



DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL' AMBIENTE

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

*Effetti indotti dall' esposizione combinata di microplastiche e cadmio
in Danio rerio*

*Induced effects by combined exposure of microplastics and cadmium
in Danio rerio*

Tesi di Laurea di:

Colombo Lorenzo

Anno accademico 2021-22

Docente referente
Chiar.ma Prof.ssa

Carnevali Oliana

CONTESTUALIZZAZIONE

La realtà contemporanea vede un incessante aumento della quantità di fibre plastiche negli ambienti marini, causati sia da un importante aumento della produzione plastica che da uno smaltimento improprio

Sottoposte a fattori abiotici, come ad esempio raggi solari, moto ondoso ed intemperie, esse si degradano arrivando allo stato di microplastiche (da $1\mu\text{m}$ a 5mm)

La grandezza di questi granuli è allarmante perché risultano avere dimensioni affini allo zooplancton, venendo scambiati quindi per nutrimento da organismi dei livelli trofici bassi. Il trasferimento a livelli trofici superiori, si profila essere inevitabile. Il trasferimento avviene anche per ingestione diretta da parte dello zooplancton.

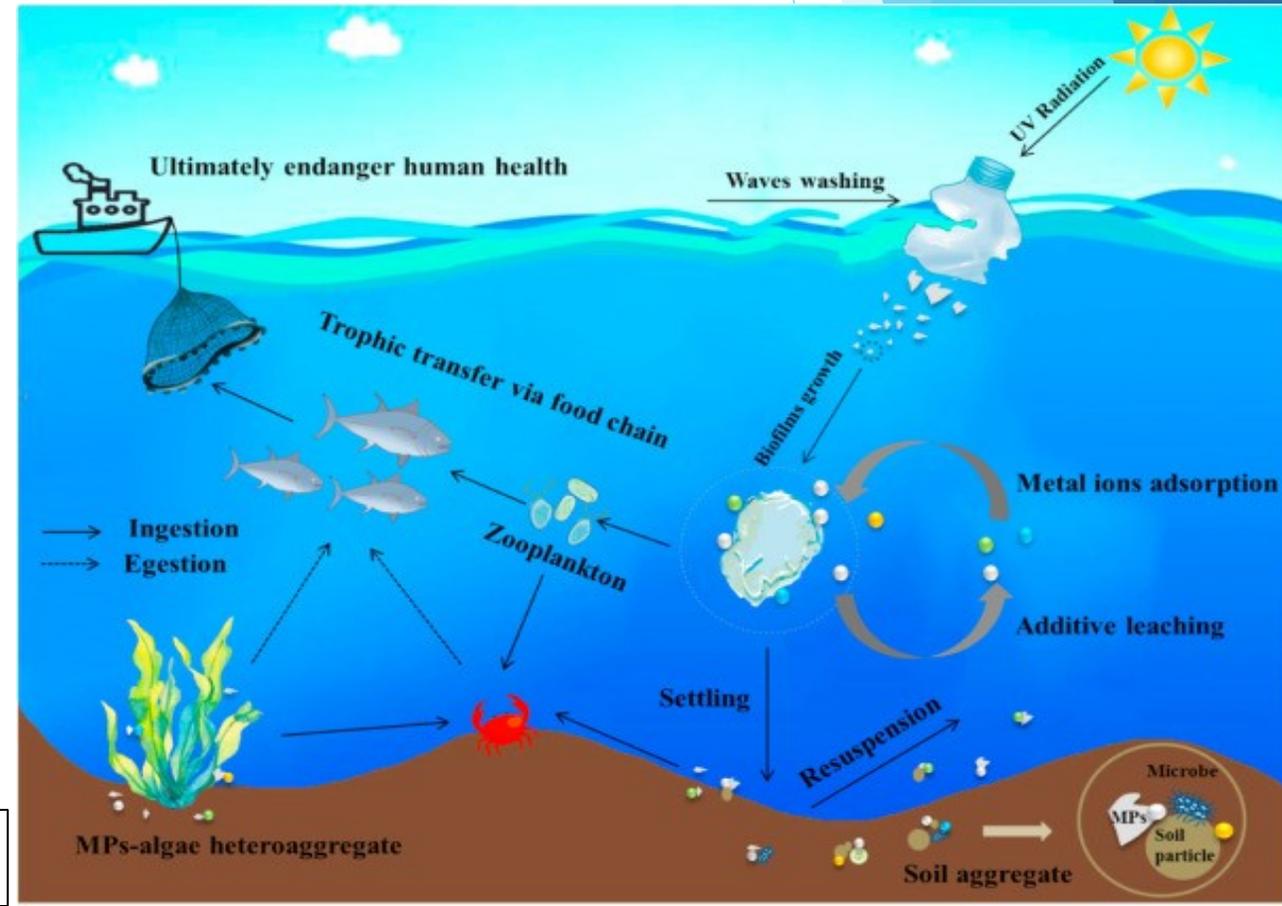


Fig.1

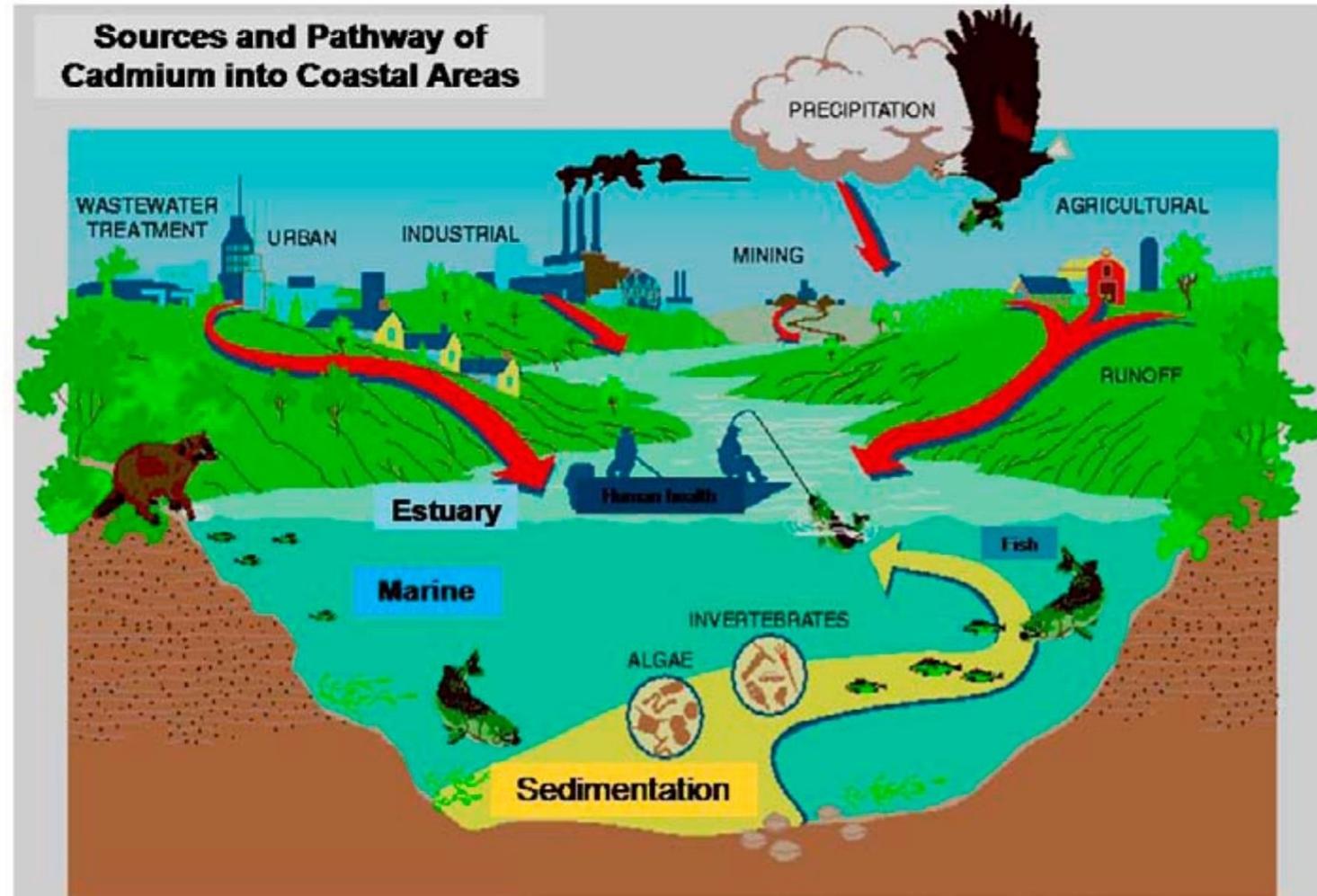
CONTESTUALIZZAZIONE

Un altro contaminante che svolge un ruolo cardine sia nell' ecotossicologia che nella fisiologia patologica degli organismi marini è rappresentato dai metalli pesanti.

Essi possono essere introdotti nell' ambiente marino attraverso attività antropiche. Dal sedimento poi ripercorrono la rete trofica contaminando tutta la biomassa.

Abbiamo quindi compreso che le microplastiche e i metalli pesanti posseggono una grande capacità di diffusione e di contaminazione, in un ambiente dinamico come quello marino

Fig 2



OBIETTIVO DELLA REVIEW

In questo lavoro, frutto dell' unione di più studi, verranno posti dei quesiti riguardo la tossicità di questi contaminanti e se la loro interazione può aumentarne il livello, creando nuovi scenari di contaminazione

-CAPACITA' DI TRASPORTO

Le microplastiche possono agire da vettori per i metalli pesanti, aumentando quindi l' accumulo di questi ultimi in Danio rerio?

Questo aspetto è molto interessante e ampiamente variabile, tuttavia sono state identificate delle condizioni e delle caratteristiche chimico-fisiche che determinano questo sodalizio negativo

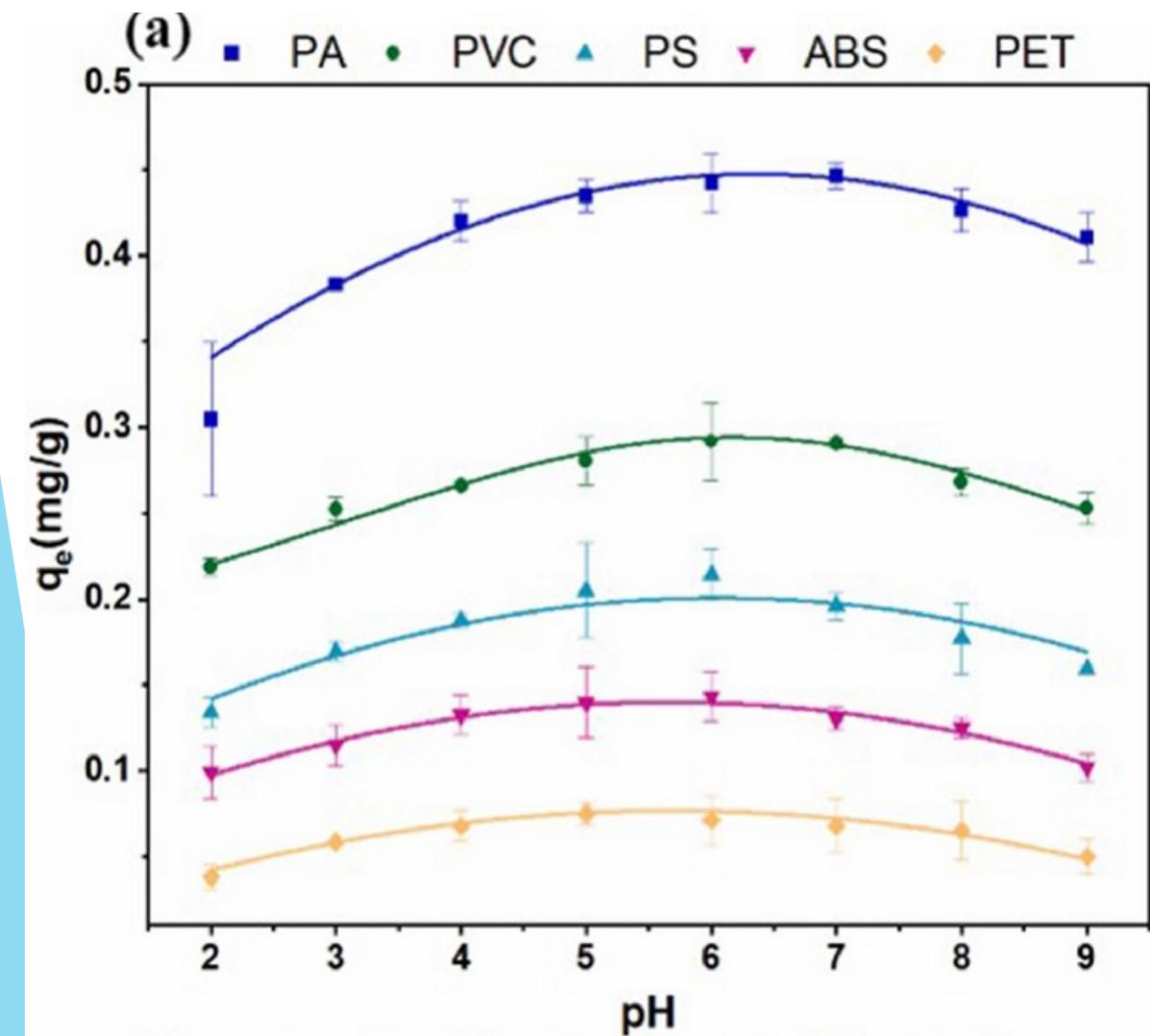
Livello di pH

Morfologia superficiale dei granuli

Interazioni elettrostatiche

RISULTATI AL PRIMO QUESITO (Fig 5 a e 6 a=microscopia elettronica a scansione Fig 5 b e 6 b=spettroscopia a dispersione x-ray)

Fig 3



Massimo assorbimento Cd a:
pH PA=7
pH PVC=6
pH PS=6
pH ABS=6
pH PET=6

I valori riportati sono tutti superiori al pH_{PZC} e con $pH > pH_{PZC}$ la carica netta risultante è negativa. Le attrazioni elettrostatiche svolgono sicuramente un ruolo importante nell'assorbimento

L'analisi dei legami formati prima e dopo l'assorbimento evidenziano sia legami polari (C-O, C=O) che legami idrofobici (sovrapposizione orbitali π - π).

Il tipo di microplastica influenza il tipo di attrazione chimica

Fig 4 a

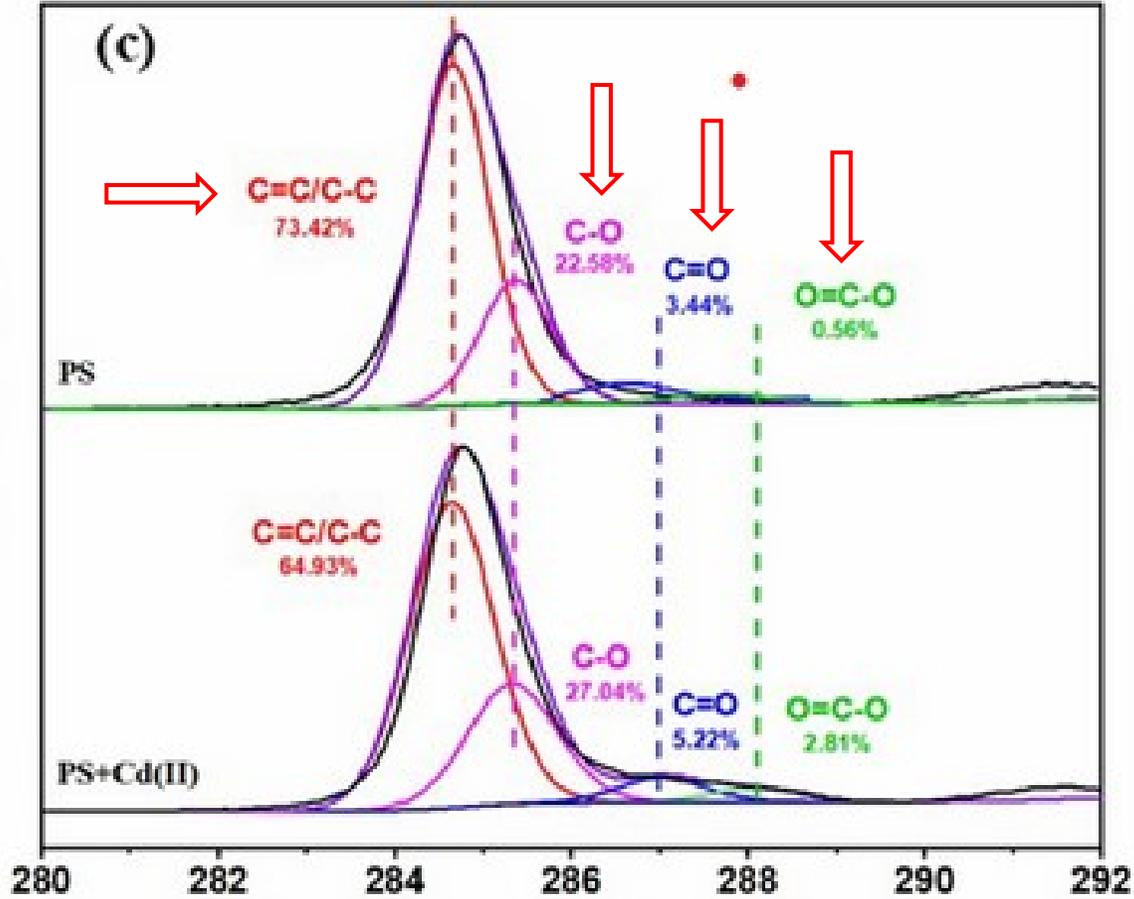
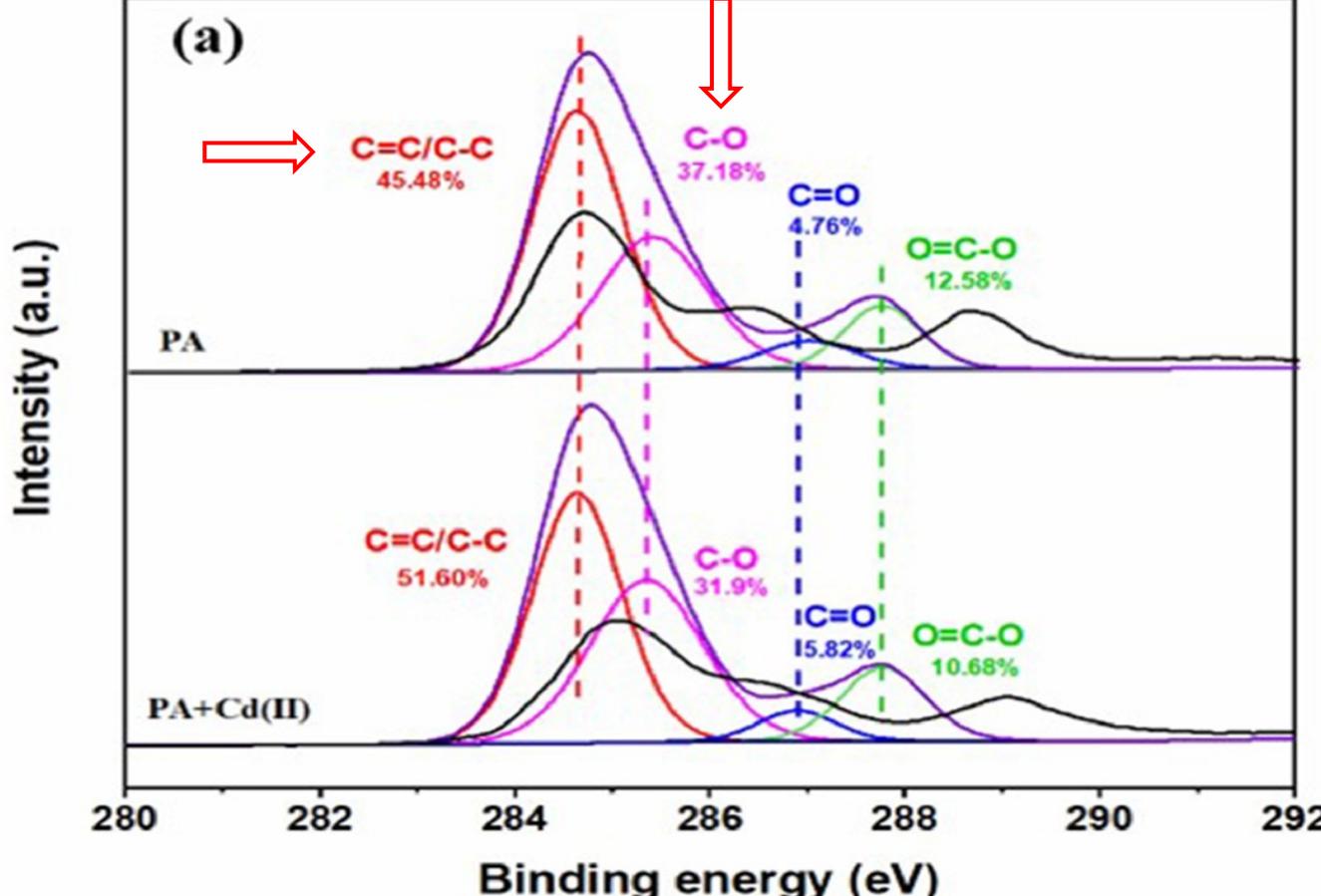


Fig 4 b

Fig 4 a e 4 b=spettroscopia fotoelettronica x-ray



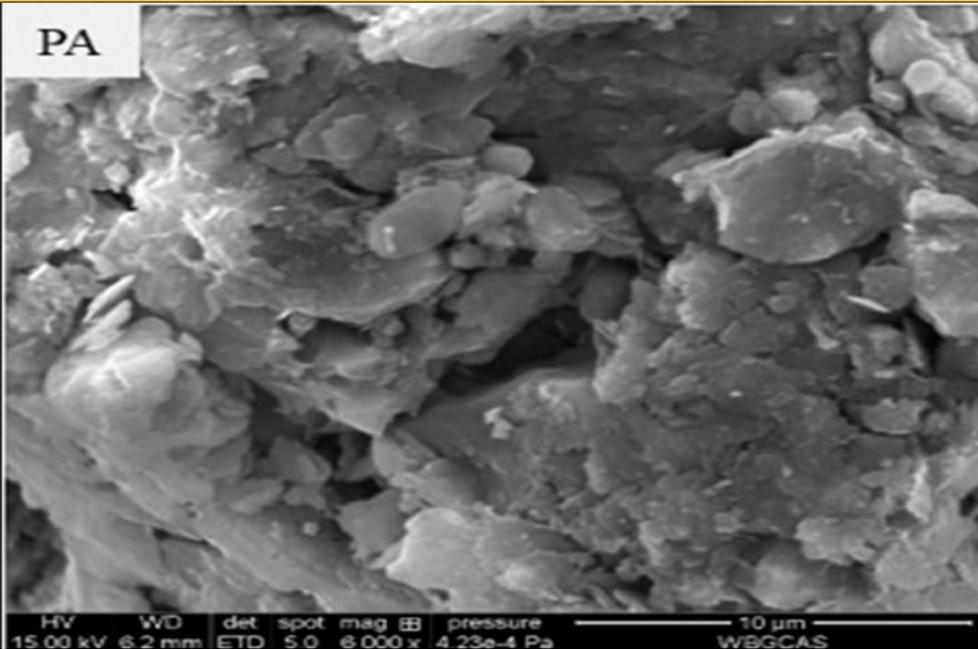


Fig 5a

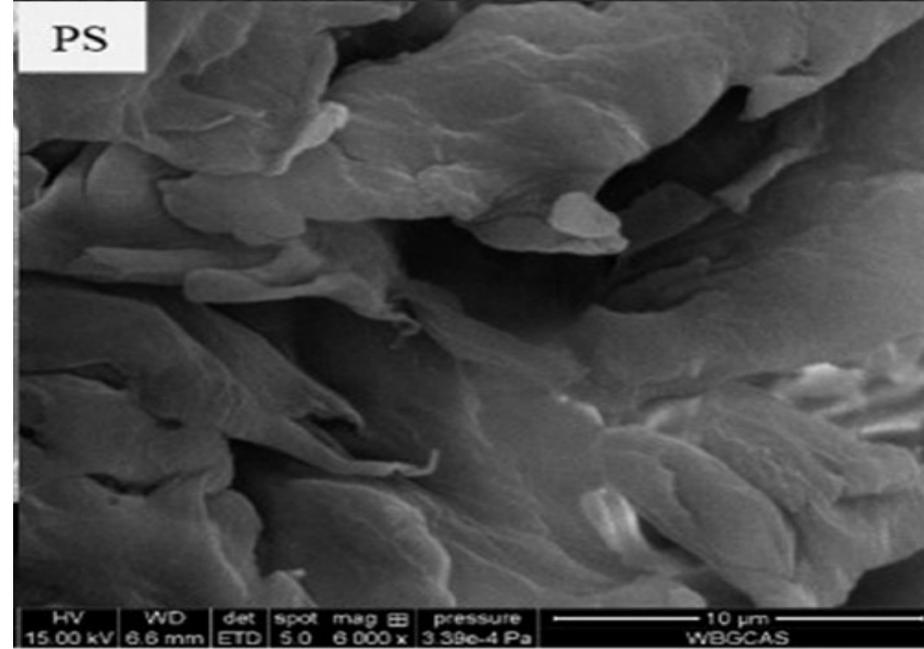


Fig 6a

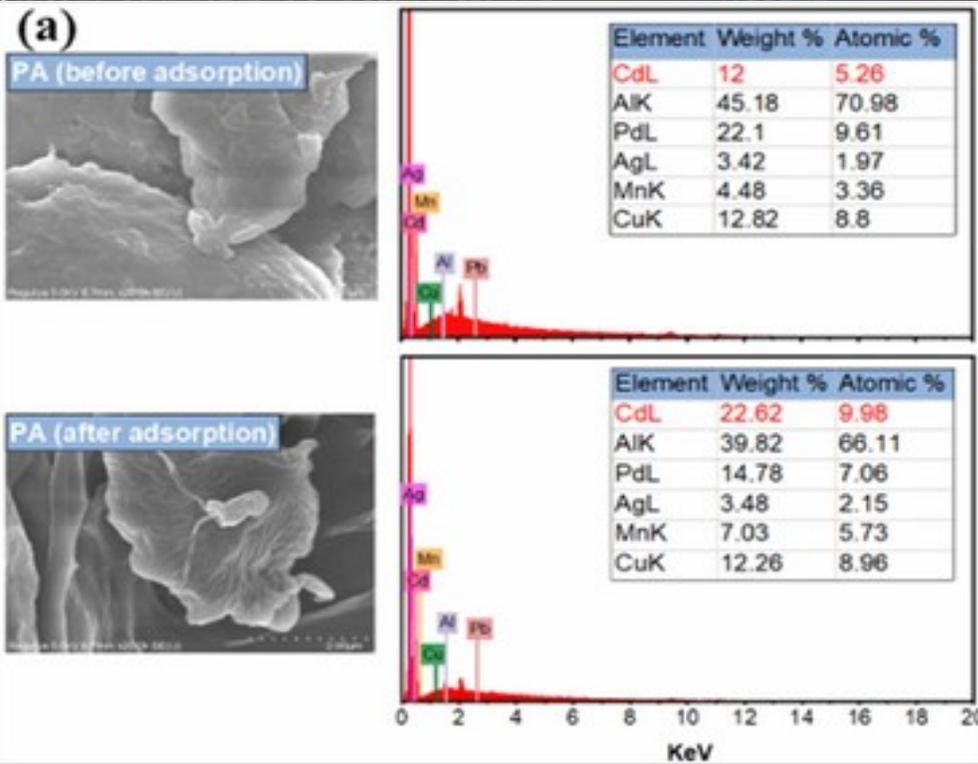


Fig 5b

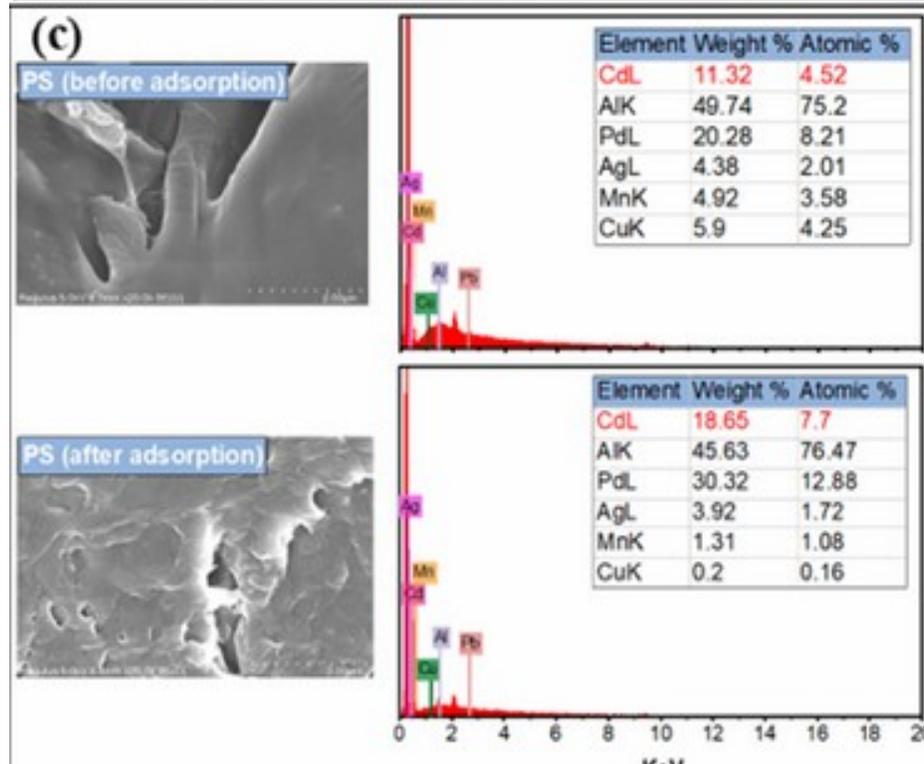


Fig 6b

A dimostrazione finale che le MPs sono in grado di assorbire Cd, qui sono state misurate le concentrazioni di Cd in tre diversi organi (fegato, stomaco e branchie) dopo un'esposizione di 3 settimane a determinate concentrazioni di Cd e PS

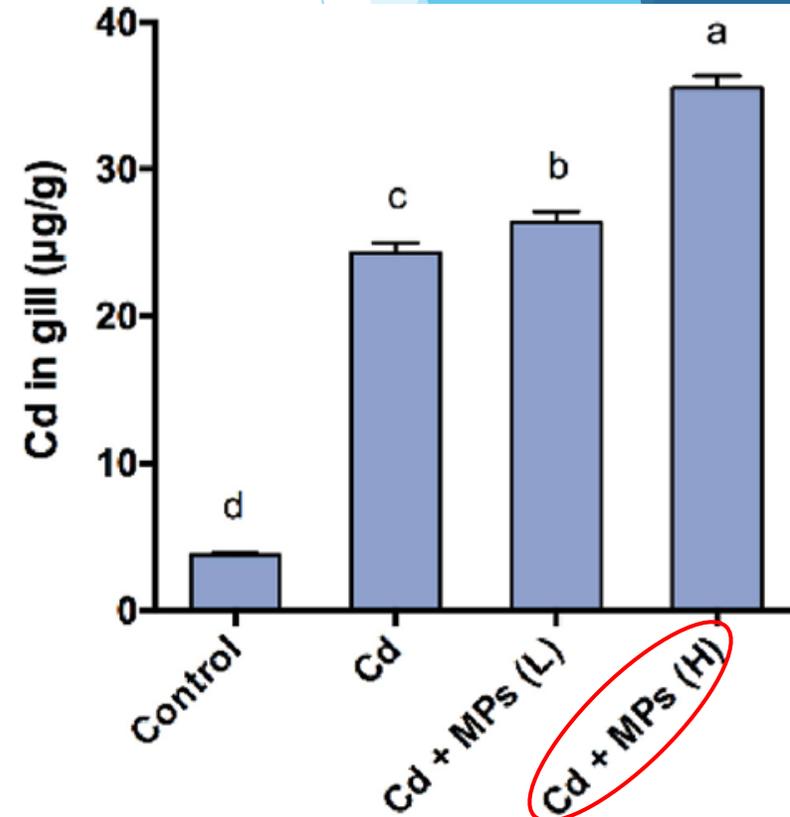
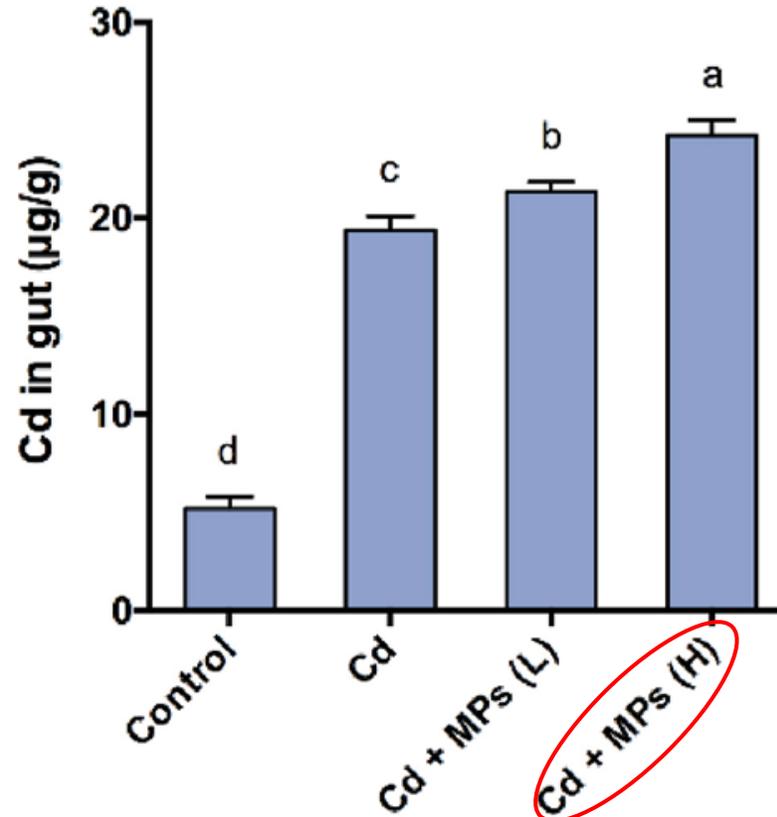
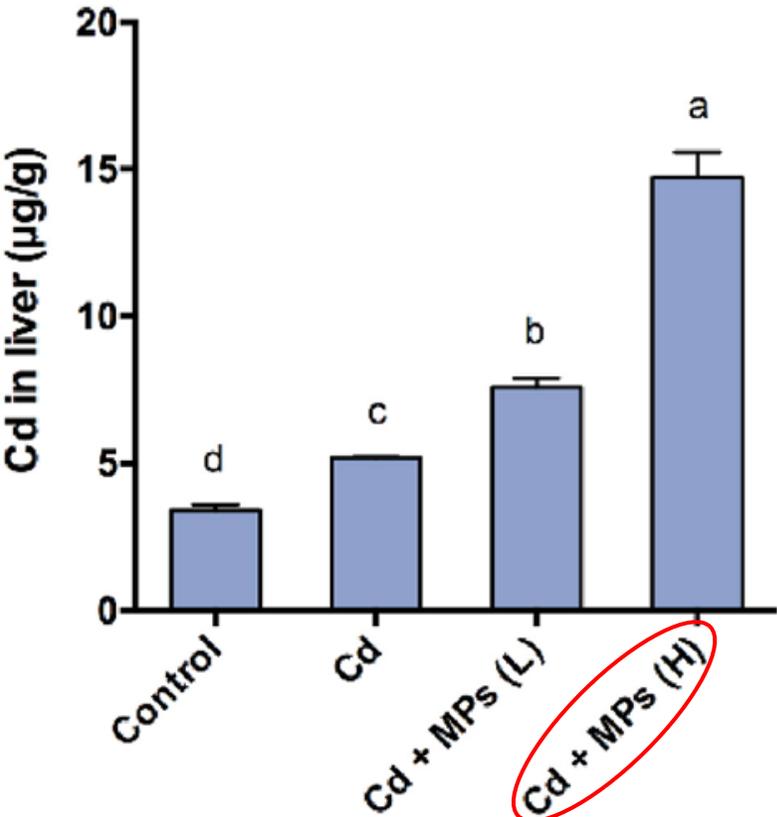
[Cd]=10 µg/L

[Cd + MPs (L)]= 10 µg/L Cd + 20 µg/L MPs

[Cd + MPs (H)]=10 µg/L Cd + 200 µg/L MPs

La concentrazione di Cadmio aumenta significativamente in tutti e tre gli organi a causa dell'aumento delle MPs. La minore penetrazione nel fegato è probabilmente dovuta a un fattore dimensionale delle MPs, che risulta facilitata con particelle minori di 5 µm, a differenza di branchie e stomaco, organi coinvolti direttamente nel transito del materiale ingerito

Fig 7



-TOSSICITÀ E IMPATTO NELLO SVILUPPO

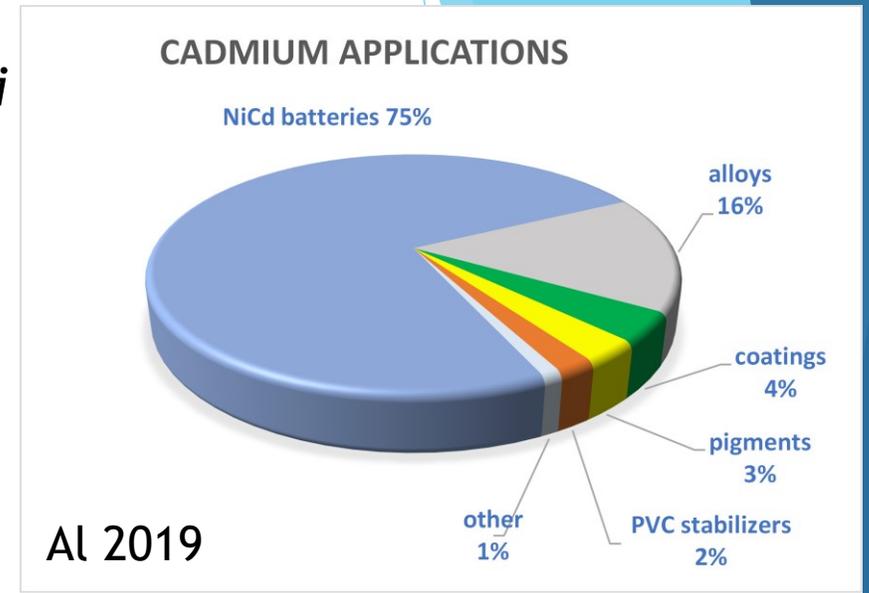
La presenza delle microplastiche può aumentare la gravità dei danni causati dai metalli pesanti?

Il metallo pesante preso in considerazione è il cadmio, risultato ubiquitario in molti ambienti acquatici

Le microplastiche prese in considerazione sono il PS(polistirene) e il PET(polietilene), anch'esse due tra le plastiche più usate al mondo e di conseguenza maggiormente disperse in ambiente marino

I tipici effetti tossici causati dall'esposizione singola di microplastiche o cadmio sono: aumento stress ossidativo e produzione di ROS, diminuzione in peso e livello di crescita, induzione dell'apoptosi e malformazione di strutture anatomiche

Fig 8



-RISULTATI DEL SECONDO QUESITO

[MPs]=500 µg/L

[Cd]=5 µg/L

[MPs+Cd]=500 µg/L

MPs + 5 µg/L Cd

Fig 9=qRT-PCR

Fig 10=lettura assorbanza a 532nm del complesso malondialdeide-acido tiobarbiturico

Fig 9

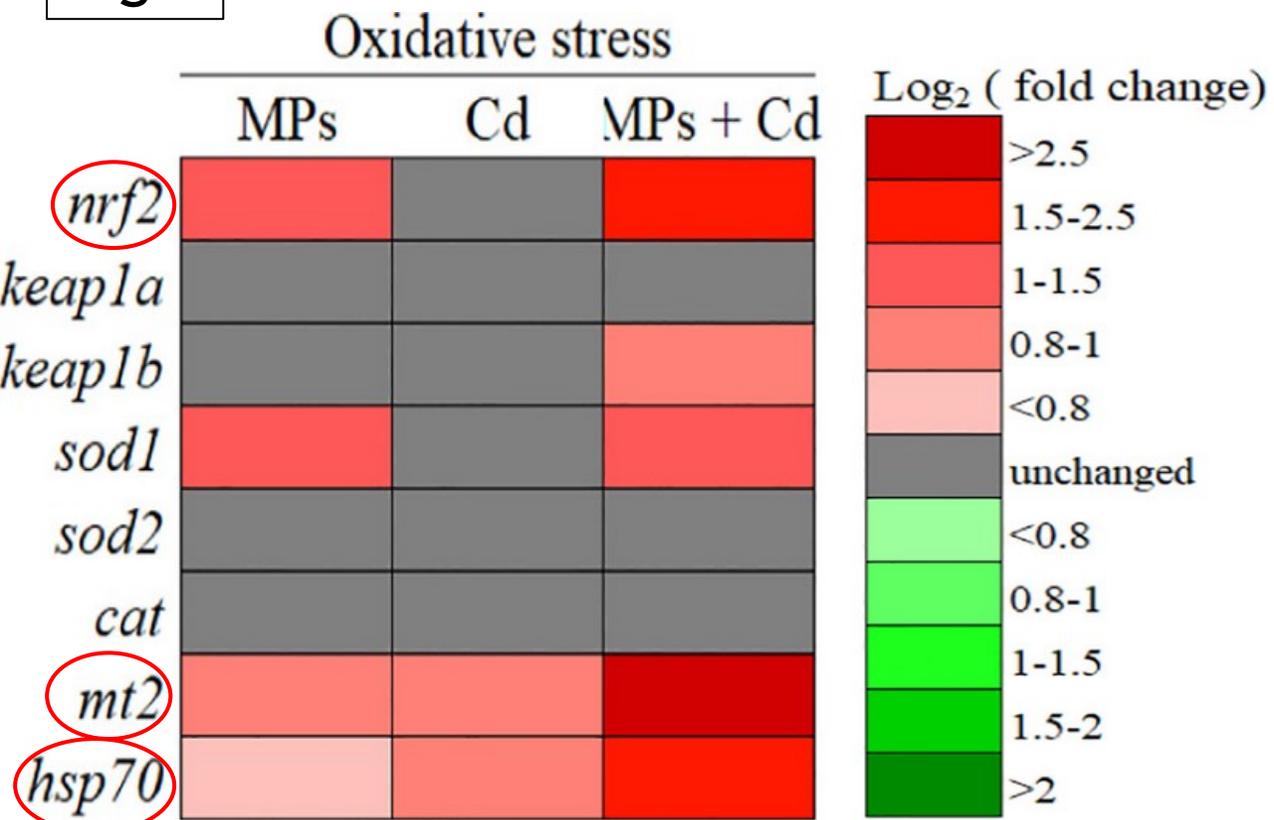


Fig 10

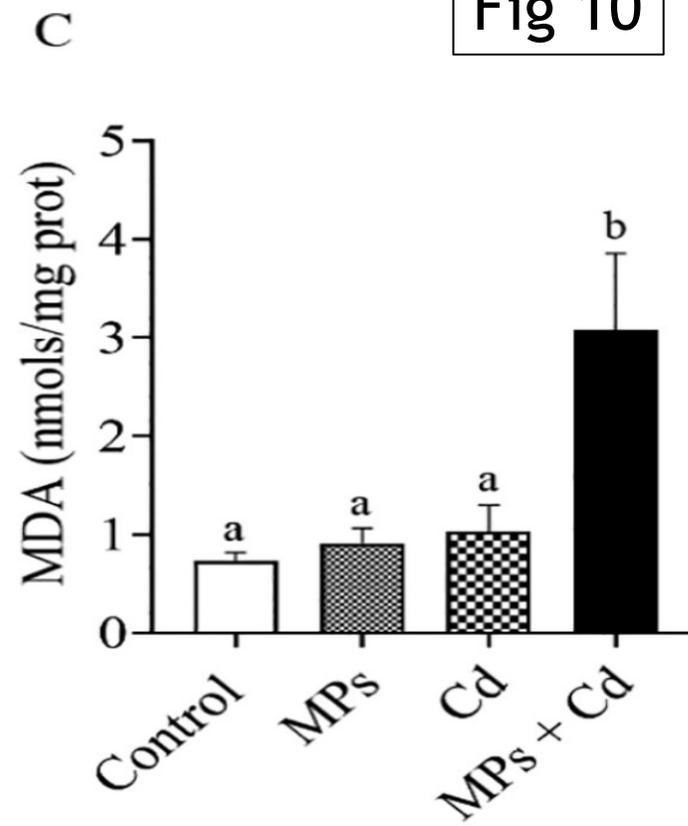


Fig 12= rilevazione attraverso utilizzo di substrati specifici Caspase-3 (Ac-DEVD-pNA), Caspase-8 (Ac-IETD-pNA) e Caspase-9 (Ac-LEHD-pNA) e rilascio del cromoforo nitroanilina (pNA).

Rilevazione per fluorescenza, utilizzo di DAPI per i nuclei cellulari sani (blu) e GFP per i nick di DNA apoptotici (tecnica TUNEL) e GFP per i nick di DNA apoptotici (tecnica TUNEL)

es=esofago; vb=porzione vertebrale

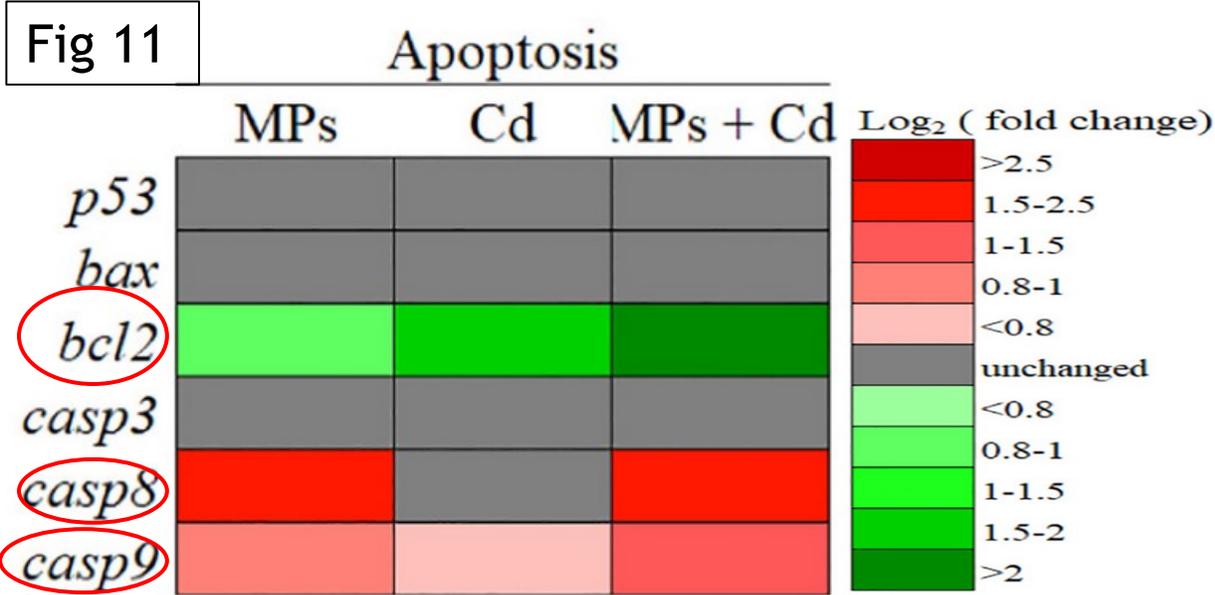


Fig 13

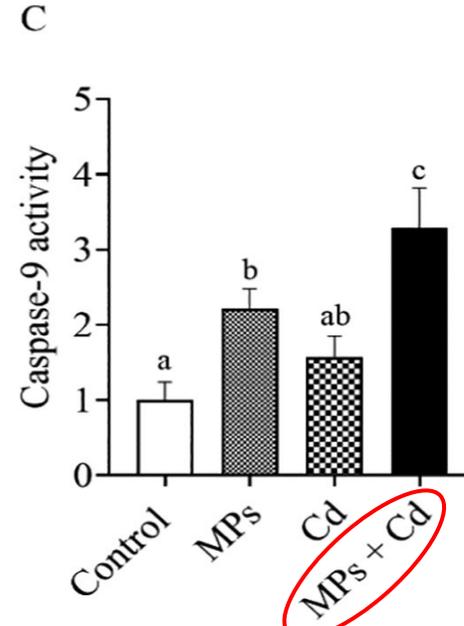
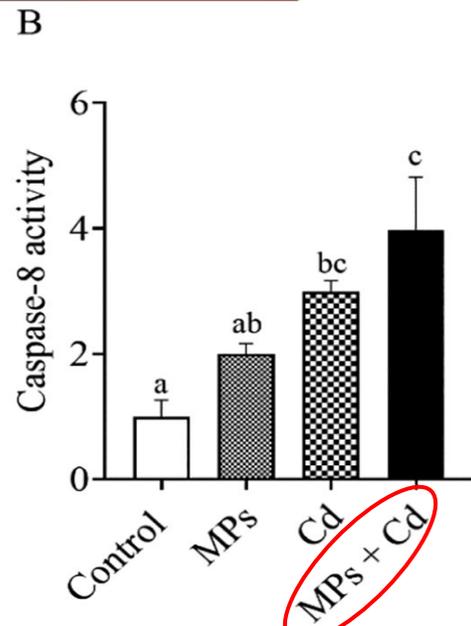
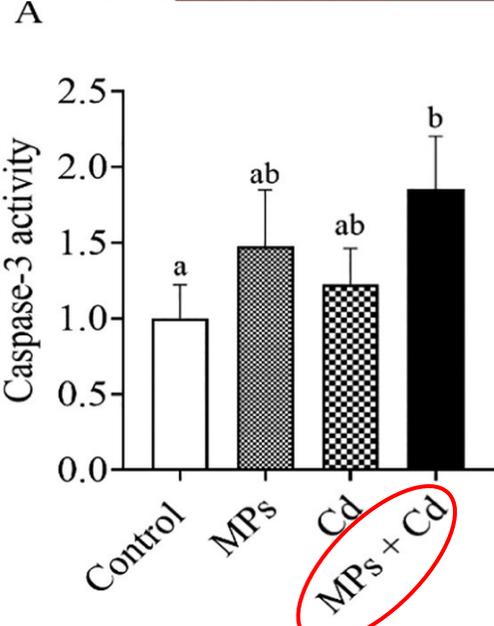
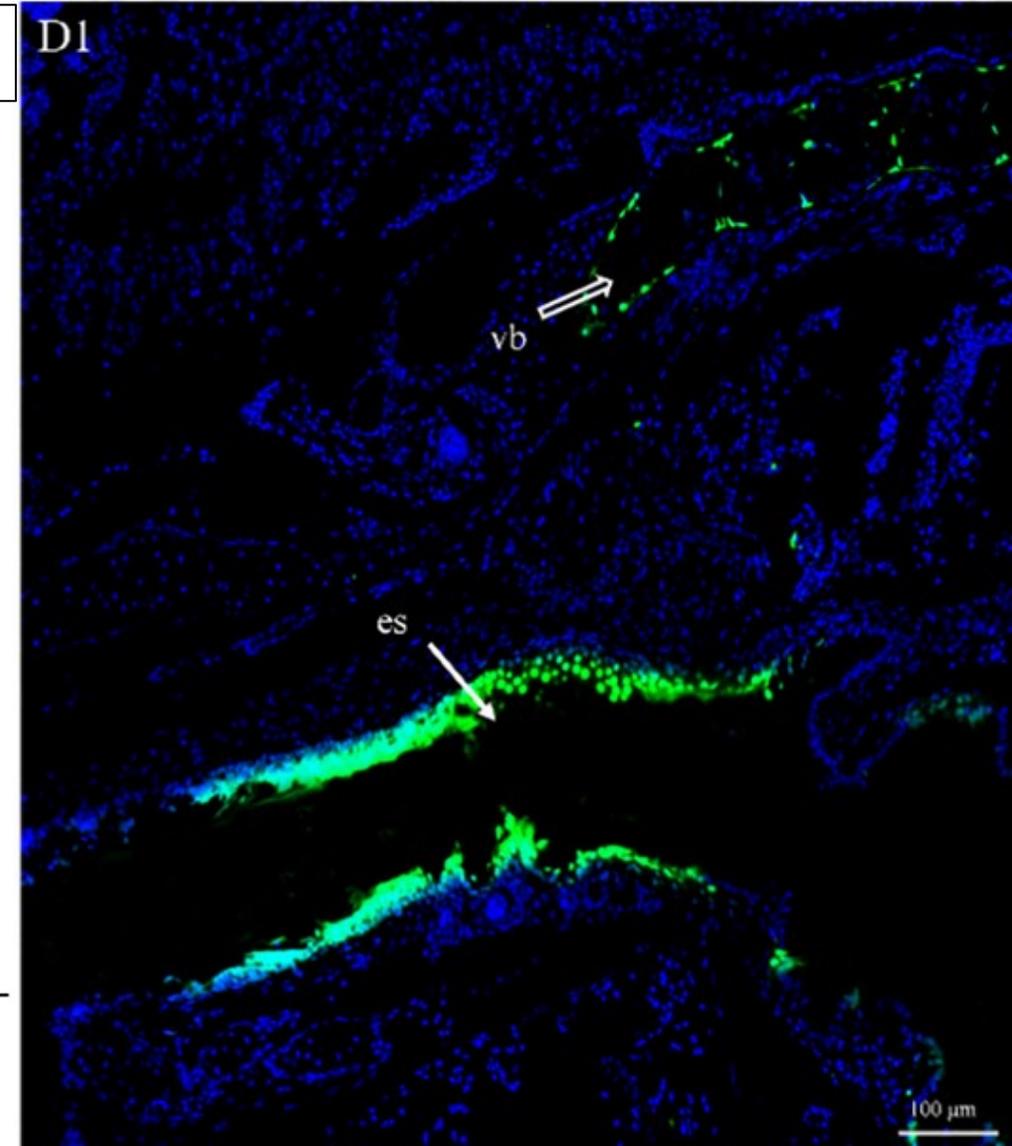


Fig 12

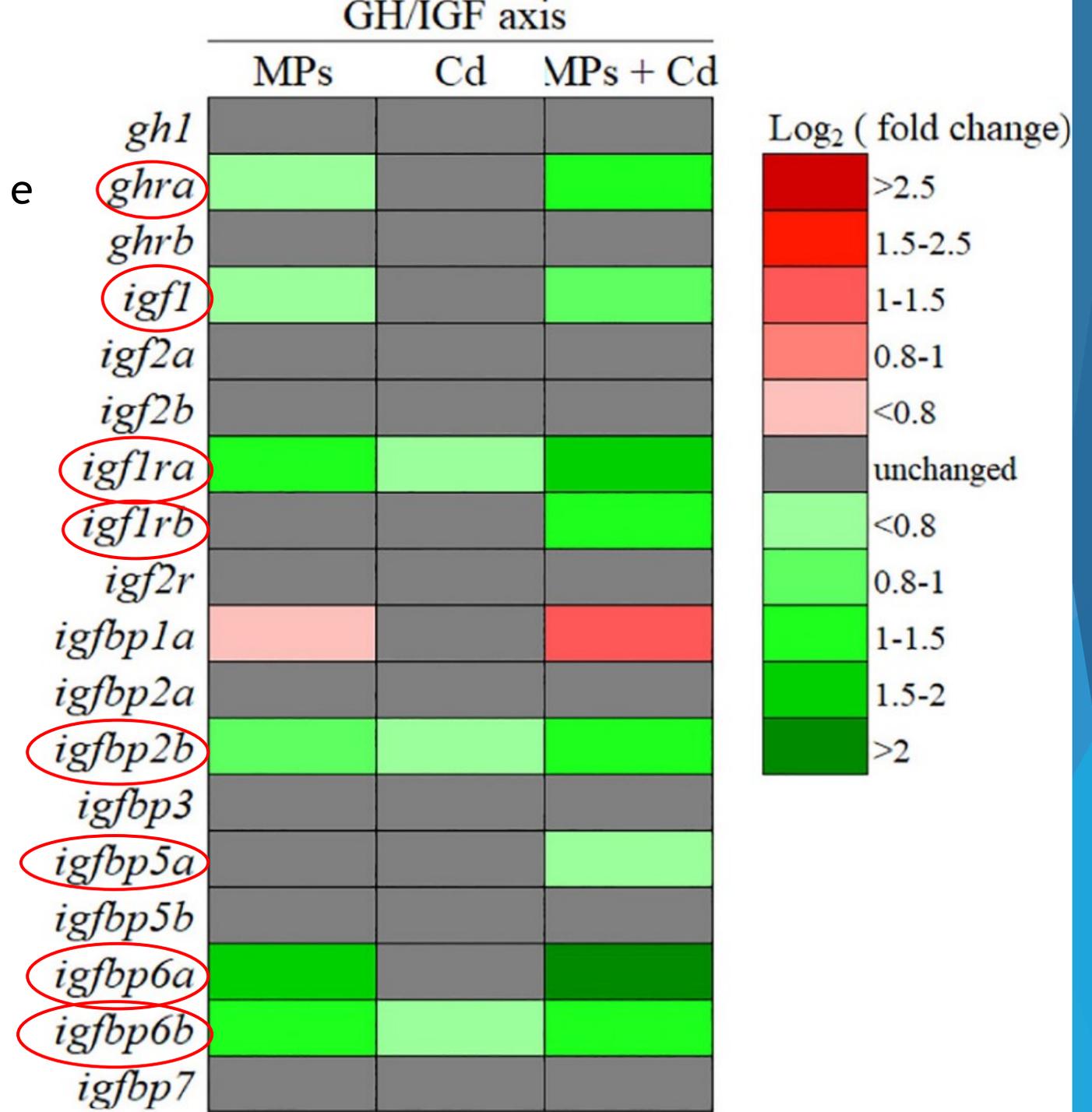


La crescita in peso e grandezza è fisiologicamente regolata da ormoni, in particolare dal GH(ormone della crescita) e dall' IGF(ormone della crescita simile all' insulina)

I loro bersagli si trovano nel fegato e sono GHR e IGHR. Le IGFBP coadiuvano l' effetto di IGH aumentandone l' emivita e promuovendone il trasporto

Tutti questi fattori agiscono direttamente e regolano la crescita in grandezza e peso.

Fig 14



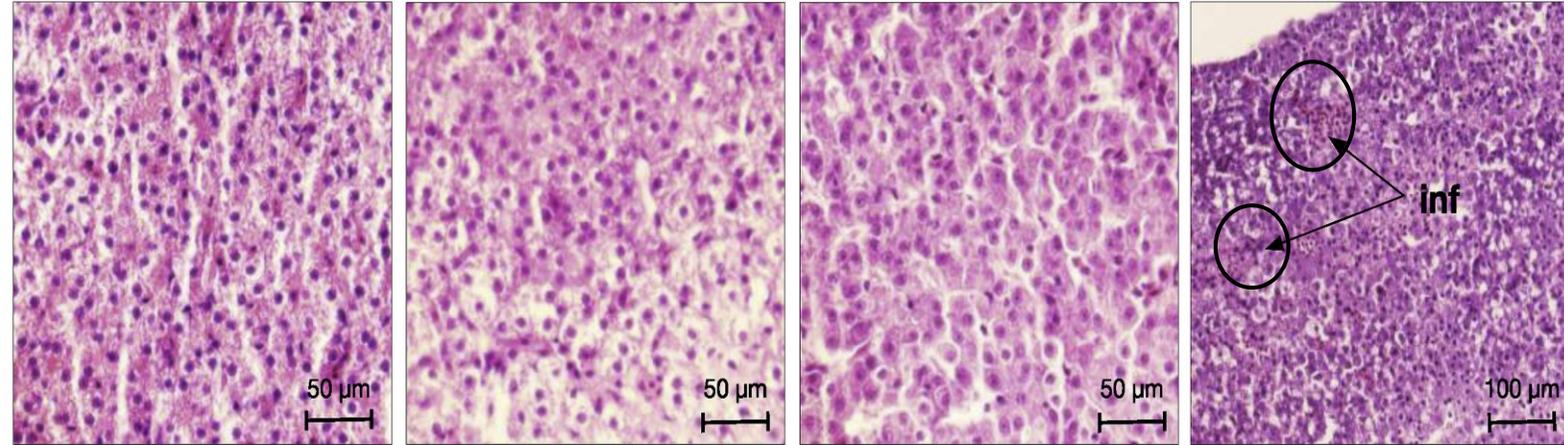
Sezioni istologiche di fegato , intestino e branchie

Si possono notare infiltrazioni
negli epatociti nel gruppo
Cd+MPs(H)

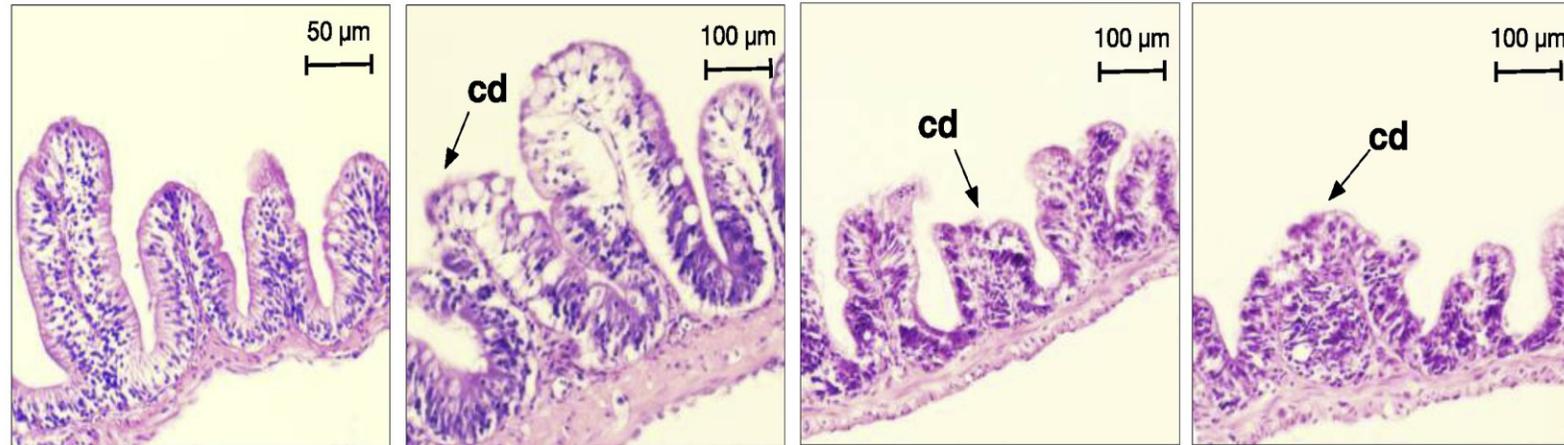
Malformazioni dei villi e degli
enterociti in tutti e tre i gruppi
con contaminanti

Strutture completamente
alterate a livello delle branchie

Liver



Gut



Gill

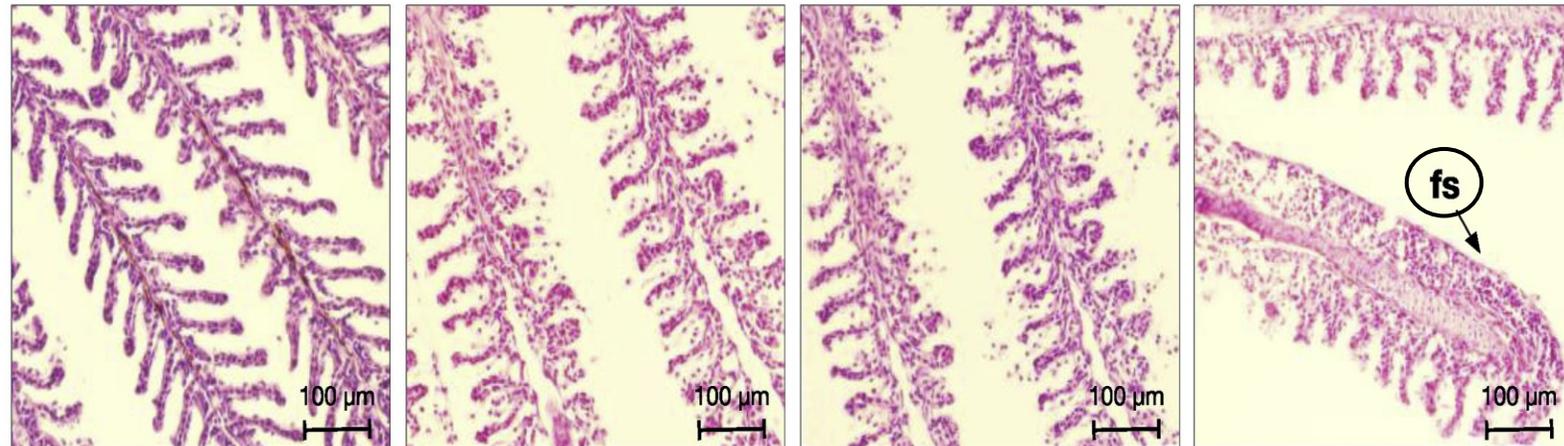


Fig 15

Control

Cd

Cd + MPs (L)

Cd + MPs (H)

-CONCLUSIONE

Il lavoro ha analizzato dei nuovi scenari di ecotossicologia, applicati allo sviluppo di *Danio rerio*, che stanno diventando sempre più comuni nel mondo in cui viviamo. Si è dimostrato che in determinate condizioni chimico fisiche e circostanze ambientali, le microplastiche sono in grado di assorbire i metalli pesanti, diminuendo la loro biodisponibilità e aumentandone il loro accumulo in *Danio rerio*, venendo ingeriti insieme alle microplastiche. Questo sodalizio è in grado di aumentare sia la tossicità delle microplastiche, venendo addizionata a quella dei metalli pesanti, sia quella dei metalli pesanti, poiché vengono a trovarsi in numero maggiore all'interno dei tessuti. Gli effetti amplificati da questa interazione risultano essere: uno stress ossidativo maggiorato, con un aumento di ROS e diminuzione dell'espressione degli enzimi antiossidanti, un'induzione apoptotica amplificata, soprattutto nelle regioni del tratto intestinale e del corpo vertebrale e un'alterazione dello sviluppo in peso e in lunghezza dell'organismo, in senso negativo, a causa dell'azione inibente sull'asse GH/IGF, agendo a livello di espressione dei geni che codificano per gli ormoni stessi e per i recettori e le binding protein di questi ultimi e malformazioni anatomiche importanti a livello di branchie, intestino e fegato.

-GIUDIZIO PERSONALE



► Il motivo della scelta di trattare questo argomento è direttamente collegato alla realtà in cui ci troviamo. Il continuo aumento dell' utilizzo di plastica porterà inevitabilmente a una contaminazione maggiore dei serbatoi naturali, risultando fondamentale comprendere gli effetti che questo materiale può apportare all' ambiente e soprattutto delle interazioni che può avere con altri elementi presenti nell' ecosistema. Negli ultimi anni il numero di articoli che discutono di questi argomenti sta aumentando, tuttavia ritengo che la serie di studi trattati in questa review, proprio per il fatto di combinare due materiali ubiquitari e che andranno ad aumentare sempre di più nei nostri ecosistemi, siano più puntuali e calzanti e mostrino in modo inequivocabile, sia da un punto di vista metabolico, fisico e ontogenetico che da uno prettamente ecotossicologico, i rischi che corriamo e che dobbiamo assolutamente scongiurare.

INDICE DELLE FIGURE

Fig 1 Microplastics as a vehicle of heavy metals in aquatic environments: A review of adsorption factors, mechanisms, and biological effects, 2021 Pubmed

[SiLiu^{ab}JinHuiHuang^{ab}WeiZhang^{ab}LiXiuShi^cKaiXinYi^{ab}HanBoYu^cChenYuZhang^{ab}SuZhouLi^{ab}JiaoNiLi^{ab}](#)

Fig 2 <http://what-when-how.com/mechanisms-of-cadmium-toxicity-to-various-trophic-saltwater-organisms/sources-and-pathways-of-cadmium-in-the-environment-part-1/>

Fig 3,4,5 a ,5b,6 a ,6b Adsorption mechanism of cadmium on microplastics and their desorption behavior in sediment and gut environments: The roles of water pH, lead ions, natural organic matter and phenanthrene 2020, Pubmed

[YanfeiZhou^{ab}YuyiYang^{acd}GuihuaLiu^{acd}GangHe^{ab}WenzhiLiu^{acd}](#)

Fig 7,15 Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*), 2018 Pubmed

[KaiLuRuxiaQiaoHaoAnYanZhang](#)

Fig 8 <https://www.cadmium.org/cadmium-applications>

Fig 9,10,11,12,13,14 Combined effects of polystyrene microplastics and cadmium on oxidative stress, apoptosis, and GH/IGF axis in zebrafish early life stages, 2021 Pubmed

[XiaoChenLi-BinPengDanWangQing-LingZhuJia-LangZheng](#)

BIBLIOGRAFIA

-Toxicities of microplastic fibers and granules on the development of zebrafish embryos and their combined effects with cadmium, 2020 Pubmed

[HaodongCheng^aYifanFeng^aZhenghuaDuan^{ab}](#)

[XinyueDuan^aShuangZhao^aYudiWang^aZhiyuanGong^cLeiWang^b](#)

-Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: A review 2020, Pubmed

[WenfengWang^{ab}JingGe^{ba}XiangyangYu^{ab}](#)

-Embryotoxicity of polystyrene microplastics in zebrafish *Danio rerio*, 2021 Pubmed

[GiuseppeDe Marco^aGea](#)

[OliveriConti^bAlessiaGiannetto^aTizianaCappello^aMariachiaraGalati^aCarmelolaria^aEloisePulvirenti^bFabianoCapparucci^aAngelaMauceri^aMargheritaFerrante^b](#)

[MariaMaisano^a](#)

-Effects of polyethylene microplastics on the microbiome and metabolism in larval zebrafish, 2021 Pubmed ☆

[YaoZhaoZhenQinZhuizuiHuangZhiweiBaoTingLuoYuanxiangJin](#)

-Combined effects of polystyrene microplastics and cadmium on oxidative stress, apoptosis, and GH/IGF axis in zebrafish early life stages, 2021 Pubmed

[XiaoChenLi-BinPengDanWangQing-LingZhuJia-LangZheng](#)

-Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*), 2018 Pubmed

[KaiLuRuxiaQiaoHaoAnYanZhang](#)

-Microplastics as a vehicle of heavy metals in aquatic environments: A review of adsorption factors, mechanisms, and biological effects, 2021 Pubmed

[SiLiu^{ab}JinHuiHuang^{ab}](#)

[WeiZhang^{ab}LiXiuShi^cKaiXinYi^{ab}HanBoYu^cChenYuZhang^{ab}SuZhouLi^{ab}JiaoNiLi^{ab}](#)

-Adsorption mechanism of cadmium on microplastics and their desorption behavior in sediment and gut environments: The roles of water pH, lead ions, natural organic matter and phenanthrene

[YanfeiZhou^{ab}YuyiYang^{acd}GuihuaLiu^{acd}GangHe^{ab}WenzhiLiu^{acd}](#)