

PRIN 2022 Deep-sea Elasmobranchs as Environmental Pollution sentinels in the MEDiterranean (DEEP-MED)

DESCRIZIONE DEL PROGETTO

Le profondità marine sono una regione chiave per valutare l'accumulo, la distribuzione e il trasferimento trofico di oligoelementi (TE) provenienti da fonti naturali e antropogeniche e di microplastiche (MP). Tra gli organismi che vivono in un ambiente di acque profonde, gli elasmobranchi svolgono un ruolo cruciale nella regolazione di questi ecosistemi. Inoltre, le specie di elasmobranchi di acque profonde sono longeve, con tassi di crescita lenti e probabilmente raggiungono la maturità a un'età avanzata rispetto alle specie delle aree continentali di piattaforma; tendono anche a nutrirsi a livelli trofici più elevati rispetto alle loro controparti di acque poco profonde e quindi potrebbero essere esposte a livelli più elevati di TE e MP per periodi più lunghi, con conseguente maggiore accumulo.

DEEP-MED si propone di confrontare i tassi di accumulo di TE e MP in quattro diverse specie di elasmobranchi di acque profonde bentopelagiche con ecologia e abitudini alimentari diverse (*Galeus melastomus*, *Scyliorhinus canicula*, *Raya clavata* e *Chimaera monstrosa*), considerando la correlazione con i tassi di crescita e lo stato riproduttivo, il carico parassitario e gli effetti sull'anatomia cerebrale, il comportamento e lo sviluppo embrionale dopo l'esposizione delle uova in via di sviluppo al mercurio. L'area di studio è rappresentata dalla Calabria tirrenica e da Mazara del Vallo (nel Canale di Sicilia).

Il progetto contribuirà a colmare le lacune nella conoscenza dell'ecologia e della biologia delle specie di elasmobranchi di acque profonde del Mediterraneo, fornendo nuove informazioni sull'impatto antropico su questi organismi marini vulnerabili, nonché una base di conoscenze sulle loro caratteristiche di vita. I risultati del progetto evidenzieranno anche le opportunità offerte dal Mediterraneo centrale come sito chiave per il monitoraggio degli elasmobranchi del Mediterraneo, grazie alla sua particolare posizione geografica.

I risultati attesi saranno

- 1 - nuove informazioni sulla biologia, la crescita e l'ecologia delle specie di acque profonde del Mediterraneo
- 2 - l'accumulo di TE nei tessuti molli (muscolo, fegato, pelle, cervello) e nelle vertebre: correleremo queste informazioni con i tassi di crescita, il carico parassitario e l'anatomia del cervello
- 3 - la descrizione della composizione faunistica delle comunità di elminti in elasmobranchi con diversi stili di vita e il calcolo dei principali indici parassitologici (prevalenza, intensità, dominanza)
- 4 - bioaccumulo di mercurio nei tessuti e nel cervello: forniremo nuove conoscenze sui possibili meccanismi protettivi che si verificano nel cervello degli squali in seguito all'esposizione embrionale, definendo la percentuale di assorbimento dall'ambiente, identificando la distribuzione del metallo nel tessuto cerebrale e valutando i biomarcatori di stress ossidativo e le alterazioni comportamentali.
- 5 - informazioni sulla diffusione delle microplastiche tra i contenuti gastrici, che ci permettono di valutare come questi contaminanti si distribuiscono e impattano su ambienti così particolari e specifici.

Il punto di forza del progetto è la natura multidisciplinare del gruppo di progetto che otterrà informazioni su un numero rappresentativo di specie di elasmobranchi e su diversi aspetti del loro ciclo di vita.

Piano attività

Il progetto si dividerà in due fasi: 1) analisi di esemplari selvatici derivati da pesca commerciale (in collaborazione con altri enti di ricerca), sia per quanto riguarda i livelli di mercurio, che per l'analisi della loro neuroanatomia (sia in elasmobranchi che in osteoitti); 2) valutazione in laboratorio dell'assorbimento embrionale del mercurio e dei potenziali effetti avversi a carico del sistema nervoso centrale.

Analisi di esemplari selvatici

Per ogni specie considerata verranno campionati almeno 40 esemplari, da cui verranno prelevati gli organi target per l'accumulo del mercurio e di riferimento per la sicurezza alimentare (cervello, fegato, muscolo). Il tessuto cerebrale verrà prelevato al momento della salpata della rete, e verrà suddiviso in due porzioni, una destinata all'analisi tossicologica e di quantificazione dello stress ossidativo, e una per le valutazioni istologiche, effettuate su un numero di non più di 5 animali/specie.

I marcatori di stress ossidativo (glutazione totale, 8-isoprostaglandina F2alfa e proteina S100b) saranno misurati su aliquote di tessuto cerebrale utilizzando saggi disponibili in commercio e già testati sugli squali. L'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) sarà determinata secondo la metodica di Ellman et al. (1961), che prevede la valutazione dell'attività dell'enzima con metodo spettrometrico, leggendo a 412 nm, in presenza di acetilficolina come substrato.

I livelli di mercurio nei vari tessuti considerati verranno analizzati con metodo ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optic Emission Spectrometry) dopo digestione a microonde dei tessuti (cervello, fegato e muscoli). Verrà utilizzato uno strumento Perkin Elmer Optima 2100 DV, abbinato a un nebulizzatore a ultrasuoni CETAC U5000AT+. In ogni set di analisi saranno inclusi due bianchi per controllare la purezza chimica e l'accuratezza del metodo sarà verificata con materiali di riferimento.

Sarà inoltre effettuata la ricerca di microplastiche dal contenuto gastrico degli esemplari campionati, utilizzando una metodica che prevede la digestione acido-basica del campione e la sua filtrazione, seguita da colorazione con Rosso Nilo e lettura a microscopio a fluorescenza degli estratti.

Da punto di vista neuroanatomico, per ogni specie considerata (elasmobranchi e osteoitti) verrà campionato un totale di 5 cervelli. I cervelli saranno trattati per la colorazione della tionina, la colorazione del mercurio e l'immunoistochimica. La colorazione della tionina sarà essenziale per determinare le aree del cervello, mentre la colorazione del mercurio ci fornirà la distribuzione del mercurio nel cervello. Nella procedura immunoistochimica, sezioni del cervello saranno colorate con anticorpi contro la popolazione neuronale totale (anticorpo contro PGP9.5), cellule gliali (anticorpo contro la proteina dell'acido fibrillare gliale - GFAP), neuroni colinergici (anticorpo contro la colina acetiltransferasi - Chat) e neuroni serotoninergici (anticorpi contro la serotonina e il trasportatore della serotonina - SERT). L'immunoistochimica combinata con un software specifico sarà utilizzata per le determinazioni morfometriche e densitometriche della popolazione neuronale totale, dei neuroni colinergici e dei neuroni serotoninergici. L'immunoistochimica combinata con la tecnica del thresholding sarà utilizzata per la determinazione quantitativa delle cellule neuronali (inclusi somata e processi colinergici e serotoninergici) e gliali. Le immagini ottenute saranno prima

"thresholded" in modo che solo i pixel al di sopra del livello di soglia saranno contati come elementi gliali e neuronali di etichettatura positiva. Il livello di soglia sarà impostato rispetto al livello di fondo delle sezioni di controllo negativo. L'area di pixel occupata da elementi gliali e neuronali positivi sopra il livello di soglia sarà misurata in ogni area del cervello, e le frazioni percentuali saranno calcolate.

Esposizione in ovo al mercurio

Per valutare se il mercurio possa influenzare la forma fisica e la sopravvivenza dei giovani, uova di *Scyliorhinus* saranno esposte a concentrazioni rilevanti dal punto di vista ambientale di mercurio per l'intero sviluppo embrionale. Saranno preparati un gruppo di controllo e due gruppi esposti (a bassa dose, LD, e ad alta dose, HD), ogni gruppo sarà fatto in triplicato, e ogni vasca includerà 12 uova (108 uova in totale). Le uova saranno lasciate sviluppare e schiudere normalmente, e i nuovi nati saranno osservati per il comportamento per 15 giorni per valutare se qualsiasi differenza nel comportamento alimentare e sociale possa essere correlato all'esposizione al mercurio. Due uova/vasca saranno campionate appena prima della schiusa, e tutti i neonati saranno sacrificati e analizzati per i residui di mercurio alla fine dei 15 giorni. Per quanto riguarda le analisi comportamentali saranno identificate le unità comportamentali di base eseguite dai neonati attraverso osservazioni di scansione e campionamento focale. Sarà poi costruita la matrice di transizione per le vasche trattate e di controllo per evidenziare e quantificare eventuali differenze comportamentali. Alla nascita e al giorno 15 saranno anche raccolti campioni di sangue per valutare eventuali effetti ematocimici negativi indotti dal mercurio.

Dato che gli animali saranno osservati anche dopo lo sviluppo embrionale fino al giorno 15 di vita, sarà richiesto il permesso del comitato etico.

Dagli esemplari saranno prelevati gli stessi campioni prelevati dagli esemplari selvatici, che saranno sottoposti alle stesse analisi.

La stessa sperimentazione verrà effettuata anche su uova di osteoitti, per una valutazione comparativa.

Si prevede di arrivare alla produzione di almeno due articoli su riviste peer-reviewed, una in ambito tossicologico e una in ambito anatomico.