

Sperimentazione in mesocosmo per la valutazione degli effetti di sostanze nutraceutiche sul bioaccumulo di mercurio in esemplari di *Sparus aurata*

Antonio Bellante, Vincenzo Tancredi, Massimo De Luca, Vincenzo Di Stefano, Giulia Maricchiolo, Davide Salvati, Martina Meola, Mario Sprovieri e Maria Bonsignore

INTRODUZIONE

CIRCLES “**Controlling mIcRobiomes CircuLations for bEtter food Systems**” è un progetto Europeo che nasce con l’obiettivo generale di fornire le conoscenze scientifiche necessarie a sfruttare i microbiomi naturali per la produzione sostenibile di alimenti di alta qualità, con l’obiettivo finale di fornire applicazioni alimentari nuove e più sane.

Valutare gli effetti del microbioma sul bioaccumulo di sostanze tossiche nei tessuti di specie ittiche commerciali potrebbe rappresentare una strategia innovativa per produrre “cibo” sicuro, sostenibile e di qualità superiore. Il beneficiario di tale strategia è il consumatore finale (uomo) che usufruisce di un prodotto salutare e di qualità dal punto di vista delle caratteristiche organolettiche, nutrizionali ed igienico-sanitarie (poiché privo di sostanze antimicrobiche e chimiche).

Il progetto presenta ricadute positive sia per la salute pubblica che per quella animale essendo i due aspetti strettamente correlati. Valutare gli effetti del microbioma sul bioaccumulo di sostanze tossiche nei tessuti di specie ittiche commerciali potrebbe rappresentare una strategia innovativa per produrre “cibo” sicuro, sostenibile e di qualità superiore.

Nello specifico, le attività di seguito descritte sono state eseguite allo scopo di determinare gli effetti di mangimi innovativi arricchiti con sostanze nutraceutiche nel contrastare/modulare il bioaccumulo di mercurio (Hg) nei tessuti della specie commerciale *Sparus aurata*. Il Mercurio è un metallo pesante non essenziale e pertanto tossico anche a basse concentrazioni. La scarsa capacità escretoria dell’organismo nei confronti di questo metallo, associata ad un’elevata esposizione attraverso il mezzo acquoso e la dieta, sono alla base del suo bioaccumulo nei tessuti degli organismi acquatici, ovvero all’aumento di concentrazione nei tessuti nel tempo. L’ingestione di pesce contaminato è la principale via d’esposizione dell’uomo al suddetto metallo (WHO, 1991). Un’esposizione cronica sub-letale di Hg può causare alterazioni di funzionalità cerebrali (Berg et al., 2010), effetti tossici al sistema riproduttivo (Kirubakaran and Joy, 2006), effetti genotossici ed alterazioni del metabolismo mitocondriale (Cambier et al., 2009). Un’esposizione cronica di Hg negli esseri umani comporta effetti principalmente neurotossici a livello della corteccia cerebrale e del cervelletto (Bernhoft, 2012). Altri effetti tossici comprendono tremori, forme di allucinazioni, danno renale, alterazioni dei

movimenti, debolezza muscolare, perdita della vista e dell'udito (Bernhoft, 2012). Lo studio degli effetti del microbioma intestinale nel contrastare/modulare il bioaccumulo di sostanze tossiche in specie destinate al consumo umano rappresenta un approccio di grande interesse scientifico che contribuirà a tutelare la salute dell'uomo mediante lo sviluppo di prodotti naturali e di maggiore qualità.

Analogamente a quanto avviene nell'uomo, anche nei pesci il microbiota intestinale gioca un ruolo chiave nel funzionamento e stato di salute dell'apparato digerente, nei meccanismi di crescita e rinnovamento tissutale, nella modulazione del sistema immunitario e nella protezione dagli agenti patogeni (Gatesoupe et al., 1997; Rawls et al., 2004; Bates et al., 2006; Salinas et al., 2006; Semova et al., 2012; Ingerslev et al., 2014 a,b; Wang et al., 2018). Nonostante le numerose sopracitate ricerche che confermano gli effetti benefici di queste sostanze sulla salute dei pesci, sono estremamente rari gli studi che mirano a determinare gli effetti del microbiota sul bioaccumulo delle sostanze tossiche e/o nel mitigare gli effetti tossici dovuti al loro bioaccumulo. Uno studio condotto sulla specie *Carassius auratus gibelio* ha evidenziato come una dieta arricchita con *Bacillus cereus* era in grado di ripristinare la flora intestinale degli esemplari il cui microbiota era stato alterato dopo un'esposizione a 0,1 - 2 mgL⁻¹ di Cd (Wang et al., 2020). I risultati ottenuti dimostrarono inoltre come una dieta arricchita con *B. cereus* fosse in grado di inibire l'alterazione degli enzimi ossidanti (Superossido dismutasi, Catalasi) indotta dal bioaccumulo di Cd e pertanto di ridurre gli effetti tossici. Risulta dunque di fondamentale importanza verificare se tali effetti protettivi siano riscontrabili anche nella specie di interesse commerciale *Sparus aurata* oggetto di questo studio e se soprattutto siano riscontrabili anche dopo l'esposizione degli animali al mercurio. Alla luce dei potenziali risvolti applicativi, inoltre, è stata scelta la specie *Sparus aurata* per via del suo importante interesse commerciale.

Nello specifico le attività del WP5- task 5.5.2, hanno previsto la somministrazione di mangimi sperimentali arricchiti con ingredienti funzionali e probiotici in grado di modulare il microbiota intestinale dei pesci e la successiva contaminazione del mezzo acquoso con l'obiettivo di studiare e ottenere "prodotti ittici con microbioma modulato" innovativi e potenzialmente in grado di rispondere alle contaminazioni ambientali.

METODOLOGIA DELL'ESPERIMENTO

Lo studio ha previsto l'utilizzo di 144 orate (*Sparus aurata*) stabulate presso l'impianto sperimentale di acquacoltura dell'IRBIM-CNR di Messina (Figura 1).

Il protocollo sperimentale di seguito descritto è stato autorizzato dal Ministero della Salute (Autorizzazione n° 707/2021-PR).



Figura 1: *Impianto Sperimentale di Acquacoltura – Istituto per le Risorse Biologiche e le Biotecnologie Marine (IRBIM) - Consiglio Nazionale delle Ricerche*

La dimensione del campione è stata stimata utilizzando il software G*Power versione 3.1.9.4 per assicurare che il numero di esemplari corrisponda al numero minimo necessario al raggiungimento di un'accettabile robustezza statistica.

Le procedure utilizzate per il trasporto delle orate hanno avuto come principio di base il rispetto del benessere animale e come riferimento scientifico/legislativo le raccomandazioni contenute nel documento formulato dal Panel di esperti sulla salute ed il benessere animale dell'EFSA (Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare). In particolare le orate sono state trasportate dall'azienda produttrice all'impianto sperimentale dell'IRBIM all'interno di vasche in polietilene (per uso

alimentare) isoterliche appositamente studiate per il trasporto dei pesci e dotate di sistema di ossigenazione ausiliario. Durante il trasporto le orate sono state ispezionate regolarmente in modo da mantenere il livello di ossigeno in vasca nel range di 6-7 mgL⁻¹. Una volta arrivati in impianto, i pesci sono stati trasferiti nelle vasche di destinazione avendo cura di far acclimatare le orate alle nuove condizioni ambientali, sostituendo gradualmente l'acqua di trasporto con l'acqua delle vasche di stabulazione. Prima dell'inizio della sperimentazione, tutti gli esemplari sono stati sottoposti ad un periodo di acclimatazione della durata di circa un mese durante il quale sono state effettuate periodiche osservazioni per verificare la presenza di segni di sofferenza, patologie e/o comportamenti anomali.

Nel dettaglio vengono riportate le condizioni di mantenimento delle orate durante la sperimentazione:
Temperatura: Le orate in quanto specie euriterme vivono entro range di temperatura molto ampi (5-32°C). Durante la fase di sperimentazione la temperatura media misurata nelle vasche è stata di circa 24° C.

Ossigeno disciolto: Il consumo di ossigeno (mg O₂ Kg⁻¹ h⁻¹) è stato calcolato in funzione del numero di animali presenti in vasca, monitorato costantemente tramite sonda multiparametrica e mantenuto ad un livello tra 7 e 8 mgL⁻¹ tramite l'utilizzo di ossigenatori ausiliari ed un sistema di pompaggio di aria.

pH: il valore di pH è stato mantenuto all'interno del range di 6.5-8.5.

Ammoniaca: la concentrazione di ammoniaca è stata mantenuta pari o inferiore a 0.26 mg L⁻¹.

Salinità: la salinità è stata mantenuta su un valore di 37-38‰.

Fotoperiodo: il fotoperiodo è stato naturale.

Densità: La densità in vasca è stata mantenuta bassa (circa 2 Kg/m³) in modo da garantire la qualità dell'acqua ed il benessere dei pesci.

Alimentazione: I pesci sono stati alimentati due volte al giorno (alle 9.00 a.m. ed alle 16.00 p.m.) e la razione giornaliera distribuita in modo da evitare competizione.

Tutti i parametri chimico-fisici sono stati controllati giornalmente tramite sonda multiparametrica.

Inoltre è stato messo a punto uno score sheet specifico per le orate che ha consentito di monitorare il benessere dei pesci in seguito all'esposizione a concentrazioni sub-letali di Mercurio.

Il "clinical score sheet" è basato su 5 segni clinici (i. alterazioni del comportamento natatorio; ii. alterazioni cromatiche della livrea; iii. alterazioni della frequenza opercolare; iv. presenza di edemi e/o distensione addominale; v. alterazioni del comportamento) a ciascuno dei quali è assegnato un punteggio da 0 a 3 in relazione alla presenza/assenza ed alla severità del sintomo.

L'attività sperimentale ha messo in evidenza la totale assenza di segni clinici indicativi di sofferenza e/o prodromici di morte durante i 30 giorni di esposizione. Non si sono verificati, peraltro, episodi di mortalità, né tantomeno, si è reso necessaria l'applicazione di end-points umanitari.

Il protocollo sperimentale delle attività ha previsto la comparazione di una dieta controllo vs 2 diete sperimentali somministrate ad orate esposte ai contaminanti selezionati.

La dieta controllo –è una formula collaudata per l'ingrasso di orate d'allevamento. Le sue caratteristiche chimico-nutrizionali sono riportate nella tabella sottostante (Tabella 1).

Granulometria mm	4.6-5,6
Proteina grezza %	43.00
Oli e grassi grezzi %	21.00
Cellulosa grezza %	2.50
Ceneri grezze %	5.60
Carboidrati totali %	18.90
Fosforo %	0.90
Vitamina C mg/Kg	160
Vitamina E mg/Kg	160
Energia digeribile mj/Kg	19.76

Le diete sperimentali sono state formulate a partire dalla dieta controllo con l'aggiunta dei seguenti additivi in ragione dell'1% sul totale.

Dieta sperimentale 1: è stata formulata con i seguenti additivi: mono, di e trigliceridi di acidi grassi (acidi grassi a catena corta – SCFA) ed estratto di castagno (*Castanea sativa* Mill)

Dieta sperimentale 2: è stata formulata con i seguenti additivi: lievito (*Saccharomyces cerevisiae*); acido caprilico; complesso di vitamine gruppo B ed estratto di Quebracho colorado (*Schinopsis balansae*)

Le orate sono state alimentate per tre mesi con i mangimi sperimentali con l'obiettivo di modularne il microbioma e successivamente esposte per 20 giorni a concentrazioni sub letali di Hg.

Per la sperimentazione sono state utilizzate un totale di 144 orate distribuite in 12 vasche come illustrato nel seguente schema operativo (Figura 2).

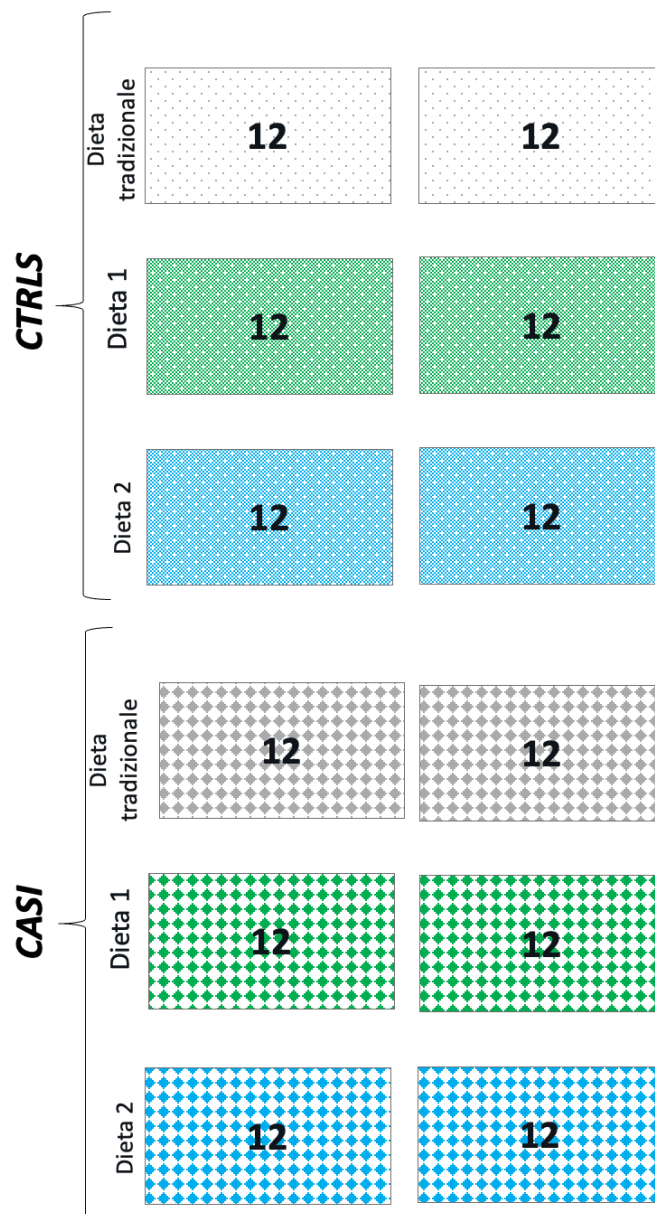


Figura 2: Schema operativo adottato per la sperimentazione.

Per verificare l'accumulo di Hg nei tessuti ed organi l'impianto è stato chiuso e le concentrazioni di ossigeno all'interno delle vasche sono state mantenute mediante un sistema di tubi connessi a degli ossigenatori. Al fine di potere osservare un bioaccumulo nei tessuti in tempi relativamente brevi, i pesci sono stati esposti ad una concentrazione sub letali di Hg ($5 \mu\text{gL}^{-1}$) ovvero notevolmente al di sotto della Lethal Concentration di 0.81 mg/L ma, allo stesso tempo, maggiore delle concentrazioni medie presenti nel Mar Mediterraneo ($0.2 - 0.8 \text{ ngL}^{-1}$; Kotnik et al., 2013).

Le dosi di Hg, precedentemente preparate in laboratorio, sono state aggiunte direttamente in vasca mediante pipetta graduata utilizzando tutti i dispositivi di sicurezza atti a garantire l'incolumità dell'operatore (Figura 3).



Figura 3: Somministrazione del contaminante in vasca.

Ogni giorno è stato effettuato un ricambio del 10% del volume totale della vasca (100 litri) con contemporanea rimozione (per aspirazione) dei rifiuti organici. Dopo ogni ricambio parziale d'acqua la concentrazione di Hg è stata mantenuta costante mediante somministrazione di dosi aggiuntive di standard del metallo. Aliquote di acqua di mare sono state prelevate nel corso di tutta la sperimentazione per la verifica delle concentrazioni di Hg nel tempo.

La scelta dei tempi di prelievo e degli organi da investigare sono stati delineati grazie ai risultati ottenuti dalla sperimentazione pilota avvenuta precedentemente e finalizzata alla conoscenza delle cinetiche di accumulo di Cadmio e Hg negli organi e tessuti della specie utilizzata (Bonsignore, Messina et al., 2023).

Sei esemplari per ogni gruppo sono stati prelevati a diversi intervalli temporali: all'inizio della sperimentazione (20 giugno; T0) e dopo 4 (T4), 10 (T10) e 20 (T20) giorni dalla somministrazione del contaminante. Dopo 20 giorni si è deciso di terminare la somministrazione del contaminante e di effettuare un ulteriore prelievo al trentesimo giorno di sperimentazione (T30- 21 luglio 2023 al fine di valutare un'eventuale detossificazione dei pesci dal contaminante.

Ad ogni intervallo temporale è stato eseguito il sacrificio dei pesci per il campionamento dei seguenti organi: branchie, rene, fegato, intestino e muscolo.

I pesci sono stati sacrificati per immersione in una soluzione acquosa contenente una overdose (0.5g/L) di tricaina metansulfonato MS222. Una volta verificato il decesso (che avviene in pochi secondi) mediante constatazione della cessazione dei movimenti opercolari da almeno 10 minuti, si è proceduto con il rilievo dei parametri biometrici e l'apertura della cavità celomatica per il prelievo degli organi precedentemente indicati.



Figura 4: Procedure di sacrificio (a), acquisizioni biometrie (b) e prelievo di tessuti ed organi (c, d) negli esemplari di *S. aurata*.

Aliquote dei tessuti/organi prelevati sono stati opportunamente conservate a -20°C per l'analisi dei contaminanti ed a -80°C per indagini volte alla valutazione di meccanismi molecolari e di risposta metabolica conseguenti allo stress indotto da contaminanti e meccanismi di detossificazione e adattamento.

BIBLIOGRAFIA

Bates JM, Mittge Ex, Kuhlman J, Baden KN, Cheesman SE, and Guillemin K. (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev. Biol.* 297, 374–386.

Berg K, Puntervoll P, Valdernesnes S, Goksøyr A. Responses in the brain proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to methylmercury. *Aquat. Toxicol.* 2010; 100: 51-65.

Bernhoft A. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *J Environ Public Health.* 2012.

Bonsignore, M. and Messina, C.M., Bellante*, A., Manuguerra, S., Arena R., Santulli, A., Maricchiolo, G., Del Core, M., Sprovieri, M. Chemical and biochemical responses to sub-lethal doses of mercury and cadmium in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Chemosphere* 307(2022), Part 3, 135822.

Cambier S, Gonzalez P, Nathalie MD, Brèthes D, Fujimura M, Bourdineaud JP. Effects of dietary methylmercury on the zebrafish brain: Histological, mitochondrial, and gene transcription analyses. *BioMetals.* 2012; 25: 165-180.

- Gatesoupe FJ, Zambonino Infante JL, Cahu C, and Quazuquel P (1997). Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158, 118–127.
- Ingerslev HC, Jørgensen LV, Strube M, Larsen N, Dalsgaard I, Boye M, et al. (2014a). The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture* 424–425, 24–34.
- Ingerslev HC, Strube ML, Jørgensen LV, Dalsgaard I, Boye M, and Madsen L. (2014b). Diet type dictates the gut microbiota and the immune response against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 40, 624–633.
- Kirubakaran R and Joy K. Toxic effects of mercury on testicular activity in the freshwater teleost, *Clarias batrachus* (L.). *Journal of Fish Biology.* 2006; 41: 305-315.
- Kotnik, J, F. Sprovieri, N. Ogrinc, M. Horvat & N. Pironne. Mercury in the Mediterranean, part I: spatial and temporal trends. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2013; 21: 4063-4080.
- Rawls JF, Samuel BS, and Gordon JI (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 30, 4596–4601.
- Salinas I, Díaz-Rosales P, Cuesta A, Meseguer J, Chabrállón M, Moriñigo MA, et al. (2006). Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 279–286.
- Semova I, Carten JD, Stombaugh J, Mackey LC, Knight R, Farber SA, et al. (2012). Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microb.* 12, 277–288.
- Wang AR, Ran C, Ringo E, and Zhou Z G (2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev. Aquacult.* 10, 1–15.
- Wang N, Jiang M, Zhang P, Shu H, Li Y, Guo Z, Li Y (2020). Amelioration of Cd induced bioaccumulation, oxidative stress and intestinal microbiota by *Bacillus cereus* in *Carassius auratus gibelio*. *Chemosphere.* 245. 125613.
- World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1991; Inorganic mercury: environmental health criteria.