



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Triennale in Scienze Biologiche

Studio delle risposte biologiche in *Mytilus galloprovincialis*
per la valutazione dell'impatto ambientale delle piattaforme off-shore nell'Adriatico centrale

Biological responses in mussel *Mytilus galloprovincialis* for assessing the environmental
impact of off-shore platforms in the Central Adriatic Sea

Tesi di Laurea di:
Andrea Evangelisti

Docente Referente:
Dott.ssa Maura Benedetti

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2019-2020-18 Dicembre 2020

Abstract

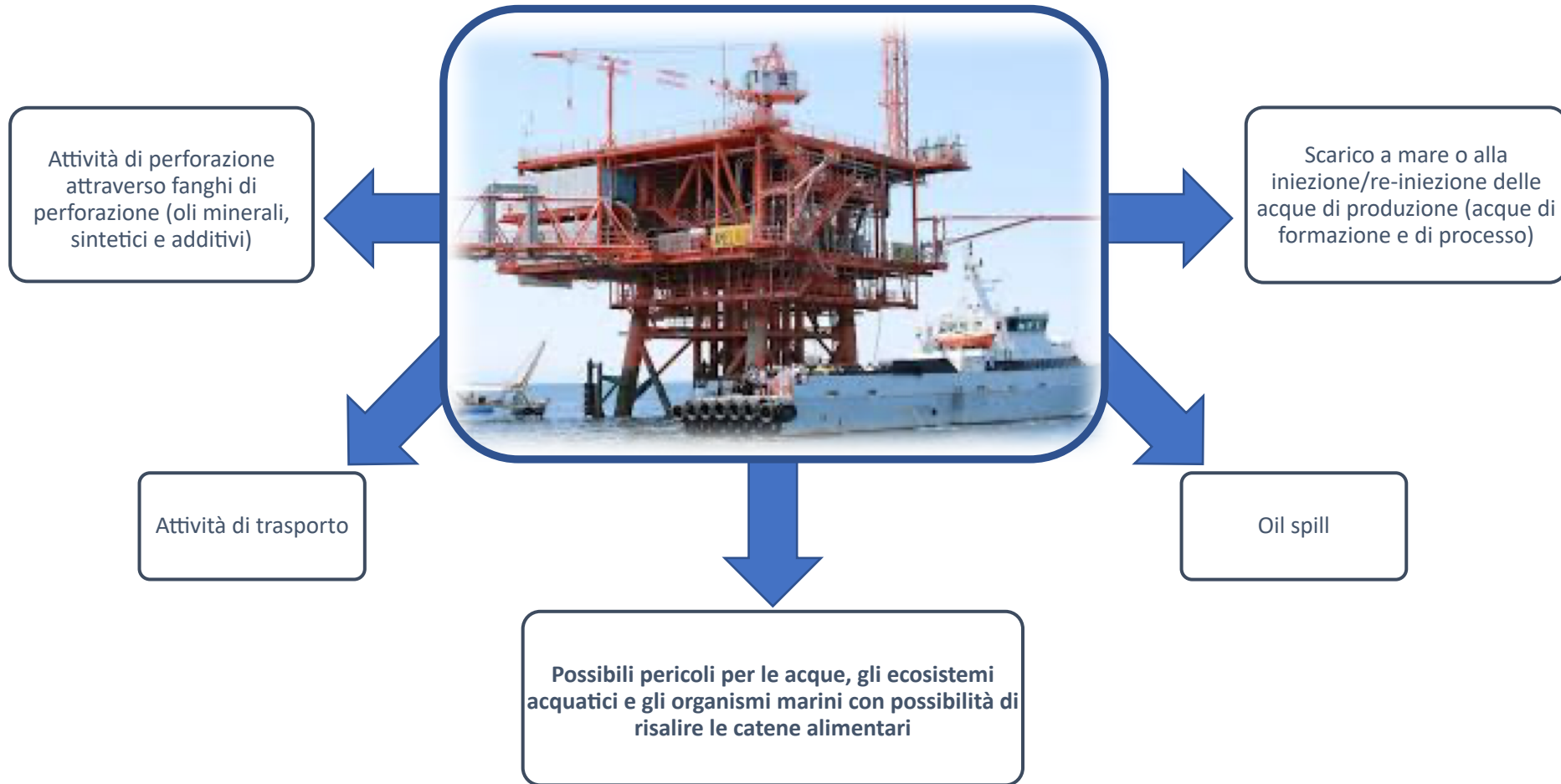
In questo lavoro di tesi mi sono occupato di andare a valutare alcune risposte biologiche in mitili *Mytilus galloprovincialis* prelevati nei piloni di due piattaforme ENI del medio Adriatico, al fine di identificare lo stato di qualità ambientale in prossimità delle piattaforme off-shore.

Le risposte biologiche considerate sono state:

- accumulo di lipofuscina, indicativo di aumentati fenomeni di perossidazione lipidica e compromissione lisosomiale;
- accumulo di lipidi neutri insaturi, spesso associato a fenomeni di lipidosi indotta dalla esposizione a xenobiotici organici;
- analisi delle difese antiossidanti, attraverso la valutazione di singole difese antiossidanti (attività dell'enzima catalasi);
- livelli di metallotioneine, proteine citosoliche indotte dall'esposizione ad alcuni metalli pesanti;

I risultati ottenuti indicano l'assenza di stress ambientale nei mitili provenienti dai diversi piloni delle due piattaforme off-shore.

Introduzione



Lo scopo della tesi è quello di valutare la possibile insorgenza di un disturbo ambientale legato alla presenza e all'attività delle piattaforme off-shore nell'Adriatico centrale attraverso lo studio di alcune risposte biologiche nel mitilo *Mytilus galloprovincialis*.

Mytilus galloprovincialis



OTTIMO BIOINDICATORE

Bioaccumulatore

Organismi sessili

Facilità di raccolta

**Presentano una
distribuzione globale**

**Mancano di meccanismi
biochimici o fisiologici in grado
di regolare le concentrazioni
tissutali dei contaminanti**

- ✓ Valutazione del grado di contaminazione dell'area costiera secondo una misura "integrata nel tempo" e non riferibile, quindi, al solo momento in cui è stato effettuato il prelievo
- ✓ Possibilità di evidenziare facilmente gradienti di inquinamento sia in senso spaziale che temporale, nonché di effettuare confronti tra aree geograficamente distanti
- ✓ Stima della "biodisponibilità" delle sostanze tossiche presenti nell'ambiente marino e valutazione del rischio legato al trasferimento di questi elementi attraverso le catene alimentari.

Piano sperimentale

RACCOLTA MITILI

Collezionati da popolazioni naturali in 2 piloni differenti, in prossimità dell'anodo e lontano l'anodo sacrificale, della piattaforma Bonaccia NW situata a 60 km dalla costa anconetana

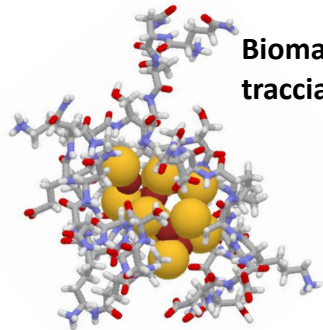
Collezionati da popolazioni naturali in 2 piloni differenti, in prossimità dell'anodo e lontano l'anodo sacrificale, della piattaforma Clara NW che dista 45 km dalla costa anconetana

Prelevati da miticoltura di Senigallia (Controllo)

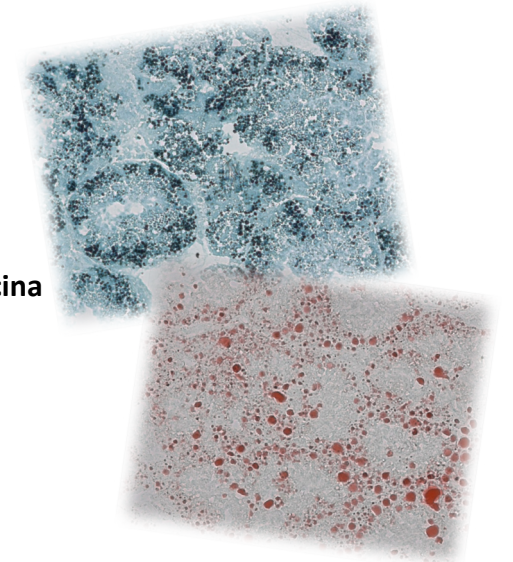


RISPOSTE BIOLOGICHE ANALIZZATE NELLA GHIANDOLA DIGESTIVA

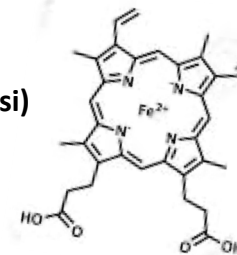
Biomarker di esposizione a metalli in traccia (metallotioneine)



Risposta lisosomiale (accumulo di lipofuscina e lipidi neutri)

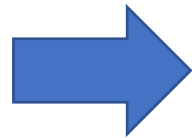
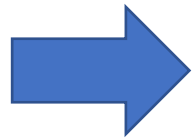


Risposta antiossidante (attività della catalasi)

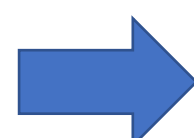


Materiali e metodi

Livelli citosolici di metallotioneine



Asciugatura
con flusso
d'azoto



OMOGENATO

Tampone Tris-HCl,
 β -mercaptoetanol,
PMSF, Saccarosio,
Inibitori di
proteasi

CENTRIFUGAZIONE

30.000 xg
45 min a 4°C

PURIFICAZIONE

Acido etanolo /
cloroformio

NaCl, HCl
EDTA

SAGGIO

Campione, DTNB,
tampone Na-fosfato

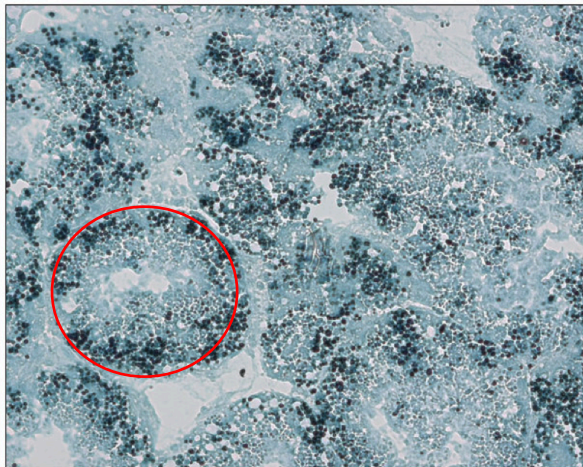
SPETTROFOTOMETRO

Lunghezza d'onda $\lambda=412$ nm

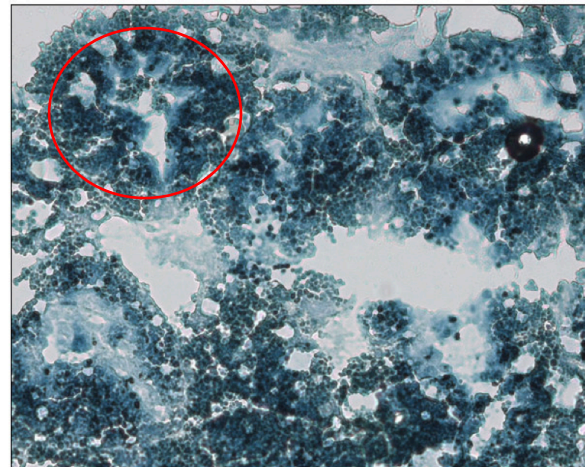
$$\text{Livelli citosolici di metallotioneine} = \frac{\text{moli in 1ml di sovrinatante}}{\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ prt}}$$

Materiali e metodi

Analisi di accumulo di lipofuscine



a. mitilo di controllo



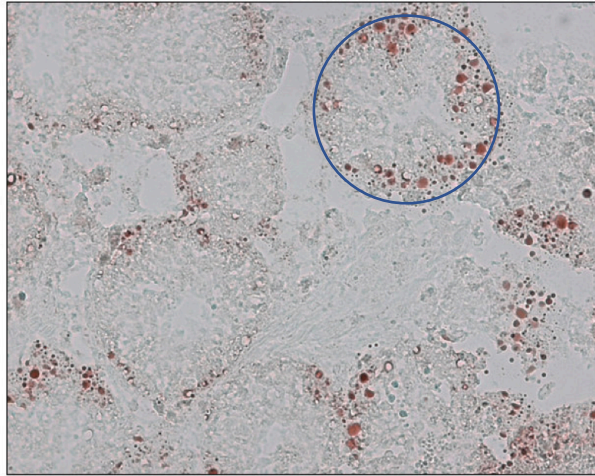
b. mitilo trapiantato



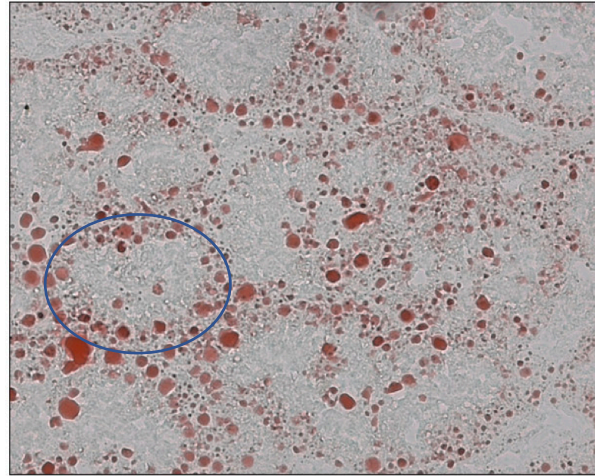
$$\text{Accumulo di lipofuscine} = \frac{\text{area selezionata} * \text{intensita'}}{\text{area totale}}$$

Materiali e metodi

Analisi di accumulo di lipidi neutri insaturi



a. mitilo di controllo



b. mitilo trapiantato



$$\text{Accumulo di lipidi neutri insaturi} = \frac{\text{area selezionata} * \text{intensita'}}{\text{area totale}}$$

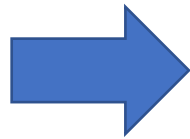
Materiali e metodi

Analisi dell'attività enzimatica della catalasi



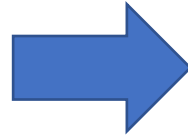
OMOGENATO

Tampone
K-fosfato, PMSF,
NaCl 2.5%,
inibitori di
proteasi



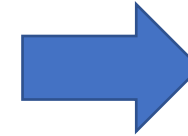
CENTRIFUGAZIONE

100.000 xg
1 ora a 4°C



SAGGIO

Aliquote
di campione,
tampone K-fosfato,
H₂O₂



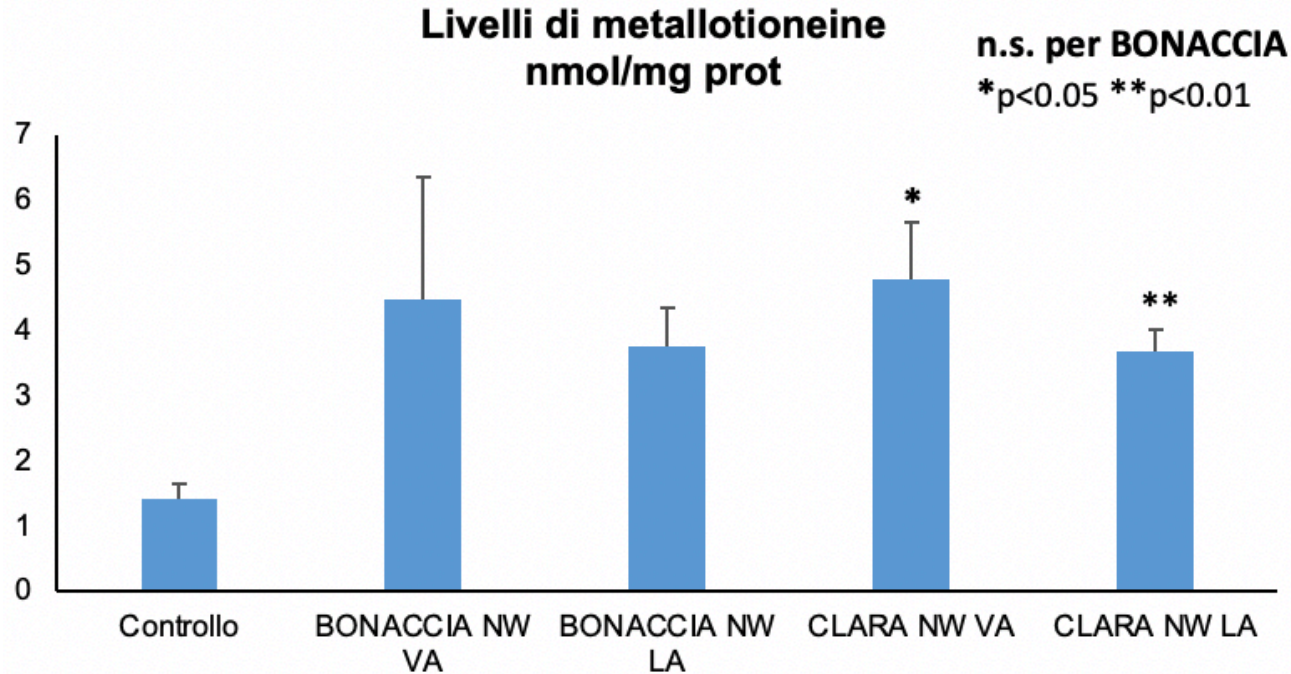
SPETTROFOTOMETRO

Lunghezza d'onda λ=240 nm

$$\text{Attività enzimatica della catalasi} = \frac{\Delta \text{min}}{\epsilon} * \frac{\text{dil. finale}}{\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ prt}} = \frac{\text{conc prt} * \text{diluizione prt}}{1000} = \frac{\text{volume finale}}{\mu\text{l di campione}} * \text{diluizione saggio}$$

Risultati

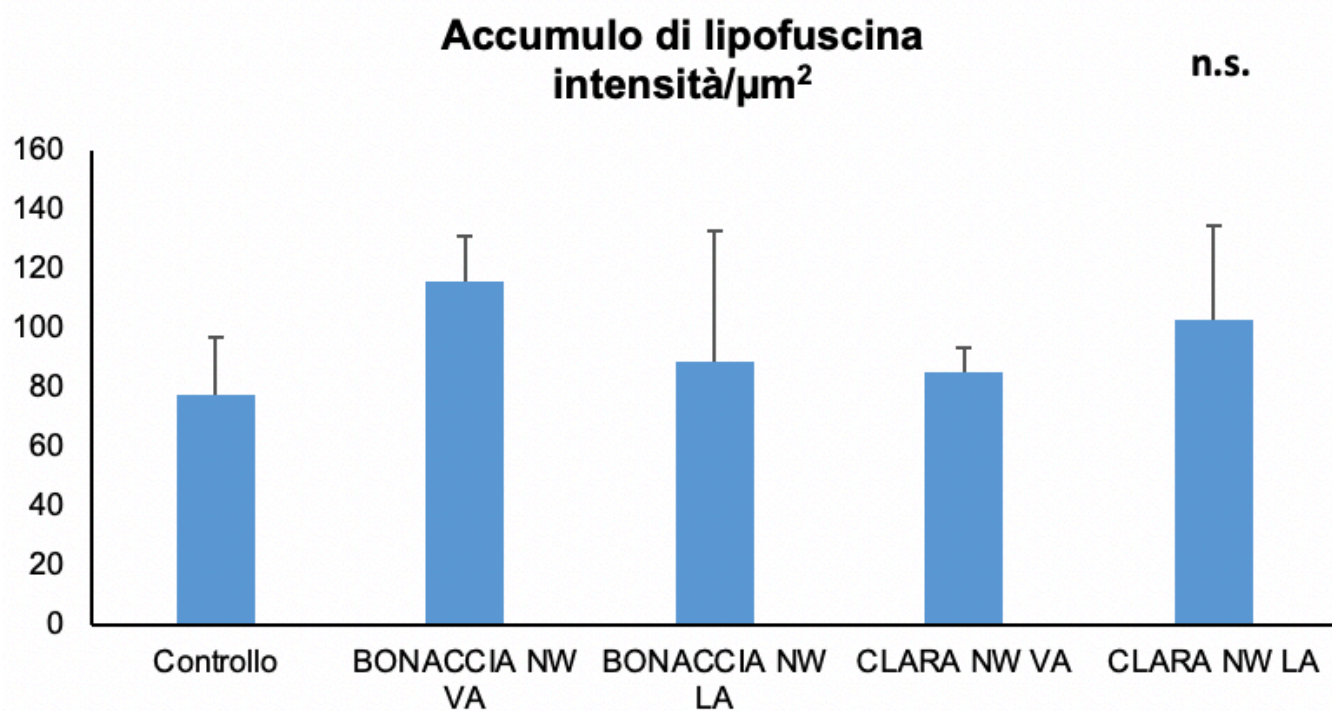
Livelli di Metallothioneine



Nonostante delle fluttuazioni abbastanza evidenti, nessuna variazione statisticamente significativa è stata osservata per quanto riguarda i livelli delle metallothioneine nei mitili provenienti dalla piattaforma ENI Bonaccia NW; al contrario, variazioni statisticamente significative sono state osservate per i livelli di metallothioneine nei campioni prelevati nella piattaforma ENI Clara NW.

Risultati

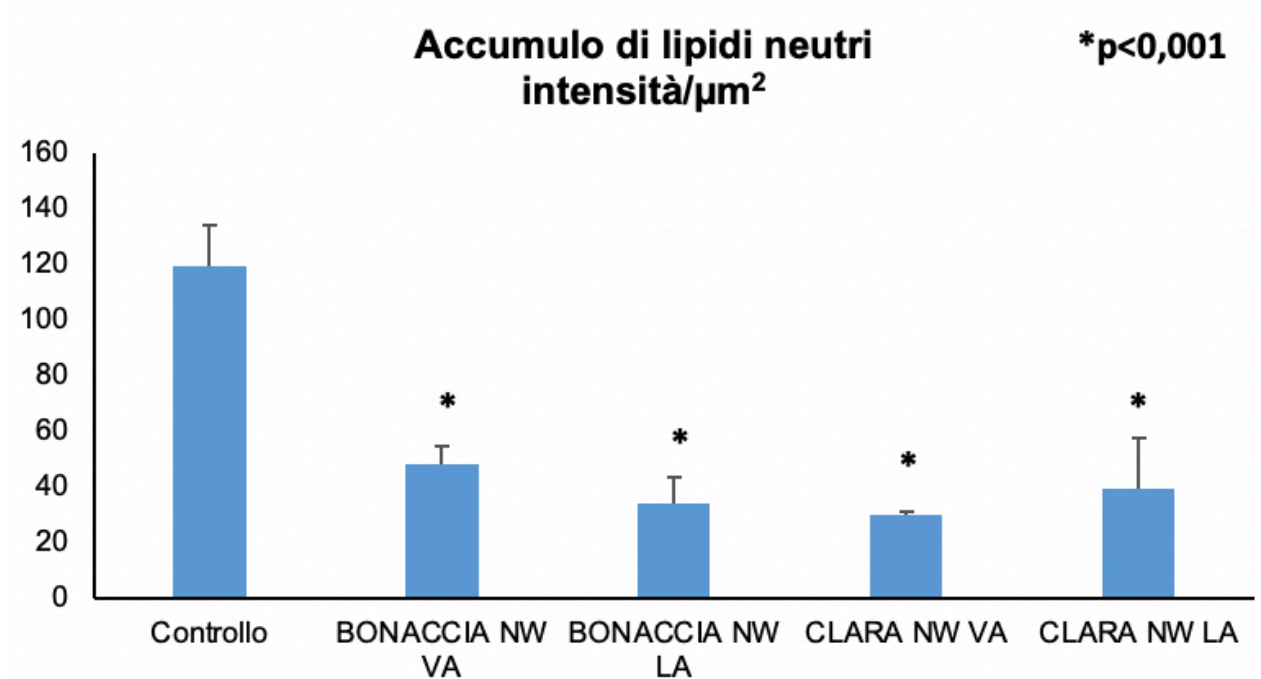
Valutazione del contenuto di lipofuscina



Nei campioni analizzati non si evidenziano variazioni statisticamente significative sia nei mitili provenienti dalla piattaforma ENI Clara NW che da quella ENI Bonaccia NW

Risultati

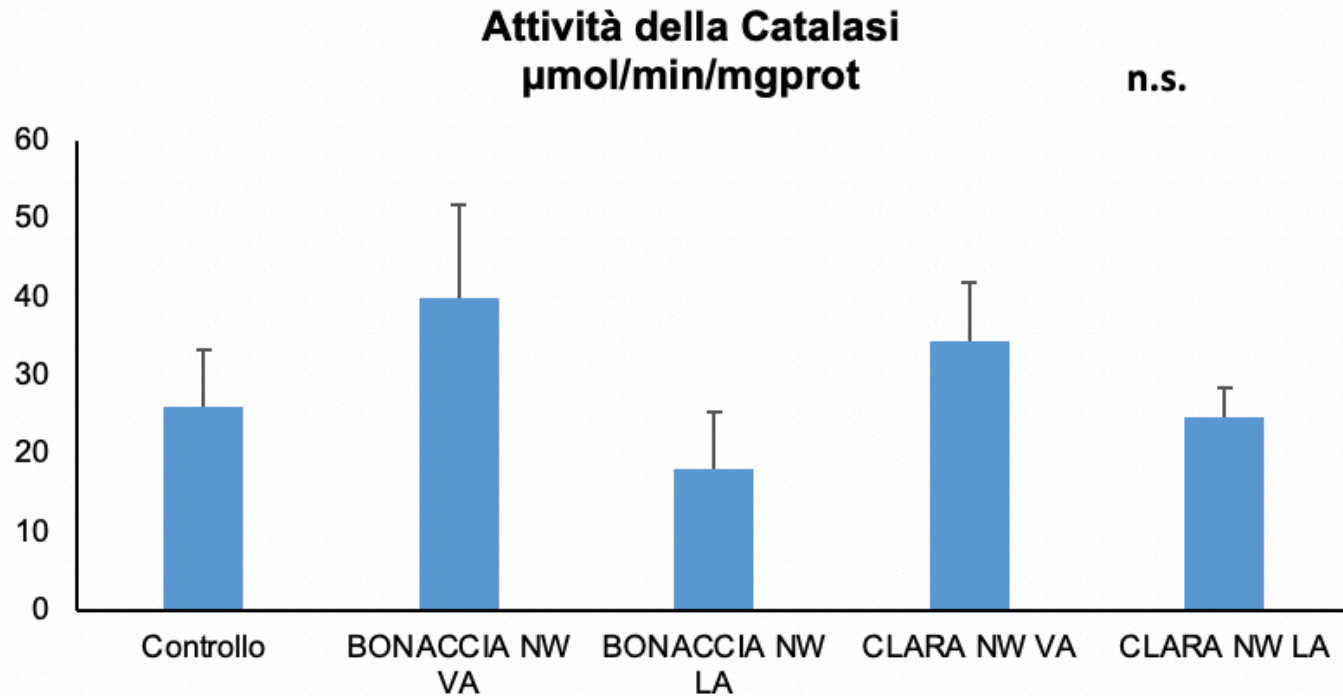
Valutazione del contenuto di lipidi neutri



Nei campioni analizzati le misurazioni di lipidi neutri hanno rivelato scarsi livelli di accumulo nelle ghiandole digestive dei mitili registrando così una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo ($p < 0.001$); questo è visibile sia negli organismi prelevati dalla piattaforma ENI Clara NW che da quella ENI Bonaccia NW

Risultati

Attività della Catalasi



Seppur con qualche variazione, nessuna differenza statisticamente significativa è stata misurata nelle ghiandole digestive dei mitili prelevati dalle piattaforme ENI Clara NW ed ENI Bonaccia NW

Conclusione

In conclusione, nessuna variazione dei parametri biologici considerati è da ricondurre alla presenza di situazioni di impatto ambientale determinato dalla presenza delle piattaforme off-shore ma piuttosto a fluttuazioni stagionali tipiche di questi organismi. Inoltre i valori misurati in questi organismi, a conferma dell'assenza di impatto ambientale, sono comparabili con quelli misurati in organismi prelevati da altri impianti offshore in Adriatico simili, e da aree di riferimento del medio Adriatico.

Sitografia

<https://www.histoline.com/it/mc4000>

<https://bilance-elettroniche.blogspot.com/2011/05/centrifuga-da-laboratorio.html>

<https://www.praxisdienst.it/it/Medicina/Laboratorio/Altri+articoli/Provette/Provette+in+vetro+con+bordo+Teqler+12+x+75+mm.html>

<https://www.slideshare.net/Lorek3/spettrofotometro-uvvisibile>

http://www.gsartor.org/pro/didattica/pdf_files/lezione_donini.pdf

<https://www.tesionline.it/tesi/scienze-matematiche%2C-fisiche-e-naturali/le-metallotioneine-come-biomarcatori-dell-inquinamento-da-metalli/29469>

https://it.123rf.com/photo_31024208_eme-b-eme-b-molecola-l-eme-è-un-componente-essenziale-di-emoglobina-mioglobina-citocromo-catalasi-e.html

https://www.arpae.it/cms3/documenti/_cerca_doc/ecotossicologia/mussel_watch_icram.pdf

<https://www.greenpeace.org/italy/storia/3629/la-nostra-battaglia-contro-le-trivelle/>