

Valutazione della tossicità e del trasferimento trofico in *Spirodela polyrhiza* (L) Schleid. e *Echinogammarus veneris* (Heller, 1865) esposti a microparticelle di polietilene

Iannilli V.¹, Passatore L.², Carloni S.², Lecce F.¹, Pietrini F.², Zacchini M.²

¹ENEA, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile, Lab. Biodiversità ed Ecosistemi, C.R. Casaccia, 00123 Roma (ITALY)

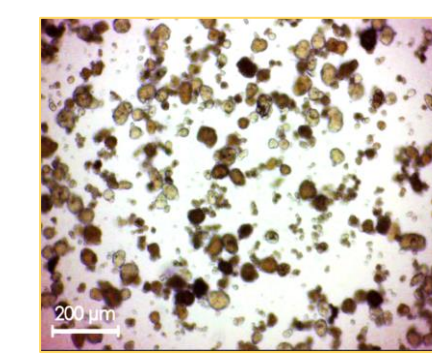
²Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), 00015 Monterotondo, Roma (ITALY)

E-mail: massimo.zacchini@cnr.it

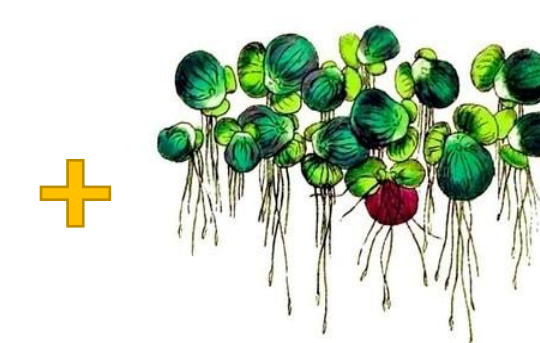
Il rilascio e l'accumulo di detriti di plastica nei comparti terrestre e acquatico rappresentano minacce ambientali di crescente preoccupazione per l'ecosistema e la salute umana. Infatti, al di là della loro presenza e persistenza nell'ambiente, il destino e la tossicità delle microplastiche (MP) negli organismi d'acqua dolce, in particolare nei produttori primari e nei detritivori, devono ancora essere chiariti. Attualmente, si sostiene che l'adsorbimento di particelle di plastica osservato sulle radici delle piante possa causare il trasferimento di MP a diverse specie erbivore all'interno dell'ecosistema acquatico. Le lenticchie d'acqua (*duckweed*, Araceae, Lemnoideae) sono minuscole specie vegetali che galleggiano liberamente, produttori primari nella rete alimentare acquatica e comunemente utilizzate come modello nei test di tossicità per gli xenobiotici. I crostacei anfipodi svolgono un ruolo fondamentale nel ciclo dei nutrienti negli ecosistemi acquatici, essendo i principali trasformatori di materia organica. A causa del loro ruolo trofico, possono interagire con le particelle di MP e ingerirle confondendole con le particelle di cibo. Possono quindi costituire punti di ingresso per le MP nella rete alimentare. Una volta ingerite, le MP possono essere disponibili ai livelli trofici superiori, fino all'uomo. L'adsorbimento di MP in *Lemna minor* (Mateos Cardenas et al., 2019) e l'ingestione negli anfipodi sono già stati documentati (Iannilli et al., 2020).

Scopo: valutare la capacità delle lenticchie d'acqua di adsorbire le MP sulle fronde e di trasferirle (*trophic transfer*) ad un gammaride anfipode in parallelo alla valutazione dell'ecotossicità e genotossicità in entrambe le specie dulcacquicole. La risposta delle due specie può contribuire a far luce sulla loro vulnerabilità all'esposizione alle MP e sui meccanismi coinvolti nelle risposte alla contaminazione da MP in ambito acquatico.

SISTEMA TROFICO SPERIMENTALE



Particelle di polietilene (MP) di grandezza 40-48 μm

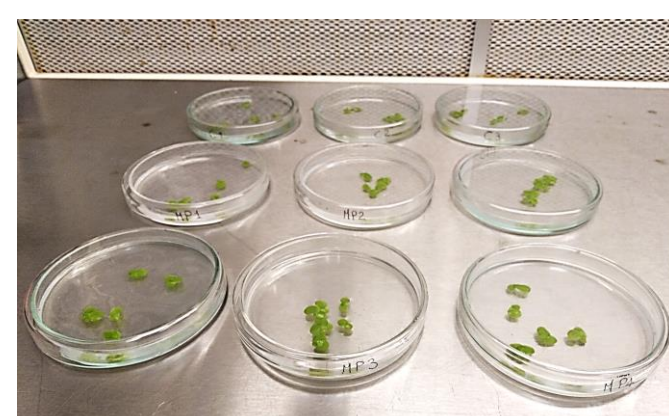


Spirodela polyrhiza (L.) Schleid.

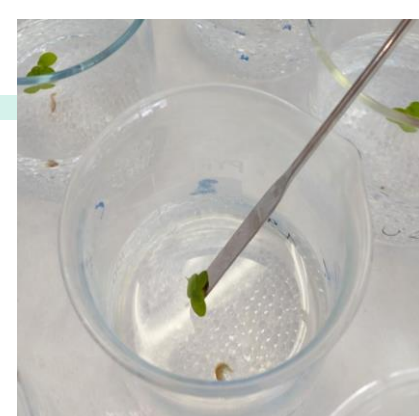


Echinogammarus veneris (Heller, 1865)

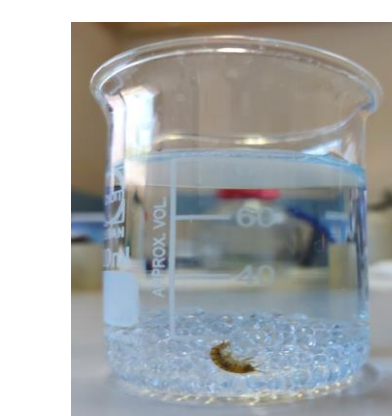
SET-UP SPERIMENTALE



Spirodela polyrhiza esposta per 7 giorni a 400 μg/ml MP (circa 50000 particelle/mL) per lo studio di effetti a livello biometrico e fotosintetico



1 colonia di *S. polyrhiza* dopo 24h di esposizione a MP posta in presenza di 1 individuo di *Echinogammarus veneris* (20 repliche) per 24 h per verificare l'ingestione di MP da parte dell'anfipode

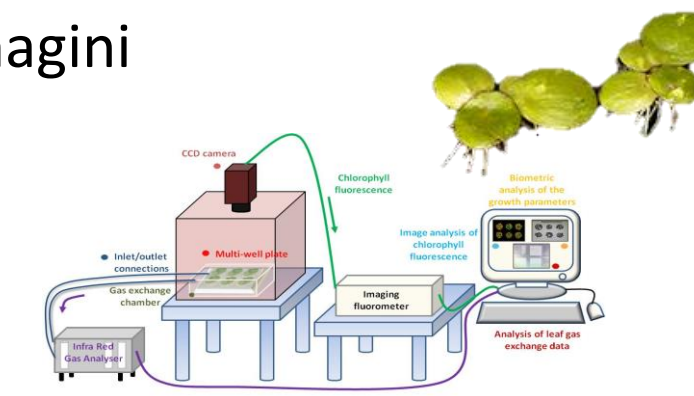


E. veneris esposto a MP disperse in acqua per 24 h per valutare l'effetto genotossico



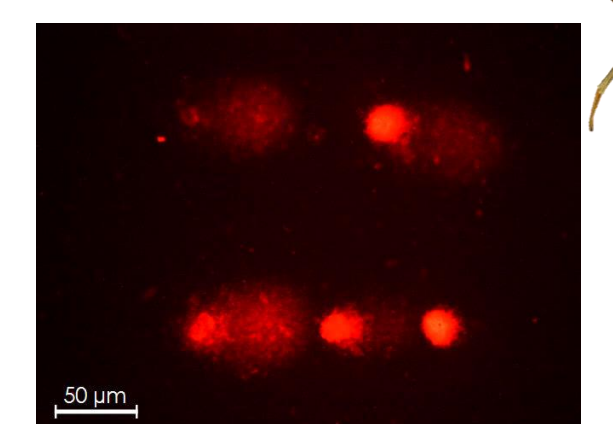
Fronde di *Spirodela* dopo esposizione per 24h alle MP sono state usate per alimentare gli anfipodi e quantificare la possibile ingestione di MP. Individui di *E. veneris* sono stati dissezionati per estrarre il tubo digerente, posto poi in H₂O₂ 30% per digerire la sostanza organica. La sospensione ottenuta è stata filtrata e colorata (Nile red) per evidenziare le MP (Iannilli et al. 2020)

Parametri biometrici e fotosintetici in *S. polyrhiza* sono stati valutati in real-time e in maniera non distruttiva mediante un sistema ad immagini



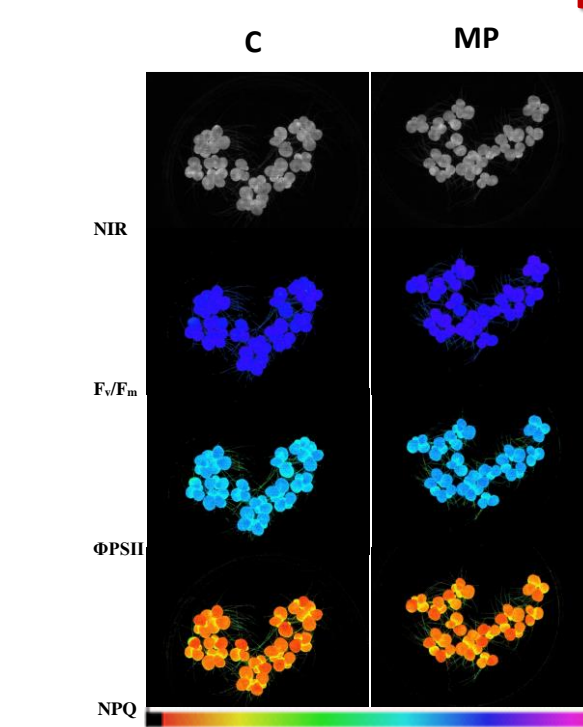
ECOTOX PHOTOSYSTEM TOOL (Pietrini and Zacchini, 2020)

Il livello di danno al DNA indotto dalle MP è stato determinato in *E. veneris* mediante Comet assay



COMET ASSAY (Cosentino et al., 2022)

RISULTATI: effetti su Spirodela



Near Infrared (NIR) e imaging di fluorescenza della clorofilla: maximum quantum yield of PSII photochemistry (Fv/Fm) in fronde adattate al buio; quantum efficiency of PSII photochemistry (Fv/Fm) e non-photochemical quenching (NPQ) ad illuminazione steady state di 60 μmol fotoni m⁻²s⁻¹ (scala in falsi colori, 0 black -1 pink)

Treatment	Biometric and physiological parameters						Tot Chl (g m ⁻²)
	TFA (mm ²)	MFA (mm ²)	FN	MR	T _d	μ _{0.7}	
C	1376±54	23.349±0.001	59.0±2.6	79.5±2.8	2.39±0.03	0.171±0.005	0.400±0.010 a
MP	1275±50	23.322±0.001	54.6±2.1	74.8±2.3	2.45±0.03	0.160±0.005	0.328±0.007 b
P	0.241	0.891	0.263	0.268	0.372	0.246	0.095

TFA - Total frond area; MFA - mean frond area at the end of the experiment; FN - Total frond number; MR - Multiplication rate, calculated on the basis of changes in FN; T_d - Doubling time of frond number; μ_{0.7} - Average specific growth rate, calculated on the basis of changes in FA; Tot Chl - Total chlorophyll content

Treatment	Spectral reflectance index values				
	PRI	PSSRa	PSSRb	PSSRc	NPQI
C	0.029±0.001	12.35±0.58 a	5.39±0.22 a	12.21±0.55 a	0.065±0.005
MP	0.024±0.002	9.45±0.28 b	4.35±0.19 b	9.42±0.19 b	0.055±0.012
P	0.100	0.011	0.024	0.009	0.531

PRI - Photochemical Reflectance Index; PSSRa - Pigment Specific Simple Ratio Chl a; PSSRb - Pigment Specific Simple Ratio Chl b; PSSRc - Pigment Specific Simple Ratio c; NPQI - Normalized Photochemical Reflectance Index; ARI - Anthocyanin Reflectance Index

Dopo 7 giorni, l'esposizione alle MP ha causato: nessuna alterazione di indici biometrici; una leggera riduzione del contenuto totale di clorofilla che non altera lo stato fisiologico (*Chl fluorescence imaging*); una leggera riduzione dei valori degli indici spettrali per clorofilla a (PSSRa), clorofilla b (PSSRb) e carotenoidi (PSSRc)

RISULTATI: effetti su Echinogammarus

Ingestione di MP



Dopo il **feeding** di *E. veneris* con *S. polyrhiza* contaminata da MP, gli anfipodi hanno ingerito circa 8 particelle di MP per individuo

Genotossicità di MP



Dopo 24h di **esposizione diretta** di *E. veneris* a MP in acqua (40μg/ml), si rileva un significativo danno al DNA (Comet assay sugli emociti circolanti) in confronto con i controlli negativi (esemplari esposti alla sola acqua)

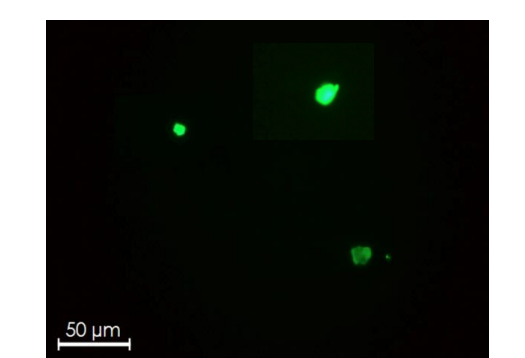
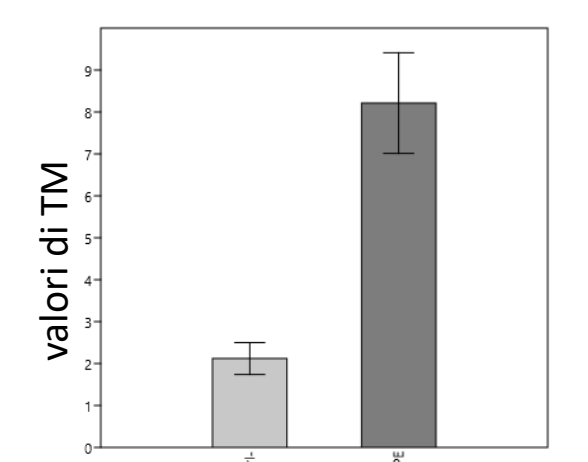


Immagine al microscopio di MP, estratte dal tubo digerente, poste su filtro, colorate con Nile red e osservate in fluorescenza nel verde



Tail Moment (TM), definito come il prodotto della lunghezza della coda della cometa e la frazione del DNA totale nella coda

- ➔ Gli effetti delle MP osservati sulle piante di *Spirodela* sono risultati limitati, anche se centinaia di particelle di MP sono state rilevate adsorbite sulle fronde delle piante e sulla superficie radicale
- ➔ L'adesione delle MP sulle piante di *Spirodela polyrhiza* può promuovere il loro trasferimento e ingestione da parte di consumatori primari, quali gli anfipodi, con l'alimentazione. Tali MP possono potenzialmente raggiungere l'uomo attraverso la catena trofica acquatica
- ➔ L'effetto genotossico delle MP su *E. veneris* desta preoccupazione, considerando l'esposizione in natura a questi xenobiotici
- ➔ Il danno al DNA può essere usato come *proxy* per la valutazione del rischio ambientale dovuto alla contaminazione da MP

