



**Saggio di sviluppo larvale nel serpulide
Ficopomatus enigmaticus: effetto di nanotubi di
carbonio ed elementi in traccia in popolazioni di
provenienza Atlantica e Mediterranea**

*M. Oliva, L. De Marchi, M. Vieira Sanches, A. Pires, A. Cuccaro, M.
Baratti, F. Chiellini, A. Morelli, R. Freitas, C. Pretti*

INTRODUZIONE: “Contaminanti di rilevanza emergente” è una definizione molto diffusa per intendere un gruppo eterogeneo di composti e materiali di diversa natura ma che condividono una certa prospettiva di rilevanza ecotossicologica. Dal 2014 Sauvé and Desrosiers hanno aggiornato tale definizione che, al momento, comprende: 1) composti e materiali di nuova scoperta e/o produzione; 2) contaminanti riconosciuti ma attualmente in oggetto di studio in termini di impatto ambientale; e 3) contaminanti classici la cui rilevanza deve essere rivista a seguito di cambiamenti di notevole entità (es. Cambiamento Climatico). Nel presente lavoro la tossicità di contaminanti associati alla categoria 2, nello specifico nanotubi di carbonio funzionalizzati (MWCNT-COOH), ed alla categoria 3, nello specifico elementi in traccia, è stata valutata tramite un saggio di sviluppo larvale con il serpulide *Ficopomatus enigmaticus*. Inoltre, la risposta ai diversi contaminanti selezionati è stata confrontata tra organismi della stessa specie ma campionati in due diverse aree (Marina di Pisa, Italia - Aveiro, Portogallo).

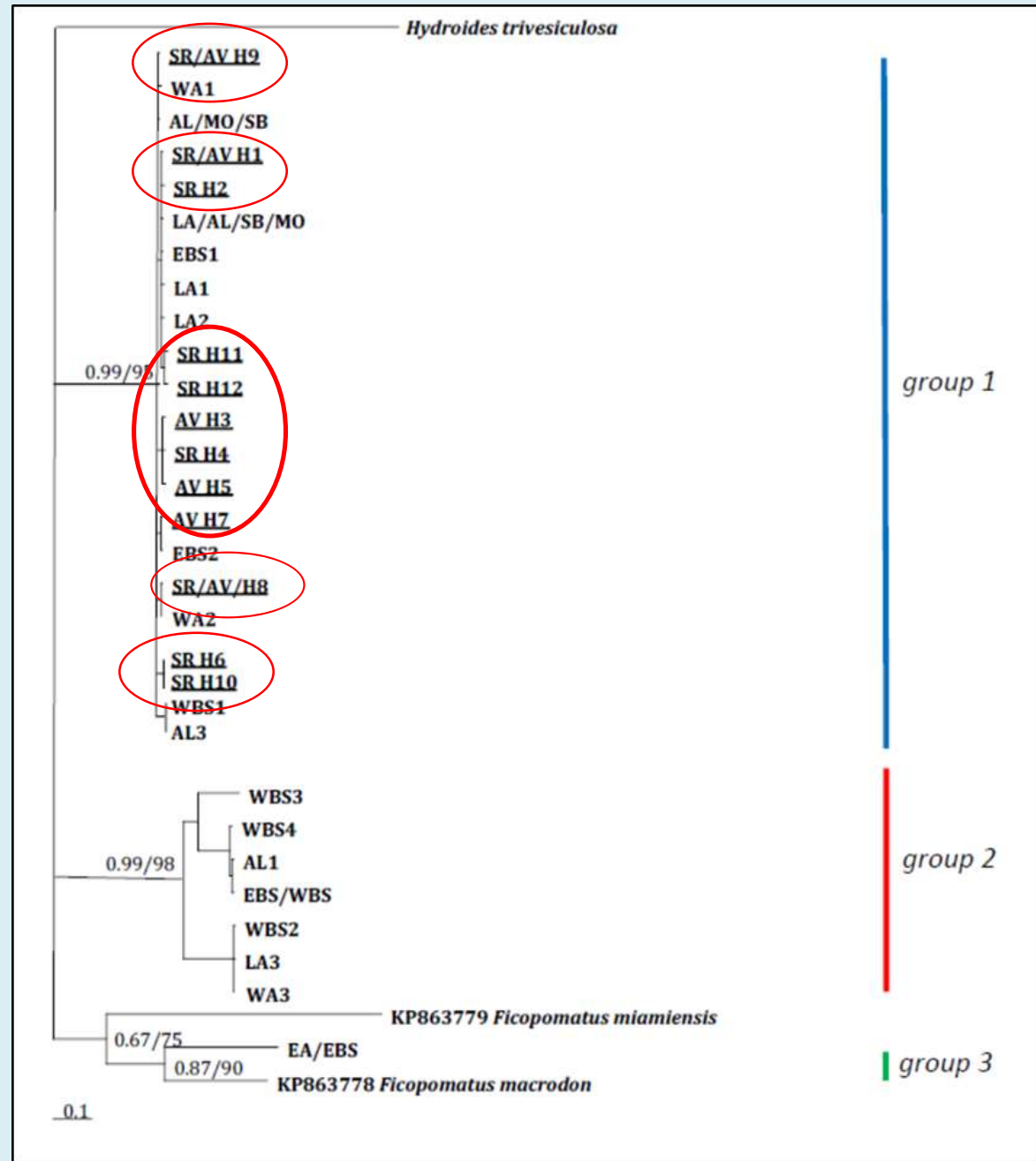


A) Nelle fotografie sono riportati i due siti di prelievo di individui di *F. enigmaticus* (A – Marina di Pisa; B – Aveiro) e un esempio di larve di *F. enigmaticus* a 48 h di sviluppo. Nello specifico WD: well-developed; UD: undeveloped; BD: badly-developed.

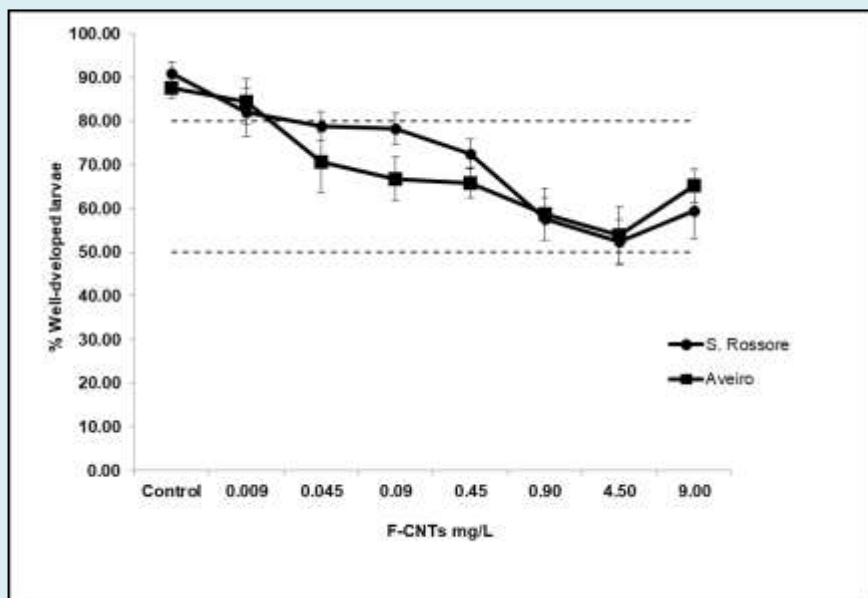
Le sospensioni di nanotubi di carbonio impiegate nei test, sono state preventivamente caratterizzate mediante la tecnica Dynamic Light Scattering (DLS). La tabella riporta i dati dimensionali (nm) e l’indice di polidispersione (PDI) degli aggregati di nanoparticelle misurati alle diverse concentrazioni di MWCNTs-COOH sia in acqua marina di controllo preparata *ah hoc* (C) sia direttamente nelle matrici utilizzate nel saggio biologico (E), in entrambi i casi la salinità è stata mantenuta a 30. i.d.: “Invalid data”.

Samples		Size (nm)	PDI
0.01 mg/L	C	2380.4	1.05
	E	i.d.	-
0.10 mg/L	C	3141.5	1.32
	E	i.d.	-
0.50 mg/L	C	3842.6	1.60
	E	2724.9	3.17
1.00 mg/L	C	6845.1	2.68
	E	2998.5	1.34
5.00 mg/L	C	6753.2	2.55
	E	4850.8	1.99
10.00 mg/L	C	6426.3	1.92
	E	7688.8	2.57

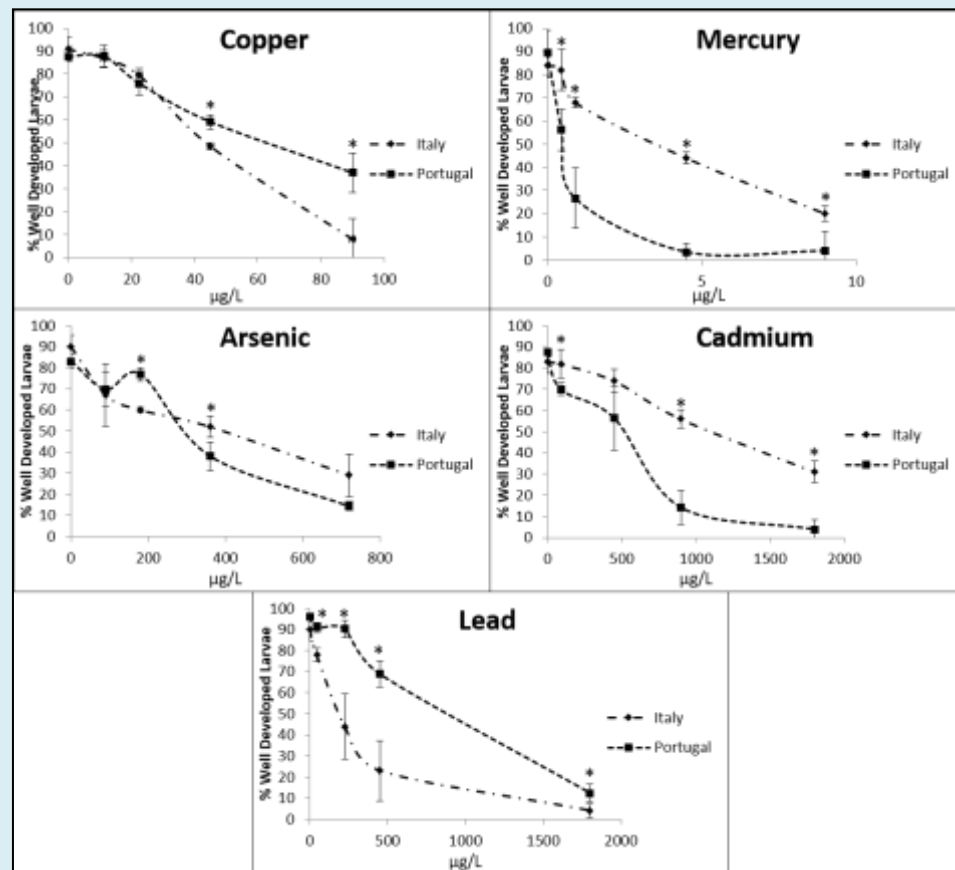
Precedentemente all'esecuzione dei saggi di sviluppo larvale, individui raccolti nelle 2 regioni di campionamento (Italia e Portogallo) sono stati utilizzati per l'estrazione di materiale genetico ai fini di analisi molecolari. A fianco è riportato l'albero filogenetico relativo agli aplotipi della citocromo ossidasi b mitocondriale ottenuta da individui di *Ficopomatus enigmaticus* raccolti nei due siti di campionamento (Marina di Pisa – Aveiro) (H1-H12 sottolineati) e presenti in letteratura (Australia - Styan et al., 2017; California - Yee et al., 2019). Le lettere indicano la regione di provenienza dei campioni (SR, Parco di San Rossore, Marina di Pisa, Italia; AV, Laguna di Aveiro, Aveiro, Portogallo; WA, Australia Occidentale; EBS, Bass Strait Orientale; WBS, Bass Strait Occidentale, Australia; AL, Alameda County; MO, Monterey County; SB, Santa Barbara County; LA, Los Angeles County, California, USA). I numeri ai nodi principali indicano la probabilità di analisi Bayesiana (BI) e valori di bootstrap dall'analisi della Maximum Likelihood (ML). É possibile osservare come tutti gli individui raccolti sia in Italia che in Portogalli appartengano all'specie *Ficopomatus enigmaticus*, ed in particolare al gruppo di aplotipi n° 1.



Le porzioni di reef campionate nelle 2 aree individuate sono state mantenute nelle medesime condizioni (T 20 ± 2 °C, salinità 30 ± 1 , fotoperiodo 14 h luce: 10 h buio) sia nei laboratori del Centro Interuniversitario di Biologia Marina (CIBM) di Livorno, sia nei laboratori del Dipartimento di Biologia dell'Università di Aveiro. In entrambi i laboratori gli organismi sono stati acclimatati per circa 7 giorni prima dell'esecuzione del test di sviluppo larvale. Il test è stato condotto secondo il metodo riportato in Oliva et al. (2019), senza modifiche. Le immagini seguenti riportano le curve concentrazione-risposta (in termini di



Confronto tra i risultati ottenuti dal saggio biologico con il polichete *F. enigmaticus*. Il grafico riporta le percentuali di larve correttamente sviluppate dopo 48 h di esposizione a diverse concentrazioni di MWCNT-COOH. Le linee tratteggiate rappresentano i valori soglia di 80 e 50% di sviluppo corretto.



Confronti tra risultati ottenuti dal saggio biologico con il polichete *F. enigmaticus*. Il grafico riporta le percentuali di larve correttamente sviluppate dopo 48 h di esposizione a diverse concentrazioni di cinque diversi elementi in traccia (rame, mercurio, arsenico, cadmio e piombo). Le linee tratteggiate rappresentano i valori soglia di 80 e 50% di sviluppo corretto.

Confronto tra i valori di EC10/50 (ed i relativi limiti fiduciali al 95%) calcolati per gli elementi in traccia riportati, tra organismi campionati in due diverse aree: Italia e Portogallo. I risultati sono stati ottenuti mediante analisi dei PROBIT per la stima della concentrazione di non effetto (EC10) e della concentrazione di effetto mediana (EC50).

Ion	Italy		Portugal		Ion	Italy		Portugal	
	EC10 (µg/L)	C.L. 95% (µg/L)	EC10 (µg/L)	C.L. 95% (µg/L)		EC50 (µg/L)	C.L. 95%	EC50 (µg/L)	C.L. 95%
Hg ²⁺	0.72	0.22 - 1.31	0.019	0.001 - 0.067	Hg ²⁺	3.97	2.64 - 5.33	0.27	0.08 - 0.57
Cd ²⁺	393.57	163.05 - 600.22	62.65	16.91 - 115.45	Cd ²⁺	1563.28	1206.47 - 2082.25	249.75	145.52 - 360.63
Cu ²⁺	4.08	0.60 - 9.28	30.46	n.c.	Cu ²⁺	110.02	63.51 - 309.57	67.91	n.c.
As ³⁺	41.61	10.07 - 81.84	123.39	9.73 - 247.69	As ³⁺	460.26	328.27 - 681.13	411.40	169.99 - 648.02
Pb ²⁺	66.65	31.87 - 104.28	252.61	188.21 - 309.69	Pb ²⁺	255.82	185.89 - 320.59	566.85	525.77 - 676.64

Concentrazione di elementi in traccia misurate in acqua prelevata nei due siti di campionamento e su tessuti e tubi calcarei di campioni di *F. enigmaticus* utilizzati per la produzione di gameti impiegati nel saggio biologico. Per ogni elemento è riportato il relativo limite di quantificazione strumentale (LOQ).

Element	Limit of Quantification (LOQ) (µg/L)	Sample Concentration (µg/L)		Element	Unit	Limit of Quantification (LOQ)	Whole Tissue		Calcareous Tubes	
		Fiume Morto	Ria de Aveiro				Fiume Morto	Ria de Aveiro	Fiume Morto	Ria de Aveiro
Hg	0.05	< LOQ	< LOQ	Hg	mg/Kg d.w.	0.005	0.56	0.07	0.06	0.01
Cd	0.1	0.22	0.21	Cd	mg/Kg d.w.	0.2	1.57	0.72	0.06	0.05
Cu	2.5	5.17	3.40	Cu	mg/Kg d.w.	0.6	25.36	35.52	5.71	3.79
As	2.5	< LOQ	< LOQ	As	mg/Kg d.w.	0.6	8.30	9.65	0.84	0.95
Pb	2.5	4.65	< 2,5	Pb	mg/Kg d.w.	0.3	1.07	8.79	2.76	2.66

Osservando i risultati delle concentrazioni elementali nei tessuti di *F. enigmaticus*, prelevato nei due diversi siti di campionamento, essi appaiono inversamente proporzionali all'effetto rilevato con il saggio di sviluppo larvale. Ciò potrebbe indicare un ipotetico «trasferimento» dagli adulti ai gameti di una forma di resistenza a determinati elementi più bioconcentrati a livello tissutale.

BIBLIOGRAFIA:

- Oliva, M., De Marchi, L., Vieira Sanches, M., Pires, A., Cuccaro, A., Baratti, M., Chiellini, F., Morelli, A., Freitas, R., Pretti, C., 2020. Atlantic and Mediterranean populations of the widespread serpulid *Ficopomatus enigmaticus*: Developmental responses to carbon nanotubes. *Marine Pollution Bulletin* 156, 111-265.
- Oliva, M., Manzini, C., Bontà Pittaluga, G., Kozinkova, L., De Marchi, L., Freitas, R., Fabi, G., Pretti, C., 2019. *Ficopomatus enigmaticus* larval development assay: An application for toxicity assessment of marine sediments. *Marine Pollution Bulletin* 139, 189-196.
- Sanches, M. V., Oliva, M., Pires, A., De Marchi, L., Cuccaro, A., Freitas, R., Baratti, M., Pretti, C. (2020). Relationship between wild-caught organisms for bioassays and sampling areas: Widespread serpulid early-development comparison between two distinct populations after trace element exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111094.
- Sauv e, S., Desrosiers, M., 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal* 8, Article number: 15.