I risultati della ricerca condotta
dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"
ANNO 2012

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Studio degli effetti tossici dei ritardanti di fiamma, polibromodifenileteri (PBDE), sulla vongola *Chamelea gallina*

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute,
Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria,
della Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute
Progetto IZS AM 09/07 RC

S. Angela Angioni
Gianfranco Diletti

Teramo, 23 maggio 2013

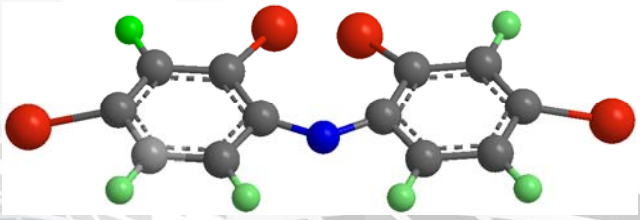
Introduzione

Obiettivo della ricerca

Il presente lavoro ha avuto i seguenti obiettivi:

- Valutare, mediante la simulazione di un evento inquinante in acquario, il potere tossico e/o dannoso del PBDE-47 su vongola *Chamelea gallina;*

- Valutare la capacità di bioaccumulo del composto tossico nei tessuti del mollusco al fine di verificare il suo possibile ingresso nella catena trofica.

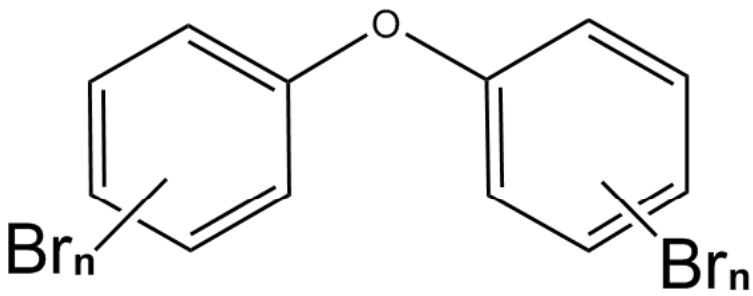


Polibromodifenileteri (PBDE)

- I PBDE, annoverati tra le sostanze pericolose dalla **Direttiva 2011/65/UE,** sono impiegati in diversi prodotti industriali tessili ed elettronici, negli imballaggi plastici e nel materiale edile, in quanto caratterizzati dalla capacità di ritardare l'estendersi delle fiamme in caso di incendio;
- Sono composti bioaccumulabili, ritenuti interferenti endocrini, genotossici e neurotossici;
- Sono regolati dalla Convenzione di Stoccolma e dalla Commissione Europea in merito all'inquinamento transfrontaliero a lunga distanza dei contaminanti organici persistenti (POPs).

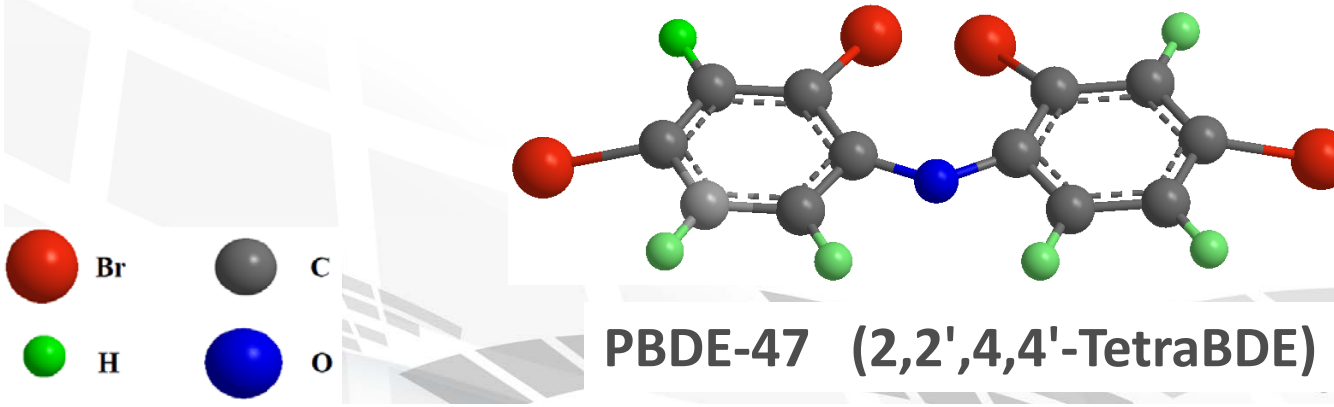
Introduzione

Polibromodifenileteri (PBDE)



Idrocarburi aromatici bromurati: scheletro di difeniletere sostituito da 1 a 10 atomi di bromo

209 congeneri: nomenclatura IUPAC simile ai Policlorobifenili



PBDE-47 (2,2',4,4'-TetraBDE)

Introduzione

Polibromodifenileteri (PBDE)

Proprietà chimico-fisiche

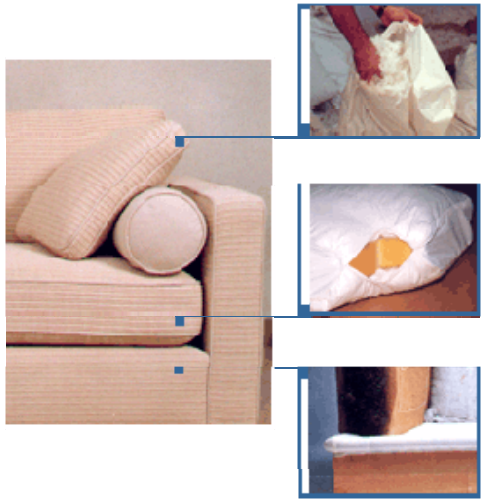
- Bassa tensione di vapore;
- Elevata temperatura di fusione e di ebollizione (310-425 °C);
- Alto coefficiente di distribuzione ottanolo/acqua (log Kow > 6);
- Elevata solubilità nei grassi;
- Scarsa solubilità in acqua.

Introduzione

Polibromodifenileteri (PBDE)

Perché si producono e modalità di rilascio

Addizionati a numerosi prodotti industriali e di consumo al fine di arginare le fiamme in caso di incendio

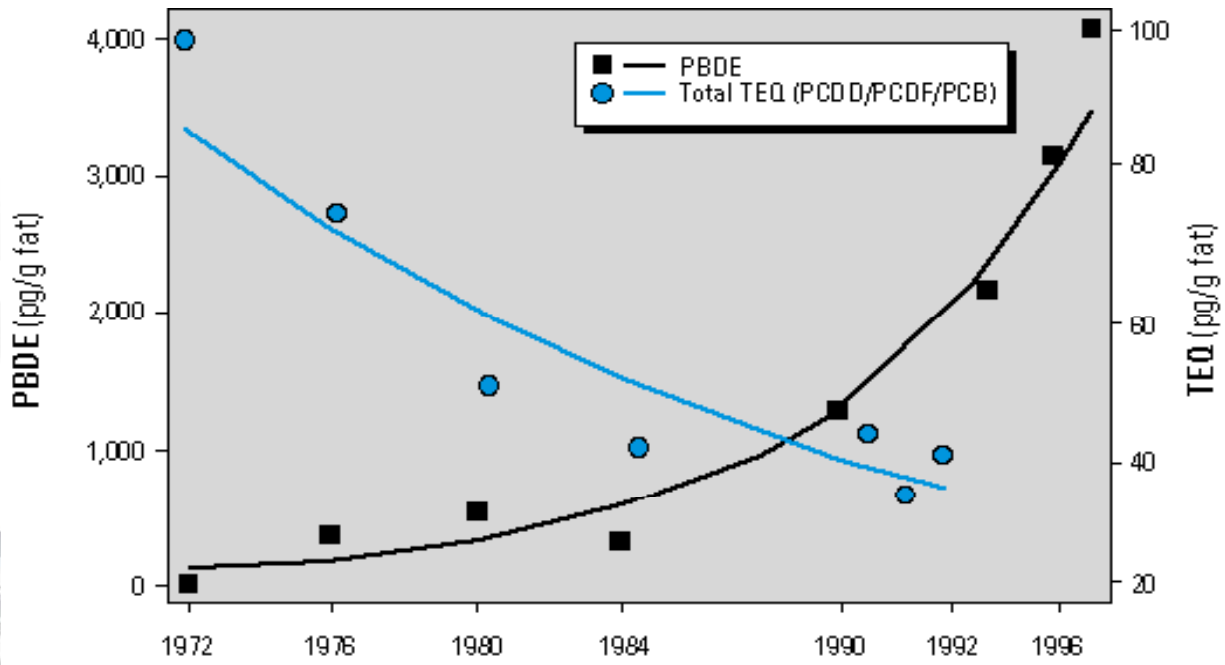


- **Fase di produzione e di utilizzo**
- **Smaltimento in discarica**
- **Incenerimento**
- **Reflui industriali**

Introduzione

I PBDE nell'ambiente

Tali inquinanti ambientali sono divenuti ubiquitari (acqua, aria e terreno) la loro concentrazione nell'ambiente, negli ultimi anni, è aumentata in maniera considerevole.



Livelli PBDE, Diossine e PCB nel latte materno in Svezia

(Norén and Mieronyté, 1998)

Introduzione

Presenza dei PBDE nel biota

La loro presenza è stata riscontrata in :

- Pesci
- Uccelli
- Molluschi
- Mammiferi marini
- Latte materno, tessuto adiposo, sangue e siero umano

La vongola
Chamelea gallina

- La vongola *Chamelea gallina* mollusco bivalve che vive aggregato in banchi a elevata densità in fondali sabbiosi o sabbio-fangosi, ha un buon potere di bioaccumulo dei contaminanti ambientali;
- L'alimentazione, basata sulla microfagia, mediante un sistema filtrante, rende la vongola particolarmente sensibile alla qualità dell'acqua, al particolato in sospensione, nonché agli stress di natura chimica.

Super Regno: Eukaryota
Regno: Animalia
Philum: Mollusca
Classe: Bivalvia
Ordine: Veneroida
Famiglia: Veneridae
Genere: Chamelea
Specie: Gallina

Materiali e metodi

Sperimentazione: campionamento

Le vongole e l'acqua marina per gli acquari sono stati prelevati, con frequenza mensile, in un punto di campionamento situato ad una distanza di circa 500 m dalla costa abruzzese e ad una profondità di circa 6 m

Materiali e metodi

Sperimentazione: fase di adattamento

I molluschi sono stati ripartiti in acquari in vetro temperato, dotati di dispositivi di ossigenazione e filtrazione meccanica dell'acqua di mare e collocati in camera termostata secondo i seguenti parametri:

- Temperatura di 19 ± 1 °C
- Intensità luminosa di 65 ± 30 lux
- Fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio

Materiali e metodi

Sperimentazione: fase di adattamento

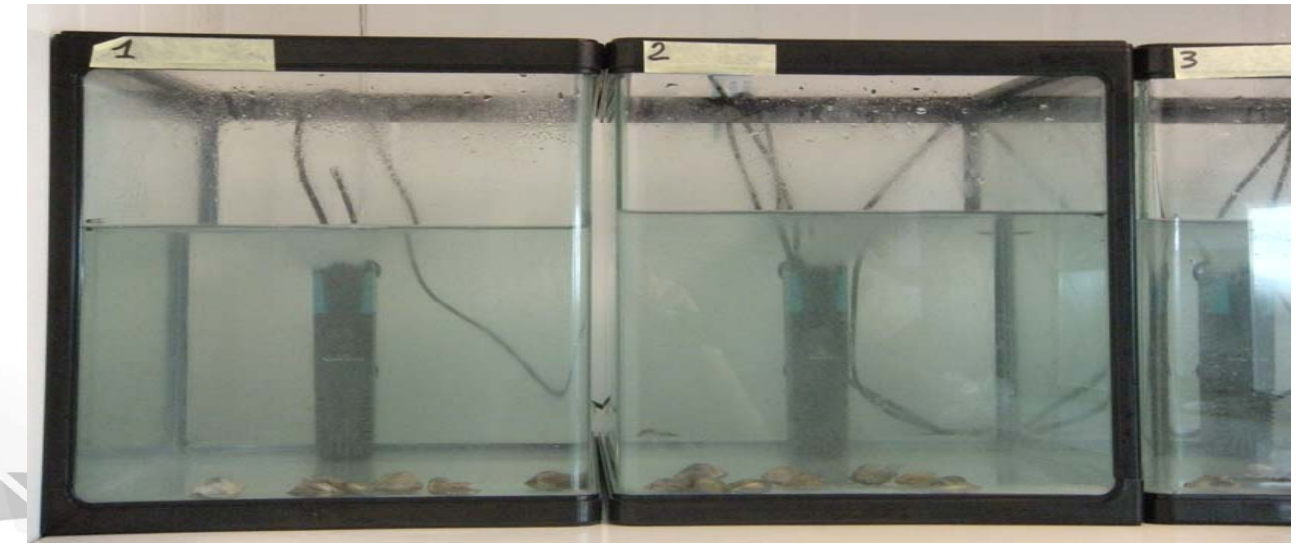
I molluschi sono stati alimentati con *Dunaliella tertiolecta*, alga marina unicellulare coltivata nel laboratorio del Centro di Biologia delle Acque dell'IZSAM e prima delle prove tossicologiche stabulati per un periodo di adattamento di 5-7 giorni

Materiali e metodi

Sperimentazione: prove ecotossicologiche

- **Le vongole sono state esposte a 7 concentrazioni crescenti di PBDE-47 (0,25 - 0,50 - 1,0 - 3,0 - 9,0 - 15,0 - 30,0 µg/L);**

- **Per ogni concentrazione di PBDE-47 sono stati valutati gli effetti tossici a 96 h (mortalità) e quelli dannosi (gonadi) con la protrazione delle prove a 21 giorni.**



Materiali e metodi

Sperimentazione: esame istologico

Alla fine delle prove a 21 gg i campioni di vongole, sgusciate e conservate in formalina al 10% (v/v), sono stati sottoposti all'esame istologico delle gonadi al fine di verificare l'eventuale presenza di alterazioni. Per ciascuna concentrazione testata sono stati esaminati un numero statisticamente rappresentativo (20-30 esemplari) sia di vongole esposte al tossico sia dei controlli.

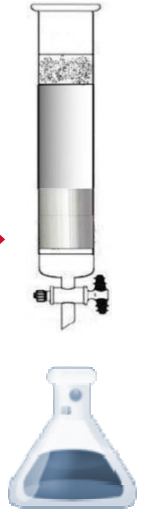
L'esame è stato eseguito presso il Laboratorio Nazionale di riferimento per le malattie dei molluschi dell'IZSVE

Materiali e metodi

Sperimentazione: analisi chimica

Le determinazioni analitiche sulle vongole sono state eseguite con metodo validato e accreditato in diluizione isotopica e spettrometria di massa ad alta risoluzione

Estrazione



Purificazione

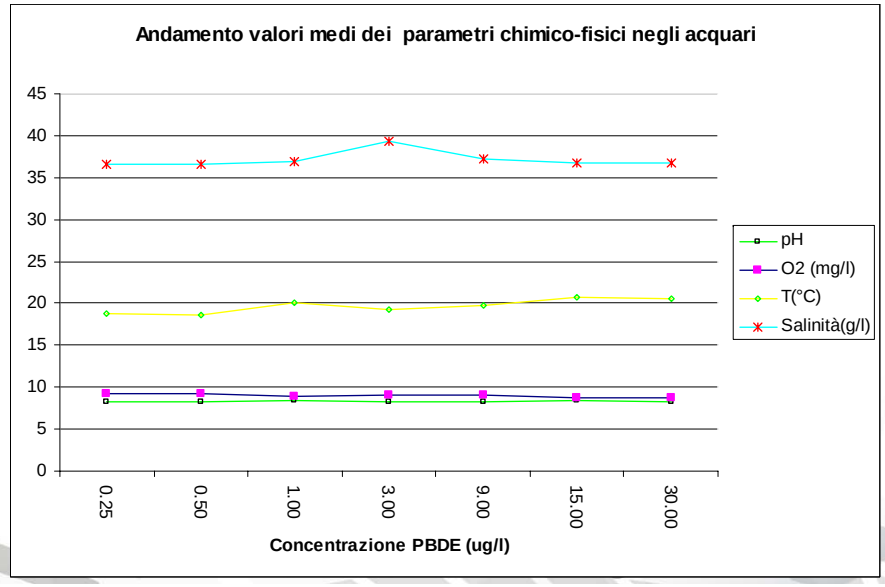
Analisi strumentale

Risultati e discussione

Parametri chimico-fisici negli acquari

I valori considerati si sono mantenuti all'interno dei seguenti range:

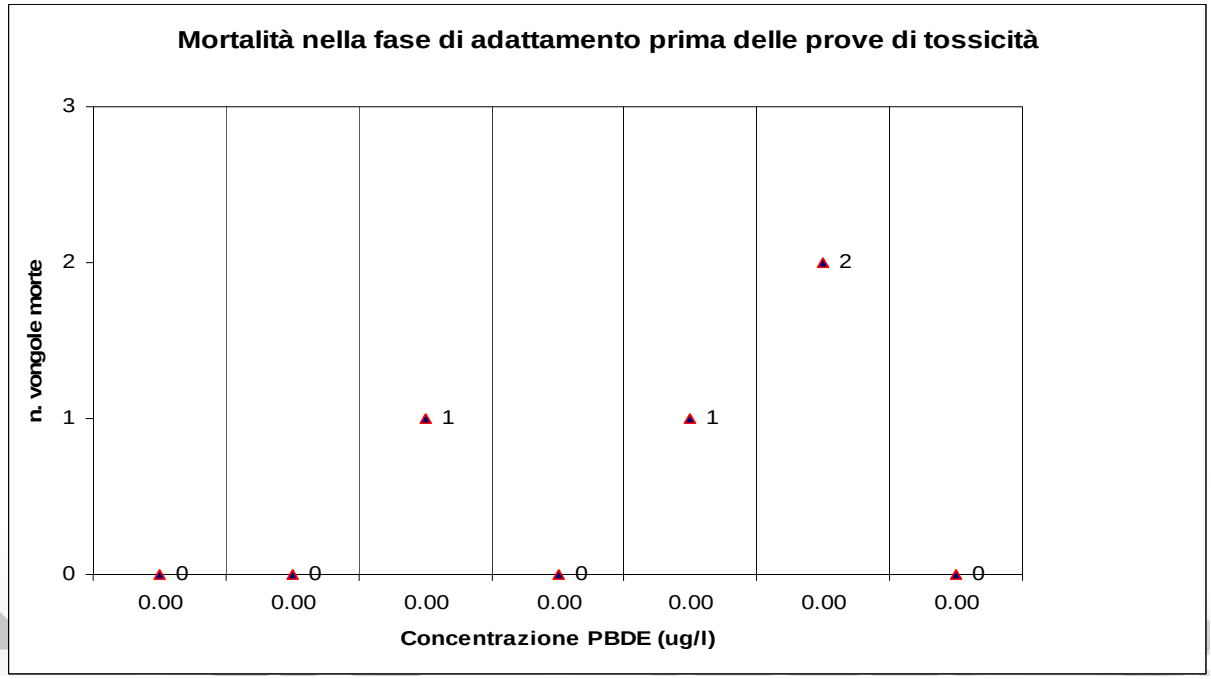
- **Concentrazione NH_3: < 0,25 mg/L**
- **Temperatura dell'acqua: 18,5-20,7 °C**
- **O_2 disciolto: 8,69-9,27 mg/L**
- **Salinità: 34,4-39,6 g/L**
- **pH: 8,22-8,37**



Risultati e discussione

Fase di adattamento

Nel corso della fase di adattamento delle vongole in acquario, è stata registrata una mortalità inferiore al 10%

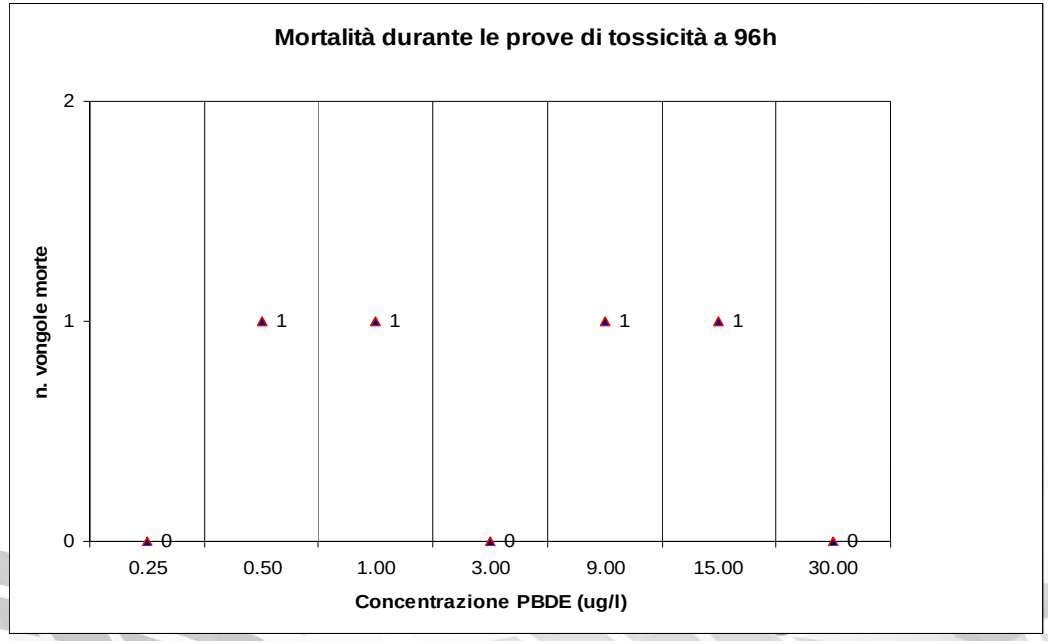


Risultati e discussione

Prove di tossicità a 96 h

Nelle prove di tossicità a 96 ore, per tutte le concentrazioni previste, la mortalità si è costantemente mantenuta al di sotto del 10%

Gli esemplari utilizzati non hanno mai manifestato segni apparenti di sofferenza



Risultati e discussione

Prove di tossicità a 96 h

- **L'analisi della varianza univariata (ANOVA) non ha rilevato differenze statisticamente significative (F= 0,500; p= 0,808) tra i valori delle mortalità osservate alle differenti concentrazioni;**

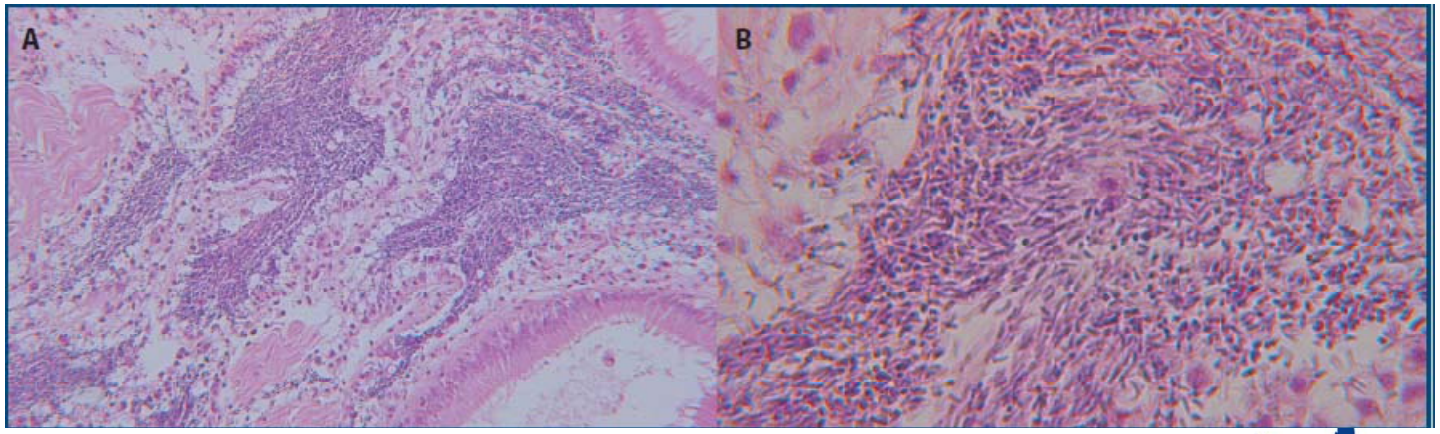
- **Le mortalità osservate a tutte le concentrazioni non sono risultate statisticamente differenti da quelle attese (0%).**

Risultati e discussione

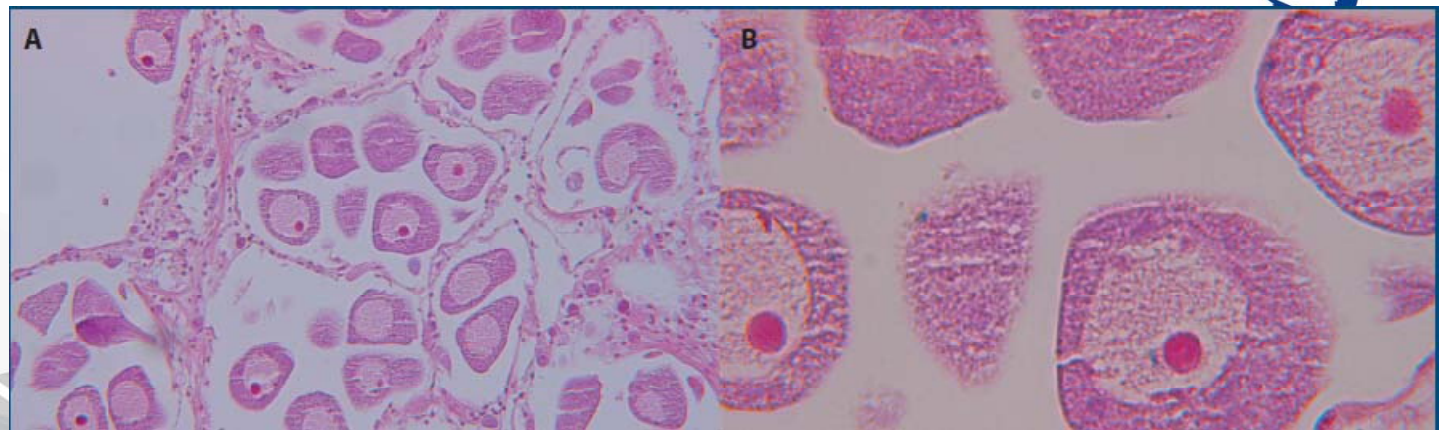
Prove di tossicità a 21 giorni

Dall'esame istologico non sono risultate alterazioni ai tessuti delle gonadi al termine di ciascuna prova di tossicità

Sezione istologica di gonade maschile senza alterazioni e buona produzione di gameti di vongola esposta a 15 μg PBDE-47/L



Sezione istologica di gonade femminile matura senza alterazioni di vongola esposta a 15 μg PBDE-47/L



(A) 100X; (B) 400X

Risultati e discussione

Livelli di contaminazione dei tessuti

I livelli del contaminante nel tessuto delle vongole risultano da 1000 a 50000 volte maggiori nei gruppi degli esposti rispetto a quelli dei corrispondenti controlli

Valori analitici dei livelli di PBDE 47 nei tessuti alla fine di ciascuna prova di tossicità a 21 gg*

PBDE-47 H_2O (ng/L)	Lipidi controllo (%)	PBDE-47 controllo (ng/kg)	Lipidi esposti (%)	PBDE-47 esposti (ng/kg)
250	1,07	119	0,97	110×10^3
500	0,84	130	0,73	$97,3 \times 10^3$
1000	1,03	118	1,14	122×10^3
3000	1,08	118	1,14	394×10^3
9000	1,16	96,0	1,05	-
15000	0,77	116	0,90	-
30000	0,90	120	0,95	5870×10^3

* La sperimentazione condotta alla concentrazione di 500 ng/L è stata interrotta a 14 giorni

Risultati e discussione

Fattori di bioconcentrazione (BCF)

Il BCF è definito come il rapporto, allo stato stazionario, tra la concentrazione del contaminante nell'organismo acquatico e la corrispondente concentrazione nel mezzo acquoso

Valori di BCF calcolati alle diverse concentrazioni di esposizione alla sostanza tossica

PBDE-47 H_2O	BCF_W	BCF_D	BCF_L	log BCF_W	log BCF_D	log BCF_L
(ng/L)	(L/kg)	(L/kg)	(L/kg)			
250	439	2260	45300	2,6	3,4	4,7
500	195	1000	26600	2,3	3,0	4,4
1000	122	630	10700	2,1	2,8	4,0
3000	131	680	11500	2,1	2,8	4,1
30000	196	1010	20600	2,3	3,0	4,3

BCF_W :fattore di bioconcentrazione su prodotto intero;
BCF_L : fattore di bioconcentrazione su base lipidica;
BCF_D : fattore di bioconcentrazione su prodotto secco

Conclusioni

- Buona capacità di adattamento della vongola *Chamelea gallina* in acquario;
- Non è stata evidenziata una relazione tra concentrazione del contaminante nell'acqua e mortalità dei molluschi esposti al PBDE-47 durante le prove di tossicità a 96 h;
- I risultati dell'esame istologico, non hanno evidenziato alterazioni evidenti dei tessuti dell'apparato riproduttivo nelle condizioni sperimentali adottate;

Conclusioni

- I risultati delle analisi chimiche indicano che le vongole esposte al PBDE-47 presentano livelli nel tessuto fino a 50000 volte superiori rispetto agli esemplari non esposti, in funzione della concentrazione del mezzo acquoso;

- La ricerca ha evidenziato il potere di bioaccumulo del mollusco bivalve, permettendo al PBDE-47 l'ingresso nella catena trofica con un possibile rischio per la sicurezza alimentare, per la salubrità degli ecosistemi marini e della risorsa vongola.

Ringraziamenti

- Nicola Ferri
- Giampiero Scortichini
- Fabrizia Perletta
- Roberta Ceci
- Alfonso De Benedictis

Grazie anche ….

…. a voi che con pazienza mi avete ascoltato

Studio degli effetti tossici del ritardante di fiamma PBDE-47 su vongola *Chamelea gallina* (Linnaeus,1758)

Salvatora Angela Angioni, Giampiero Scortichini, Gianfranco Diletti, Fabrizia Perletta, Roberta Ceci e Nicola Ferri

Veterinaria Italiana 2013 - Volume 49 (1)