

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, Nicola Ferri

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale",
Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
a.angioni@izs.it

Parole chiave

Bioaccumulo,
Catena trofica,
Chamelea gallina,
PBDE-47,
Ritardante di fiamma,
Venus gallina,
Vongola.

Riassunto

Lo studio ha avuto l'obiettivo di valutare gli effetti del 2,2',4,4'-tetrabromodifenil etero (PBDE-47) su vongola *Chamelea gallina* (*Venus gallina* secondo la normativa commerciale vigente). I PBDE, impiegati in diversi prodotti industriali come ritardanti di fiamma, sono annoverati tra le sostanze pericolose dalla Direttiva 2011/65/UE. Si tratta di composti bioaccumulabili, ritenuti interferenti endocrini, genotossici e neurotossici, praticamente ubiquitari, la cui concentrazione nell'ambiente, negli ultimi anni, è aumentata in maniera considerevole. Il presente studio ha avuto l'obiettivo di verificare gli effetti del PBDE-47 su *Chamelea gallina*: potere tossico ed eventuali effetti dannosi sulle gonadi, capacità di bioaccumulo nei tessuti e possibile ingresso nella catena trofica. La ricerca si è avvalsa di prove sperimentali a 96 h e a 14-21gg su esemplari di vongola stabulati in acqua marina filtrata. Le prove sono state precedute da un periodo di adattamento dei molluschi della durata di 5-7gg. Le vongole sono state alimentate con alghe marine (*Dunaliella tertiolecta*). La scelta del composto tossico PBDE-47 è stata effettuata in considerazione delle maggiori concentrazioni, tra i congeneri di PBDE, riscontrate in alcune specie acquatiche. Lo studio ha evidenziato che le concentrazioni impiegate del contaminante non hanno alterato le funzioni vitali, causato livelli significativi di mortalità e determinato alterazioni evidenti alle gonadi di *Chamelea gallina*. La ricerca ha evidenziato, comunque, il potere di bioaccumulo del mollusco bivalve, permettendo al PBDE-47 l'ingresso nella catena trofica.

Veterinaria Italiana 2013, 49 (1), 59-68

Introduzione

I ritardanti di fiamma, polibromodifenil eteri (PBDE), sono composti chimici idrofobici, inclusi tra le sostanze pericolose contemplate dalla Direttiva 2011/65/UE (26). Comunemente sono usati nei settori tessile ed elettronico, nonché nella produzione di imballaggi plastici e materiale edile, in quanto caratterizzati dalla capacità di ritardare l'estendersi delle fiamme in caso di incendio. Negli ultimi anni il loro utilizzo ha subito un incremento, con il conseguente aumento della loro concentrazione nell'ambiente (1, 22). I PBDE sono additivi che vengono miscelati con polimeri di varia natura e non chimicamente legati alle plastiche o ai tessuti. Questa particolarità può provocare un rilascio graduale nel tempo che, da una parte diminuisce le proprietà ignifughe del manufatto, dall'altra aumenta il rischio di contaminazione ambientale (22).

Queste sostanze possono essere rilasciate nell'ambiente in fase di produzione, di utilizzo, di smaltimento in discarica, durante le operazioni di ince-

nerimento e tramite i reflui industriali (7, 27). Tali inquinanti ambientali sono divenuti ubiquitari (acqua, aria e terreno) (4, 6, 22, 24). La loro presenza è stata riscontrata in pesci, uccelli, molluschi bivalve, mammiferi marini, nonché in latte materno, tessuto adiposo, sangue e siero umano (13, 22, 24).

I PBDE sono ritenuti persistenti, stabili, poco sensibili ai processi di degradazione chimica e biologica, e in grado di esercitare la propria azione contaminante anche a considerevole distanza dai luoghi di emissione (22, 24).

Sono noti come composti bioaccumulabili (14, 22, 24), interferenti endocrini (1), neurotossici (17, 24) e genotossici con capacità di indurre aberrazioni cromosomiche (3, 7). In letteratura sono riportati effetti dannosi sulle gonadi di molluschi bivalve (mitili) (1).

La vongola *Chamelea gallina* (Figura 1), mollusco bivalve endobentonico, che vive aggregato in banchi a elevata densità in fondali sabbiosi o sabbio-fangosi, ha un buon potere di bioaccumulo di contaminanti ambientali. L'alimentazione, basata sulla microfagia,



Figura 1. *Chamelea gallina*. lavalledelcesano.it.

mediante un sistema filtrante (15, 18), rende la vongola particolarmente sensibile alla qualità dell'acqua, al particolato in sospensione, nonché agli stress di natura chimica.

In generale, lo stato di salute della fauna ittica riflette le condizioni dell'ambiente in cui essa vive. Da qui la possibilità di utilizzare gli studi ecotossicologici sui Molluschi Bivalvi per determinare la salubrità della fauna ittica (intesa come prodotto destinato all'alimentazione umana) e la qualità degli ecosistemi acquatici.

Il presente lavoro ha lo scopo di valutare, mediante la simulazione di un evento inquinante in acquario, il potere tossico e gli eventuali effetti dannosi del ritardante di fiamma 2,2',4,4'-tetrabromodifeniletere (PBDE-47) sull'apparato riproduttore della vongola. Inoltre, è stata valutata la capacità di bioaccumulo del composto tossico nei tessuti del mollusco al fine di verificare il suo possibile ingresso nella catena trofica. La scelta del PBDE-47 è stata effettuata in considerazione della sua maggiore concentrazione riscontrata in specie acquatiche (11, 19).

Il presente studio, relativo al progetto IZSAM 09/07 RC - Studio degli effetti tossici dei ritardanti di fiamma, polibromodifenileteri (PBDE), su vongola *Chamelea gallina*, è stato finanziato dal Ministero della Salute.

Materiali e metodi

Piano di campionamento e prelievo

Lo studio è stato effettuato nel Centro di Biologia delle Acque dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale". Sono

stati impiegati esemplari di *Chamelea gallina* (Super Regno: Eukaryota, Regno: Animalia, Phylum: Mollusca, Classe: Bivalvia, Ordine: Veneroida, Famiglia: Veneridae, Genere: *Chamelea*, Specie: *Gallina*). Gli esemplari di vongola e acqua marina per gli acquari sono stati prelevati, con frequenza mensile, in un punto di campionamento (Latitudine: 42° 27' 279 N e Longitudine: 14° 15' 865 E) situato ad una distanza di circa 500 m dalla costa abruzzese, a sud del porto di Pescara e ad una profondità di circa 6 m (Figura 2).

Prove ecotossicologiche

I molluschi prelevati sono stati trasferiti in frigo portatile, immediatamente trasportati a temperatura refrigerata in laboratorio e selezionati in base alla taglia minima commerciabile (25 mm \pm 10%). Gli esemplari sono stati ripartiti in 10 acquari in vetro temperato (40x25x28 cm) dotati di dispositivi di ossigenazione e filtrazione meccanica dell'acqua. Per ciascun acquario sono stati impiegati 16 litri di acqua di mare, precedentemente filtrata mediante

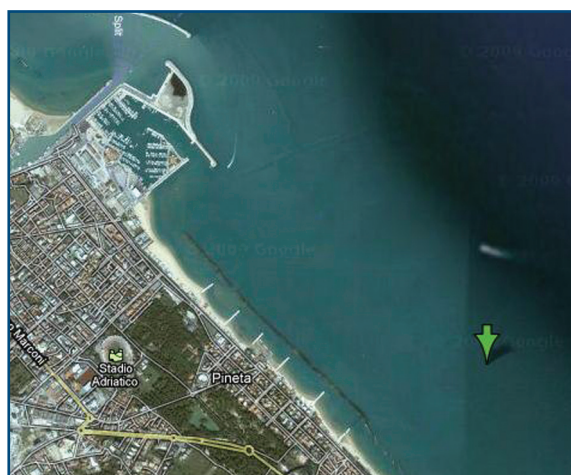


Figura 2. Punto di campionamento. Latitudine: 42° 27' 279 N, Longitudine: 14° 15' 865 E. Fonte: Google maps.



Figura 3. Fase di adattamento di *Chamelea gallina*.

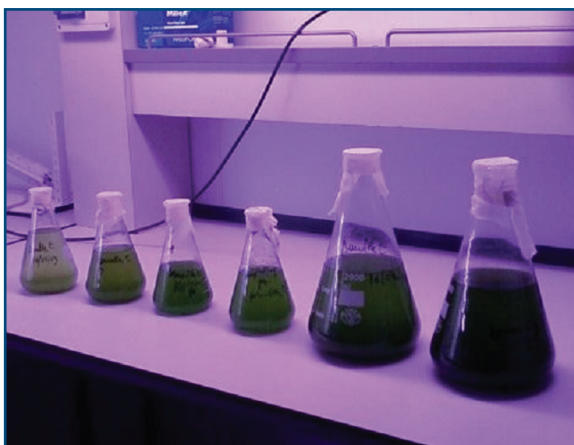


Figura 4. Coltura di *Dunaliella tertiolecta*.

dispositivo costituito da tre cartucce in fibre di polipropilene disposte in successione (25 μm , 10 μm , 1 μm). Gli acquari sono stati collocati in una camera termostata con temperatura costante di $19 \pm 1^\circ\text{C}$, intensità luminosa di 65 ± 30 lux, fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Le vongole sono state stabulate per un periodo di adattamento di 5-7 giorni (Figura 3). I molluschi sono stati alimentati con *Dunaliella tertiolecta*, alga marina unicellulare (Figura 4) coltivata in laboratorio su terreno di coltura concentrato (20 ml x 1 L di acqua di mare) Guillard's-F/2 50X (Marine Water Enrichment Solution SIGMA Aldrich®, USA) (2). Prima della somministrazione di *Dunaliella tertiolecta*, le cellule algali sono state recuperate dal mezzo di coltura mediante centrifugazione (400 RCF x 10' a 4°C) (RCF: *relative centrifugal force*), contate in camera di Fuchs Rosenthal con microscopio ottico (10-40X) (Figura 5) e utilizzate ad una concentrazione di $5-15 \times 10^3$ cellule/ml (2).

Le vongole, secondo quanto descritto in letteratura, sono state alimentate nel 1° e 4° giorno (2, 23).

La sperimentazione si è avvalsa di 7 prove ecotossicologiche ognuna a diversa concentrazione di PBDE-47 (0,25 - 0,50 - 1,0 - 3,0 - 9,0 - 15,0 - 30,0 $\mu\text{g/L}$) (Figura 6).

Ogni prova ha previsto una prova di controllo senza aggiunta del composto tossico. In relazione alla sola prima prova (0,25 $\mu\text{g/L}$), è stata prevista una prova di "controllo solvente" con aggiunta di solo acetone (<10 mg/L), diluente del PBDE-47.

Tutte le prove hanno previsto 5 repliche effettuate con lo stesso numero di molluschi (12 vongole) e alle stesse condizioni ambientali. Quotidianamente sono stati rilevati il numero di molluschi morti, i parametri chimico-fisici dell'acqua (temperatura, salinità, pH, ossigeno disciolto) e la concentrazione di ammoniaca. Il PBDE-47 (ChemService, Inc., West Chester, PA, USA), disciolto in acetone, è stato aggiunto al mezzo acquoso alle concentrazioni note.

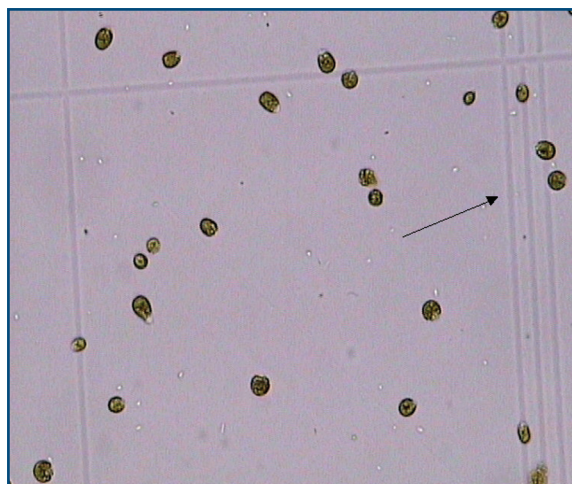


Figura 5. *Dunaliella tertiolecta* (20X) in camera di Fuchs Rosenthal. Un particolare del reticolo di conta, freccia a destra.

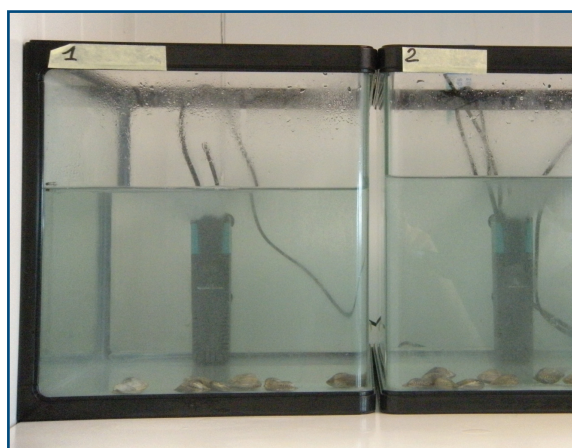


Figura 6. Prova con PBDE-47.

La scelta del range di concentrazioni del composto tossico e dei tempi di esposizione è stata effettuata secondo i criteri riportati in letteratura e in base ai risultati preliminari ottenuti nel corso della sperimentazione (1, 10). La concentrazione di acetone in acqua è stata, per tutte le prove, inferiore a 10 mg/L, valore al di sotto della No Observed Effect Concentration (NOEC) (1).

Per ogni concentrazione di PBDE-47 è stata prevista la valutazione sia degli effetti tossici a 96 ore (mortalità) sia di quelli dannosi sull'apparato riproduttivo con la protrazione delle prove a 21 giorni.

Durante le prove ecotossicologiche a 96 ore, i molluschi non sono stati alimentati (2, 23), a differenza delle prove a 14-21 giorni in cui l'alimento è stato somministrato 2 volte a settimana.

A conclusione di ogni prova a 14-21 gg, per ciascuna concentrazione di sostanza tossica, è stato effettuato l'esame istologico dei tessuti delle gonadi sia dei molluschi esposti sia dei controlli. È stata inoltre de-

terminata la concentrazione di PBDE-47 nei tessuti al fine di verificarne l'eventuale bioaccumulo.

Esame istologico

I campioni di vongole, sgusciate e conservate in formalina al 10% (v/v), sono stati sottoposti all'esame istologico delle gonadi, al fine di evidenziare eventuali alterazioni, nel Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie dei molluschi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Per ciascuna prova sono stati esaminati un numero statisticamente rappresentativo di vongole (20-30 esemplari). L'esame è stato svolto in accordo a quanto riportato in letteratura (5).

Determinazione analitica del PBDE-47

Per la determinazione del PBDE-47 nei tessuti della vongola, è stato ottimizzato un metodo validato per la determinazione di 9 polibromodifenileteri (PBDE-28-47-66-85-99-100-153-154-183) in matrici alimentari.

Il metodo ha previsto l'utilizzo della tecnica di diluizione isotopica, la separazione in gas-cromatografia ad alta risoluzione (HRGC) e la rivelazione in spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS).

I campioni di molluschi (5-10 grammi) sono stati miscelati con una quantità di terra di diatomee 2-3 volte maggiore rispetto al peso dell'aliquota e mantenuti in stufa a 40°C per una notte. Ad ogni campione è stata aggiunta la miscela degli "standard interni", costituita da 7 PBDE marcati con carbonio 13, rappresentativa degli analiti in esame. Successivamente, i campioni sono stati estratti con una miscela acetone/esano (20:80, v/v) attraverso estrazione accelerata con solvente, utilizzando un sistema di estrazione ASE® 200 (Dionex, Sunnyvale, California, USA) alla pressione di 1.500 psi e una temperatura di 125°C. L'estratto organico è stato portato a secco su evaporatore rotante ed è stata determinata la percentuale lipidica per via gravimetrica.

Il successivo processo di purificazione è stato effettuato in due fasi. Nella prima l'estratto solubilizzato in esano è stato sottoposto ad una partizione liquido/liquido (passaggi in H₂SO₄ concentrato e soluzione acquosa saturata di NaCl), nella seconda fase l'estratto è stato purificato per mezzo di una colonna cromatografica multistrato impaccata manualmente con 3 grammi di gel di silice neutra, 4 grammi di gel di silice impregnato con H₂SO₄ al 44% (p/p) e 1 grammo di sodio solfato anidro. Gli eventuali interferenti sono stati rimossi con esano, i PBDE eluiti con una miscela diclorometano/esano (10:90, v/v).

L'estratto finale è stato portato a secco mediante evaporazione in corrente di azoto e ripreso con una soluzione contenente "standard di iniezione", rap-

presentata da 2 PBDE marcati con carbonio 13 (diversi dai precedenti). La soluzione ottenuta è stata iniettata in gascromatografia ad alta risoluzione e la rivelazione dei composti in esame è stata ottenuta per mezzo di uno spettrometro di massa operante con risoluzione (R) maggiore di 9500, in *single ion monitoring*.

Il metodo adottato ha previsto l'impiego di un sistema HRGC-HRMS costituito da un gascromatografo capillare Trace Series 2000 (ThermoQuest CE Instruments, Milano, Italia) accoppiato con uno spettrometro di massa MAT 95 XP (Thermo Fisher Scientific, Brema, Germania). L'analisi è stata condotta su una colonna capillare DB-5 MS (60 m x 0,25 mm, 0,10 µm, J&W Scientific, California, USA).

Tutte le soluzioni standard di riferimento, sono state acquistate da Wellington Laboratories Inc. (Ontario, Canada).

Risultati e Discussione

I valori dei parametri chimico-fisici considerati si sono mantenuti all'interno dei seguenti range:

- concentrazione dell'ammoniaca (NH₃): < 0,25 mg/L;
- temperatura dell'acqua: 18,5 - 20,7°C;
- salinità: 34,4-39,6 g/L;
- pH: 8,22 - 8,37;
- ossigeno disciolto: 8,69 - 9,27 mg/L.

Nel corso della fase di adattamento delle vongole in acquario, è stata registrata una mortalità inferiore al 10% (Figura 7). Nella prova di tossicità a 96 ore, per tutte le concentrazioni previste, la stessa si è costantemente mantenuta al di sotto del 10%.

Gli esemplari utilizzati non hanno mai manifestato segni apparenti di sofferenza, alimentandosi ed evidenziando regolarmente le valve semichiusure

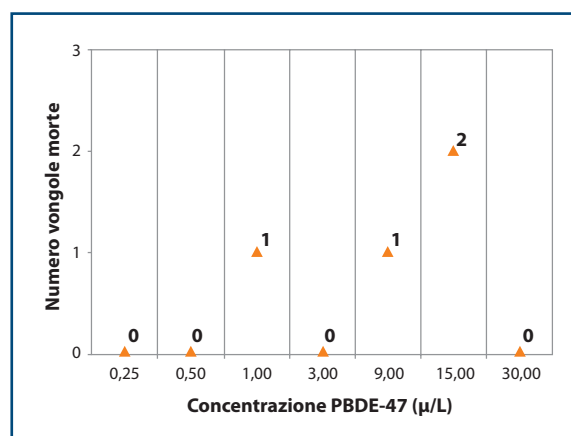


Figura 7. Numero di vongole morte nelle fasi di adattamento, per ciascuna delle 7 prove di tossicità.

con i sifoni ben visibili all'esterno (Figura 8). Nello specifico, l'osservazione dei molluschi ha messo in evidenza un esemplare morto alle concentrazioni di PBDE pari a 0,50 - 1,0 - 9,0 - 15,0 µg/L (mortalità = 1,67%). L'analisi della varianza univariata (ANOVA)



Figura 8. Vongole in acquario: esemplare con i sifoni all'esterno.

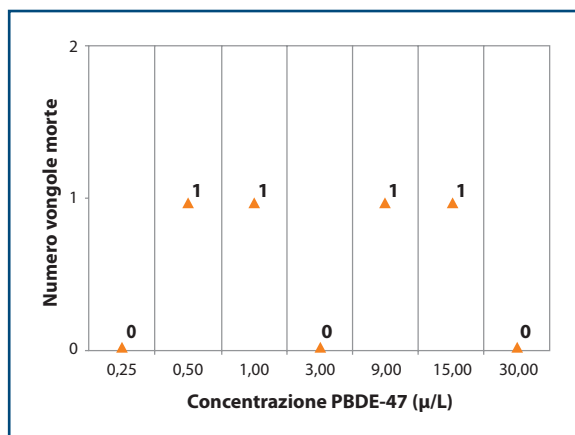


Figura 9. Numero di vongole morte per ogni concentrazione di PBDE-47 nelle prove di tossicità a 96 h.

non ha rilevato differenze statisticamente significative ($F = 0,500$; $p = 0,808$) tra i valori delle mortalità osservate alle differenti concentrazioni (Tabella I).

Le mortalità osservate a tutte le concentrazioni non sono risultate statisticamente differenti da quelle attese (0%), infatti, tutti gli intervalli di confidenza delle stesse hanno incluso lo 0% (Tabella II). Non sono stati rilevati esemplari di molluschi morti alle altre concentrazioni utilizzate (Figura 9). Dall'esame istologico non sono risultate alterazioni ai tessuti delle gonadi al termine di ciascun prova di tossicità (14 - 21 giorni). Nelle Figure 10 e 11 sono riportati, come esempio, al valore di 15 µg/L, preparati istologici di gonadi maschili e femminili visti al microscopio ottico.

Si evidenzia, come la mortalità tra i molluschi bivalve esposti al composto tossico, sia sempre stata inferiore al 10% anche durante la protrazione delle prove a 21 gg, con 3 esemplari morti alla concentrazioni di PBDE pari a 0,50 µg/L e 2 esemplari morti alle concentrazioni di PBDE pari a 1 - 9 - 15 µg/L (Figura 12) (mortalità pari a 5% e 3,33% rispettivamente). Tali valori non sono significativi, in quanto l'analisi della varianza univariata (ANOVA) non ha rilevato differenze statisticamente significative ($F = 1,250$; $p = 0,279$) tra i valori delle mortalità osservate alle differenti concentrazioni (Tabella III). Inoltre, le mortalità osservate a tutte le concentrazioni non sono risultate statisticamente differenti da quelle attese (0%), infatti, tutti gli intervalli di confidenza delle stesse hanno incluso lo 0% (Tabella IV).

Tabella I. Risultati ottenuti utilizzando il metodo ANOVA univariata (prova a 96 h).

Fonte	Somma dei quadrati	Gradi di libertà	Media dei quadrati	F di Fisher	Pr > F Significatività
Concentrazione	0,029	6	0,005	0,500	0,808
Errore	3,933	413	0,010		
Totale	3,962	419			

Tabella II. Stima della mortalità attesa nei molluschi bivalve impiegati nella sperimentazione (prova a 96 h).

Concentrazione (PBDE-47 µg/L)	Mortalità osservata	t di Student	Significatività > t	Intervalli di confidenza (95%)	
				Limite inferiore	Limite superiore
0,25	0,00%	0,000	1,000	-3,50%	3,50%
0,5	1,67%	0,935	0,350	-1,84%	5,17%
1	1,67%	0,935	0,350	-1,84%	5,17%
3	0,00%	0,000	1,000	-3,50%	3,50%
9	1,67%	0,935	0,350	-1,84%	5,17%
15	1,67%	0,935	0,350	-1,84%	5,17%
30	0,00%	0,000	1,000	-3,50%	3,50%

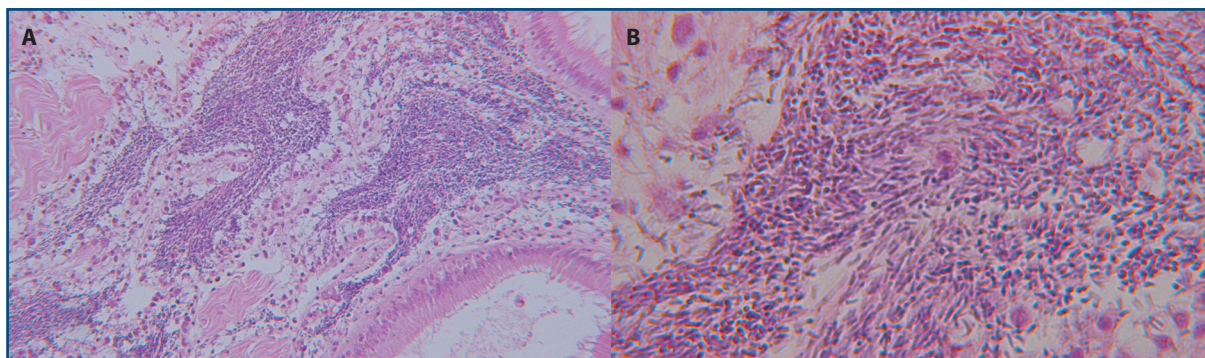


Figura 10. Sezione istologica di gonade maschile, senza alterazioni e con buona produzione di gameti, di *Chamelea gallina* esposta a 15 µg PBDE-47/L. (A) 100X; (B) 400X.

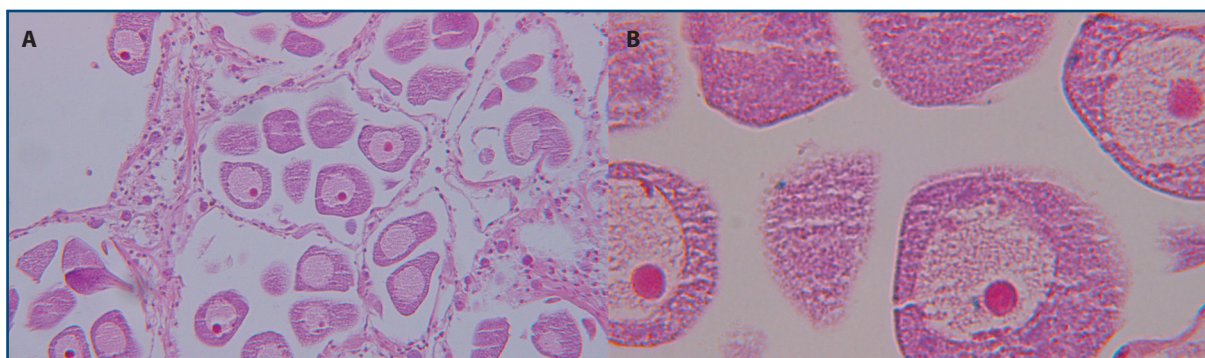


Figura 11. Sezione istologica di gonade femmine mature, senza alterazioni, di *Chamelea gallina* esposta a 15 µg PBDE-47/L. (A) 100X; (B) 400X.

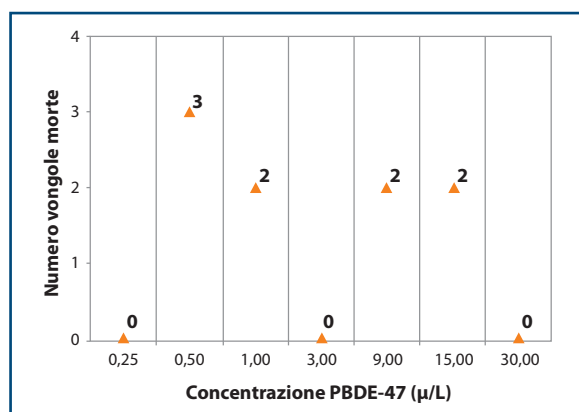


Figura 12. Numero di vongole morte per ogni concentrazione di PBDE-47, nelle prove di tossicità a 21gg. La sperimentazione condotta alla concentrazione di 0,5 µg/L è stata interrotta a 14 giorni.

Tabella III. Risultati ottenuti utilizzando il metodo ANOVA univariata (prova a 21 gg).

Fonte	Somma dei quadrati	Gradi di libertà	Media dei quadrati	F di Fisher	Pr > F Significatività
Concentrazione	0,157	6	0,026	1,250	0,279
Errore	8,650	413	0,021		
Totale	8,807	419			

Tabella IV. Stima della mortalità attesa nei molluschi bivalve impiegati nella sperimentazione (prova a 21 gg*).

Concentrazione (PBDE-47 µg/L)	Mortalità osservata	t di Student	Significatività >t	Intervalli di confidenza (95%)	
				Limite inferiore	Limite superiore
0,25	0,00%	0,000	1,000	-5,19%	5,19%
0,5	5,00%	1,892	0,059	-0,19%	10,19%
1	3,33%	1,262	0,208	-1,86%	8,53%
3	0,00%	0,000	1,000	-5,19%	5,19%
9	3,33%	1,262	0,208	-1,86%	8,53%
15	3,33%	1,262	0,208	-1,86%	8,53%
30	0,00%	0,000	1,000	-5,19%	5,19%

* La sperimentazione condotta alla concentrazione di 0,5 µg/L è stata interrotta a 14 giorni.

Livelli di contaminazione dei tessuti

In Tabella V si riportano i risultati relativi ai livelli di PBDE-47 riscontrati nei tessuti di vongola esposti a concentrazioni crescenti della sostanza tossica, nell'ambito delle prove a 21 giorni.

I risultati relativi alle sperimentazioni con concentrazione di PBDE-47 pari a 9 e 15 g/L, non sono stati riportati a causa di problemi analitici nella fase di estrazione del campione. Il basso recupero dello standard interno, infatti, non ha permesso una determinazione affidabile dell'analita in esame. L'unicità del campione non ha consentito la ripetizione dell'analisi.

Le concentrazioni del PBDE-47 nel tessuto sono state riportate su prodotto fresco, prodotto secco e base lipidica. Per le concentrazioni su prodotto secco si è fatto riferimento ad un valore di umidità medio di 80,6%, dato desunto da uno studio condotto su campioni di *Chamelea gallina* prelevati nel Mar Adriatico (21). Tale accorgimento si è reso necessario in quanto l'esiguo numero di esemplari, costituenti il campione, non è stato sufficiente alla determinazione contemporanea dell'umidità e del PBDE-47.

La frazione lipidica è stata determinata in tutti i campioni e i valori ottenuti non hanno presentato differenze significative in funzione del periodo di campionamento. I valori sono risultati compresi tra 0,73% e 1,16% con valore medio di 0,98% di lipidi.

I livelli di PBDE-47 rilevati alla fine dei test di tossicità nei gruppi di controllo sono risultati trascurabili rispetto a quelli riscontrati negli individui esposti, con valori compresi tra 96 ng/kg e 130 ng/kg. Tali valori sono risultati comparabili e, a volte, inferiori a quelli riscontrati in monitoraggi condotti su alcune specie di Molluschi Bivalvi in regioni europee e asiatiche (8, 16, 19, 20, 25).

L'analisi delle vongole non esposte al contaminante ha mostrato un profilo di contaminazione (rapporti dei 9 congeneri determinati) paragonabile a quelli riscontrati in altri organismi acquatici e riportati in letteratura (11, 19).

In uno studio di bioaccumulo condotto su mitili è stato messo in evidenza come l'abbondanza dei congeneri 47 e 99 nei tessuti possa essere legata ad una migliore efficienza nei meccanismi di assunzione e di accumulo dei due congeneri rispetto agli altri PBDE (20).

I livelli di PBDE-47 nel tessuto delle vongole sono risultati da 1.000 a 50.000 volte maggiori nei gruppi degli esposti rispetto a quelli dei corrispondenti controlli (Tabella V). Tali livelli hanno mostrato una crescita, seppur non lineare, all'aumentare della concentrazione della sostanza tossica in acqua. I valori di contaminazione sul prodotto fresco sono risultati compresi tra 110×10^3 ng/kg nelle vongole esposte alla concentrazione minima di 250 ng/L di PBDE in acqua, e 5.870×10^3 ng/kg per quelle esposte alla concentrazione massima di 30.000 ng/L.

In diversi studi di esposizione, relativi a organismi acquatici e contaminanti organici persistenti, quali PCB e PBDE, è stata individuata una relazione lineare tra quantità di contaminante determinata nel tessuto e caratteristiche idrofobiche del composto in esame, queste ultime descritte dal logaritmo del suo coefficiente di partizione ottanolo-acqua ($\log k_{ow}$). I dati in letteratura riportano per il PBDE-47 un valore di $\log k_{ow}$ compreso tra 6,0 e 6,8 (10, 12), valore elevato che indica come tale composto abbia spiccate caratteristiche idrofobiche e sia potenzialmente pericoloso poiché facilmente accumulabile, con meccanismi di diffusione passiva, nei tessuti adiposi della vongola.

Sebbene le concentrazioni di PBDE-47 impiegate nei test di tossicità siano di gran lunga maggiori rispetto a quelle riscontrate in zone particolarmente inquinate (valori massimi riportati in letteratura di circa 0,5 ng/L), la sperimentazione ha dimostrato la facilità della vongola a bioconcentrare il contaminante in esame, con la conseguente possibilità della sua introduzione nella catena alimentare (16). La bioconcentrazione è il risultato di un'as-

Tabella V. Valori analitici della frazione lipidica e delle concentrazioni di PBDE-47 nei tessuti alla fine di ciascuna prova di tossicità a 21 gg*.

PBDE-47 H ₂ O (ng/L)	Lipidi controllo (%)	PBDE-47 controllo (ng/kg)	PBDE-47 controllo (ng/kg secco)	PBDE-47 controllo (ng/kg grasso)	Lipidi esposti (%)	PBDE-47 esposti (ng/kg)	PBDE-47 esposti (ng/kg secco)	PBDE-47 esposti (ng/kg grasso)
250	1,07	119	613	11.200	0,97	110×10^3	566×10^3	11.300×10^3
500	0,84	130	670	15.500	0,73	$97,3 \times 10^3$	501×10^3	13.300×10^3
1000	1,03	118	608	11.500	1,14	122×10^3	627×10^3	10.700×10^3
3.000	1,08	118	608	10.900	1,14	394×10^3	2.030×10^3	34.600×10^3
9.000	1,16	96,0	495	8.300	1,05	-	-	-
15.000	0,77	116	598	15.200	0,90	-	-	-
30.000	0,90	120	619	13.300	0,95	5.870×10^3	30.300×10^3	618.000×10^3

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

sunzione diretta, attraverso l'acqua, di una sostanza chimica da parte di un organismo. Infatti il fattore di bioconcentrazione (BCF) è definito come il rapporto, allo stato stazionario (velocità di assorbimento uguale a velocità di eliminazione), tra la concentrazione del contaminante nell'organismo acquatico e la corrispondente concentrazione nel mezzo acquoso.

$$BCF = C_o/C_w$$

dove:

C_o = concentrazione del contaminante (ng/kg) nell'organismo acquatico;

C_w = concentrazione del contaminante (ng/L) in acqua.

Si può esprimere il valore di C_o su prodotto intero, base lipidica o prodotto secco, dando origine a tre fattori (BCF_w , BCF_L , e BCF_D , rispettivamente) che numericamente possono essere molto differenti tra loro.

In Europa le sostanze chimiche con BCF_w maggiore di 100 sono considerate ad alto potenziale di bioaccumulo e, quindi, classificate "pericolose per l'ambiente" in quanto potrebbero danneggiare gli organismi acquatici e i loro predatori (9).

Nel presente studio i dati sperimentali sui livelli di PBDE-47 determinati nel tessuto della vongola sono stati impiegati per calcolare una stima inferiore del valore di BCF. Si parla di stima inferiore poichè il protocollo sperimentale adottato nei test di tossicità, il cui obiettivo principale è stato quello di stimare la tossicità acuta e cronica del PBDE-47, non ha permesso di valutare il raggiungimento dello stato stazionario. Infatti, il protocollo sperimentale ha previsto un'unica determinazione analitica del PBDE-47 nel tessuto della vongola dopo un tempo massimo di esposizione di 21 giorni.

In Tabella VI sono riportati i valori di BCF calcolati alle diverse concentrazioni di esposizione. In tutti i casi il valore di BCF_w è stato maggiore di 100.

Tabella VI. Valori di BCF calcolati alle diverse concentrazioni di esposizione alla sostanza tossica.

Concentrazione PBDE-47 H ₂ O (ng/L)	BCF _w (L/kg)	BCF _D (L/kg)	BCF _L (L/kg)	log BCF _w	log BCF _D	log BCF _L
250	439	2.260	45.300	2,6	3,4	4,7
500	195	1.000	26.600	2,3	3,0	4,4
1.000	122	630	10.700	2,1	2,8	4,0
3.000	131	680	11.500	2,1	2,8	4,1
30.000	196	1.010	20.600	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.

In letteratura non sono riportati studi sperimentali di bioaccumulo del PBDE-47 in *Chamelea gallina*, ma su altri Molluschi Bivalvi come *Mytilus edulis* (10, 19). I valori di BCF in questi organismi sono maggiori rispetto a quelli riscontrati nel presente studio. Una tale differenza potrebbe essere associata a:

- concentrazione di ammoniaca (NH₃): < 0,25 mg/L;
- mancato raggiungimento dello stato stazionario dovuto al breve tempo di esposizione;
- inappropriata comparazione tra organismi biologicamente differenti.

A conferma delle ipotesi formulate, è stato utilizzato un modello matematico (16) che mette in relazione il log k_{ow} di una determinata sostanza con il valore di BCF in *Mytilus edulis*:

$$\log BCF_w = 0,858 \log k_{ow} - 0,808$$

L'equazione permette, noto il valore di log k_{ow} di una sostanza, di stimare il fattore di bioaccumulo del mitilo. L'equazione di linearità impiegata porterebbe ad un risultato di log BCF pari a 4,3, valore superiore a quello sperimentalmente stimato in questo studio per *Chamelea gallina*.

Conclusioni

Nelle condizioni operative ottimizzate in questo studio, *Chamelea gallina* ha mostrato buona capacità di adattamento in acquario, permettendo la corretta esecuzione delle prove ecotossicologiche in laboratorio.

Dai risultati dei test di tossicità a 96 h e a 21 gg non è stata evidenziata una relazione tra concentrazione di PBDE-47 nell'acqua marina degli acquari e mortalità di *Chamelea gallina*. La massima concentrazione di esposizione al PBDE-47, infatti, non ha provocato fenomeni significativi di mortalità. I risultati dell'esame istologico non hanno evidenziato alterazioni evidenti dei tessuti dell'apparato riproduttivo nelle condizioni sperimentali adottate.

Le analisi chimiche indicano come le vongole esposte al PBDE-47 presentino livelli del contaminante nel tessuto migliaia di volte superiori agli esemplari non esposti, in funzione della concentrazione nell'ecosistema acquatico, dimostrando la facilità con la quale *Chamelea gallina* bioconcentra il contaminante. L'ingresso di PBDE-47 nella catena trofica potrebbe costituire un rischio per la sicurezza alimentare, la qualità degli ecosistemi marini e la salubrità della risorsa vongola.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Sig. Alfonso de Benedictis per il valido supporto tecnico.

Bibliografia

1. Aarab N., Lemaire-Gony S., Unruh E., Hansen P.D., Larsen B.K., Andersen O.K. & Narbonne J.F. 2006. Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromo diphenyl ether. *Aquat Toxicol*, **78S**, S86-S92.
2. Angioni S.A., Giansante C. & Ferri N. 2010. Vongola (*Chamelea Gallina*): valutazione degli effetti dei solidi sospesi in acqua marina nel mollusco bivalve. *Vet Ital*, **46**, 93-99.
3. Baršienė J., Syvokiene J. & Bjornstad, A. 2006. Induction of micronuclei and other abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether - 47. *Aquat Toxicol*, **78S**, S105-S108.
4. De Boer J., Wester P.G., van der Horst A. & Leonards P.E.G. 2003. Polybrominated diphenyl ethers in influents, suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plants and effluents and biota from the Netherlands. *Environ Pollut*, **122**, 63-74.
5. Delgado M. & Pérez-Camacho A. 2007. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Scientia Marina*, **71**, 471-484.
6. De Wit C. A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, **46**, 583-624.
7. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2011. Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. EFSA Journal, 9(5): 2156 (www.efsa.europa.eu/efsajournal ultimo accesso il 23 gennaio 2012).
8. Fernandes A., Mortimer D.N., Gem M., Dicks P., Smith F., White S. & Rose M. 2008. Brominated contaminants (PBDD/Fs and PBDEs) in shellfish. *Organohalogen Compounds*, **70**, 1024-27.
9. Geyer H.J., Rimkus G.G., Scheunert I., Kaune A., Schramm K-W., Kettrup A., Zeeman M., Muir D.C.G., Hansen L.G. & Mackay D. 2000. Bioaccumulation and occurrence of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), Persistent Organic Pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. In: The Handbook of Environmental Chemistry, vol. 2 Part J, Bioaccumulation, (B. Beek, eds). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1-166.
10. Gustafsson K., Bjork M., Burreau S. & Gilek M. 1999. Bioaccumulation kinetics of brominated flame retardants (polybrominated diphenyl ethers) in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Environ Toxicol Chem*, **18**, 1218-1224.
11. Kuiper R.V., Vethaak A.D., Cantón R.F., Anselmo H., Dubbeldam M., van den Brandhof E-J, Leonards P.E.G., Wester P.W., van den Berg M. 2008. Toxicity of analytically cleaned pentabromodiphenylether after prolonged exposure in estuarine European flounder (*Platichthys flesus*), and partial life-cycle exposure in fresh water zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, **73**, 195-202.
12. Kuramochi H., Maeda K. & Kawamoto K. 2007. Physicochemical properties of selected polybrominated diphenyl ethers and extension of the UNIFAC model to brominated aromatic compounds. *Chemosphere*, **67**, 1858-1865.
13. Lema S.C., Schultz I.R., Scholz N.L., Incardona J.P., Swanson P. 2007. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquat Toxicol*, **82**, 296-307.
14. Liu Y., Zheng G.J., Hongxia Y., Martin M., Richardson B.J, Lam M.H.V. & Lam P.K.S. 2005. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediments and mussel tissue from Hong Kong marine waters. *Mar Pollut Bull*, **50**, 1173-1184.
15. Lucchetti A. 2003. La vongola. Biologia, pesca e consumo delle più importanti specie commerciali. La vongola *Chamelea gallina* (Linneo, 1758). *Il Pesce*, **6**, 135 (<http://www.pubblicitaitalia.com/ilpesce/2003/6/4963.html> ultimo accesso il 26 gennaio 2012).
16. Mai B.-X., Luo X.-J., Yu M. & Chen S.-J. 2009. PBDEs in water and aquatic biota of the Pearl river estuary, South China. *Organohalogen Compd*, **71**, 807-12.
17. McDonald T.A. 2002. A perspective on the potential health risk of PBDEs. *Chemosphere*, **46**, 745-755.
18. Mengoli A. 1998. Aspetti morfo-funzionali dei mitili. *Laguna*, **4**, 13-9.
19. Mizukawa K., Takada H., Takeuchi I., Ikemoto T., Omori K. & Tsuchiya K. 2009. Bioconcentration and biomagnification of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) through lower-trophic-level coastal marine food web. *Mar Pollut Bull*, **58**, 1217-1224.
20. Moon H-B., Kannan K., Lee S-J. & Choi M. 2007. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediment and bivalves from Korean coastal waters. *Chemosphere*, **66**, 243-251.
21. Orban E., Di Lena G., Navigato T., Casini I., Caproni R., Santaroni G. & Giulini G. 2006. Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea. *Food Chemistry*, **101**, 1063-1070.
22. Palm A. Cousins I.T., Mackay D., Tysklind M., Metcalfe C. & Alaee M. (2002). Assessing the environmental fate of chemicals of emerging concern: a case study of polybrominated diphenyl ethers. *Environ Pollut*, **117**, 195-213.
23. Shin P.K.S., Yau F.N., Chow S.H., Tai K.K. & Cheung S.G. 2002. Responses of the green-lipped mussel *Perna viridis* (L) to suspended solids. *Mar Pollut Bull*, **45**, 157-162.
24. Siddiqi M.A., Laessig R.H. & Reed K.D. 2003. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): New Pollutants - Old Diseases. *Clinical Medical & Research*, **1**, 281-290.
25. Umlauf G., Christoph E.H., Huber T., Mariani G., Mueller A., Skejo H. & Wollgast J. 2009. PBDEs in water, sediments and biota of the river Danube from

Germany to the Black Sea. *Organohalogen Compd*, **71**, 737-742.

26. Unione Europea, 2011. Direttiva 2011/65/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'8 giugno 2011 sulla restrizione dell'uso di determinate sostanze

pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche (Gazzetta Ufficiale L 174 del 1.7.2011).

27. Watanabe I. & Sakai S. 2003. Environmental release and behaviour of brominated flame retardants. *Environ Int*, **29**, 665-682.