortalità cellulare. Come sonda si utilizza il SYBR Green™ (Sigma-Aldrich) che si lega selettivamente agli acidi nucleici delle cellule morte di *Dictyostelium discoideum*: solo le cellule morte lo assorbono, a differenza di quelle vive che hanno le membrane biologiche intatte. L'assorbimento del SYBR Green™ da parte dei nuclei delle cellule morte fa sì che esse emettano una fluorescenza verde visibile mediante l'utilizzo di microscopio a fluorescenza e FITC. I risultati vengono espressi in grafico come % di cellule vive per ciascun campione.

##### Metodica

Dopo aver incubato le cellule con il campione in esame in condizioni standard (180rpm, 21°C), sono stati prelevati 100µl per ogni campione e si trasferiti in una eppendorf da 1,5ml. E' stata effettuata una centrifugata a 500g per 5' (RT) in modo da eliminare il terreno di coltura, altamente fluorescente. Dopo la prima centrifuga, il surnatante è stato rimosso e il pellet risospeso in 100µl di PAS per effettuare un lavaggio; è stata effettuata un'ulteriore centrifugata a 500g per 5' (RT).

Nel frattempo è stata preparata la soluzione di SYBR Green: 1µl SYBR Green stock solution (concentrazione: 10.000X, mantenuto a - 20°C) in 10ml di PAS.

E' stato rimosso il surnatante e risospeso il pellet in 100µl di SYBR Green/PAS work solution (l'importante è mantenere sempre il rapporto di volume 1:1 tra la quantità di campione messo in eppendorf all'inizio e la quantità di SYBR Green per avere una concentrazione di cellule appropriata per l'analisi). Sono stati prelevati 40µl di ogni campione e messi su un vetrino coprioggetto per l'analisi, lasciando aderire le cellule per

almeno 10' in camera umida alla temperatura di  $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Subito dopo si è proceduto con l'acquisizione delle immagini utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: FITC, obiettivo 200×).

Per ogni singola immagine è stato contato il numero di cellule totali e il numero di cellule morte (le uniche fluorescenti) ed è stato calcolato il rapporto percentuale.

### **3.5.12.2. Tasso di replicazione**

#### Principio del metodo

La crescita cellulare può essere definita come l'incremento numerico di individui nell'ambito di una popolazione. Mediante tale processo la cellula si divide generando due cellule figlie che ricevono ciascuna una copia del DNA della cellula genitrice. L'accrescimento e la divisione cellulare sono influenzati da numerosi fattori: disponibilità di fonti di carbonio e di energia, capacità del DNA di replicarsi, dimensioni e massa delle cellule e, naturalmente effetti di agenti di natura fisica e chimica (T, pH e forza ionica) presenti nell'ambiente. I protozoi destinati a tale esperimento vengono prelevati routinariamente al terzo giorno di crescita, cioè durante la fase di crescita logaritmica, momento nel quale la divisione cellulare è mantenuta ad un ritmo costante e massimale. Durante la fase logaritmica (detta anche fase esponenziale) il ritmo di crescita o tempo di raddoppiamento è costante. *Dictyostelium discoideum*, in condizioni ottimali di crescita ha un tempo di raddoppiamento di 8h e arriva con circa  $1 \cdot 10^7$  cell/ml al plateau della curva di crescita.

#### Metodica

Il procedimento ha previsto la conta ai tempi 0h e 24h delle amebe incubate nelle acque interstiziali dei siti in esame e con gli inquinanti. Il numero di microrganismi è stato stabilito per osservazione diretta al microscopio grazie all'impiego di una particolare camera di conteggio o camera di Burker. Sono state contate le cellule che si osservano all'interno del reticolo impresso sulla camera di Burker; il numero ottenuto è stato rapportato al valore volumetrico della camera.

### 3.5.12.3. Tasso di endocitosi

#### Principio del metodo

Mediante il processo di endocitosi le cellule eucariotiche possono assumere materiale corpuscolato dall'ambiente esterno. La superficie cellulare si invagina per formare una piccola tasca delimitata dalla plasmamembrana; questa progressivamente si approfonda nel citoplasma, sino a perdere ogni connessione con la membrana plasmatica. Si forma in tal modo una vescicola, contenente il materiale corpuscolato, delimitata da una porzione della plasmamembrana che migra verso l'interno della cellula. L'endocitosi riveste particolare importanza perché le plasmamembrane coinvolte in tale fenomeno rappresentano il primo possibile bersaglio degli inquinanti ambientali. Inoltre, il complesso fenomeno dell'endocitosi, per potersi realizzare correttamente, necessita di una corretta organizzazione della membrana e del citoscheletro, di un corretto apporto di ATP (funzione mitocondriale) e di un'opportuna variazione del calcio citosolico. Pertanto, le alterazioni metaboliche dei più importanti parametri fisiologici delle cellule possono fortemente influire su questo importante indice di stress. Il tasso di endocitosi viene valutato quantificando il tasso di assunzione di molecole fluorescenti quali Bioparticles (lieviti e batteri) (Dondero et al., 2006).

#### Metodica

Dopo aver incubato le cellule in condizioni controllate di laboratorio (180rpm, 21°C), sono stati prelevati 40µl di liquido di coltura contenente le cellule e depositati su un coprioggetto (2 gocce).

Le cellule sono state fatte aderire al vetrino coprioggetto mantenendolo per 10' in camera umida alla temperatura di  $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

E' stata preparata nel frattempo la soluzione di batteri *Escherichia coli* (1:100); gli *E.coli* sono stati prelevati dalla soluzione madre.

**Soluzione madre:** *Escherichia coli* (K-12 strain) Bioparticles Fluorescent Particles: BODIPY® FL conjugate (Molecular probes 2864); 10mg; Abs/Em maxima= 505/513nm)

E' stato effettuato un lavaggio del vetrino con 40µL di PAS e dopo di ché sono stati depositati 40µl di Bioparticles diluito e si è lasciato il vetrino per 15' in camera umida al buio.



Sono stati effettuati due lavaggi con 40µl di PAS e depositati 40µl di paraformaldeide 3.7% sul campione, lasciando il vetrino per 15' in camera umida al buio.

Dopo tre lavaggi con 40µl di PAS sono stati addizionati 40µl di PAS sul campione e si è proceduto alla osservazione del vetrino.

Le cellule presenti sui vetrini sono state osservate al microscopio (Zeiss Axiovert 100 M, fig.3) utilizzando il canale della fluorescenza (filtro FITC), con un obiettivo 400×. Le immagini sono state salvate ed analizzate mediante il sistema di analisi d'immagine (NIH Image- Scion Image, software version 1.59) che permette la quantificazione del tasso di endocitosi.

#### **3.5.12.4. Stabilità membrane lisosomiali**

##### Principio del metodo

Come noto, le cellule eucariote rispondono agli inquinanti attraverso una serie di alterazioni che coinvolgono sia la membrana plasmatica sia l'attività di diversi compartimenti intracellulari. Un componente subcellulare che si è dimostrato molto sensibile agli inquinanti è il sistema vacuolare lisosomiale. I lisosomi hanno assunto un notevole interesse in ambito ecotossicologico poiché rappresentano il target di un ampio range di contaminanti; inoltre, sono presenti in tutte le cellule nucleate, e quindi non sono specie-specifici (Viarengo et al., 2007). I lisosomi contengono numerosi enzimi idrolitici coinvolti in diversi processi cellulari tra cui degradazione di macromolecole cellulari ed extracellulari (Moore, 1976; Pipe, 1993). Un aumento dell'attività catabolica lisosomiale e del danno lisosomiale può causare, come effetto estremo, il rilascio di enzimi idrolitici lisosomiali nel citosol che possono portare alla necrosi cellulare. Come ottimo indicatore del danno indotto da inquinanti alle membrane lisosomiali, la stabilità delle membrane lisosomiali rappresenta uno dei biomarker più applicati in studi di campo utilizzando "organismi sentinella" quali ad esempio mitili, ostriche e pesci (Lowe et al., 1995; Köhler et al., 2002; Ringwood et al., 2002). La riduzione della stabilità delle membrane lisosomiali viene considerato quale indice di stress fisiologico generale, che permette di seguire l'evoluzione della sindrome di stress negli animali dalle prime fasi allo sviluppo di condizioni patologiche (Moore, 1988).

### Metodica

Dopo incubazione delle cellule in condizioni controllate di laboratorio (180rpm, 21°C), sono stati posti 40µl di campione su un vetrino coprioggetto (2 gocce) per l'analisi, lasciando aderire per almeno 10' in camera umida alla temperatura di 21° ± 1°C.

Nel frattempo è stata diluita la soluzione madre di *Neutral Red (NR)*, costituita da 20mg di NR in 1ml di DMSO (dimetilsolfossido), nella proporzione 1:800. Dopo aver scolato il vetrino per togliere il terreno in eccesso, è stato effettuato un lavaggio con 40µl di PAS.

Successivamente le cellule sono state poste a contatto con 40µl di NR per 3' in camera umida.

L'eccesso di NR è stato eliminato e sono stati effettuati 3 lavaggi con 40µl di PAS per rimuovere il NR non incorporato e sono stati lasciati i vetrini in camera umida per 1h.

I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 630× utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: rodamina). Le immagini sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine (Scion image freeware), che ha permesso di quantificare il rilascio del NR dai lisosomi, che è stato espresso come variazione % di intensità di fluorescenza rispetto ai controlli.

### **3.5.12.5. Determinazione della funzionalità mitocondriale**

#### Principio del metodo

La funzionalità dei mitocondri, responsabili principalmente della produzione di energia (ATP) necessaria per molte funzioni cellulari (processi di sintesi, trasporto attivo, movimento, contrazione etc.), può diminuire in seguito all'esposizione a sostanze tossiche. In commercio è disponibile una sonda fluorescente denominata MitoTracker che penetra nei mitocondri permettendo la valutazione della funzionalità di questi importanti organelli cellulari.

#### Metodica

Dopo incubazione delle cellule in condizioni standard (180 rpm, 21°C), su un coprioggetto sono posti 40 µl di soluzione contenente cellule di *D. discoideum*; le cellule sono lasciate aderire per 10 min in camera umida alla temperatura di 21° ± 1°C. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono aggiunti 40 µl della soluzione della sonda fluorescente MitoTracker (1:20.000). Dopo l'incubazione in camera umida al buio per 5 min a 21° ± 1°C, l'eccesso di sonda è eliminato e le cellule sono risciacquate con PAS. I coprioggetto

sono osservati ad un ingrandimento di 400× utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: FITC). Le immagini sono analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine che permette di quantificare il livello di fluorescenza cellulare relativo all'attività mitocondriale.

### **3.5.12.6. Determinazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)**

#### Principio del metodo

Le specie reattive dell'ossigeno (anione superossido  $O_2^{\cdot-}$ , radicale idrossidrilico  $\cdot OH$ , perossido d'idrogeno  $H_2O_2$ , perossinitrito  $ONOO^-$ ) sono in grado di produrre danni ossidativi a macromolecole quali proteine, acidi nucleici e lipidi, e possono provocare danni a diversi organelli cellulari (Sabatini et al., 2009). La determinazione dei ROS si avvale dell'utilizzo di specifiche sonde fluorescenti: la diidrorodamina (DHR) 123 per la rilevazione di perossido d'idrogeno e perossinitrito, la sonda TEMPO-9-AC per l'anione superossido e radicale idrossile.

#### Metodica

Dopo incubazione delle cellule in condizioni standard (180 rpm, 21°C), su un coprioggetto sono stati posti 40µl di soluzione contenente cellule di *D. discoideum*; le cellule sono state lasciate aderire per 10' in camera umida alla temperatura di 21° ± 1°C. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono aggiunti 40µl della soluzione delle sonde i) TEMPO, specifica per la rilevazione dei radicali idrossile e superossido (1:500), ii) diidrorodamina (DHR) 123, in grado di evidenziare la generazione di perossido di idrogeno e perossinitrito (1:1000). Dopo l'incubazione in camera umida al buio per 3' a 21° ± 1°C, l'eccesso di sonda è stato eliminato e le cellule sono state risciacquate con PAS. I coprioggetto sono stati osservati ad un ingrandimento di 400× utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: FITC). Le immagini sono state analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine che permette di quantificare il livello di fluorescenza cellulare.

### **3.5.12.7. Determinazione della formazione di lipoperossidi**

#### Principio del metodo

Uno degli effetti più noti dei ROS è la perossidazione dei lipidi di membrana (Viarengo, 1989) con conseguente produzione di lipoperossidi, danno alle membrane cellulari e variazione della loro permeabilità.

#### Metodica

Dopo incubazione delle cellule in condizioni standard (180 rpm, 21°C), su un coprioggetto sono stati posti 40µl di soluzione contenente cellule di *D. discoideum*; le cellule sono state lasciate aderire per 10' in camera umida alla temperatura di 21° ± 1°C. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono stati aggiunti 40µl della soluzione della sonda BODIPY specifica per lipoperossidi (diluizione 1:1000). Dopo l'incubazione in camera umida al buio per 3' a 21° ± 1°C, l'eccesso di sonda è stato eliminato e le cellule sono state risciacquate con PAS. I coprioggetto sono stati osservati ad un ingrandimento di 400× utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: FITC). Le immagini sono analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine che permette di quantificare il livello di fluorescenza cellulare.

### 3.5.12.8. Determinazione del contenuto di lipofuscine

#### Principio del metodo

Le lipofuscine sono pigmenti che si accumulano nei lisosomi come prodotti finali della perossidazione delle membrane lipidiche e presentano la caratteristica di non essere degradabili dalle idrolasi lisosomiali. La maggior parte dei granuli di lipofuscine è costituito da proteine modificate per danno ossidativo e da prodotti di degradazione dei lipidi, insieme a carboidrati e metalli (George et Viarengo, 1985; Viarengo et Nott, 1993; Terman et Brunk, 2004). L'accumulo di questi pigmenti nei lisosomi rappresenta un'indicazione del livello di stress ossidativo nelle cellule ed è legato, principalmente, al livello di perossidazione dei lipidi di membrana (Viarengo et Nott, 1993; Moore et Allen, 2002; Bocchetti et al., 2006; Viarengo et al., 2007).

#### Metodica

Dopo incubazione delle cellule in condizioni standard (180 rpm, 21°C), su un coprioggetto sono stati posti 40µl di soluzione contenente cellule di *D. discoideum*; le cellule sono state lasciate aderire per 10' in camera umida alla temperatura di 21° ± 1°C. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, le cellule sono state fissate in calcio-formolo per 5' a 4°C, risciacquate in acqua MilliQ e poste nel mezzo contenente cloruro di ferro 1% e potassio ferrocianuro 1% in rapporto 3:1 per 5' (Moore, 1988). Successivamente i coprioggetto vengono lavati in acido acetico all'1% per 30'', risciacquati con acqua, e montati con gelatina glicerinata. I vetrini sono osservati ad un ingrandimento di 630× utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in luce trasmessa. Le cellule vengono analizzate mediante un sistema di analisi di immagine al microscopio ottico per la determinazione della percentuale di colorazione dei lisosomi dovuta all'accumulo di lipofuscine.

### 3.5.12.9. Contenuto di glutatione

#### Principio del metodo

Il glutatione è un tripeptide costituito da cisteina, acido glutammico e glicina; ha un ruolo cruciale per la proliferazione cellulare, la progressione del ciclo cellulare e nell'apoptosi (Poot et al., 1995; Schnelldorfer et al., 2000) e in qualità di forte antiossidante ha un'azione molto rilevante contro i radicali liberi e quindi nel contrastare i meccanismi dello stress ossidativo cellulare. La sua concentrazione cellulare diminuisce pertanto in presenza di ROS e può essere quantificata mediante l'utilizzo di una sonda fluorescente specifica.

#### Metodica

Livelli di GSH cellulare sono stati analizzati utilizzando 5-chloromethylfluorescein diacetato (CMFDA, Invitrogen). La sospensione cellulare è stata posta su vetrini coprioggetto e lasciata aderire per 10' in una camera umida a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Le cellule sono state poi incubate con CMFDA. Dopo 3', la sonda in eccesso è stata rimossa e le cellule sono state lavate con PAS. I vetrini sono stati visualizzati utilizzando un obiettivo 400x e filtro per le emissioni FITC di un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) attrezzato per microscopia a fluorescenza. Le immagini sono state analizzate usando un sistema di analisi di immagine che permesso la quantificazione del contenuto GSH, espresso come variazione percentuale di intensità di fluorescenza rispetto ai controlli.

### **3.5.12.10. Comet Assay in soluzione alcalina: metodo standard e con enzimi endonucleasi III e formamido pirimidin glicosilasi**

#### Principio del metodo

Il Comet Assay è una tecnica sensibile e rapida per la quantificazione dei danni al DNA in singole cellule. Östling e Johanson hanno sviluppato questa tecnica nel 1984, successivamente modificata da Singh et al., nel 1988. L'immagine che si ottiene assomiglia ad una "cometa" con una testa distinta e la coda. La testa è composta da DNA intatto, mentre la coda è dovuta a rotture sul singolo filamento o doppio filamento di DNA ed è quindi costituita da frammenti di DNA. La quantità di DNA rilasciato dalla testa della cometa è direttamente proporzionale alla quantità di danni al DNA. Il Comet assay può essere utilizzato per rilevare danni al DNA causati da rotture del doppio filamento, singolo filamento, siti alcali labili, e cross-linking del DNA con il DNA o proteine.

Una versione del Comet assay modificata per rilevare il danno ossidativo al DNA è stata messa a punto da Collins et al. (1993) e si avvale di enzimi quali formamido-pirimidin glicosilasi (FPG) ed endonucleasi III (ENDO III). L'FPG riconosce specificamente e sottopone a clivaggio le basi puriniche ossidate del DNA, in particolare le 8-oxoguanine, producendo siti apurinici (Dušinská et Collins, 1996). Questi a loro volta sono convertiti in rotture del filamento, grazie all'attività endonucleasica associata all'enzima. La endonucleasi III converte in rotture del filamento i siti in cui sono presenti pirimidine ossidate (Collins et al., 1993).

#### Metodica

La procedura di esecuzione del Comet assay modificato mediante l'uso degli enzimi FPG ed ENDO III è del tutto analoga a quella del test convenzionale, con l'unica differenza che la migrazione elettroforetica del lisato è preceduta dall'incubazione di quest'ultimo con l'enzima in oggetto.

Dopo incubazione delle cellule di *Dictyostelium discoideum* in condizioni standard (180rpm, 21°C), sono stati posti in una eppendorf 50µL di agarosio low melting point (0.9% in PAS, mantenuto alla temperatura di 40°C mediante termoblocco) e 50µL di campione (con una concentrazione cellulare di  $2,5 \cdot 10^6$  cell/ml) e distribuiti poi su vetrini precedentemente preparati con Normal Melting Agarose 1% in PBS.

I vetrini sono stati coperti con coprioggetto e mantenuti a 4°C per 15' in modo da permettere la solidificazione dell'agarosio. Successivamente sono stati aggiunti 70µL di

agarosio (LMA) mantenuto a 40°C, sono stati coperti nuovamente i vetrini con un coprioggetto e posti a 4°C per 20'. Sono stati incubati i vetrini in una soluzione di lisi a 4°C per 30' al buio e dopo di che immersi in un buffer alcalino (pH>13) per 5' a temperatura ambiente (RT).

La metodica messa a punto sulle cellule di *Dictyostelium discoideum* prevede l'incubazione delle cellule con EndoIII (diluizione 1:4000) e con FPG (diluizione 1:10000) per 5', dopo aver effettuato 3 sciacqui da 3' con il buffer per endonucleasi e FPG.

Si è proceduto con l'elettroforesi, posizionando i vetrini in una cella elettroforetica riempita con soluzione alcalina e impostando i seguenti parametri di corsa: 150mA per 5'.

Al termine della corsa elettroforetica i vetrini sono stati scolati dall'eccesso di soluzione alcalina diluita, lavati con PBS per 5' e fissati in etanolo 70% per ulteriori 5'. La colorazione è avvenuta con DAPI (1:15000 in PAS) per 5' e l'acquisizione delle immagini è stata effettuata con microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) con i seguenti parametri: obiettivo 630×, filtro DAPI. Le immagini acquisite sono state analizzate utilizzando il software di analisi d'immagine Comet Score freeware (TriTek Comet Score™). Il programma fornisce numerosi parametri e quello preso in considerazione nelle nostre analisi è il contenuto % di DNA nella coda.



### 3.5.12.11. Valutazione della frequenza dei micronuclei

#### Principio del metodo

I micronuclei si formano quando le cellule falliscono l'incorporazione di cromosomi o frammenti di questi, nei nuclei figli durante il processo di divisione cellulare (Heddle et al., 1973; Fenech, 2000). Cromosomi e/o frammenti di cromosomi vengono incorporati in piccoli nuclei addizionali, dove rimangono nel citoplasma per tutta la durata di vita della cellula. La presenza di micronuclei è un indicatore di rottura a livello cromosomiale che può essere causata da agenti blastogenetici o disfunzioni del fuso causate da composti tossici.

#### Metodica

Dopo incubazione delle cellule in condizioni standard (180 rpm, 21°C), su un coprioggetto sono stati posti 40µl di soluzione contenente cellule di *D. discoideum*; le cellule sono state lasciate aderire per 10' in camera umida alla temperatura di 21° ± 1°C. E' stato effettuato un lavaggio con 40µl di PAS e sono stati aggiunti 40µl di paraformaldeide 4%, lasciando per 10' in camera umida a 21° ± 1°C. Sono stati effettuati 3 lavaggi con la PAS e i coprioggetto sono stati messi ad asciugare sotto cappa. Si possono conservare a -20°C sino alla fase di colorazione. La colorazione è stata effettuata utilizzando il colorante fluorescente DAPI. Dopo un lavaggio con PAS è stata posta qualche goccia di montante sui coprioggetto e ad ognuno un vetrino è stato fatto aderire. I vetrini sono stati conservati a 4°C sino al momento dell'analisi che avviene osservando i vetrini mediante un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) e impostando i seguenti parametri: fluorescenza 100%, obiettivo 630x, filtro DAPI.

### **3.6. *Unio pictorum***

#### **3.6.1. Stabulazione**

Gli animali sono stati stabulati per 28 giorni nei diversi siti del Lago Maggiore utilizzando apposite gabbie. Al termine dei 28 giorni le gabbie sono state recuperate e le *Unio* sono state trasportate in laboratorio per effettuare i test ecotossicologici.

#### **3.6.2. I test biologici**

##### **3.6.2.1. Stabilità delle membrane lisosomiali delle cellule dell'emolinfa**

###### Prelievo dell'emolinfa

L'emolinfa viene prelevata dal muscolo adduttore posteriore con siringa da 1ml (con ago grande –ottenuto da una siringa da 20ml) contenente 0.2 ml di acqua di lago filtrata. Dopo aver tolto l'ago dalla siringa, per ridurre lo stress fisico a cui sono sottoposte le cellule, l'emolinfa prelevata viene trasferita in eppendorf.

###### Metodica

L'analisi è condotta essenzialmente seguendo il metodo sviluppato da Lowe et Pipe (1994). Su un vetrino polilisinato (2  $\mu$ l di soluzione 1:10 w:v) sono stati posti 40 $\mu$ l di sospensione contenente gli emociti; le cellule sono state lasciate aderire sul vetrino per 30' in camera umida alla temperatura di  $16^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono stati aggiunti 40 $\mu$ l della soluzione di neutral red (NR), ottenuta diluendo 5 $\mu$ l della soluzione madre di NR (20 mg di NR in 1 ml di DMSO) in 995 $\mu$ l di acqua di lago filtrata. Dopo l'incubazione in camera umida al buio per 15' a  $16^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , l'eccesso di colorante è stato quindi eliminato e le cellule sono state sciacquate e idratate con acqua di lago filtrata. La ritenzione del NR nei lisosomi (NRRT) è stata valutata dopo 1h. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 630 $\times$  utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: rodamina). Le immagini sono state analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine (Scion image freeware), che ha permesso di quantificare il rilascio del NR dai lisosomi, che è stato espresso come variazione % di intensità di fluorescenza rispetto ai controlli.

### 3.6.2.2. Rapporto lisosomi/citoplasma

#### Principio del metodo

Il rapporto lisosomi/citoplasma rappresenta un parametro morfometrico che permette di valutare l'attività lisosomiale in base alle dimensioni di tali organuli rispetto al citoplasma cellulare, in quanto un aumento della loro dimensione implica un'augmentata attività lisosomiale in seguito a stimolazione da agenti inquinanti che può a sua volta determinare uno stato di autofagia; col tempo, per riduzione della quantità di citoplasma, lo stato fisiologico di cellule e tessuti può essere alterato notevolmente. Il rapporto lisosomi/citoplasma si mantiene, in generale, elevato nei siti ove la determinazione della stabilità delle membrane lisosomiali ha evidenziato una condizione di sofferenza degli organismi campionati.

#### Preparazione dei tessuti per l'analisi citochimica

Cinque frammenti (3-4 mm) di ghiandola digestiva di *U. pictorum* sono stati prelevati da cinque organismi diversi, tagliati a mano in modo tale da ottenere delle sezioni trasversali dei tubuli disposti parallelamente all'asse longitudinale della ghiandola stessa, e posti in fila su apposito supporto in alluminio per criostato (chuck) precedentemente raffreddato in ghiaccio. Successivamente il supporto con i frammenti è stato posto per 40 secondi in un piccolo recipiente contenente N-esano, precedentemente raffreddato a  $-70^{\circ}\text{C}$  con azoto liquido. Il chuck è stato avvolto in 4-5 strati di parafilm e posto immediatamente a  $-65^{\circ}\text{C}$ . A questa temperatura i tessuti possono essere conservati per 4-6 mesi. Il congelamento con esano impedisce la formazione di ghiaccio nel tessuto, e di conseguenza un eventuale danno strutturale ai componenti subcellulari.

Successivamente, per mezzo di un criostato Leica CM 3050 ad una temperatura di camera inferiore a  $-28^{\circ}\text{C}$ , sono state ottenute sezioni di  $10\mu\text{m}$  di spessore. Le sezioni sono state quindi fatte aderire per essiccamento su vetrini tenuti a temperatura ambiente.

#### Metodica

Il rapporto lisosomi/citoplasma a livello della ghiandola digestiva di *U. pictorum* è stato valutato seguendo il metodo descritto da Moore (1976) e Moore et Clarke (1982). L'enzima lisosomiale di cui è stata valutata l'attività è  $\beta$ -N-acetilesosaminidasi (NAH). Le sezioni di tessuto ( $10\mu\text{m}$ ) ottenute al criostato sono state incubate per 20' a  $37^{\circ}\text{C}$  in una soluzione contenente naphthol-As-BI N-acetil-D-glicosaminide (substrato per l'enzima

lisosomiale), precedentemente disciolto in 2-metossietanolo, buffer Na-citrato (0.1M NaCl 2.5%, pH 4.5) e polipep (un polipeptide a bassa viscosità che agisce come stabilizzante per le sezioni). I vetrini sono stati sciacquati in tampone sodio-fosfato (0.1M, pH 7.4) per 2' a 37°C, e quindi incubati per 10' a temperatura ambiente in una soluzione contenente il colorante Fast Violet B sciolto in tampone sodio-fosfato. I vetrini sono stati quindi sciacquati in acqua deionizzata per 5' e infine montati con gelatina glicerinata. Le sezioni di tessuto sono state osservate utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) ad un ingrandimento di 400×, connesso ad una fotocamera digitale (Zeiss AxioCam). Le immagini ottenute sono state analizzate come descritto in precedenza, ossia mediante un sistema di analisi d'immagine (Scion Image freeware), che ha permesso di determinare il rapporto lisosomi/citoplasma e che è stato espresso come variazione % rispetto ai controlli.

### **3.6.2.3. Accumulo lisosomiale di lipofuscine e lipidi neutri nelle cellule dell'emolinfa**

Gli effetti tossici degli inquinanti spesso dipendono dalla loro capacità di aumentare i livelli cellulari delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Quando i livelli di produzione dei ROS superano le difese antiossidanti, si generano nelle cellule condizioni di stress ossidativo che provocano diversi effetti tra cui la perossidazione delle membrane lipidiche (Viarengo, 1989). I prodotti finali del processo di perossidazione vengono accumulati nei lisosomi come granuli insolubili, noti con il termine di lipofuscine. La misurazione dell'accumulo lisosomiale di lipofuscine rappresenta un indice dei processi di perossidazione nelle cellule.

Un'altra risposta biologica indotta da inquinanti è l'alterazione del metabolismo degli acidi grassi e l'accumulo lisosomiale di alti livelli di lipidi neutri insaturi che sono incorporati nei lisosomi per autofagia.

### **Determinazione dell'accumulo lisosomiale di lipofuscine**

#### *Metodica*

Il contenuto di lipofuscine è stato valutato essenzialmente utilizzando il metodo Schmorl (Pearse, 1972; Moore, 1988). Su un vetrino polilisinato (2 µl di soluzione 1:10 w:v) sono stati posti 40µl di sospensione contenente gli emociti (stesso metodo utilizzato per la valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali); le cellule sono state lasciate aderire

sul vetrino per 30' in camera umida alla temperatura di  $16^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, gli emociti sono state fissati in calcio-formolo per 10' a  $4^{\circ}\text{C}$ , sciacquati in acqua Milli-Q e posti nel mezzo di reazione contenente cloruro ferrico  $\text{FeCl}_3$  1% e potassio ferrocianuro  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  1% in rapporto 3:1 per 5'. Successivamente i vetrini sono stati lavati in acido acetico 1% per 30'', sciacquati in acqua MilliQ e montati con gelatina glicerinata. Il contenuto lisosomiale di lipofuscine è stato quantificato mediante un sistema di analisi d'immagine (Scion Image freeware) ed espresso come variazione % rispetto ai controlli.

### **Determinazione dell'accumulo lisosomiale di lipidi neutri**

#### Metodica

Il contenuto lisosomiale di lipidi neutri è stato valutato mediante colorazione Oil Red-O (ORO), essenzialmente come descritto da Moore (1985). Su un vetrino polilisinato (2  $\mu\text{l}$  di soluzione 1:10 w:v) sono stati posti 40 $\mu\text{l}$  di sospensione contenente gli emociti (si veda il metodo utilizzato per la valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali); le cellule sono state lasciate aderire sul vetrino per 30' in camera umida alla temperatura di  $16^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, le cellule sono state fissate in calcio-formolo per 10' a  $4^{\circ}\text{C}$ , sciacquate in acqua Milli-Q e poste in trietilfosfato 60% per 5'. Successivamente gli emociti sono stati colorati con una soluzione di Oil Red-O (ORO) 1% in trietilfosfato 60% a temperatura ambiente per 15', lavati in trietilfosfato 60% per 30'', risciacquati in acqua Milli-Q e quindi i vetrini montati con gelatina glicerinata. Il contenuto lisosomiale di lipidi neutri è stato quantificato utilizzando l'analisi d'immagine come descritto in precedenza ed espresso come variazione % rispetto ai controlli.

### 3.6.2.4. Malondialdeide

#### Principio del metodo

La malondialdeide è un prodotto intermedio del processo di perossidazione lipidica (Viarengo et al., 2007). Il metodo si basa sulla rilevazione spettrofotometrica di una variazione di assorbanza a 586nm in una soluzione di N-methyl-2-phenylindole (NMPI) in acetonitrile quando due molecole di NMPI si legano ad una molecola di MDA generando una carbocianina stabile. La variazione di assorbanza è proporzionale alla concentrazione di MDA presente nel campione (Erdelmeier et al., 1998; Gérard-Monnier et al., 1998).

#### Metodica

Per il dosaggio della malondialdeide su *Unio pictorum* è stata utilizzata la ghiandola digestiva. Il tessuto è stato omogeneizzato con Potter-Elvehjem in tampone Tris-HCl 20mM pH 7,4 contenente lo 0,1% di  $\beta$ - mercaptoetanololo a 4°C. L'omogenato è stato centrifugato a 18000g per 20' a 4°C, è stato recuperato il surnatante e mantenuto in ghiaccio fino all'analisi. Parallelamente sono stati preparati gli standard contenenti diverse concentrazioni di TMOP (1,1,3,3-tetrametossipropano) 10mM in Tris HCl 20mM pH 7,4. Sono stati aggiunti a 650 $\mu$ L di reattivo contenente NMPI (N-methyl-2-phenylindole 10,3mM in acetonitrile e metanolo in rapporto 1:3), 200 $\mu$ L di campione e 150 $\mu$ L di HCl. I campioni e gli standard sono stati incubati a 45°C per 40' in termoblocco, coperti con carta stagnola. Dopo averli tenuti 5' in ghiaccio, i campioni sono stati centrifugati a 15000g per 10' a 4°C. Il surnatante è stato prelevato e è stata effettuata lettura del campione a 586nm con Varian Cary 50 Bio UV visible spectrophotometer. I dati ottenuti dall'interpolazione dei valori dell'assorbanza con la retta della curva standard, corrispondono alle  $\mu$ M di MDA presenti nel campione, da riferirsi ai grammi di tessuto utilizzati.

### 3.6.2.5. Carbonilazione delle proteine

#### Principio del metodo

In condizioni di stress ossidativo, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) può determinare l'ossidazione di molecole biologiche quali le proteine. L'ossidazione delle proteine può essere rilevata tramite la presenza di gruppi carbonili (CO).

Uno dei saggi più utilizzati prevede l'utilizzo di 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) che legandosi ai gruppi carbonili porta alla formazione di un prodotto stabile, dinitrophenyl hydrazone (DNP), in soluzione acida (Levine et al., 1994; Adams et al., 2001).

#### Metodica

Per il saggio delle proteine carbonilate su *Unio pictorum* è stata utilizzata la ghiandola digestiva. Il tessuto è stato omogeneizzato in tampone Tris-HCl 20mM pH 7,4 contenente lo 0,1% di  $\beta$ - mercaptoetanololo. Il surnatante è stato prelevato e le proteine precipitate con acido tricloroacetico (TCA); dopo incubazione in ghiaccio per circa 10', è stata effettuata una centrifugata a 10000g per 20' a 4°C. Il surnatante è stato eliminato, il pellet asciugato con flusso d'azoto e dopo averlo risospeso in 500  $\mu$ L di 10mM DNPH, è stato lasciato al buio per 45' a temperatura ambiente, vortexandolo ogni 5'. Le proteine contenute nei campioni sono state quindi precipitate con 500 $\mu$ L di TCA al 20%, i campioni incubati in ghiaccio per 10' e centrifugati a 15000g per 10'. Si è proceduto con una serie di lavaggi del pellet del campione, con etanolo-ethyl acetato, in modo da rimuovere il DNPH non legato, effettuando centrifugate a 15000g per 5'. Il pellet lavato è stato risospeso in 1ml di soluzione di guanidina, incubato a 37°C per 15-30', al buio, fino a completa solubilizzazione. E' stata effettuata un'ultima centrifugata per eliminare il materiale insolubile a 15000g per 5'. Il campione è stato analizzato allo spettrofotometro (Varian Cary 50 Bio UV visible spectrophotometer) a 360nm (picco di assorbimento del DNP). La concentrazione delle proteine ossidate è stata ottenuta dalla formula:  $C = \text{Abs} (360\text{nm}) / 45,45$  nmoli/mL. Il valore è stato rapportato alla concentrazione di proteine totali presenti nel campione, ottenendo le nmoli/mg proteine.

### 3.6.2.6. Contenuto di Metallotioneine

#### Principio del metodo

Le metallotioneine (MTs) sono proteine citosoliche a basso peso molecolare ricche in gruppi SH, che sono coinvolte nell'omeostasi dei metalli pesanti. Tali proteine sono sovraesprese in organismi esposti ad un ambiente contaminato da metalli (Viarengo, 1989; Viarengo et al., 1999a). La determinazione del livello tissutale di MTs viene quindi considerato un indice della contaminazione ambientale da metalli ed è ampiamente utilizzato sia nei mitili che nei pesci.

#### Metodica

Il contenuto delle metallotioneine nella ghiandola digestiva di *U. pictorum* è stato valutato seguendo il metodo descritto da Viarengo et al. (1997a). I tessuti su cui effettuare l'analisi (ghiandola digestiva) sono stati prelevati da *U. pictorum*, congelati in azoto liquido e conservati a -65°C. Al momento dell'analisi i tessuti sono stati omogeneizzati in 3 volumi di saccarosio 0.3M, Tris-HCl 20mM pH 8.6 addizionati di leupeptina 0.006mM, PMSF 0.5mM e  $\beta$ -mercaptoetanolo 0.01%. L'omogenato è stato quindi centrifugato a 30000g per ottenere una frazione solubile contenente le metallotioneine. Il soprannatante 30000g è stato successivamente precipitato con etanolo-cloroformio con il duplice scopo di rimuovere i tioli a basso peso molecolare e concentrare le metallotioneine: 1mL di surnatante è stato quindi addizionato con 1.05mL di etanolo freddo (-20°C) e 80 $\mu$ L di cloroformio e centrifugato a 6000g per 10 minuti. Il soprannatante così ottenuto è stato addizionato di 3 volumi di etanolo freddo e mantenuto a -20°C per 1h e quindi centrifugato a 6000g per 10' in rotore oscillante. Il pellet è stato lavato una volta con 87% di etanolo e 1% di cloroformio nel buffer di omogenizzazione, ricentrifugato, insufflato con azoto e risospeso in 150 $\mu$ L di NaCl 0.25M addizionato di 150 $\mu$ L di HCl 1N e EDTA 4mM. Ai campioni così risospesi sono stati aggiunti 4.2mL di DTNB (acido ditiobisnitrobenzoico) preparato al momento dell'uso e centrifugati a 3000g per 5'. L'assorbanza (riferita ad una curva standard di GSH) è stata valutata mediante spettrofotometro (Varian Cary 50 Bio UV visible spectrophotometer) alla lunghezza d'onda di 412nm. E' stato così ottenuto il valore di nM/mL di gruppi -SH ossia di metallotioneine. Il valore finale viene espresso in  $\mu$ g MT/g di tessuto.



### 3.6.2.7. Attività acetilcolinesterasica

Il test dell'acetilcolinesterasi è basato sul metodo messo a punto da Ellman in cui il substrato tio-estere acetilcolina (AchSC), idrolizzato dall'enzima, libera un gruppo sulfidrilico in grado di reagire con il reagente di Ellman (Bis(3 carboxy-4-nitrophenyl)disulphide). Con un'assorbanza di 412nm si analizza la cinetica di formazione dell'anione 2-nitro-5-thiobenzoato che si sviluppa durante la reazione. La colorazione risulterà tanto più intensa (gialla) quanto maggiore sarà la concentrazione del prodotto della reazione, corrispondente ad un'elevata attività dell'enzima (controllo). Il dosaggio viene effettuato su campioni biologici per valutare un'eventuale inibizione dell'acetilcolinesterasi considerata un biomarker di esposizione a pesticidi organofosfati e carbammati.

#### Metodica

Per il test è stato utilizzato l'acetylcholinesterase reagent kit (IKZUS ENVIRONMENT, Cat No. 1418-050-K). Le branchie prelevate da *U. pictorum* sono state omogeneizzate a 4°C con Potter-Elvehjem con pestello di teflon in 3 volumi di tampone di omogeneizzazione. L'omogenato è stato centrifugato a 10000g per 20' a 4°C, è stato recuperato il surnatante che si mantiene in ghiaccio fino all'analisi. Sono stati aggiunti a 940µL di tampone di reazione, 100µL di campione e 12µL di substrato subito prima della lettura. In parallelo è stato effettuato il bianco di ogni campione, per valutare l'attività dei gruppi sulfidrilici endogeni, e il bianco del substrato, per valutarne l'idrolisi spontanea. Il primo è stato effettuato senza l'aggiunta del substrato, il secondo con tampone di omogeneizzazione al posto del campione. La cinetica di reazione è stata seguita per 10' a 412nm mediante Varian Cary 50 Bio UV visible spectrophotometer. L'attività specifica dell'enzima viene riferita ai mg di proteine presenti nel campione.

### **3.7. Indagini ecotossicologiche ed ecologiche nelle aree interessate dalle acque della galleria di scolo di Gavorrano**

#### **3.7.1. Campionamento**

I punti di campionamento sono stati posizionati in modo da permettere la valutazione degli impatti relativi all'immissione delle acque di miniera della galleria di scolo di Gavorrano nel Fosso Rigiolato, corpo idrico superficiale dell'area. Le acque di miniera vengono convogliate nel Fosso Rigiolato mediante Fosso San Giovanni.

Per ciascun punto di campionamento, sono stati raccolti campioni di acqua in cinque repliche. Nei punti lungo il Fosso Rigiolato, a monte (RiM) e a valle (RiV) dell'immissione del Fosso San Giovanni, sono stati inoltre prelevati campioni di sedimento, anch'essi in cinque repliche, da cui è successivamente stata estratta l'acqua interstiziale.

Inoltre, nei due punti lungo il Fosso Rigiolato (RiM e RiV) è stata valutata la struttura delle comunità di macroinvertebrati bentonici (Indice Biotico Esteso).

##### **3.7.1.1. Galleria di scolo della miniera di Gavorrano**

Per lo studio degli impatti derivanti dall'immissione delle acque della galleria di scolo, sono stati prelevati i seguenti campioni di acqua e di sedimento:

- RiM – Punto lungo il Fosso Rigiolato, a monte dell'immissione delle acque del Fosso San Giovanni
- RiV – Punto lungo il Fosso Rigiolato, a valle dell'immissione delle acque del Fosso San Giovanni

##### **3.7.1.2. Modalità di prelievo dei campioni di acqua dolce e dei sedimenti**

I campioni di acqua sono stati raccolti immergendo direttamente il contenitore (bottiglie chiare a tappo largo in polietilene) sotto il pelo libero dell'acqua, evitando in tal modo travasi intermedi ed il pericolo di contaminazione incrociata. Prima di effettuare il campionamento, i contenitori di vetro sono stati "normalizzati", cioè sciacquati 3 volte con l'acqua del sito in esame. In laboratorio, le acque sono state aliquotate in opportuni contenitori e stoccate a -20°C fino all'analisi. Le acque superficiali sono state prelevate seguendo le direttive del manuale APAT 43/2006.

I campioni di sedimento sono stati prelevati con una benna in acciaio inossidabile (Benna di Van Veen), come descritto nel manuale APAT 43/2006. I campioni sono stati riposti in contenitori di vetro per evitare contaminazioni ed eventuali alterazioni della matrice e conservati in freezer a -20°C. Prima dei test specifici i sedimenti sono stati centrifugati a 3000rpm per 30min per ottenere l'acqua interstiziale. La fase liquida ottenuta è stata aliquotata e conservata a -20°C fino all'analisi.

### **3.7.2. Test biologici**

Oltre ai test con il batterio *V. fischeri*, l'alga *P. subcapitata*, il crostaceo *D. magna* e l'ameba sociale *D. discoideum* descritti rispettivamente nei paragrafi 3.1., 3.2., 3.3. e 3.5.12., sono stati effettuati test con l'ostracode *H. incongruens*, il nematode *C. elegans* e fitotest utilizzando la dicotiledone *P. sativum* e la monocotiledone *S. bicolor*.

#### **3.7.2.1. Test con l'ostracode *Heterocypris incongruens***

Il metodo presentato, derivante dal manuale operativo allegato a OSTRACODTOXKIT F., è stato messo a punto dal DiSIT di Alessandria.

Gli ostracodi sono piccoli organismi bentonici che si localizzano preferenzialmente in corrispondenza o appena al di sotto dell'interfaccia acqua-sedimento; questa loro peculiarità li rende quindi più sensibili, rispetto ad altri crostacei, alla tossicità delle sostanze chimiche rilasciate dal substrato.

*H.incongruens* è routinariamente impiegato come organismo test in un saggio di tossicità cronica che prevede l'esposizione degli organismi alla matrice solida per un periodo di sei giorni, con valutazione finale di due endpoint: la percentuale di mortalità (effetto letale acuto) e la percentuale di inibizione della crescita (effetto subletale cronico) riferita ai risultati ottenuti da una matrice di riferimento (controllo di laboratorio).

## Metodica

### **Allestimento del test**

Come controllo di laboratorio, utilizzato per la validazione del test, è stata utilizzata della sabbia sterile (OSTRACODTOXKIT F.)

Per ogni replica sono stati introdotti nella piastra multipozzetto:

- 10 ostracodi
- 1ml di matrice solida (prelevata con l'apposito misurino in dotazione nel OSTRACODTOXKIT F)
- 2ml di Standard fresh water
- 2ml di *Pseudokirchneriella subcapitata* in coltura alla concentrazione di  $1,5 \cdot 10^7$  cellule/ml.

Al termine dell'allestimento del test, per favorire la distribuzione omogenea della matrice solida sul fondo del pozzetto, la piastra è stata agitata manualmente per alcuni secondi.

Le piastre sono quindi state incubate per 6 giorni in un termoincubatore alla temperatura di  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  al buio. Al termine del periodo di esposizione è stata misurata la lunghezza degli individui ritenuti vivi.

Sono stati considerati non vitali gli organismi che, dopo sollecitazione, non presentavano alcun movimento.

### **Acqua di diluizione per *Heterocypris incongruens***

Per la preparazione della Standard fresh water (a durezza moderata) utilizzata per la schiusa delle cisti e per la preparazione della sospensione algale, sono stati aggiunti (secondo la formula US EPA) ad un volume di 1 litro di acqua distillata e microfiltrata i seguenti sali:

- $\text{NaHCO}_3$ ;
- $\text{CaSO}_4$
- $\text{MgSO}_4$
- $\text{KCl}$

La soluzione ottenuta risponde ai requisiti sottoelencati:

- pH 7.4 - 7.8;
- durezza 80 -100 (mg/L  $\text{CaCO}_3$ );
- alcalinità 60 - 70 (mg/L  $\text{CaCO}_3$ ).

L'acqua standard viene conservata in frigorifero a  $4 \pm 3$  °C , al buio per un periodo non superiore ai 6 mesi.

### **Schiusa delle cisti di Ostracodi**

Alla fiala contenente le cisti di *Heterocypris incongruens* è stato aggiunto un volume di 200µl di Standard fresh water. Le cisti di ostracodi sono quindi state trasferite in una piastra petri contenente 30ml di Standard fresh water e incubate a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  per 52h in condizioni di illuminazione continua (3000-4000 lux).

Trascorse 48h dall'incubazione si è proceduto ad un prefeeding degli organismi con Spirulina.

L'incubazione degli organismi si è protratta per le restanti 4h.

### **Misurazione degli Ostracodi prima dell'inizio del saggio**

Completato il periodo di incubazione, sono stati prelevati 10 organismi neonati, sono stati fissati mediante la soluzione Lugol, e si è misurata la lunghezza (L0) mediante scala micrometrica.

### **Determinazione della vitalità percentuale**

Al termine dei sei giorni di esposizione, è stato registrato il numero degli organismi vivi presenti nelle piastre multipozzetto espresso in termini di percentuale media di vitalità rispetto al numero di ostracodi introdotti nei pozzetti all'inizio del test (10 organismi).

### **Determinazione della crescita percentuale (G%)**

Gli organismi vitali, trasferiti nelle piastre di lettura, sono stati immobilizzati mediante l'aggiunta di 1-3 gocce di fissativo Lugol.

E' stata quindi registrata la loro lunghezza mediante l'utilizzo di una scala micrometrica e calcolato l'incremento medio in lunghezza mediante la seguente formula:

$$\Delta L = L_f - L_0$$

dove:

- $L_f$  è la lunghezza media degli ostracodi dopo il periodo di incubazione
- $L_0$  è la lunghezza media degli ostracodi misurata all'inizio dell'esecuzione del test
- La percentuale di crescita (G%) è stata calcolata mediante la seguente formula :
- $G\% = (\Delta L \text{ campione} / \Delta L \text{ controllo}) \times 100$

### **Validazione dei saggi**

Il test è considerato valido quando:

- la mortalità percentuale negli organismi del controllo di laboratorio risulta < 20%
- l'incremento della crescita degli organismi del controllo di laboratorio risulta superiore a 300 µm.

#### **3.7.2.2. Test con il nematode *Caenorhabditis elegans***

##### **Tasso di mortalità**

Il metodo seguito per l'analisi tossicologica su fase liquida è stato proposto da Ura et al., 2002.

*Caenorhabditis elegans* è un nematode fasmidario che vive negli strati superficiali del terreno delle regioni temperate (Donald, 1997). Principalmente si nutre di batteri e si riproduce con un ciclo vitale di circa tre giorni in condizioni ottimali (20°C). Le caratteristiche che rendono *C. elegans* particolarmente adatto per l'utilizzo nei test di laboratorio per la valutazione di sostanze inquinanti sono: l'estrema facilità di studio, la facilità di allevamento in laboratorio su terreno solido o in liquido, il ciclo vitale breve, le numerose e dettagliate informazioni su anatomia, sviluppo e funzioni delle singole cellule dell'animale, il genoma completamente sequenziato (The *C.elegans* Sequencing Consortium, 1998).

##### Metodica

Come controllo di laboratorio, utilizzato per la validazione del test, è stata utilizzata la soluzione K-MEDIUM (Williams, 1990) costituita da 3.1g di NaCl e 2.4g di KCl in 1 litro di acqua sterile.. La soluzione è stata autoclata e dopo di ch  è stato aggiunto 1ml di colesterolo (5mg/ml EtOH).

Gli organismi utilizzati nel test sono stati sincronizzati da piastre di mantenimento utilizzando la Bleaching solution (Emmons et al., 1979). Le uova ottenute dopo tale lavaggio, sono state trasferite su piastre di agar seminate con *E.coli* e lasciate overnight a 20°C, al buio, periodo necessario agli organismi per raggiungere la fase larvale L1.

Per ogni replica sono stati introdotti in multiwells da 24 pozzetti:

- 10 nematodi al primo stadio larvale (L1).
- 500µl di acqua da analizzare.

Le piastre sono quindi state incubate per 24h alla temperatura di 20°C, al buio.

Durante l'esposizione agli organismi non è stato somministrato cibo. Al termine delle 24h di esposizione, sono stati contati i nematodi vivi.

Sono stati considerati non vitali gli organismi che, dopo sollecitazione, non presentavano alcun movimento. Il test di screening è considerato valido quando la mortalità percentuale negli organismi del controllo di laboratorio risulta < 20%.

### **3.7.2.3. Test su vegetali (Fitotest)**

#### **Valutazione dell'inibizione della germinazione e della crescita radicale**

I test di germinazione sono stati eseguiti con metodica UNICHIM n° 1651 (2003). I sedimenti sono stati trasferiti in capsule Petri in polistirene del diametro di 15 cm (22,5 g di ogni campione di sedimento), saturati in 25 ml di acqua sterile e coperti con carta da filtro. Semi di *Pisum sativum* L. CV Mezzarama Espresso Generoso sono stati lasciati ad imbibire in acqua per 3 ore, e trasferiti nelle piastre (25 semi per ogni piastra). Per ogni campione sono solitamente preparate 3 repliche.

Le capsule così ottenute sono state incubate a 25°C al buio per 3 giorni. Si è valutata la percentuale di germinazione dei semi e la lunghezza delle radici sviluppate. La significatività delle differenze fra i campioni è stata valutata mediante ANOVA ( $P < 0,05$ ).

#### **Preparazione del materiale vegetale per la valutazione dell'indice mitotico, degli indici di fase, delle anomalie mitotiche.**

Alcune radici sono state fissate 1h in reagente di Carnoy (25% v/v acido acetico; 75% v/v etanolo), sciacquate accuratamente e conservate in Etanolo 70% v/v per la valutazione dell'indice mitotico mediante colorazione Feulgen.

#### **Tasso di germinazione e allungamento radicale**

I test di germinazione sono stati eseguiti con metodica UNICHIM n° 1651 (2003). I sedimenti sono stati trasferiti in capsule Petri in polistirene del diametro di 9 cm (10g di ogni terreno), saturati con 8ml di acqua sterile e coperti con carta da filtro sterile. Semi di *Pisum sativum* cv. Mezzarama Espresso Generoso e *Sorghum bicolor* cv. Hygrazer sono stati lasciati ad imbibire in acqua del rubinetto per 3 ore, e trasferiti nelle piastre (10 semi per ogni piastra). Per ogni campione sono state preparate solitamente 4 repliche. Le capsule così ottenute sono state incubate a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  al buio per 3 giorni. Si è valutata la percentuale di germinazione dei semi e la lunghezza delle radici sviluppate.

### **3.7.3. Campionamento biologico e applicazione dell'Indice Biotico Esteso (I.B.E.)**

#### Principio del metodo

Le acque correnti sono ambienti estremamente eterogenei e complessi, le cui caratteristiche ecologiche sono legate all'interazione di numerosi fattori che agiscono a scale differenti.

Nel monitoraggio della qualità di ambienti lotici, oltre ai tradizionali metodi di indagine chimico-fisica vengono attualmente impiegati con una frequenza sempre maggiore i sistemi di monitoraggio biologico.

I principali vantaggi presentati dall'impiego di tali sistemi sono i seguenti:

- a) permettono di rilevare la presenza di fattori di disturbo che sfuggono all'analisi chimica. Un'alterazione del regime idrologico di un fiume, dovuta alla canalizzazione dell'alveo, può provocare enormi scompensi nell'ecosistema, causando anche l'estinzione di varie specie;
- b) consentono di individuare scarichi saltuari di inquinanti, che proprio a causa della loro episodicità, possono sfuggire ad un controllo chimico, mentre provocano effetti permanenti o di lunga durata sulle comunità (morte degli esemplari più deboli, allontanamento in massa dal luogo inquinato, ecc.);
- c) sono stati ideati per monitorare direttamente le specie animali e vegetali, che costituiscono l'obiettivo diretto della salvaguardia ambientale;
- d) sono molto sensibili alle interazioni tra diversi fattori di stress (per esempio aumento di temperatura e aumento del carico di sostanza organica);
- e) sono di applicazione relativamente semplice, non richiedono costose attrezzature o laboriose analisi;

I sistemi di monitoraggio biologico si basano sul presupposto che un organismo, essendo il prodotto del suo ambiente di vita, fornisce indicazioni precise sulle caratteristiche di quest'ultimo e può quindi essere utilizzato come indicatore ambientale. Numerosi gruppi animali e vegetali possono essere utilizzati come indicatori ambientali per la valutazione dello stato ecologico delle acque correnti:

- alghe (diatomee)
- macrofite;
- macroinvertebrati;
- fauna ittica.



Nello studio effettuato per valutare la qualità del corpo idrico Fosso Rigiolato, ricevente le acque di drenaggio della miniera di Gavorrano, si è scelto di utilizzare come bioindicatori i macroinvertebrati. Le comunità macrobentoniche possono variare nella loro composizione e struttura a livello spaziale e temporale, rispondendo a numerosi fattori ambientali (Allan, 1995; Bo et al., 2007a; Fenoglio et al., 2002, 2005). I macroinvertebrati bentonici costituiscono una componente centrale nelle dinamiche ecologiche degli ambienti lotici, svolgendo un ruolo fondamentale nel riciclo della sostanza organica di origine autoctona e alloctona e influenzando in modo importante sulla capacità autodepurativa del fiume. La variazione della struttura di queste biocenosi è un valido indicatore delle caratteristiche ambientali. Sono relativamente facili da campionare e da determinare ed inoltre, essendo relativamente poco mobili ed essendo le loro comunità osservabili per lungo tempo, registrano efficacemente le variazioni nella qualità dell'ambiente. Numerosi taxa sono notevolmente sensibili all'inquinamento ed inoltre hanno cicli di vita raramente inferiori ad un anno, per cui sono presenti stabilmente nell'alveo fluviale. Essi sono stati perciò utilizzati da molti ricercatori per formulare indici biotici numerici, che assumono valori decrescenti con l'aumentare dell'inquinamento. Per questi motivi, i macroinvertebrati bentonici rappresentano il gruppo di riferimento maggiormente impiegato nel monitoraggio ambientale: il loro utilizzo è previsto dal D. Lgs. 152/99 e s.m.i. e dalla Direttiva 2000/60/CE (Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy).

### **Raggruppamenti Trofici Funzionali del macrozoobenthos**

I macroinvertebrati occupano praticamente tutti i livelli dei consumatori nella struttura trofica degli ambienti lotici. I predatori si nutrono generalmente di altri macroinvertebrati, gli erbivori di vegetali (microfite e macrofite) e di fianco a questi è presente un'ampia gamma di macroinvertebrati detritivori che si nutre di detrito organico grossolano o fine. Sulla base della grande varietà di adattamenti utilizzati dagli organismi costituenti le comunità lotiche, si usa classificare i macroinvertebrati in gruppi funzionali definiti in base al tipo di risorsa utilizzata e al modo con cui questa viene recuperata. In questo contesto, vengono distinti cinque gruppi trofici funzionali o *functional feeding groups (FFG)* (fig.4); questi possono essere anche molto eterogenei dal punto di vista tassonomico, ma sono definiti dalla modalità di reperimento e utilizzazione delle risorse trofiche e quindi da analogie strutturali e comportamentali (Merritt et Cummins, 1996).

FFG		sigla	Alimento prevalente	Ruolo trofico
Scrapers	Raschiatori	Sc	Periphyton	Erbivori Detritivori
Collectors gatherers	Raccoglitori	Cg	Sedimento di origine organica	Detritivori
Collectors filtereres	Filtratori	F	Particellato organico in sospensione	Detritivori
Predators	Predatori	P	Organismi viventi	Carnivori
Shredders	Tagliuzzatori	Sh	Tessuti vegetali vascolari viventi e non	Erbivori Detritivori

**Fig. 4. Gruppi trofico-funzionali (functional feeding groups)**

### **L'Indice Biotico Esteso**

L'indice I.B.E. è lo strumento previsto dalla normativa italiana per l'analisi della qualità dei sistemi di acqua corrente (D. Lgs. 152/99 e s.m.i.). Questo indice deriva dal Trent Biotic Index – T.B.I. (Woodiwiss, 1964), aggiornato come Extended Biotic Index – E.B.I. (Woodiwiss, 1981) ed è stato adattato successivamente per una applicazione standardizzata ai corsi d'acqua italiani (Ghetti, 1997; APAT – IRSA, 2003). Questo strumento si basa sull'analisi della struttura delle comunità di macroinvertebrati fluviali, e permette di formulare una diagnosi della qualità di ambienti lotici sulla base delle modificazioni nella composizione delle sopra citate comunità.

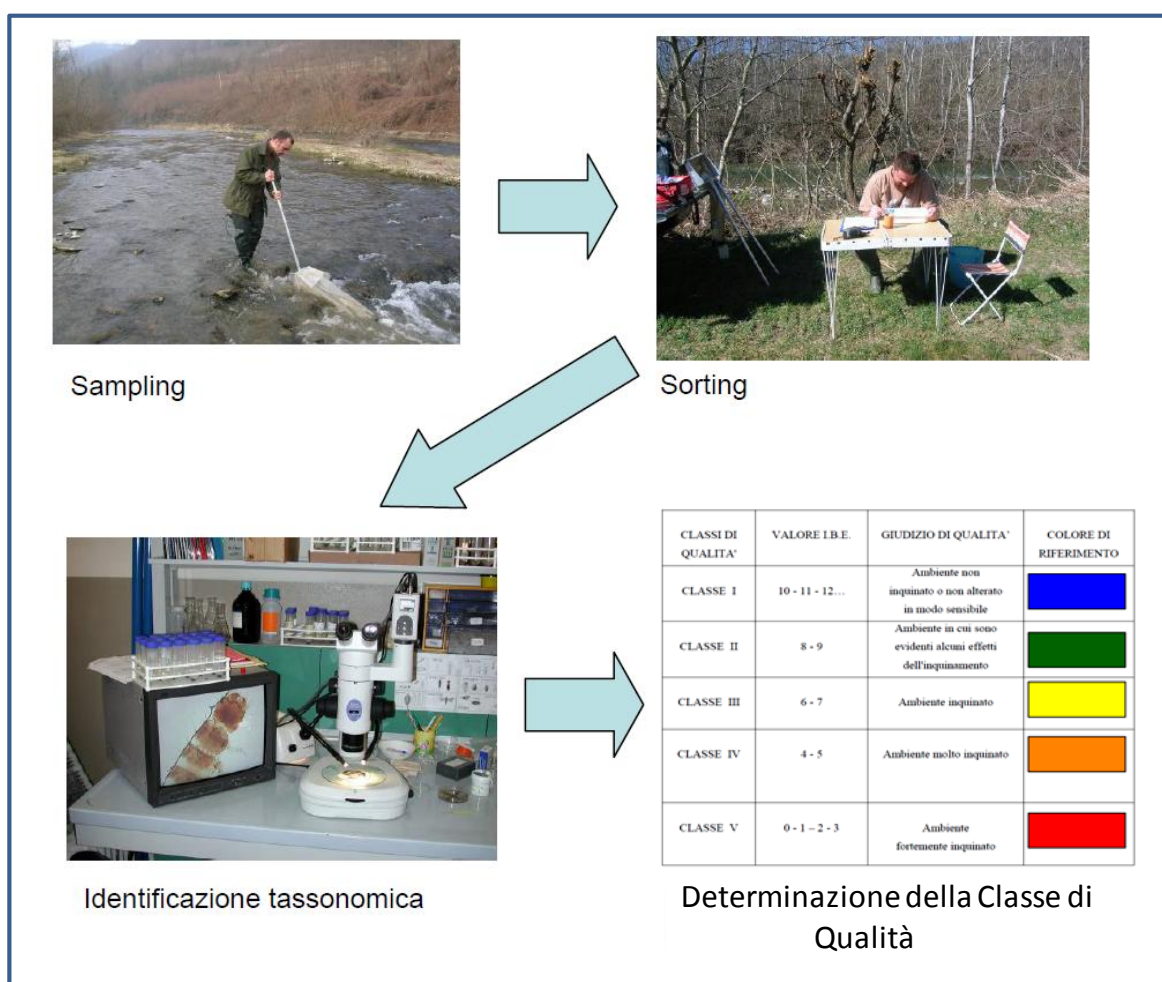
Essendo i macroinvertebrati legati ai substrati, con la presenza di numerosi taxa che mostrano differenti livelli di sensibilità alle modificazioni ambientali e differenti ruoli trofici, e avendo cicli vitali relativamente lunghi, l'indice è particolarmente adatto a rilevare nel tempo gli effetti dovuti al complesso dei fattori di stress sull'ambiente.

L'indice rileva quindi lo stato di qualità di un determinato tratto di corso d'acqua integrando nel tempo gli effetti di differenti cause di turbativa (fisiche, chimiche, biologiche); la fauna macrobentonica risponde ad impatti di natura idraulica, organica e tossica con riduzione di numerose specie e cambiamenti nella comunità animale e di conseguenza nella funzionalità dell'ecosistema.

Metodica

L'applicazione del metodo I.B.E. ha previsto alcune fasi di analisi (fig. 5):

- Fase 1: campionamento (*sampling*), cioè raccolta in situ del macro-zoobenthos, con la finalità di caratterizzare tassonomicamente la cenosi macrobentonica;
- Fase 2: *sorting*, cioè separazione del campione in campo;
- Fase 3: identificazione tassonomica del materiale raccolto in laboratorio;
- Fase 4: applicazione dell'Indice Biotico Esteso e definizione della Classe di Qualità del corpo idrico.



**Fig. 5. Le diverse fasi dell'applicazione dell'indice I.B.E.**

L'I.B.E. valuta il grado di inquinamento di un ambiente acquatico in base ad un punteggio, il quale è determinato da due fattori:

- presenza nell'ambiente del taxon più sensibile.
- numero di Unità Sistematiche (U.S.) presenti.

La determinazione tassonomica si arresta nei vari gruppi a livelli differenti, come si può notare nella seguente tabella (Tabella 1):

PLECOTTERI	Genere
TRICOTTERI	Famiglia
EFEMEROTTERI	Genere
ODONATI	Genere
COLEOTTERI	Famiglia
MOLLUSCHI	Famiglia
CROSTACEI	Famiglia
MEGALOTTERI	Genere
EMITTERI	Famiglia
DITTERI	Famiglia
TURBELLARI	Genere
IRUDINEI	Genere
OLIGOCHETI	Famiglia

**Tabella 1. Livelli a cui si arresta la determinazione tassonomica nei vari gruppi.**

Considerando due diversi fattori, come la presenza di specie sensibili ed il numero di Unità Sistematiche, si è potuto rendere questo indice utilizzabile in ambienti dalle caratteristiche naturali anche molto diverse.

I taxa considerati dall'Indice vengono ordinati in base alla loro diversa tolleranza alla diminuzione dell'ossigeno disciolto, come si può osservare in tabella 2. I Plecotteri, che non tollerano alterazioni di tale parametro sono quindi posti al primo livello mentre i Ditteri, che possono sopravvivere in acque molto povere di ossigeno, vengono assegnati al livello più basso. Ai taxa delle righe superiori vengono attribuiti punteggi più alti, a quelli delle righe inferiori punteggi più bassi.

Numero totale delle U.S.	0 1	2 5	6 10	11 15	16 20	21 25	26 30	31 35	36 40	41 45
Plecotteri presenti ( <i>Leuctra</i> *)										
+ di 1 U.S.	-	-	8	9	10	11	12	13	14	15
1 U.S.	-	-	7	8	9	10	11	12	13	14
Efemerotteri presenti (escludere <i>Baetidae</i> e <i>Caenidae</i> ) <sup>oo</sup>										
+ di 1 U.S.	-	-	7	8	9	10	11	12	13	14
1 U.S.	-	-	6	7	8	9	10	11	12	13
Tricotteri presenti (comprendere <i>Baetidae</i> e <i>Caenidae</i> )										
+ di 1 U.S.	-	5	6	7	8	9	10	11	-	-
1 U.S.	-	4	5	6	7	8	9	10	-	-
Gammaridae e/o <i>Atiidi</i> e/o Paleomonidi presenti										
e/o <i>Atiidi</i> e/o	-	4	5	6	7	8	9	10	-	-
Asellidi e/o Niphargidi presenti										
e/o	-	3	4	5	6	7	8	9	-	-
Oligocheti o Chironomidi	1	2	3	4	5	-	-	-	-	-
Altri organismi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 2. Indice Biotico Esteso (Ghetti; 1997).

- \* nelle comunità in cui *Leuctra* è presente come unico taxon di Plecotteri e sono contemporaneamente assenti gli Efemerotteri (o presenti solo *Baetidae* e *Caenidae*), *Leuctra* deve essere considerata al livello dei Tricotteri per definire l'entrata orizzontale in tabella;
- <sup>oo</sup> per la definizione dell'ingresso orizzontale in tabella, le famiglie *Baetidae* e *Caenidae* vengono considerate a livello dei Tricotteri.

E' stata poi operata una conversione dei valori I.B.E. in modo da poter dividere gli ambienti acquatici in Classi di Qualità, dalle caratteristiche tipiche e da un colore di riferimento ben definito, per la rappresentazione in cartografia (Fig. 6).

<b>CLASSI DI QUALITA'</b>	<b>VALORE DI IBE</b>	<b>GIUDIZIO</b>	<b>COLORE DI RIFERIMENTO</b>
Classe I	10 - 11 - 12	Ambiente non inquinato o non alterato in modo sensibile	Azzurro
Classe II	8 - 9	Ambiente in cui sono evidenti alcuni effetti dell'inquinamento	Verde
Classe III	6 - 7	Ambiente inquinato	Giallo
Classe IV	4 - 5	Ambiente molto inquinato	Arancione
Classe V	1 - 2 - 3	Ambiente fortemente inquinato	Rosso

**Fig. 6. Classi di qualità ricavate dall'I.B.E.**

### **3.8. Analisi statistica**

Tutti gli esperimenti descritti nei paragrafi 3.1., 3.2., 3.3, 3.4., 3.5.12., 3.6.2. e 3.7.2. sono stati condotti in almeno 5 repliche e l'analisi statistica dei dati è stata effettuata usando il test non parametrico Mann-Whitney  $U$ -test.

## ***4. Risultati***



#### **4.1. Uso di *Dictyostelium discoideum* come organismo modello per la valutazione degli effetti biologici indotti da DDT e Hg<sup>2+</sup> in studi di campo e di laboratorio**

Gli inquinanti organici persistenti (POPs), insieme ai metalli pesanti, sono tra i principali rappresentanti dei contaminanti in ambiente acquatico. Uno dei più noti POP è il DDT, utilizzato per diversi anni come pesticida in agricoltura e per debellare insetti portatori di malattie quali tifo e malaria. L'impiego massivo di tale composto ha portato alla comparsa di effetti tossici su numerosi organismi non target quali ad esempio pesci ed uccelli. Sulla base di tali evidenze il DDT è stato bandito in Italia dal 1978 e con la Convenzione di Stoccolma, entrata in vigore nel 2004, ne è stato severamente regolamentato l'utilizzo in tutti i Paesi firmatari.

Tuttavia nonostante l'utilizzo del DDT sia vietato da diversi anni, esso può tuttora rappresentare un pericolo per l'ecosistema visto che questo contaminante e i suoi metaboliti persistono nell'ambiente, tendono ad accumularsi lungo la catena trofica e nei tessuti degli organismi viventi (Turusov et al., 2002) oltre che a concentrarsi nei sedimenti lacustri, che possono pertanto fungere da fonte durevole di contaminazione dell'ambiente acquatico.

In Italia il Lago Maggiore, il secondo più grande lago in termini di superficie e volume, dopo aver sperimentato una pesante contaminazione da mercurio negli anni 1970 e una tendenza all'eutrofizzazione negli anni 1980, negli ultimi decenni è stato soggetto ad inquinamento da DDT. La contaminazione, causata da una attività industriale presente nella zona sino al 1996, è stata biomonitorata negli anni successivi mediante diversi studi (Binelli et Provini, 2003; Binelli et al., 2004).

In questo lavoro di ricerca la tossicità di sedimenti prelevati nel Lago Maggiore, contaminati sulla base delle analisi chimiche da DDT e i suoi metaboliti DDD, DDE (DDX) e dal metallo pesante Hg<sup>2+</sup>, è stata valutata sia mediante i bioassays comunemente applicati per lo studio della qualità dei corpi idrici (inibizione del tasso di motilità del crostaceo cladocero *Daphnia magna*, della bioluminescenza del batterio *Vibrio fischeri* e del tasso di crescita dell'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*) e dei sedimenti in essi presenti (inibizione della sopravvivenza dell'oligochete bentonico *Lumbriculus variegatus*), sia utilizzando l'organismo modello *Dictyostelium discoideum*.

La tossicità dell'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti del Lago Maggiore è stata valutata mediante l'utilizzo di due endpoint di alto livello, il tasso di vitalità cellulare e il tasso di replicazione, in grado di evidenziare effetti a livello di organismo/popolazione, e di una batteria di biomarker comprendente la stabilità delle membrane lisosomiali e il tasso di endocitosi, tipici biomarker di stress nelle cellule eucariotiche, e parametri in grado di rilevare gli eventuali effetti genotossici (Comet assay e frequenza dei micronuclei). Non sono state riscontrate alterazioni apprezzabili sulla sopravvivenza/replicazione delle amebe, né a livello dei biomarker subletali/genotossici. Tuttavia considerata l'elevata concentrazione di DDX e  $\text{Hg}^{2+}$  nel sedimento contaminato sono stati condotti esperimenti per valutare gli effetti tossici che tali contaminanti avrebbero sulle amebe se fossero totalmente biodisponibili. A tale scopo oltre ai parametri precedentemente utilizzati, sono stati messi a punto nuove metodiche a livello molecolare/cellulare per valutare la funzionalità mitocondriale e l'eventuale produzione di ROS e quindi di stress ossidativo nelle cellule, il livello di GSH e il danno ossidativo al DNA. Inoltre, considerato che in ambiente gli inquinanti si ritrovano molto spesso sottoforma di miscela, sono stati indagati i possibili effetti additivi, sinergici o antagonisti della miscela costituita da DDX e  $\text{Hg}^{2+}$  sul tasso di sopravvivenza e di replicazione delle amebe.

## Risultati

### 4.1.1. Esperimenti di campo

Vengono di seguito riportati i risultati ottenuti esponendo il crostaceo cladocero *Daphnia magna*, il batterio *Vibrio fischeri*, l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, l'oligochete bentonico *Lumbriculus variegatus* e l'ameba sociale *Dictyostelium discoideum* all'acqua interstiziale o nel caso del lombrico ai sedimenti prelevati in due siti del Lago Maggiore

Sulla base delle analisi chimiche, i due siti campionati sono stati considerati sito di riferimento (controllo di campo) e sito contaminato da 4,4-DDT, 4,4-DDD, 4,4-DDE e  $Hg^{2+}$  (come mostrano i dati evidenziati in tabella 1).

	Sito di riferimento		Sito contaminato	
	Ppb		Ppb	
	Tq	Dw	Tq	Dw
PCB-028	1,59	3,00	5,00	8,69
PCB-052	53,21	100,39	71,78	124,83
2,4-DDE	1,98	3,74	32,18	55,96
<b>4,4-DDE</b>	8,91	16,81	100,05	<b>174,00</b>
2,4'-DDD	8,27	15,61	80,80	140,53
<b>4,4-DDD</b>	15,76	29,73	307,67	<b>535,07</b>
2,4-DDT	2,36	4,45	8,35	14,53
PCB-153	0,99	1,87	3,95	6,86
<b>4,4-DDT</b>	1,96	3,70	13,47	<b>23,43</b>
PCB-138	2,14	4,04	5,31	9,24
	Ppm		Ppm	
	Tq	Dw	tq	Dw
<b>Hg<sup>2+</sup></b>	0,46	0,87	4,5	<b>7,8</b>

**Tabella 1. Dati chimici relativi ai contaminanti presenti nei sedimenti del sito di riferimento e del sito contaminato (tal quale-tq- e peso secco-dw), prelevati nel Lago Maggiore. In grassetto sono evidenziati il 4,4-DDT, i suoi metaboliti 4,4-DDD e 4,4-DDE ed il Hg<sup>2+</sup> e le relative concentrazioni nel sito contaminato.**

#### 4.1.1.1. Bioassays

I risultati ottenuti hanno dimostrato che non ci sono effetti significativi sul tasso di motilità di *Daphnia magna* (fig. 1) e sulla bioluminescenza di *Vibrio fischeri* (fig. 2) esposti all'acqua interstiziale del sito di contaminato.

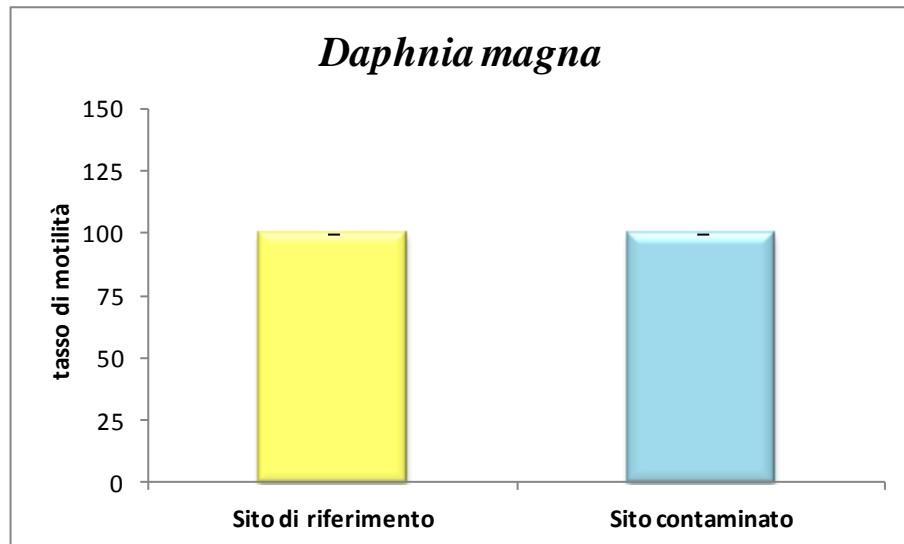


Fig. 1. Effetti indotti sul tasso di motilità di *D. magna* in seguito alla esposizione per 24h all'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti prelevati nei due siti. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo di campo (sito di riferimento) e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

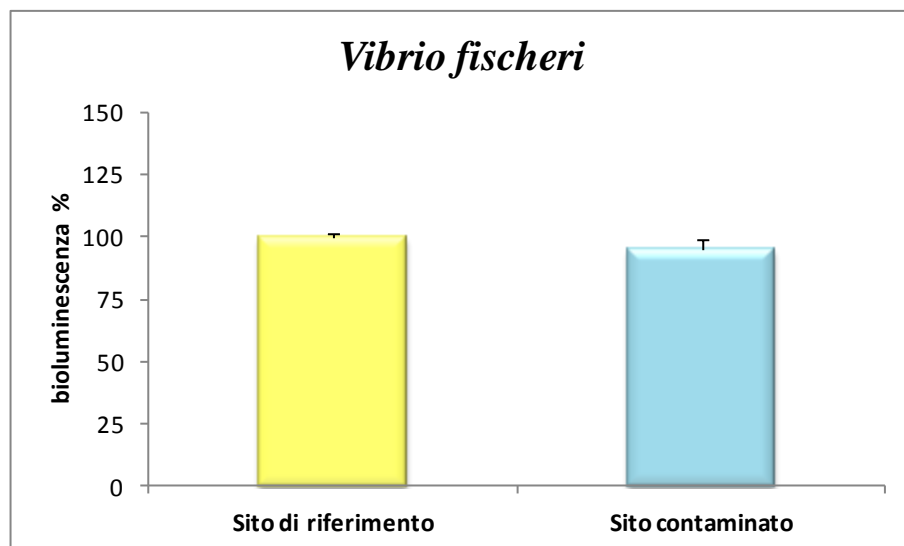


Fig. 2. Effetti indotti sulla bioluminescenza di *V. fischeri* in seguito alla esposizione per 15min. all'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti prelevati nei due siti. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo di campo (sito di riferimento) e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

Anche sul tasso di crescita di *Pseudokirchneriella subcapitata* (fig. 3) esposta all'acqua interstiziale del sito di contaminato e sulla sopravvivenza di *Lumbriculus variegatus* esposto per 28 giorni ai sedimenti del sito contaminato (fig. 4) non sono stati evidenziati effetti significativi.

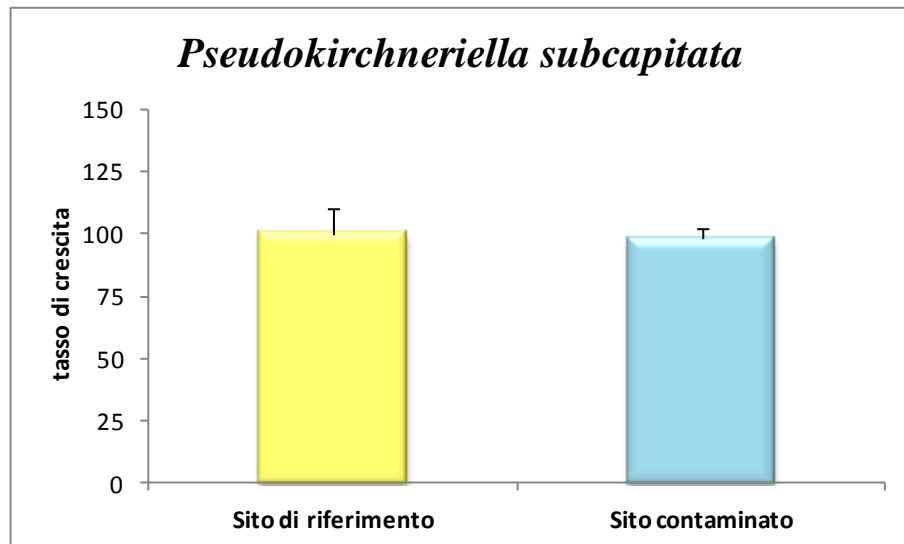


Fig. 3. Effetti indotti sul tasso di crescita di *P. subcapitata* in seguito alla esposizione per 72h all'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti prelevati nei due siti. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo di campo (sito di riferimento) e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

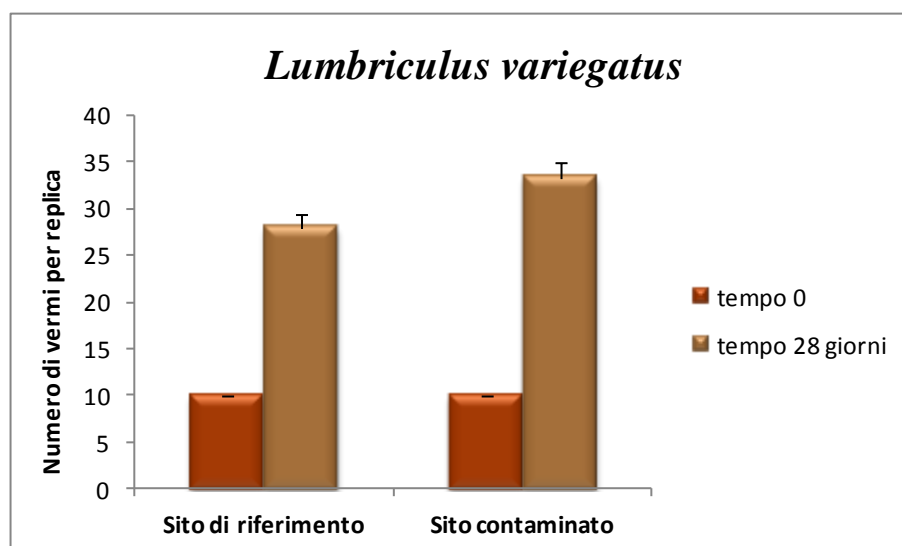


Fig. 4. Effetti indotti sulla vitalità di *L. variegatus* in seguito alla esposizione per 28 giorni ai sedimenti prelevati nei due siti. I dati rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

#### 4.1.1.2. Endpoint di alto livello

I dati della vitalità cellulare a 3h e 24h (fig. 5) e del tasso di replicazione (fig. 6) del protozoo *Dictyostelium discoideum* esposto all'acqua interstiziale ottenuta dal sedimento contaminato non hanno mostrato significative differenze rispetto al controllo di campo (sito di riferimento).

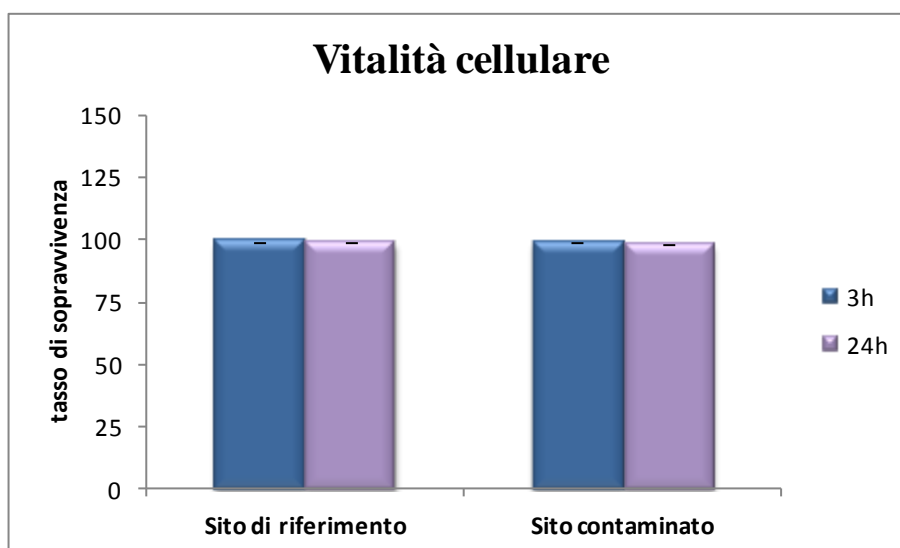


Fig. 5. Effetti indotti sulla vitalità cellulare di *D. discoideum* in seguito alla esposizione per 3h e 24h all'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti prelevati nei due siti. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo di campo (sito di riferimento) e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

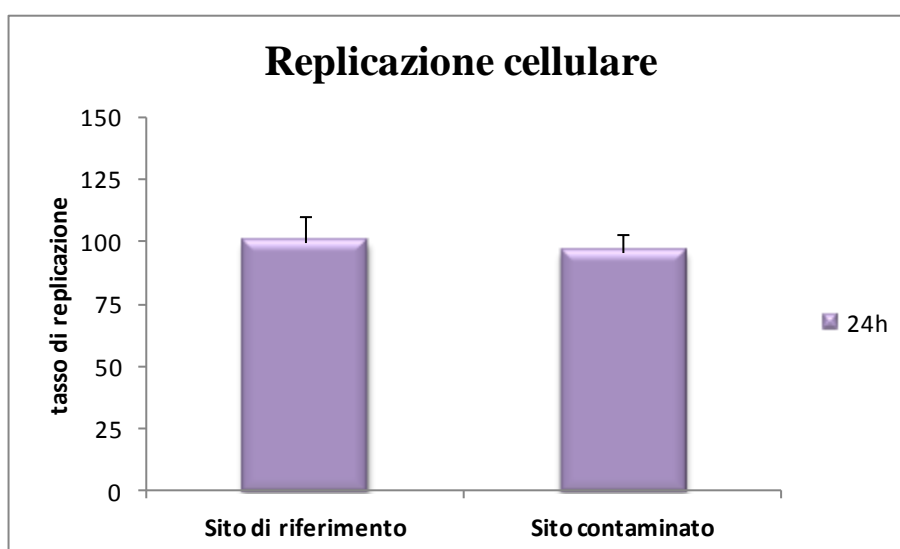


Fig. 6. Effetti sul tasso di replicazione cellulare di *D. discoideum* riscontrabili dopo 24h di esposizione all'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti prelevati nei due siti. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo di campo (sito di riferimento) e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

### 4.1.1.3. Biomarker subletali

La stabilità delle membrane lisosomiali (fig. 7) e il tasso di endocitosi (fig. 8) degli organismi esposti all'acqua interstiziale del campione contaminato non hanno mostrato variazioni rispetto al sito di riferimento per entrambi i tempi di esposizione (3h e 24h).

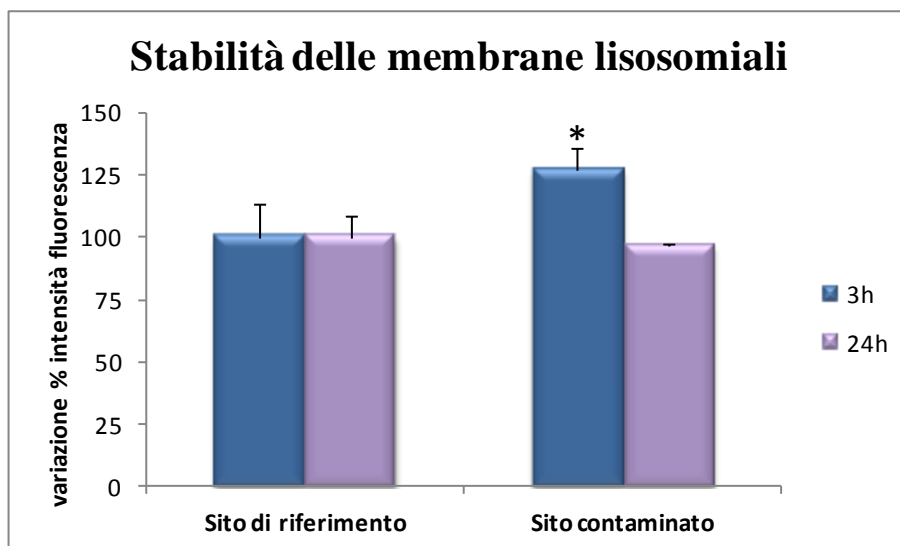


Fig. 7. Effetti indotti sulla stabilità delle membrane lisosomiali di *D. discoideum* in seguito all'esposizione per 3h e 24h dei protozoi all'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti prelevati nel sito di riferimento e nel sito contaminato. I dati, ottenuti mediante NRRT assay con osservazione in microscopia a fluorescenza sono espressi in percentuale rispetto al controllo di campo (sito di riferimento) e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche. \*= valori statisticamente significativi  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

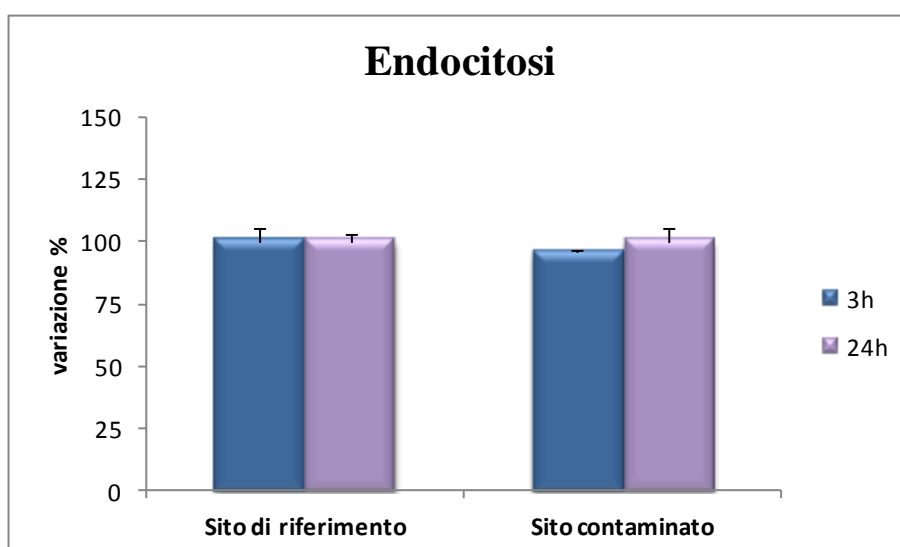


Fig. 8. Effetti sul tasso di endocitosi di *D. discoideum* riscontrabili dopo esposizione per 3h e 24h all'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti prelevati nei due siti. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo di campo (sito di riferimento) e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

#### 4.1.1.4. Biomarker di genotossicità

Come si può osservare rispettivamente dalle figure 9 e 10 la valutazione del danno al DNA (Comet assay) e della frequenza dei micronuclei nel protozoo *Dictyostelium discoideum* esposto all'acqua interstiziale del campione contaminato non ha evidenziato effetti statisticamente significativi rispetto al controllo di campo.

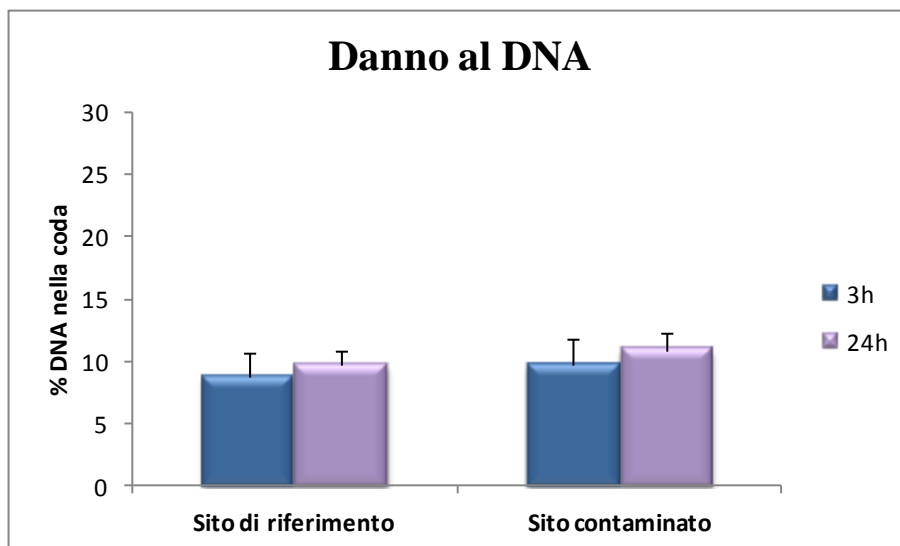


Fig. 9. Danno al DNA (Comet assay) indotto in *D. discoideum* in seguito all'esposizione per 3h e 24h all'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti prelevati nel sito di riferimento e nel sito conatminato. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo di campo (sito di riferimento) e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

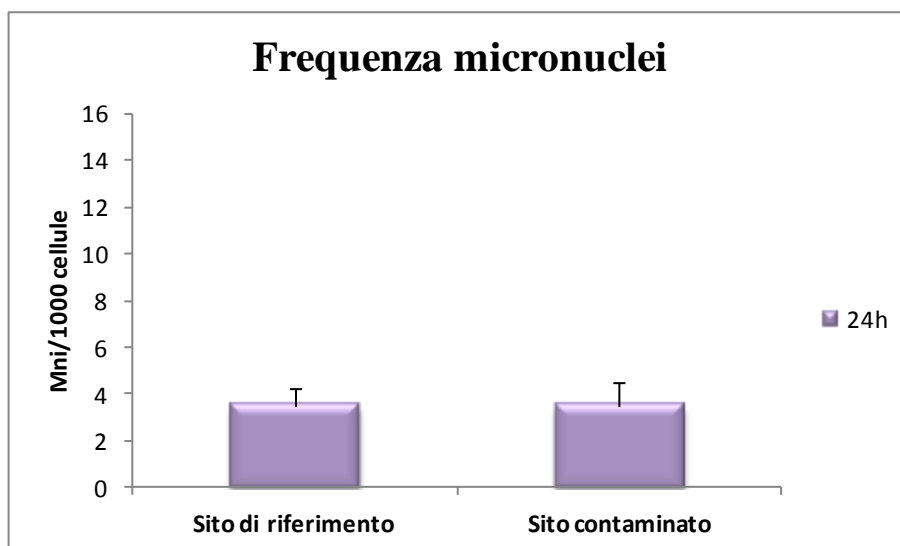


Fig. 10. Effetti indotti sulla frequenza di MNi in *D. discoideum* dopo esposizione per 24h dei protozoi all'acqua interstiziale ottenuta dai sedimenti campionati nei due siti. I dati espressi come numero di micronuclei su 1000 cellule, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche.



### 4.1.2. Esperimenti di laboratorio

Vengono riportati di seguito i risultati ottenuti nello studio degli effetti indotti sull'ameba sociale *D. discoideum* dalla miscela DDX (732.5ppb) e  $\text{Hg}^{2+}$  (7.8ppm).

#### 4.1.2.1. Endpoint di alto livello

Il tasso di vitalità cellulare delle amebe esposte per 3h e per 24h al DDX (fig.11) e al  $\text{Hg}^{2+}$  (fig.12) non ha mostrato variazioni significative rispetto al controllo.

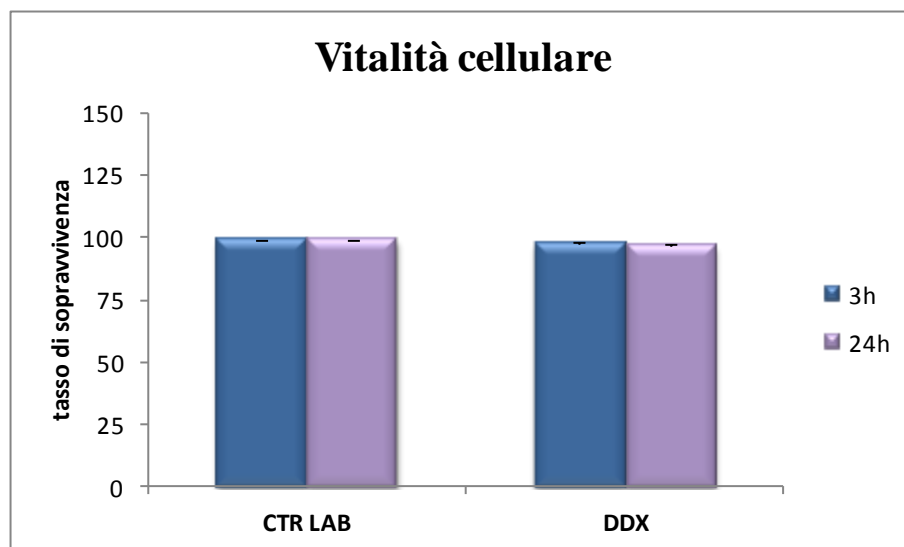


Fig. 11. Effetti indotti da DDX (732.5ppb) sulla vitalità cellulare di *D. discoideum* dopo esposizione per 3h e 24h. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

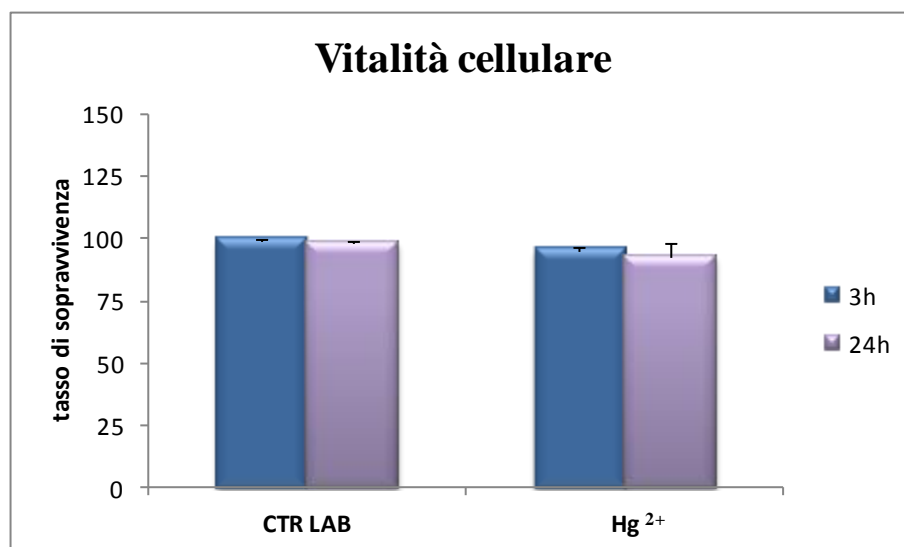


Fig. 12. Effetti indotti da  $\text{Hg}^{2+}$  (7.8ppm) sulla vitalità cellulare di *D. discoideum* dopo esposizione per 3h e 24h. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche.

Il tasso di replicazione ha mostrato una diminuzione statisticamente significativa in seguito ad esposizione delle amebe per 24h sia al DDX (-61%, fig. 13) che al  $Hg^{2+}$  (-71%, fig. 14) rispetto ai valori del controllo.

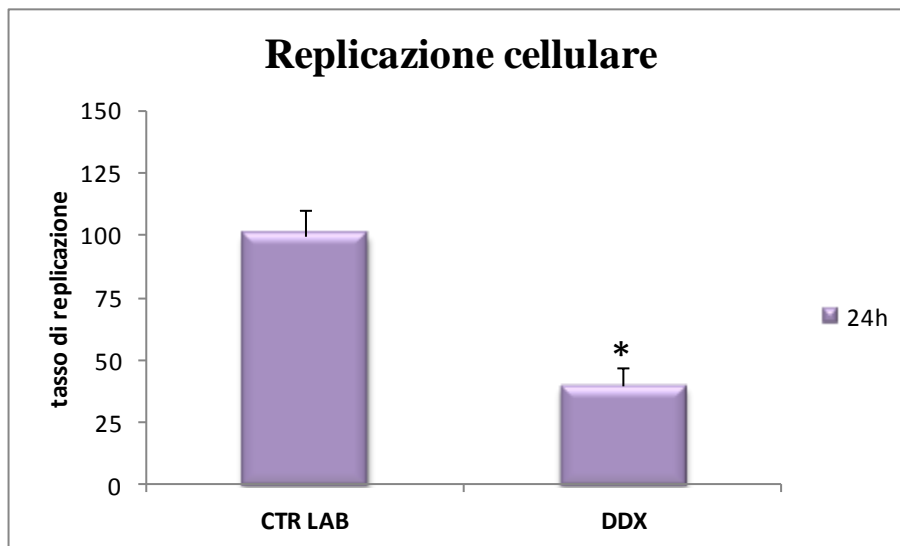


Fig. 13. Effetti indotti da DDX (732.5ppb) sul tasso di replicazione di *D. discoideum* dopo esposizione per 24h. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche. \*= valori statisticamente significativi  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

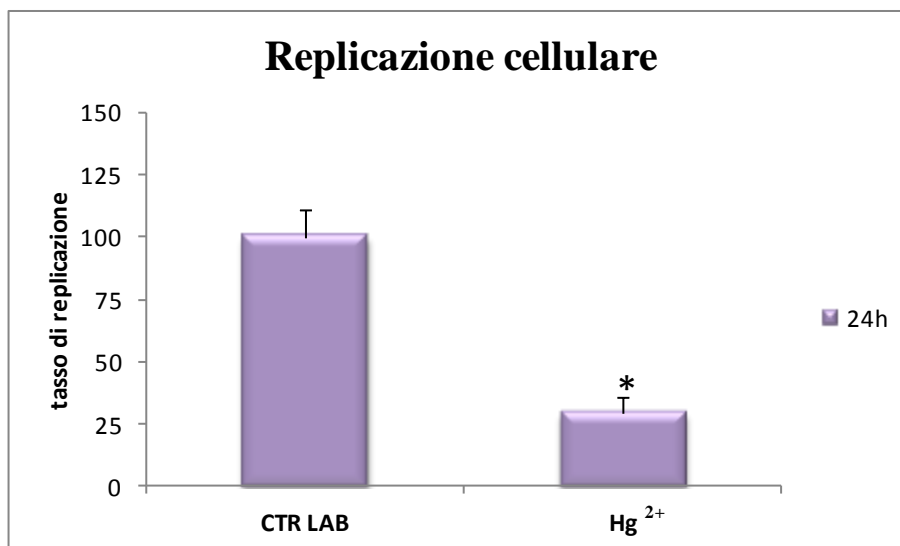


Fig. 14. Effetti indotti da  $Hg^{2+}$  (7.8ppm) sul tasso di replicazione di *D. discoideum* dopo esposizione per 24h. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche. \*= valori statisticamente significativi  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

#### 4.1.2.2. Biomarker subletali

L'esposizione di *D. discoideum* a DDX ha determinato una diminuzione statisticamente significativa della stabilità delle membrane lisosomiali (SML, fig. 15) per entrambi i tempi di esposizione, diminuzione che è risultata più marcata dopo 3h di incubazione con DDX.

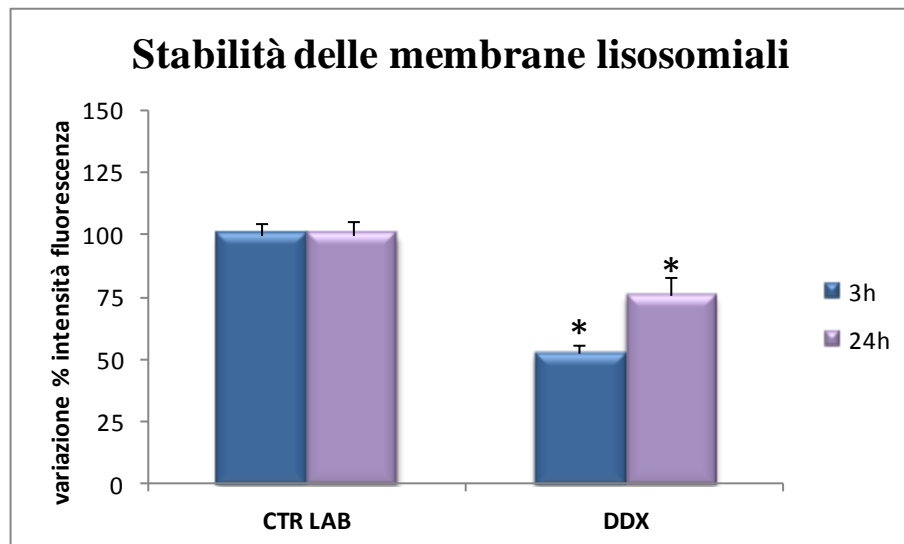


Fig. 15. Effetti indotti da DDX (732.5ppb) sulla stabilità delle membrane lisosomiali di *D. discoideum* dopo esposizione per 3h e 24h. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche. \*= valori statisticamente significativi  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

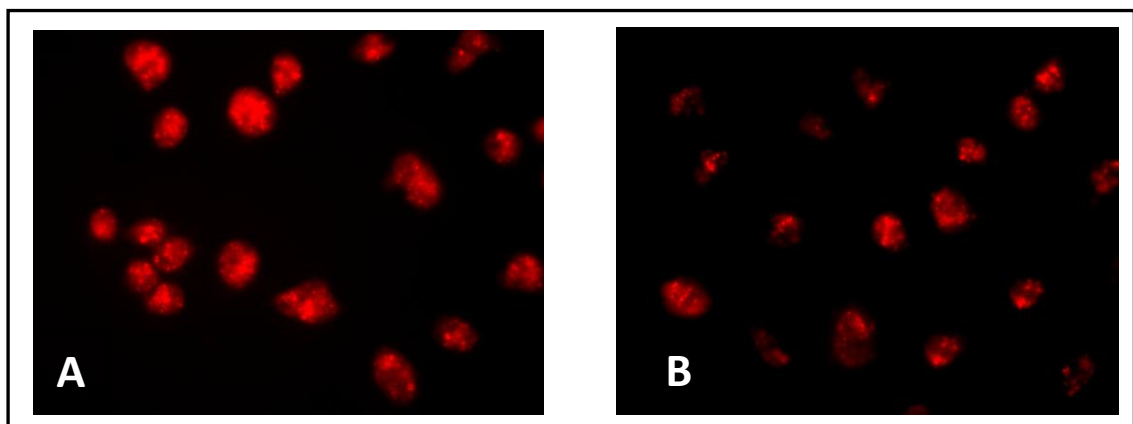
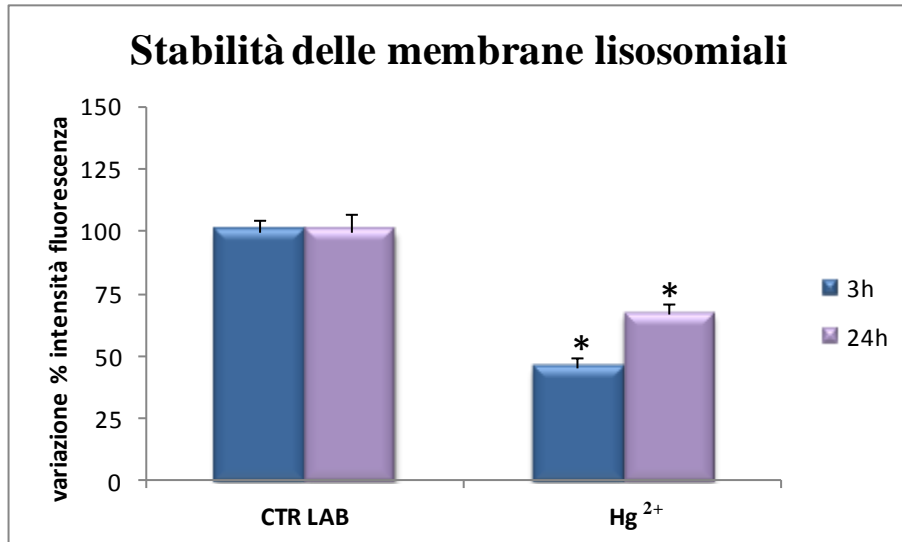


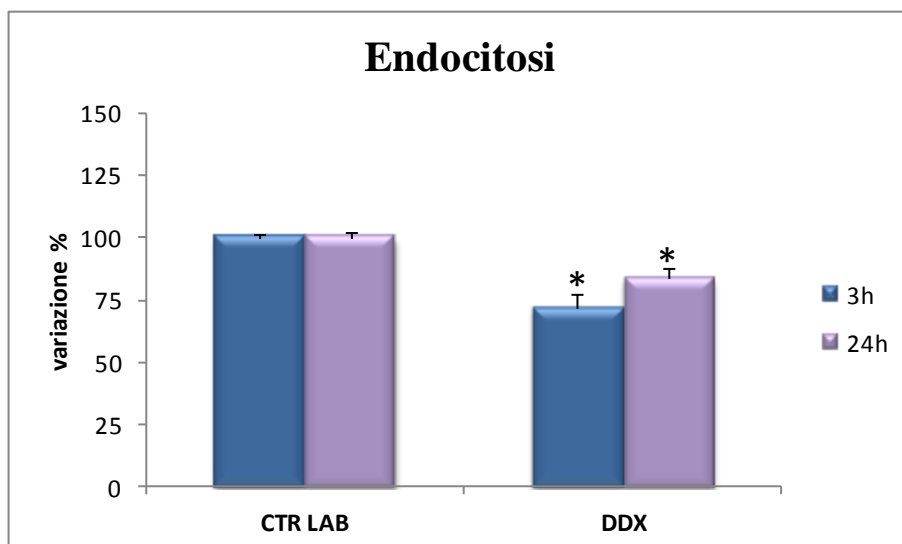
Fig. 16. Immagini rappresentative della colorazione con NR in *D. discoideum* esposto per 3h alla soluzione di controllo e al DDX. Rispetto alle cellule di controllo (A), nelle cellule trattate con l'inquinante (B) si può notare una diminuzione del colorante NR, indice di una destabilizzazione delle membrane lisosomiali.

Anche l'esposizione per 3h e per 24h delle amebe al metallo pesante  $Hg^{2+}$  ha causato una diminuzione della SML, raggiungendo un valore pari a  $-55\%$  rispetto al controllo dopo 3h di incubazione (figura 17).



**Fig. 17.** Effetti indotti da  $Hg^{2+}$  (7.8ppm) sulla stabilità delle membrane lisosomiali di *D. discoideum* dopo esposizione per 3h e 24h. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche. \*= valori statisticamente significativi  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

Il tasso di endocitosi delle amebe esposte ai contaminanti ha mostrato una variazione statisticamente significativa rispetto al controllo; tale diminuzione come per il parametro SML, è risultata più marcata dopo 3h di incubazione con gli inquinanti (figure 18 e 19),



**Fig. 18.** Effetti indotti da DDX (732.5ppb) sul tasso di endocitosi di *D. discoideum* dopo esposizione per 3h e 24h. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche. \*= valori statisticamente significativi  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

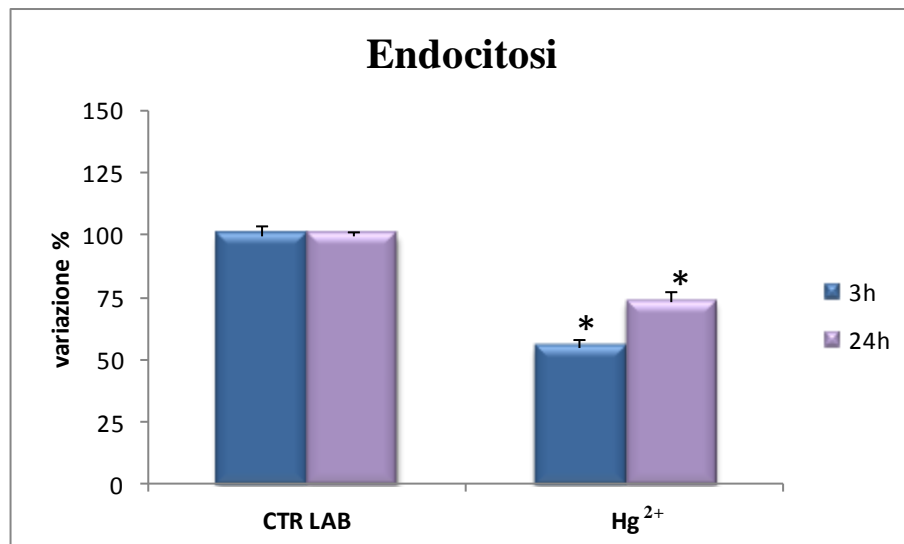


Fig. 19. Effetti indotti da Hg<sup>2+</sup> (7.8ppm) sul tasso di endocitosi di *D. discoideum* dopo esposizione per 3h e 24h. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche. \*= valori statisticamente significativi  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

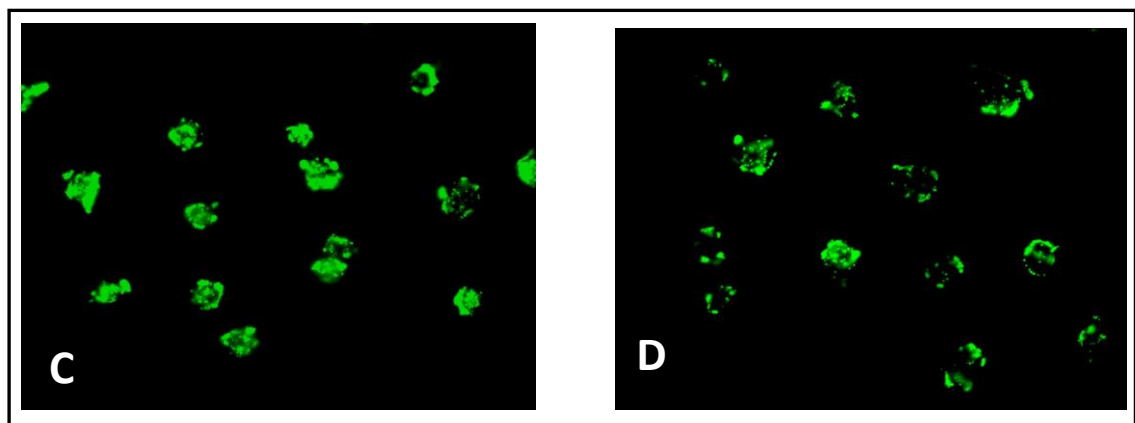


Fig. 20. Immagini rappresentative del tasso di endocitosi di Bioparticles (batteri fluorescenti) in *D. discoideum* esposto per 3h alla soluzione di controllo e al Hg<sup>2+</sup>. Rispetto alle cellule di controllo (C), nelle cellule trattate con l'inquinante (D) si può notare una diminuzione della quantità di batteri assunta dalle cellule mediante endocitosi.

#### 4.1.2.3. Determinazione della funzionalità mitocondriale

L'uso della sonda MitoTracker ha evidenziato un decremento di oltre il 50% in seguito all'esposizione di *D. discoideum* per 24h al DDX, mentre non sono state rilevate differenze significative in seguito al trattamento per 3h delle amebe con l'inquinante (figura 21).

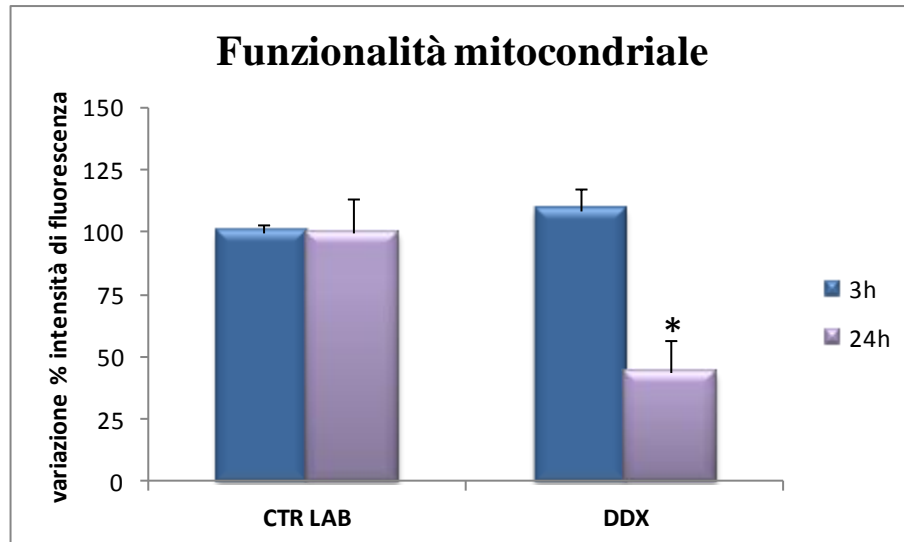


Fig. 21. Effetti indotti da DDX (732.5ppb) dopo esposizione per 3h e 24h sulla funzionalità mitocondriale in *D. discoideum*, valutata mediante l'utilizzo della sonda MitoTracker. I dati, espressi come variazioni percentuali rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche.

\* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

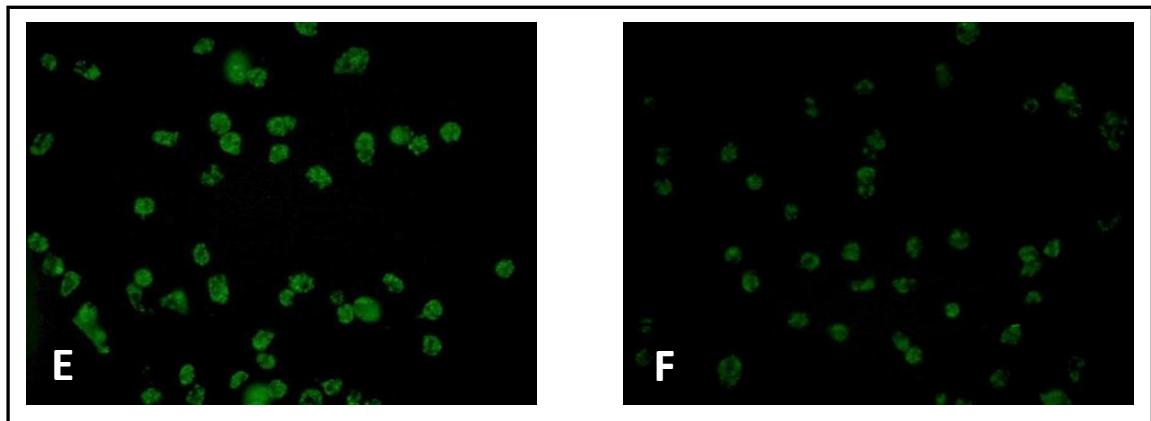


Fig. 22. Immagini rappresentative della colorazione di *D. discoideum* con la sonda fluorescente MitoTracker dopo esposizione per 24h alla soluzione di controllo e al DDX. Rispetto alle cellule di controllo (E), nelle cellule trattate con l'inquinante(F) si può notare una diminuzione della colorazione, corrispondente ad una riduzione del potenziale della membrana mitocondriale interna.

Il potenziale della membrana mitocondriale interna, evidenziato dalla sonda MitoTracker, ha presentato una diminuzione di circa il 50% anche dopo esposizione delle amebe per 24h al  $\text{Hg}^{2+}$ , mentre a 3h non sono state osservate variazioni rispetto al controllo (figura 23).

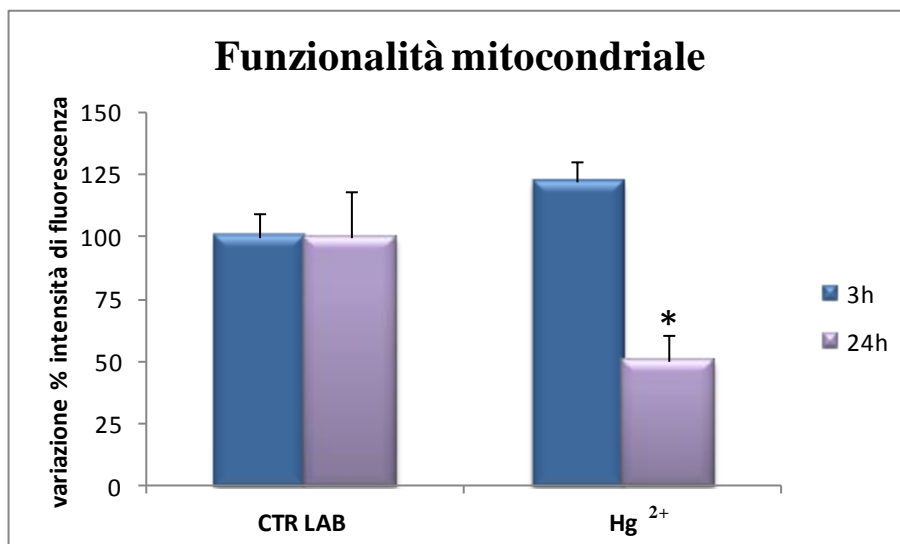


Fig. 23. Effetti indotti da  $\text{Hg}^{2+}$  (7.8ppm) dopo esposizione per 3h e 24h sulla funzionalità mitocondriale in *D. discoideum*, valutata mediante l'utilizzo della sonda MitoTracker. I dati, espressi come variazioni percentuali rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

#### 4.1.2.4. Diluizioni della miscela DDX

Vengono riportati di seguito i risultati ottenuti esponendo l'ameba sociale *Dictyostelium discoideum* alla miscela di inquinanti organici DDX diluita 1:2, 1:5 e 1:100.

Come si può osservare è necessario diluire 100 volte la miscela DDX per ripristinare nelle amebe valori simili al controllo per i parametri tasso di replicazione (fig. 24) e stabilità delle membrane lisosomiali (fig. 25).

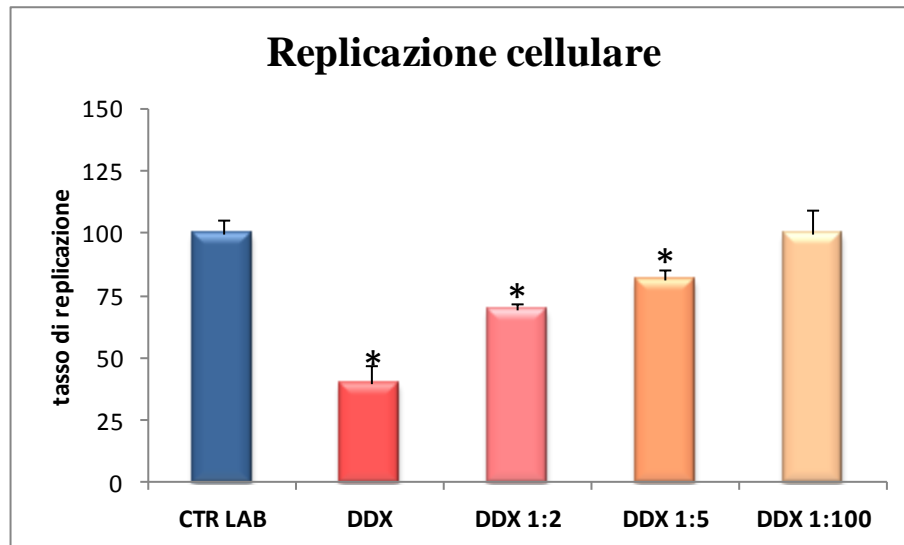


Fig. 24. Effetti sul tasso di replicazione cellulare di *D. discoideum* riscontrabili dopo esposizione per 24h rispettivamente alla miscela DDX (732.,5ppb) e alle diluizioni 1:2, 1:5 e 1:100. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media±SD di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

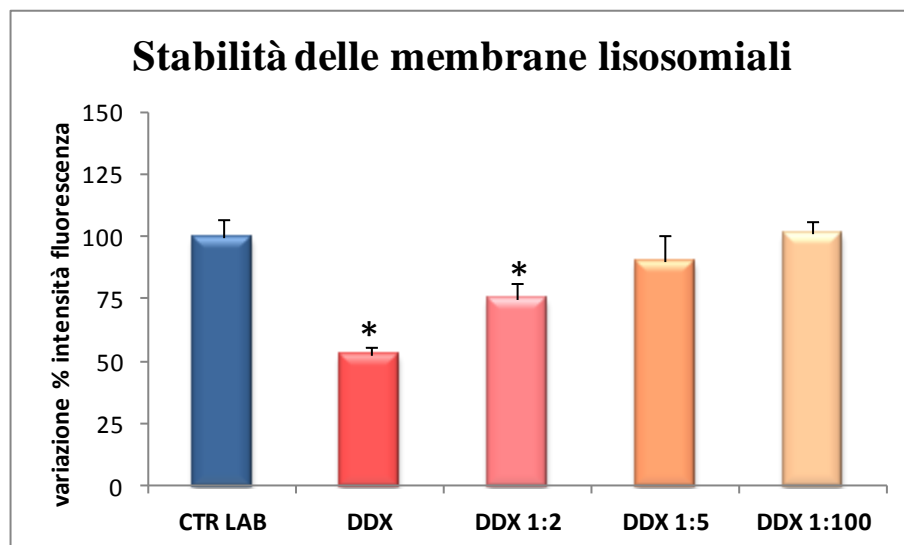


Fig. 25. Effetti indotti dalla miscela DDX (732.,5ppb) e dalle diluizioni 1:2, 1:5 e 1:100 sulla stabilità delle membrane lisosomiali in *D. discoideum* valutata mediante Neutral Red Retention Time assay con osservazione in microscopia a fluorescenza dopo esposizione dei protozoi per 3h. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media±SD di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).



Anche per quanto riguarda il tasso di endocitosi è necessario diluire la miscela di inquinanti organici 100 volte per non avere più effetti di riduzione statisticamente significativa rispetto al controllo (fig. 26).

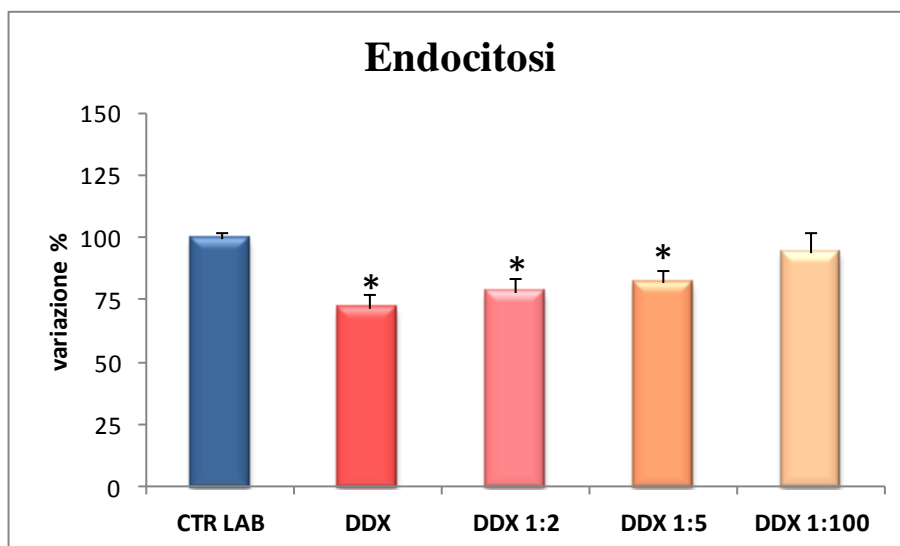


Fig. 26. Effetti sul tasso di endocitosi di *D. discoideum* riscontrabili dopo esposizione per 3h alla miscela DDX (732.,5ppb) e alle diluizioni 1:2, 1:5 e 1:100. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media $\pm$ SD di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

#### 4.1.2.5. Determinazione delle specie reattive dell'ossigeno

L'utilizzo della sonda fluorescente TEMPO-9-AC, specifica per il rilevamento dell'anione superossido e del radicale idrossile, ha evidenziato un aumento dell'intensità di fluorescenza delle cellule di *D. discoideum* esposte per 3h al DDX (figura 27); l'esposizione al  $\text{Hg}^{2+}$  ne ha invece determinato un significativo aumento ad entrambi i tempi di esposizione (3h e 24h) (figura 28).

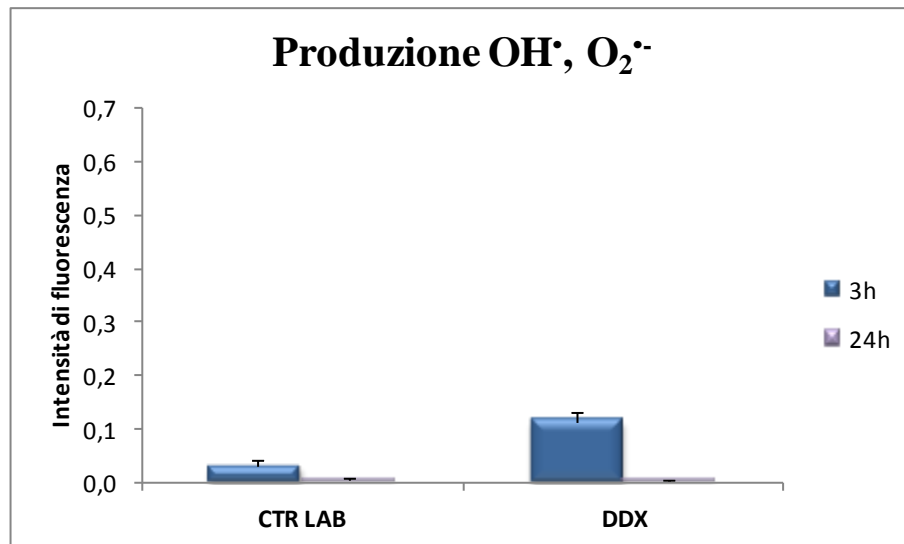


Fig. 27. Effetti indotti da DDX (732.5ppb) dopo esposizione per 3h e 24h sulla produzione di radicale  $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  in *D. discoideum*, valutata mediante l'utilizzo della sonda TEMPO-9-AC con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche.

\* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

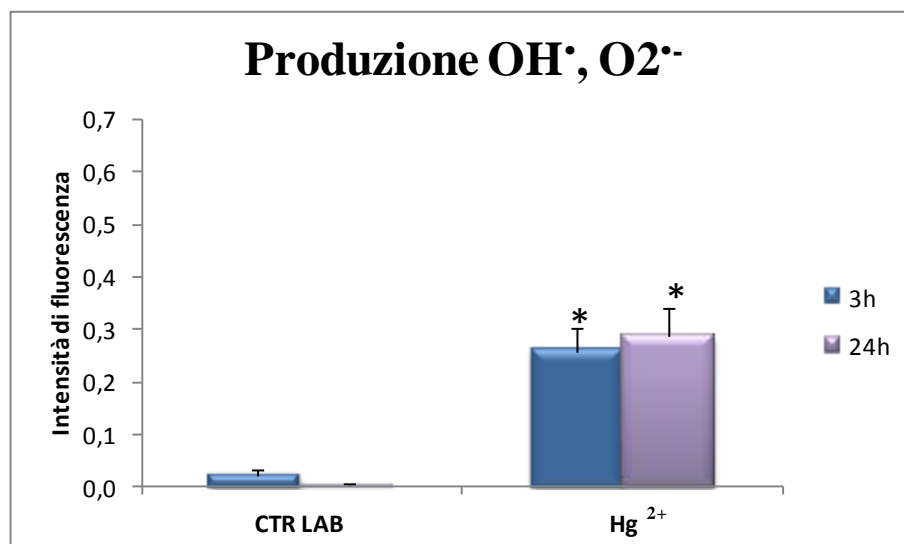
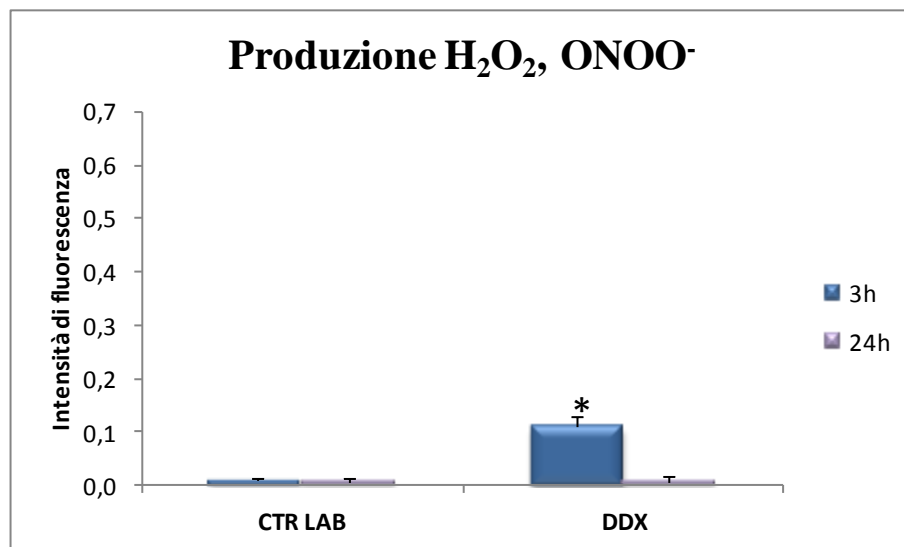
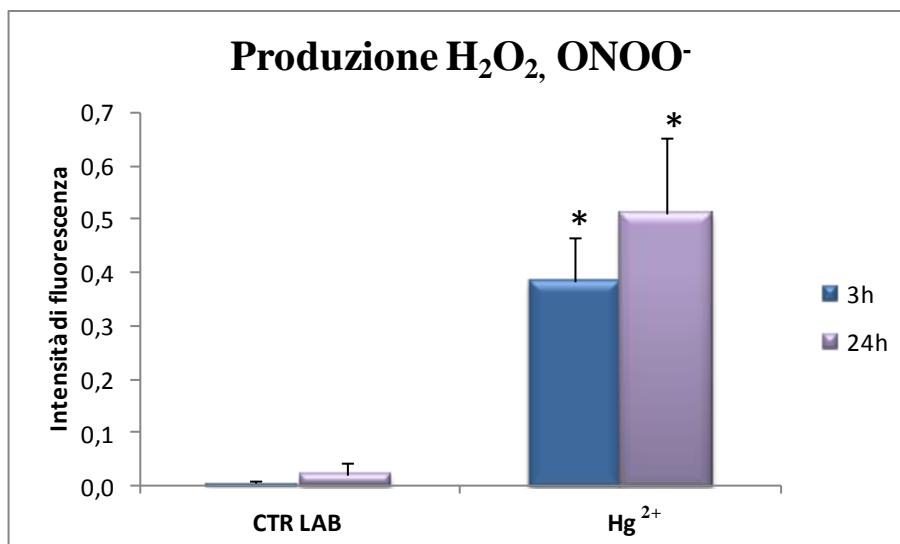


Fig. 28. Effetti indotti da  $\text{Hg}^{2+}$  (7.8ppm) dopo esposizione per 3h e 24h sulla produzione di  $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  in *D. discoideum*, valutata mediante l'utilizzo della sonda TEMPO-9-AC con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

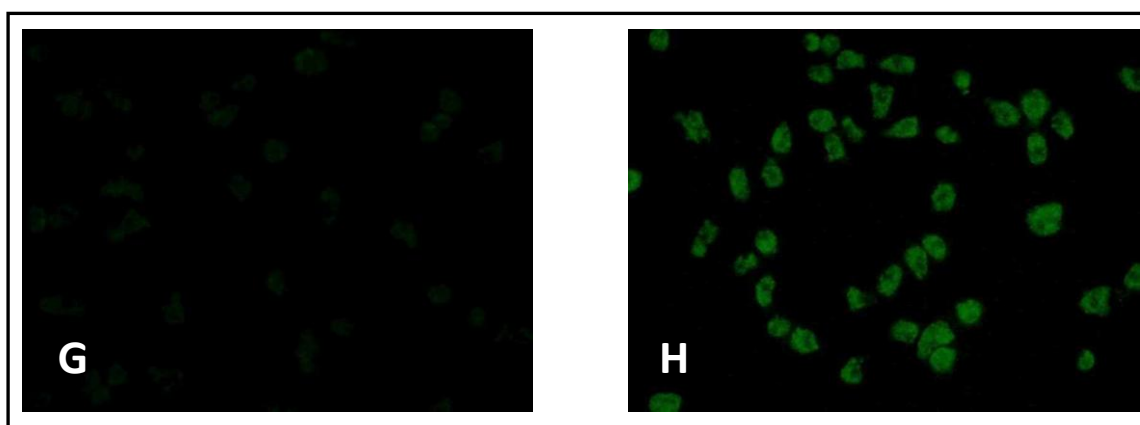
I risultati ottenuti mediante l'utilizzo della sonda DHR 123, in grado di evidenziare la generazione di perossido di idrogeno e perossinitrito, hanno presentato un trend simile a quello della sonda TEMPO, indicando un significativo incremento della fluorescenza delle amebe esposte per 3h al DDX, con la massima intensità degli organismi esposti per entrambi i tempi al  $\text{Hg}^{2+}$  (figure 29-30).



**Fig. 29.** Effetti indotti da DDX (732.5ppb) dopo esposizione per 3h e 24h sulla produzione di perossido di idrogeno e perossinitrito in *D. discoideum*, valutata mediante l'utilizzo della sonda DHR 123 con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).



**Fig. 30.** Effetti indotti da Hg<sup>2+</sup> (7.8ppm) dopo esposizione per 3h e 24h sulla produzione di perossido di idrogeno e perossinitrito in *D. discoideum*, valutata mediante l'utilizzo della sonda DHR 123 con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati rappresentano la media±DS di almeno 5 repliche. \* = p < 0.05 (Mann-Whitney U test).



**Fig. 31.** Immagini rappresentative della colorazione di *D. discoideum* con la sonda fluorescente TEMPO dopo esposizione per 24h alla soluzione di controllo e al Hg<sup>2+</sup>. Rispetto alle cellule di controllo (G), nelle cellule trattate con l'inquinante (H) si può notare un aumento della colorazione, corrispondente ad una maggiore produzione di perossido di idrogeno e perossinitrito.

#### 4.1.2.6. Determinazione della produzione di lipoperossidi e del contenuto lisosomiale di lipofuscine

La sonda BODIPY, utilizzata per determinare la produzione di lipoperossidi, non ha evidenziato differenze significative nell'intensità di fluorescenza delle cellule di *D. discoideum* esposte al DDX (figura 32).

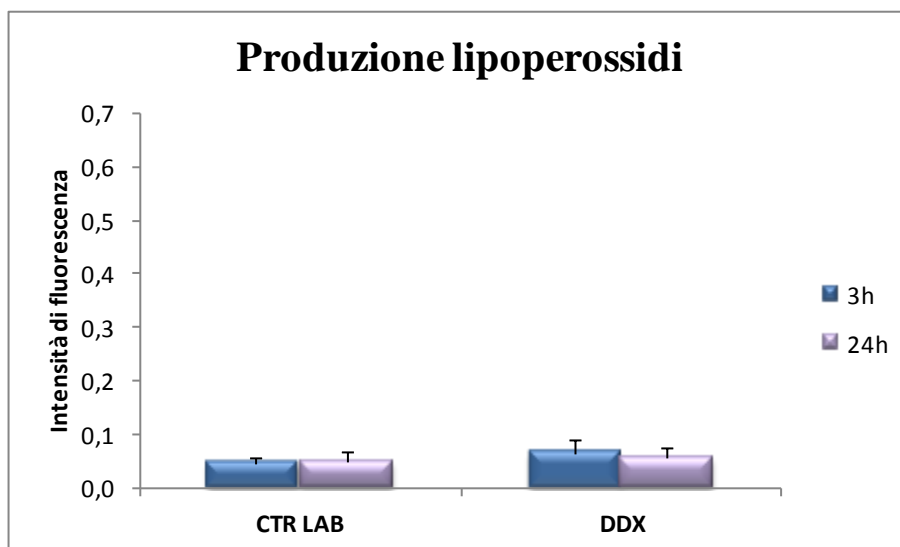


Fig. 32. Effetti indotti da DDX (732.5ppb) dopo esposizione per 3h e 24h sulla produzione di lipoperossidi in *D. discoideum*, valutata mediante l'utilizzo della sonda BODIPY con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati rappresentano la media $\pm$ DS di almeno cinque repliche.

Un significativo aumento dell'intensità di fluorescenza della sonda BODIPY è stato invece riscontrato esponendo le amebe al  $\text{Hg}^{2+}$ ; tale incremento è risultato particolarmente elevato al tempo di incubazione di 24h (figura 33).

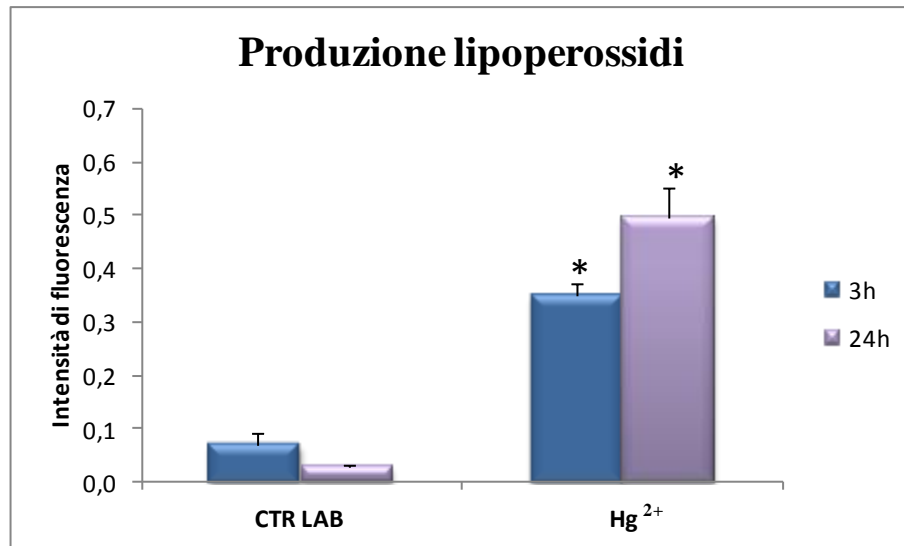


Fig. 33. Effetti indotti da  $\text{Hg}^{2+}$  (7,8ppm) dopo esposizione per 3h e 24h sulla produzione di lipoperossidi in *D. discoideum*, valutata mediante l'utilizzo della sonda BODIPY con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati rappresentano la media $\pm$ DS di almeno cinque repliche. \* =  $p < 0,05$  (Mann-Whitney *U* test).

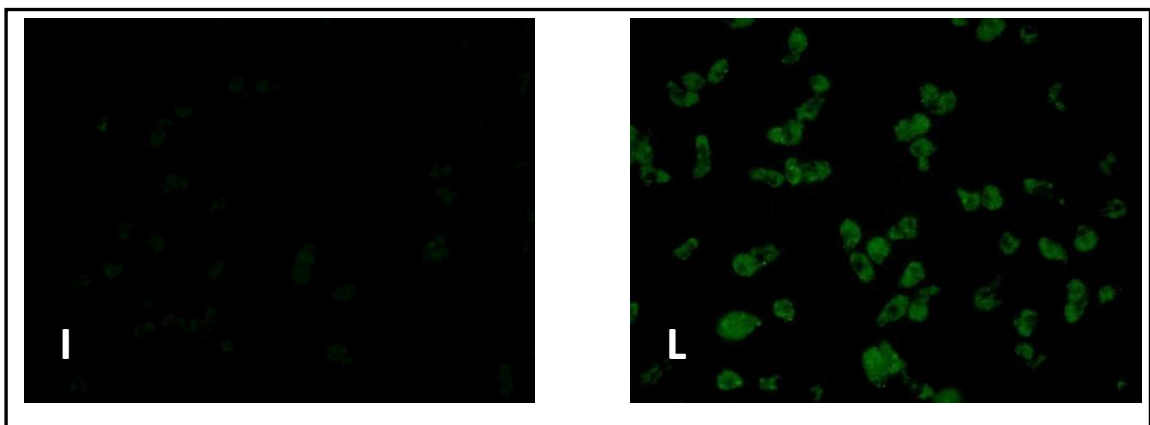
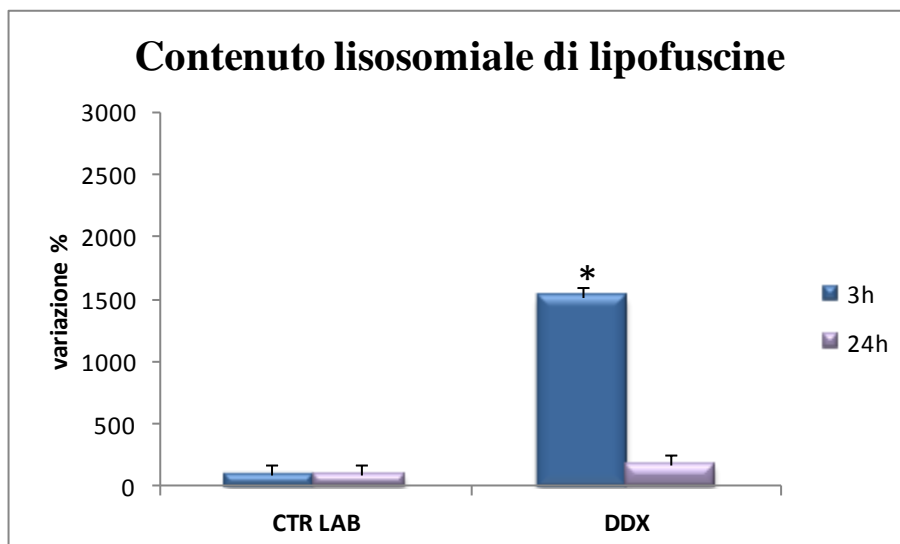


Fig. 34. Immagini rappresentative della colorazione di *D. discoideum* con la sonda fluorescente BODIPY dopo esposizione per 24h alla soluzione di controllo e al  $\text{Hg}^{2+}$ . Rispetto alle cellule di controllo (I), nelle cellule trattate con l'inquinante (L) si può notare un aumento colorazione, corrispondente ad una maggiore produzione di lipoperossidi.

Per quanto riguarda il contenuto lisosomiale di lipofuscine, i risultati mostrano un incremento statisticamente significativo di tale parametro in seguito all'esposizione per 3h delle amebe mentre dopo 24h si osservano valori simili al controllo (figure 35).



**Fig. 35.** Effetti indotti da DDX (732.5 ppb) dopo esposizione per 3h e 24h sul contenuto lisosomiale di lipofuscine in *D. discoideum*. I dati, espressi come variazioni percentuali rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno cinque repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

L'esposizione delle amebe al  $\text{Hg}^{2+}$  ha determinato un notevole incremento del contenuto lisosomiale di lipofuscine rispetto al controllo, con effetto massimo nelle cellule incubate per 3h con il contaminante (fig. 36).

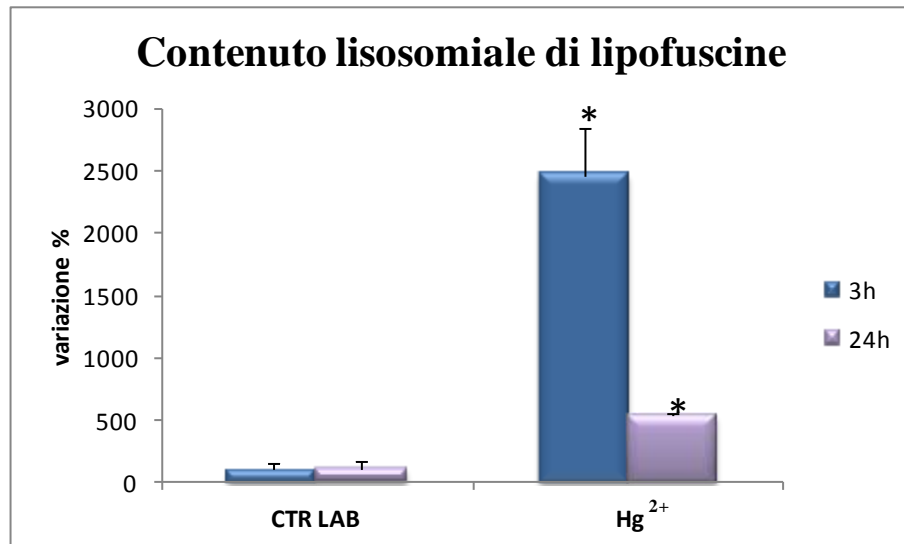


Fig. 36. Effetti indotti da  $\text{Hg}^{2+}$  (7.8ppm) dopo esposizione per 3h e 24h sul contenuto lisosomiale di lipofuscine in *D. discoideum*. I dati, espressi come variazioni percentuali rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno cinque repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

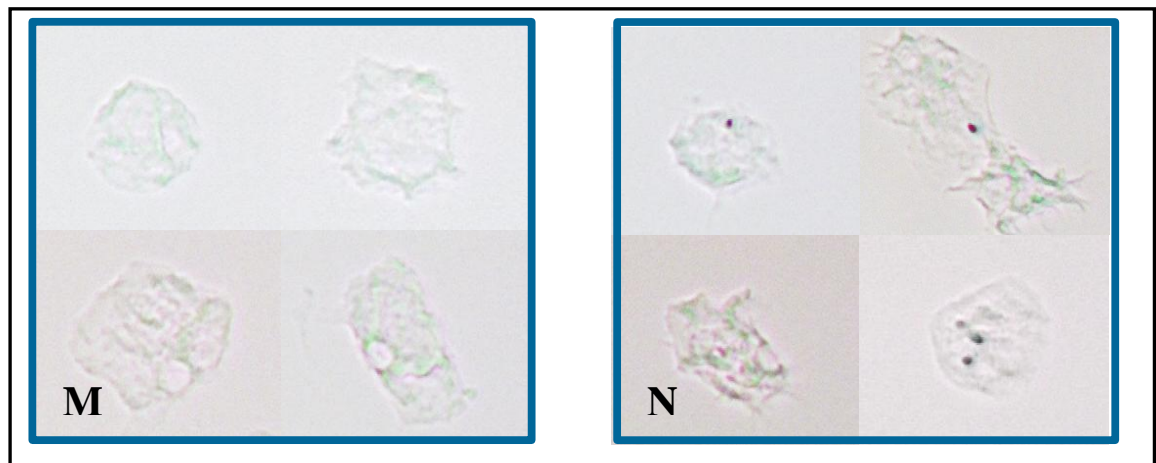


Fig. 37. Immagini rappresentative del contenuto lisosomiale di lipofuscine in *D. discoideum* esposto per 3h alla soluzione di controllo e al  $\text{Hg}^{2+}$ . Rispetto alle cellule di controllo (M), nelle cellule trattate con l'inquinante (N) si può notare un aumento di tali granuli lisosomiali.



#### 4.1.2.7. Contenuto di GSH

Il contenuto di GSH, valutato mediante l'utilizzo della sonda fluorescente CMFDA, è risultato drasticamente diminuito rispetto ai valori di controllo nelle amebe esposte per 3h e per 24h al DDX e al  $Hg^{2+}$  (figure 38 e 40).

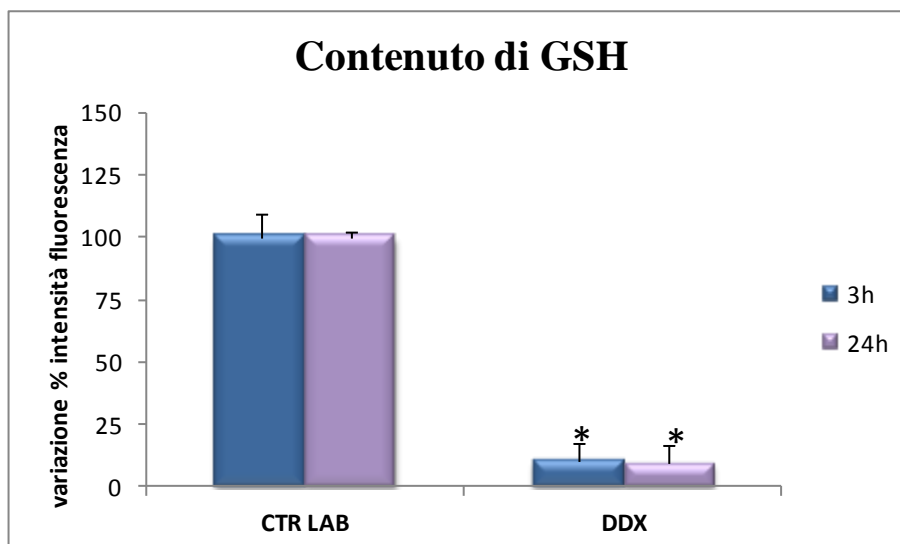


Fig. 38. Effetti indotti da DDX (732.5 ppb) dopo esposizione per 3h e 24h sul contenuto di GSH in *D. discoideum*, valutato mediante l'utilizzo della sonda CMFDA con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati, espressi come variazioni percentuali rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno cinque repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

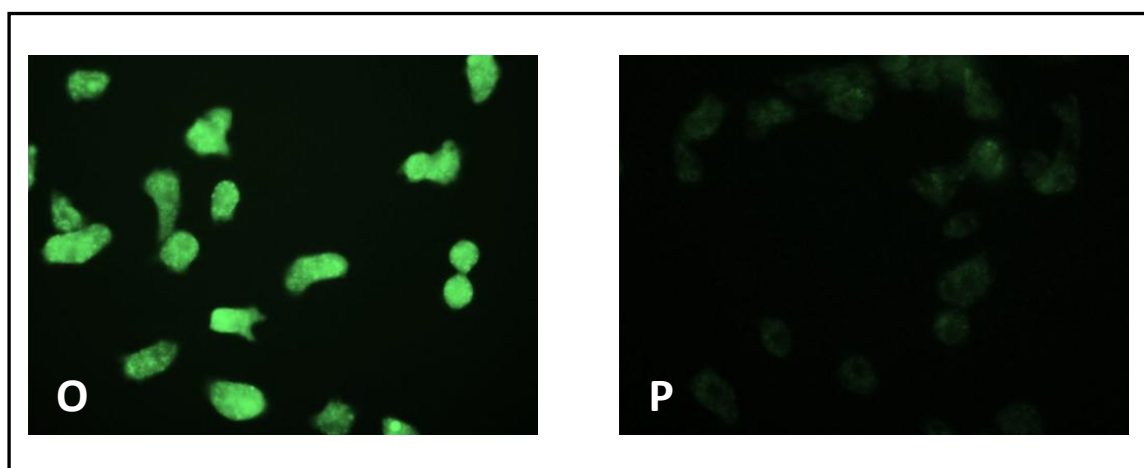


Fig. 39. Immagini rappresentative della colorazione *D. discoideum* con la sonda fluorescente CMFDA dopo esposizione per 3h alla soluzione di controllo e al DDX. Rispetto alle cellule di controllo (O), nelle cellule trattate con l'inquinante (P), si può notare una riduzione dell'intensità di fluorescenza, indice di una diminuzione del contenuto di GSH.

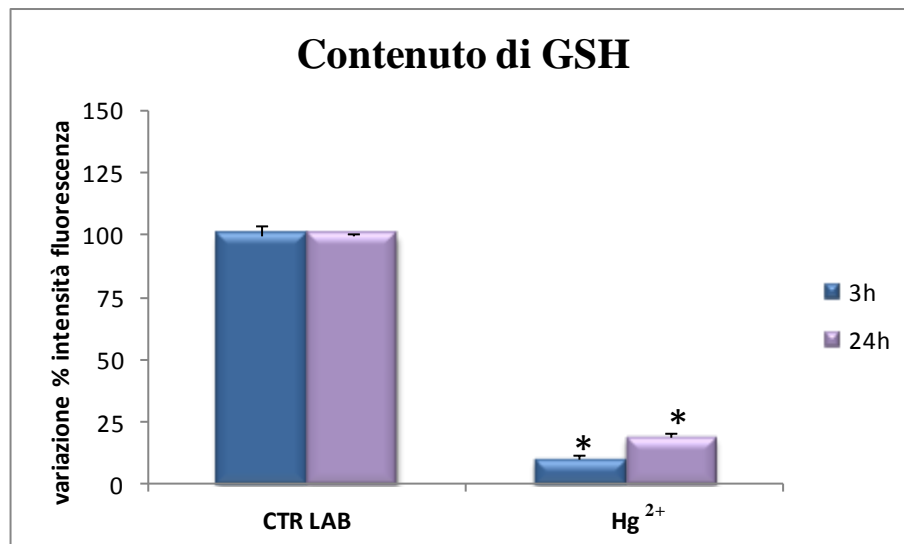


Fig. 40. Effetti indotti da Hg<sup>2+</sup> (7.8ppm) dopo esposizione per 3h e 24h sul contenuto di GSH in *D. discoideum*, valutato mediante l'utilizzo della sonda CMFDA con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati, espressi come variazioni percentuali rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. \* = p < 0.05 (Mann-Whitney U test).

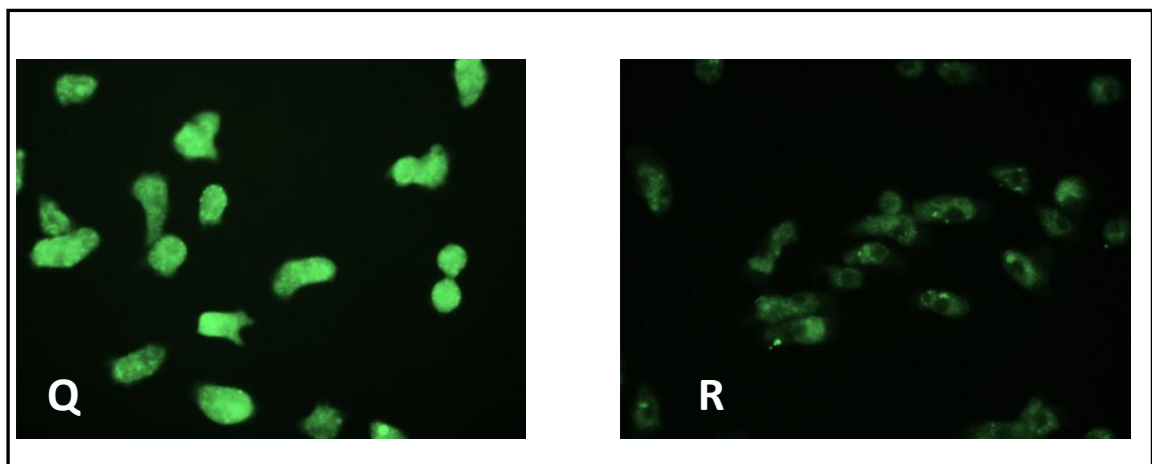


Fig. 41. Immagini rappresentative della colorazione di *D. discoideum* con la sonda fluorescente CMFDA dopo esposizione per 3h alla soluzione di controllo e al Hg<sup>2+</sup>. Rispetto alle cellule di controllo (Q), nelle cellule trattate con l'inquinante (R), si può notare una riduzione dell'intensità di fluorescenza, indice di una diminuzione del contenuto di GSH.

#### 4.1.2.8. Determinazione del danno ossidativo al DNA

Per verificare i potenziali effetti genotossici provocati da DDX e  $Hg^{2+}$  in *D. discoideum*, è stato valutato su queste cellule il danno al DNA sia mediante Comet assay standard sia introducendo in questa metodica l'utilizzo degli enzimi ENDOIII e FPG in grado di evidenziare anche il danno ossidativo. I risultati del Comet assay alcalino modificato mediante l'aggiunta dell'enzima FPG hanno indicato un significativo incremento del danno al DNA ossidativo nelle cellule esposte per 3h ad entrambe le sostanze, che è risultato maggiore per il  $Hg^{2+}$  (figure 42 e 43). Dopo 24h, i dati ottenuti dal Comet assay standard e mediante l'utilizzo degli enzimi hanno indicato effetti significativi nelle amebe esposte sia al DDX che al  $Hg^{2+}$ . I risultati hanno chiaramente indicato effetti maggiori nelle cellule esposte al  $Hg^{2+}$ , in termini sia di danno al DNA sia di danno ossidativo al DNA, valutato mediante l'utilizzo dell'enzima FPG (figure 42 e 43).

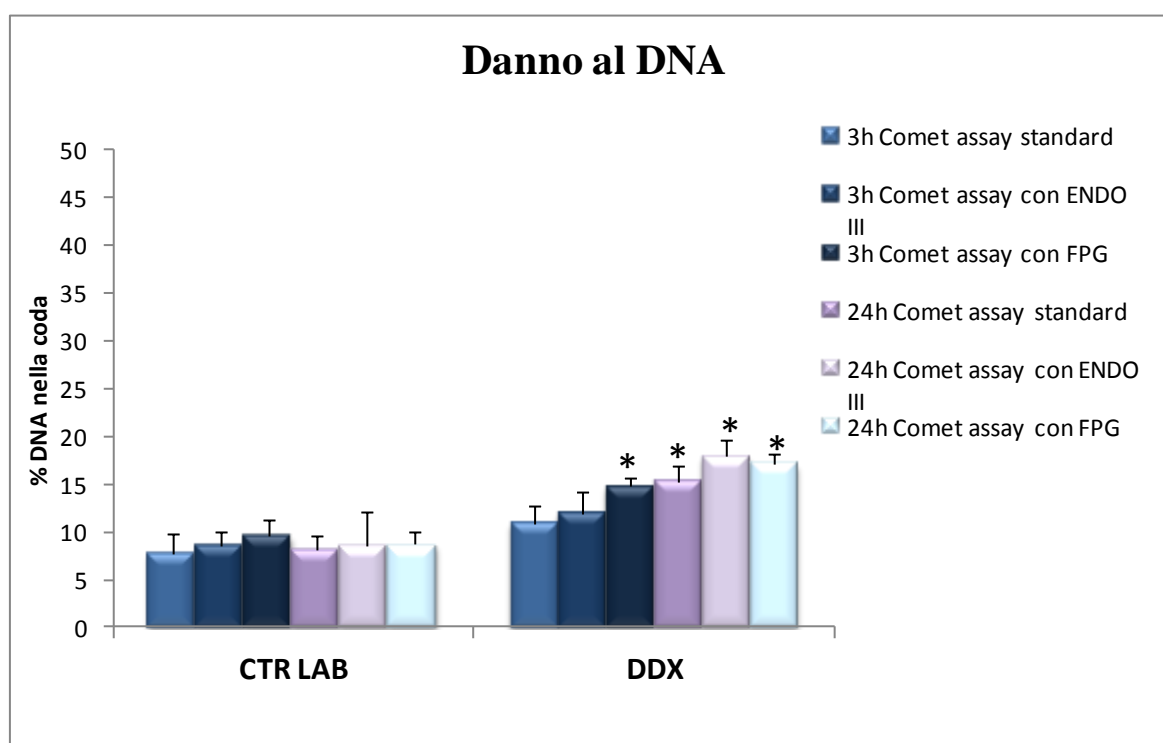


Fig. 42. Effetti indotti da DDX (732.5ppb) dopo esposizione per 3h e 24h sul danno al DNA di *D. discoideum*, valutato mediante Comet assay alcalino standard e introducendo nella metodica l'utilizzo degli enzimi ENDO III e FPG. I dati, espressi come percentuale di DNA presente nella coda, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

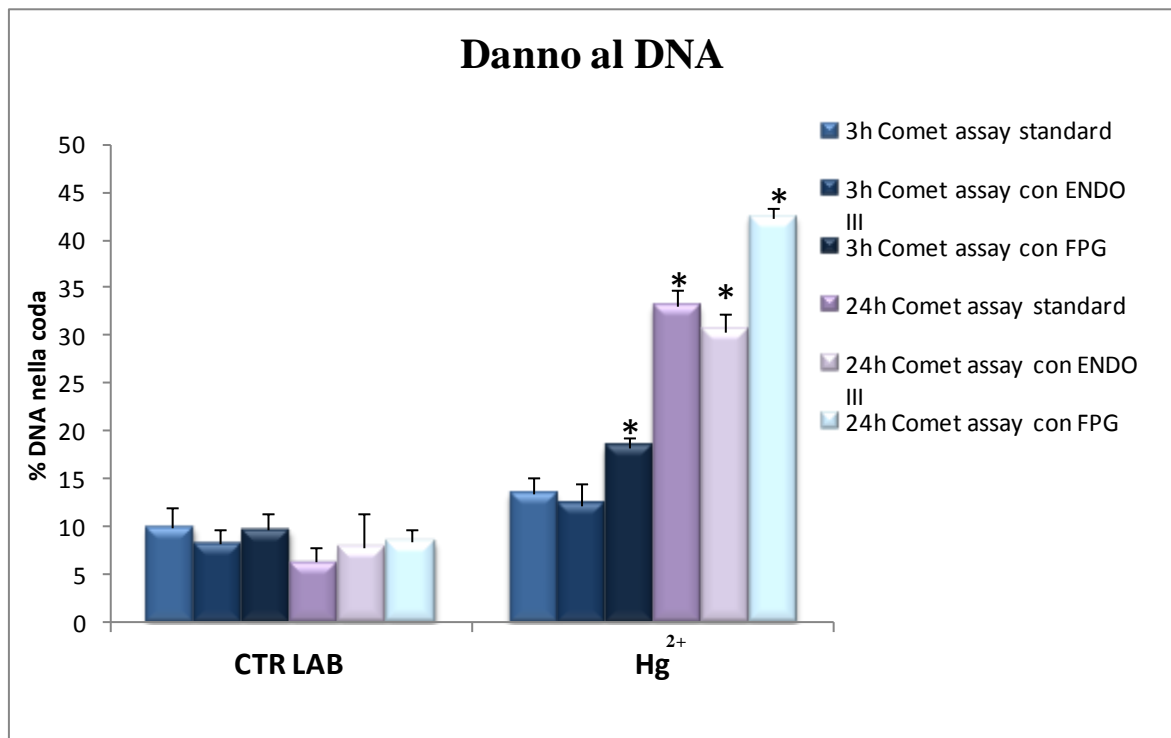


Fig. 43. Effetti indotti da Hg<sup>2+</sup> (7.8ppm) dopo esposizione per 3h e 24h sul danno al DNA di *D. discoideum*, valutato mediante Comet assay alcalino standard e introducendo nella metodica l'utilizzo degli enzimi ENDO III e FPG. I dati, espressi come percentuale di DNA presente nella coda, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* = p < 0.05 (Mann-Whitney U test).

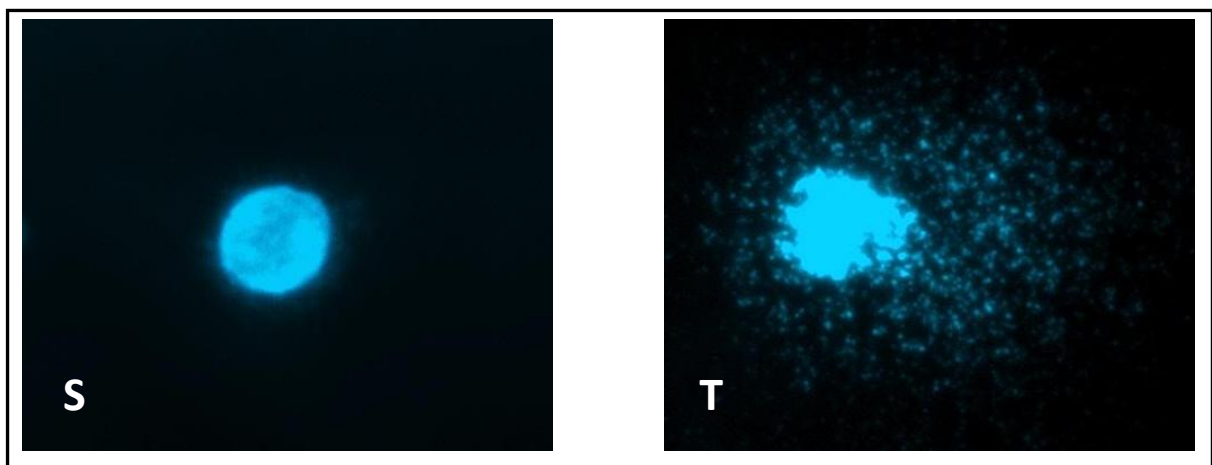


Fig. 44. Immagini rappresentative del Comet assay condotto in condizioni standard in *D. discoideum* esposto per 24h alla soluzione di controllo e al Hg<sup>2+</sup>. Il nucleo della cellula trattata con l'inquinante (T), rispetto a quello di controllo (S), presenta la caratteristica coda costituita da frammenti di DNA danneggiato.

#### 4.1.2.9. Determinazione della frequenza dei micronuclei

La frequenza dei micronuclei, indicatori di danno cromosomico ha mostrato valori molto simili al controllo per gli organismi esposti al DDX (figura 45).

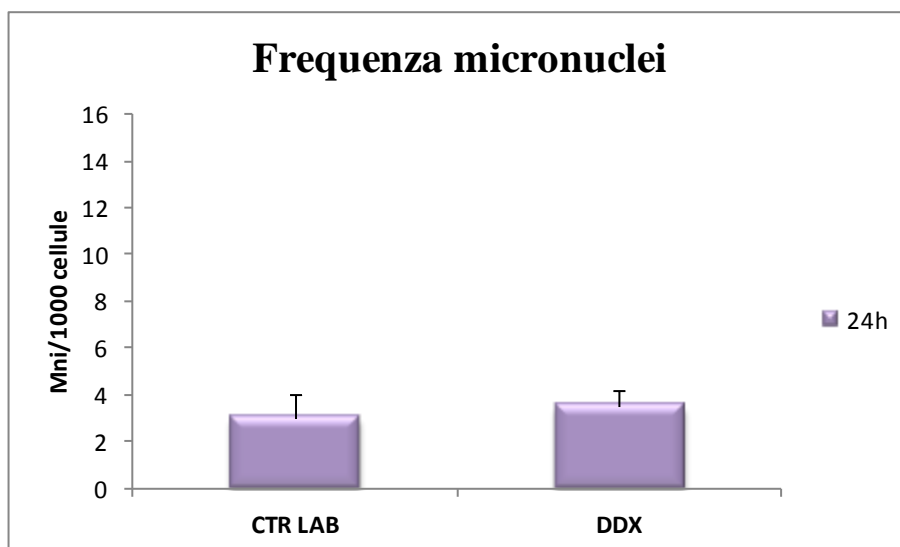


Fig. 45. Effetti indotti da DDX (732.5ppb) dopo esposizione per 24h sulla frequenza dei micronuclei nelle cellule di *D. discoideum*. I dati espressi come numero di micronuclei su 1000 cellule, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche.

Come si può osservare in figura 46, l'esposizione delle amebe al metallo pesante  $\text{Hg}^{2+}$  ha invece determinato un notevole e significativo aumento della frequenza dei micronuclei rispetto ai valori degli organismi di controllo.

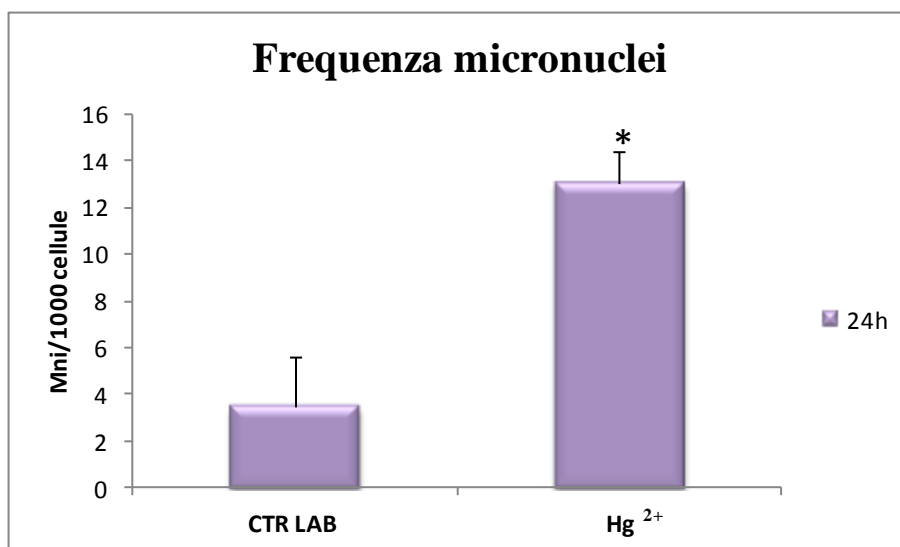


Fig. 46. Effetti indotti da  $\text{Hg}^{2+}$  (7.8ppm) dopo esposizione per 24h sulla frequenza dei micronuclei nelle cellule di *D. discoideum*. I dati espressi come numero di micronuclei su 1000 cellule, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

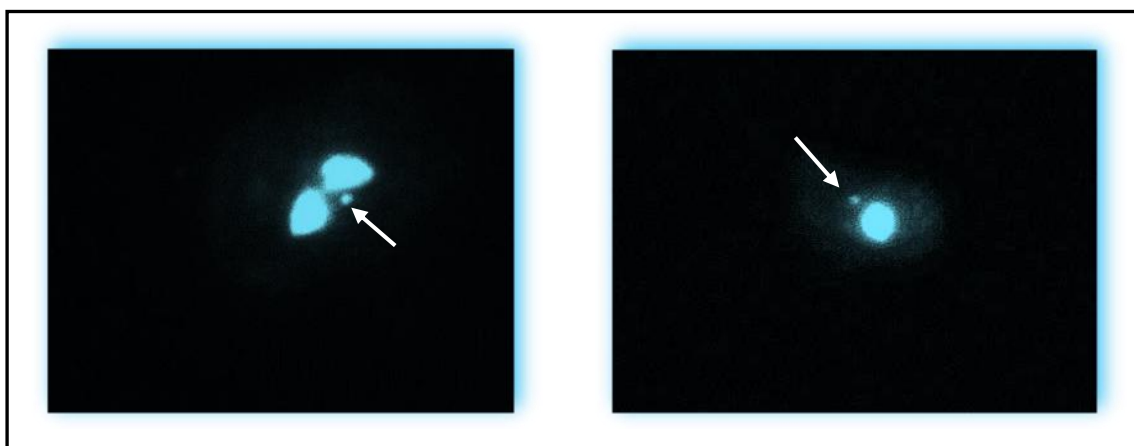


Fig. 47. Immagini rappresentative di micronuclei di *D. discoideum* esposto per 24h al  $\text{Hg}^{2+}$ .

#### 4.1.2.10. Effetti tossici della miscela DDX+Hg<sup>2+</sup>

I risultati relativi agli effetti tossici della miscela DDX+Hg<sup>2+</sup> hanno mostrato una notevole diminuzione del tasso di vitalità (pari ad oltre il 70% in meno rispetto al controllo, figura 48).

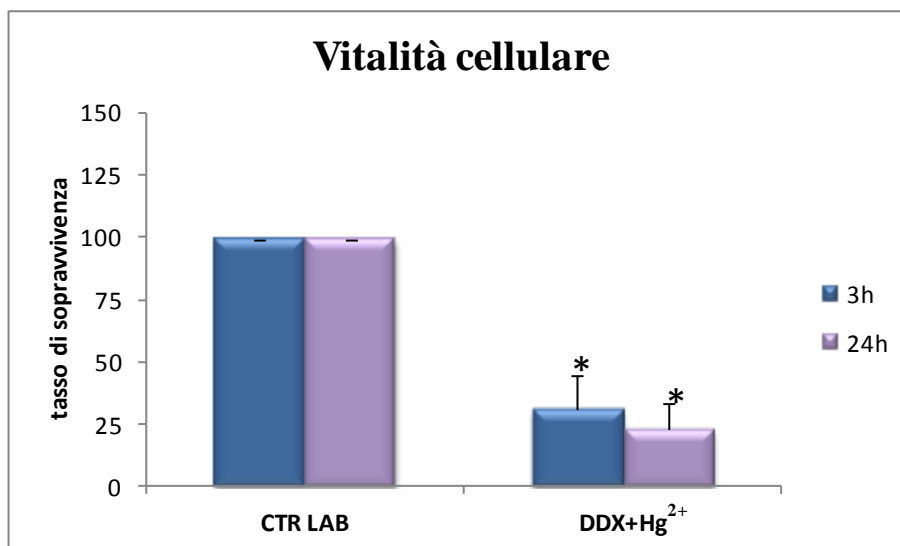


Fig. 48. Effetti indotti dalla miscela DDX+Hg<sup>2+</sup> dopo esposizione per 3h e 24h sulla vitalità cellulare di *D. discoideum*. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media±SD di almeno cinque repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

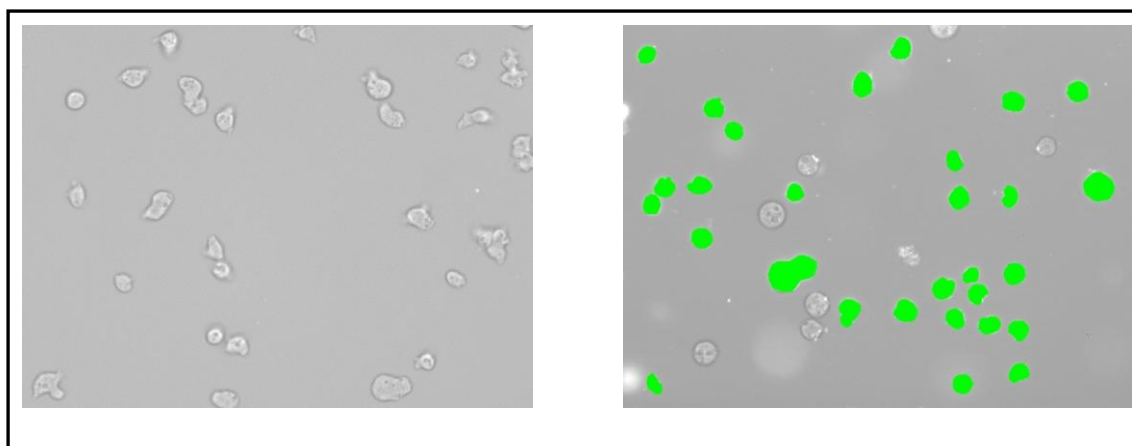


Fig. 49. Immagini rappresentative della vitalità di *D. discoideum* esposto per 3h alla soluzione di controllo ed alla miscela DDX+Hg<sup>2+</sup>. La colorazione in verde delle cellule morte dopo trattamento con l'inquinante è dovuta all'ingresso della sonda fluorescente SYBR GREEN esclusivamente nelle membrane danneggiate.

Anche il tasso di replicazione di *D. discoideum* è risultato drasticamente ridotto (pari a circa l'85% in meno rispetto al controllo, figura 50) dopo esposizione alla miscela DDX+Hg<sup>2+</sup>, evidenziando un effetto sinergico degli inquinanti.

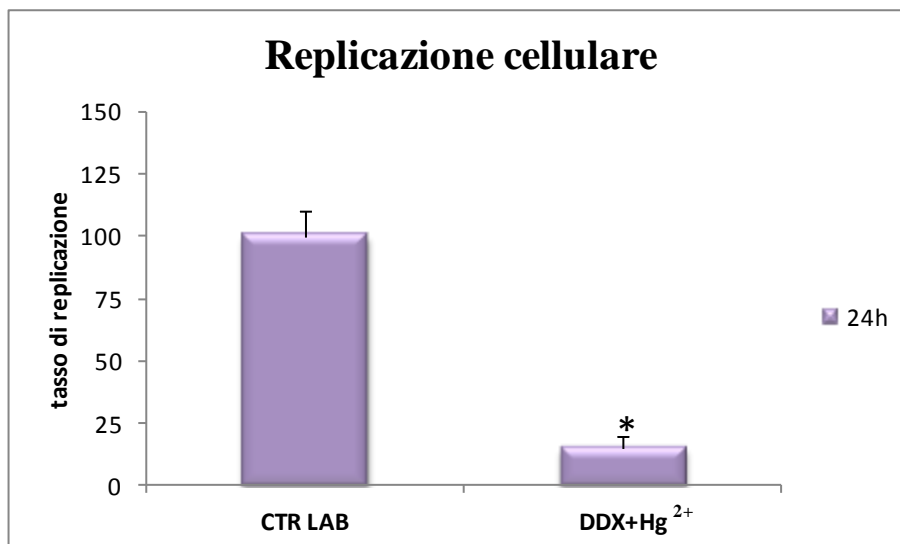


Fig. 49. Effetti indotti dalla miscela DDX+Hg<sup>2+</sup> dopo esposizione per 24h sul tasso di replicazione di *D. discoideum*. I dati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo e rappresentano la media±SD di almeno cinque repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).



### 4.1.3. Discussione

Il corpo idrico oggetto di questo studio, il Lago Maggiore è un tipico esempio di inquinamento cronico da DDT a causa di una pregressa attività industriale che ha comportato lo scarico di tale contaminante nelle acque superficiali. Quando il DDT e i suoi metaboliti entrano nell'ambiente hanno la potenzialità di rimanere adsorbiti ai sedimenti per più di 100 anni (Gajski et al., 2012), e possono rappresentare un pericolo per gli organismi che popolano gli ecosistemi acquatici e per la salute umana. E' pertanto importante valutare la biodisponibilità e gli effetti tossici di tali contaminanti per stabilire l'effettivo rischio ambientale che essi possono causare.

I sedimenti contaminati presentano sulla base della analisi chimiche concentrazioni più elevate, rispetto a quelle riscontrate nei sedimenti del sito di riferimento, di DDT, DDD, DDE (DDX) e  $Hg^{2+}$ , tuttavia i risultati ottenuti hanno evidenziato che l'esposizione all'acqua interstiziale dei sedimenti contaminati non ha provocato effetti sulla motilità di *Daphnia magna*, sulla bioluminescenza di *Vibrio fischeri*, sulla crescita di *Pseudokirchneriella subcapitata* e sul tasso di sopravvivenza di *Lumbriculus variegatus*. Anche l'ameba sociale *Dictyostelium discoideum*, sensibile bioindicatore utilizzato in campo ecotossicologico per valutare le risposte indotte da esposizione a benzo[a]pirene, mercurio e rame (Dondero et al., 2006) e per determinare la qualità di acque dolci (Sforzini et al., 2008), non ha mostrato variazioni del tasso di sopravvivenza e di replicazione dopo esposizione all'acqua interstiziale dei sedimenti del sito contaminato. Tali dati risultano importanti per escludere un potenziale effetto a livello di organismo/popolazione. L'uso di biomarker di stress sensibili quali la stabilità delle membrane lisosomiali e il tasso di endocitosi (Viarengo et al., 2007; Gomiero et al., 2012) non ha mostrato alterazioni significative dopo incubazione delle amebe per 3h e per 24h all'acqua interstiziale dei sedimenti del Lago. Inoltre non è stato evidenziato danno genotossico né cromosomico, valutati rispettivamente mediante il Comet assay e il test dei micronuclei.

Nel loro insieme i dati raccolti hanno dimostrato che i sedimenti del sito contaminato non risultano tossici per gli organismi appartenenti a diversi livelli della catena trofica delle acque dolci (alga *P. subcapitata*, batterio *V. fischeri*, crostaceo *D. magna*, , oligochete *L. variegatus*, protozoo *Dictyostelium discoideum*) e pertanto il rischio ambientale per tale area del Lago Maggiore è minimo.

Tuttavia le concentrazioni di DDX (732.5ppb) e  $Hg^{2+}$  (7.8ppm) nei sedimenti del sito contaminato risultano essere superiori al valore PEC - Limite al di sopra del quale è

possibile osservare effetti nocivi- di MacDonald (MacDonald et al., 2000) e possono pertanto causare effetti biologici avversi. Per poter approfondire lo studio del potenziale tossico di tali inquinanti, l'ameba sociale *Dictyostelium discoideum* è stata esposta alla miscela di organici xenobiotici DDX e al  $\text{Hg}^{2+}$  in forma biodisponibile addizionando il DDX (solubilizzato in DMSO) e il  $\text{Hg}^{2+}$  alla soluzione di controllo. I risultati ottenuti hanno mostrato che seppure vi sia una lieve diminuzione dopo esposizione al  $\text{Hg}^{2+}$ , non vi sono effetti statisticamente significativi sul tasso di sopravvivenza; è possibile invece riscontrare effetti significativi sul tasso di replicazione che risulta diminuito dopo esposizione per 24h al DDX e il  $\text{Hg}^{2+}$  rispettivamente del 61% e del 71% rispetto al controllo. Gli effetti del DDT e dei suoi metaboliti sulla riproduzione sono stati confermati da diversi autori (Persoone et Uyttersprot, 1975; Lal et Saxena, 1979; Shi et al., 2013) e su *Dictyostelium discoideum* da Gayatri & Chatterjee (1993), sebbene le concentrazioni utilizzate siano superiori a quelle oggetto di studio. Anche il  $\text{Hg}^{2+}$  è noto causare effetti avversi su tale parametro in diversi organismi (Boening, 2000; Apostoli et Catalani, 2011, Gomiero et al., 2012) e in *Dictyostelium discoideum* già a concentrazioni relativamente basse (Dondero et al., 2006; Marsano et al., 2010). L'esposizione ai contaminanti ha determinato anche una destabilizzazione delle membrane lisosomiali, che si ritiene possa provocare un tasso di turnover proteico maggiore ed infine autofagia a causa di un aumento del catabolismo delle macromolecole cellulari nei lisosomi attivati (Moore et al., 2007; 2012), ed una riduzione significativa del tasso di endocitosi. La compromissione di tali parametri, assieme ad un ridotto apporto energetico evidenziato dalla diminuzione del potenziale della membrana mitocondriale interna osservata dopo 24h di esposizione delle amebe agli inquinanti, può contribuire a spiegare il risultato ottenuto a livello dell'aumento del tempo di replicazione cellulare (Nilsson, 1979; Dini, 1981; Nilsson, 1981; Dondero et al., 2006; Marchi et al., 2004; Moore et al., 2007).

E' importante menzionare che è necessario diluire la miscela DDX 100 volte in modo da avvicinarsi al valore TEC di MacDonald – Limite al di sotto del quale è improbabile osservare effetti dannosi – pari a 5,28  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (MacDonald et al., 2000) per ripristinare i valori di controllo per quanto riguarda i parametri tasso di replicazione, stabilità delle membrane lisosomiali e tasso di endocitosi.

Per quanto riguarda la produzione di specie reattive dell'ossigeno, i risultati hanno evidenziato che sebbene il DDX determini un aumento di tali specie, la quantità prodotta in seguito al trattamento delle amebe con  $\text{Hg}^{2+}$  risulta decisamente superiore, specialmente aumentando il tempo di esposizione da 3h a 24h. Inoltre la produzione di lipoperossidi è

notevolmente aumentata in seguito al trattamento delle amebe con  $\text{Hg}^{2+}$ , mentre con il DDX non si osservano variazioni rispetto al controllo. Entrambi i contaminanti determinano accumulo lisosomiale dei prodotti finali della perossidazione lipidica, le lipofuscine, specialmente ad un tempo di esposizione pari a 3h, mentre a 24h per il DDX si osservano valori di poco superiori al controllo. Esaminando i dati nel loro complesso è possibile concludere che lo stress ossidativo indotto in *D. discoideum* risulta superiore in seguito al trattamento con il mercurio rispetto a quello con il DDT e metaboliti. E' noto, da numerosi studi, che i metalli pesanti sono una classe di contaminanti in grado di determinare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Viarengo et al., 1990; Stohs et al., 2000) e di conseguenza danno ossidativo: i risultati ottenuti esponendo l'organismo modello *D. discoideum* al mercurio confermano tale meccanismo di tossicità.

Sulla base dei dati bibliografici sono inoltre ben documentati per il mercurio: a) l'elevata affinità con i residui  $-\text{SH}$  (gruppi sulfidrilici) secondo l'ordine  $\text{Hg(II)} > \text{Cu(I)} > \text{Cd(II)} > \text{Cu(II)} > \text{Zn(II)}$  (Viarengo et Nott, 1993; Viarengo, 1994); i gruppi  $-\text{SH}$  sono presenti in numerosi enzimi ed in particolare anche in quelli la cui attività può risultare inibita con conseguenti danni cellulari derivanti dalla riduzione delle difese antiossidanti delle cellule b) la capacità di incrementare la produzione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  a livello mitocondriale con danneggiamento dell'efficienza della fosforilazione ossidativa e del trasporto di elettroni (Lund et al., 1991, Chavez et al., 1988, Nath et al., 1996), e c) la capacità di indurre perossidazione lipidica in animali (Allemand et al., 1989, Viarengo, 1989; Huang et al, 1994; Fukino et al, 1984, Lund et al., 1993, Rana et al., 1995) e piante (Cho et Park, 2000; Ali et al., 2000).

L'esposizione delle amebe al  $\text{Hg}^{2+}$  determina, come prevedibile, una fortissima riduzione del livello di GSH, che rappresenta una difesa cellulare contro lo stress ossidativo; interessante è il dato ottenuto su tale parametro in seguito all'esposizione di *D. discoideum* al DDX: il livello di GSH, nonostante l'incremento di ROS sia minimo, risulta drasticamente ridotto. Questo effetto può essere spiegato considerando la capacità di numerosi organismi di coniugare il DDT e i suoi metaboliti con il GSH. Infatti diverse GST, e in particolare le GST d1 e GST e2 giocano un ruolo importante nella detossificazione del DDT in insetti come *Drosophila melanogaster* (Low et al., 2010) e *Anopheles gambiae* (Wang et al., 2008). L'attività di questi enzimi, che può anche portare a ossidazione del GSH (Dinamarca et al, 1974) durante la deidroclorinazione del DDT, è legata alla coniugazione del GSH al DDT; questo meccanismo potrebbe causare la deplezione di GSH osservato nelle amebe esposte al DDX. Il prodotto di coniugazione può

essere estruso da trasportatore ABC presente nella membrana plasmatica. Questo sistema di disintossicazione è perfetto per ridurre gli effetti tossici di DDT/DDX nelle amebe ma può rendere le cellule più sensibili alla presenza nell'ambiente di proossidanti.

Una certa diminuzione del livello di GSH nelle cellule esposte al DDT è stato precedentemente riportato in epatociti ottenuti da organismi diversi ed esposti "in vitro" al contaminante (Neto et al., 2008; Bussolaro et al., 2010).

Per quanto riguarda gli effetti genotossici, l'incubazione con  $\text{Hg}^{2+}$  determina effetti maggiori rispetto all'incubazione con DDX in termini di danno al DNA, di danno ossidativo al DNA valutato mediante l'utilizzo dell'enzima FPG, e di aumento della frequenza dei micronuclei, indicatori di danno cromosomico e di quanto sono estesi gli effetti genotossici causati dagli inquinanti (Viarengo et al., 2007). Tali risultati possono essere in parte dovuti allo stress ossidativo causato nelle amebe esposte al mercurio, essendo questo uno dei meccanismi molecolari descritti per spiegare le possibili conseguenze genotossiche del mercurio (Lee et al., 1997; Schurz et al., 2000; Rao et al., 2001; Di Pietro et al., 2008). Le modalità di azione dei radicali liberi sono infatti essenzialmente due: la prima è un'azione diretta sugli acidi nucleici che può comportare mutazioni genetiche (Schurz et al., 2000); la seconda è dovuta a cambiamenti conformazionali nelle proteine responsabili della sintesi e del riparo del DNA, quali enzimi di riparazione, DNA-polimerasi, e anche proteine motrici quali tubulina e chinesina, responsabili del fuso mitotico e della segregazione cromosomica (Stohs et Bagchi, 1995; Stoiber et al., 2004; Cebulska et al., 2005; Halliwell, 2007).

Esponendo *D. discoideum* alla miscela di DDX+ $\text{Hg}^{2+}$  si è verificato un drammatico effetto sinergico sia sul tasso di sopravvivenza delle amebe, che si è ridotto rispetto al controllo del 70%, sia sul tasso di replicazione (-85% rispetto al controllo). Tale risultato potrebbe essere in parte spiegato sia considerando i possibili effetti additivi sui lisosomi, tasso di endocitosi ed attività mitocondriale, ma un effetto importantissimo potrebbe essere dovuto al fatto che cellule esposte al DDX vi sia una drastica riduzione di GSH; infatti l'aggiunta di un forte agente pro ossidante quale il  $\text{Hg}^{2+}$  potrebbe causare un forte danno in numerose componenti cellulari con effetto sinergico tale da condurre a morte cellulare.

## **4.2. Biodisponibilità di inquinanti organici e inorganici nelle acque di un corpo idrico lenticò: utilizzo di *Unio pictorum* per la determinazione del bioaccumulo e dei conseguenti effetti biologici**

Un numero sempre crescente di contaminanti di origine antropica viene immesso negli ambienti acquatici provocando, in molti casi, un'alterazione della biodiversità. I mitili d'acqua dolce, tra cui *Unio sp.*, presentano le caratteristiche di un buoni bioindicatori e sono ampiamente utilizzati quali organismi sentinella per valutare la qualità di acque lotiche e lentiche.

In questo studio *U. pictorum* è stato utilizzato per determinare il bioaccumulo ed i conseguenti effetti biologici di contaminanti organici ed inorganici (quali IPA, PCB e soprattutto DDT, oltre ad alcuni metalli pesanti) presenti a differenti concentrazioni in tre diversi siti del Lago Maggiore.

Al termine dei 28 giorni di stabulazione in apposite gabbie, gli effetti dei contaminanti sono stati valutati mediante l'utilizzo di una batteria di biomarker sviluppata su *U. pictorum* in modo da determinare l'evolversi della sindrome di stress valutando gli effetti nelle cellule dell'emolinfa (emociti) e in diversi tessuti dei molluschi, ossia branchie e ghiandola digestiva. In assenza di effetti sul tasso di sopravvivenza dei mitili, il set di parametri fisiologici che sono stati analizzati comprende:

- biomarker di stress (stabilità delle membrane lisosomiali, contenuto lisosomiale di lipidi neutri, rapporto lisosomi/citoplasma), inclusi anche parametri che indicano condizioni di stress ossidativo (contenuto lisosomiale di lipofuscine, contenuto di malondialdeide carbonilazione delle proteine);
- biomarker di esposizione a particolari classi di inquinanti quali metalli pesanti e pesticidi ossia contenuto di metallotioneine e attività acetilcolinesterasica.

I dati ottenuti sono stati poi integrati ed analizzati mediante il Sistema Esperto (Dagnino et al., 2007) in grado di indicare per ciascun sito il livello della "sindrome di stress" raggiunto dagli organismi.

## Risultati

### 4.2.1. Biomarker di stress

Come si può vedere in figura 1, gli organismi esposti alle acque dei tre siti hanno mostrato una destabilizzazione delle membrane lisosomiali degli emociti rispetto a quelli stabulati per 28 giorni nel sito di controllo; in particolare la diminuzione è risultata più marcata specialmente per quanto riguarda i siti 2 e 3.

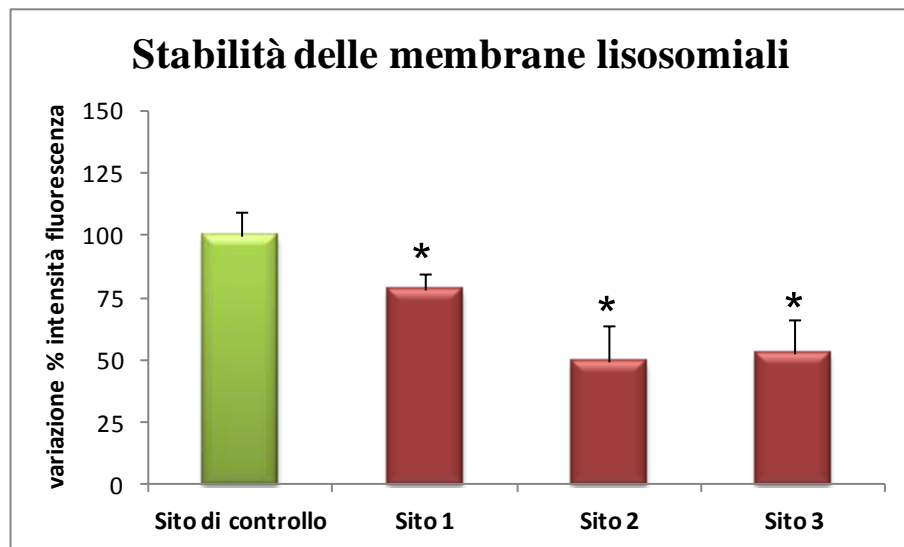


Fig.1. Effetti indotti sulla stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti di *U. pictorum* dopo stabulazione per 28 giorni nei diversi siti. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche.

\* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

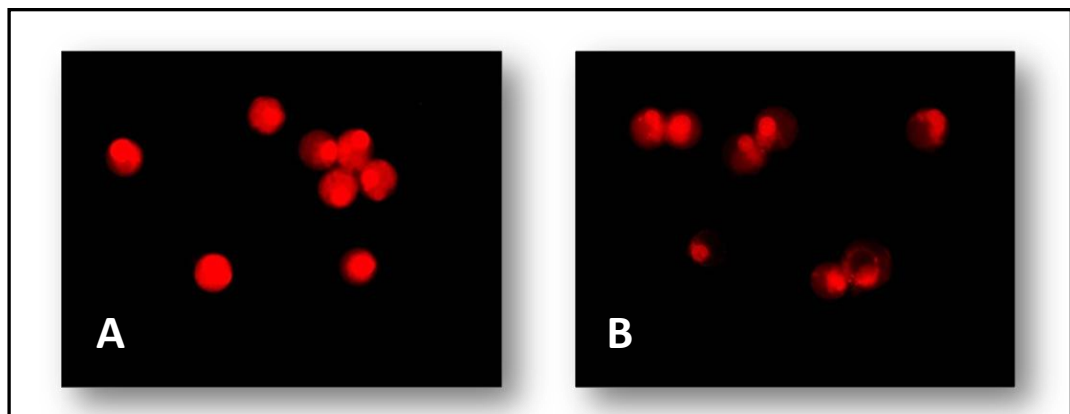


Fig. 2. Immagini rappresentative degli emociti di *U. pictorum* esposto per 28 giorni al sito di controllo e al sito 2. Rispetto agli emociti di controllo (A), quelli degli organismi stabulati nel sito 2 presentano una diminuzione del colorante NR, indice di una destabilizzazione delle membrane lisosomiali.

Anche il rapporto lisosomi/citoplasma della ghiandola digestiva dei molluschi esposti ai tre diversi siti ha mostrato un incremento statisticamente significativo rispetto al sito di controllo, specialmente per i siti 2 e 3 (fig. 3), concordando con i risultati ottenuti per il parametro stabilità delle membrane lisosomiali.

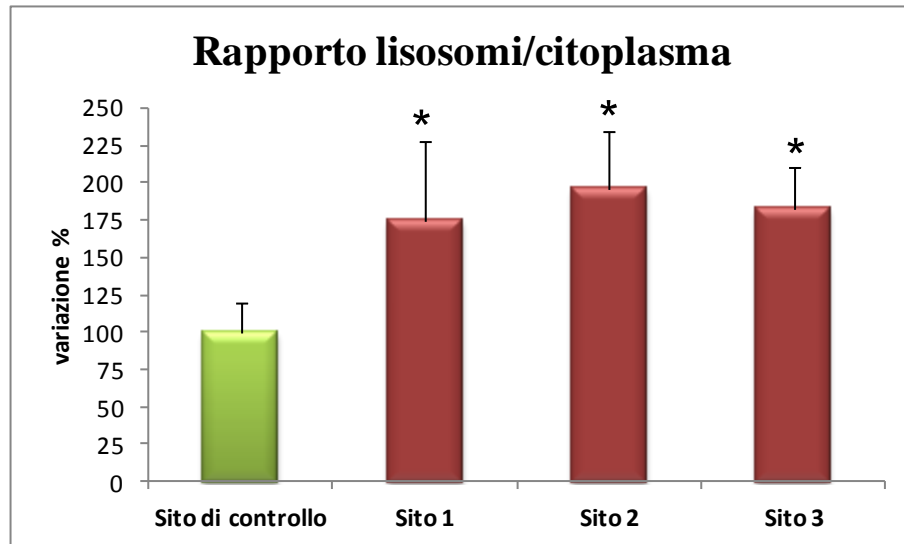


Fig. 3. Effetti indotti sul rapporto lisosomi/citoplasma della ghiandola digestiva di *U. pictorum* dopo stabulazione per 28 giorni nei diversi siti. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

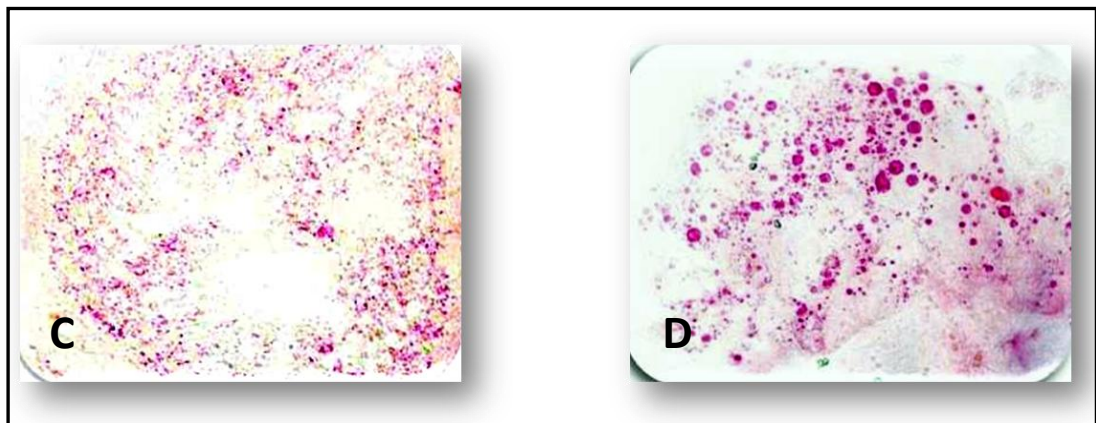


Fig. 4. Immagini rappresentative del rapporto lisosomi/citoplasma della ghiandola digestiva di *U. pictorum* esposto per 28 giorni al sito di controllo (C) e al sito 3 (D).

Il contenuto lisosomiale di lipidi neutri valutato negli emociti (fig. 5), mostra un aumento statisticamente significativo negli organismi esposti al sito 2, rispetto al sito di controllo.

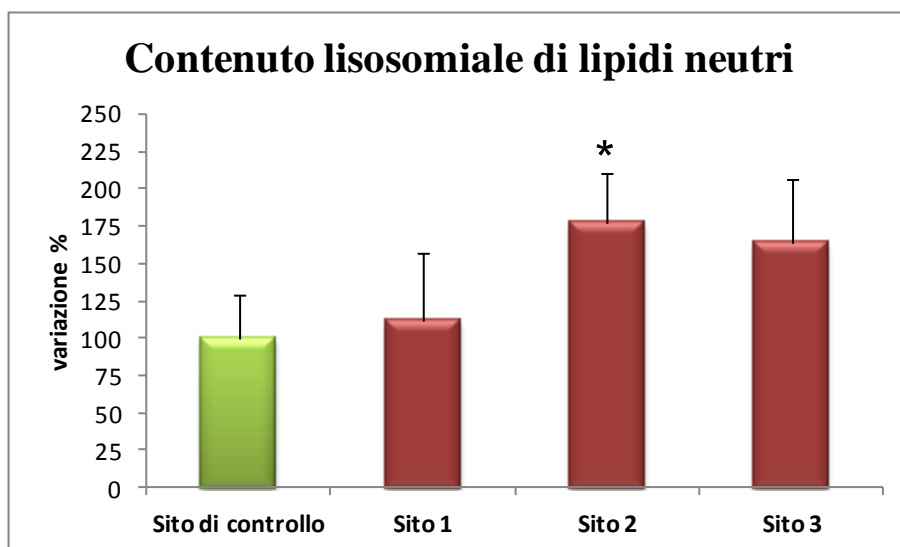


Fig. 5. Effetti indotti sul contenuto lisosomiale di lipidi neutri degli emociti di *U. pictorum* dopo stabulazione per 28 giorni nei diversi siti. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

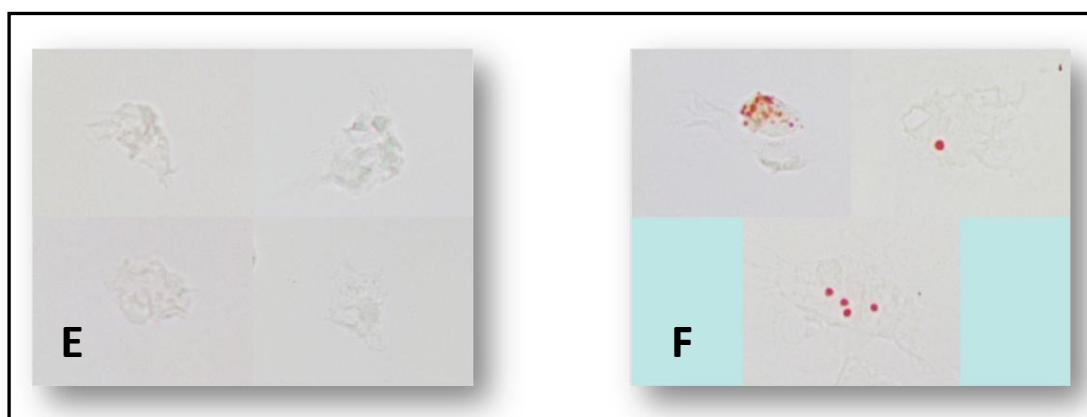


Fig. 6. Immagini rappresentative del contenuto di lipidi neutri negli emociti di *U. pictorum* esposto per 28 giorni al sito di controllo (E) e al sito 2 (F).



#### 4.2.2. Biomarker di stress ossidativo

L'esposizione dei molluschi ai siti 2 e 3 ha determinato, rispetto al sito di controllo, un incremento statisticamente significativo del contenuto lisosomiale di lipofuscine (fig. 7) valutati negli emociti.

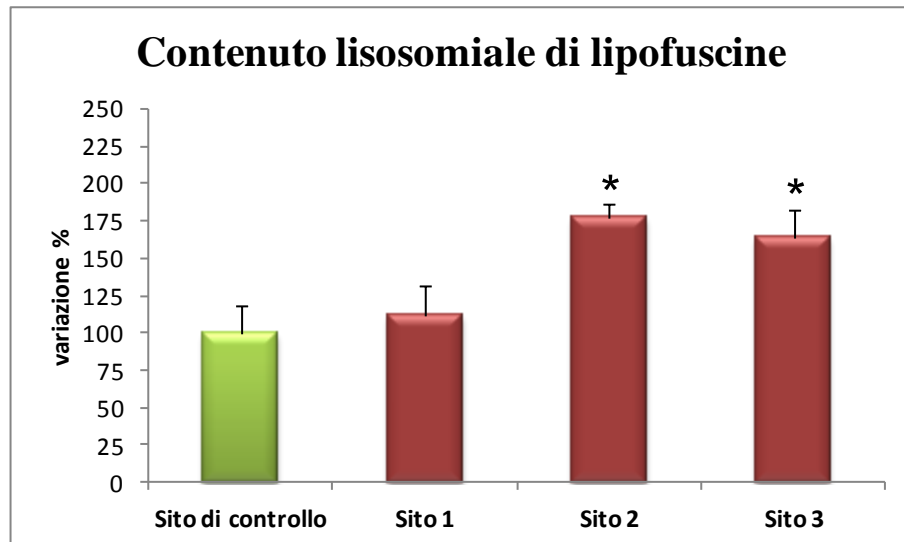


Fig. 7. Effetti indotti sul contenuto lisosomiale di lipofuscine degli emociti di *U. pictorum* dopo stabulazione per 28 giorni nei diversi siti. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

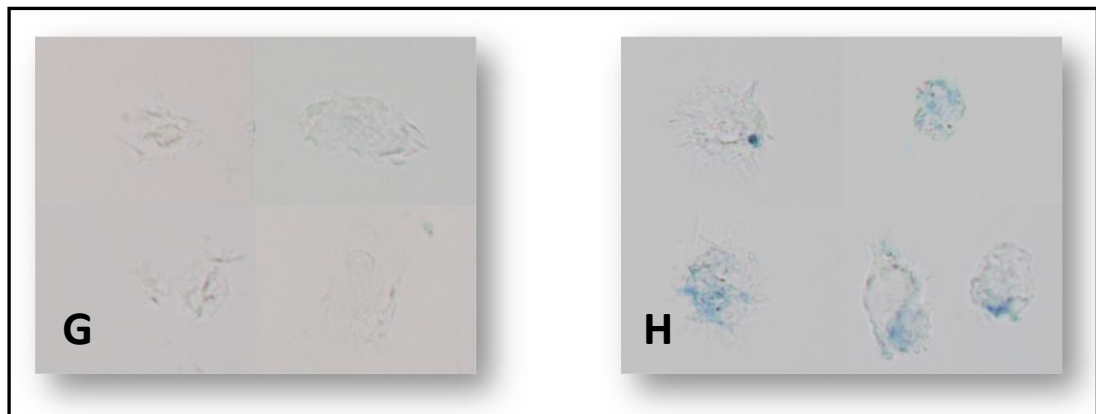
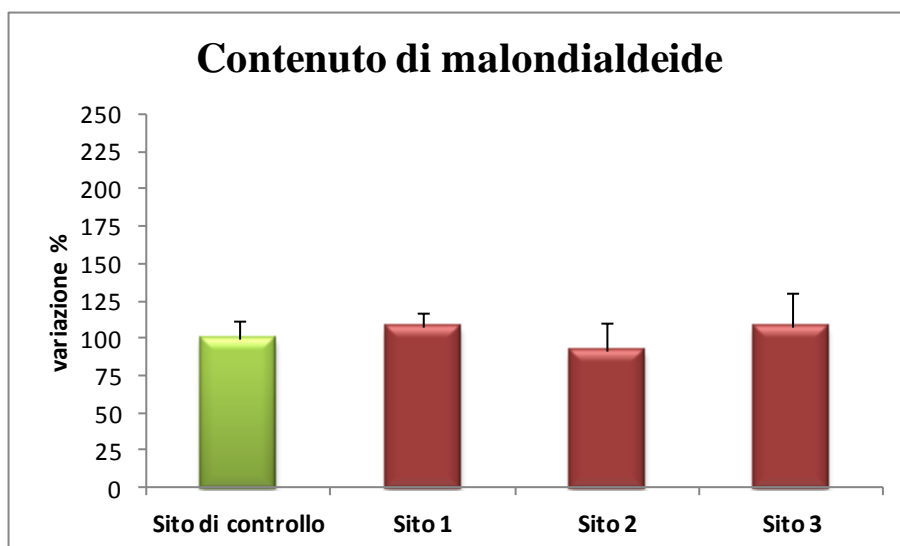


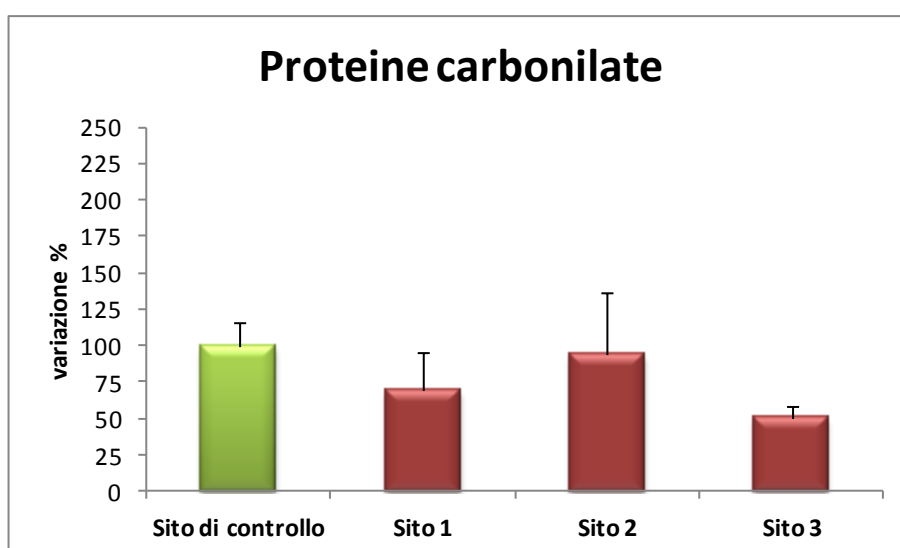
Fig. 8. Immagini rappresentative del contenuto di lipofuscine negli emociti di *U. pictorum* esposto per 28 giorni al sito di controllo (G) e al sito 2 (H).

Non sono state osservate variazioni significative rispetto al sito di controllo del contenuto di malondialdeide (fig. 9) nella ghiandola digestiva, dopo esposizione per 28 giorni ai diversi siti.



**Fig. 9.** Effetti indotti sul contenuto di malondialdeide nella ghiandola digestiva di *Unio pictorum* dopo stabulazione per 28 giorni nei diversi siti. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

Anche la carbonilazione delle proteine non ha mostrato variazioni significative negli organismi stabulati nei tre siti del Lago rispetto a quelli del sito di controllo (fig. 10)



**Fig. 10.** Effetti indotti sulla carbonilazione delle proteine nella ghiandola digestiva di *Unio pictorum* dopo stabulazione per 28 giorni nei diversi siti. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche.

\* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

### 4.2.3. Biomarker di esposizione

Il contenuto di metallotioneine nella ghiandola digestiva, indice della contaminazione ambientale da metalli, e l'attività acetilcolinesterasica, valutata nelle branchie e considerata un biomarker di esposizione a pesticidi organofosfati e carbammati, non hanno mostrato variazioni statisticamente significative dopo esposizione di *U. pictorum* ai diversi siti (figure 11 e 12).

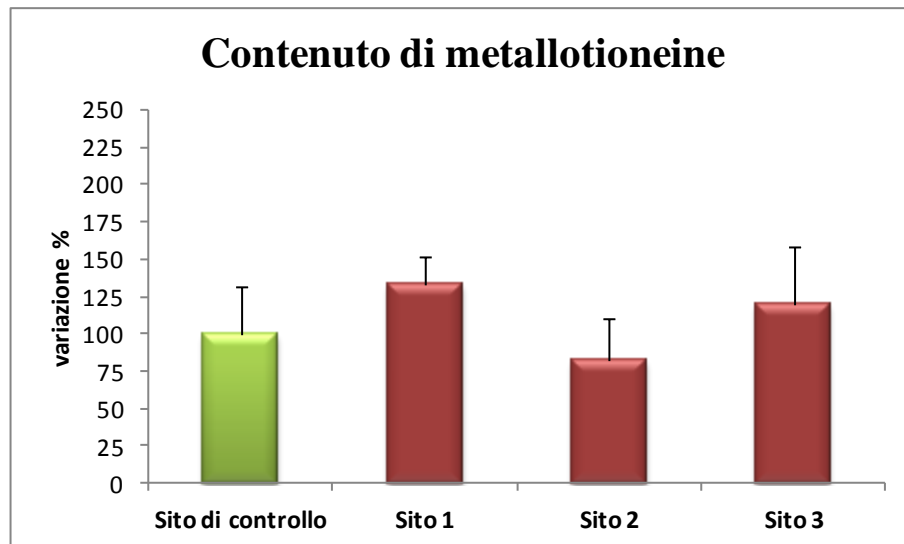


Fig. 11. Effetti indotti sul contenuto di metallotioneine in *U. pictorum* dopo stabulazione per 28 giorni nei diversi siti. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

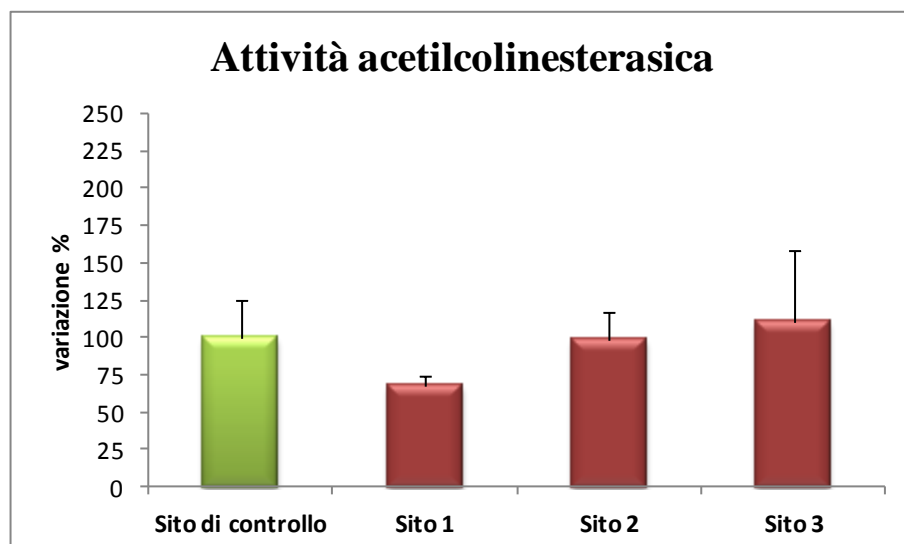


Fig. 12. Effetti indotti sull'attività acetilcolinesterasica in *U. pictorum* dopo stabulazione per 28 giorni nei diversi siti. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di almeno 5 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

#### 4.2.4. Sistema esperto di integrazione dei dati

Mediante il Sistema Esperto di integrazione dei dati sono stati correlati i cambiamenti osservati nei diversi biomarker analizzati al fine di classificare i siti su una scala di 5 livelli, da A che corrisponde ad un'assenza di stress a E che denota la presenza di stress patologico (fig. 13), permettendo così un'interpretazione semplice ed oggettiva dei dati complessi ottenuti mediante i biomarker.

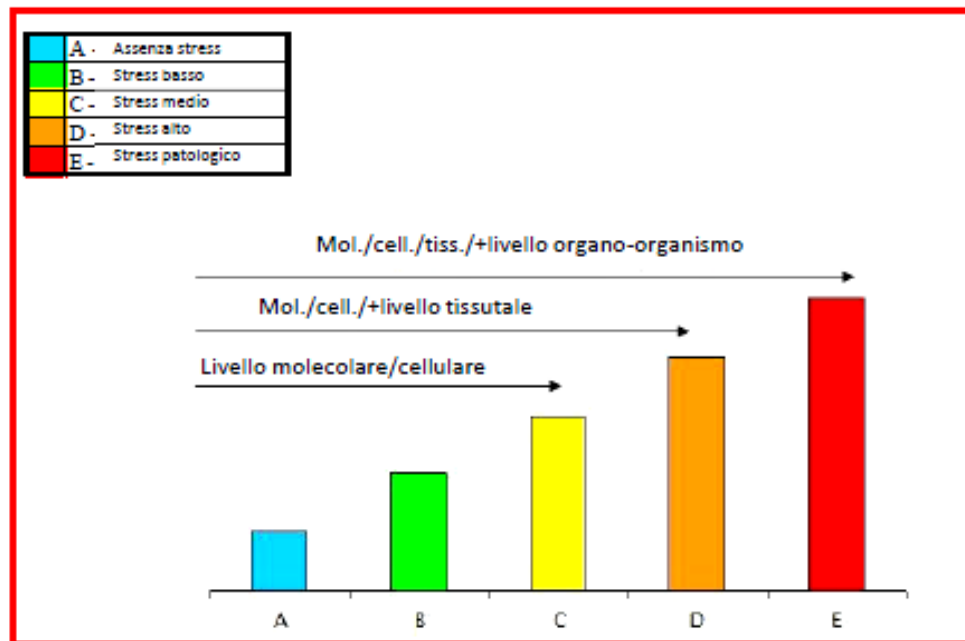


Fig. 13. Scala dei livelli di stress stabiliti dal Sistema Esperto di integrazione dei dati, da A che corrisponde ad un'assenza di stress ad E che indica la presenza di stress patologico indotto dai contaminanti negli organismi esposti.

Nello specifico, come si può osservare in figura 14, il Sistema Esperto ha evidenziato che l'effetto totale dei contaminanti ha causato nei molluschi una sindrome di stress che è moderata nei siti 1 e 3 (livello B), attestandosi ad un livello molecolare/cellulare, mentre raggiunge valori elevati nel sito 2 (livello D), dove interessa anche il livello tissutale.

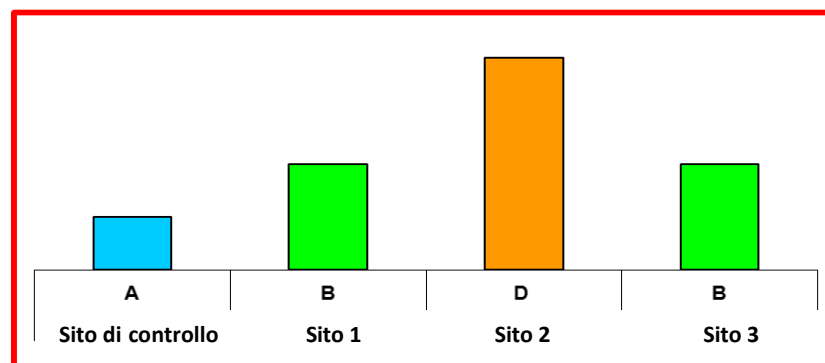


Fig. 14. Livello di stress raggiunto dagli organismi esposti ai diversi siti del Lago Maggiore.

#### 4.2.5. Discussione

In questo studio è stata utilizzata una batteria di biomarker a differenti livelli di complessità funzionale (biochimico, cellulare, tissutale, organismo) per valutare la sindrome di stress indotta in *Unio pictorum* in seguito all'esposizione per 28 giorni in tre diversi siti del Lago Maggiore contaminati da inquinanti organici ed inorganici, ed in particolar modo da DDT (e dai suoi metaboliti). In assenza di effetti sul tasso di sopravvivenza dei molluschi, è stata osservata una riduzione della stabilità delle membrane lisosomiali (SML) negli emociti degli organismi esposti a tutti e tre i siti oggetto di studio, diminuzione che è risultata più marcata per il sito 2. La valutazione della SML risulta di grande importanza poiché rappresenta un parametro estremamente sensibile della condizione cellulare, in grado di dimostrare i primi effetti avversi degli inquinanti in differenti organismi modello (Moore, 1985; Viarengo, 1989; Köhler et al., 2002). Alla destabilizzazione delle membrane lisosomiali si associa un aumentato rapporto lisosomi/citoplasma nella ghiandola digestiva dei bivalvi esposti a tutti e tre i siti ed in particolare per quelli stabulati in corrispondenza del sito 2, rispetto al sito di controllo. Si tratta di un parametro che può essere usato per verificare se lo sviluppo della sindrome di stress influisce sulla fisiologia dell'intero tessuto, in quanto un aumento del rapporto lisosomi/citoplasma indica che le cellule stanno diventando cataboliche. Un inquinante che induce un incremento dell'attività dei lisosomi comporta processi autofagici, che, con il tempo, possono determinare una riduzione del citoplasma delle cellule e, di conseguenza, una perdita della loro corretta funzionalità (Moore et Viarengo, 1987; Cuervo, 2004; Marigómez et al., 2005; Viarengo et al., 2007; Moore et al., 2008).

Gli inquinanti presenti nel sito 2 hanno inoltre causato nei molluschi un incremento statisticamente significativo del contenuto lisosomiale di lipidi neutri, valutato negli emociti, rispetto ai valori del sito di controllo. Gli effetti degli inquinanti sono spesso associati ad un metabolismo degli acidi grassi sbilanciato con l'accumulo di lipidi neutri insaturi nel sistema vacuolare lisosomiale (Moore, 1988; Köhler, 1991). Modificazioni del metabolismo lipidico che portano al patologico accumulo lisosomiale di lipidi neutri possono avere gravi effetti a livello di cellule e tessuti (Köhler et al, 2002; Maxfield e Tabas, 2005), che contribuiscono ad alterare la fisiologia dei molluschi.

Gli invertebrati d'acqua dolce del genere *Unio timidus* e *Unio pictorum* sono stati utilizzati negli ultimi anni come sensibili bioindicatori di inquinanti acquatici associati alla produzione di ROS (Cossu et al., 1997, 2000; Doyotte et al., 1997; Guidi et al., 2010). Per

determinare l'eventuale stress ossidativo indotto in *U. pictorum* dai contaminanti presenti nei tre siti, sono stati valutati il contenuto lisosomiale di lipofuscine negli emociti, il contenuto di malondialdeide e la carbonilazione delle proteine nella ghiandola digestiva. Per quanto riguarda il contenuto lisosomiale di lipofuscine è stato rilevato un aumento significativo nei siti 2 e 3 rispetto al sito di controllo. Le lipofuscine si accumulano nei lisosomi come granuli insolubili costituiti da proteine ossidate modificate e prodotti della degradazione lipidica, ma anche carboidrati e metalli (George et Viarengo, 1985; Viarengo et Nott, 1993; Terman et Brunk, 2004). L'accumulo di questi pigmenti nel sistema vacuolare lisosomiale di epatociti di pesce o nelle cellule della ghiandola digestiva dei molluschi rappresenta un'indicazione del livello di stress ossidativo nelle cellule e può essere messo in relazione al livello di perossidazione delle membrane lipidiche cellulari (Viarengo et Nott, 1993).

Il contenuto di malondialdeide (MDA), che rappresenta uno dei prodotti intermedi della perossidazione lipidica, e la carbonilazione delle proteine nella ghiandola digestiva, biomarker che misura principalmente i derivati carbonilici delle proteine, in particolare i prodotti di ossidazione degli amminoacidi fenilalanina e tirosina (Valavanidis et al., 2006), non hanno mostrato variazioni negli organismi esposti ai tre siti rispetto a quelli stabulati nel sito di controllo. I dati ottenuti confermano che l'uso delle lipofuscine come biomarker di stress ossidativo cellulare sembra essere più appropriato dell'uso della MDA. Infatti quest'ultimo composto in quanto prodotto intermedio della perossidazione lipidica può, come i metaboliti tossici reattivi, essere generalmente rapidamente degradato/eliminato (Esterbauer, 1985). Anche le proteine carbonilate sono considerate un parametro dinamico perché, specialmente quelle ossidate, possono essere catabolizzate più rapidamente (Lushchak, 2011) e accumulate all'interno dei lisosomi determinando un incremento di lipofuscine e variazioni più moderate del contenuto di proteine carbonilate. Pertanto, come in questo studio, questi due biomarker di stress ossidativo possono risultare invariati negli animali esposti ai siti contaminati rispetto a quelli stabulati nel sito di controllo.

La batteria di biomarker utilizzata nei programmi di biomonitoraggio ambientale include i biomarker di esposizione, ossia quei parametri il cui cambiamento può essere correlato all'esposizione degli organismi ad una specifica classe di contaminanti (Viarengo et al., 2007), quali ad esempio il contenuto di metallotioneine e l'attività acetilcolinesterasica.

L'esposizione di *U. pictorum* per 28 giorni nei tre diversi siti non ha provocato un aumento del contenuto di metallotioneine rispetto agli organismi stabulati nel sito di controllo; tale dato può essere dovuto ad una bassa concentrazione o biodisponibilità di metalli pesanti

nei siti oggetto di studio che non necessita di una over-espressione di tali proteine citosoliche, a basso peso molecolare. Infatti le metallotioneine sono normalmente espresse nei tessuti degli animali e sono altamente up-regolate come conseguenza di un elevata concentrazione di metalli pesanti nell'ambiente (Viarengo, 1989; Viarengo et al., 1999b). Il risultato ottenuto può essere correlato all'invarianza osservata nel contenuto di MDA e nella carbonilazione delle proteine della ghiandola digestiva, essendo i metalli pesanti noti per essere tra i principali responsabili dell'induzione di stress ossidativo mediante produzione di ROS (Viarengo et al., 1990; Stohs et al., 2000).

L'attività acetilcolinesterasica (AChE), valutata nelle branchie e inibita principalmente da pesticidi organofosfati e carbammati, non ha mostrato variazioni negli organismi esposti nel sito 1,2,3 rispetto al sito di controllo. Sono stati pubblicati diversi studi riguardanti l'utilizzo di questo biomarker di esposizione in diversi vertebrati, dai pesci ai mammiferi (Sturm et al., 1999; Sanchez-Hernandez et Moreno-Sanchez, 2002; Rodriguez-Fuentes et Gold-Bouchot, 2004). Tuttavia sebbene sia considerato un biomarker estremamente sensibile ai pesticidi neurotossici nei vertebrati, alcuni studi (Galloway et al., 2002; Rickwood et Galloway, 2004) sottolineano che l'attività AChE è significativamente ridotta nei molluschi marini solo in presenza di elevate concentrazioni di tali contaminanti e questo potrebbe essere uno dei motivi per cui tale parametro risulta inalterato nelle *Unio* stabulate nel Lago Maggiore.

L'integrazione dei biomarker è stata effettuata mediante l'utilizzo di un Sistema Esperto, sviluppato presso il nostro dipartimento, che rappresenta un valido strumento per la valutazione oggettiva del rischio ambientale causato dai contaminanti e fornisce una chiara indicazione del grado della sindrome di stress da essi indotta negli organismi (Dagnino et al., 2007). I risultati ottenuti hanno evidenziato uno stress elevato che coinvolge cellule e tessuti (livello D del Sistema Esperto) per i molluschi esposti al sito 2, mentre per quelli stabulati nei siti 1 e 3 lo stress è moderatamente basso (livello B del Sistema Esperto).

Nel complesso quindi i risultati evidenziano che occorre attuare degli interventi correttivi per ripristinare nel sito 2 condizioni prossime al sito di controllo e evitare che possano esserci ripercussioni a livello di organismo/popolazione.

### **4.3. Valutazione basata sull'approccio Triad del rischio ambientale di ecosistemi lotici contaminati da inquinanti inorganici**

L'attività estrattiva delle miniere metallifere situate nel sud della Toscana risale ai tempi degli Etruschi (Cipriani et Tanelli, 1983); da allora e sino a tempi relativamente recenti numerosi metalli (Hg, Sb, ossidi di Fe e depositi di pirite) sono stati intensivamente sfruttati in questo distretto. A partire dal 1992 sono stati effettuati diversi studi per investigare gli effetti ambientali derivanti dalla presenza di miniere dismesse in Toscana (Benvenuti et al., 1997; 1999a). In queste aree, infatti, alla naturale presenza di elevate concentrazioni di elementi inorganici a causa della composizione mineralogica delle rocce, suoli e sedimenti (Siegel, 2002), si uniscono gli scarichi di drenaggio delle miniere che possono raggiungere le acque dolci superficiali ed essere potenziali fonti di perturbazione degli ecosistemi acquatici. La biodisponibilità degli elementi presenti nelle acque di miniera è il fattore discriminante per determinare il rischio ambientale dei corpi idrici riceventi le acque di drenaggio.

Il potenziale impatto ambientale di un sistema lotico (Fosso Rigiolato) interessato da effluenti provenienti da una zona mineraria dismessa della Toscana (Gavorrano), considerata uno dei più grandi ex giacimenti di pirite d'Europa, è stato valutato mediante applicazione dell'approccio Triad. Sono state effettuate analisi chimiche, ecotossicologiche ed ecologiche in due punti del corpo idrico Fosso Rigiolato ricevente le acque di drenaggio della miniera, uno a monte ed uno a valle della confluenza (figure 1 e 2). I dati ottenuti sono poi stati integrati mediante un Sistema Esperto di Supporto alle Decisioni sviluppato presso il nostro dipartimento ed è stato ricavato un indice di rischio ambientale.



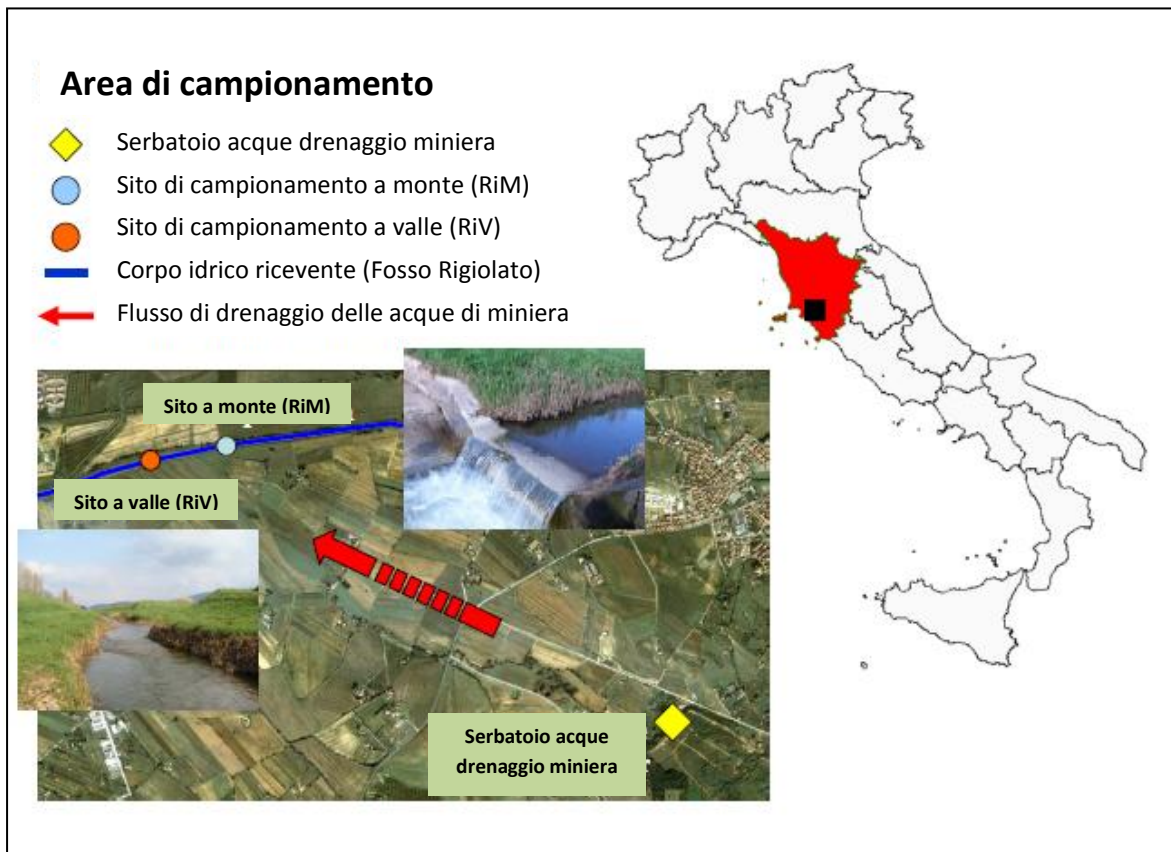


Fig. 1. Area di campionamento situata nel sud della Toscana. Sono indicati nel corpo idrico Fosso Rigiolato il sito a monte e a valle della ricezione delle acque di miniera.



Fig. 2. Ingrandimento dell'area di campionamento. In blu sono evidenziati i corpi idrici Fosso San Giovanni che convoglia le acque di miniera in Fosso Rigiolato.

## Risultati

### 4.3.1. Analisi chimiche

Tutti i campioni di acqua superficiale sono stati sottoposti ad analisi chimiche per determinare la concentrazione degli inquinanti inorganici.

Vengono di seguito riportati i risultati delle analisi chimiche di tre elementi tipicamente presenti nelle acque di miniera dell'area di studio: il ferro, il manganese e i solfati.

Per quanto riguarda il ferro (fig 3), è risultato superiore all'EQS (Environmental Quality standard, pari a 2mg/l) nei due pozzi che emungono direttamente l'acqua di miniera (PRi e PRo), nel punto in uscita da una vasca di decantazione (UV) dove viene convogliata l'acqua della galleria di scolo prima di essere immessa nel Fosso San Giovanni, che drena le acque di miniera in Fosso Rigiolato, ed anche nel punto poco prima dell'immissione di Fosso San Giovanni in Fosso Rigiolato (SuV).

Nei punti suddetti, anche il manganese (fig. 4) e i solfati (fig. 5) sono risultati superiori agli EQS, pari rispettivamente a 2mg/l e a 1000mg/l.

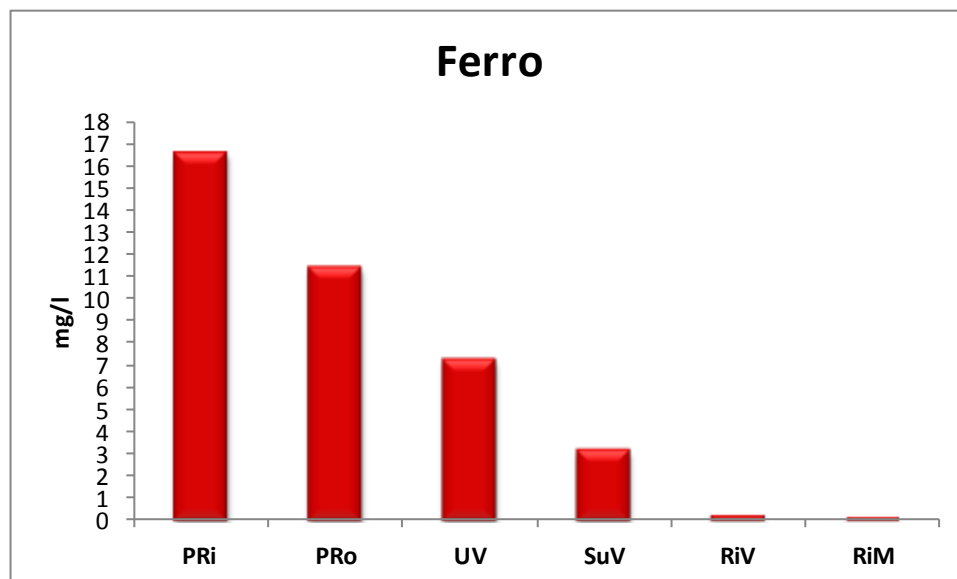


Fig. 3. Dati chimici relativi alla concentrazione di ferro espressa in mg/l presente nei diversi punti di campionamento.

Per quanto riguarda il sito di Fosso Rigiolato a valle (RiV) della confluenza con le acque di miniera, i contaminanti inorganici risultano presenti in concentrazioni meno elevate, sebbene spesso poco inferiori agli EQS; può inoltre essere osservato un gradiente di concentrazione decrescente di ferro, manganese e solfati (figure 3, 4 e 5) tra il sito UV e il sito a valle (RiV) e soprattutto a monte (RiM) di Fosso Rigiolato.

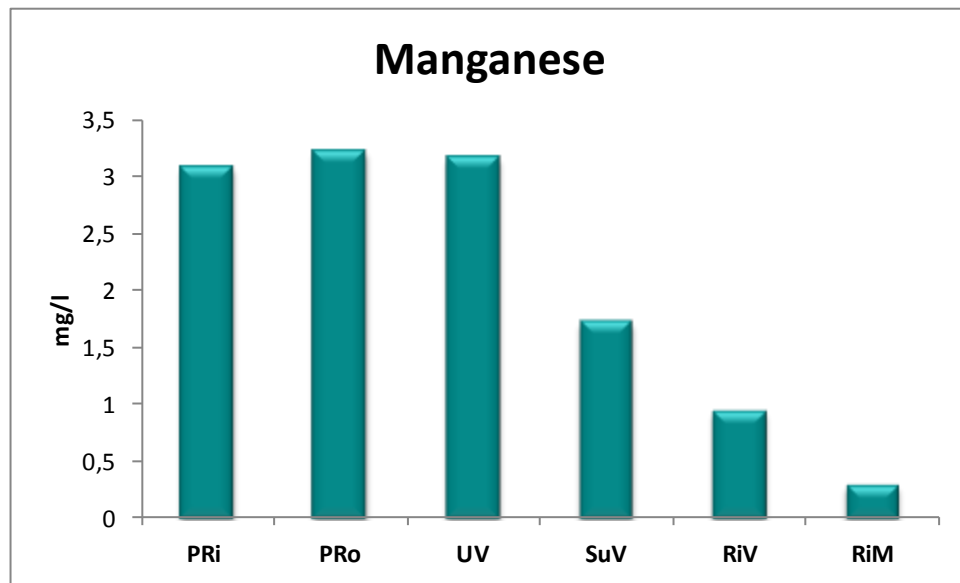


Fig. 4. Dati chimici relativi alla concentrazione di manganese espressa in mg/l presente nei diversi punti di campionamento.

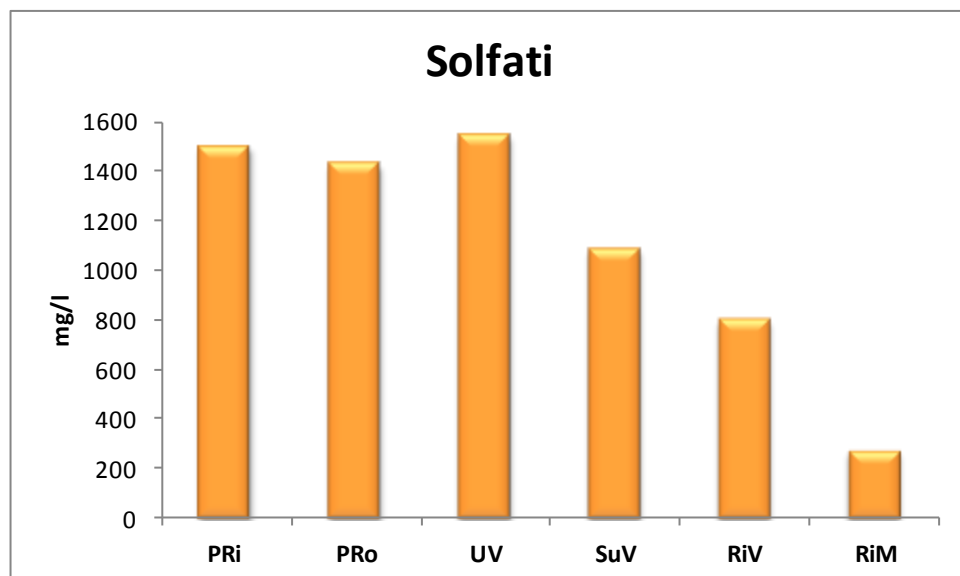


Fig. 5. Dati chimici relativi alla concentrazione di solfati espressa in mg/l presente nei diversi punti di campionamento.

### 4.3.2. Analisi ecotossicologiche

I risultati dei test ecotossicologici sono espressi come percentuali di effetto rispetto al controllo e, come previsto dai protocolli ISPRA comunemente applicati nelle indagini ambientali, tradotti in un giudizio di tossicità del campione per ognuno degli endpoint valutati, come indicato nella tabella seguente.

PERCENTUALE DI EFFETTO	GIUDIZIO
>10%	Biostimolato
>10% o <-20%	Non tossico
-20%<<-50	Debolmente tossico
>-50%	Tossico

Per valutare la tossicità delle acque superficiali sono stati utilizzati i seguenti organismi-endpoint:

- batteri (*V. fischeri*) - bioluminescenza
- alghe (*P. subcapitata*) - crescita algale
- protozoi (*D. discoideum*) - tasso di sopravvivenza e tasso di replicazione
- crostacei cladoceri (*D. magna*) - tasso di motilità

Per valutare la tossicità dei sedimenti sono stati utilizzati i seguenti organismi-endpoint:

Acqua interstiziale

- protozoi (*D. discoideum*) - tasso di sopravvivenza e tasso di replicazione
- nematodi (*C. elegans*) - tasso di sopravvivenza

Sedimenti tal quali

- semi monocotiledoni (*S. bicolor*) - tasso di germinazione e allungamento radicale
- semi dicotiledoni (*P. sativum*) - tasso di germinazione e allungamento radicale
- ostracodi (*H. incongruens*) - tasso di sopravvivenza e tasso di crescita

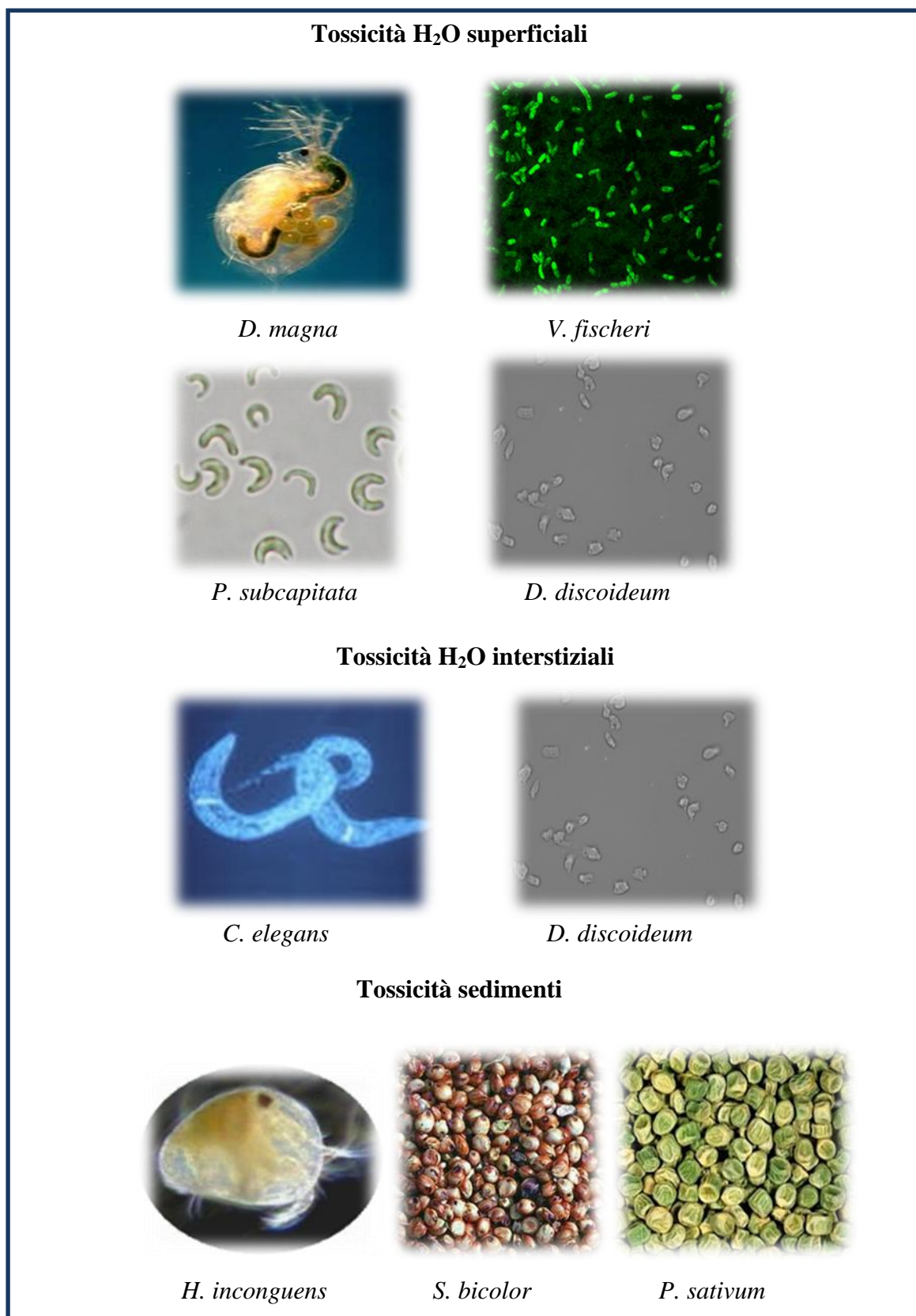


Fig. 6. Organismi utilizzati per valutare la tossicità delle acque superficiali, delle acque interstiziali e dei sedimenti del sito a monte (RiM) e a valle (RiV) di Fosso Rigiolato.

*Acque superficiali*

Sui campioni di acqua superficiale sono stati effettuati i seguenti test:

- test con batteri (*Vibrio fischeri*, endpoint: bioluminescenza);
- test con crostacei (*Daphnia magna*, endpoint: tasso di motilità);
- test con alghe (*Pseudokirchneriella subcapitata*, endpoint: crescita algale);
- test con protozoi (*Dictyostelium discoideum*, endpoint: tasso di sopravvivenza, tasso di replicazione).

Il test con *Vibrio fischeri* (fig.7) ha indicato una biostimolazione che raggiunge valori superiori al 20%, rispetto al controllo di laboratorio, nei campioni RiV.

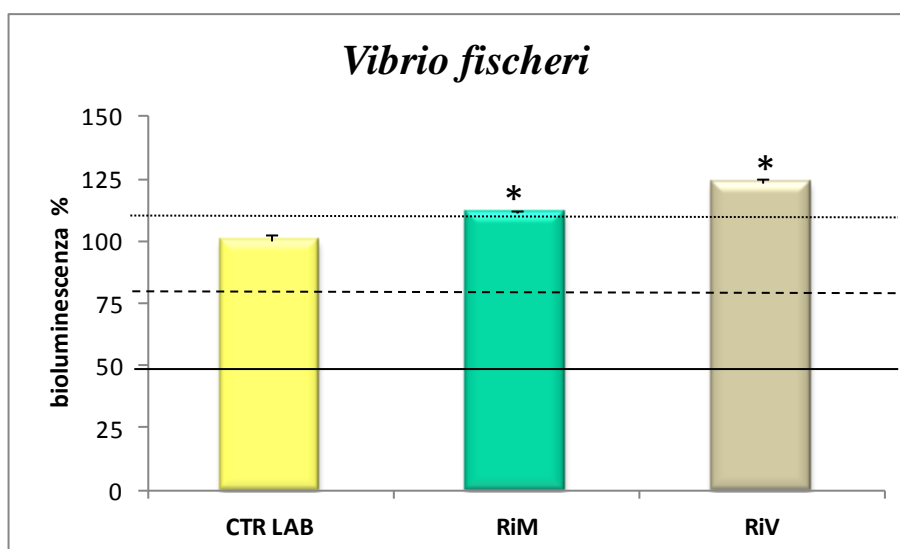


Fig. 7. Bioluminescenza in *V. fischeri*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

I risultati riguardanti il test *Daphnia magna* (fig. 8) non hanno mostrato differenze significative tra CTR LAB, RiM e RiV, così come i dati relativi al test con *Pseudokirchneriella subcapitata* (fig. 9).

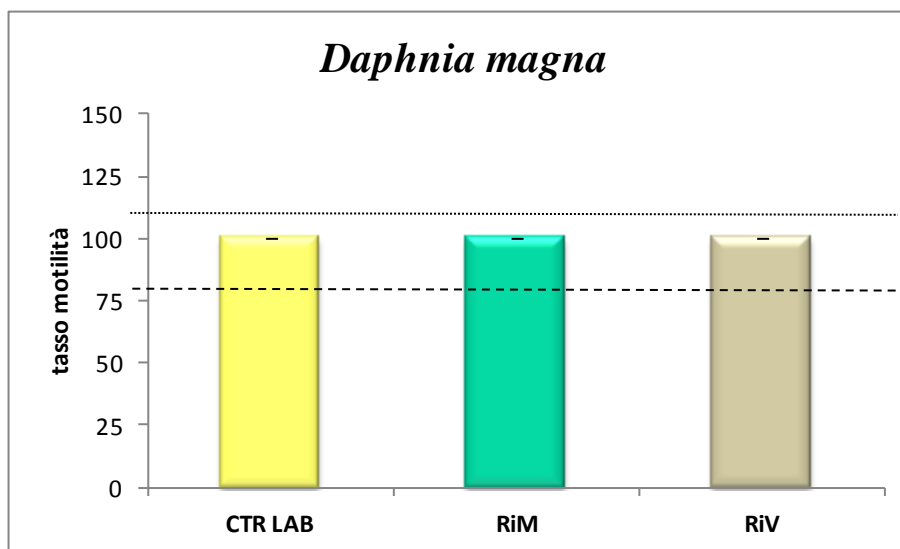


Fig. 8. Tasso di motilità in *D. magna*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche.

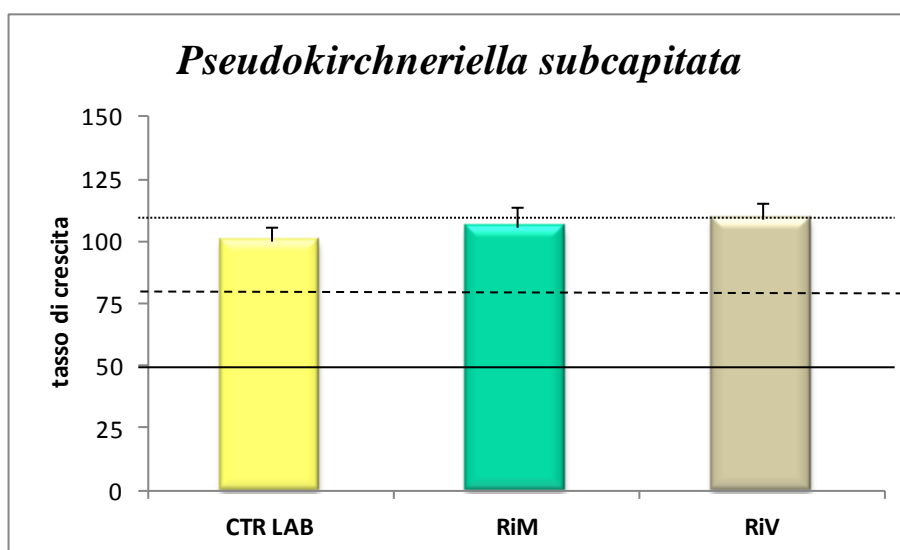


Fig. 9. Tasso di crescita in *P. subcapitata*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche.

Esaminando i risultati relativi agli effetti delle acque superficiali prelevate da Fosso Rigiolato sull'ameba sociale *Dictyostelium discoideum* non si osservano effetti sulla mortalità (fig. 10), ma sul tasso di replicazione (fig. 11) dove sono stati rilevati decrementi pari al 51% nei campioni di acqua prelevati dal punto a valle della confluenza (RiV).

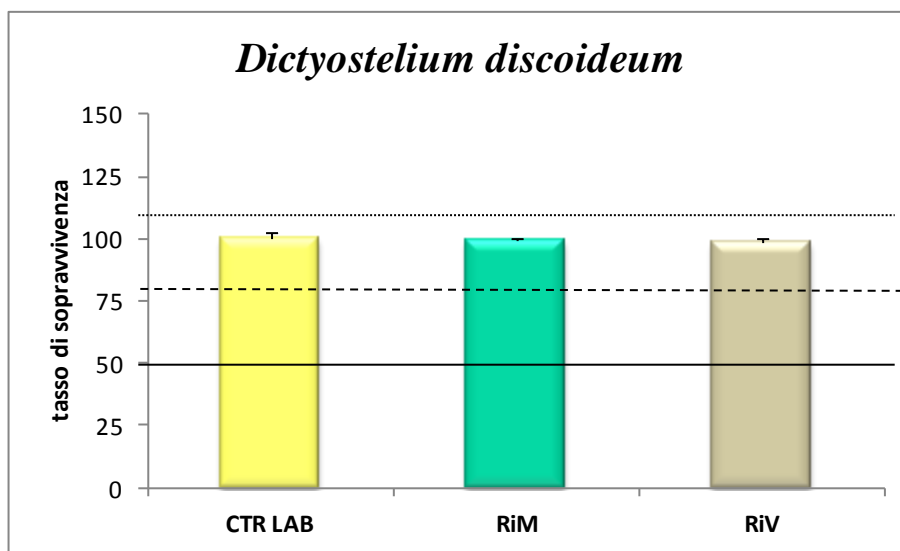


Fig. 10. Tasso di sopravvivenza in *D. discoideum*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche.

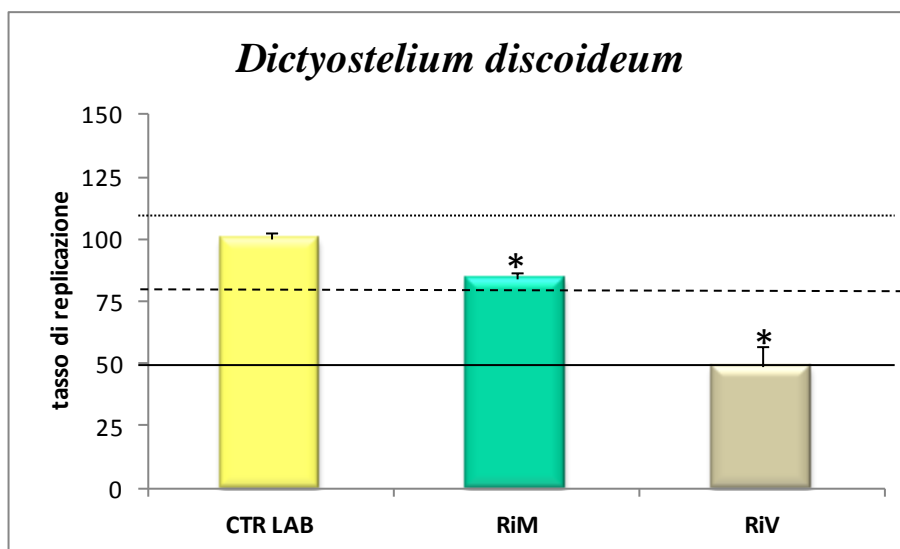


Fig. 11. Tasso di replicazione in *D. discoideum*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).



*Coefficiente di pressione tossica*

I risultati ottenuti dai campioni prelevati dal sito RiV sono stati anche correlati alla presenza di metalli, maggiore nelle acque del sito RiV rispetto a quelle del sito RiM. A tal fine è stato valutato il coefficiente di pressione tossica (TPC), calcolato secondo la formula seguente:

$$TPC^j = \sum \frac{(TAC_i^j)}{EQS_i}$$

Dove:

**TPC<sup>j</sup>** rappresenta il coefficiente di pressione tossica nel j-esimo campione;

**TAC<sub>i</sub><sup>j</sup>** rappresenta la concentrazione relativa all'i-esimo contaminante, nel j-esimo campione;

**EQS<sub>i</sub>** rappresenta il livello di concentrazione scelto come standard di qualità ambientale, relativo all'i-esimo contaminante (CSC).

Il valore di TPC per i siti analizzati è risultato pari a 2,04 per RiM e 4,14 per RiV.

*Acqua interstiziale*

Per valutare la tossicità dei sedimenti, sono stati effettuati i seguenti test ecotossicologici sui campioni di acqua interstiziale:

- test con protozoi (*Dictyostelium discoideum*, endpoint: tasso di sopravvivenza, tasso di replicazione, danno al DNA);
- test con nematodi (*Caenorhabditis elegans*, endpoint: tasso di sopravvivenza).

Gli effetti delle acque interstiziali su *Dictyostelium discoideum* sono risultati simili a quelli relativi alle acque superficiali, con l'aggiunta che anche le acque prelevate da RiM hanno mostrato effetti sul tasso di replicazione degli organismi, con decrementi superiori al 20% (fig. 12 e 13).

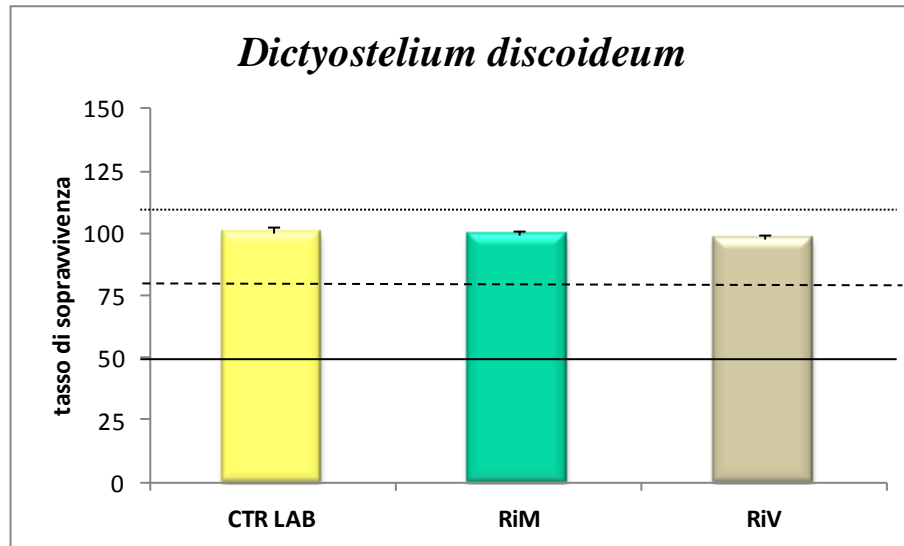


Fig. 12. Tasso di sopravvivenza in *D. discoideum*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media ± DS di 4 repliche.

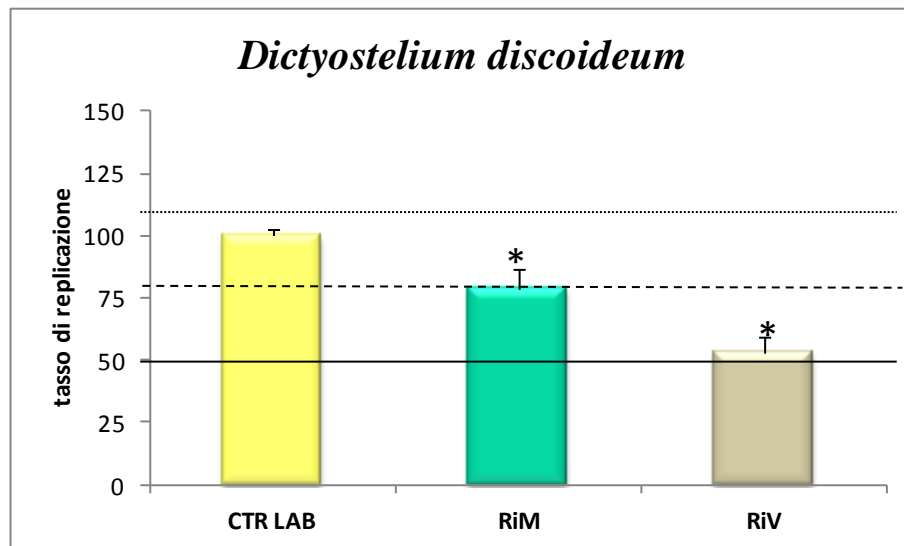


Fig. 13. Tasso di replicazione in *D. discoideum*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media ± DS di 4 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney  $U$  test).

E' importante notare che le acque interstiziali del Fosso Rigiolato non sono risultate genotossiche per l'ameba *Dictyostelium discoideum* (fig.14).

I dati riguardanti gli effetti delle acque interstiziali su *Caenorhabditis elegans* non hanno mostrato alterazioni sul tasso di sopravvivenza del nematode sia per il sito RiM che per il sito RiV (fig. 15).

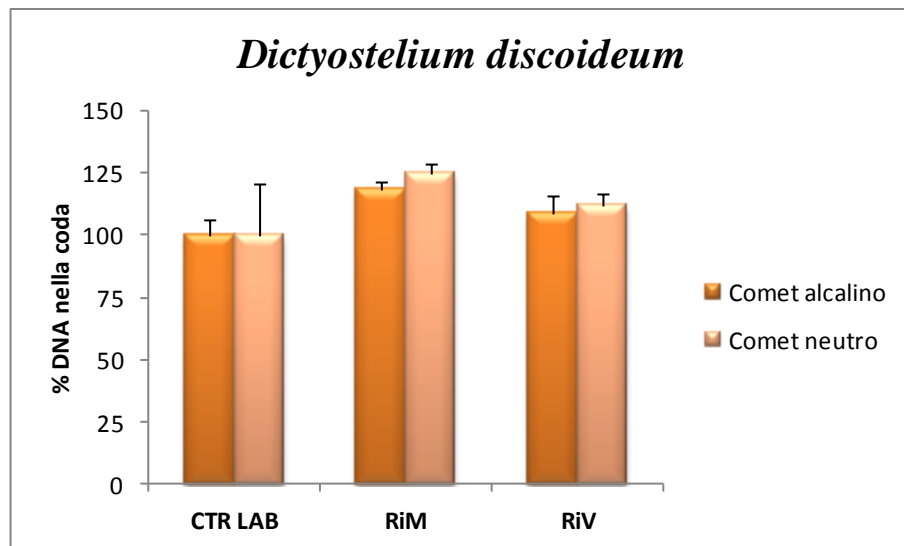


Fig. 14. Danno al DNA in *D. discoideum*, valutato mediante Comet assay alcalino e neutro. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

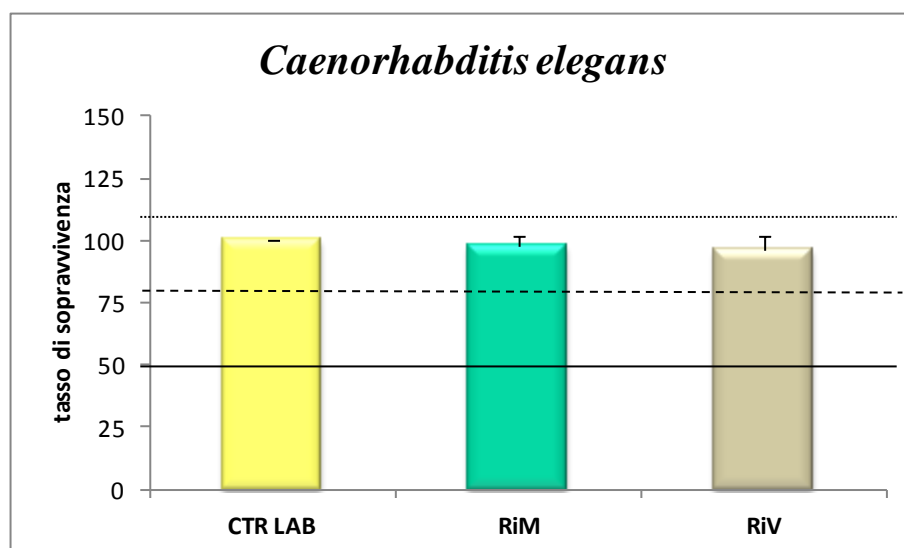


Fig. 15. Tasso di sopravvivenza in *C. elegans*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche.

### Sedimento

Sul sedimento tal quale è stata infine realizzata la seguente batteria di test ecotossicologici:

- test con vegetali (*Pisum sativum* – dicotiledone - e *Sorghum bicolor* – monocotiledone - endpoint: tasso di germinazione, allungamento radicale, indice mitotico, frequenza MNi);
- test con crostacei ostracodi (*Heterocypris incongruens*, endpoint: tasso di sopravvivenza, tasso di crescita).

I dati ottenuti hanno evidenziato effetti statisticamente significativi sul tasso di germinazione (fig. 16) e di debole tossicità per RiV, oltre che una biostimolazione per quanto riguarda l'allungamento radicale di *P. sativum* esposto a RiM (fig. 17).

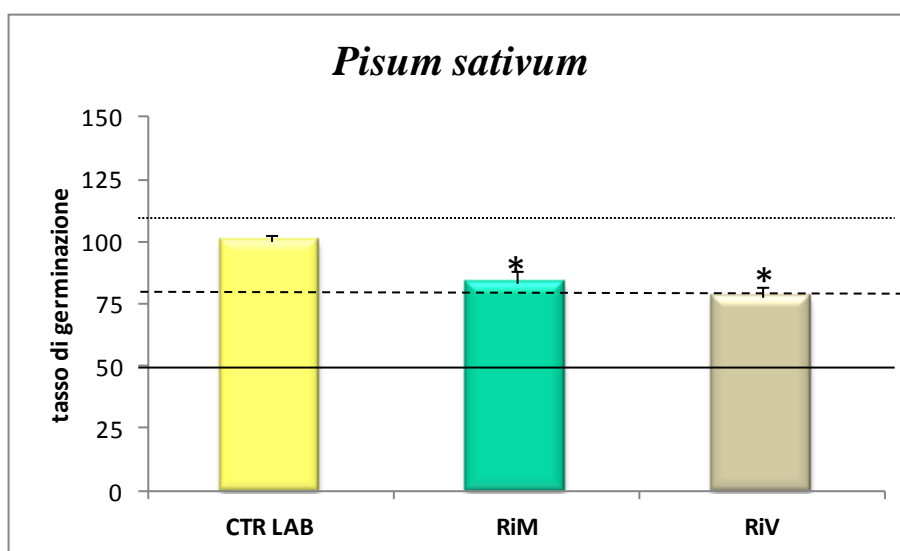


Fig. 16. Tasso di germinazione in *P. sativum*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

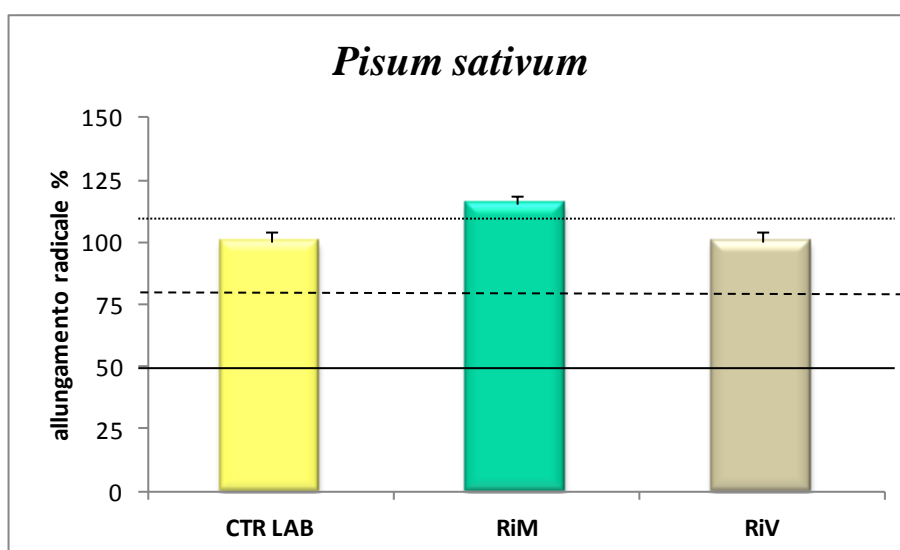


Fig. 17. Allungamento radicale in *P. sativum*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche.

Effetti statisticamente significativi sono inoltre stati rilevati sul tasso di germinazione (fig. 18) di *S. bicolor* e di debole tossicità per RiV, mentre nessun effetto è stato evidenziato sull'allungamento radicale (fig. 19).

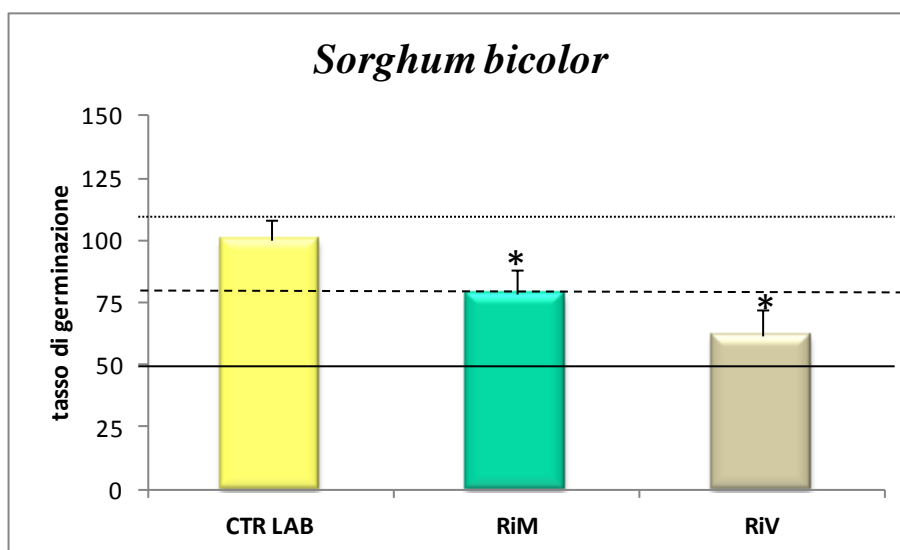


Fig. 18. Tasso di germinazione in *S. bicolor*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

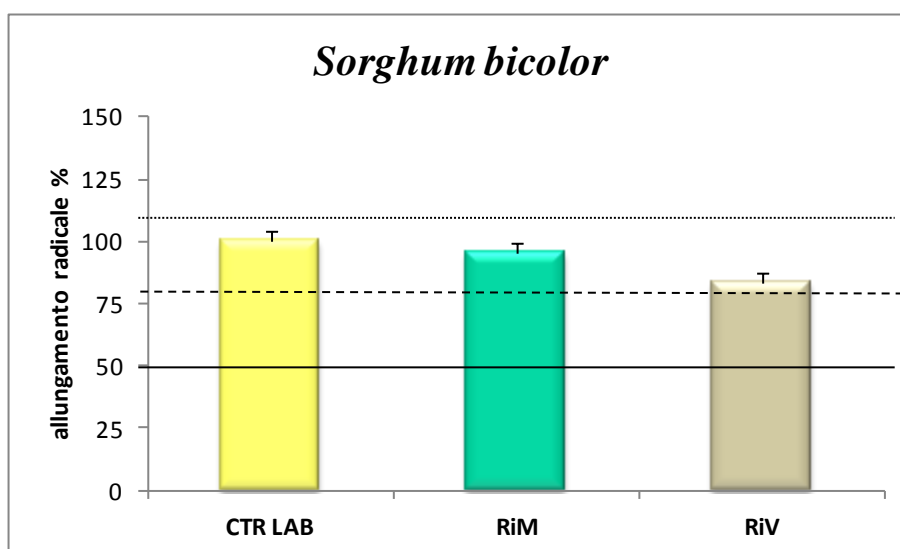


Fig. 19. Allungamento radicale in *S. bicolor*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche.

La valutazione di biomarker di genotossicità (indice mitotico, fig. 20, e frequenza dei micronuclei, fig. 21) su *Pisum sativum* non ha mostrato evidenti effetti indotti dall'esposizione ai sedimenti di RiM e RiV.

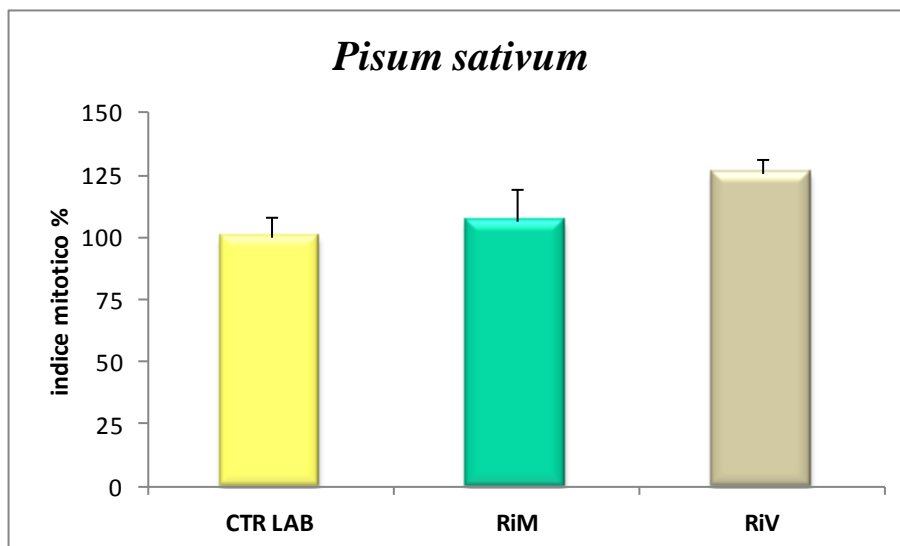


Fig. 20. Indice mitotico in *P. sativum*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche.

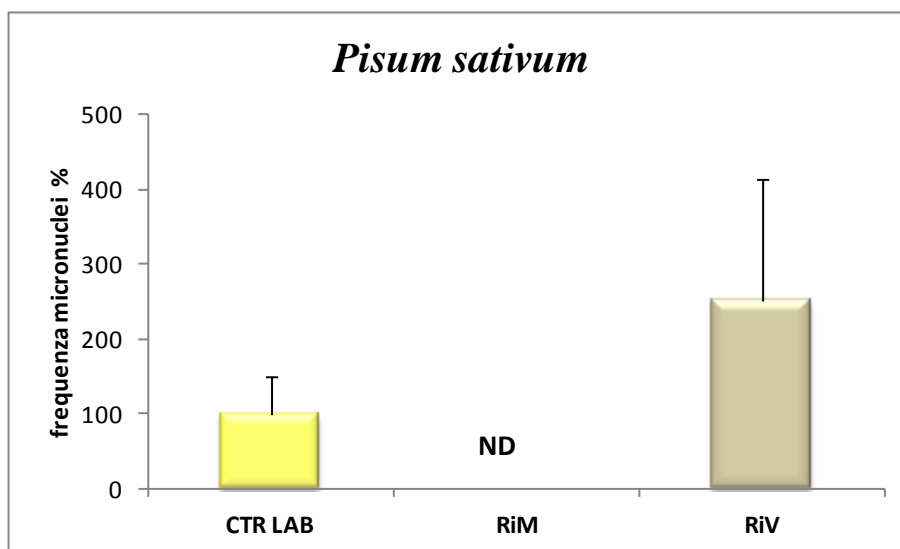


Fig. 21. Frequenza dei micronuclei in *P. sativum*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche.

I dati relativi al crostaceo *Heterocypris incongruens*, in assenza di effetti sul tasso di sopravvivenza (fig. 22), hanno mostrato una biostimolazione del tasso di crescita indotta dall'esposizione ai sedimenti prelevati da RiV (fig. 23).

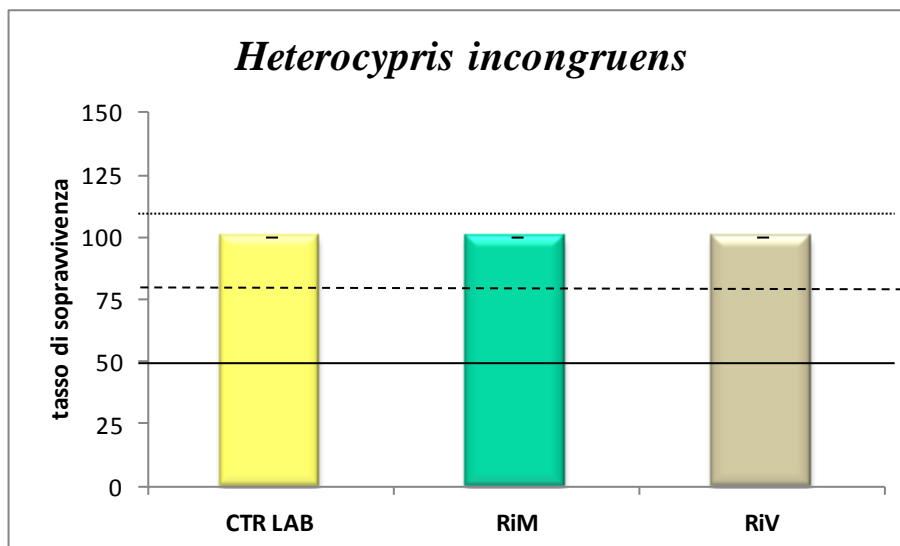


Fig. 22. Tasso di sopravvivenza in *H. incongruens*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di 4 repliche.

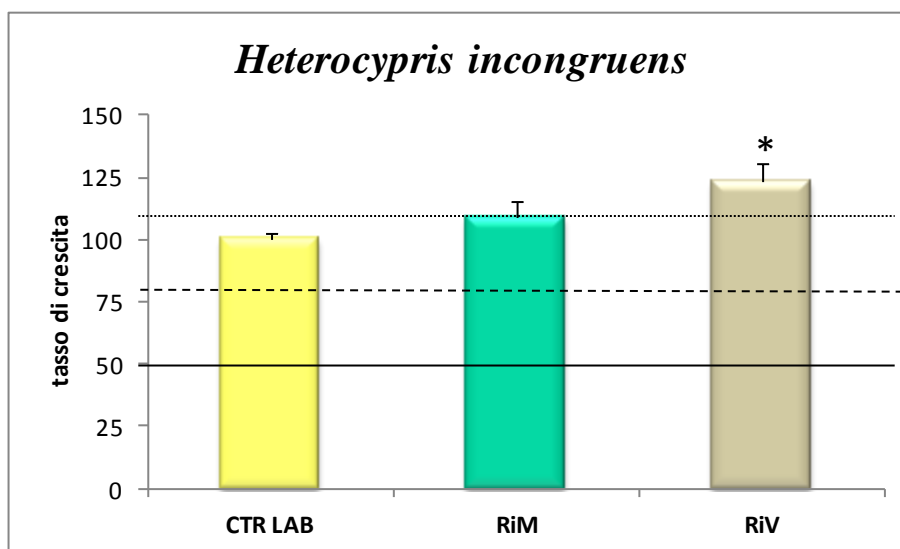


Fig. 23. Tasso di crescita in *H. incongruens*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media $\pm$ DS di quattro repliche. \* =  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

### 4.3.3. Indagini ecologiche

La determinazione del rischio ambientale, seguendo l'approccio Triad, è stata completata con la valutazione della struttura della comunità macrobentonica del comparto sedimentario ed il calcolo dell'indice biotico esteso (IBE).

Le indagini sono state condotte su due siti di campionamento relativi al Fosso Rigiolato, secondo la stessa logica utilizzata per il prelievo dei campioni per i test ecotossicologici: si è considerato un punto di campionamento a monte della confluenza Fosso Rigiolato-Fosso San Giovanni (RiM) ed uno a valle (RiV) (fig. 24).

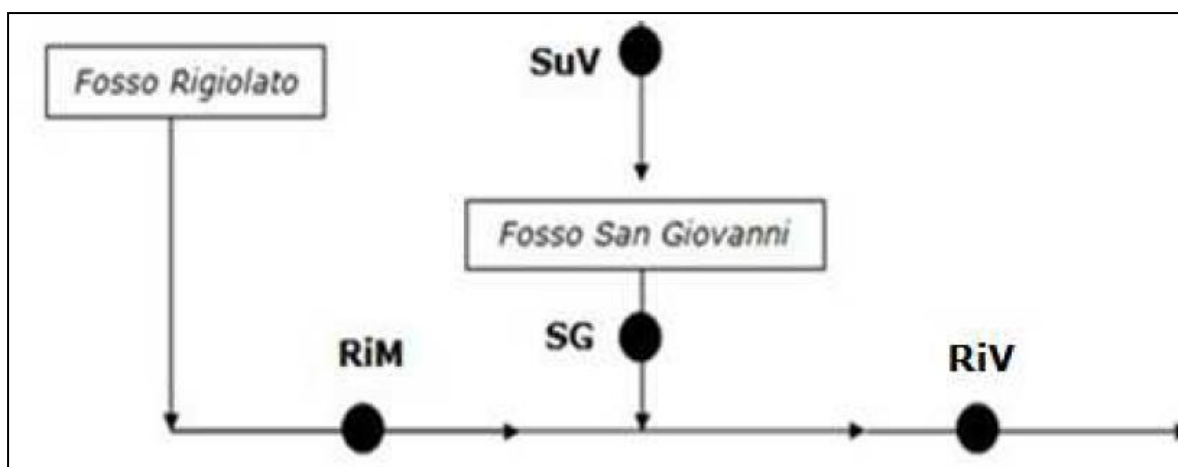


Fig. 24. Schema punti di campionamento usato le per indagini ecologiche.

I dati ottenuti mostrano come l'immissione nel Fosso Rigiolato delle acque provenienti dal Fosso San Giovanni, che drena le acque di scolo del complesso minerario, non solo non porti ad un deterioramento dello stato di salute delle comunità macrobentoniche, ma anzi migliori il livello di biodiversità del corpo idrico. Infatti, i risultati relativi alla determinazione dell'Indice Biotico Esteso (I.B.E.) nei punti di campionamento RiM e RiV sono rispettivamente pari a 6/7 (fig. 25), corrispondente alla classe di qualità III ed a 8/7 (fig. 26), corrispondente alla classe di qualità II/III (fig. 28).

È stato inoltre applicato l'Indice anglosassone BMWP (Hellowell, 1978) basato sui macroinvertebrati bentonici e calcolabile attraverso l'attribuzione di punteggi alle singole famiglie che colloca entrambe le stazioni campionate in II° Classe.

Data la situazione ambientale riscontrata nel Fosso Rigiolato si è ritenuto opportuno effettuare un campionamento di fauna macrobentonica anche nel tratto terminale del Fosso San Giovanni, che riceve le acque di scolo della miniera di Gavorrano (SG). I risultati hanno mostrato un valore dell'indice pari a 10 (fig. 27), corrispondente alla classe di qualità I, propria di ambienti non inquinati o non alterati in modo sensibile (fig. 28).



<b>Fosso Rigiolato: Stazione a monte della c.za scolo miniera (RiM)</b>	
<b>Plecoptera</b>	
Nemouridae	<i>Nemoura</i> sp. *
<b>Ephemeroptera</b>	
Caenidae	<i>Caenis</i> sp.
Baetidae	<i>Baetis</i> sp. *
<b>Diptera</b>	
Simuliidae	
Ceratopogonidae	
Chironomidae	
Empididae	
Psychodidae *	
<b>Coleoptera</b>	
Hydrophilidae *	
Dytiscidae	
Hydraenidae *	
<b>Odonata</b>	
Platycnemidae	<i>Platycnemis pennipes</i>
Coenagrionidae	<i>Coenagrion</i> sp.
Gomphidae	<i>Onychogomphus</i> sp.
Libellulidae	<i>Orthetrum</i> sp.
<b>Heteroptera</b>	
Notonectidae	<i>Notonecta</i> sp. *
<b>Annelida</b>	
Lumbriculidae	
Lumbricidae	
Naididae	
Tubificidae	
Erpobdellidae	<i>Dina</i> sp.
<b>Arachnida</b>	
Hydracarina *	
<hr/>	
<b>Unità Sistematiche Totali</b>	<b>22</b>
<b>Unità Sistematiche Valide</b>	<b>15</b>
<b>IBE</b>	<b>6/7</b>
<b>Classe di Qualità</b>	<b>III</b>
N.B. - L'asterisco indica i taxon non conteggiati, in quanto presenti con numeri e densità non significative (*).	

**Fig. 25. Elenco Faunistico e valore IBE per il punto di campionamento sul Fosso Rigiolato a monte della confluenza con il Fosso San Giovanni (RiM).**

<b>Fosso Rigiolato: Stazione a valle della c.za scola miniera (RiV)</b>	
<b>Plecoptera</b>	
Nemouridae	<i>Nemoura</i> sp. *
	<i>Protonemura</i> sp.
Perlodidae	<i>Isoperla</i> sp. *
Capniidae	<i>Capnia</i> sp. *
<b>Ephemeroptera</b>	
Ephemerellidae	<i>Ephemerella</i> sp. *
Leptophlebiidae	<i>Habrophlebia</i> sp. *
Baetidae	<i>Baetis</i> sp.
<b>Diptera</b>	
Simuliidae	
Ceratopogonidae	
Chironomidae	
Psychodidae *	
Stratiomyidae *	
<b>Coleoptera</b>	
Dryopidae *	
Dytiscidae *	
<b>Odonata</b>	
Libellulidae	<i>Orthetrum</i> sp.
<b>Anellida</b>	
Lumbriculidae	
Lumbricidae	
Naididae	
Tubificidae	
Erpobdellidae	<i>Dina</i> sp.
<b>Arachnida</b>	
Hydracarina *	
<hr/>	
<b>Unità Sistematiche Totali</b>	<b>21</b>
<b>Unità Sistematiche Valide</b>	<b>11</b>
<b>IBE</b>	<b>8/7</b>
<b>Classe di Qualità</b>	<b>II/III</b>
N.B. - L'asterisco indica i taxon non conteggiati, in quanto presenti con numeri e densità non significative (*).	

**Fig. 26. Elenco Faunistico e valore IBE per il punto di campionamento sul Fosso Rigiolato a valle della confluenza con il Fosso San Giovanni (RiV).**

<b>Fosso San Giovanni, a monte della c.za con il Fosso Rigiolato (SG)</b>	
<b>Plecoptera</b>	
Nemouridae	<i>Nemoura</i> sp. *
	<i>Protonemura</i> sp.
Perlodidae	<i>Isoperla</i> sp.
<b>Ephemeroptera</b>	
Caenidae	<i>Caenis</i> sp. *
Leptophlebiidae	<i>Habrophlebia</i> sp.
Baetidae	<i>Baetis</i> sp.
<b>Diptera</b>	
Simuliidae	
Ceratopogonidae	
Chironomidae	
Stratiomyidae *	
Empididae	
<b>Trichoptera</b>	
Limnephilidae	
<b>Coleoptera</b>	
Dryopidae	
Hydrophilidae *	
Dytiscidae	
<b>Annelida</b>	
Lumbriculidae	
Lumbricidae	
Naididae	
Tubificidae	
Erpobdellidae	<i>Dina</i> sp.
Haemophilidae	<i>Haemophis</i> sp.
<b>Mollusca</b>	
Physidae	<i>Physa</i> sp.
<b>Platelminta</b>	
Dugesidae	<i>Dugesia</i> sp.
<b>Arachnida</b>	
Hydracarina *	
<b>Unità Sistematiche Totali 24</b> <b>Unità Sistematiche Valide 19</b> <b>IBE 10</b> <b>Classe di Qualità I</b>	

**Fig. 27. Elenco Faunistico e valore IBE per il punto di campionamento sul Fosso San Giovanni, a monte della confluenza con Fosso Rigiolato.**

<b>CLASSI DI QUALITA'</b>	<b>VALORE DI IBE</b>	<b>GIUDIZIO</b>	<b>COLORE DI RIFERIMENTO</b>
Classe I	10 - 11 - 12	Ambiente non inquinato o non alterato in modo sensibile	Azzurro
Classe II	8 - 9	Ambiente in cui sono evidenti alcuni effetti dell'inquinamento	Verde
Classe III	6 - 7	Ambiente inquinato	Giallo
Classe IV	4 - 5	Ambiente molto inquinato	Arancione
Classe V	1 - 2 - 3	Ambiente fortemente inquinato	Rosso

Fig. 28. Classi di qualità ricavate dall'I.B.E.

#### 4.3.4. Determinazione del rischio ambientale

Per quanto concerne la determinazione del rischio ambientale derivante dall'immissione delle acque di scolo della miniera di Gavorrano nel Fosso Rigiolato, i dati chimici, ecotossicologici ed ecologici raccolti nel corso di questo studio, sono stati integrati applicando uno specifico Sistema Esperto di Supporto alle Decisioni (EDSS).

In particolare, i risultati ottenuti da ciascuna disciplina Triad sono stati pesati in funzione della rilevanza ecologica in termini di capacità di descrivere gli effetti, in atto o potenziali, sulla biodiversità della zona, come descritto in Dagnino et al (2008).

Il risultato finale è un indice di rischio ambientale (EnvRI) modulato in valori compresi tra 0 e 1.

In relazione al presente studio, l'indice ottenuto dall'integrazione dei dati relativi al Fosso Rigiolato (RiV) ha mostrato un valore pari a 0.15 (tabella 1), inferiore quindi al valore soglia di 0.25, generalmente utilizzato come riferimento per individuare le aree in cui il rischio ambientale risulta significativo (figura 29).

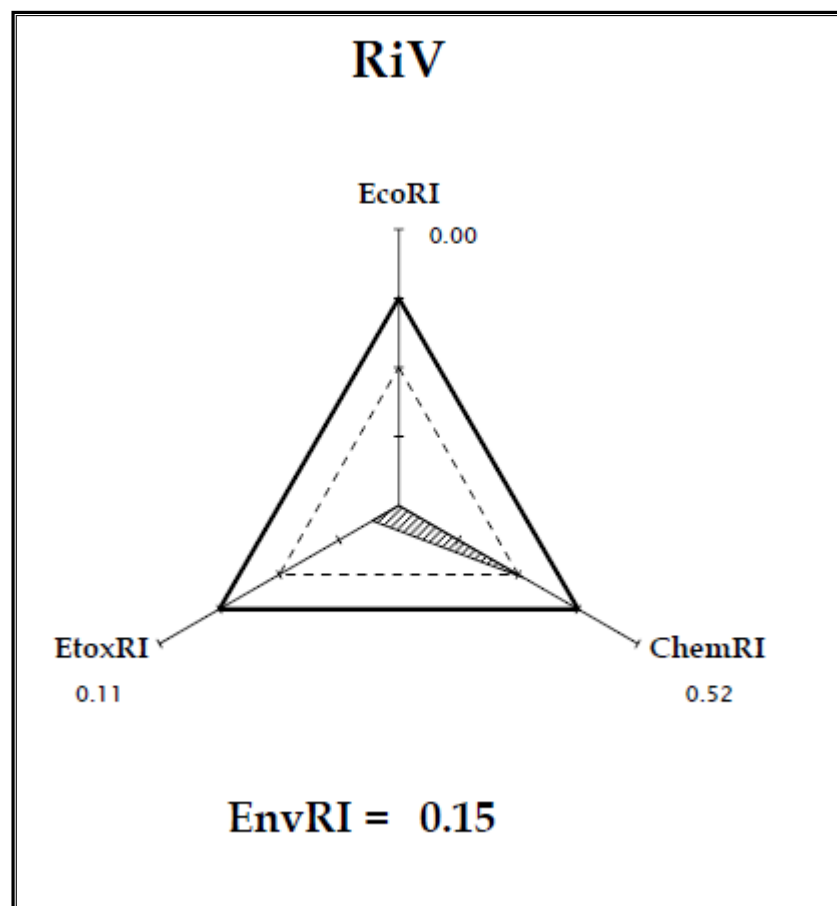


Fig. 29. Valutazione dell'indice di rischio ambientale (EnvRI).  
RiV= Fosso Rigiolato valle

Di seguito (tabella 1) si riassumono, per le varie stazioni, gli altri indici calcolati utilizzando la stessa metodologia.

	RiV vs RiM	RiM vs SuM	RiV vs SuM	Fattore di peso
ChemRI	0.52	0.50	0.52	1.0
EtoxRI	0.11	0.08	0.18	1.5
EcoRI	0.00	0.39	0.28	2.0
EnvRI	0.15	0.31	0.30	-

Tabella 2. Riassunto degli indici utilizzati per il calcolo dell'EnvRI.

EnvRI, indice di rischio ambientale, è calcolato dalla media pesata dei sub-indici ChemRI, EtoxRI ed EcoRI, secondo la seguente formula:

$$EnvRI = \frac{(wf_{ChemRI} * ChemRI + wf_{EtoxRI} * EtoxRI + wf_{EcoRI} * EcoRI)}{(wf_{ChemRI} + wf_{EtoxRI} + wf_{EcoRI})}$$

Nella procedura di integrazione, a ciascun indice viene attribuito un coefficiente di peso (*wf*) (tabella 2).

Indice	Tipo di parametro	Fattore di peso	Valore di default
<i>ChemRI</i>	Concentrazione totale di inquinanti	<i>wf<sub>CHEM</sub></i>	1.0
<i>EtoxRI</i>	Saggi ecotossicologici	<i>wf<sub>ETOX</sub></i>	1.5
<i>EcoRI</i>	Concentrazione totale di inquinanti	<i>wf<sub>ECO</sub></i>	2.0

Tabella 2. Fattore di peso di ciascun indice utilizzato per il calcolo dell'EnvRI.

### 4.3.5. Discussione

Negli ultimi decenni l'attività mineraria è progressivamente diminuita in Italia, così come in molti altri Paesi Europei. Una miniera dismessa pone una serie di problematiche economiche ma anche ambientali. Infatti una delle conseguenze più comuni è il drenaggio acido della miniera, associato all'ossidazione di minerali quali la pirite, che in presenza di acqua ed ossigeno reagisce formando acido solforico (Singer et Strumm; 1970) compromettendo la struttura della comunità di organismi di un determinato ecosistema (Gray, 1997); il rischio ecologico può aumentare per la presenza di elementi tossici quali metalli e sali che possono pertanto rendere pericoloso lo scarico incontrollato delle acque di miniera e il loro utilizzo per diversi scopi (Garzonio et Affuso, 2004).

La miniera di Gavorrano è stata uno dei più grandi giacimenti di pirite in Europa durante il secolo scorso; la produzione cessò nel 1981 e da allora la zona è sottoposta a monitoraggio. Le indagini chimiche svolte in questo studio hanno evidenziato la presenza di solfati e metalli quali ferro e manganese, elementi chiave nelle acque di miniera dell'area di Gavorrano (Garzonio et Affuso, 2004): essi sono risultati presenti in concentrazioni superiori agli EQS nei due pozzi che emungono direttamente l'acqua di miniera (PRi e PRo), nel punto in uscita da una vasca di decantazione (UV) dove viene convogliata l'acqua della galleria di scolo prima di essere immessa nel Fosso San Giovanni, che drena le acque di miniera in Fosso Rigiolato, ed anche nel punto poco prima dell'immissione di Fosso San Giovanni in Fosso Rigiolato (SuV). Pertanto è stato necessario valutare se tali contaminanti potessero determinare effetti dannosi negli organismi presenti in Fosso Rigiolato, primo recettore sensibile delle acque di miniera, e quale fosse l'impatto in termini di eventuale declino della biodiversità.

Per quanto riguarda le analisi ecotossicologiche, non sono stati evidenziati effetti rilevanti sulla bioluminescenza del batterio *V. fischeri*, sul tasso di motilità del crostaceo cladocero *D. magna* e sul tasso di crescita dell'alga *P. subcapitata* esposti alle acque superficiali dei siti situati sul corpo idrico Fosso Rigiolato (RiM e RiV). Invece i risultati ottenuti mediante l'utilizzo dell'organismo modello *D. discoideum*, pur non evidenziando effetti a livello del tasso di sopravvivenza, mostrano decrementi pari al 51% sul tasso di replicazione delle amebe esposte ai campioni di acqua prelevati dal punto a valle della confluenza (RiV). Dati simili si ottengono valutando gli effetti delle acque interstiziali su *D. discoideum* con l'aggiunta che anche le acque prelevate da RiM mostrano effetti sul tasso di replicazione degli organismi, con decrementi superiori al 20%, mentre nessuna alterazione è stata

riscontrata sul tasso di sopravvivenza del nematode *Caenorhabditis elegans* sia per il sito RiM che per il sito RiV. Dai risultati ottenuti è possibile constatare una maggiore sensibilità di risposta allo stress dell'ameba sociale *D. discoideum* rispetto agli organismi *V. fischeri*, *D. magna*, *P. subcapitata* come sottolineato anche in studi di valutazione della qualità delle acque dolci (Sforzini et al., 2008) e in attività di ricerca che lo utilizzano come organismo modello per determinare la tossicità di inquinanti organici ed inorganici quali metalli pesanti (Dondero et al., 2006).

I test effettuati sul sedimento dei siti RiM e RiV utilizzando la monocotiledone *S. bicolor*, la dicotiledone *P. sativum* e il crostaceo ostracode *H. incongruens*, hanno evidenziato effetti statisticamente significativi e di debole tossicità solo per il parametro tasso di germinazione di *P. sativum* e *S. bicolor* esposti ai sedimenti di RiV.

E' importante notare che i sedimenti, così come l'acqua interstiziale, non risultano genotossici; infatti la valutazione dell'indice mitotico e della frequenza dei micronuclei su *Pisum sativum* non ha mostrato evidenti effetti indotti dall'esposizione ai sedimenti RiM e RiV, e le acque interstiziali del Fosso Rigiolato non hanno indotto danno al DNA dell'ameba *Dictyostelium discoideum*, valutato mediante Comet assay.

Di particolare interesse sono i risultati ottenuti dalle indagini ecologiche, effettuate mediante applicazione dell'indice biotico esteso (I.B.E.), strumento previsto dalla normativa italiana per l'analisi della qualità dei sistemi di acqua corrente (D. Lgs. 152/99 e s.m.i.), basato sull'analisi della struttura delle comunità di macroinvertebrati bentonici fluviali. Dai campionamenti effettuati è emerso chiaramente che Fosso San Giovanni, che convoglia le acque di miniera in Fosso Rigiolato, presenta una biodiversità ottimale, con I.B.E. pari a 10, tipico di ambienti non inquinati e corrispondente alla classe di qualità I, ed è in grado di influenzare positivamente la comunità di macroinvertebrati bentonici di Fosso Rigiolato determinando nel punto a valle della confluenza I.B.E. pari a 8/7 (classe di qualità II/III), mentre nel tratto a monte non influenzato dagli scarichi minerari l'I.B.E. pari a 6/7 ha evidenziato una situazione già compromessa (classe di qualità III).

La determinazione dell'indice di rischio ecologico, basata sull'approccio Triad che prevede l'integrazione dei dati chimici, ecotossicologici ed ecologici (Dagnino et al., 2008), ha evidenziato come le acque del Fosso Rigiolato di valle (RiV), confrontate con quelle di monte (RiM) non influenzate dalle acque di miniera, presentino un rischio trascurabile pari a 0.15 (inferiore al valore soglia 0.25).

Considerati nel loro insieme i risultati di questo studio confermano l'importanza di valutare il reale significato dei dati chimici alla luce dei risultati relativi alle analisi biologiche.



Infatti applicando la normativa vigente e considerando i limiti di legge relativi a ferro, manganese e solfati, le acque reflue della miniera dismessa risulterebbero tossiche e pertanto in grado di alterare l'ecosistema della rete fluviale ricevente presente nell'area di studio; i dati ecologici ed ecotossicologici invece determinano un quadro molto meno impattante sugli organismi che popolano i corpi idrici correlati alle acque di miniera e pertanto l'indice di rischio ambientale risulta trascurabile.

I risultati ottenuti pongono anche l'attenzione sull'importanza di conoscere il cosiddetto "fondo naturale" di aree come quella del grossetano caratterizzate da elevate concentrazioni di sostanze inorganiche, al fine di stabilire 'limiti di legge' adeguati: diversi studi (Benvenuti et al., 1997; Mascaro et al., 2001; Pagnanelli et al., 2004) sono stati infatti effettuati per determinare le caratteristiche lito-geologiche tipiche della zona e capire quale è il reale contributo delle fonti esterne, quali le acque di miniera, all'inquinamento ambientale.

E' inoltre importante determinare quali possono essere le attività antropiche, presenti nell'area oggetto di studio, che possono provocare effetti negativi in termini di declino della biodiversità dei corpi idrici. Dalle indagini ecologiche (valore I.B.E. di RiM pari a 6/7, di RiV 8/7 e di Fosso San Giovanni, che convoglia le acque di miniera in Fosso Rigiolato, pari a 10) appare chiaro che non sono le acque di scarico minerario, sebbene ricche di sali inorganici, a comportare rischi per la biodiversità e ad alterare l'equilibrio del corpo idrico ma le cause vanno ricercate in altre fonti antropiche presenti nell'area: infatti Fosso Rigiolato, al contrario di Fosso San Giovanni, drena una zona di coltivazioni agrarie ed è presumibile che i valori inferiori di I.B.E. ottenuti nel punto a monte della confluenza con le acque di drenaggio della miniera (RiM) siano in parte dovuti alla contaminazione prodotta da pratiche agricole intensive, che si avvalgono anche di prodotti chimici come erbicidi, pesticidi e disinfestanti.

Lo studio ha evidenziato inoltre l'importanza di usare i test cronici quali il tasso di riproduzione, essenziale per correlare gli effetti degli inquinanti sugli organismi ai possibili cambiamenti a livello di popolazione (Viarengo et al., 2007), e i biomarker subletali, che essendo più sensibili, meglio garantiscono una corretta interpretazione del quadro complessivo degli effetti biologici dovuti alla contaminazione delle matrici quali le acque dolci (Sforzini et al., 2008). In questo contesto particolare rilievo assumono i test di genotossicità, molto importanti per la "percezione del rischio" della popolazione residente: gli studi effettuati su protozoi e su organismi vegetali indicano chiaramente che valori elevati di sali inorganici nelle matrici dell'ecosistema non comporta effetti genotossici per

gli organismi che lo popolano e pertanto è possibile l'utilizzo dell'acqua a scopo di potabilizzazione e di irrigazione delle colture vegetali. Nel caso contrario in cui le matrici fossero risultate genotossiche, anche in assenza di effetti sulla biodiversità, sarebbe emersa l'esigenza di più approfonditi studi atti a valutare come scongiurare possibili effetti negativi sulla comunità locale.

Sulla base delle evidenze degli studi sperimentali condotti, non risultano pertanto necessarie azioni correttive per l'area interessata dagli scarichi della miniera dismessa di Gavorrano.

## ***5. Conclusioni***

I dati raccolti in questa ricerca hanno evidenziato diversi aspetti importanti che occorre considerare nei programmi di biomonitoraggio per stimare correttamente il rischio ecologico di corpi idrici lentici e lotici.

Innanzitutto è emersa l'importanza di stimare la frazione realmente biodisponibile dei contaminanti presenti nei sedimenti e/o acque superficiali di un corpo idrico. La biodisponibilità è infatti un fattore chiave per evitare errori di sovrastima o sottostima del rischio ambientale ed è strettamente correlata alla manifestazione degli effetti biologici causati dagli inquinanti negli organismi. Per poter valutare la tossicità dei diversi contaminanti biodisponibili presenti nell'ambiente è risultato estremamente vantaggioso affiancare alle analisi chimiche un approccio di tipo ecotossicologico. In questo contesto gli studi effettuati hanno dimostrato chiaramente l'utilità di organismi modello quali l'ameba sociale *Dictyostelium discoideum* e il mollusco bivalve *Unio pictorum* per valutare la tossicità di inquinanti organici ed inorganici presenti nelle acque dolci lotiche e lentiche. Rispetto ai classici bioassays utilizzati dalle Agenzie Ambientali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) in Italia, l'impiego congiunto in *D. discoideum* e in *U. pictorum* di endpoint di alto livello (tasso di mortalità e/o di riproduzione), in grado di chiarire i possibili effetti a livello di popolazione/comunità, e dei biomarker, parametri che consentono di seguire l'evolversi della sindrome di stress ai diversi livelli di organizzazione biologica, ha permesso di ottenere un quadro più esaustivo degli effetti biologici dei contaminanti. A tale proposito l'implementazione della batteria di biomarker sull'ameba sociale *Dictyostelium discoideum*, specialmente per quanto riguarda la determinazione dello stress ossidativo, ha rappresentato un'innovazione rispetto agli studi precedentemente effettuati su tale organismo (Dondero et al., 2006; Sforzini et al., 2008; Marsano et al., 2010; Boatti et al., 2012) e ne ha confermato la validità per comprendere il meccanismo tramite cui si esplica la tossicità di inquinanti presenti in elevata concentrazione nei sedimenti di alcuni laghi, quali il DDX e il  $Hg^{2+}$ . Inoltre l'uso di *D. discoideum* ha permesso di evidenziare gli eventuali effetti sinergici causati dalla miscela dei contaminanti organici e del metallo pesante quando i due contaminanti sono presenti in forma biodisponibile; gli inquinanti in ambiente sono raramente presenti singolarmente ed è pertanto importante studiarne la tossicità in forma combinata per avere un'indicazione realistica delle possibili ripercussioni sugli organismi e più in generale sugli ecosistemi. Negli studi effettuati hanno assunto particolare rilievo i biomarker di genotossicità, molto importanti per la percezione del rischio da parte dei residenti nelle aree monitorate: infatti l'invarianza del danno al DNA e/o cromosomico, come nel caso di *D. discoideum* e di

*P.sativum* esposti rispettivamente alle acque ed ai sedimenti del corpo idrico ricevente gli scarichi della miniera di Gavorrano, è indice che le acque inquinate non presentano un rischio cancerogeno anche per la popolazione umana. In quest'ottica i biomarker possono servire da "early warning signals" per discriminare le aree in cui sono necessarie azioni correttive per salvaguardare l'ecosistema e, più in generale, la salute dell'uomo, ed è pertanto fondamentale includerli nei programmi di biomonitoraggio.

L'integrazione dei risultati ottenuti mediante il Sistema Esperto sviluppato nel nostro dipartimento ha inoltre evidenziato l'utilità di usare tale strumento per correlare i dati dei diversi biomarker e interpretarli nella maniera corretta. In particolare l'integrazione dei dati ha fornito una chiara indicazione del grado raggiunto dalla sindrome di stress negli organismi e dovrebbe consentire l'introduzione, nel prossimo futuro, dell'approccio biomarker nel corpo ufficiale delle procedure per il monitoraggio e la valutazione del rischio ecologico (Dagnino et al., 2007).

Infine lo studio effettuato per determinare la qualità del corpo idrico ricevente le acque della miniera dismessa di Gavorrano ha messo in luce il ruolo fondamentale delle indagini ecologiche per avere una stima diretta delle alterazioni a livello della struttura e funzioni di una comunità che possono comportare un declino della biodiversità di un ecosistema. L'approccio Triad che prevede l'integrazione in un unico indice (EnvRI) dei dati chimici, ecotossicologici ed ecologici mediante l'utilizzo del Sistema Esperto di Supporto alle Decisioni (EDSS), si è confermato essere il più adatto per determinare il rischio ecologico di un corpo idrico lotico (Dagnino, 2013). Applicando EDSS è possibile gestire una batteria di dati molto eterogenea da cui sono calcolati diversi indici numerici. Tali indici sono facilmente interpretabili e possono quindi aiutare nel decidere le azioni da attuare per una corretta gestione ambientale; in particolare EnvRI può servire per identificare i siti dove sono necessari o consigliati interventi di bonifica a causa di una effettiva diminuzione della biodiversità (Dagnino et al., 2008; 2013).

# ***Bibliografia***

Adams S., Green P., Claxton R., Simcox S., Williams M.V., Walsh K., Leeuwenburgh C., 2001. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front. Biosci.*; 6:17-24.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2002. DDT, DDE and DDD. Public Health Service, U.S.Department of Health and Human Services ([www.atsdr.cdc.gov](http://www.atsdr.cdc.gov)).

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2003. Public Health Service, U.S.Department of Health and Human Services ([www.atsdr.cdc.gov](http://www.atsdr.cdc.gov)).

Ali M.B., Vajpayee P., Tripathi R.D., Rai U.N., Kumar A., Singh N., Behl H.M., Singh S.P., 2000. Mercury bioaccumulation induces oxidative stress and toxicity to submerged macrophyte *Potamogeton crispus L.* *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*; 65:573-582.

Allan J.D., 1995. *Stream Ecology*, Chapman e Hall, London.

Allemand D., Walter P., Delmas P., Renzis G.D., 1989. Alteration of calcium transport as a mechanism of cell injury induced by mercuric chloride in sea-urchine eggs. *Marine Env. Res.*; 28:227-230.

Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.*; 76: 160–202.

Andral B., Stanisiere J. Y., Sauzade D., Damier E., Thebault H., Galgani F., Boissery P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Poll. Bull.*; 49: 704–712.

APAT, 2002. Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati. Utilizzo di indicatori ecotossicologici e biologici. RTI CTN\_SSC 2/2002.

APAT - I.R.S.A. Istituto di Ricerca sulle Acque, 2003. Metodi analitici per le acque. Volume Terzo. Manuali e linee guida. APAT, N. 29.

APAT, 2006. Manuale per le indagini ambientali nei siti contaminati.

Apostoli P., Catalani S., 2011. Metal ions affecting reproduction and development. *Metal Ions Life Sci.*; 8:263-303.

Arbuckle K. E., Downing J. A., 2002. Freshwater mussel abundance and species richness: GIS relationships with watershed land use and geology. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*; 59: 310–316.

Axenfeld F., Münch J., Pacyna J., 1991. Europäische Test-Emissionsdatenbasis für Quecksilberverbindungen für Modellrechnungen Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz and Reaktorsicherheit, Forschungsvorhaben Umweltbundesamt, Berlin.

Bakir F., Damluji S.F., Amin-Zaki L., Murtadha M., Khalidi A., Al-Rawi N.Y., Tikriti S., Dhahir H. I., Clarkson T. W., Smith J. C., Doherty R.A., 1973. Methylmercury Poisoning in Iraq. *Science*; 181:230-241

Barth C., Le P., Fisher P.R., 2007. Mitochondrial Biology and Disease in *Dictyostelium* *Int. Rev. Cytol.*; 263: 207-252

Bauer G., Hochwald S., Silkenat W., 1991. Spatial distribution of freshwater mussels: the role of host fish and metabolic rate. *Freshwater Biol.*; 26: 377-386.

Benvenuti M., Mascaro I., Corsini F., Lattanzi P., Parrini P., Tanelli G. 1997. Mine waste dumps and heavy metal pollution in abandoned mining district of Boccheggiano (Southern Tuscany, Italy). *Environ Geol.*; 30:238-243.

Benvenuti M., Mascaro I., Corsini F., Catigliola P., Parrini P., Lattanzi P., Tanelli G. 1999a. Environmental problems related to sulfide mining in Tuscany. *Chronique Recherche Miniere*; 534:29-45.



- Bernhoft R.A., 2011. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. J. Environ. Public Health; 10 p.
- Binelli A., Provini A., 2003. DDT is still a problem in developed countries: the heavy pollution of Lake Maggiore. Chemosphere; 52 :717–723.
- Binelli A., Bacchetta R., Mantecca P., Ricciardi F., Provini A., Vailati G., 2004. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. Aquat. Toxicol.; 69:175-188
- Binelli A., Riva C., Provini A., 2007. Biomarkers in zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy). Biomarkers; 12:349-368.
- Birnbaum L.S., Fenton S. E., 2003. Cancer and Developmental Exposure to Endocrine Disruptors. Environ. Health Perspect.; 111:389-394.
- Bo T., Fenoglio S., Malacarne G., Pessino M., Sgariboldi F., 2007a. Effect of clogging on stream macroinvertebrates: an experimental approach. Limnol.; 37: 186-192.
- Boatti L., Robotti E., Marengo E., Viarengo A., Marsano F., 2012. Effects of nickel, chlorpyrifos and their mixture on the *Dictyostelium discoideum* proteome. Int. J. Mol. Sci.; 13:15679-15705
- Bocchetti R., Regoli F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. Chemosphere; 65: 913-921.
- Bocquene G., Chantreau S., Cl rendeau C., Beausir E., Me nard D., Raffin B., Minier C., Burgeot T., Leszkowicz A. P., Narbonne J. F., 2004. Biological effects of the ‘‘Erika’’ oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). Aquatic Living Resources; 17: 309-316.
- Boening D. W., 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. Environ. Monit. Assess.; 55:459-470

- Boening D. W., 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*; 40:1335-1351.
- Bolognesi C., Buschini A., Branchi E., Carboni P., Furlini M., Martino A., Monteverde M., Poli P., Rossi C., 2004. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci. Total Environ.*; 333:127-136.
- Brown E.M., Burmeister E.F., Everett G.D., Blair A., 1993. Pesticide exposure and multiple myeloma in Iowa men. *Cancer Causes Control*; 4:153-156
- Burlando B., Magnelli V., Panfoli I., Berti E., Viarengo A., 2003a. Ligand-independent tyrosine kinase signalling in RTH 149 trout hepatoma cells: comparison among heavy metals and pro-oxidants. *Cell. Physiol. Biochem.* 13:147-154.
- Bussolaro D., Filipak Neto F., Ribeiro C. A., 2010. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. *Toxicol. In Vitro*; 24:1491-1497.
- Butler G.C., 1978. *Principle of Ecotoxicology*. Ed. John Wiley and Sons Ltd.
- Cairns J. Jr., 1990. The genesis of biomonitoring in aquatic ecosystems. *The environmental professional*; 12: 169-176.
- Carlile M.J., Watkinson S.C., 1996. *The fungi*. Academic-press Limited. San Diego. 482 p.
- Cavalier-Smith T., Chao E.E.Y., Oates B., 2004. Molecular phylogeny of Amoebozoa and the evolutionary significance of the unikont Phalansterium. *Eur. J. Protistol.*; 40:21-48.
- Cebulska-Wasilewska A., Panek, Z. Żabiński A., Moszczyński P., Au W.W., 2005. Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair *Mutat. Res.*; 586: 102-114
- Chapman P.M., 1990. The sediment quality Triad approach to determining pollution-induced degradation. *Sci Total Environ*; 97-98:815-825.

- Chapman P.M., Anderson J., 2005. A Decision-Making Framework for Sediment Contamination. *Integr. Environ. Assess. Manag.*; 1:163-173.
- Cho U-H., Park J-O., 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Sci.*; 156:1-9.
- Chubb J.R., Insall R.H., 2001. *Dictyostelium*: an ideal organism for genetic dissection of Ras signalling networks. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)*; 1525: 262-271.
- Cipriani C., Tanelli G., 1983. Risorse minerarie ed industria estrattiva in Toscana. Notizie storiche ed economiche. *Atti Mem. Acc. Tosc. Sci. Lett. La Colombaria*; 47:241-283.
- Clarkson T.W., Magos L., Cox C., Greenwood M.R., Amin-Zaki L., Majeed M.A., Al-Damluji S.F., 1981. Tests of efficacy of antidotes for removal of methylmercury in human poisoning during the Iraq outbreak. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218:74-83
- Clarkson T.W., 2002 The three modern faces of mercury. *Environ. Health Perspect.* 110 (Suppl. 1); 11:23
- Cocco P., Blair A., Congia P., Saba G., Ecça A.R., Palmas C., 1997. Long term health effects of the occupational exposure to DDT. *Ann. NY Acad. Sci.*; 837:246-256.
- Cocco P., Kazerouni N., Zahm S.H., 2000. Cancer mortality and environmental exposure to DDE in the United States. *Environ. Health Perspect.*; 108:1-4
- Coffinet S., Cossu-Leguille C., Bassères A., Gonnet J. F., Vasseur P., 2008. Response of the bivalve *Unio tumidus* and freshwater communities in artificial streams for hazard assessment of methyl methacrylate. *Environ. Toxicol. Chem.*; 27:1371-1382.
- Colborn T., vom Saal F.S., Soto A.M., 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environ. Health Perspect.*; 101:378-384

- Collins A.R., Duthie S. J., Dobson V. L., 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*; 14:1733-1735.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A., Vasseur P., 1997. Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid Peroxidation in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, as Biomarkers of Aquatic Contamination in Field Studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*; 38:122-131
- Cossu C., Doyotte A., Babut M., Exinger A., Vasseur P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Safety*; 45: 106–121.
- Cotham W.E. Jr., Bidleman T.F., 1991. Estimating the atmospheric deposition of organochlorine contaminants to the Arctic. *Chemosphere*; 22:165-188.
- Crumbling D.M., Lynch K., Howe R., Groenjes C., Shockley J., Keith L., Lesnik B., Van Ee J., McKenna J., 2001. Managing uncertainty in environmental decisions. *Environ. Sci. Technol.*; 35:404A-409A.
- Cuervo A.M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.*; 14:70-77.
- Dagnino A., Allen J.I., Moore M.N., Broeg K., Canesi L., Viarengo A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*; 12:155-172.
- Dagnino A., Sforzini S., Dondero F., Fenoglio S., Bona E., Jensen J., Viarengo A., 2008. A “Weight-of-Evidence” Approach for the Integration of Environmental “Triad” Data to Assess Ecological Risk and Biological Vulnerability. *Integr. Environ. Assess. Manag.*; 4:314-326.
- Dagnino A., Bo T., Copetta A., Fenoglio S., Oliveri C., Bencivenga M., Felli A., Viarengo A., 2013. Development and application of an innovative expert decision support system to manage sediments and to assess environmental risk in freshwater ecosystems. *Environ. Intern.*; 60:171-182

Dameron C.T., Harrison M.D., 1998. Mechanism for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*; 67(5):1091S-1097S.

de Solla S.R., Bishop C.A., Van der Kraak G., Brooks R.J., 1998. Impact of organochlorine contamination on level of sex hormones and external morphology of common snapping turtles (*Chelidra serpentina*) in Ontario, Canada. *Environ. Health Perspect.*; 106:253–260

Depledge M.H., Amaral-Mendes J.J., Daniel B., Halbrook R.S., Kloepper-Sams P., Moore M.N., Peakall D.P., 1993. The conceptual basis of the biomarker approach, in: D.G. Peakall, L.R. Shugart (Eds.), *Biomarkers-Research and Application in the Assessment of Environmental Health*, Springer, Berlin, pp. 15–29.

Di Pietro A., Visalli G., La Maestra S., Micale R., Baluce B., Matarese G. et al., 2008. Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. *Mutat. Res.*; 650:115-122.

Dinamarca M.L., Ramirez A., Del Villar E., Capdevtla J., 1974. DDT-dehydrochlorinase. III. Enzymic oxidation of glutathione. *Int. J. Biochem.*; 5:1-9.

Dini F., 1981. Relationship between breeding systems and resistance to mercury in *Euplotes crassus* (Ciliophora, Hypotrichida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*; 4:195-202.

Donald D. L., 1997. *C. elegans* II. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Dondero F., Jonsson H., Rebelo M., Pesce G., Berti E., Pons G., Viarengo A., 2006. Cellular responses to environmental contaminants in amoebic cells of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Comp. Bioch. Phys. C.*; 143:150-157.

Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.C., Babut M., Vasseur P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.*; 39:93-110

Duhon D., Cardelli J., 2002. The regulation of phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J. Muscle Res. Cell Motil.*; 23:803-808.

Dušinská M., Collins A., 1996. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Altern. Lab. Anim.*; 24:405-411.

Emmons S.W., Klass M.R., Hirsch D., 1979. Analysis of the constancy of DNA sequences during development and evolution of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 76:1333–1337.

Ercal N., Gurer-Orhan H.; Aykin-Burns N., 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal-induced Oxidative Damage. *Curr. Top. Med. Chem.*; 1:529-539.

Erdelmeier I., Gérard-Monnier D., Yadan J.-C, Chaudière J., 1998. Reactions of N-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Mechanistic Aspects of the Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.*; 11:1184-1194.

Esterbauer H., 1985. Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: Pli, G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U., Slater, T.F. (Eds.), *Free Radicals in Liver Injury*. IRL Press, Oxford, pp. 29–47.

Fenech M., The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.*; 455:81–95.

Fenoglio S., Agosta P., Bo T., Cucco M., 2002. Field experiments on colonization and movements of stream invertebrates in an Apennine river (Visone, NW Italy). *Hydrobiol.*; 474: 125-30.

Fenoglio S., Bo T., Agosta P., Malacarne G., 2005. Temporal and spatial patterns of coarse particulate organic matter and macroinvertebrate distribution in a low-order Apennine stream. *J. Freshwater Ecol.*; 20: 539-547.

- Firtel R.A., 1996. Interacting signaling pathways controlling multicellular development in *Dictyostelium*. *Curr. Opin. Genet. Dev.*; 6:545–554
- Fisher P.R., Noegel A.A., Fechheimer M., Rivero F., Prassler J., Gerisch G., 1997. Photosensory and thermosensory responses in *Dictyostelium* slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Curr. Biol.*, 7:889–892
- Fischer P.R., 2001. Genetic analysis of phototaxis in *Dictyostelium*. *Comprehensive Series in Photosciences*, 1: 519–559
- Frizek J.P., Garabrant D.H., Harlow S.D., Severson R.K., Gillespie B.W., Schenk M., Schottenfeld D., 1997. A case-control study of self reported exposures to pesticides and pancreas cancer in south-eastern Michigan. *Int. J. Cancer*; 72:62-67.
- Fukino H., Hirai M., Hsueh Y.M., Moriyasu S., Yamani Y., 1984. Effect of zinc pretreatment on mercury chloride-induced lipid peroxidation in rat kidney. *Tox. Appl. Pharmacol.*; 73:395-401
- Gaglione P., Ravera O., 1964. Manganese-54 concentration in fall-out, water and *Unio* mussels of Lake Maggiore 1960. *Nature*; 204:1215-1217.
- Gajski G., Gerić M., Ravlić S., Capuder Ž., Garaj-Vrhovac V., 2012. Presence of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in Croatia and evaluation of its genotoxicity. *Insecticides-Pest Engineering*; Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN: 978-953-307-895-3, InTech., 117-151.
- Galloway T.S., Millward N., Browne M.A., Depledge M.H., 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusk *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarker. *Aquat. Toxicol.*; 61:169-180.
- Garabrant D.H., Held J., Langholz B., Peters J.M., Mack T.M., 1992. DDT and related compounds and risk of pancreatic cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*; 84:764-771.

- Garzonio C.A., Affuso A.M.G., 2004. Hydrogeological problems for the rehabilitation and re-utilisation of the water resources of the mining area of Gavorrano (Italy). *Environ. Geol.*; 46:286-294.
- Gayatri R., Chatterjee S., 1994. Growth and development of cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* treated with DDT. *Environ. Pollut.*; 86:135-140.
- George R.P., Hohl H.R., Raper K.B., 1972. Ultrastructural Development of Stalk-producing Cells in *Dictyostelium discoideum*, a Cellular Slime Mould. *Microbiology*; 70:477-489.
- George S.G., Viarengo A., 1985. A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussel. *Mar. Pollut. Physiol.: Recent Advances*; 125–143.
- Gérard-Monnier D., Erdelmeier I., Régnard K., Moze-Henry N., Yadan J.-C., Chaudière J., 1998. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.*; 11:1176–1183.
- Ghetti P.F., 1997. Manuale di applicazione Indice Biotico Esteso (I.B.E.). Provincia Autonoma di Trento, Trento.
- Gilbert S.F., 2003. *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Gomer R., Brazill D., 2003. The versatile *Dictyostelium discoideum*. Meeting report: International *Dictyostelium* Conference 2002. *Protist*; 154:5-10.
- Gomiero A., Sforzini S., Dagnino A., Nasci C., Viarengo A., 2012. The use of multiple endpoints to assess cellular responses to environmental contaminants in the interstitial marine ciliate *Euplotes crassus*. *Aquat. Toxicol.*; 114-115:206-216.
- Gray N.F., Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem. *Environ. Geol.*; 30:62-71



- Guidi P., Frenzilli G., Benedetti M., Bernardeschi M., Falleni A., Fattorini D., Regoli F., Scarcelli V., Nigro M., 2010. Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquat. Toxicol.*; 100:75-83.
- Guzzella L., Mingazzini M., 1994. Biological assaying of organic compounds in surface waters. *Water Sci. Techn.*; 30:113-124.
- Haeghele S., Kohler R., Merkert H. et al., 2000. *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol* 2:165-171.
- Halldin K., Axelsson J., Brunström B., 2005. Effects of endocrine modulators on sexual differentiation and reproductive function in male Japanese quail. *Brain Res. Bull.*; 65:211-218.
- Halliwell B., 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.*; 401:1-11.
- Hastings J. W., Gibson Q.H., 1963. Mononucleotide Oxidation of Reduced Flavin Intermediates in the Bioluminescent. *J. Biol. Chem.*; 238:2537-2554.
- Heddle J.A., 1973. A rapid in vivo test for chromosome damage, *Mutat. Res.*; 18:187-192.
- Huang Y.L., Cheng S.L., Lin T.H., 1996. Lipid peroxidation in rats administrated with mercury chloride. *Biol. Trace Elem. Res.*; 52:193-206.
- IRSA-CNR, ISSN:0392-1425, 1996. Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti. *Notiziario dei metodi analitici*.
- ISO 6341:1996. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. ISO, Geneva, Switzerland.

ISO 11348-1:1998. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent bacteria test) – Part 1: Method using freshly prepared bacteria. ISO, Geneva, Switzerland.

ISO 11348-3:1998. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria. ISO, Geneva, Switzerland.

ISO 8692:2004. Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO, Geneva, Switzerland.

Jensen J, Mesman M., 2006. Ecological risk assessment of contaminated land. Decision support for site specific investigations. 136 p.

Jermyn K. A., Duffy K. T. I., Williams J.G., 1989. A new anatomy of the prestalk zone in *Dictyostelium*. *Nature*; 340:144-146.

Jermyn K.A., Williams J.G., 1991. An analysis of culmination in *Dictyostelium* using prestalk and stalk-specific cell autonomous markers. *Development*; 111:779-787

Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., Sumpter J.P., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*; 103:582-587.

Kabata A., Pendias H., 1992. Trace elements in soils and plants. 2nd edition. CRC press, Florida.

Keith E.H., 1997. Environmental Endocrine Disruptors. New York: John Wiley & Sons.

Keice W.R., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E. , Kemppainen J.A., Wilson E.M., 1995. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*; 375:581-585

Klaassen C.D., Amdur M.O., Doull J., 1986. Toxicology (III ed), The Basic Science of Poisons, Macmillan, New York, NY.

Klobučar G., Štambuk A., Hylland K., Pavlica M., 2008. Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir Bays, Croatia. Sci. Total Environ.; 405:330-337.

Köhler A., 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution. Comp. Biochem. Physiol. C; 100:123-127.

Köhler A., Wahl E., Söffker K., 2002. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.)). Environ. Toxicol. Chem.; 21:2434-2444

Labieniec M., Gabryelak T., 2007. Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or Cu<sup>2+</sup> ions. Toxicol. In Vitro; 21:146-156.

Lal R., Saxena D. M., 1979. Effect of DDT on growth of *Tetrahymena pyriformis*. Arch. Protistenk.; 122:382-386.

Lee C.H., Lin R.H., Liu S.H., Lin-Shiau S.Y., 1997. Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human lymphocytes as compared with other mercury compounds Mutat. Res.; 392: 269-276

Lehtonen K. K., Schiedek D., Köhler A., Lang T., Vuorinen P. J., Förlin L., Baršienė J., Pempkowiak J., Gercken J., 2006. The BEEP project in the Baltic Sea: overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. Marine Poll. Bull.; 53:523-537

Lemiere S., Cossu-Leguille C., Charissou A.M., Vasseur P., 2005. DNA damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Biomarkers; 10:41-57.

- Lennox E.S., 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*; 1:190-206.
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*; 233:346-357.
- Longnecker M.P., Rogan W.J., Lucier G., 1997. The human health effect of DDT (dichlorodiphenylethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annu. Rev. Public. Health.*; 18:211-244.
- Loomis W.F., 1998. Role of PKA in the Timing of Developmental Events in *Dictyostelium* Cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 62:684-694
- Low W.Y., Fei, S.C., Ng H.L., Gorman M.A., Morton C.J., Pyke J., McConville M.J., Bieri M., Mok Y.F., Robin C., Gooley P.R., Parker M.W., Batterham P., 2010. Recognition and detoxification of the insecticide DDT by *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase D1. *J. Mol. Biol.*; 399:358-366.
- Lowe D.M., Pipe R.K., 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.*; 30:357-365.
- Lowe D.M., Fossato V.U., Depledge M.H., 1995. Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *M. galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol. Pr. Ser.*; 129:189-196.
- Lund B.O., Miler D.M., Woods J.S., 1993. Studies on Hg(II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*; 45:2017-2024.
- Lundholm C.E., 1997. DDE-induced eggshell thinning in birds: Effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*; 118:113-128.

- Luria S.E., Adams J.N., Ting R.C., 1960. Transduction of lactose-utilizing ability among strain of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology*; 12:348-390.
- Luria S.E., Burrous J.W., 1955. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.*; 74:461-476.
- Lushchak V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.*, 101:13-30.
- MacDonald D.D., Ingersoll C.G., Berger T.A., 2000. Development and Evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; 39:20-31
- Maniak M., 2002. Conserved features of endocytosis in *Dictyostelium*. *Int. Rev. Cytol.*, 221: 257-287
- Marchi B., Burlando B., Moore M.N., Viarengo A., 2004. Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on [Ca<sup>2+</sup>] dependent phospholipase A2 activation. *Aquat. Toxicol.*; 66:197-204.
- Marigómez I., Izagirre U., Lekube X., 2005. Lysosomal enlargement in digestive cells of mussels exposed to cadmium, benzo[a]pyrene and their combination. *Comp. Biochem. Physiol. C*; 141:188-193.
- Marin T., 1976. Regulation of development in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*; 48:110-117.
- Marsano F., Boatti L., Ranzato E., Cavaletto M., Magnelli V., Dondero F., Viarengo A., 2010. Effects of mercury on *Dictyostelium discoideum*: proteomics reveals the molecular mechanism of physiological adaptation and toxicity. *J. Proteome Res.*; 9:2839-2854.
- Maxfield F.R., Tabas I., 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*; 438:36-45.

- McNulty T.J., Taylor C.W., 1999. Extracellular heavy-metal ions stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in hepatocytes. *Biochem. J.*; 339:555-561.
- Merritt R.W., Cummins K.W., 1996. An introduction to the aquatic insects of North America. 3<sup>o</sup> Edition, Kendall Hunt, Dubuque, IO, 862 pp.
- Moore M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell and Tissue Res.*; 175:279-287.
- Moore M.N., 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.*; 16:134-139.
- Moore M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*; 46:81-89.
- Moore M.N., 2002. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.*; 59:1-15.
- Moore M.N., Clarke K.R., 1982. Use of microstereology and quantitative cytochemistry to determine the effects of crude oil-derived aromatic hydrocarbons on lysosomal structure and function in a marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. *Histochem. J.*; 713-718.
- Moore M.N., Viarengo A., 1987. Lysosomal membrane fragility and catabolism of a direct relationship. *Experientia*; 43:320-323.
- Moore M.N., Allen J.I., 2002. A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.*; 54:579-584.
- Moore M.N., Depledge M.H., Readman J.W., Leonard D.R.P., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*; 552:247-268.

Moore M.N., Viarengo A., Donkin P., Hawkins A.J., 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat Toxicol*; 84:80-91.

Moore M.N., Köhler A., Lowe D., Viarengo A., 2008. Lysosomes and autophagy in aquatic animals. In: Klionsky, D.J. (Ed.), *Methods in Enzymology, Part A. Autophagy in Lower eucaryotes and Non-mammalian Systems*, vol. 451. Elsevier Inc. Academic Press, Burlington, pp. 581–620.

Moore M.N., Viarengo A., Somerfield P.J., Sforzini S., 2012. Linking lysosomal biomarkers and ecotoxicological effects at higher biological levels. *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects a cura di Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., Rainbow P.S.*; 107-123.

National Oceanic and Atmospheric Administration's Ocean Service, 2005. *Mercury in Aquatic Habitats*.

National Research Council, 2000. *Toxicological effects of methylmercury*. National Academy Press, Washington, DC.

Neto F. F., Zanata S.M., Silva de Assis H.C., Nakao L.S., Randi M.A.F., Oliveira Ribeiro C.A., Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. *Toxicol. in Vitro*; 22: 1705-1713.

Nilsson J.R., 1979. Phagotrophy in *Tetrahymena*. In: Levandowsky, M., Hutner, S.H. (Eds.), *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, vol. 2, 2nd edition. Academic Press, New York, pp. 339–379.

Nilsson J.R., 1981. Effect of copper on phagocytosis in *Tetrahymena*. *Protoplasma*; 109:359–370.

Noegel A.A., Schleicher M., 2000. The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J. Cell Sci.*; 113:759-766.

OECD, 202:1984. *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test (Updated Guifrlinr, adepte 13th April 2004). OECD, Paris, France.

OECD, 201:2002. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Draft Revised Guideline, July 2002). OECD, Paris, France.

OECD, 2006. Guideline for testing of chemicals. Sediment-water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.

Östling O., Johanson K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 123:291-298.

Pagnanelli F., Moscardini E., Giuliano V., Toro L., 2004. Sequential extraction of heavy metals in river sediments of an abandoned pyrite mining area: pollution detection and affinity series. *Environ. Poll.*, 132:189-201.

Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C., 2005. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Mar. Poll. Bull.*; 50:1548-1557

Parent C.A., 2004. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*. *Curr. Opin. Cell Biol.*; 16: 4-13

Patterson D.J., Sogin M.L., 1992. Eukaryotes origins and protistan diversity. Pp. 13-46. In: *The origin and evolution of prokaryotic and eukaryotic cells*. Eds H. Hartman, K. Matsuno World Scientific Singapore.

Pavlica M., Klobučar G., Mojaš N., Erben R., Papeš D., 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res.*; 490: 209-214.

Peakall D.B., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicol.*; 3:157-160.



Pearse A.G.E., 1972, third ed. Histochemistry Theoretical and Applied, vol. 2. Churchill Livingstone, Edinburgh and London. 1518 pp.

Persoone G., Uyttersprot G., 1975. The influence of inorganic and organic pollutants on the rate of reproduction of a marine hypotrichous ciliate: *Euplotes vannus* Muller. Rev. Intern. Océanogr. Méd.; 37-38:125-151.

Petushok N., Gabryelak T., Pałecz D., Zavodnik L., Szollosi Varga I., Deér K.A., 2002. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments. Aquat. Toxicol.; 61:65-72.

Pipe R.K., 1993. The generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev. Comp. Immunol.; 16:111-122.

Podreka S., Georges A., Maher B., Limpus C.J., 1998. The environmental contaminant DDE fails to influence the outcome of sexual differentiation in the marine turtle *Chelonia mydas*. Environ. Health Perspect.; 106:185-188

Poot M., Teubert H., Rabinovitch P.S., Kavanagh T. J., 1995. De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. J. Cell. Physiol.; 163:555-60.

Ramamoorthy K., Wang F., Clien I.C., Safe S., Norris J.D., McDonnell D.P., Gaido K.W., Bocchinfuso W.P., Korach K.S., 1996. Potency of combined estrogenic pesticides [Letter]. Science; 275:405-406.

Rana S.V.S., Singh R., Verma S., 1995. Mercury-induced lipid peroxidation in the liver, kidney, brain and gills of a fresh water fish, *Channa punctatus*. Japan J. Ichthyol, 42:255-259

Rao M.V., Chinoy N.J., Suthar M.B., Rajvanshi M.I., 2001. Role of ascorbic acid on mercuric chloride-induced genotoxicity in human blood cultures. Toxicol. In Vitro; 15:649-654

- Raper K.B., 1984. *The Dictyostelids*. Princeton University Press. Princeton N. J.
- Ravera O., 2001. Monitoring of the aquatic environment by species accumulators of pollutants: a review, in: Ravera, O.(eds), Scientific and legal aspects of biological monitoring in freshwater. *Journal of Limnology*; 60: 63–72.
- Riccardi N., Ravera O., 1989. Unionidae (molluscs, lamellibranchiata) used as an environmental indicator of radioactive contamination from the Chernobyl accident. *Environ. Technol. Lett.*; 10:347-353.
- Rickwood C.J., Galloway T.S., 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect a study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquat. Toxicol.*; 67:45-56.
- Ringwood A.H., Hoguet J., Keppler C.J., 2002. Seasonal variation in lysosomal destabilization in oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Environ. Res.*; 54: 793-797
- Ritter L., Solomon K.R.R, Forget J., 1995. Persistent Organic Pollutants. An assessment report on: DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Chordane, Heptachlor, Hexachlorobenzene, Mirex, Toxaphene, Polychlorinated Biphenyls, Dioxins and Furans. IPCS/IOMC.
- Rocher B., Le Goff J., Peluhet L., Briand M., Manduzio H., Gallois J., 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquat Toxicol*; 79:65-77.
- Rodriguez-Fuentes G., Gold-Bouchot G., 2004. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mar. Environ. Res.*; 58:505-509.
- Roméo M., Hoarau P., Garello G., Gnassia-Barelli M., Girard J. P., 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Envir. Poll.*; 122: 369-378.

Sabatini S.E., Juárez Á.B., Eppis M.R., Bianchi L., Luquet C.M., Ríos de Molina M.C., 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Safety*; 72:1200-1206

Sanchez-Hernandez J.C., Moreno-Sanchez B., 2002. Lizard cholinesterases as biomarkers of pesticide exposure: enzymological characterization. *Environ. Toxicol. Chem.*; 21:2319-2325.

Schnelldorfer T.M.S., Gansauge S. Ph.D., Gansauge F.M.D., Schlosser S. Ph.D., Beger H. G.M.D., Nussler A.K. Ph.D., 2000. Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer*; 89:1440-1447.

Schurz F., Sabater-Vilar M., Fink-Gremmels J., 2000. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. *Mutagenesis*, 15:525-530.

Schwalb M., Roth R., 1970. Axenic growth and development of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.*; 60:283-286.

[SETAC] Society of Environmental toxicology and chemistry. 1997. Technical issue paper: Ecological risk assessment. Pensacola (FL): SETAC. 4 p.

Sforzini S., Dagnino A., Torrielli S., Dondero F., Fenoglio S., Negri A., Boatti L., Viarengo A., 2008. Use of highly sensitive sublethal stress responses in the social amoeba *Dictyostelium discoideum* for an assessment of freshwater quality. *Sc. Tot. Envir.*; 395:101-108.

Shi Y., Lu Y., Meng F., Guo F., Zheng X., 2013. Occurrence of organic chlorinated pesticides and their ecological effects on soil protozoa in the agricultural soils of North Western Beijing, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*; 92:123-128.

Siegel FR., 2002. Environmental geochemistry of potentially toxic metals. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 223 p.

Singer P.C., Strumm W., 1970. Acidic mine drainage: the rate-determining step. *Science* (New York); 167 :1121–3

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*; 175:184-191.

Skerfving S. B., Copplestone J. F., 1976. Poisoning caused by the consumption of organomercury-dressed seed in Iraq. *Bull World Health Organ.*; 54(1):101–112.

Solomon J.M., Isberg R.R., 2000. Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*: a novel system for genetic analysis of host–pathogen interactions. *Trends in Microbiol.*; 8:478–480

Spezzano P., 2004. Inquinanti organici persistenti. ENEA, UTS Protezione e Sviluppo dell' Ambiente e del Territorio, *Tecnologie Ambientali*; 30-48.

Spurgeon D.J., Hopkin S.P., Jones D.T., 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystem. *Environ. Pollut.*; 84:123-130.

Štambuk A., Pavlica M., Malović L., Klobučar G., 2008. Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. *Environ. Molecular Mutagenesis* 49: 217-225.

Štambuk A., Pavlica M., Vignjević G. , Bolarić B., Klobučar G., 2009. Assessment of genotoxicity in polluted freshwaters using caged painter's mussel, *Unio pictorum*. *Ecotoxicol.*; 18:430-439.

Stohs S.J., Bagchi D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*; 18:321-336.

- Stohs J.S., Bagchi D., Hassoun E., Bagchi M., 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Oncol.*; 19:201-213.
- Stoiber T., Bonacker D., Böhm K.J., Bolt H.M, Thier R., Degen G. et al., 2004. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury (II). *Mutat. Res.*; 563: 97-106.
- Sturm A., da Silva de Assis H.C., Hansen P.D., 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar. Environ. Res.*; 47:389-398.
- Swan P., Garrod D. R., Morris D., 1977. An inhibitor of cell cohesion from axenically grown cells of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Sci.*; 28:107-116.
- Terman A., Brunk U.T., 2004. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*; 36:1400-1404.
- The *C.elegans* Sequencing Consortium, 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*; 282:2012-2018.
- Tomatis L., Turusov V., Charles R.T., Boiocchi M., Gati E., 1974. Liver tumours in CF-1 mice exposed for limited periods to technical DDT. *Z Krebsforsch*; 82:25-35
- Tomatis L., Turusov V., 1975. Studies on the carcinogenicity of DDT. *Gann. Monogr.* 17:219-241.
- Turci R., Businaro J., Minoia C., Sturchio E., Ficociello B., Signorini S., Colosio C., Imbriani M., 2010. Interferenti endocrini. Schede monografiche. DDT, DDE e DDD. *G. Ital. Med. Lav. Erg.*; 32: 93-144.
- Turusov V.S., Day N.E., Tomatis L., Gati E., Charles R.T., 1973. Tumors in CF-1 mice exposed for six consecutive generations to DDT. *J. Natl. Cancer Inst.*; 51:983-997
- Turusov V., Rakitsky V., Tomatis L., 2002. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks. *Environ. Health Perspect.*; 110:125-128.

UNECE 1998. Protocol to the 1979 Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution on Persistent Organic Pollutants. ECE/EB.AIR/60, United Nations Economic and Social Council, Economic Commission for Europe.

UNI EN ISO 692:2005. Prova di inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari.

UNICHIM M.U. 1651:2003 - Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in *Cucumis sativus L.* (Cetriolo), *Lepidium savitum L.* (Crescione), *Sorghum saccharatum Moench* (Sorgo) (Saggio di tossicità cronica breve).

Ura K., Kai T., Sakata S., Iguchi T., Arizono K., 2002. Aquatic acute toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Health Sci.*; 48:583-586.

USEPA OPPTS 850.5400:1996. Algal toxicity, Tiers I and II. US EPA, United States of America.

Veltman D.M., Keizer-Gunnik I., Van Haastert P. J.M., 2008. Four key signaling pathways mediating chemotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.*; 180:747-753

Verboost P.M., Flik G., Pang P.K., Lock R.A., Wendelaar Bonga S.E., 1989. Cadmium inhibition of the erythrocyte  $Ca^{2+}$  pump. A molecular interpretation. *J. Biol. Chem.*; 264:5613-5615

Viarengo A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci. Review*; 1:295-317.

Viarengo A., 1994. Heavy metal cytotoxicity in marine organisms. Effects of  $Ca^{2+}$  homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol.*; 20:85-110

Viarengo A., Nott J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.*; 104:355-372.

Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M.N., Orunesu M., 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam. *Comp. Biochem. Physiol. C*; 97: 37-42

Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Livingstone D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C*; 100:187-190.

Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R., 1997a. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.*; 44:69-84.

Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M., Marchi B., Ponzano E., Blasco J., 1999a. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Am. J. Physiol.*; 277:R1612–R1619.

Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Panfoli I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.*, 46:407-417.

Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C*; 146:281-300.

Wang Y., Qiu L., Ranson H., Lumjuan N., Hemingway J., Setzer W. N., Meehan E. J., Chen L., 2008. Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxifying activity. *J. Struct. Biol.*; 164:228-235.

Watts D.J., Ashworth J.M., 1970. Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.*; 119:71-174.

WHO, International Program on Chemical Safety, 1991. Inorganic Mercury. *Environmental Health Criteria*; 118. World Health Organization, Geneva.

Willard S.S., Devreotes P.N., 2006. Signaling pathways mediating chemotaxis in the social amoeba, *Dictyostelium discoideum*. Eur. J. Cell Biol.; 85:897-904

Williams J.G., 2006. Transcriptional regulation of *Dictyostelium* pattern formation. EMBO reports; 7:694-698.

Woodiwiss F.S., 1964. The biological system of stream classification used by the Trent River Board". Chem Ind.; 14: 443-447.

Woodiwiss F.S., 1981. Biological monitoring of surface water, Quality Summery report. Commission of the European Communities: ENV / 787 /80.

Yee S., Choi B.H., 1996. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. Neurotoxicology; 17:17-26



# *Ringraziamenti*

Desidero ringraziare ed esprimere la mia riconoscenza nei confronti di tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi e mi hanno accompagnata nel mio percorso di studio.

Innanzitutto ringrazio sentitamente il mio Responsabile Scientifico, il Prof. Viarengo, per avermi seguita in questi tre anni di Dottorato di ricerca, ampliando le mie conoscenze accademiche e permettendomi di fare nuove interessanti esperienze formative.

Relativamente alla realizzazione della tesi, ringrazio il gruppo di lavoro della Prof.ssa Berta e del Dott. Fenoglio, nonché il Dott. Alessandro Dagnino per la collaborazione nello studio degli effetti delle acque di miniera. Alessandro in particolare mi ha aiutata molto per alcuni aspetti del lavoro mostrandosi sempre cordiale e disponibile, pertanto desidero ringraziarlo particolarmente. Ringrazio inoltre tutti coloro dell'Istituto ENI-Donegani di Novara che hanno partecipato attivamente ai progetti riguardanti la valutazione degli effetti dei contaminanti presenti nel Lago Maggiore.

Un grazie enorme va alle Dott.sse Laura Oliveri, Susanna Sforzini e Marta Boeri.

Ringrazio Laura perché mi ha seguita dall'inizio del mio Dottorato, mi ha insegnato con grande pazienza numerosi aspetti dell'attività di laboratorio ed ha saputo darmi preziosi consigli. Con lei ho trascorso ore piacevoli ed il suo carattere sempre allegro e la sua simpatia mi sono stati di grande aiuto.

Ringrazio Susanna perché è sempre stata disponibile ad aiutarmi ed a consigliarmi in caso di bisogno e il suo contributo è stato molto importante per la realizzazione degli studi presenti in questa tesi. Con lei e Marta ho condiviso esperienze, come il congresso a Palermo e a Glasgow, che sono dei bellissimi ricordi.

Ringrazio Marta perché oltre che una collega è un'amica e con lei ho condiviso questa esperienza, sia i momenti belli ma anche i momenti "no". Devo dire che il suo buonumore, la sua compagnia ed i suoi consigli sono stati fondamentali in questo percorso. Grazie "compagna d'avventura" per la pazienza e per aver sopportato le mie numerose "fisse". E prometto che mi ricorderò che "la vita è come una fotografia: viene meglio se sorridi!!".

Un grazie anche alla Dott.ssa Caterina Oliveri e al Dott. Alessio Gomiero che spesso mi hanno aiutata e capita.

Infine, ma non certo per ordine di importanza, ringrazio i miei genitori e mia sorella a cui devo molto perché mi hanno sempre spronata, supportata ma soprattutto sopportata, credendo nell'importanza di portare a termine il Dottorato nel migliore dei modi senza arrendersi alle prime difficoltà incontrate. Inoltre ringrazio di cuore il mio fidanzato Gabriele perché mi è stato vicino, ha rispettato le mie scelte anche se a volte non era d'accordo e ha avuto infinita pazienza, tollerando e cercando di capire i miei momenti difficili, che negli ultimi tempi sono stati numerosi. Grazie anche alla sua famiglia per il supporto che ha saputo darmi.

*Allegati*

## Articolo in preparazione

Sforzini S., **Governa D.**, Boeri M., Oliveri L., Congiu A., Oldani A., Vago F., Cucchetti D., Borrelli R., Cesti P., Viarengo A. New insight on the molecular effects of DDT and its metabolites on *Dictyostelium discoideum*: relevance for environmental risk assessment.

## Partecipazione a Congressi

Sforzini S., Boeri M., **Governa D.**, Oliveri L., Viarengo A. Alterazioni fisiologiche provocate dal Cr(VI) nel verme terrestre *Eisenia andrei*: dagli effetti a livello molecolare/cellulare alle risposte a livello di organismo. XXIII Congresso della Società Italiana di Ecologia (SIte), 16-18 settembre 2013, Ancona-*comunicazione orale*.

Sforzini S., **Governa D.**, Boeri M., Gomiero A., Oliveri L., Viarengo A. Uso di fitofarmaci nella coltura del riso: valutazione degli effetti biologici in differenti organismi modello. XXIII Congresso della Società Italiana di Ecologia (SIte), 16-18 settembre 2013, Ancona-*poster*.

Viarengo A., Boeri M., **Governa D.**, Olivieri S., Oldani A., Vago F., Borrelli R., Chiaberge S., Fiorani T., Cesti P., Zaninetta L., Sforzini S. Accumulation of chemicals in caged molluscs (*Unio pictorum*) and evaluation of their effects using a multilevel biomarkers approach. 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe), 12-16 maggio 2013, Glasgow- *poster*.

Boeri M., **Governa D.**, Olivieri S., Oldani A., Vago F., Borrelli R., Chiaberge S., Fiorani T., Cesti P., Zaninetta L., Viarengo A., Sforzini S. Biodisponibilità di inquinanti organici e inorganici nelle acque di un corpo idrico lenticò: utilizzo di *Unio pictorum* per la determinazione del bioaccumulo e dei conseguenti effetti biologici. XXII Congresso della Società Italiana di Ecologia (SIte), 10-13 settembre 2012, Alessandria-*poster*.

**Governa D.**, Boeri M., Congiu A., Oldani A., Vago F., Cucchetti D., Borrelli R., Cesti P., Viarengo A., Sforzini S. Use of *Dictyostelium discoideum* as model organism for the evaluation of biological effects due to DDT and mercury in field and laboratory studies. 28<sup>th</sup> Congress of European Society for Comparative Physiology and Biochemistry (ESCPB), 2-5 september 2012, Bilbao-*oral presentation*.

Oliveri L., **Governa, D.** , Congiu, A., Oldani, A., Vago, F., Franzosi, G., Borrelli, R., Cesti, P., Viarengo, A., and Sforzini, S. Importanza dell'approccio ecotossicologico per la valutazione degli effetti biologici indotti da contaminanti ambientali biodisponibili in matrici complesse. XXI Congresso della Società Italiana di Ecologia (SItE), 3-6 ottobre 2011, Palermo-*poster*.