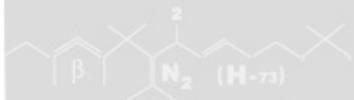


**Cristiana Guerranti¹, Emiliano Fanello¹, Guido Perra¹, Michela Mariottini¹,
Costanza Burroni¹, Davide Baroni¹, Nicoletta Borghesi¹, Camilla Della Torre¹,
Ilaria Corsi¹, Valerio Volpi¹, Dante Caserta², Augusto De Sanctis², Silvano Focardi¹**

¹ Dipartimento di Scienze Ambientali "G.Sarfatti", Università degli Studi di Siena

² WWF Sezione Abruzzo, Pescara

I risultati del biomonitoraggio ambientale di PREVIENI



P R E V I E N I



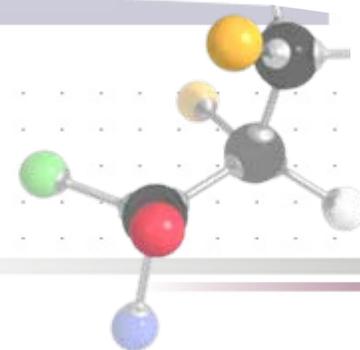
Salute riproduttiva e contaminanti

workshop

**INTERFERENTI ENDOCRINI: DAI BIOMARKER ALLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO:
IL PROGETTO PREVIENI**

27 ottobre 2009 Istituto Superiore di Sanità





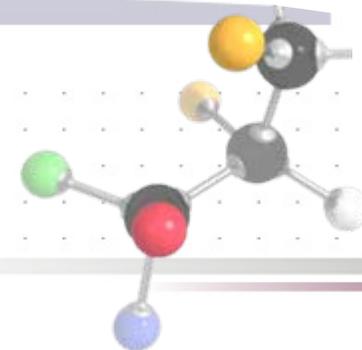
La struttura del progetto PREVIENI

Lo studio si articola nei programmi di ricerca sotto indicati:

Studio su popolazioni animali sentinella in due oasi del WWF (UO 3)

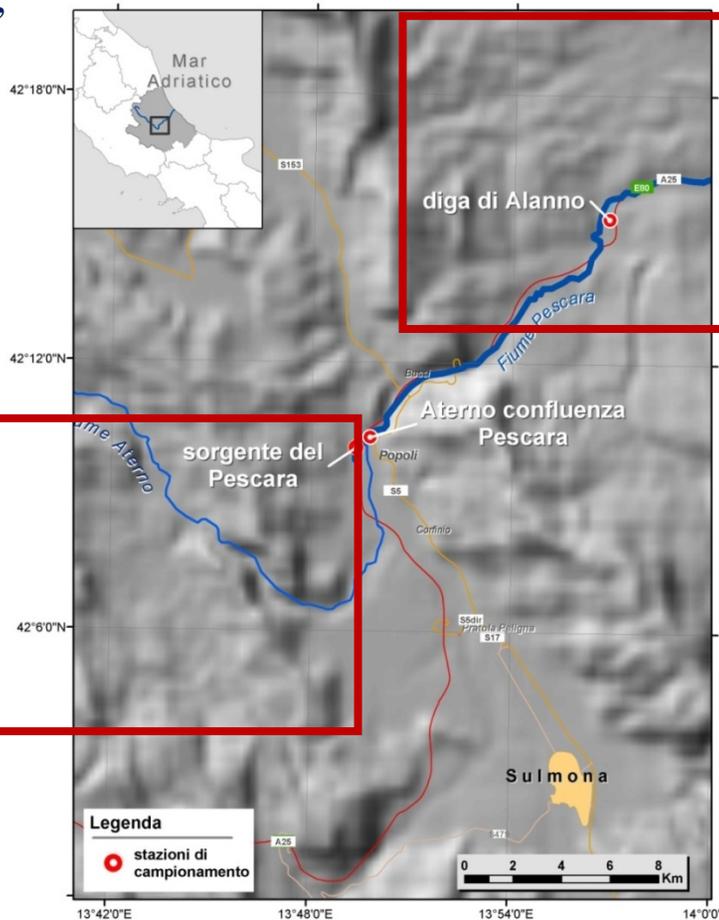
Studio sull'infertilità *sine causa* (UO 1, UO 2, UO 3)

Studio *satellite* sull'esposizione transgenerazionale (trasferimento madre-neonato) a interferenti endocrini (IE) (UO 1, UO 2, UO 3)



Area di Studio

Due aree umide, Oasi WWF,
lungo il corso del fiume
Pescara



1. Oasi di Protezione della Fauna della Diga di Alanno

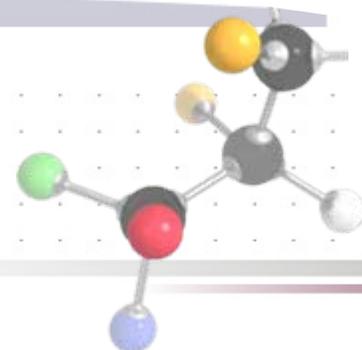
Situata a valle dei siti chimici Bussi sul Tirino e Piano d'Orte

Sito contaminato

2. La Riserva Naturale Regionale Sorgenti del Pescara

Situata a diversi chilometri a monte dal sito industriale chimico di Bussi sul Tirino

Sito di controllo



Campionamento



Barbo (*Barbus tyberinus*)



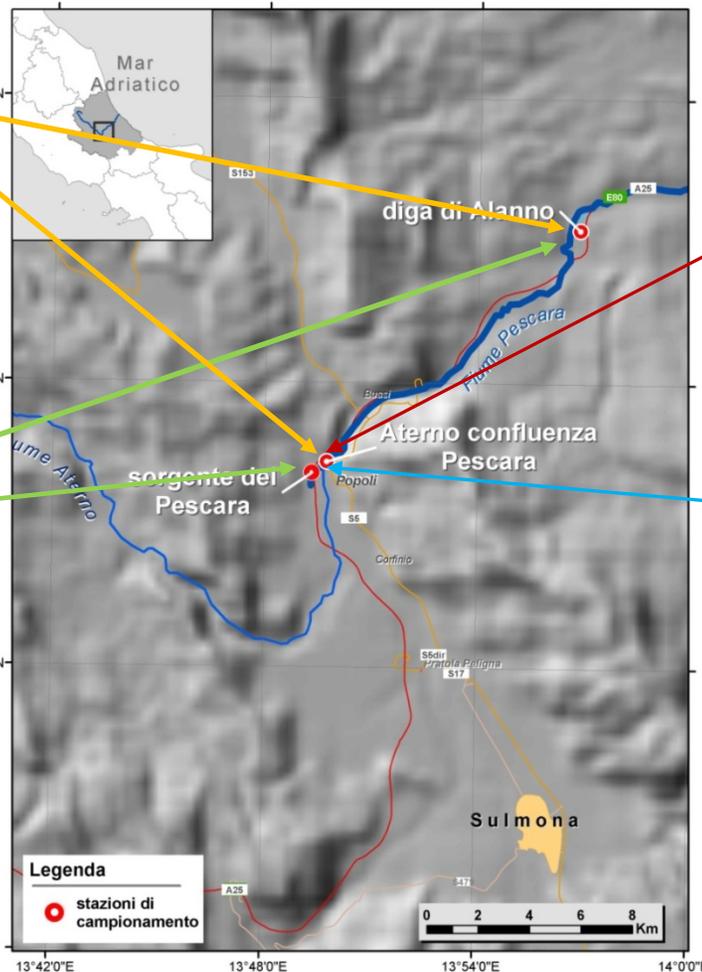
Lombrico (*Lumbricus terrestris*)

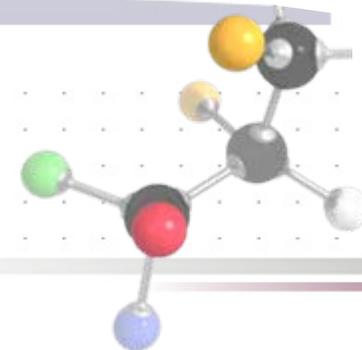


Trota (*Salmo trutta*)



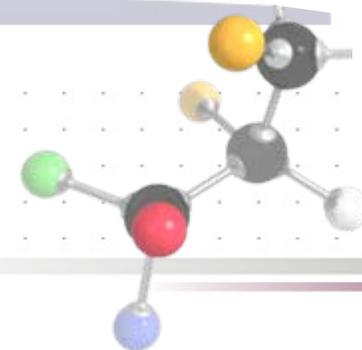
Folaga (*Fulica atra*)





Parametri analizzati

PFC	fegato e muscolo barbo e trota; uova folaga; lombrico
Ftalati	uova folaga, lombrico
PCB, PBDE, IPA ed elementi in tracce (As, Cd, Hg, Pb)	fegato barbo e trota; uova folaga; lombrico
<i>p</i> NP	lombrico
EROD (7-etossi/7-metossi/7-benzossi/7-pentossiresorufina-O-deetilasi) e UDPGT (uridin difosfatoglucuronisil transferasi)	frazione microsomiale epatica barbo
GST(glutatione-S-trasferasi)	frazione citosolica epatica barbo
AChE (acetilcolinesterasi)	cervello barbo
Metaboliti biliari IPA	bile barbo
Micronuclei	eritrociti barbo



Metodi di analisi: bioaccumulo contaminanti

PFC e ftalati

PFOS e PFOA e DEHP e MEHP sono estratti utilizzando due diverse procedure di separazione liquido-liquido e determinati tramite LC-ESI-MS

PCB, PBDE e IPA e *p*-NP

Estrazione in ASE e successive purificazioni del campione specifiche per ogni categoria di composti.

Determinazione strumentale:

PCB → GC-ECD

IPA → HPLC-FL-PDA

p-NP e PBDE → GC-MS

Elementi in tracce

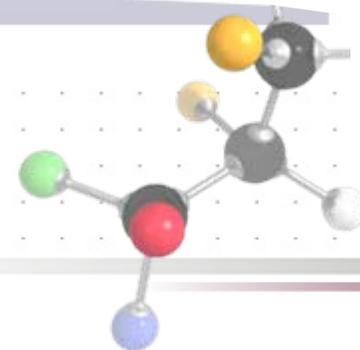
Campioni liofilizzati, direttamente nel contenitore di trasporto, determinazione rapporto peso fresco/peso secco.

Mineralizzazione con HNO_3 , in contenitori di Teflon, sotto pressione, a 120°C , per 8 ore.

Determinazione strumentale:

Pb, As e Cd → spettrofotometria di assorbimento atomico

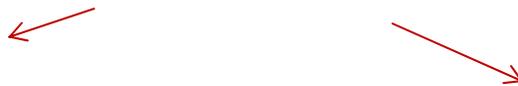
Hg → spettrofotometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS)



Metodi di analisi: risposte enzimatiche

Estrazione delle frazioni citosolica e microsomiale epatiche per l'analisi successiva di *biomarker*

I campioni di fegato vengono centrifugati ottenendo un così un pellet ed un sovrnatante; quest'ultimo centrifugato nuovamente così da ottenere un nuovo pellet ed un nuovo sovrnatante che sono rispettivamente le frazioni **microsomiale e citosolica**



EROD (7-etossiresoruffina-O-deetilasi)

Miscela di reazione costituita da: Tris-HCl e NADPH;
lettura spettrofluorimetria

UDPGT (uridin difosfato-glucuronosiltrasferasi)

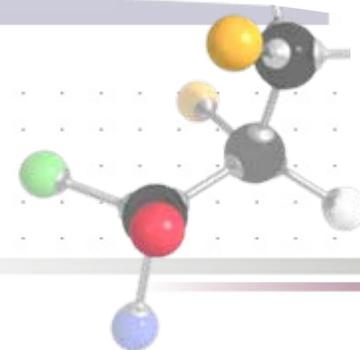
Miscela di reazione costituita da: 4-metilumbelliferone e acido glucuronico;
lettura spettrofotometria

GST (glutathione-S-trasferasi)

Miscela di reazione costituita da: 1-cloro-2,4-dinitrobenzene e glutathione;
lettura spettrofotometria

AChE (acetilcolinesterasi)

La miscela di reazione è costituita da: Tris-CaCl₂, DTNB, ATCI; determinazione spettrofotometrica



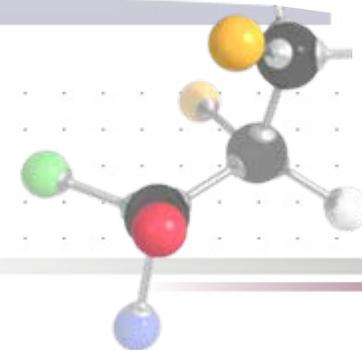
Metodi di analisi

Metaboliti biliari IPA

La quantità di metaboliti degli IPA contenuti nella bile è stata determinata con un metodo spettrofluorimetrico. I reagenti utilizzati sono etanolo e H₂O.

Micronuclei

La determinazione dei micronuclei negli eritrociti nel barbo, preventivamente trattati con EDTA e poli-L-lisina, è stata effettuata al microscopio ottico.



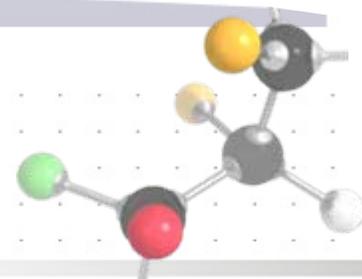
Risultati: PFC, ftalati e *p*-NP

I composti perfluorurati considerati (PFOS e PFOA), in fegato e muscolo di barbo, fegato e muscolo di trota, uova di folaga e lombrichi sono risultati sempre <LOD (0,5 ng/g).

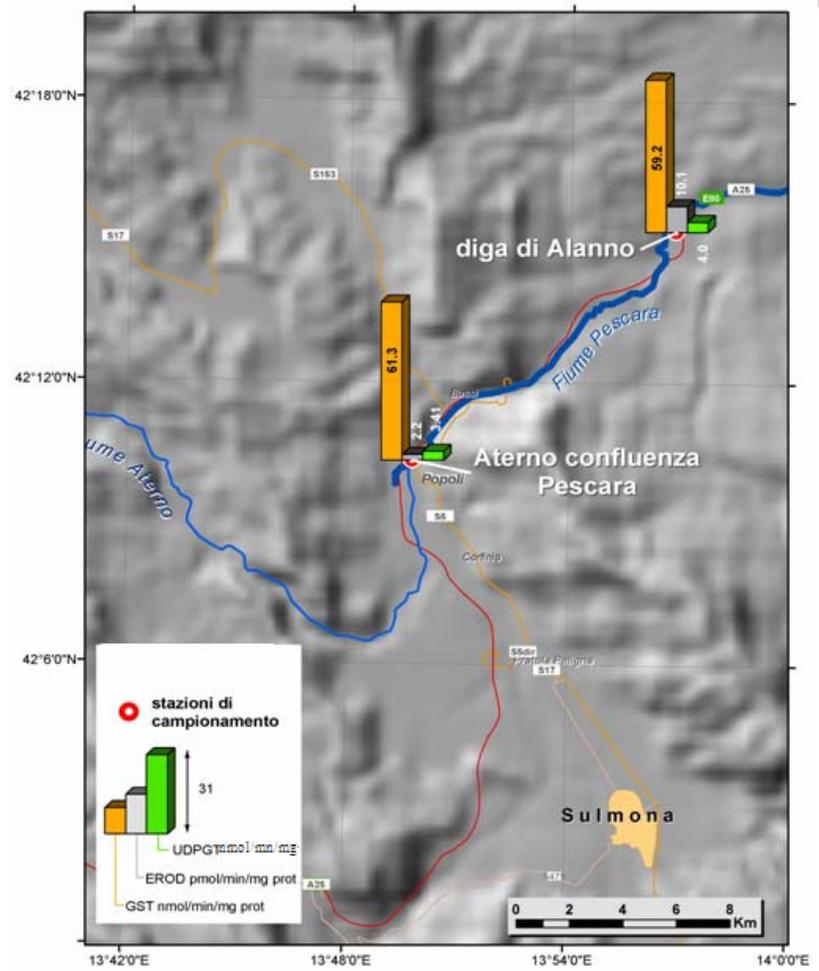
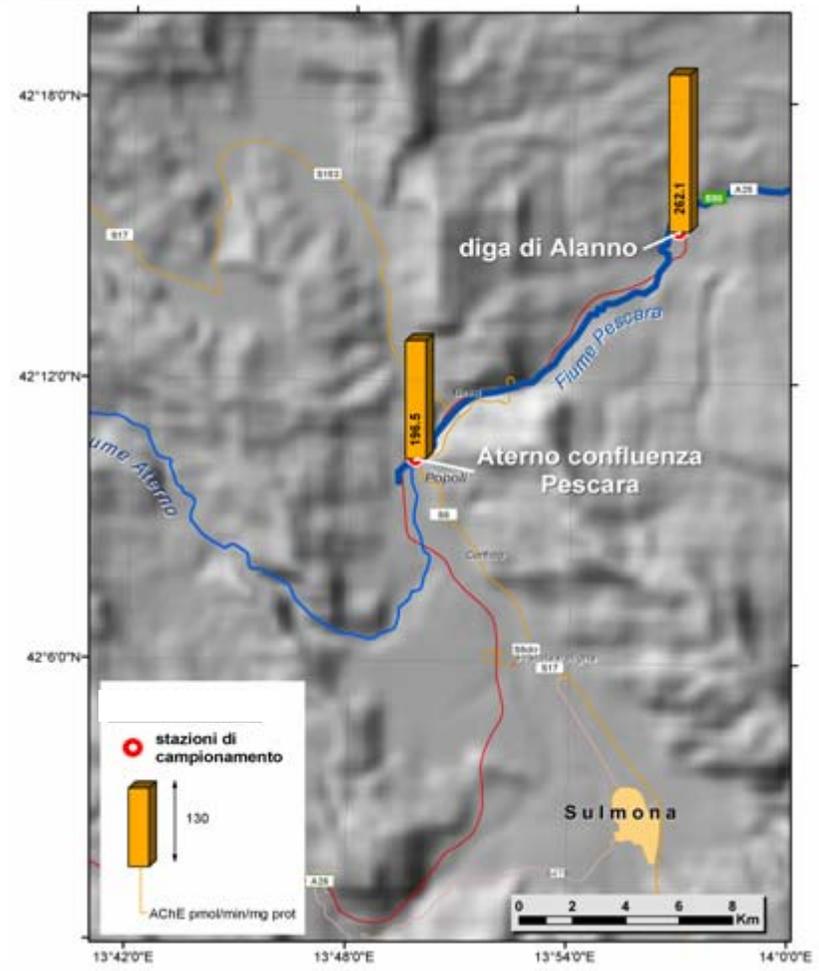
Le concentrazioni degli ftalati considerati (DEHP e MEHP), in uova di folaga e lombrico risultano essere tutte <LOD (0,25 ng/g).

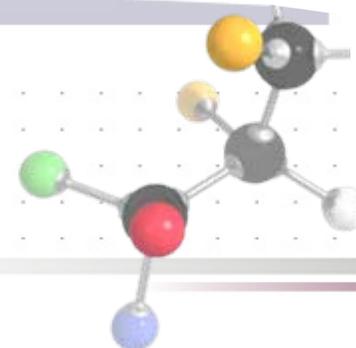
La determinazione di *p*-NP in campioni di lombrico ha evidenziato una bassa contaminazione nell'area della sorgente del fiume Pescara (media $0,5 \pm 0,6$ ng/g p.f.) e concentrazioni <LOD (1 ng/g p.f.) nell'area della diga di Alanno.

Poiché la contaminazione da *p*-NP in ambiente terrestre è legata a fanghi di depurazione o alla sua presenza nei fertilizzanti, si può concludere che nella zona della diga di Alanno è assente una contaminazione attuale o pregressa mentre i bassissimi livelli determinati nei lombrichi provenienti dalla zona della sorgente non sono in grado di disturbare il sistema ormonale e la riproduzione di questi invertebrati (Jensen *et al.*, 2009. *Ecotoxicol Environ Saf* **72**: 10-16).

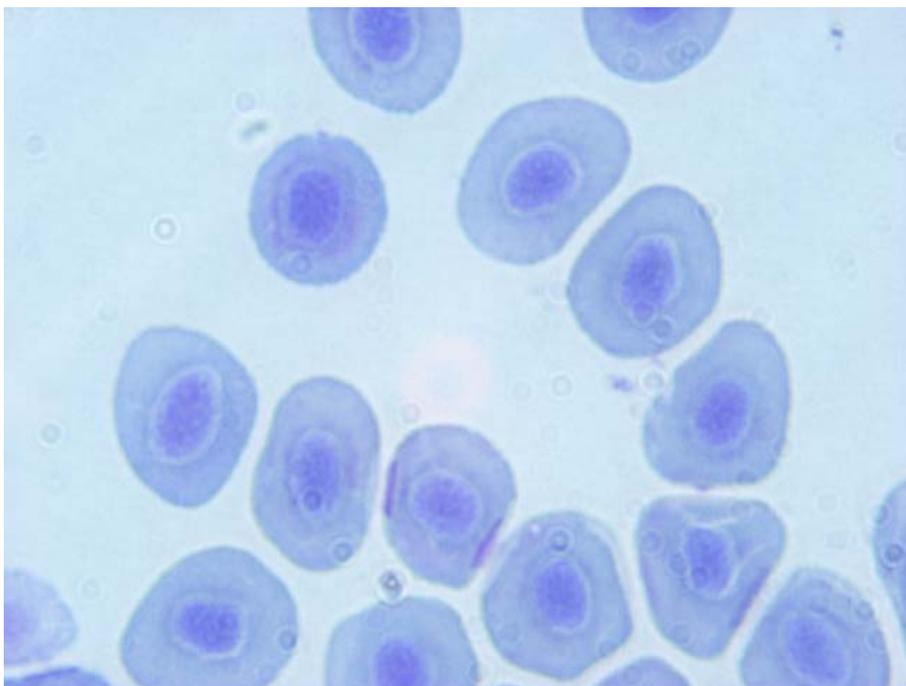


Risultati: risposte enzimatiche

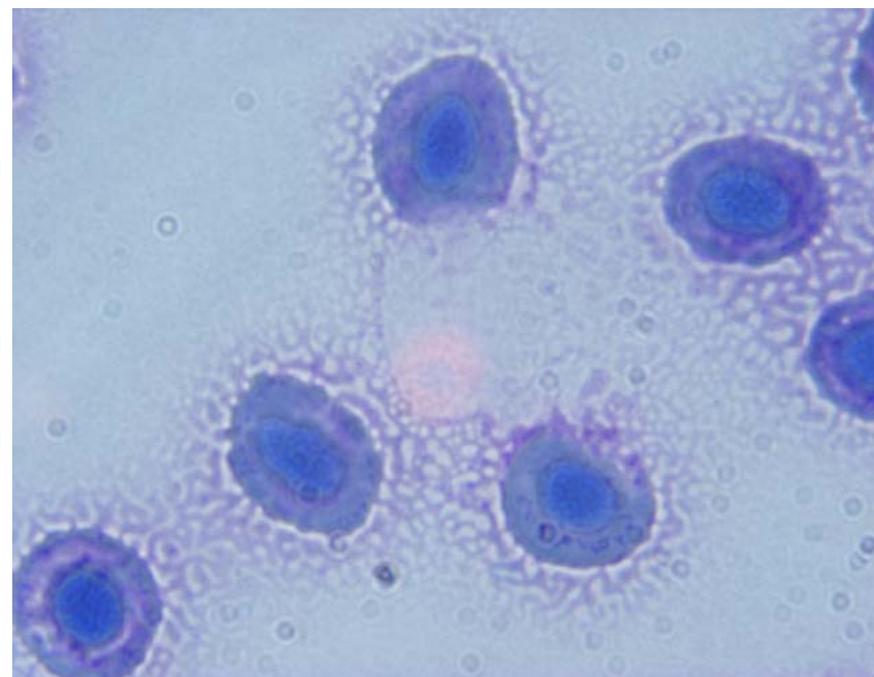




Risultati: micronuclei

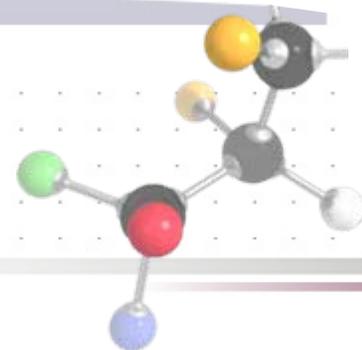


Cellule di esemplari di *Barbus tyberinus* campionati alla Diga di Alanno



Cellule di esemplari di *Barbus tyberinus* campionati alla confluenza Aterno-Pescara

L'assenza di micronuclei esclude attività genotossiche negli esemplari studiati.



Considerazioni conclusive

Per la limitatezza del piano sperimentale questa parte di PREVIENI si configura come una sorta di “progetto pilota” sull’area indagata., che ha fornito comunque un’importante indicazione circa la maggior contaminazione dell’area della Diga di Alanno rispetto ai siti di controllo.

Dallo studio di effettuato sono emersi livelli di contaminazione minimi per la totalità dei bioindicatori considerati.

Questo aspetto porta ad ipotizzare livelli di contaminazione ambientale molto bassi, almeno per quanto riguarda i contaminanti oggetto di studio, dando, in questo senso, un’indicazione di conservazione dell’ambiente naturale.

I bassissimi livelli di accumulo di interferenti endocrini determinati nei bioindicatori e confermati dalle risposte enzimatiche, non risultano in grado di disturbare il sistema ormonale e la riproduzione di questi organismi.

Un’interpretazione più approfondita dei risultati ottenuti in questa parte dello studio potrà essere fatta quando sarà possibile inquadrarli nel contesto generale dei risultati del progetto nel suo complesso.

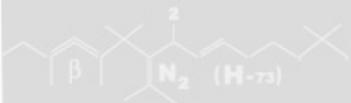
**Cristiana Guerranti¹, Emiliano Fanello¹, Guido Perra¹, Michela Mariottini¹,
Costanza Burroni¹, Davide Baroni¹, Nicoletta Borghesi¹, Camilla Della Torre¹,
Ilaria Corsi¹, Valerio Volpi¹, Dante Caserta², Augusto De Sanctis², Silvano Focardi¹**

1 Dipartimento di Scienze Ambientali "G.Sarfatti", Università degli Studi di Siena

2 WWF Sezione Abruzzo, Pescara

cristianaguerranti@unisi.it

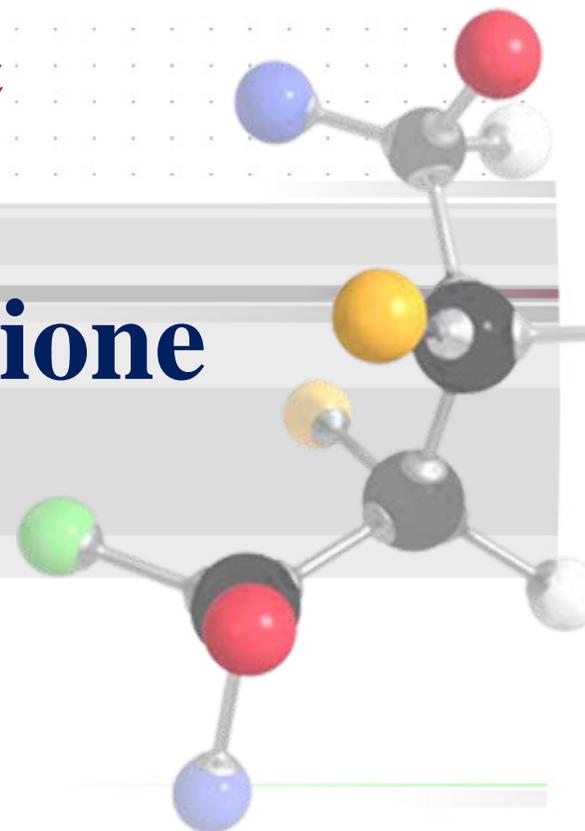
Grazie per l'attenzione



P R E V I E N I



Salute riproduttiva e contaminanti



I risultati del biomonitoraggio ambientale di PREVIENI