



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



**BORSE DI STUDIO DI DOTTORATO DI RICERCA SU TEMATICHE
GREEN (AZIONI IV.5) D.M. 10 agosto 2021, n. 1061**

Anno Accademico 2021/2022

Dottorato di Ricerca

in BIOMOLECULAR AND HEALTH SCIENCES

Ciclo XXXVII

***Theme: "Isopods as efficient Ecosystem Bioindicators:
biological parameters detectable in flow cytometry as
guidelines of rapid and reproducible test for the assessment of
Environmental Quality"***

Giovanna Panza

Applicazione della citometria a flusso su cellule di epatopancreas di Isopodi per la valutazione dello stato di vitalità cellulare.

Tematica GREEN

**RICERCA
PROPOSTA**

*breve
descrizione della
ricerca proposta
dal candidato
strutturata nel
seguente modo:
introduzione
della
problematica nel
contesto
scientifico
internazionale,
rilevanza del
problema,
metodo
attraverso il
quale il
problema verrà
affrontato,*

Da molto tempo i ricercatori si sono interessati alla diversa sensibilità di alcuni organismi nei confronti delle variazioni ambientali, facendo nascere il settore della bioindicazione. Molti articoli a livello internazionale propongono la caratterizzazione di ecosistemi attraverso tecniche di biomonitoraggio, utilizzando come strumenti di indagine organismi vegetali e/o animali che presentano una specifica sensibilità verso determinati fattori di disturbo ambientale e che, pertanto, sono definiti genericamente “bioindicatori”.

A questo proposito molti studi riportano l’alta capacità di bioindicazione degli Isopodi (Crustacea, Oniscidea), soprattutto l’alta capacità di accumulare contaminanti.

Manti et al. (2013) dimostrano la reale potenzialità di questi organismi nel rispondere in maniera critica e sensibile a variazioni ambientali in modo rapido e predittivo, in particolare, attraverso le valutazioni di alcuni parametri dello stress cellulare rilevato negli epatociti (alterazioni dell’attività mitocondriale e lisosomiale, accumulo di ROS, apoptosi). Dunque, l’oggetto dello studio saranno gli epatociti (cellule B e cellule S), ossia cellule di epatopancreas, data la sua funzione di accumulo di contaminanti.

Rilevare un’alterazione ambientale in modo il più possibile preventivo prima ancora che abbia generato un effetto ecologico macroscopico sarebbe utile ed efficace per diversi ambiti.

Gli Isopodi potrebbero essere il giusto mezzo per poter individuare “contaminazioni nascoste” dell’ambiente in cui vivono.



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



obiettivi e
risultati attesi,
bibliografia.

Questi animali esposti a condizioni sfavorevoli, prima di manifestare un effetto ben visibile (ad es. asimmetrie corporee), potrebbero accumulare un “debito” che noi potremmo essere in grado di ricercare e valutare all’interno degli epatociti.

Ricerche in corso del nostro gruppo di lavoro hanno confrontato siti diversi, e hanno riportato dati coerenti e prevedibili: in aree apparentemente non contaminate si riscontra un basso livello di danno cellulare; un livello intermedio in aree variamente urbanizzate; ed alto in siti urbanizzati (spesso aree industriali).

Questo database di dati raccolti da siti di riferimento potrebbe costituire la base per la costruzione di un sistema analitico in grado di associare un livello di stress cellulare ad uno stato (livello) di qualità ecologico-ambientale.

Il programma di ricerca comprende principalmente tre fasi di lavoro.

Una prima fase sul campo, come la raccolta dei campioni in siti precedentemente individuati, che può essere mirata a caratterizzare il sito o anche stagionale per capire le dinamiche dell’inquinante e il rapporto con l’indicatore. La raccolta degli Isopodi avverrà in diversi ambienti a diverso grado di impatto antropico presumibilmente con un diverso grado di stress. Si sceglieranno alcuni siti dove si conosce il livello di contaminazione anche considerando i *Siti Interesse Nazionale* individuati da ISPRA. Un sito di riferimento è la discarica di Ginestreto gestita da Sogliano Ambiente SpA nel Comune di Sogliano al Rubicone (FC) perchè esiste una grande quantità di dati raccolti e informazioni dal momento che è stata protagonista di diversi lavori sulla stessa tematica.

Una parte in laboratorio con analisi citofluorimetriche e microscopiche sul materiale raccolto ed in particolare gli epatociti. In laboratorio, l’analisi dei campioni verrà effettuata mediante citofluorimetria a flusso e microscopia. Ci sarà una prima fase di preparazione del campione che prevede l’estrazione



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



dell'epatopancreas e la disgregazione tissutale per poter ottenere cellule in sospensione in una soluzione di PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). Per purificare le cellule prima dell'analisi citometriche si eseguirà una centrifugazione del campione in modo da eliminare materiale estraneo non utile ai fini delle analisi (es. polvere, batteri ecc.). Saranno utilizzate sonde fluorescenti come dimostrato in Manti et al., 2013.

Pertanto dopo una prima formazione sulle tecniche e procedure laboratoriali si prevede di pianificare la parte ecologico-ambientale del progetto (siti di prelievo, numero di siti/animali), e l'analisi dei campioni di Isopodi prelevati dai vari siti individuati nella ricerca, adottando i protocolli di disgregazione cellulare e di marcatura evidenziati in letteratura, ma anche inserendo l'utilizzo di nuovi probes fluorescenti (valutazione della presenza di metalli pesanti come cadmio e piombo, alterazioni dei livelli di GSH intracellulare) e nuovi protocolli di disgregazione tissutale, allo scopo di rendere le analisi sempre più standardizzabili.

La terza ed ultima fase è l'interpretazione dei dati, parte fondamentale del lavoro per poter individuare e stabilire i nuovi indici in grado di rappresentare il valore di qualità ecologico/ambientale di un sito.

Il risultato atteso è la messa a punto di nuovi protocolli per la realizzazione di un indicatore ecologico-ambientale mediante l'utilizzo di Isopodi, specie edafiche cioè influenzate dalle condizioni fisiche e chimiche degli strati superficiali del suolo.

Tale necessità è motivata dal fatto che le tradizionali analisi chimico-fisiche forniscono dati di tipo quantitativo, relativi all'istante del campionamento, che vengono espresse in termini di concentrazioni relative a singoli inquinanti chimici. Tuttavia, spesso non si hanno informazioni sufficienti riguardo la presenza nel tempo di queste molecole veicolate in atmosfera, trasportate dall'acqua o depositate sul suolo, la loro pericolosità e il grado di biodisponibilità, e in alcuni casi anche riguardo la formula chimica e l'origine.



	<p>Queste difficoltà possono essere superate con il monitoraggio biologico basato sul principio che gli organismi che vivono in un determinato ecosistema sono adattati al loro ambiente, pertanto cambiamenti, anche minimi delle condizioni ambientali, determinano cambiamenti negli organismi viventi opportunamente scelti e sensibili a tali modificazioni mantenendo la memoria dell'evento in seguito all'alterazione permanente sugli individui e sui parametri di popolazione.</p> <p><u>Bibliografia</u></p> <p>Manti A., Canonico B., Ciandrini E., Mazzeo R., Tsiola M., Santolini R., Papa S., 2011. Flow cytometric analyses of hepatopancreatic cells in terrestrial Isopods.. Cytometry. Part a, 2011. ISSN 1552-4922.</p> <p>Nannoni F., Mazzeo R., Protano G., Santolini R. 2014. Bioaccumulation of heavy elements by Armadillidium vulgare (Crustacea, Isopoda) exposed to fallout of a municipal solid waste landfill. Ecological Indicators 49:24–31. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.036</p> <p>Nannoni F., Mazzeo R., Santolini R., Protano G., 2017. Multi-matrix environmental monitoring to assess heavy element distribution around a municipal solid waste landfill in Italy. Int. J. Environ. Sci. Technol. (2017) 14:2591–2602 DOI 10.1007/s13762-017-1342-y</p>
<p><i>Evidenziare sinteticamente i caratteri di coerenza tra il progetto, la SNSI ed il PNR con riferimento anche alla capacità di favorire l'innovazione e l'interscambio tra mondo della</i></p>	<p>La presente proposta di ricerca ha uno spiccato carattere innovativo, perché prende spunto dalle ricerche di base per sviluppare modalità di analisi ambientale con indicatori biologici che possano caratterizzare il livello di inquinamento di diversi siti considerati attraverso la costruzione di un indice di valutazione.</p> <p>Questo indice (o indici) potrebbe essere in grado di rendere il monitoraggio più efficace e affidabile, sia perché gli Isopodi sono da tempo riconosciuti come bioindicatori in grado di evidenziare l'azione della contaminazione a livello cellulare, e sia perché in rapporto alle analisi chimico-fisiche del suolo, potrebbe consentire la misura del danno arrecato nel tempo alla biocenosi ed all'ecosistema.</p>



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



<p><i>ricerca e mondo produttivo nei settori dell'innovazione, del digitale e delle tecnologie abilitanti, nonché le potenziali ricadute scientifiche, economiche e sociali.</i></p>	<p>In particolare, potrebbe diventare un valido supporto per il monitoraggio e il controllo del comparto suolo per valutare il grado di alterazione e quindi operare per mitigare l'inquinamento da sostanze pericolose così come viene indicato e richiesto nell'articolazione 3 del PNR (<i>Programma Nazionale per le Ricerche</i>) <i>Prevenzione della contaminazione del suolo.</i></p> <p>Inoltre, secondo il PNR le <i>green technologies</i> contribuiscono in modo sostanziale allo sviluppo di un'economia industriale sostenibile e circolare; in particolare di queste <i>green technologies</i> il <i>cluster 6</i> fa riferimento alla riduzione dell'inquinamento. A questo proposito questa proposta di ricerca potrebbe essere in grado di intervenire sulle "esternalità" ambientali, come l'inquinamento del suolo, individuando possibili stress causati ad esempio da sostanze pericolose, in linea con quanto proposto dall'articolazione 6 del PNR.</p> <p>La qui presente proposta di ricerca è coerente anche con il punto 5.5 <i>Traiettorie tecnologiche di sviluppo a priorità nazionale</i> della SNSI (<i>Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente</i>), in particolare con il comparto <i>Industria intelligente e sostenibile, energia e ambiente</i> dal momento che la ricerca potrebbe riguardare un indice non solo innovativo e ad alta efficienza ma anche capace di supportare o monitorare nel tempo azioni di bonifica di siti contaminati nonché del trattamento dei rifiuti nelle discariche, in special modo di rifiuti urbani.</p> <p>In definitiva questo progetto di ricerca potrebbe offrire l'opportunità di passare da valori di semplice raffronto alla costruzione di un vero e proprio indice sintetico e standardizzato (o più di uno) che, tenendo conto di valutazioni strumentali sui sistemi sensibili dell'individuo bioindicatore (es. analisi citofluorimetriche e reazioni degli epatociti ai diversi coloranti; reazioni alle condizioni ambientali), restituisca il valore di qualità ecologica/ambientale di un sito.</p> <p>Approfondire l'uso degli Isopodi come bioindicatori consente di misurare il danno arrecato dai contaminanti agli organismi e di rapportarlo al livello di</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



alterazione del sistema ambientale nel rapporto tra l'azione di stress e/o l'effetto della contaminazione ambientale, risultando così un ottimo indicatore sul livello di rischio per l'Uomo.

Dunque si tratta di un indice utile ed efficace per molti ambiti produttivi, anche nella pianificazione territoriale e nelle decisioni politiche.

English version

The researchers were interested in a long time in the different sensitivity of some organisms toward environmental variations, this is why the bioindication sector was born.

A lot of international articles come up the ecosystems characterization using biomonitoring techniques; these techniques use vegetal or animal organisms having a specific sensitivity to specific disturbing environmental factors as survey tool and, thus, these are called generically "bioindicators".

On this matter a lot of studies report the high capacity of bioindication of *Isopoda* (Crustacea, Oniscidea), especially the high capacity to accumulate contaminants.

Manti et al. (2013) demonstrate the real potential of this organisms in responding in critical and sensitive way to environmental variations in a rapidly and predictive way, in particular, through the evaluations of some parameters of cellular stress detected in the hepatopancreatic cells of isopods (alterations of mitochondrial and lysosomal activity, accumulation of ROS, apoptosis).

So, the purpose will be studying hepatopancreatic cells of isopods (cells B and cells S). The hepatopancreas of *Isopoda* takes an important role in bioaccumulation of contaminants, such as heavy elements.

Monitoring the environmental alteration as soon as preventive possible, before it generates a macroscopic ecological effect, would be useful and efficient for different fields. The *Isopoda* could be the right means to identify "hidden contamination" of the environment in which they live.

These animals exposed to unfavorable conditions, before expressing a clearly visible effect (ex. body asymmetries), could accumulate a "debt" that we could be able to search and evaluate inside the hepatopancreatic cells.

Research in progress of our work group compared different sites and reported coherent and predictable data: in apparently uncontaminated areas there is a low level of cellular damage; an intermediate level in variously urbanized areas; and high level in urbanized sites (often industrial areas).



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



This database could be the basis for the construction of an analytical system capable of associating a level of cellular stress to a condition of environmental quality (level).

The research program mainly includes three work phases.

The first one in the field to collect samples in previously identified sites; it is the purpose of characterizing the site (if the site is sampled once) or to understand the dynamics of the polluting agent and the relationship with the indicator (if the site is seasonally sampled).

The collection of *Isopoda* will take place in different environments to different degrees of anthropic impact presumably with a different degree of stress.

Some sites will be chosen where the level of contamination is also known considering the *Siti Interesse Nazionale* identified by ISPRA. A reference site is the Ginestreto landfill managed by Sogliano Ambiente SpA in Sogliano al Rubicone (FC) town, because there is a large amount of data collected since it was the protagonist of several works on the same topic.

The second phase in the laboratory, with cytofluorimetric and microscopic analyzes on the sample collected and in particular the hepatopancreatic cells. In the laboratory, the analysis of the samples will be carried out by flow cytofluorimetry and microscopy. There will be a first phase of preparation of the sample that includes the extraction of the hepatopancreas and the tissue disintegration to obtain suspended cells in a solution of PBS (*Phosphate-Buffered Saline*).

Before cytometric analysis the sample cells will be purified by a centrifugation to eliminate non-useful foreign material for the purposes of the analysis (ex. dust, bacteria etc.). Fluorescent probes will be used as demonstrated in Manti et al. (2013).

Therefore, after a first training on laboratory techniques and procedures, it is planned to plan the ecological-environmental part of the project (sample sites, number of sites / animals), and the analysis of the *Isopoda* samples taken from the various sites identified in the research.

Mainly it is expected to adopt the protocols of cellular disintegration and marking highlighted in the literature, but it is also expected to use new fluorescent probes (ex. assessment of the presence of heavy metals such as cadmium and lead, alterations of intracellular GSH levels) and new protocols of tissue disintegration, to make the analyzes more standardizable.



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



The third and last phase is the interpretation of data, a fundamental part of the work to identify and establish the new indices capable of representing the ecological / environmental quality value of a site.

The expected result is the development of new protocols for the realization of an ecological-environmental indicator using *Isopoda*, the soil species (auspatic) that is influenced by the physical and chemical conditions of the surface layers of the soil.

This is because traditional chemical-physical analyzes provide quantitative data, relating to the instant of sampling, which are expressed in terms of concentrations relating to single chemical pollutants.

However, we often do not have sufficient information about the presence over time of these carried molecules in the atmosphere, transported by water or deposited on the soil, their danger, and the degree of bioavailability, and in some cases also concerning the chemical formula and the origin.

These difficulties can be passed with biological monitoring based on the principle that organisms that live in each ecosystem are adapted to their environment; therefore, changes even minimal of environmental conditions, determine changes in the living organisms appropriately chosen and sensitive to these modifications maintaining the memory of the event later permanent alteration on individuals and parameters of population.

Bibliografia

Manti A., Canonico B., Ciandrini E., Mazzeo R., Tsiola M., Santolini R., Papa S., 2011. Flow cytometric analyses of hepatopancreatic cells in terrestrial Isopods.. Cytometry. Part a, 2011. ISSN 1552-4922.

Nannoni F., Mazzeo R., Protano G., Santolini R. 2014. Bioaccumulation of heavy elements by *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda) exposed to fallout of a municipal solid waste landfill. Ecological Indicators 49:24–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.036>

Nannoni F., Mazzeo R., Santolini R., Protano G., 2017. Multi-matrix environmental monitoring to assess heavy element distribution around a municipal solid waste landfill in Italy. Int. J. Environ. Sci. Technol. (2017) 14:2591–2602 DOI 10.1007/s13762-017-1342-y

The present research proposal has a strong innovative nature because it takes inspiration from the basic research to develop environmental analysis methods with biological indicators that can characterize the level of pollution of different sites considered through the construction of an assessment index.

This index (or indexes) could make the monitoring more effective and reliable because the *Isopoda* have long been recognized as bioindicators able to highlight the action of contamination at the cellular level; and because in relation to soil chemical-physical analyzes, it could allow the measure of the damage caused in time to biocenosis and to ecosystem.

It could become a valid support for the monitoring and control of the soil sector to assess the degree of alteration, and therefore operate to mitigate pollution from hazardous substances as is indicated and requested in articulation 3 of the PNR (*Programma Nazionale per le Ricerche Prevenzione della contaminazione del suolo*).

Furthermore, according to PNR the *Green Technologies* contribute substantially to the development of a sustainable and circular industrial economy. Of these Green Technologies the cluster 6 refers to the reduction of pollution. In this regard this research proposal could be able to intervene on environmental "externalities", such as soil pollution, identifying possible stress caused for example by dangerous substances, in line with what proposed by articulation 6 of the PNR.

The present research proposal is also coherent with point 5.5 *Traiettorie tecnologiche di sviluppo a priorità nazionale* della SNSI (*Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente*), in particular with the sector *Industria intelligente e sostenibile, energia e ambiente*. Because the research could concern an index not only innovative and high efficiency, but also capable of supporting or monitoring in time recovery actions of contaminated sites as well as waste treatment in landfills, especially urban waste.

Ultimately this research project could offer the opportunity to switch from values of simple comparison to the construction of a real synthetic and standardized index (or more than one) that, considering instrumental assessments on the sensitive systems of the individual bioindicator

(ex. cytofluorimetric analysis and reactions of hepatocytes to different dyes; reactions to environmental conditions), returns the ecological / environmental quality value of a site.

Increase the use of Isopods as bioindicators makes it possible to measure the damage caused by the contaminants to the organisms and to report it to the level of alteration of the environmental system in the relationship between stress action and / or the effect of environmental contamination, thus resulting a great indicator on the risk level for man.

Therefore, it is a useful and effective index for many production areas, even in territorial planning and political decisions.