

Capitolo 10

BIOMARKERS IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

10.1 Campionamento degli organismi e metodiche utilizzate

Il monitoraggio per il I anno di monitoraggio – fase di esercizio provvisorio ha previsto lo svolgimento di quattro campagne di campionamento eseguite nel 2011 (Settembre, Ottobre, Novembre e Dicembre), utilizzando un protocollo di trapianto di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) prelevati da una popolazione naturale (Cicero e Di Girolamo, 2001).

Gli organismi sono stati prelevati da un impianto di miticoltura di Portonovo (Ancona) e in parte immediatamente traslocati nella stessa area (TE041), utilizzata come sito di riferimento per valutare l'effetto della procedura di traslocazione. Entro le 24 h, gli organismi sono stati traslocati in due siti posti nell'area del Terminale denominate rispettivamente TE040T (a circa 500 m Sud-Est dal Terminale) e TE039A (presso l'impianto di miticoltura VISMA, già precedentemente utilizzato come sito di indagine durante le campagne di monitoraggio nelle fasi di bianco e cantiere).

La posizione delle stazioni con il dettaglio delle coordinate geografiche e la relativa cartina rappresentativa sono riportate rispettivamente in tabella e figura 10.1.1.

Tabella 10.1.1: Coordinate geografiche stazioni di campionamento di *Mytilus galloprovincialis*.

Posizione	Stazione	Latitudine Nord	Longitudine Est
Impianto miticoltura VISMA	TE039A	45°06'46,26"	12°27'19,74"
Circa 500m a Sud-Est dal terminale	TE040T	45°05'4,62"	12°35'36,36'
Controllo Portonovo	TE041M	43°34'27,00"	13°35'10,00"

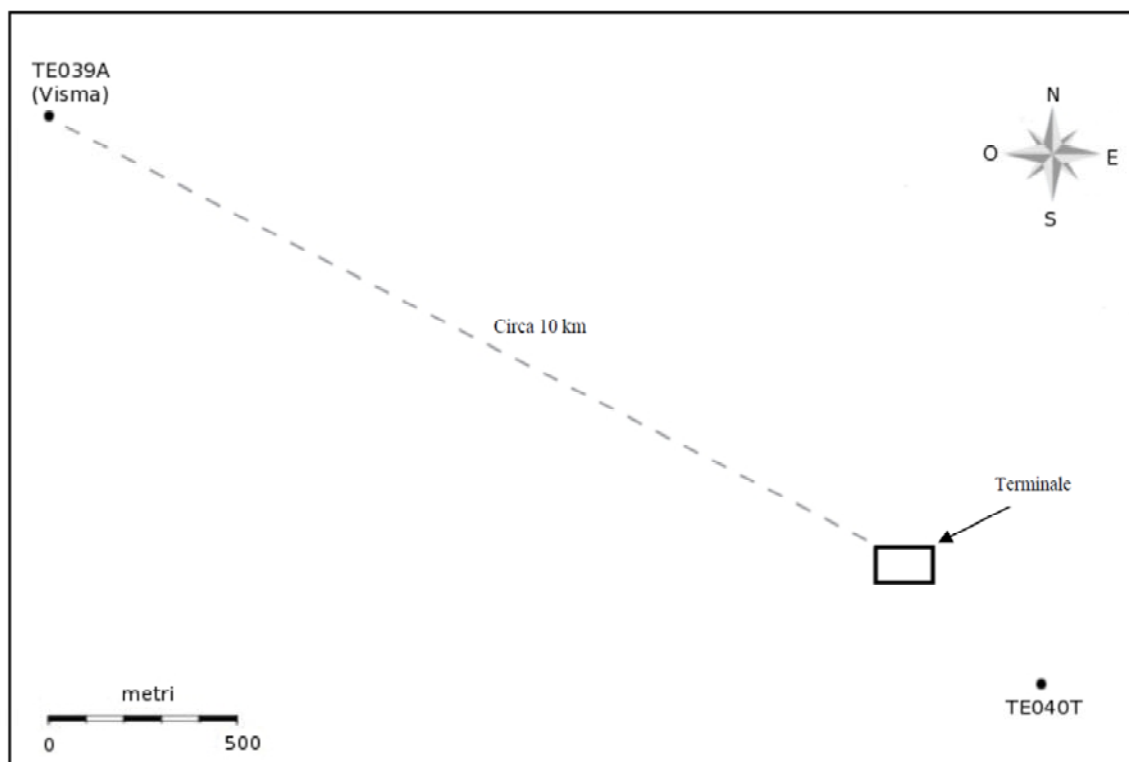


Figura 10.1.1: Mappa con le stazioni di biomonitoraggio con mitili (*Mytilus galloprovincialis*).

Dopo il prelievo, i mitili sono stati portati in laboratorio e mantenuti per 12 h in acquario a 18°C. Per ogni punto di campionamento, le ghiandole digestive di circa 50 organismi sono state dissezionate e suddivise in 10 pool, congelate in azoto liquido e mantenute a -80°C fino al momento delle analisi. Per la valutazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi, della stabilità lisosomiale e del danno genotossico, è stata prelevata un'aliquota di emolinfa dal muscolo adduttore di 10 organismi opportunamente processata come descritto in seguito per ogni punto di campionamento.

Per quantificare i livelli di **metallotioneine**, proteine citosoliche indotte da esposizione a metalli pesanti (Viarengo et al., 2007), i campioni di ghiandola digestiva dei mitili sono stati omogenati (1:3 p/v) in tampone Tris-HCl 20 mM pH 8.6 con saccarosio 0.5 M, leupeptina 0.006 mM, fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF) 0.5 mM, β-mercaptoetanolo 0.01%. Dopo centrifugazione a 30.000 xg per 45 minuti a 4°C, la purificazione delle metallotioneine è stata effettuata attraverso una serie di precipitazioni etanoliche. Il pellet ottenuto da questi procedimenti e contenente le metallotioneine, è stato asciugato sotto flusso d'azoto, risospeso nuovamente in una soluzione di NaCl 0.25 M e HCl 1 N,

contenente acido etilene diamino-tetracetico (EDTA) 4 mM per eliminare i cationi metallici legati alle metallotioneine. Alla soluzione così ottenuta è stato aggiunto tampone Na-fosfato 200 mM pH 8, NaCl 2 M e acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0.43 mM ed il campione ulteriormente centrifugato a 3.000 xg per 5 minuti a 4°C. La concentrazione delle metallotioneine è stata valutata in rapporto ai gruppi -SH determinati spettrofotometricamente a $\lambda = 412$ nm mediante reazione con DTNB. La quantificazione è stata effettuata attraverso una retta standard di calibrazione, con concentrazioni note di GSH (50-500 μ M) (Viarengo et al., 1997; Bocchetti et al., 2008).

La **proliferazione perossisomiale**, biomarker specifico di esposizione a molti xenobiotici organici (Cajaraville et al., 1997; 2003), è stata valutata per via spettrofotometrica attraverso l'analisi dell'attività enzimatica della acil-CoA ossidasi (AOX), principale enzima coinvolto nella beta-ossidazione degli acidi grassi. I campioni di ghiandola digestiva sono stati omogenati in tampone sodio bicarbonato 1 mM, pH 7.6, contenente EDTA 1mM, etanolo 0.1%, TRITON X-100 0.01% e centrifugati a 500 xg per 15 min a 4°C. L'attività enzimatica della AOX è stata determinata seguendo la reazione di ossidazione della diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) in presenza di una perossidasi esterna e con l'aggiunta di un substrato specifico (Palmitoil CoA) alla temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\lambda = 502$ nm (Small et al., 1985; Zorita et al., 2008).

L'attività dell'**acetilcolinesterasi**, scelta come biomarker di neurotossicità (Galloway et al., 2004; Rickwood & Galloway, 2004), è stata determinata in campioni di emolinfa conservati alla temperatura di -80°C e centrifugati per 10 minuti a 10.000 xg. L'attività dell'acetilcolinesterasi è stata misurata usando come substrato l'acetilcolina iodide, che viene convertita dall'enzima in tiocolina (Ellman et al., 1961). Questa reagisce con l'acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), che dà origine ad un anione giallo che viene quantificato alla lunghezza d'onda di 412 nm ($\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Per le analisi degli **enzimi antiossidanti**, utilizzati come biomarker generali dello stato di salute degli organismi (Winston & Di Giulio, 1991; Regoli & Principato, 1995; Regoli, 2000), i campioni di ghiandola digestiva sono stati omogenati (1:5 p/v) in tampone K-fosfato 100 mM, pH 7.5, con cloruro di sodio 2.5%, e PMSF 0.1 mM ed i seguenti inibitori di proteasi: aprotinina 0.008 TIU/ml, leupeptina 1 μ g/ml, pepstatina 0.5 μ g/ml e bacitracina 0.1 mg/ml. Dopo centrifugazione a 100.000 xg per 1h e 10 min a 4°C, la frazione citosolica è stata aliquotata e conservata a -80°C . Le attività enzimatiche sono

state misurate con specifici saggi spettrofotometrici utilizzando uno strumento Varian (modello Cary 5) termostato a temperatura costante di 18 ± 1 °C (Regoli et al., 2004).

La **catalasi** trasforma il perossido di idrogeno (H_2O_2) in acqua e ossigeno molecolare, rimuovendo così oltre che un potente ossidante cellulare, anche il principale precursore del radicale idrossilico, il più reattivo e tossico fra le specie reattive dell'ossigeno (Regoli et al., 2005). L'attività della catalasi è stata misurata seguendo la diminuzione di assorbanza in funzione del tempo, dovuta alla riduzione del perossido di idrogeno ad acqua; la lunghezza d'onda utilizzata è stata $\lambda = 240$ nm ed il coefficiente di estinzione millimolare applicato è stato $\epsilon = -0.04$ $mM^{-1}cm^{-1}$. Il saggio è stato condotto per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.0, con H_2O_2 12 mM ed opportune aliquote di campione.

Le **glutazione S-transferasi** catalizzano la coniugazione di una molecola di glutazione ridotto (GSH) ai gruppi elettrofili di composti organici. Delle molte isoforme, alcune possono avere funzione antiossidante, ma la maggior parte sono coinvolte nella detossificazione di substrati organici, resi più idrosolubili e di più facile escrezione. L'attività catalitica delle glutazione S-transferasi è stata analizzata seguendo l'aumento di assorbanza dovuto alla formazione del complesso di coniugazione tra GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), ad una lunghezza d'onda $\lambda = 340$ nm e con un coefficiente di estinzione millimolare $\epsilon = 9.6$ $mM^{-1}cm^{-1}$. La reazione è stata seguita per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM pH 6.5, CDNB 1.5 mM, GSH 1 mM ed opportune aliquote di campione.

La **glutazione reduttasi** ha la funzione di riconvertire il glutazione ossidato nella sua forma ridotta, cioè quella funzionalmente attiva, utilizzando come cofattore riducente il NADPH. Il saggio della glutazione reduttasi è stato condotto alla lunghezza d'onda $\lambda = 340$ nm e con coefficiente di estinzione millimolare $\epsilon = -6.22$ $mM^{-1}cm^{-1}$, misurando il decremento di assorbanza dovuto al consumo di NADPH nel tempo. La reazione è avvenuta in un volume di saggio finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.0, GSSG 1 mM, NADPH 0.12 mM ed opportune aliquote di campione.

Gli enzimi **glutazione perossidasi**, Se-dipendenti e Se-indipendenti, svolgono la loro funzione agendo su perossidi organici ed inorganici riducendoli all'alcool corrispondente. L'attività enzimatica è stata misurata seguendo l'azione di un sistema di enzimi accoppiati dove il GSSG formato nella reazione

delle perossidasi viene convertito nella forma ridotta GSH dalla glutatione reduttasi. Il consumo di NADPH è stato seguito come diminuzione di assorbanza a $\lambda = 340 \text{ nm}$ ($\epsilon = -6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). L'attività delle forme enzimatiche Se-dipendenti e Se-indipendenti è stata misurata usando come substrato l'idroperossido di cumene (CuPx) per valutarne l'azione su perossidi organici. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, EDTA 1mM, GSH 2 mM, NADPH 0.24 mM, 0.8 mM CuPx, 1U GR ed opportune aliquote di campione.

Il **glutatione** è un tripeptide citosolico formato da γ glutamil-cistenil-glicina e oltre ad essere un importante cofattore di svariati sistemi enzimatici glutatione-dipendenti, è in grado di neutralizzare numerose forme di radicali liberi reagendovi direttamente ed ossidandosi. Per la determinazione del glutatione totale gli omogenati di ghiandola digestiva sono stati preparati in acido sulfosalicilico 5% con EDTA 4 mM (1:5 p/v). I campioni sono quindi stati lasciati in ghiaccio per 45 min al fine di ottenere una completa deproteinizzazione e centrifugati a 37.000 xg per 15 min. Il contenuto di glutatione totale è stato determinato nel sovrantante misurando per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda $\lambda = 412 \text{ nm}$, l'intensità di reazione tra i gruppi $-\text{SH}$ e l'acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB). Il saggio è stato condotto in tampone K-fosfato 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTNB 0.1 mM, NADPH 0.24 mM, glutatione reduttasi 1 U ed opportune aliquote di campione. I valori di assorbanza ottenuti sono stati quantificati mediante una curva di calibrazione standard a concentrazioni note di glutatione ridotto.

La **Capacità Antiossidante Totale** è stata stimata tramite il saggio TOSC che misura l'efficienza complessiva di un tessuto biologico di neutralizzare diverse forme di ROS tra cui i radicali perossilici ($\text{ROO}\cdot$) e i radicali idrossilici ($\text{HO}\cdot$) (Winston et al., 1998; Regoli & Winston, 1999; Gorbi & Regoli, 2003).

Le analisi sono state effettuate sulla componente citosolica delle ghiandole digestive omogenate (1:5 p/v) in un working-buffer costituito da tampone K-fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 2.5% ed i seguenti inibitori di proteasi: aprotinina 0.008 TIU/ml, leupeptina 1 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 100.000 xg per 1 ora e 10 minuti a 4°C, e la frazione citosolica subaliquotata e conservata a - 80°C fino al momento delle analisi.

Il saggio TOSC-A (Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay) prevede la reazione tra le diverse forme di radicali che sono artificialmente generati, e l'acido α -cheto- γ -metiolbutirrico (KMBA), che funge da substrato e si ossida liberando gas etilene. La produzione di etilene risulta quantitativamente

diminuita in presenza di agenti antiossidanti (come quelli contenuti nel materiale biologico) che reagiscono con i radicali neutralizzandoli e sottraendoli alla reazione con il KMBA. Il grado di inibizione della formazione di etilene rispetto alla reazione di controllo, permette di quantificare un parametro TOSC che rappresenta la capacità antiossidante totale del campione nei confronti di una determinata classe di radicali liberi (Winston et al., 1998). Poiché l'efficienza relativa degli antiossidanti può variare molto nei confronti di diverse forme di ossidanti, il metodo TOSCA è stato standardizzato nei confronti di più classi di radicali liberi, tra cui i radicali perossilici ed idrossilici.

I radicali perossilici (ROO•) sono stati generati attraverso l'omolisi termica del 2,2'-azo-bis-amidinopropano (ABAP) mentre i radicali idrossilici (HO•) attraverso la reazione di Fenton ferro-ascorbato.

Le condizioni finali di saggio sono state le seguenti:

- per l'analisi con i radicali perossilici (ROO•): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM e ABAP 20 mM in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4;
- per l'analisi con i radicali idrossilici (•OH) : un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM, Fe³⁺ 1.8 µM, EDTA 3.6 µM e acido ascorbico 180 µM in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4;

Le reazioni sono state condotte in appositi contenitori di vetro da 10 ml (vials), sigillati con speciali tappi muniti di setto gas-tight Mininert per iniezioni multiple, mantenuti alla temperatura costante di 35°C in bagno termostatico continuamente agitato per consentire una generazione costante delle varie forme di radicali.

Il KMBA viene ossidato dalle diverse forme di radicali generando gas etilene, aliquote di 200 µl sono state prelevate dallo spazio di testa ad intervalli di 10-12 min e la formazione dell'etilene è stata monitorata nel tempo mediante analisi gas-cromatografica su colonna capillare "Supelco SPB-1" (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm) e con rivelatore FID (Flame Ionization Detector), utilizzando le seguenti condizioni strumentali: temperatura del forno pari a 35°C, temperatura del FID pari a 220°C, temperatura d'iniezione pari a 160°C, flusso d'idrogeno pari a 30 ml/minuto; flusso d'elio pari a 3 ml/minuto.

La differenza nella produzione di etilene tra la reazione nei vials di controllo e la reazione nei vials contenenti i campioni, è stata calcolata matematicamente, integrando l'area al di sotto delle rispettive curve cinetiche della produzione d'etilene in funzione del tempo, considerando che ogni campione viene letto ogni 12 minuti per un tempo totale di saggio pari a 96 minuti. I risultati ottenuti permettono di quantificare il parametro TOSC, compreso tra 0 e 100, indice della capacità complessiva del campione analizzato, di neutralizzare le varie forme di specie reattive dell'ossigeno.

I valori TOSC sperimentali ottenuti nei confronti delle varie forme di radicali sono quantificati dall'equazione:

$$\text{TOSC} = 100 - (\int\text{SA} / \int\text{CA} \times 100)$$

dove $\int\text{SA}$ e $\int\text{CA}$ sono gli integrali delle aree al di sotto delle curve che rappresentano rispettivamente le reazioni di un campione SA (Sample Area), e del controllo CA (Control Area).

Un campione che sia privo di qualsiasi capacità di neutralizzare i radicali mostrerà una produzione di etilene in funzione del tempo uguale a quella dei controlli ($\int\text{SA} / \int\text{CA}=1$) ed il risultante valore TOSC sarà pertanto pari a 0. Al contrario un ipotetico valore TOSC=100 corrisponderebbe ad un campione che neutralizza tutte le specie reattive prodotte, inibendo completamente la formazione di etilene nell'intera durata del saggio ($\int\text{SA}=0$). Dai risultati sperimentali viene ottenuto un valore TOSC specifico, rapportato al contenuto di proteine ed espresso come unità TOSC/mg di proteine.

Il **contenuto di malondialdeide**, principale prodotto di perossidazione lipidica a carico delle membrane (Doyotte et al., 1997), è stato determinato attraverso una reazione di coniugazione con 1-metil-2-fenilindolo, che dà luogo alla formazione di un composto con assorbanza massima alla lunghezza d'onda $\lambda = 586$ nm (Shaw et al., 2004). Per queste analisi i campioni di ghiandola digestiva sono stati omogenati in Tris-HCl 20 mM pH 7.4 (1:3 p/v) e centrifugati a 3.000 xg per 20 min. La reazione di coniugazione è stata condotta a 45°C per 40 min in un volume finale di 1 ml costituito da: 650 μl di 1-metil-2-fenilindolo 10.3 mM in acetonitrile diluito in rapporto 3:1 con metanolo; 100 μl di H_2O ; 150 μl di HCl 37%. Dopo centrifugazione a 15.000 xg per 10 min, il contenuto di malondialdeide è stato misurato per via spettrofotometrica, utilizzando come standard 1,1,3,3-tetrametossipropano in Tris-HCl 20 mM.

Le **proteine** sono state analizzate secondo il metodo di Lowry, utilizzando albumina di siero bovino (BSA) come standard (Lowry et al., 1951).

La **stabilità delle membrane lisosomiali** rappresenta un biomarker estremamente sensibile, indicativo dello stato di salute generale dell'organismo e della comparsa precoce di condizioni di stress ossidativo (Moore, 1982, 1988; Regoli, 1992; Moore et al., 2006). Tale parametro è stato misurato negli emociti di *M. galloprovincialis* prelevando da 10 organismi un'aliquota di emolinfa (0.5 ml) dal muscolo adduttore anteriore, mediante siringa ipodermica contenente un eguale volume di soluzione fisiologica (Lowe et al., 1995; Moore et al., 2004). Una aliquota di tale sospensione è stata poi dispersa su un vetrino dove le cellule sono state lasciate aderire per 15 min a 4 °C in camera buia e umida. Le cellule sono quindi state

incubate con una soluzione di Rosso Neutro ed esaminate ad intervalli di 15 min (fino ad un tempo massimo di 120 min) per determinare il tempo al quale il 50% degli emociti presenta il Rosso Neutro non più compartimentalizzato nei lisosomi ma rilasciato nel citosol. La soluzione stock di Rosso Neutro è stata preparata dissolvendo 28.8 mg di colorante in 1 ml di dimetilsolfossido (DMSO) e conservata a 4°C per non più di 3 settimane; al momento dell'analisi 10 µl di soluzione stock sono stati diluiti in 5 ml di soluzione fisiologica.

Il grado di **danneggiamento al DNA** è stato valutato nell'emolinfa dei mitili attraverso il test della cometa e la frequenza di micronuclei (Frenzilli et al., 2009; Pisanelli et al., 2009). Il test della cometa misura la perdita di integrità strutturale del DNA e permette una stima delle rotture a carico dei legami zucchero-fosfato nella doppia elica (strand breaks) a livello di singole cellule (Frenzilli et al., 2001; Machella et al., 2006). Gli strand breaks, che si formano anche in condizioni fisiologiche nel DNA cellulare, possono essere riparati da sistemi enzimatici che ne preservano l'integrità strutturale; quando viene meno l'equilibrio fra processi di rottura e riparo, si verifica un accumulo delle rotture nel DNA che può avere delle conseguenze rilevanti per alcuni processi essenziali del ciclo cellulare, come la corretta segregazione del materiale genetico durante la mitosi e la comparsa di micronuclei (MN), cioè di piccoli frammenti di cromatina fisicamente separati dal nucleo principale (Bolognesi et al., 2004; Nigro et al., 2006). Per il **test della cometa**, gli emociti sono stati prelevati dal muscolo adduttore posteriore e per ogni sito sono stati analizzati 5 individui in replicato. Le cellule lavate in buffer salino (12.5 mM KCl; 0.5 M NaCl; 20 mM Hepes; 10 mM EDTA) e portate alla concentrazione di 40×10^4 cellule \times ml⁻¹, sono state incluse entro un duplice strato di agarosio a basso punto di fusione, allestito su vetrini da microscopia pre-trattati con agarosio a punto di fusione normale. I vetrini così allestiti sono stati immersi per 90 minuti in una soluzione di lisi cellulare (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Trizma-base; 1% Triton X-100 e 10% DMSO), 4°C, al buio, pH 10 e sottoposti a denaturazione alcalina (75 mM NaOH; 1 mM EDTA a pH > 12 per 10 minuti) e a corsa elettroforetica (1V/cm per 10 minuti, a 4°C, al buio). Dopo lavaggio di 10 minuti in soluzione di neutralizzazione (400 mM TRIS HCl, pH 7.5) e fissaggio in metanolo (3 min, a -20°C), i vetrini sono stati colorati con il 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), colorante fluorescente specifico per il DNA. L'entità della frammentazione del DNA è stata misurata per via microscopica; attraverso l'utilizzo di un software appropriato, Image Pro-Plus 6.2, sono stati creati dei mosaici di foto, costituiti dalle fotografie di circa 70 nuclei, che sono stati successivamente analizzati con il programma di analisi di immagine CometScore 1.5. La quantificazione della perdita di integrità strutturale del DNA valutata attraverso tale programma viene espressa come percentuale di DNA nella coda su una media di 70 nuclei analizzati per singolo vetrino.

La frequenza di insorgenza di **micronuclei (MN)** è stata valutata negli emociti prelevati dal muscolo adduttore, dilavati in un buffer salino (500 mM NaCl, 120 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM EDTA) con brevi centrifugate. Di seguito le cellule sono state trattate con fissativo di Carnoy (miscela 3:1 metanolo ed acido acetico) e sottoposte ulteriormente a brevi centrifugate, e cambi di fissativo, prima di allestire degli strisci su vetrino. Dopo colorazione dei preparati con 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) (100 ngml⁻¹), i vetrini sono stati esaminati al microscopio in fluorescenza per determinare la percentuale delle cellule contenenti MN. Per ciascun campione sono state contate almeno 2.000 cellule, considerando MN tutte quelle porzioni di cromatina fortemente DAPI positive in discontinuità fisica con il nucleo centrale (Nigro et al., 2006).

Analisi statistiche e applicazione del modello di analisi di rischio SediquaSoft

Per ogni parametro analizzato l'analisi della varianza (ANOVA) a una via è stata applicata per testare la significatività delle differenze misurate negli organismi traslocati/prelevati da siti diversi durante le stesse campagne. L'omogeneità della varianza è stata verificata mediante il test di Cochran C e l'analisi post hoc (Newman-Keuls) ha permesso di verificare la significatività delle differenze tra le medie dei valori.

La valutazione complessiva del livello di pericolo derivante dalle analisi dei biomarkers è stata effettuata tramite l'applicazione di uno specifico modello di analisi di rischio (SediquaSoft©) che elabora i risultati in un indice sintetico di pericolo (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012).

Il modello SediquaSoft è stato recentemente sviluppato per una sua specifica applicazione alla valutazione della qualità dei sedimenti e del rischio associato alla gestione di questi materiali (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012). In generale, tale modello è basato su un approccio "weight-of-evidence" (WOE) che si basa sull'utilizzo di dati provenienti da diverse tipologie di indagine (o linee di evidenza, LOE) tra cui i dati della caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE1), la biodisponibilità dei contaminanti per gli organismi (LOE2), la comparsa di effetti sub letali misurabili tramite biomarkers (LOE3), ed eventualmente l'applicazioni di saggi di ecotossicità dei sedimenti (LOE4). Specifici algoritmi e diagrammi di flusso permettono, sulla base di precisi obiettivi ed assunzioni da giudizio esperto, di applicare criteri di integrazione ponderata ad ampi data-sets di dati eterogenei che, dopo essere stati elaborati all'interno di ciascun modulo, vengono poi integrati in una valutazione complessiva del pericolo, secondo un approccio WOE che da un peso diverso ai risultati delle varie linee di evidenza.

I risultati delle analisi dei biomarker nei mitili trapiantati ottenuti in questa indagine sono stati elaborati nella LOE3. I criteri che hanno portato allo sviluppo di questo modulo sono stati la selezione di

un'ampia batteria di biomarker tra quelli maggiormente riconosciuti ed utilizzati a livello nazionale ed internazionale e l'attribuzione a ciascun biomarker di un peso in funzione della rilevanza biologica dell'effetto misurato; per ciascun biomarker inoltre, in funzione della specie e del tessuto analizzati, è stata stabilita anche una soglia per variazioni considerate biologicamente rilevanti (Threshold) che tiene conto delle possibili risposte bifasiche di certi biomarkers che possono sia essere indotti che inibiti. La variazione misurata per ciascun biomarker è confrontata con la soglia e corretta sia per la significatività statistica della differenza rispetto al controllo, che per l'importanza biologica della risposta (peso); i risultati dei singoli biomarkers sono quindi assegnati ad una classe, in funzione della quale sono diversamente considerati nel calcolo dell'indice cumulativo di pericolo (HQ), mentre il livello di pericolo complessivo dipende dalla percentuale di distribuzione dei vari biomarkers nelle 5 classi. Viene di seguito riportato il flow-chart di queste elaborazioni (Figura 10.1.2).

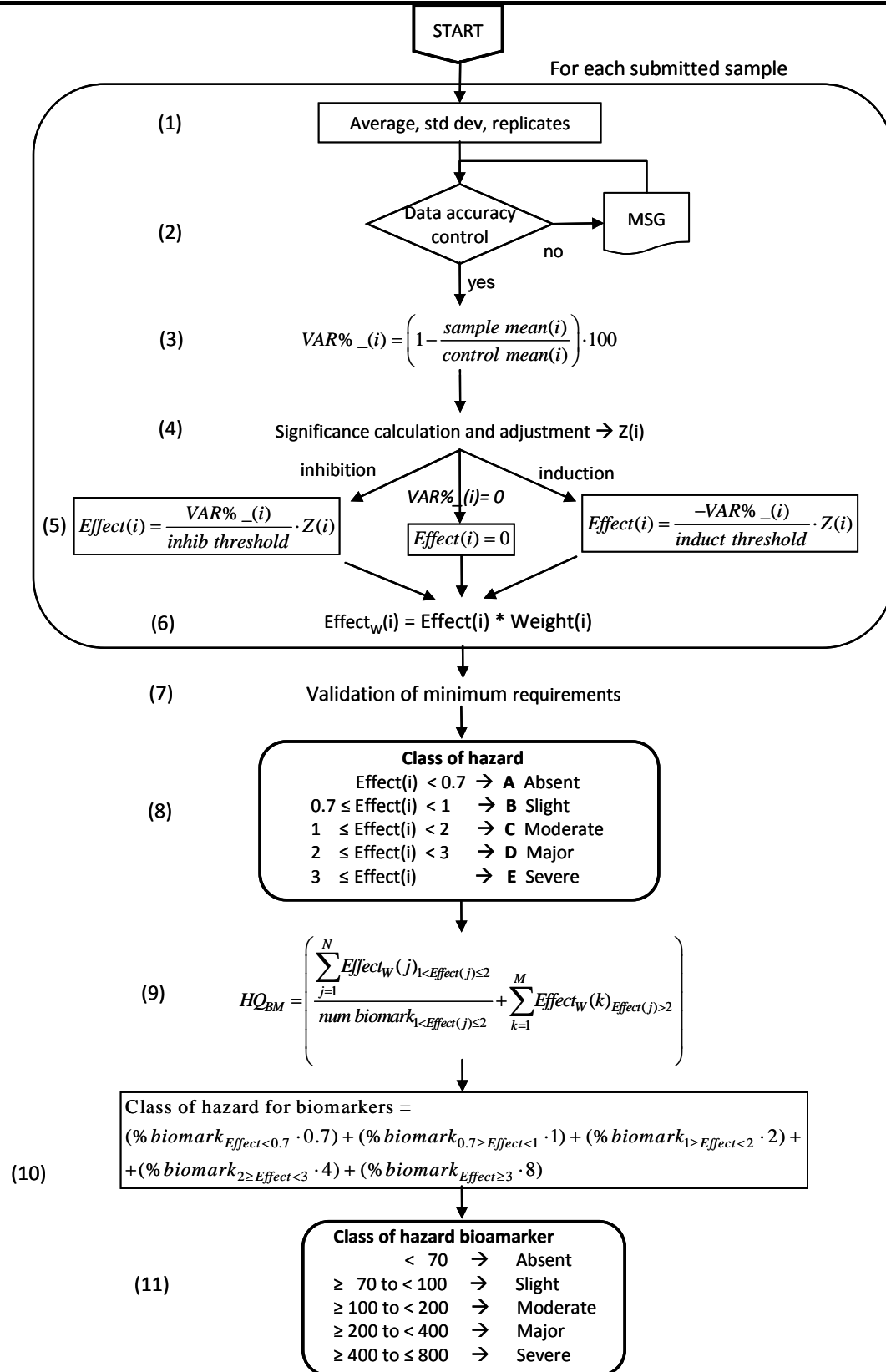


Figura 10.1.2: Flow-chart della elaborazione dei risultati ottenuti dai biomarkers per il calcolo dell'Hazard Quotient (HQ) e dell'indice di pericolo complessivo (da Piva et al., 2011).

10.2 Risultati ottenuti in *Mytilus galloprovincialis*

Il dettaglio di tutti i risultati ottenuti viene riportato nell'Appendice del presente capitolo.

L'analisi delle **metallotioneine**, biomarker specifico di esposizione a contaminanti metallici non ha generalmente evidenziato durante la fase di esercizio differenze significative tra i mitili traslocati nei due siti dell'alto Adriatico, rispettivamente in prossimità del terminale e presso la mitilicoltura, rispetto agli organismi traslocati nell'area di riferimento TE041M di Portonovo (Figura 10.2.1A). I valori medi di metallotioneine sono risultati prossimi a 2.5 ± 0.5 Eq. GSH nmol/mg prot, con l'eccezione dell'ultima campagna di traslocazione in cui sono stati evidenziati livelli significativamente più elevati negli organismi traslocati nei 2 siti dell'alto Adriatico con valori medi pari a 4.4 ± 1.48 Eq. GSH nmol/mg prot nella stazione TE040T (quella più vicina al terminale).

L'attività dell'**acilCoA ossidasi (AOX)**, biomarker di alterazione perossisomiale, ha sempre mostrato differenze significative durante le quattro traslocazioni effettuate (Figura 10.2.1B), con valori mediamente più elevati nelle due stazioni dell'alto Adriatico (TE040T e TE039A), in particolare in quella più prossima al terminale, rispetto alla stazione di controllo (TE041M).

Per quanto riguarda l'attività dell'**acetilcolinesterasi** nessuna differenza significativa è stata riscontrata nei mitili traslocati nelle stazioni dell'alto Adriatico (TE040T e TE039A) rispetto a quella di Portonovo nelle prime tre traslocazioni con valori medi di circa 55 nmol/min/mg prot (Figura 10.2.1C); al contrario un aumento dell'attività di tale enzima è stata osservato nell'ultima campagna di traslocazione con valori che raggiungono 87 ± 20.8 e 105.7 ± 14.07 nmol/min/mg prot nei mitili traslocati nell'area dell'alto Adriatico (TE040T e TE039A) rispetto ai 48.2 ± 13.2 nmol/min/mg prot misurati negli organismi dell'area di riferimento (TE041M): i valori di acetilcolinesterasi non sono tuttavia risultati significativamente diversi tra gli organismi traslocati nei 2 siti posti in prossimità del terminale o presso la mitilicoltura.

Tra i biomarkers di danno cellulare, la **stabilità delle membrane lisosomiali** (Figura 10.2.2A) è risultata significativamente più bassa nei mitili traslocati nella stazione TE039A presso la mitilicoltura dell'alto Adriatico, in quasi tutti i periodi di traslocazione con valori di circa 35 minuti rispetto ai 50 min misurati negli organismi di riferimento.

Il grado di **frammentazione del DNA** non ha evidenziato invece differenze tra le aree e i diversi periodi con valori medi compresi tra 30 e 48 % di DNA nella coda (Figura 10.2.2B), ed anche la **frequenza di micronuclei** è risultata confrontabile tra gli organismi traslocati nei vari siti sebbene con una maggior variabilità e fluttuazione stagionale (Figura 10.2.2C).

L'analisi dei parametri ossidativi ha evidenziato qualche differenza tra i mitili traslocati nelle diverse aree, ed anche variazioni tra le diverse campagne di traslocazione come effetto di una normale stagionalità di queste risposte biologiche (Figura 10.2.3). L'attività media della **catalasi** (Figura 10.2.3A) è risultata più elevata nella quarta campagna di traslocazione, con valori circa doppi di quelli misurati durante la prima campagna (43 ± 2 vs 11 ± 2.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$), ma tipicamente paragonabili tra gli organismi traslocati nei siti di riferimento e in prossimità dell'area del terminale. Variazioni ossidative significative sono state osservate al termine della terza campagna di traslocazione, quando oltre all'inibizione della catalasi nella stazione posizionata presso la mitilicoltura (TE039A), si sono misurati valori più alti dell'attività delle **glutazione S-transferasi** in entrambe le stazioni dell'alto Adriatico (TE040T e TE039A) rispetto al sito di controllo (TE041M); i valori, pari rispettivamente a 279.3 ± 63.7 , 279.5 ± 39.5 e 165.4 ± 17.4 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ (Figura 10.2.3B), non hanno però evidenziato differenze tra gli organismi traslocati nell'alto Adriatico a diversa distanza rispetto alla struttura del terminale. Le attività della **glutazione reduttasi** e delle **glutazione perossidasi** sono risultate simili tra aree e con valori tendenzialmente superiori durante le ultime due campagne di campionamento (Figura 10.2.3 C-D). I mitili traslocati nei siti dell'alto Adriatico hanno evidenziato anche livelli di **glutazione** tendenzialmente o significativamente più elevati rispetto a quelli di Portonovo negli ultimi 2 periodi di traslocazione (Figura 10.2.3 E). La **capacità antiossidante totale** verso i radicali perossilici ed idrossilici e i livelli di **malondialdeide** sono risultati confrontabili tra i diversi siti mentre, per quanto riguarda le variazioni stagionali, il contenuto di malondialdeide è risultato più basso durante gli ultimi due periodi di traslocazione (Figura 10.2.3 F-H).

I risultati complessivi di tutti i biomarkers sono stati analizzati con il modello di analisi di rischio SediquaSoft che, pesando le differenze in funzione della rilevanza biologica dei vari biomarkers e dell'entità delle variazioni misurate, permette di ottenere degli indici sintetici di pericolo biologico complessivo.

Rispetto agli organismi di Portonovo, quelli traslocati in prossimità del terminale hanno evidenziato un livello di alterazioni biologiche rispettivamente lieve e moderato durante le prime due campagne di traslocazione, mentre è risultato elevato nelle ultime due (Figura 10.2.4). Come già precedentemente

discusso, i biomarkers che hanno determinato l'elaborazione di questi giudizi sulla gravità complessiva degli effetti sono stati principalmente le variazioni misurate per metallotioneine, acil CoA ossidasi, acetilcolinesterasi, glutatione S-transferasi e glutatione.

Per verificare se tali variazioni siano effettivamente imputabili alla fase di esercizio del terminale, il modello di analisi di rischio ha elaborato i risultati ottenuti nei mitili traslocati in prossimità della struttura rispetto a quelli dei mitili trapiantati sempre nell'area dell'alto Adriatico, ma nel sito della mitilicoltura, non influenzato dalle attività del terminale. In questo caso, l'entità delle variazioni complessivamente ottenute dai biomarkers è stata assegnata ad un livello di classe lieve (Figura 10.2.5).

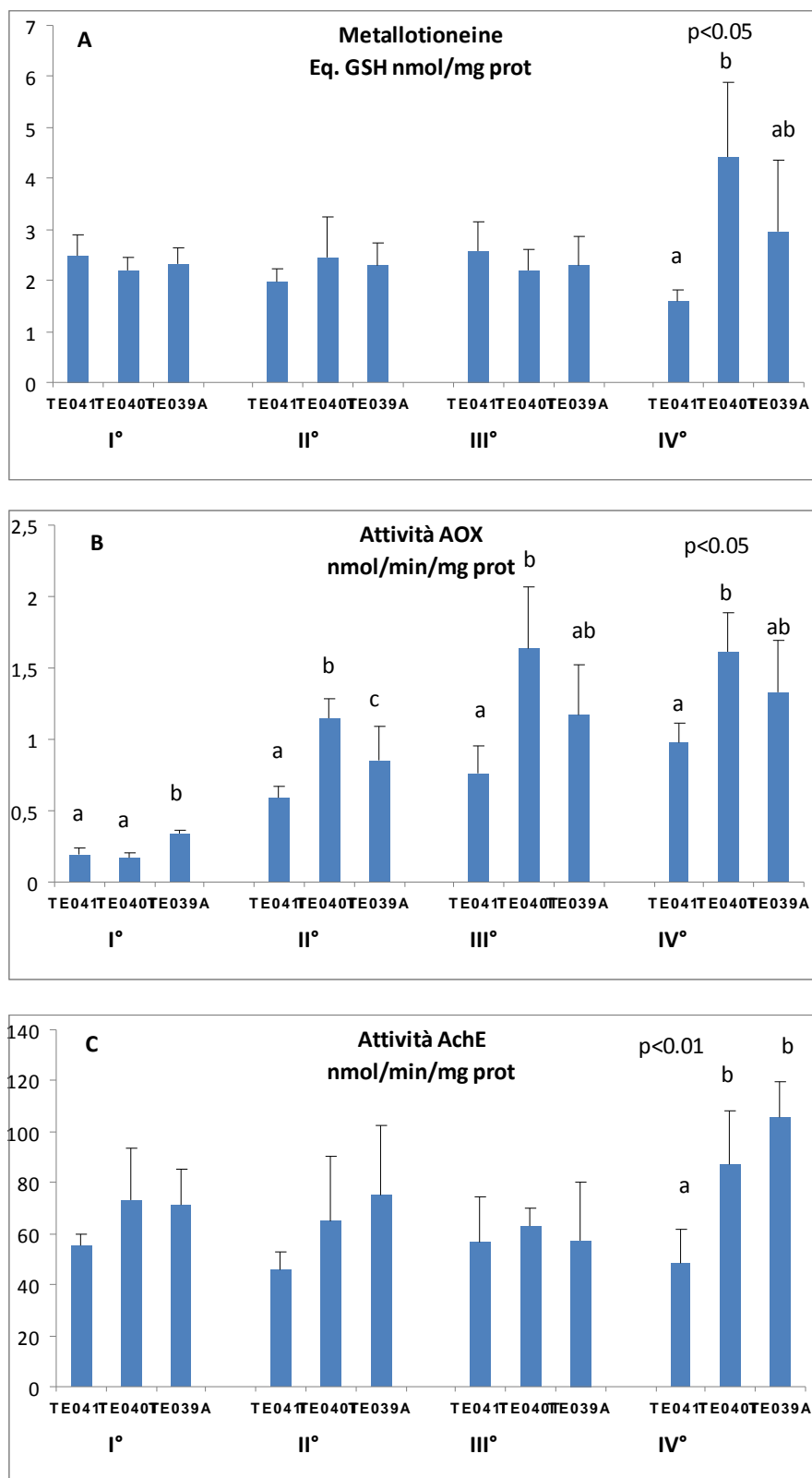


Figure 10.2.1 A,B,C: Livelli di **metallotioneine**, **attività dell'AOX** e dell'**acetilcolinesterasi** nei mitili traslocati durante le quattro campagne di esercizio nel sito di riferimento di Portonovo (TE041) ed in quelli dell'alto Adriatico in prossimità del terminale (TE040T) e della mitilicoltura (TE039A). Valori espressi come medie \pm deviazioni standard (n=10). Le lettere indicano le differenze significative tra siti nello stesso periodo.

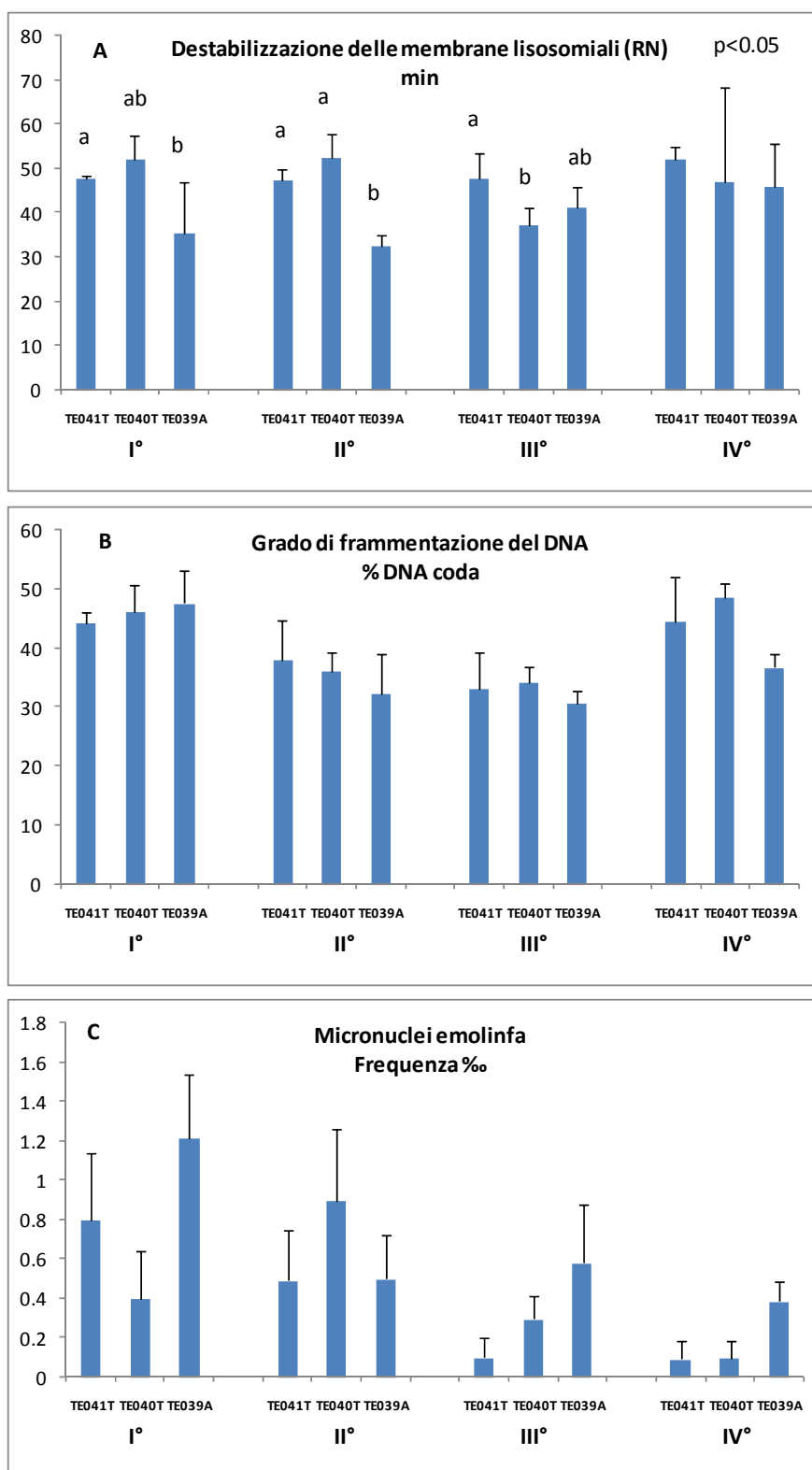


Figure 10.2.2 A,B,C: Stabilità lisosomiale, grado di frammentazione del DNA e frequenza di micronuclei nei mitili traslocati durante le quattro campagne di esercizio nel sito di riferimento di Portonovo (TE041) ed in quelli dell'alto Adriatico in prossimità del terminale (TE040T) e della mitilicoltura (TE039A). Valori espressi come medie \pm deviazioni standard ($n=5$). Le lettere indicano le differenze significative tra siti nello stesso periodo.

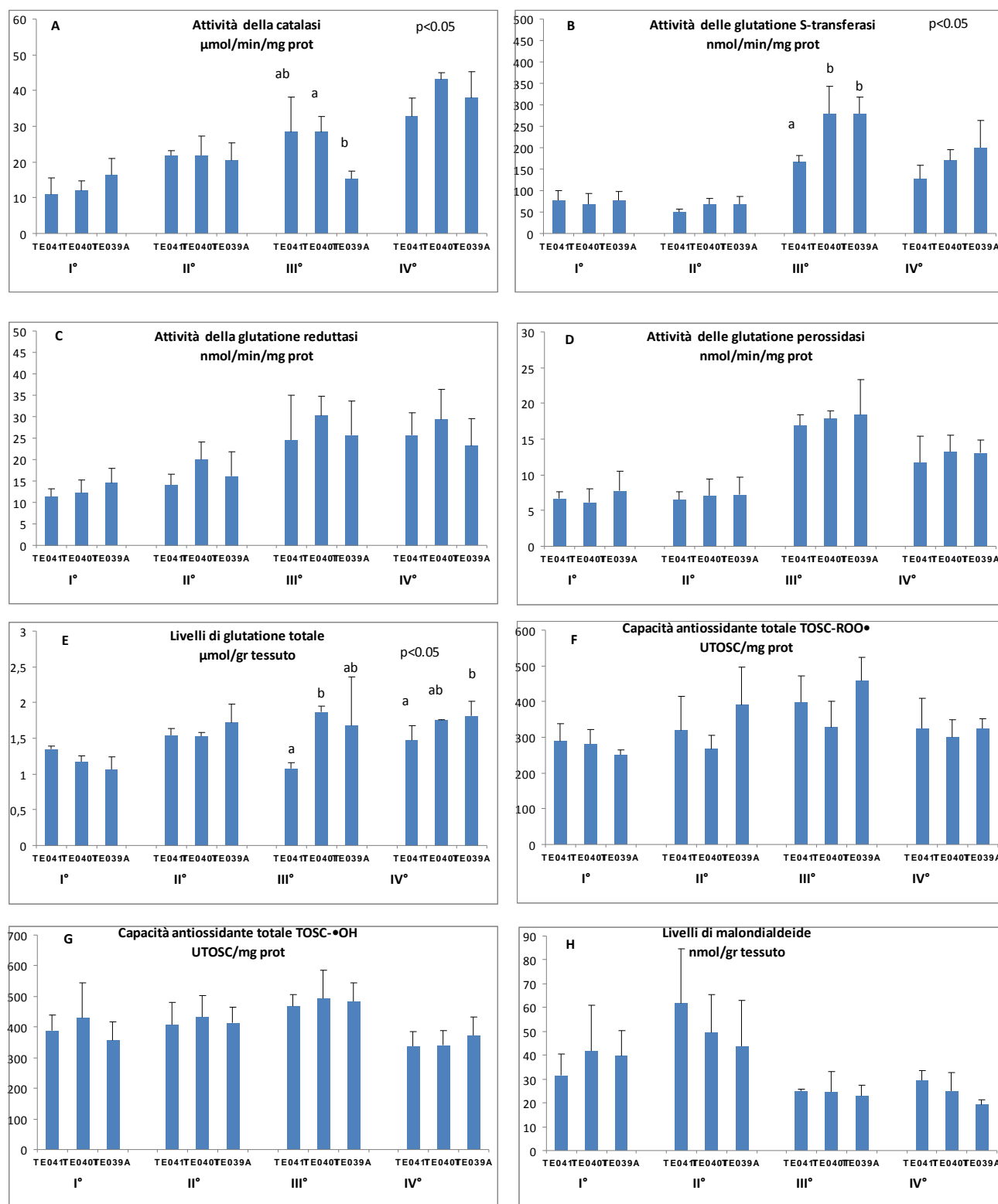


Figure 10.2.3 A,B,C,D,E,F,G,H: Attività di catalasi, glutazione S-transferasi, glutazione reduttasi, glutazione perossidasi, livelli di glutazione totale, capacità antiossidante totale (TOSC) nei confronti dei radicali perossidici ed idrossidici e livelli di malondialdeide nei mitili traslocati durante le quattro campagne di esercizio nel sito di riferimento di Portonovo (TE041) ed in quelli dell'alto Adriatico in prossimità del terminale (TE040T) e della mitilicoltura (TE039A). Valori espressi come medie \pm deviazioni standard ($n=10$). Le lettere indicano le differenze significative tra siti nello stesso periodo.

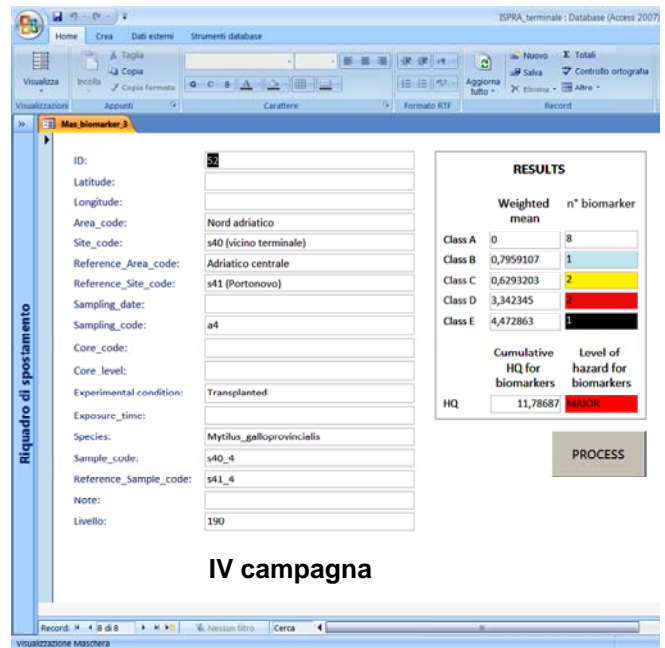
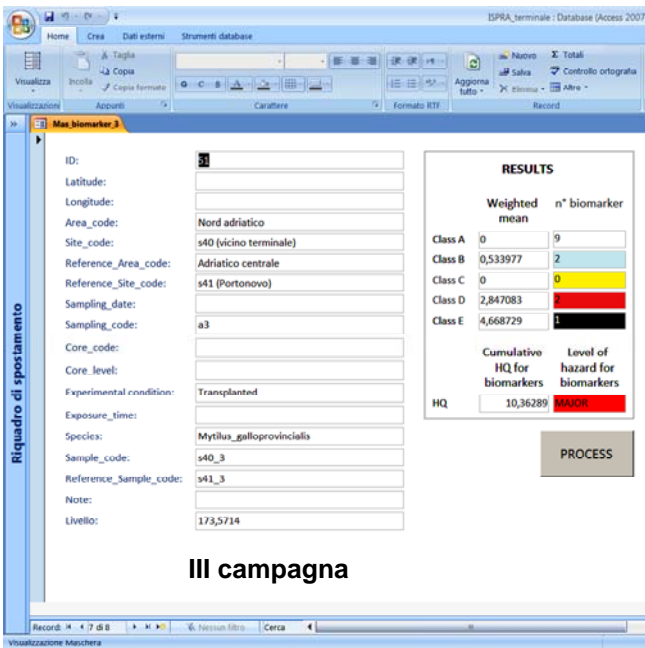
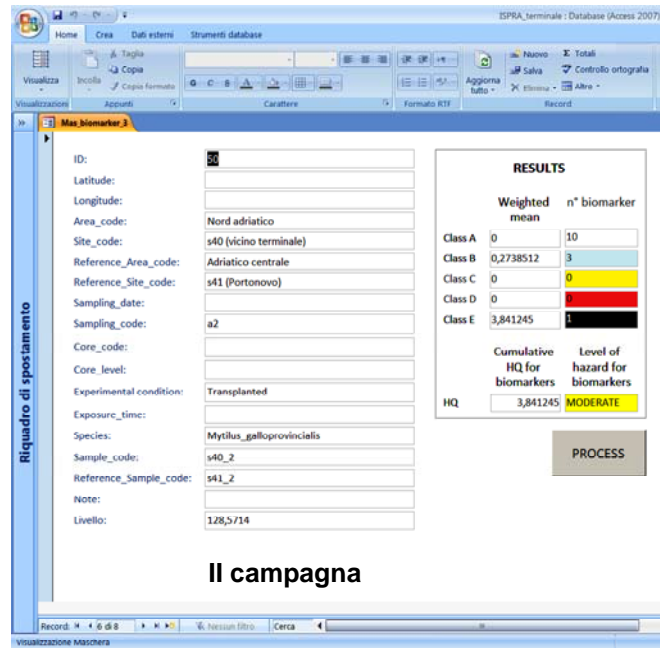
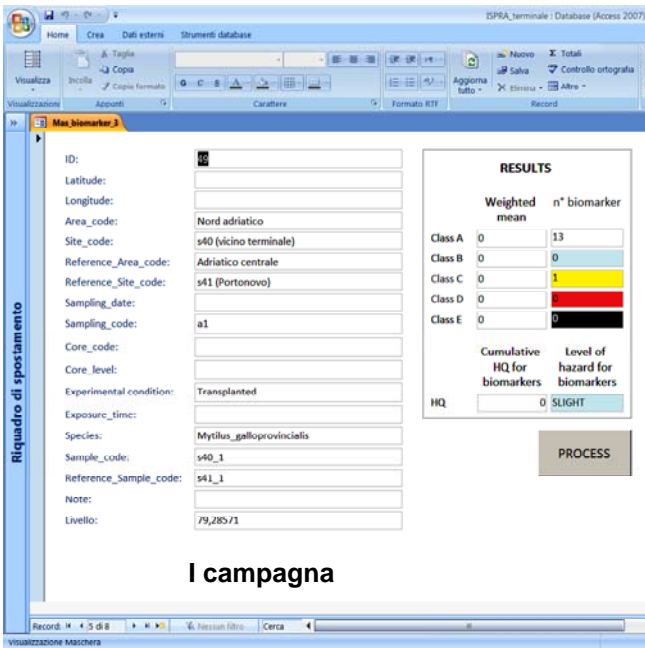


Figura 10.2.4: Elaborazione complessiva del livello di alterazioni biologiche e output del modello Sediqua software relativo al modulo dei biomarkers, nei mitili traslocati durante le 4 campagne nei pressi del terminale (TE040T) rispetto agli organismi traslocati nel sito di Portonovo (TE041).

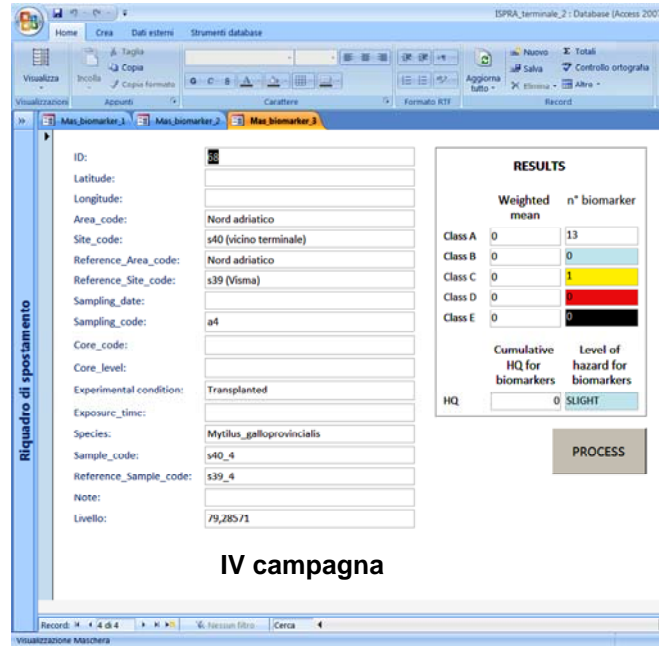
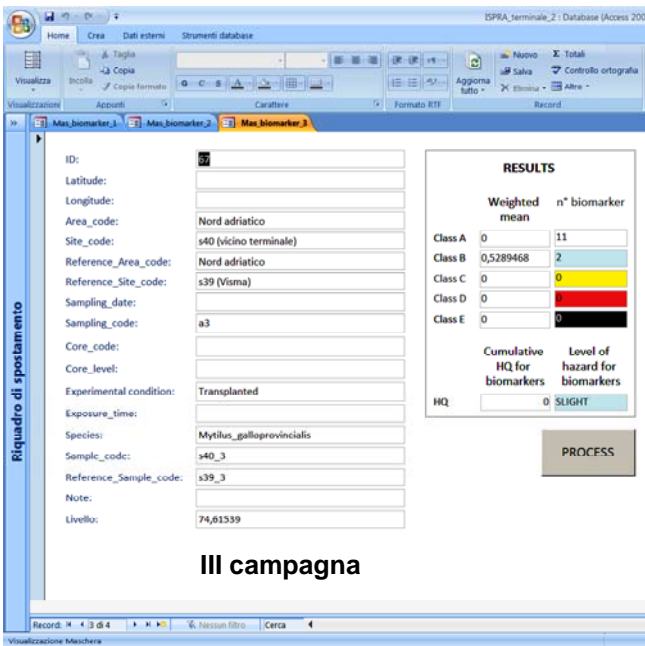
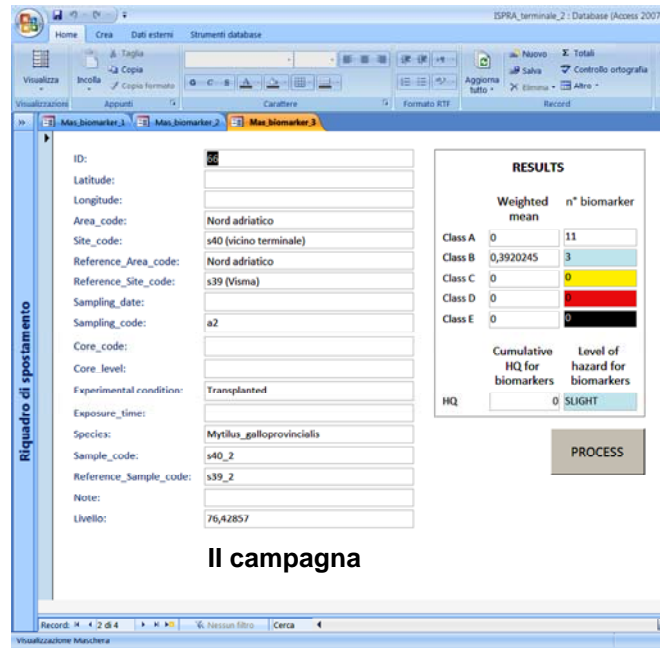
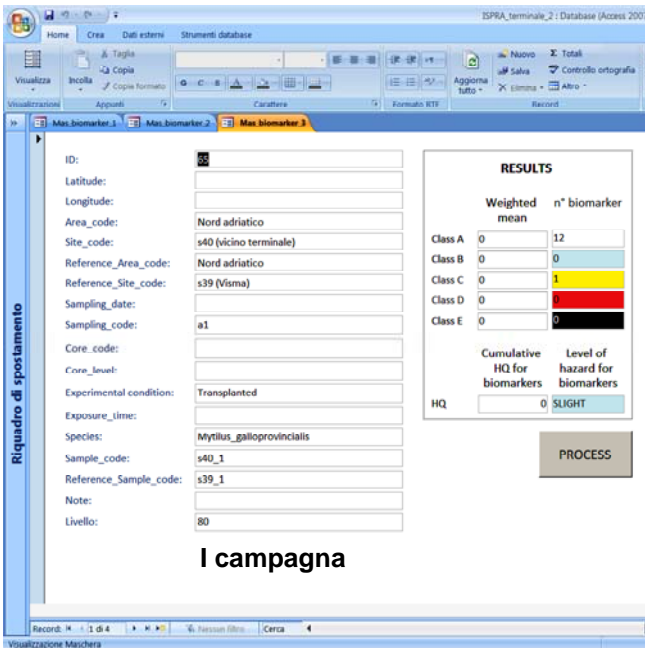


Figura 10.2.5: Elaborazione complessiva del livello di alterazioni biologiche e output del modello Sediqua relativo al modulo dei biomarkers, nei mitili traslocati durante le 4 campagne nei pressi del terminale (TE040I) rispetto agli organismi traslocati nell'altro sito dell'alto Adriatico presso la mitilicoltura (TE039A).

10.3 Discussione dei risultati relativi alla traslocazione dei mitili

Il potenziale impatto ecotossicologico determinato dalla fase di esercizio del terminale di rigassificazione, è stato valutato mediante un'ampia batteria di biomarker analizzati nei mitili, *Mytilus galloprovincialis* traslocati nell'area di interesse, in due siti posti a diversa distanza da questa struttura. L'utilizzo dei biomarkers è un utile strumento per rilevare l'avvenuta esposizione degli organismi a sostanze contaminanti poiché sono capaci di evidenziare precocemente le alterazioni, i potenziali rischi biologici e la compromissione dello stato di salute degli organismi, permettendo anche di anticipare la comparsa di cambiamenti a più alti livelli di organizzazione biologica.

Tra i biomarker di esposizione, le metallothioneine (MT) sono proteine citosoliche a basso peso molecolare caratterizzate da inducibilità, termostabilità ed elevato contenuto di gruppi tiolici, coinvolte nell'omeostasi cellulare di diversi metalli pesanti. Tali proteine non hanno mostrato variazioni significative tra i mitili traslocati nei due siti dell'alto Adriatico rispetto agli organismi traslocati nell'area di riferimento di Portonovo durante le prime tre campagne, suggerendo l'assenza di una esposizione biologicamente rilevante a contaminanti metallici per i mitili traslocati in prossimità del terminale. Inoltre i valori medi, che nell'ultima campagna di traslocazione risultano essere superiori rispetto a quelli misurati a Portonovo, sono comunque confrontabili con quelli osservati in organismi trapiantati nello stesso periodo stagionale in un'area off-shore dell'Adriatico centrale (Gorbi et al., 2008). Le metallothioneine, biomarker ben caratterizzato in *M. galloprovincialis* (Bocchetti & Regoli, 2006), presentano spesso risultati variabili e discordanti in funzione della stagionalità; mitili provenienti dalla costa Adriatica hanno evidenziato, come nel nostro caso, più elevati livelli nel periodo invernale (Ivankovic et al., 2005) mentre alcuni lavori hanno indicato un aumento di tale parametro durante il periodo estivo (Viarengo et al., 1997). Altri studi infine non hanno misurato alcuna variazione significativa di questo biomarker in mitili prelevati in diversi periodi e in diversi siti della costa greca, croata e italiana (Petrovic et al., 2001; Domouhtsidou et al., 2004; Bocchetti & Regoli, 2006).

I livelli di proliferazione perossisomiale (AOX) hanno sempre mostrato differenze significative tra siti, con valori più elevati nelle due stazioni dell'alto Adriatico (TE040T e TE039A). Tuttavia, gli organismi traslocati in prossimità del terminale non hanno evidenziato differenze marcate rispetto a quelli del sito più distante presso la mitilicoltura, permettendo così di escludere che l'induzione di tale parametro nel sito più prossimo al terminale sia conseguenza di una possibile esposizione a contaminanti organici, legati al trasporto marittimo delle navi metaniere e all'attività stessa dell'impianto. Le variazioni misurate rispetto agli organismi traslocati a Portonovo, così come quelle stagionali con più bassi livelli di attività AOX durante il periodo estivo, possono essere influenzate dall'andamento del ciclo riproduttivo e della disponibilità di cibo a sua volta legata alle fluttuazioni dei bloom fitoplanctonici (Cancio et al., 1999;

Bocchetti & Regoli, 2006, Zorita et al., 2008); a questo proposito è nota la presenza di un bloom fitoplanctonico nel mese di ottobre, caratterizzato dalla presenza di diatomee (Bocchetti & Regoli, 2006).

L'attività dell'acetilcolinesterasi (AchE), normalmente utilizzata come biomarker di esposizione a composti organofosforici e carbammati, non ha mostrato alcuna differenza significativa tra i mitili traslocati nelle stazioni dell'alto Adriatico (TE040T e TE039A) rispetto alla stazione di controllo durante le prime tre traslocazioni con valori medi di circa 55 nmol/min/mg prot; al contrario un aumento dell'attività dell'enzima è stato osservato nell'ultima campagna di traslocazione con valori che raggiungono 87 ± 20.8 e 105.7 ± 14.07 nmol/min/mg prot nei mitili traslocati presso il terminale e nella mitilicoltura (TE040T e TE039A) rispetto a 48.2 ± 13.2 nmol/min/mg prot dei mitili nell'area di riferimento (TE041M). Oltre all'effetto specifico di alcuni pesticidi (effetto peraltro di inibizione), è oggi noto che l'attività di tale enzima può essere modulata anche da fattori ambientali caratteristici delle diverse aree di indagine, quali salinità, temperatura e presenza di biotossine o cianobatteri nei tessuti dei mitili (Najimi et al., 1997; Dellali et al., 2001; Dailianis et al., 2003; Rickwood & Galloway, 2004; Frasco et al., 2005; Gorbi et al., 2008).

Tra i biomarkers di danno cellulare, la stabilità delle membrane lisosomiali è risultata significativamente più bassa nei mitili traslocati in prossimità della stazione TE039A in quasi tutti i periodi di traslocazione con valori di circa 35 minuti rispetto agli organismi trapiantati nell'area di controllo (47 minuti); i valori risultano essere più bassi, se confrontati con quelli misurati in organismi naturali del medio Adriatico (Bocchetti & Regoli, 2006). I lisosomi rappresentano un organulo importante nella fisiologia di questi organismi (Moore 1988; Regoli, 1992; Lowe et al., 1995) e l'alterazione della loro stabilità di membrana è stata ampiamente dimostrata come valido biomarker, sia in esperimenti di laboratorio che in studi di campo (Petrovic et al., 2004; Regoli et al., 2004; Moore et al., 2006). In questo lavoro, la ridotta funzionalità delle membrane lisosomiali osservata durante le prime 3 campagne di traslocazione nella stazione della mitilicoltura (TE039A), cioè quella meno prossima al terminale, potrebbe essere dovuto sia all'elevata ed anomala temperatura delle acque (dati di ARPA Veneto disponibili online presso: <http://www.arpa.veneto.it/arpavinforma/bollettini/acqua-1/acque-marinocostiere>), che alla presenza di un carico organico elevato dovuto all'impianto di mitilicoltura. Il mantenimento di alte temperature per un tempo prolungato in concomitanza con il maggior carico di nutrienti, potrebbe aver ragionevolmente provocato un aumento della pressione proossidante e quindi l'insorgenza di deboli condizioni di stress ossidativo negli organismi di questo sito con conseguente alterazione della stabilità delle membrane lisosomiali.

Nonostante la diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali, nessuna alterazione significativa è stata osservata per i parametri di genotossicità, sia in termini di frammentazione del DNA che in termini di frequenza dei micronuclei, sottolineando un disturbo ossidativo di tipo lieve. A tal riguardo, seppur con alcune differenze i valori di DNA nella coda risultano compresi tra il 30 e 48%, percentuali comparabili con quelle delle normali variazioni stagionali (Pisanelli et al., 2009).

Negli organismi aerobi la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) è la naturale conseguenza di fondamentali reazioni cellulari come la fosforilazione ossidativa dell'adenosina difosfato (ADP), le catene di trasporto elettronico mitocondriali e microsomiali, le attività di diversi sistemi enzimatici, come l'azione delle ossidasi (Winston et al., 1998; Regoli et al., 2011). Anche i contaminanti ambientali possono incrementare la produzione intracellulare di ROS mediante diversi meccanismi tra cui le reazioni di Fenton ed Haber-Weiss, l'attività del citocromo P450 ed il ciclo redox per citarne alcuni. Per contrastare la produzione basale delle forze pro-ossidanti, le cellule hanno evoluto un complesso sistema antiossidante composto da scavenger a basso peso molecolare (vitamina E, β -carotene, acido ascorbico, acido urico e glutatione) e specifici sistemi enzimatici. La produzione basale delle specie reattive dell'ossigeno non necessariamente ha come conseguenza la tossicità cellulare, ma lo stress ossidativo si verifica quando la maggior produzione intracellulare di ROS non è più controbilanciata dalle difese antiossidanti.

Tra i principali meccanismi antiossidanti di tipo enzimatico la catalasi (CAT) è un enzima chiave poiché è responsabile della degradazione del perossido d'idrogeno (H_2O_2), il principale precursore del radicale idrossilico ($\cdot OH$). La catalasi è caratterizzata da una sensibilità di risposta a numerose forme di disturbo ambientale quali l'esposizione a contaminanti o fattori ambientali (Livingstone, 2001). L'attività di questo enzima analizzata nei mitili trapiantati nei due siti dell'alto Adriatico e in quello di controllo è risultata più elevata durante la quarta campagna, con valori circa doppi rispetto a quelli misurati durante la prima campagna (43 ± 2 vs 11 ± 2.5 $\mu mol/min/mg$ prot.). Questi valori sono tuttavia comparabili a quelli già misurati in popolazioni naturali (Bocchetti & Regoli 2006), e riflettono una normale fluttuazione stagionale legata ad esempio a variazioni della temperatura dell'acqua ed al ciclo riproduttivo dei mitili che hanno un principale evento di spawning in Autunno (ottobre) ed una seconda emissione dei gameti nel periodo di dicembre (Regoli & Orlando, 1994; Pampanin et al., 2005); un aumento dell'attività di questo enzima può essere inoltre causato dalle variazioni nella disponibilità dei nutrienti in seguito a bloom fitoplanctonici associati per lo più a diatomee (Totti et al., 2002). Differenze significative tra i siti sono state osservate durante la terza campagna di traslocazione (ottobre), con valori più bassi negli organismi traslocati in prossimità della mitilicoltura, in concomitanza con la diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali.

La presenza di uno stato ossidativo perturbato durante la terza campagna di traslocazione è evidente anche per quanto riguarda la variazione dell'attività delle glutatione S-transferasi (GST). E' stato ampiamente dimostrato che l'induzione delle GST è legata all'esposizione ad alcuni contaminanti organici (Eggens et al., 1995; Goksøyr, 1995; Beyer et al., 1996; Peters et al., 1997; Grinwis et al., 2000; Schlezinger & Stegeman, 2000; Stephensen et al., 2000), ma anche a condizioni proossidanti, alla maggiore disponibilità di cibo in seguito a bloom fitoplanctonici (Regoli, 1998). Questo enzima è presente in diverse isoforme, alcune con funzione antiossidante ed altre che catalizzano le reazioni di coniugazione del GSH a metaboliti e composti di varia natura. In questo lavoro, la contemporanea induzione nel terzo periodo delle GST e l'aumento nell'attività dell'acil CoA ossidasi, indicatore di proliferazione perossisomiale, conferma una debole pressione ossidativa negli organismi traslocati nell'alto Adriatico. Un'altra famiglia di enzimi che utilizzano il GSH come cofattore è rappresentata dalle glutatione perossidasi GPX Se-dipendenti e Se-indipendenti che mostrano un aumento, seppur non significativo, in tutti gli organismi durante la traslocazione nel mese di ottobre, con valori medi che rientrano comunque nelle normali fluttuazioni stagionali (Bocchetti & Regoli, 2006).

I mitili traslocati in entrambi i siti dell'area dell'alto Adriatico hanno evidenziato livelli di glutatione totale più elevati rispetto a quelli di controllo negli ultimi due periodi di traslocazione con valori che oscillano tra 1.20-1.90 e 1.60-1.80 $\mu\text{mol/g}$ tessuto. L'aumento dei livelli di glutatione totale può supportare l'ipotesi di un aumento generalizzato della pressione ossidativa in questi siti, non legata tuttavia alle attività del terminale. La glutatione reduttasi (GR) non ha mostrato alcuna variazione nei mitili traslocati nei diversi siti e nei diversi periodi.

A causa della complessità delle interazioni tra fattori pro-ossidanti, le risposte delle singole difese antiossidanti non forniscono indicazioni integrate sulla variata suscettibilità a condizioni di stress ossidativo negli organismi. Al fine di comprendere in maniera più completa l'effettiva capacità dei mitili traslocati di contrastare l'insorgenza di un disturbo proossidante, è stata analizzata la capacità antiossidante totale verso i radicali perossilici ed idrossilici. L'efficienza nel neutralizzare queste diverse forme di specie reattive dell'ossigeno non ha mostrato variazioni significative nei diversi siti e periodi di trapianto, con valori rispettivamente di 300-400 UTosc/mg prot, paragonabili a quelli osservati in popolazioni naturali dell'Adriatico centrale (Bocchetti & Regoli, 2006). La mancanza di un danno di tipo ossidativo è inoltre confermata anche dall'analisi della malondialdeide, principale prodotto di perossidazione lipidica che non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa tra siti e periodi di traslocazione.

L'analisi complessiva di tutti i risultati dei biomarkers elaborati dal modello di analisi di rischio Sediqualsoft (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012), ha evidenziato che l'entità delle variazioni è

risultata elevata nei mitili traslocati nei due siti dell'alto Adriatico durante le ultime due campagne di traslocazione. Tali alterazioni non sono comunque imputabili all'esercizio del terminale poiché i mitili traslocati presso questa struttura hanno mostrato risposte biologiche sostanzialmente sovrapponibili a quelle degli organismi trapiantati nel sito della mitilicoltura, non influenzato dalle attività del terminale: nel confronto tra questi organismi, il livello delle differenze complessivamente ottenute dai biomarkers è stato assegnato alla classe lieve.

10.4. Conclusioni

In conclusione, questo studio ha confermato l'importanza dell'applicazione di un protocollo ecotossicologico che permetta di monitorare e valutare il potenziale impatto ambientale e rischio ecologico associato all'attività di impianti di rigassificazione offshore e l'efficacia delle tecniche di trapianto durante tali studi.

I risultati ottenuti hanno evidenziato alcuni effetti ossidativi negli organismi traslocati nei siti dell'alto Adriatico durante la terza e quarta campagna. Le principali variazioni hanno riguardato l'aumento delle metallothioneine, dell'attività dell'acil CoA ossidasi e della acetilcolinesterasi, nonché la variazione di alcune difese antiossidanti e la diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali. Tuttavia, questo lieve disturbo di tipo ossidativo non è legato alle attività di esercizio del terminale quanto piuttosto a caratteristiche ambientali dell'alto Adriatico tra cui, ad esempio, gli elevati valori di temperatura che si sono registrati in quest'area durante lo studio.

Le variazioni osservate non hanno inoltre determinato l'alterazione di parametri biologicamente rilevanti come la diminuzione della capacità antiossidante totale, la comparsa di fenomeni di genotossicità o di perossidazione lipidica, permettendo così di escludere la compromissione di un buono stato di salute degli organismi trapiantati.

L'elaborazione complessiva dei risultati tramite un modello di analisi di rischio ha sostanzialmente escluso effetti biologicamente rilevanti nei biomarkers dei mitili trapiantati in prossimità del terminale ed imputabili alle attività di esercizio.

APPENDICE BIOMARKERS

AREA TERMINALE

CAMPAGNE:

SETTEMBRE 2011

OTTOBRE 2011

NOVEMBRE 2011

DICEMBRE 2011

Fase di esercizio provvisorio

I anno di monitoraggio

<i>Mytilus galloprovincialis</i> – I anno esercizio terminale – I campagna settembre 2011			
	TE039A	TE040T	TE041M
<u>Esposizione a metalli in traccia</u>			
Metallotioneine Eq. (GSH) nmol/mg prot	2,32 ± 0,314	2,19 ± 0,269	2,49 ± 0,425
<u>Prolif. perossisomiale (esposizione a proliferatori perossisomiali)</u>			
Att. enzimatica AcilCoA ossidasi (AOX) nmol/min/mg prt	0,338 ± 0,027	0,168 ± 0,036	0,196 ± 0,043
<u>Esposizione a organofosforici, carbammati ed altri inquinanti</u>			
Att. enzimatica della acetilcolinesterasi (AChE) nmol/min/mg prt	71,1 ± 13,9	73,0 ± 20,5	55,3 ± 4,62
<u>Danni al sistema lisosomiale</u>			
Stabilità lisosomiale minuti	35,3 ± 11,5	52,1 ± 5,30	47,7 ± 0,521
<u>Danni DNA</u>			
Integrità strutturale DNA (Comet Assay) % DNA nella coda	47,6 ± 5,60	46,1 ± 4,49	44,1 ± 1,96
Micronuclei negli emociti Frequenza di MN ogni 1000 cellule	1,21 ± 0,325	0,400 ± 0,245	0,799 ± 0,399

<i>Mytilus galloprovincialis</i> – I anno esercizio terminale – I campagna settembre 2011			
	TE039A	TE040T	TE041M
<u>Parametri stress ossidativo</u>			
Att. enzimatica della catalasi µmol/min/mg prt	16,4 ± 4,73	12,0 ± 2,62	10,9 ± 4,75
Att. enzimatica delle Glutazione S-transferasi (GST) nmol/min/mg prt	76,8 ± 19,8	68,4 ± 24,3	76,9 ± 23,3
Att. enzimatica delle Glutazione Reduttasi (GR) nmol/min/mg prt	14,5 ± 3,41	12,2 ± 3,03	11,4 ± 1,71
Att. enzimatica delle Glutazione perossidasi (GPx) nmol/min/mg prt	7,75 ± 2,69	6,08 ± 1,93	6,68 ± 0,990
Livelli di Glutazione totale µmol/g tess	1,06 ± 0,178	1,18 ± 0,077	1,36 ± 0,030
Capacità antiossidante totale (TOSC ROO·) U TOSC/mg prt	251 ± 12,7	280 ± 42,1	288 ± 50,7
Capacità antiossidante totale (TOSC HO·) U TOSC/mg prt	357 ± 60,3	430 ± 116	388 ± 49,5
<u>Perossidazione lipidica</u>			
Livelli di malondialdeide nmol/g tess	39,7 ± 10,6	41,8 ± 19,1	31,3 ± 9,19

<i>Mytilus galloprovincialis</i> – I anno esercizio terminale – II campagna ottobre 2011			
	TE039A	TE040T	TE041M
<u>Esposizione a metalli in traccia</u>			
Metallotioneine Eq. (GSH) nmol/mg prot	2,28 ± 0,444	2,44 ± 0,789	1,97 ± 0,260
<u>Prolif. perossisomiale (esposizione a proliferatori perossisomiali)</u>			
Att. enzimatica AcilCoA ossidasi (AOX) nmol/min/mg prt	0,850 ± 0,239	1,15 ± 0,136	0,588 ± 0,078
<u>Esposizione a organofosforici, carbammati ed altri inquinanti</u>			
Att. enzimatica della acetilcolinesterasi (AChE) nmol/min/mg prt	75,2 ± 27,4	64,7 ± 25,6	46,1 ± 6,55
<u>Danni al sistema lisosomiale</u>			
Stabilità lisosomiale minuti	32,6 ± 2,38	52,4 ± 5,28	47,2 ± 2,68
<u>Danni DNA</u>			
Integrità strutturale DNA (Comet Assay) % DNA nella coda	32,4 ± 6,68	36,0 ± 3,24	38,1 ± 6,73
Micronuclei negli emociti Frequenza di MN ogni 1000 cellule	0,499 ± 0,223	0,897 ± 0,366	0,491 ± 0,253

<i>Mytilus galloprovincialis</i> – I anno esercizio terminale – II campagna ottobre 2011			
	TE039A	TE040T	TE041M
Parametri stress ossidativo			
Att. enzimatica della catalasi µmol/min/mg prt	20,3 ± 4,98	21,8 ± 5,42	21,8 ± 1,32
Att. enzimatica delle Glutazione S-transferasi (GST) nmol/min/mg prt	69,3 ± 16,5	67,6 ± 14,1	51,1 ± 6,37
Att. enzimatica delle Glutazione Reduttasi (GR) nmol/min/mg prt	16,1 ± 5,66	20,0 ± 4,02	14,2 ± 2,45
Att. enzimatica delle Glutazione perossidasi (GPx) nmol/min/mg prt	7,27 ± 2,37	7,08 ± 2,32	6,50 ± 1,09
Livelli di Glutazione totale µmol/g tess	1,71 ± 0,271	1,52 ± 0,063	1,54 ± 0,096
Capacità antiossidante totale (TOSC ROO·) U TOSC/mg prt	391 ± 107	266 ± 38,8	319 ± 95,7
Capacità antiossidante totale (TOSC HO·) U TOSC/mg prt	413 ± 51,7	432 ± 70,2	409 ± 73,0
Perossidazione lipidica			
Livelli di malondialdeide nmol/g tess	43,6 ± 19,4	49,5 ± 16,1	61,7 ± 22,9

<i>Mytilus galloprovincialis</i> – I anno esercizio terminale – III campagna novembre 2011			
	TE039A	TE040T	TE041M
<u>Esposizione a metalli in traccia</u>			
Metallotioneine Eq. (GSH) nmol/mg prot	2,30 ± 0,599	2,21 ± 0,407	2,57 ± 0,586
<u>Prolif. perossisomiale (esposizione a proliferatori perossisomiali)</u>			
Att. enzimatica AcilCoA ossidasi (AOX) nmol/min/mg prt	1,17 ± 0,356	1,64 ± 0,432	0,756 ± 0,197
<u>Esposizione a organofosforici, carbammati ed altri inquinanti</u>			
Att. enzimatica della acetilcolinesterasi (AChE) nmol/min/mg prt	57,1 ± 23,0	63,1 ± 6,92	56,4 ± 18,0
<u>Danni al sistema lisosomiale</u>			
Stabilità lisosomiale minuti	41,3 ± 4,37	37,2 ± 3,90	47,9 ± 5,59
<u>Danni DNA</u>			
Integrità strutturale DNA (Comet Assay) % DNA nella coda	30,7 ± 2,18	34,1 ± 2,69	33,1 ± 6,11
Micronuclei negli emociti Frequenza di MN ogni 1000 cellule	0,580 ± 0,296	0,295 ± 0,121	0,100 ± 0,100

<i>Mytilus galloprovincialis</i> – I anno esercizio terminale – III campagna novembre 2011			
	TE039A	TE040T	TE041M
Parametri stress ossidativo			
Att. enzimatica della catalasi µmol/min/mg prt	15,2 ± 2,13	28,3 ± 4,44	28,3 ± 9,84
Att. enzimatica delle Glutazione S-transferasi (GST) nmol/min/mg prt	279 ± 39,5	279 ± 63,7	165 ± 17,4
Att. enzimatica delle Glutazione Reduttasi (GR) nmol/min/mg prt	25,7 ± 8,06	30,3 ± 4,55	24,4 ± 10,5
Att. enzimatica delle Glutazione perossidasi (GPx) nmol/min/mg prt	18,4 ± 4,89	17,9 ± 1,11	16,9 ± 1,57
Livelli di Glutazione totale µmol/g tess	1,67 ± 0,688	1,87 ± 0,082	1,08 ± 0,084
Capacità antiossidante totale (TOSC ROO·) U Tosc/mg prt	458 ± 65,1	327 ± 73,1	398 ± 73,2
Capacità antiossidante totale (TOSC HO·) U Tosc/mg prt	484 ± 59,6	495 ± 89,7	468 ± 38,4
Perossidazione lipidica			
Livelli di malondialdeide nmol/g tess	22,8 ± 4,47	24,5 ± 8,59	25,0 ± 0,929

<i>Mytilus galloprovincialis</i> – I anno esercizio terminale – IV campagna dicembre 2011			
	TE039A	TE040T	TE041M
<u>Esposizione a metalli in traccia</u>			
Metallotioneine Eq. (GSH) nmol/mg prot	2,97 ± 1,38	4,41 ± 1,48	1,58 ± 0,23
<u>Prolif. perossisomiale (esposizione a proliferatori perossisomiali)</u>			
Att. enzimatica AcilCoA ossidasi (AOX) nmol/min/mg prt	1,33 ± 0,37	1,61 ± 0,27	0,97 ± 0,14
<u>Esposizione a organofosforici, carbammati ed altri inquinanti</u>			
Att. enzimatica della acetilcolinesterasi (AChE) nmol/min/mg prt	105,70 ± 14,07	87,19 ± 20,75	48,20 ± 13,23
<u>Danni al sistema lisosomiale</u>			
Stabilità lisosomiale minuti	45,90 ± 9,88	46,99 ± 21,28	52,15 ± 2,69
<u>Danni DNA</u>			
Integrità strutturale DNA (Comet Assay) % DNA nella coda	36,73 ± 2,22	48,61 ± 2,38	44,53 ± 7,42
Micronuclei negli emociti Frequenza di MN ogni 1000 cellule	0,39 ± 0,10	0,09 ± 0,09	0,09 ± 0,09

<i>Mytilus galloprovincialis</i> – I anno esercizio terminale – IV campagna dicembre 2011			
	TE039A	TE040T	TE041M
Parametri stress ossidativo			
Att. enzimatica della catalasi µmol/min/mg prt	37,94 ± 7	43,09 ± 1,91	32,8 ± 5,22
Att. enzimatica delle Glutazione S-transferasi (GST) nmol/min/mg prt	199,74 ± 64,58	171,25 ± 23,93	127,14 ± 32,95
Att. enzimatica delle Glutazione Reduttasi (GR) nmol/min/mg prt	23,13 ± 6,50	29,24 ± 7,11	25,61 ± 5,40
Att. enzimatica delle Glutazione perossidasi (GPx) nmol/min/mg prt	13,06 ± 1,83	13,21 ± 2,33	11,74 ± 3,66
Livelli di Glutazione totale µmol/g tess	1,81 ± 0,21	1,76 ± 0,003	1,47 ± 0,20
Capacità antiossidante totale (TOSC ROO·) U TOSC/mg prt	323,54 ± 27,91	300,75 ± 47,48	323,81 ± 84,85
Capacità antiossidante totale (TOSC HO·) U TOSC/mg prt	370,88 ± 60,88	338,99 ± 48,80	335,87 ± 50,13
Perossidazione lipidica			
Livelli di malondialdeide nmol/g tess	19,32 ± 1,83	24,79 ± 7,79	29,40 ± 3,99