

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di Protezione dei Sistemi Agroalimentare e
Urbano e valorizzazione delle biodiversità

Scuola di dottorato in Terra, Ambiente e Biodiversità

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE NATURALISTICHE E AMBIENTALI**

CICLO XXIII

**Approfondimento delle conoscenze
sull'ecologia dei Ditteri Chironomidi nelle
acque interne Italiane**

TUTOR: PROF. **BRUNO ROSSARO**

CO-TUTOR: DOTT.SSA **VALERIA LENCIONI**

COORDINATORE DEL DOTTORATO: PROF. **ANDREA TINTORI**

CANDIDATA: DOTT.SSA **VALENTINA GRAZIOLI**

(...) la motivazione su cui si fonda questo comportamento non va ricercata nell'appetenza verso un'unica azione finale che costituisce lo scopo e che soddisfa la pulsione, ma deriva da un'altra fonte, cui spetta la singolare capacità di attivare molte, o addirittura tutte le coordinazioni ereditarie dell'animale. Questo tipo di acquisizione del sapere (...) viene chiamato comportamento esplorativo o di curiosità.(...).L'elemento qualitativamente nuovo consiste nel fatto che la motivazione è fornita dal processo di apprendimento stesso, e non dall'esecuzione dell'azione finale. Con questo passo apparentemente così piccolo si manifesta un processo cognitivo di tipo del tutto nuovo, che è fondamentalmente identico alla ricerca umana, e che conduce, senza che intervengano modificazioni essenziali, allo studio scientifico della natura.

K. Lorenz

INDICE

1. PREFAZIONE	5
2. SCOPO DELLA TESI	9
3. INDICATORI BIOLOGICI	11
3.1. INTRODUZIONE	11
3.2. MATERIALI E METODI	13
3.2.1. Metodi di campionamento.....	22
3.2.2. Stazioni di campionamento	22
3.2.3. Identificazione tassonomica	25
3.2.4. Analisi dei dati.....	25
3.2.5. Self Organizing Maps analysis.....	26
3.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	27
3.3.1. Fauna	27
3.3.2. Fauna e tipologie lacustri	31
3.4. CONCLUSIONI	33
4. MODELLO ANIMALE: <i>Chironomus riparius</i> Meigen, 1804	37
4.1. I DITTERI CHIRONOMIDI	37
4.2. <i>Chironomus riparius</i> Meigen, 1804.....	41
4.3. RACCOLTA E ALLEVAMENTO DEI CHIRONOMIDI.....	43
5. RESISTENZA ALL'ANOSSIA	49
5.1. INTRODUZIONE	49
5.2. MATERIALI E METODI	53
5.2.1. Disegno sperimentale.....	53
5.2.2.1. Ipossia progressiva	56
5.2.2.2. Anossia	57
5.2.2.3. Iperossigenazione	58
5.2.2. Misura del consumo di ossigeno	59
5.2.3. Estrazione dell'emolinfa	60
5.2.4. Dosaggio dell'emoglobina (Hb).....	60
5.2.5. Dosaggio delle proteine nell'emolinfa	62
5.2.6. Preparazione dei campioni per il dosaggio enzimatico.....	63
5.2.7. Attività dell'Alcol-deidrogenasi (ADH)	64
5.2.8. Dosaggio delle proteine totali.....	65
5.2.9. Analisi statistiche.....	67
5.3. RISULTATI	68
5.3.1. Ipossia progressiva e consumo di ossigeno	68

5.3.2. Anossia	70
5.3.3. Iperossigenazione	71
5.4. DISCUSSIONE	72
5.5. CONCLUSIONI	77
6. RESISTENZA AI METALLI PESANTI E PESTICIDI	79
6.1. INTRODUZIONE	79
6.1.1. Rame.....	79
6.1.2. Azadiractina	80
6.1.3. Heat Shock Proteins	82
6.1.4 Citocromo P450.....	84
6.2 MATERIALI E METODI	86
6.2.1. Acclimatazione e shock.....	86
6.2.1.1. Analisi statistica dei dati di sopravvivenza	87
6.2.2. Analisi dell'espressione genica di heat shock proteins e Cyp450....	89
6.2.2.1. Larve utilizzate per lo studio dell'espressione genica	89
6.2.2.2 Trascrittasi inversa (RT-PCR)	90
6.2.2.3. Estrazione dell'RNA totale	90
6.2.2.4 Digestione con Dnasi e pulizia dell' RNA	91
6.2.2.5. Retrotrascrizione	92
6.2.2.6. Amplificazione del template di cDNA	93
6.2.2.7 Analisi dei dati.....	95
6.3. RISULTATI	95
6.3.1. Esposizioni al rame.....	95
6.3.1.1. Sopravvivenza	95
6.3.1.2. Induzione genica in risposta al rame	96
6.3.2. Esposizioni all'azadiractina.....	99
6.3.2.1. Sopravvivenza	99
6.3.1.2. Induzione genica in risposta all'azadiractina	100
6.4. DISCUSSIONE	102
6.3. CONCLUSIONI.....	105
7. CONCLUSIONI GENERALI.....	107
BIBLIOGRAFIA	111
ALLEGATO 1	134
ALLEGATO 2	138
ALLEGATO 3	140
ALLEGATO 4	141
ALLEGATO 5	143

ALLEGATO 6	144
ALLEGATO 7	145
ALLEGATO 8	147
ALLEGATO 9	148
ALLEGATO 10	149
ALLEGATO 11	150
RINGRAZIAMENTI.....	151

1. PREFERAZIONE

Fin dalla più lontana preistoria la vita delle comunità umane è stata profondamente influenzata dalla presenza di acqua dolce: l'uomo da sempre ha posto i suoi insediamenti presso laghi e fiumi, sfruttando la presenza di acqua sia per scopi alimentari che, più recentemente, per scopi irrigui meccanici e, nel corso del XX secolo, anche per scopi industriali. Lo sfruttamento degli ambienti d'acqua dolce e degli ambienti ad essi limitrofi ha portato molti cambiamenti in laghi e fiumi sia a livello morfologico (costruzione di dighe, canali e raccolte d'acqua artificiali) sia a livello chimico-fisico (aumento del trasporto solido e della temperatura, arricchimento in nutrienti, metalli e altre sostanze di origine antropica, diminuzione del flusso, ecc.). Negli ultimi cento anni la pressione delle attività umane sui laghi e fiumi ha raggiunto livelli non più sostenibili dalle comunità che in essi vivono, e in molti casi si è assistito ad un deterioramento degli habitat, ad un impoverimento delle comunità e in definitiva ad una generale riduzione della qualità dei corpi idrici.

In anni recenti si è assistito ad una presa di coscienza della necessità di tutelare le risorse idriche, e a partire dagli anni '70 anche in Italia sono state promulgate in questo senso: a partire dal 1976 la cosiddetta legge Merli (Legge 319/1976) stabiliva un'unica disciplina degli scarichi con un'applicazione rigida e uniforme di valori limite degli inquinanti. In seguito, nel 1999, il Decreto 152/99 recepiva una lunga serie di Direttive Comunitarie in materia di acque. Con la sua emanazione sono state abrogate numerose norme (tra le quali la c.d. Legge Merli); la nuova legge poneva in capo al "titolare" dello scarico nuovi obblighi e poggiava su due presupposti fondamentali: tutti gli scarichi devono essere autorizzati (concetto

presente anche nella vecchia normativa), e devono rispettare valori limite di emissione stabiliti in funzione degli obiettivi di qualità dei corpi idrici.

Nel 2000 la Direttiva 2000/60/EC, conosciuta anche come Water Framework Directive (WFD) ha avviato un cambiamento nella concezione di qualità dell'acqua, abbandonando la visione utilitaristica della risorsa idrica secondo cui l'acqua è un prodotto che deve essere monitorato chimicamente per assicurarne lo sfruttamento antropico, ed abbracciando una visione dell'acqua quale eredità per le future generazioni.

Al fine di raggiungere un buono stato delle acque superficiali gli Stati membri devono adottare le misure necessarie per: impedire il deterioramento dello stato di tutti i corpi idrici superficiali; proteggere, migliorare e ripristinare tutti i corpi idrici superficiali, i corpi idrici artificiali e quelli fortemente modificati; ridurre progressivamente l'inquinamento causato dalle sostanze pericolose prioritarie e arrestare o eliminare gradualmente le emissioni, gli scarichi e le perdite di sostanze prioritarie.

La Direttiva chiede agli Stati membri di individuare sul proprio territorio dei siti caratterizzati da uno stato ecologico elevato, le cui condizioni biologiche saranno prese come riferimento per le condizioni a cui dovranno essere portati gli altri corpi idrici appartenenti alla stessa tipologia. Gli elementi qualitativi per la classificazione dello stato ecologico sono molti e comprendono, tra gli altri, anche la composizione e abbondanza dei macroinvertebrati bentonici. Gli invertebrati bentonici giocano un ruolo chiave negli ecosistemi d'acqua dolce, essendo il *link* tra i produttori primari, il detrito e i più alti livelli delle reti trofiche acquatiche (Brinkhurst, 1974, Stoffels *et al.*, 2005).

Prima della promulgazione della WFD vi era già la necessità di avere indici che permettessero di ottenere un'informazione sintetica riguardo allo "stato di salute" di un corpo idrico. Scopo degli indici biotici è proprio quello di fornire tale informazione, rilevando se una determinata comunità corrisponde a quella che si dovrebbe osservare in un ambiente di riferimento. L'uso di questi indici è assai sviluppato soprattutto nello studio delle acque interne perché, anche se non permette l'individuazione delle cause di degrado, consente di mettere in evidenza in modo rapido l'esistenza di un inquinamento pregresso grazie all'effetto "memoria" della comunità, la cui struttura "integra" la qualità dell'acqua di un precedente periodo. Gli organismi utilizzati per la costruzione degli indici biologici sono chiamati bioindicatori.

Il bioindicatore ideale deve avere alcune caratteristiche, quali:

- capacità di integrare gli effetti di diversi stress ambientali nello spazio e nel tempo;
- relativa facilità di identificazione specifica, anche da parte di personale non specializzato;
- distribuzione ubiquitaria che permette comparazioni a livello regionale, nazionale e sovranazionale;
- presenza in elevate densità e dimensioni relativamente grandi che facilitano la raccolta sul campo nonché il riconoscimento durante lo smistamento;
- variabilità genetica e nicchia ecologica piuttosto ristretta (organismo stenoecio);

- mobilità limitata e durata del ciclo vitale relativamente lunga;
- valenza ecologica ben conosciuta in letteratura;
- facilità di allevamento in laboratorio al fine di essere utilizzato in eventuali test di tossicità;

Ogni cambiamento ambientale, per esempio nella concentrazione di nutrienti, ma non solo, si riflette sulla struttura della comunità di macroinvertebrati (Carvalho *et al.*, 2002). Per questo i macroinvertebrati bentonici sono indicatori di molteplici cause di degrado dei corpi idrici (Solimini *et al.*, 2006), e vengono comunemente usati nel monitoraggio biologico e nella formulazione di indici di qualità. Tra i macroinvertebrati i Chironomidi sono considerati tra migliori indicatori delle condizioni di ossigenazione delle acque (Brundin, 1949) e del loro stato trofico (Sæther, 1979). Le larve acquatiche di questi ditteri sono ampiamente utilizzate nel monitoraggio ambientale delle acque e nei test di tossicità in laboratorio, avendo un'ampia distribuzione e un ciclo vitale piuttosto breve, essendo sensibili a diversi inquinanti ed essendo facili da allevare (Ingersoll & Nelson, 1990; Choi, 2004). Purtroppo la scarsa conoscenza della loro tassonomia, autoecologia, biologia e fisiologia spesso costituisce un ostacolo al loro utilizzo come indicatori, per cui il loro studio fornisce un utile strumento in un'ottica di ripristino e tutela delle acque interne.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo generale di questa tesi è quello di studiare la comunità di macroinvertebrati bentonici di ambienti lacustri nel loro complesso, e dei Ditteri Chironomidi in particolare, per capire quali fattori ambientali influenzino maggiormente la loro composizione e distribuzione e fornire informazioni sulla loro autoecologia.

Tra i Chironomidi è stata scelta una specie modello, il *Chironomus riparius* Meigen 1804, su cui sono stati fatti test tossicologici e di cui sono stati analizzati i meccanismi biochimici e molecolari che stanno alla base della resistenza agli stress.

In particolare sono stati studiati:

- Il METABOLISMO ANAEROBIO per comprendere gli adattamenti fisiologici che permettono alle larve di vivere in ambienti fortemente eutrofizzati e con forte scarsità di ossigeno;
- l'ESPRESSIONE DEI GENI *hsp10*, *hsp40*, *hsp70*, *hsc70* e *cyp450* in risposta all'esposizione a metalli pesanti (rame) e pesticidi (azadiractina) per valutare gli impatti dell'agricoltura (in particolare di quella biologica) sulle comunità residenti in corpi idrici che attraversano aree coltivate;

3. INDICATORI BIOLOGICI

3.1. INTRODUZIONE

Com'è noto i macroinvertebrati bentonici possono essere utilizzati come utile strumento di valutazione e biomonitoraggio dei corpi idrici. Sono raccomandati per stimare la qualità dell'acqua perché offrono svariati vantaggi (Rosenberg & Resh, 1993): sono organismi ubiquitari e sono influenzati da cambiamenti ambientali, presentano un vasto numero di specie offrendo un ampio spettro di risposte a stress ambientali, hanno natura sedentaria che permette un'analisi spaziale degli inquinanti e dei fattori di disturbo, ed infine consentono analisi a lungo termine in quanto hanno cicli vitali abbastanza lunghi da fungere da controllori in continuo dell'acqua in cui vivono. Impatti antropici diretti (presenza di infrastrutture, scarichi industriali e fognari) determinano infatti alterazioni sulle acque con ricadute, strutturali ed ecologiche, sul comparto biologico (Rosenberg & Resh, 1993). Sono indicatori di condizioni di naturalità o di stress antropogenico, come per esempio l'eutrofizzazione (O'Toole *et al.*, 2008), l'acidificazione (SNIFFER, 2007), le alterazioni idromorfologiche della zona litorale e le alterazioni di livello dovute ai prelievi di acqua per scopi idroelettrici o irrigui (Solimini *et al.*, 2006; Feld & Hering, 2007), la presenza di sostanze tossiche (e.g. Peeters *et al.*, 2001; Binelli *et al.*, 2004; Schäfer *et al.*, 2007).

Oligocheti e Chironomidi sono considerati i più utili indicatori delle condizioni di ossigeno (Brundin, 1949) quando l'ossigeno è al di sotto della saturazione, e di stato trofico (Sæther, 1979) quando l'ossigeno non è il fattore limitante. Questi due taxa sono costituenti principali della comunità lacustre a macroinvertebrati, e

sono caratterizzati da diverse caratteristiche autoecologiche: i Ditteri Chironomidi sono più mobili, non essendo direttamente legati alla qualità del sedimento lacustre e nutrendosi di sedimento fresco. Tendono quindi a dare una più rapida risposta alle variazioni delle condizioni ambientali (Dinsmore & Prepas, 1997; Lang & Lods-Crozet, 1997). Gli Oligocheti invece, sono più sedentari e strettamente correlati alla tipologia e alla qualità del sedimento in cui vivono, nutrendosi di batteri associati alla sostanza organica decomposta, pertanto presentano una maggior resistenza alle variazioni ambientali.

La *Water Framework Directive* (WFD; 2006/60/EC) crea un nuovo contesto legislativo per la gestione, l'uso, la protezione ed il ripristino delle risorse idriche sia superficiali che sotterranee. Lo scopo della WFD è di ottenere una gestione sostenibile delle risorse idriche, raggiungere uno stato ecologico buono, e prevenire ulteriori deterioramenti.

La WFD richiede che lo stato ecologico dei corpi idrici sia valutato utilizzando elementi biologici che ne compongono l'ecosistema, come per esempio fitoplancton, pesci, flora e fauna bentonica. Questo implica la creazione di un sistema di classificazione che riesca ad evidenziare in modo prevedibile eventuali cambiamenti nella comunità biologica e nel funzionamento dell'ecosistema in risposta a pressioni antropiche.

Come prerequisito per lo studio delle reazioni delle diverse specie alle pressioni antropogeniche, è necessario conoscere anche la risposta dei macroinvertebrati bentonici ai fattori naturali; devono essere prese in considerazione le interazioni tra i due tipi di fattori e dev'essere tenuto presente il fatto che esistono variabili

ambientali influenzate sia da fattori antropici che naturali (i.e. temperatura dell'acqua, conducibilità, nutrienti, ecc.) (Moss *et al.*, 2003).

3.2. MATERIALI E METODI

Per questo lavoro è stato analizzato un *database* di circa 50 laghi italiani (Fig. 3.1, Tab. 3.1) comprendente dati chimico-fisici e biologici (Tab.3.2 e 3.3), per un totale di circa 15000 campioni. In questa analisi sono stati inclusi campioni prelevati in diversi periodi, dal 1960 in poi. Sono stati analizzati solo i campioni per cui erano disponibili dati sia biologici che ambientali (morfometrici e chimico-fisici).



Figura 3.1. Mappa dei più importanti laghi analizzati.

Tabella3.1. Caratteristiche morfometriche dei laghi analizzati

Lago	Tipologia	Abbreviazioni	altitudine (m)	volume (m ³ 10 ⁶)	superficie (km ²)	profondità max (m)
Alplake (1)	AL-1-2-7	Alplake*	>2000	<4	<0.2	<10
Alserio	AL-5		260	6.6	1.23	8.1
Annone.est	AL-5	AnnoneE	224	24	3.81	11.3
Annone.ovest	AL-5	AnnoneW	224	6.8	1.7	10.1
Aveto	ME-3-4		600	<10	<2	<10
Avigliana.gran	AL-6	AviglianaG	352	16.2	0.83	26
Avigliana.Picco	AL-5	AviglianaP	356	4.5	0.58	12
Bolsena	ME-6-7		305	8922	114	146
Bracciano	ME-6-7		160	4950	57.47	160
Caldaro	AL-5		214	5.5	1.51	7
Caldonazzo	AL-6		450	149	5.6	49
Candia	AL-5		226	8.1	1.35	8
Canzolino	AL-7		540	0.0007	0.07	15
Cavedine	AL-6		242	24.5	1.01	50
Comabbio	AL-5		243	16.62	3.58	7.7
Como	AL-3		198	22500	145	410
Dirillo	ME-3-4		328	20.1	1.11	46
Endine	AL-5		338	11.93	2.13	10
Frassino	AL-6		74	2.4	0.3	15.2
Garda	AL-3	GardaVR/TN/	65	49030	370	346
Garlate	AL-6		198	70	4.47	34
Ghirla	AL-5		442	3	0.25	14
Idro	AL-6		368	33.5	11.4	122
Iseo	AL-3		186	7600	61	251
Lamar	AL-6		714	0.25	0.04	16
Lases	AL-6		629	1.75	0.16	31
Levico	AL-6		440	6,5	1.16	38
Maggiore	AL-3	MaggVA/VB	194	37500	210	370
Mergozzo	AL-6		194	83	1.83	73
Monate	AL-6		266	45	2.51	34
Montorfano	AL-5		396	1.9	0.46	6.8
Nemi	ME-6-7		318	32.5	1.67	34
Occhito	ME-3-4		195	290.83	13.74	
Pertusillo	ME-3-4		530	152.2	6.93	90
Piano	AL-5		276	4.03	0.63	12.5
Pusiano	AL-6		259	69.2	4.95	24
Segrino	AL-5		374	1.2	0.38	8.6
Sirio	AL-6		271	5.4	0.31	43.5
Tenno	AL-6		570	3.9	0.25	47.7
Varese	AL-6		238	100	14.56	26
Vico	ME-6-7		507	268	12.1	49.5
Viverone	AL-6		230	125	5.58	50
Ponds (2)		Pond*	319	<1.2	<0.11	<5

(1) La categoria "Alplake" include piccoli laghi delle Alpi Occidentali (Ossola, Canton Ticino) e Centrali (Trentino (TN), Avisio)

(2) La categoria "Ponds" include piccole pozze nell'Italia settentrionale (Lodigiano, Lombardia) e centrale (Zittola, Abruzzo)

Tabella3.2. Variabili ambientali usate nell'analisi dei dati

Descrizione	Abbreviazione	Unità di misura
Altitudine	altit	m
Bacino i drenaggio	bac	km ²
Volume	vol	m ³ 10 ⁶
Superficie del lago	sup	km ²
profondità massima del lago	maxdepth	M
Profondità di campionamento	Depth	m
pH	pH	
pH colonna d'acqua	Ph colu	
Conducibilità	cond	µS/cm
Conducibilità ipolimnio	Cond hypo	µS/cm
Conducibilità metalimnio	Cond meta	µS/cm
Conducibilità colonna d'acqua	Cond colu	µS/cm
Alcalinità colonna d'acqua	Alcal	mg/l
Temperatura dell'acqua	Temp	°C
Trasparenza colonna d'acqua	Trasp	m
O ₂ ipolimnio	O ₂ hypo	mg/l
O ₂ metalimnio	O ₂ meta	mg/l
O ₂ colonna d'acqua	O ₂	mg/l
O ₂ % saturazione ipolimnio	O ₂ %hypo	%sat
O ₂ % saturazione metalimnio	O ₂ %meta	%sat
O ₂ % colonna d'acqua	O ₂ %	%sat
Fosforo totale	TP	µg/l
Fosforo totale colonna d'acqua	TPcolu	µg/l
Nitrato colonna d'acqua	NO ₃	µg/l
Ammonio colonna d'acqua	NH ₄	µg/l
Clorofilla colonna d'acqua	Chlra	µg/l
Abitanti residenti	Res ab	Ind/km ²
Abitanti temporanei	Temp ab	Ind/km ²

Tabella 3.3. Lista delle specie

specie	abbreviazioni
<i>Asellus aquaticus</i> (Linnaeus, 1758)	<i>A. aquaticus</i>
<i>Ablabesmyia monilis</i> (Linnaeus, 1758)	<i>A. monilis</i>
<i>Aulodrilus pluriseti</i> (Piguet, 1906)	<i>A. pluriseti</i>
<i>Baetis rhodani</i> (Pictet, 1843)	<i>B. rhodani</i>
<i>Bichaeta sanguinea</i> Bretscher, 1900	<i>B. sanguinea</i>
<i>Branchiura sowerbyi</i> Beddard, 1892	<i>B. sowerbyi</i>
<i>Bithynia tentaculata</i> (Linnaeus, 1758)	<i>B. tentaculata</i>
<i>Bothrioneurum vej dovskianum</i> Stolc, 1886	<i>B. vej dovskianum</i>
<i>Crenobia alpina</i> (Dana, 1766)	<i>C. alpina</i>
<i>Cricotopus annulator</i> Goetghebuer, 1927	<i>C. annulator</i>
<i>Chironomus anthracinus</i> Zetterstedt, 1860	<i>C. anthracinus</i>
<i>Cladotanytarsus atridorsum</i> Kieffer, 1924	<i>C. atridorsum</i>
<i>Orthocladius</i> spp.	<i>C. bicinctus</i>
<i>Cryptochironomus defectus</i> (Kieffer, 1913)	<i>C. defectus</i>
<i>Chaoborus flavicans</i> (Meigen, 1830)	<i>C. flavicans</i>
<i>Cryptotendipes pseudotener</i> (Goethebuer, 1922)	<i>C. holsatus</i>
<i>Corynoneura lobata</i> Edwards, 1924	<i>C. lobata</i>
<i>Conchapelopia pallidula</i> (Meigen, 1818)	<i>C. pallidula</i>
<i>Chironomus plumosus</i> (Linnaeus, 1758)	<i>C. plumosus</i>

Tabella 3.3. Lista delle specie (continua)

specie	abbreviazioni
<i>Corynoneura scutellata</i> Winnertz 1846	<i>C. scutellata</i>
Ceratopogonidae sp.	<i>C. vermiformes</i>
<i>Cladopelma viridulum</i> (Linnaeus, 1767)	<i>C. viridulum</i>
<i>Caenis</i> sp.	<i>Caenis</i>
<i>Dero digitata</i> (Müller, 1774)	<i>D. digitata</i>
<i>Dina lineata</i> (O. F. Müller, 1774)	<i>D. lineata</i>
<i>Dicrotendipes nervosus</i> (Stæger, 1839)	<i>D. nervosus</i>
<i>Dugesia</i> sp.	<i>D. tigrina</i>
<i>Diamesa tonsa</i> (Haliday, 1856)	<i>D. tonsa</i>
<i>Demicryptochironomus vulneratus</i> (Zetterstedt, 1838)	<i>D. vulneratus</i>
<i>Endochironomus dispar</i> (Meigen 1830)	<i>E. dispar</i>
<i>Einfeldia</i> sp.	<i>E. longipes</i>
<i>Endochironomus tendens</i> (Fabricius, 1775)	<i>E. tendens</i>
<i>Eiseniella tetraedra</i> (Savigny, 1826)	<i>E. tetraedra</i>
<i>Echinogammarus stammeri</i> (S Karaman, 1931)	<i>Echinogammarus</i>
<i>Glyptotendipes pallens</i> (Meigen, 1804)	<i>G. pallens</i>
<i>Psectrocladius</i> (<i>Allopsectrocladius</i>) <i>obvius</i> (Walker, 1856)	<i>H. marcidus</i>
<i>Helobdella stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)	<i>H. stagnalis</i>
Hydracarina	Hydracar

Tabella 3.3 Lista delle specie (continua)

specie	abbreviazioni
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparède, 1862	<i>L. hoffmeisteri</i>
<i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)	<i>L. stagnalis</i>
<i>Micropsectra atrofasciata</i> (Kieffer, 1911)	<i>M. atrofasciata</i>
<i>Micropsectra contracta</i> Reiss, 1965	<i>M. contracta</i>
<i>Macropelopia nebulosa</i> (Meigen, 1804)	<i>M. nebulosa</i>
<i>Microtendipes pedellus</i> (De Geer, 1776)	<i>M. pedellus</i>
<i>Micropsectra radialis</i> Goetghebuer, 1939	<i>M. radialis</i>
<i>Nais elinguis</i> Müller, 1774	<i>N. elinguis</i>
<i>Niphargus foreli</i> Humbert, 1877	<i>N. foreli</i>
<i>Neozavrelia fuldensis</i> Fittkau, 1954	<i>N. fuldensis</i>
<i>Physa acuta</i> (Draparnaud, 1805)	<i>P. acuta</i>
<i>Paratendipes albimanus</i> (Meigen, 1818)	<i>P. albimanus</i>
<i>Paratanytarsus</i> spp.	<i>P. austriacus</i>
<i>Psammoryctides barbatus</i> (Grube, 1861)	<i>P. barbatus</i>
<i>Parakiefferiella bathophila</i> (Kieffer, 1912)	<i>P. bathophila</i>
<i>Paracladopelma camptolabis</i> (Kieffer, 1913)	<i>P. camptolabis</i>
<i>Pisidium</i> sp.	<i>P. casertanum</i>
<i>Procladius choreus</i> (Meigen, 1804)	<i>P. choreus</i>
<i>Paracladius</i> sp.	<i>P. conversus</i>

Tabella 3.3 Lista delle specie (continua)

specie	abbreviazioni
<i>Phaenopsectra flavipes</i> (Meigen, 1818)	<i>P. flavipes</i>
<i>Potamoithrix hammoniensis</i> (Michaelsen, 1901)	<i>P. hammoniensis</i>
<i>Potamoithrix heuscheri</i> (Bretscher, 1900)	<i>P. heuscheri</i>
<i>Paracladopelma nigritulum</i> (Goetghebuer, 1942)	<i>P. nigritulum</i>
<i>Paralauterborniella nigrohalteralis</i> (Malloch, 1915)	<i>P. nigrohalteralis</i>
<i>Polypedilum nubeculosum</i> (Meigen, 1804)	<i>P. nubeculosum</i>
<i>Prodiamesa olivacea</i> (Meigen, 1818)	<i>P. olivacea</i>
<i>Pagastiella orophila</i> (Edwards, 1929)	<i>P. orophila</i>
<i>Psectrocladius</i> spp.	<i>P. oxyura</i>
<i>Pseudochironomus prasinatus</i> (Stæger, 1839)	<i>P. prasinatus</i>
<i>Rhyacodrilus</i> sp.	<i>R. coccineus</i>
<i>Slavina appendiculata</i> (Udekem, 1855)	<i>S. appendiculata</i>
<i>Stempellina bausei</i> (Kieffer, 1911)	<i>S. bausei</i>
<i>Spirosperma ferox</i> Eisen, 1879	<i>S. ferox</i>
<i>Stylodrilus heringianus</i> Claparède, 1862	<i>S. heringianus</i>
<i>Stylaria lacustris</i> (Linnaeus, 1767)	<i>S. lacustris</i>
<i>Stylodrilus lemani</i> (Grube, 1879)	<i>S. lemani</i>
<i>Stictochironomus pictulus</i> (Meigen, 1830)	<i>S. pictulus</i>
<i>Sialis</i> sp.	<i>Sialis</i>

Tabella 3.3. Lista delle specie (continua)

specie	abbreviazioni
<i>Theodoxus fluviatilis</i> (Linnaeus, 1758)	<i>T. fluviatilis</i>
<i>Tanytarsus gregarius</i> Kieffer, 1909	<i>T. gregarius</i>
<i>Tanytarsus sylvaticus</i> (van der Wulp, 1859)	<i>T. sylvaticus</i>
<i>Tubifex tubifex</i> (Müller, 1774)	<i>T. tubifex</i>
<i>Uncinaiis uncinata</i> (Orsted, 1842)	<i>U. uncinata</i>
<i>Valvata piscinalis</i> (Müller, 1774)	<i>V. piscinalis</i>
<i>Xenochironomus xenolabis</i> (Kieffer, 1916)	<i>X. xenolabis</i>

3.2.1. Metodi di campionamento

I macroinvertebrati bentonici sono stati campionati sul fondo e sul litorale di diversi laghi con draghe Petersen (Corbella *et al.*, 1956; Nocentini, 1979; Nocentini, 1989) o Ponar (Lencioni *et al.*, 2007; Rossaro *et al.*, 2007) e retino immanicato. I campioni sono stati raccolti tra il tardo inverno e la primavera, durante il periodo di piena circolazione. Campioni aggiuntivi sono poi stati raccolti anche durante il periodo estivo, durante la stratificazione; i laghi alpini sono stati solo campionati in estate. I campioni raccolti sono stati setacciati attraverso un setaccio con maglia di 250 μm , e fissati in formaldeide al 10%. Campioni aggiuntivi sono stati prelevati nei laghi di maggiori dimensioni da subacquei a profondità di 5, 10, 15, 20 e 25 metri, in circa 10 stazioni per lago.

Campioni di exuvie pupali galleggianti e adulti sono stati raccolti tramite l'utilizzo di retini da drift trascinati sulla superficie dell'acqua e retini da adulti, per agevolare l'identificazione dei taxa.

3.2.2. Stazioni di campionamento

Il *database* include piccoli e grandi laghi del Nord Italia, laghi vulcanici dell'Italia centrale e alcuni laghi artificiali.

I laghi presenti nel *database* possono essere divisi in 5 gruppi, seguendo la classificazione del sistema B della WFD proposto da Tartari (Tartari *et al.*, 2006).

- Laghi alpini al di sopra dei 2000 m, con substrato calcareo (AL-1) o siliceo (AL-2) e altitudine tra gli 800 e i 2000 m s.l.m. (AL-7).

- Grandi laghi, con profondità massima maggiore di 120 m, superficie maggiore di 100 km² e volume maggiore di 5000 x 10⁶ m³ (AL-3: Maggiore, Como e Garda).
- Piccoli laghi al di sotto degli 800 m di quota, con volume minore di 70 x 10⁶ m³, con profondità media minore di 15 m (AL-5: Comabbio, Montorfano, Alserio, Annone est, Annone ovest, Segrino, Endine etc.), o con profondità media maggiore di 15 m (AL-6: Avigliana grande, Caldonazzo, Cavedine, Levico, Mergozzo, Monate, Pusiano, Varese etc.).
- Laghi mediterranei, inclusi quelli di origine vulcanica, con profondità media maggiore di 15 m (ME-6-7: Vico, Bracciano e Bolsena) e laghi artificiali (ME-3-4: Occhito, Pertusillo)
- Piccole pozze non classificate nelle 18 tipologie e non considerate ai fini della WFD.

Il numero di campioni raccolti per ogni lago è riassunto in Figura 3.2.

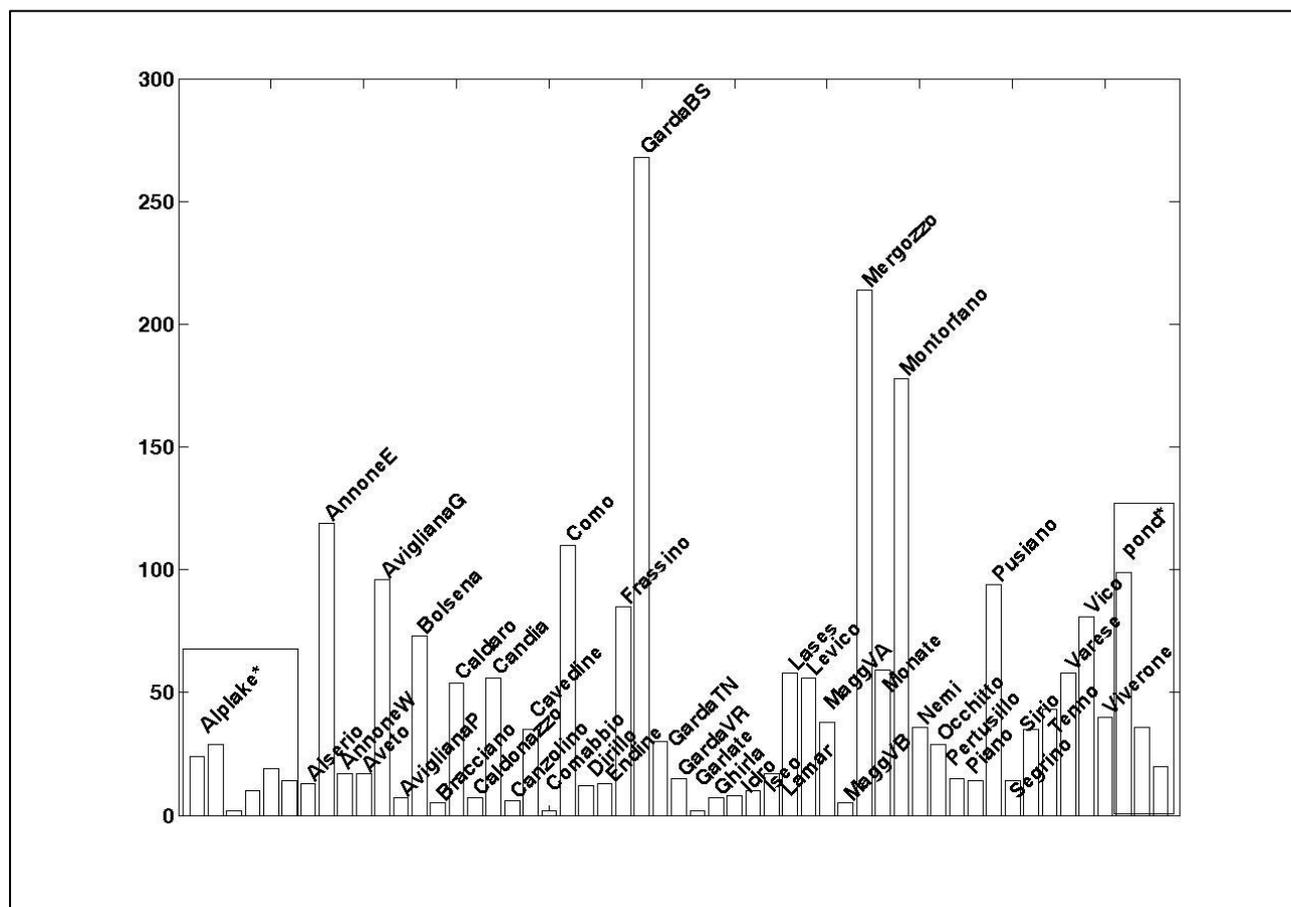


Figura 3.2. Numero di campioni raccolti per ogni lago.

I dati relativi alle variabili ambientali sono stati raccolti contemporaneamente ai campionamenti biologici. Per quei campioni per cui erano incompleti i dati chimico-fisici, i valori sono stati tratti dal *database* LIMNO, liberamente consultabile all'indirizzo <http://www.ise.cnr.it/limno/limno.htm>, così come alcune delle variabili ambientali (quota, volume, superficie, profondità massima e medie annue di alcune variabili chimiche). Il sito fornisce informazioni dettagliate sulla morfometria e sulla qualità dell'acqua dei più importanti laghi italiani. Alcuni dati sono stati infine desunti dal primo rapporto di sintesi sulla qualità delle acque lacustri in Lombardia (Ossevatorio dei Laghi Lombardi, 2005).

I dati non presenti nel database LIMNO sono stati desunti dalla letteratura (Giussani *et al.*, 1986).

3.2.3. Identificazione tassonomica

L'identificazione dei taxa ritrovati è stata condotta fino al massimo livello di dettaglio (principalmente a livello di specie per quel che riguarda Chironomidi e Oligocheti, a livello di genere per i restanti taxa). I campioni sono stati montati su vetrini e osservati a diversi ingrandimenti, seguendo chiavi dicotomiche (e.g. Campaioli *et al.*, 1994; Tarmo, 1999). L'identificazione a livello specifico di Chironomidi è stata basata anche sull'esame di adulti, pupe ed exuvie pupali raccolte nei siti di campionamento contemporaneamente ai campioni di fondo, mentre per gli Oligocheti la determinazione si è basata sull'osservazione di esemplari maturi.

3.2.4. Analisi dei dati

Tutti i dati sono stati immagazzinati in un database Microsoft ACCESS® (Rossaro *et al.*, 2001). Le variabili fisiche (Tab. 3.1) e chimiche (Tab. 3.2) ed i taxa di macroinvertebrati (Tab. 3.3) sono stati esportati da Microsoft ACCESS® ed analizzati con Matlab R2008b®. L'abbondanza delle specie è stata trasformata nel suo logaritmo ($\log(x+1)$ in cui x rappresenta il numero degli organismi per m^2) per l'analisi dei dati.

3.2.5. Self Organizing Maps analysis

I dati sono stati analizzati con l'utilizzo delle *Self Organizing Maps* (SOM); le SOM permettono di suddividere le località di raccolta dei macroinvertebrati in *cluster* sulla base dei taxa ritrovati e della loro frequenza, e per ciascun taxon di visualizzare graficamente il risultato in una mappa formata da celle colorate con gradazioni dal blu al rosso a seconda della crescente frequenza dei singoli taxa. Le variabili ambientali registrate nelle stazioni di raccolta non influenzano la costruzione delle mappe, e vengono introdotte solo successivamente al calcolo, costruendo ulteriori mappe sulla base di questi parametri, per facilitare l'interpretazione delle mappe relative alla fauna. Queste mappe sono state poi colorate in base al valore del parametro esaminato, anch'esse con gradazioni dal rosso al blu. In particolare è stato assegnato il colore rosso a quelle stazioni, o gruppi di stazioni, in cui il valore della variabile in oggetto determina condizioni peggiori di qualità, e blu quelle in cui il valore della variabile ambientale determina condizioni migliori (quindi, per esempio, saranno rosse le celle con alti valori di fosforo totale, e blu quelle con valori bassi, ma, al contrario, saranno blu le celle con alti valori di ossigeno disciolto, e rosse quelle in cui la quantità di ossigeno è più bassa). Le celle che non contengono stazioni sono state colorate in grigio, ma esse risultano invece colorate nelle mappe relative alla distribuzione dei taxa, poiché il programma calcola una fauna ipotetica, sulla base dei dati delle celle vicine.

3.3. RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi ha permesso di costruire una mappa 12x20, dividendo i siti di campionamento sulla base della fauna ritrovata in ciascuno. Successivamente i siti sono stati suddivisi in 12 *cluster* (Fig.3.3).



Figura 3.3. Individuazione sulle mappa dei *cluster*

La distribuzione di ogni taxon è stata mappata all'interno dei diversi siti di campionamento, attraverso la colorazione delle singole celle, ed in seguito sono state mappate anche le variabili ambientali.

3.3.1. Fauna

I risultati della mappatura dei singoli taxa sono mostrati nelle figure allegate (allegati da 1 a 8).

Il *cluster* 12 (allegato 1) raggruppa laghi in cui sono frequenti taxa come *Bothrioneurum vej dovsky an um*, *Cladotany tarsus atridorsum*, *Cryptochironomus defectus*, *Cladopelma viridulum*, *Conchapelopia pallidula*, *Demicryptochironomus vulneratus*, *Dicrotendipes nervosus*, *Micropsectra radialis*, *Polypedilum nubeculosum*, *Parakiefferiella bathophila*, *Pagastiella orophila*, *Psectrocladius* spp., *Pseudochironomus prasinatus*, *Stempellina bausei*, *Tanytarsus gregarius*, *Aulodrilus pluriseta*, *Rhyacodrilus* sp., *Branchiura Sowerbyi* e *Dero digitata*. Questo *cluster*, caratterizzato da bassa alcalinità e conducibilità e valori intermedi di trasparenza, NO₃, ossigeno disciolto, pH e profondità massima, è per lo più riconducibile a stazioni di raccolta poste sul lago di Mergozzo. La letteratura riporta molte delle specie citate come frequenti in questo lago: Nocentini (1985) annovera il *Cladotany tarsus atridorsum* tra le specie comuni nei laghi dell'Italia centro settentrionale, mentre per il genere *Cryptochironomus* sono segnalati ritrovamenti nel lago Maggiore fino a 150 m di profondità. Larve di *Pagastiella orophila* sono state frequentemente ritrovate nel lago di Mergozzo, dove sono piuttosto comuni, così come quelle di *Stempellina bausei* (Nocentini, 1985). Anche *Parakiefferiella bathophila*, *Stempellina bausei*, *Tanytarsus gregarius*, *Dicrotendipes nervosus* e *Demicryptochironomus vulneratus* sono taxa che tipicamente vengono ritrovati in condizioni di oligotrofia come quelle presenti nel lago di Mergozzo (Marziali *et al.*, 2008).

Il *cluster* numero 2 (allegato 2) raggruppa stazioni appartenenti per lo più ai laghi Maggiore (bacino Nord) e Mergozzo, e da questo deriva la sua similarità faunistica con il *cluster* numero 12, raffigurato nell'angolo in basso a sinistra delle mappe (diversi taxa presentano due picchi di distribuzione nei due *cluster* citati). I taxa che sono esclusivi del *cluster* 2 (*Helobdella stagnalis*, *Prodiamesa olivacea*,

Uncinaiis uncinata, e *Slavina appendiculata*), sono maggiormente legate ad ambienti profondi e a condizioni oligo-mesotrofiche (Marziali *et al.*, 2008). Altri taxa sono presenti nei campionamenti riuniti in questo *cluster* (*Asellus aquaticus*, *Paracladopelma camptolabis* e *Paralauterborniella nigrohalteralis*), e presentano picchi di abbondanza anche in altri *cluster* (numero 3 e 6), che comprendono comunque campioni raccolti in grandi laghi (Maggiore e Garda).

Anche il *cluster* numero 8 (allegato 3) riunisce stazioni di campionamento appartenenti in gran parte al lago di Garda, che sono caratterizzate dal punto di vista faunistico dalla abbondante presenza di Oligocheti (*Bichaeta sanguinea*, *Psammoryctides barbarus*, *Potamothrix hammoniensis*, *Potamothrix heuscheri*, *Stylodrilus heringianus*, *Tubifex tubifex* e *Stylodrilus lemani*) (allegato 6).

I *cluster* numero 1 e 7 comprendono campioni raccolti su laghi vulcanici del centro-Italia (laghi di Bracciano, Vico e Bolsena). Questi *cluster* presentano pattern faunistico molto ben definito (allegato 4), ospitando gasteropodi (*Bithynia tentaculata*, *Lymnea stagnalis*, *Theodoxus fluviatilis* e *Physa acuta*), tricladi (*Dugesia tigrina*) e gammaridi (*Echinogammarus sp.*). Questi siti sono caratterizzati da alti valori di conducibilità e bassi valori di NO₃, acque ben ossigenate e alti valori di pH. Per quanto riguarda la chironomidofauna, in questi laghi vengono ritrovati con frequenza *Endochironomus tendens*, *Paratendipes albimanus* e *Xenochironomus xenolabis*, la cui presenza è confermata da diversi autori (Nocentini, 1985; Mastrantuono & Mancinelli, 2005; Marziali *et al.*, 2008).

Il *cluster* numero 5, rappresentato in alto a destra nella mappa, è rappresentato dai laghi maggiormente eutrofici (Varese, Comabbio, Annone, Montorfano, Endine, Pusiano e Segrino) con bassi valori di ossigeno ipolimnico e alti valori di

clorofilla a e fosforo totale (allegato 5). La fauna di questo *cluster* è rappresentata da *Chaoborus flavicans* e *Chironomus plumosus*; entrambi i taxa sono generalmente ritenuti indicatori di forte eutrofia (Rossaro *et al.*, 2007).

Il *cluster* numero 4 comprende campioni tra loro molto eterogenei, caratterizzati dalla bassa temperatura dell'acqua (allegato 6). Tra essi si individuano un gruppo di celle, posizionate nell'angolo in alto a sinistra, che raggruppano i campioni raccolti in zona alpina, caratterizzati da altitudini elevate e da una fauna peculiare (*Endochironomus dispar*, *Psectrocladius (Allopsectrocladius) obivus*, *Corynoneura scutellata*, *Macropelopia nebulosa*, *Paratanytarsus austriacus* e *Crenobia alpina*). Il ritrovamento di queste specie in laghi alpini era già stato messo in evidenza in studi precedenti (Füreder *et al.*, 2006).

Il *cluster* numero 3 (allegato 7) raggruppa campioni raccolti alle maggiori profondità, in grandi laghi che drenano bacini ampi (laghi Maggiore e Garda) in cui si hanno quali taxa dominanti: *Asellus aquaticus*, *Chironomus anthracinus*, *Eiseniella tetraedra*, *Niphargus foreli*, *Pisidium sp.*, *Phaenopsectra flavipes*, *Spirosperma ferox* e *Stylodrilus lemni*.

I *cluster* 6, 9 e 11 (allegato 8) contengono campionamenti effettuati su diversi laghi, caratterizzati da un'alta temperatura delle acque. In essi troviamo *Chironomus anthracinus*, *Eiseniella tetraedra*, *Tubifex tubifex*, *Sialis sp.* e idracari.

L'analisi SOM mette in luce il fatto che alcuni parametri ambientali (per es. la conducibilità, la morfometria del lago, la quantità di ossigeno disciolto, la temperatura e la trofia) influenzano più di altri la composizione della comunità macrobentonica. Per esempio, il *pattern* faunistico peculiare mostrato da alcuni

cluster (per es. il *cluster* numero 12), potrebbe riflettere la reale composizione della fauna del lago o dei laghi che in quel *cluster* sono inclusi, ma potrebbe anche essere frutto del maggiore sforzo di campionamento che in quelle stazioni è stato effettuato (ed in effetti il *cluster* numero 12 si riferisce essenzialmente a stazioni posizionate sul lago di Mergozzo, che è una di quelli più intensamente campionati, Fig. 3.2).

3.3.2. Fauna e tipologie lacustri

Sulla base dell'analisi SOM è possibile affermare che alcune delle tipologie lacustri individuate dal sistema B della WFD si differenziano nettamente dalle altre, oltre che sulla base dei criteri geografici e geologici sanciti da Tartari (Tartari *et.al.*, 2006), anche sulla base della fauna a macroinvertebrati.

In particolare la fauna presente nelle tipologie ME-6 e ME-7 (laghi Vico, Bracciano e Bolsena: laghi mediterranei, inclusi quelli di origine vulcanica, con profondità media maggiore di 15 m), si separa piuttosto nettamente da quella ritrovata in altre tipologie, (essendo, per esempio, più ricca di gasteropodi).

Anche i piccoli laghi di bassa quota vengono ben separati: il *cluster* 5 raggruppa la maggior parte dei campioni raccolti nei laghi di tipologia AL-5 (piccoli laghi al di sotto degli 800 m di quota, con volume minore di $70 \times 10^6 \text{ m}^3$, con profondità media minore di 15 m: Comabbio, Montorfano, Alserio, Annone est, Annone ovest, Segrino, Endine etc.), mentre i *cluster* 9 e 10 raggruppano campioni appartenenti alla tipologia AL-6 (piccoli laghi al di sotto degli 800 m di quota, con volume minore di $70 \times 10^6 \text{ m}^3$, con profondità media maggiore di 15 m: Avigliana

grande, Caldonazzo, Cavedine, Levico, Mergozzo, Monate, Pusiano, Varese etc.).

Il *cluster* 12 contiene campioni esclusivamente appartenenti al lago di Mergozzo, che quindi si discosta molto dagli altri laghi appartenenti alla stessa tipologia (AL-6).

Nel *cluster* numero 3 vengono raggruppati campioni raccolti alle maggiori profondità, ovviamente nei grandi laghi (tipologia AL-3, Maggiore, Como e Garda).

Al contrario altre tipologie lacustri si trovano riunite entro gli stessi *cluster*, per esempio all'interno del *cluster* 4 sono riuniti sia campioni provenienti da laghi di alta quota (tipologie AL-1 e 2), laghi di tipologia ME-3 e ME-4 (laghi Nemi, Occhitto e Pertusillo: laghi artificiali) e grandi laghi (AL-3, lago di Garda).

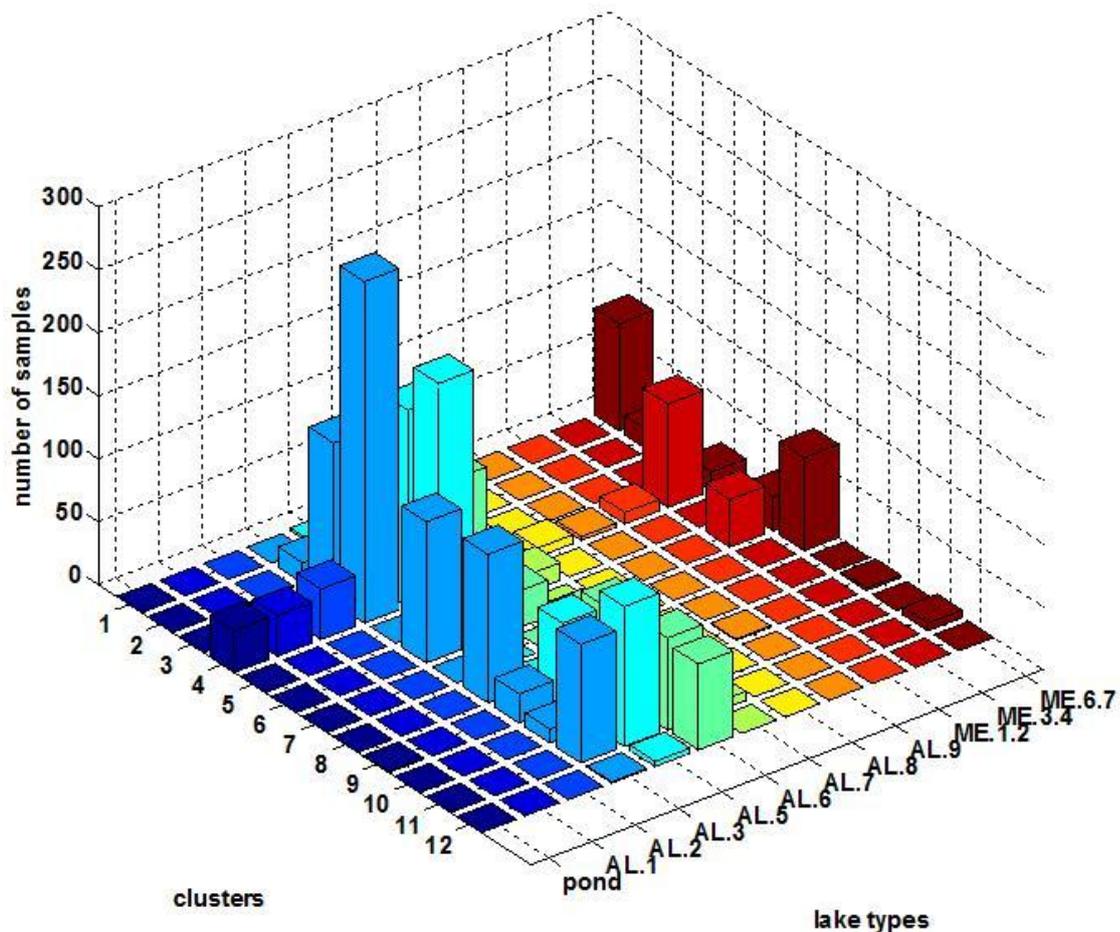


Figura 3.4. Numero di campioni in ogni tipologia di lago per ogni *cluster*.

La distribuzione dei siti di campionati nei diversi *cluster* è riassunta in Figura 3.4.

Dal grafico è evidente che ogni *cluster* racchiude differenti tipologie lacustri, e che alcune tipologie sono distribuite in diversi *cluster*.

3.4. CONCLUSIONI

Durante lo studio si sono evidenziati alcuni limiti della banca dati esistente, che include dati raccolti da operatori diversi, nell'ambito di progetti di ricerca o

monitoraggio diversi, seguendo protocolli diversi. Ciononostante il fatto di lavorare su una grossa banca dati presenta indubbi vantaggi, primo tra tutti il fatto di minimizzare il peso del singolo campione, che potrebbe essere influenzato da condizioni particolari verificatesi al momento del prelievo (per es. condizioni climatiche, scelta di un sito poco rappresentativo, fattori stocastici, ecc.),

L'analisi conferma l'ottima capacità di risposta dei macroinvertebrati alle diverse condizioni ambientali, e il loro ruolo di indicatori di qualità ambientale. Inoltre ha fornito alcune informazioni sull'autoecologia dei macroinvertebrati presi in esame, confermando, in particolare per quel che riguarda i Chironomidi, l'eccezionale rispondenza delle diverse specie alle varie condizioni ambientali: ad esempio in laghi oligotrofi (ad es. Mergozzo) sono presenti generi (*Pagastiella*, *Parakiefferiella*, *Stempellina*, ecc.) che necessitano di acque ben ossigenate e con valori di alcalinità e conducibilità bassi. Nel lago di Mergozzo troviamo poi anche la specie *Corynoneura lobata*, che è però assente nei laghi d'alta quota, a differenza della *C. scutellata*, che invece li colonizza. Analogamente, anche all'interno del genere *Endochironomus*, la specie *E. dispar* è frequente in ambienti di alta quota, mentre la specie *E. tendens* è maggiormente legata a laghi con bassissimi valori di NO₃ e alti valori di conducibilità, tipici del centro Italia. All'interno del genere *Chironomus* riusciamo a discernere specie che sono indicatrici di condizioni eutrofe (*C. plumosus*), da quelle che vivono in condizioni di meso-eutrofia (*C. anthracinus*).

Dai dati sopra citati si evince anche l'utilità dell'analisi in un'ottica di applicazione delle Direttiva 2000/60/CE, innanzitutto perché sottolinea la necessità della

creazione di un indice che preveda la determinazione tassonomica a livello specifico, e secondariamente perché mette l'accento sulla non perfetta rispondenza tra la tipizzazione dei laghi su base geografica e la fauna in essi contenuta. L'altitudine, la profondità, il volume e la conducibilità, usati nella tipizzazione dei laghi secondo il sistema B, influenzano la struttura della comunità, ma anche altri fattori come la temperatura dell'acqua, il fosforo totale o l'ossigeno disciolto sono molto importanti per determinare la composizione in specie delle diverse comunità lacustri (ad es. allegati 5 e 6) .

I fattori sopra citati influiscono sul grado di trofia del lago, che in definitiva sembra essere il vero discriminante nella selezione della comunità che nel lago risiede.

Per questo motivo, nel proseguo di questa tesi, l'attenzione è stata focalizzata sull'approfondimento della ricerca di *biomarkers* in grado di dare indicazioni sul grado di trofia di un corpo idrico, e dal momento che uno dei più immediati effetti dell'eutrofizzazione di un lago è la carenza di ossigeno nei sedimenti di fondo, le ricerche si sono orientate nell'individuazione di sostanze che rispondessero alle diverse condizioni di ossigenazione.

Tra i Chironomidi, il genere che mostra una maggior resistenza alla carenza di ossigeno è il *Chironomus* (allegati 5 e 7), che quindi è stato scelto come animale modello per i successivi esperimenti.

4. MODELLO ANIMALE: *CHIRONOMUS RIPARIUS*

MEIGEN, 1804

4.1. I DITTERI CHIRONOMIDI

I Chironomidi sono Insetti appartenenti all'ordine dei Ditteri, sottordine Nematoceri. La fauna mondiale ne comprende circa 3700 specie suddivise in 11 sottofamiglie, che si stima rappresentino solo il 30% del totale (Ashe *et al.*, 1987). In Italia sono presenti 400 specie appartenenti a cinque sottofamiglie (Tanypodinae, Diamesinae, Prodiamesinae, Orthocladiinae e Chironominae) (Lencioni *et al.*, 2007).

Alla famiglia dei Chironomidi (Diptera Chironomidae) appartengono la maggior parte delle specie di macroinvertebrati presenti negli ambienti di acqua dolce, e, in molti habitat acquatici, il gruppo comprende più della metà del totale degli insetti presenti (Armitage *et al.*, 1995). Questa famiglia è quella più ampiamente distribuita tra gli insetti, ed è adattata a quasi tutti gli ambienti acquatici o semi-acquatici, incluse raccolte temporanee entro cavi negli alberi, bromeliacee, suolo, vegetazione marcescente, liquami e raccolte d'acqua artificiali.

Sono Insetti Olometaboli, ossia subiscono metamorfosi completa, con la presenza, tra lo stadio larvale e quello adulto, di uno stadio pupale durante il quale l'animale non si nutre.

Lo stadio immaginale è alato (Fig. 4.1a e 4.1b), e ha vita breve, di poche settimane al massimo. Gli adulti formano sciami riproduttivi soprattutto in autunno e primavera (Lencioni *et al.*, 2007). Sono lunghi da poco meno di 1 a 14 mm

circa, hanno antenne lunghe, piumose nei maschi (Fig. 4.1b) e moniliformi nelle femmine (Fig. 4.1a). Sono simili nella forma generale del corpo alle zanzare, con le quali spesso vengono confusi, ma dalle quali si distinguono per avere il torace gibboso l'apparato boccale succhiatore e non pungente (i Chironomidi infatti non pungono, e da questo deriva il loro nome inglese di *non-biting midges*). Le ali hanno un basso numero di nervature, ed in particolare la nervatura mediana è semplice. Le femmine depongono le uova in prossimità delle rive in ammassi gelatinosi (Fig 4.1c).

Le larve (Fig. 4.1d) appena schiuse (larve del I stadio), passano un breve periodo in forma planctonica e successivamente raggiungono il fondale. Sono eucefale, vermiformi, apneustiche. La loro colorazione varia a seconda delle specie dal grigio giallastro al giallo bruno, al violetto, all'arancione, al rosso, al verde (Ferrarese & Rossaro, 1981). Il corpo è di forma cilindrica, suddiviso in 13 segmenti (3 toracici e 10 addominali); il primo segmento toracico e l'ultimo addominale portano ognuno una coppia di pseudopodi che terminano distalmente in corone di uncini semplici o terminanti in più punte al margine interno, usati per aggrapparsi al substrato. Ogni segmento può portare setole in ciuffi o isolate. La capsula cefalica è chitinoso e ben sviluppata, con antenne che possono essere retrattili (sottofamiglia Tanypodinae).

Le pupe (Fig. 4.1e) hanno dimensioni simili a quelle delle larve, ma hanno la parte anteriore del corpo ingrossata per la presenza degli astucci delle zampe, antenne ed ali dell'adulto. Frequentemente presentano una coppia di organi respiratori sul torace (corni toracici), che possono essere semplici o ramificati, ed una coppia di lobi anali talvolta provvisti di setole natatorie.

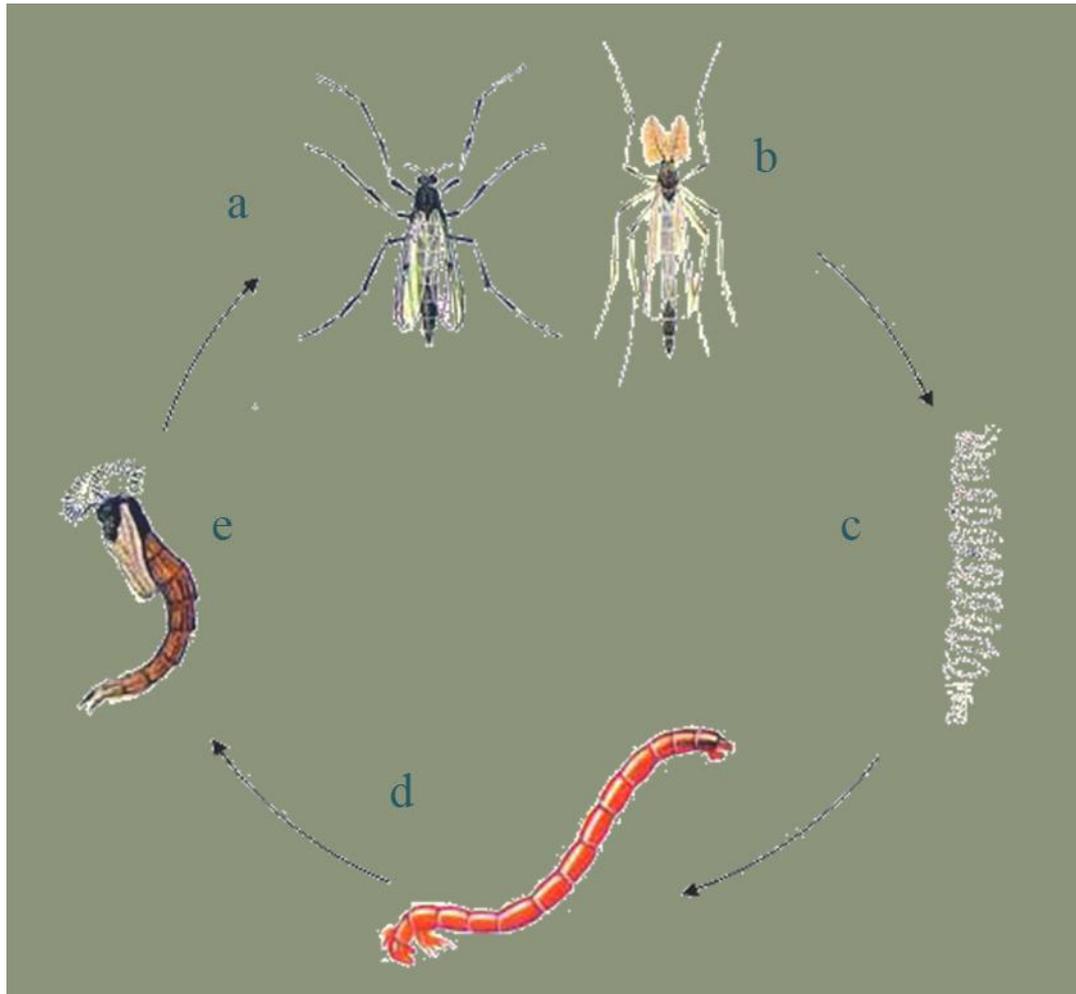


Figura 4.1. Ciclo vitale dei Ditteri Chironomidi (*C. riparius*): a femmina adulta; b maschio adulto; c massa di uova; d larva; e pupa.

Il numero di generazioni all' anno è variabile da 1/7 (ossia una generazione richiede 7 anni per essere completata) (Butler, 1982) a 5-7 (Tokeshi, 1986 e 1995). In genere i cicli vitali molto lunghi sono comuni in specie che vivono in ambienti polari (Lencioni, 2004), ma la maggior parte dei Chironomidi presenta 1 o 2 generazioni all'anno. L'emergenza degli adulti alle nostre latitudini si osserva più frequentemente in primavera nelle specie univoltine, in primavera ed autunno in quelle bivoltine (Lencioni *et al.*, 2007). Le larve delle specie acquatiche popolano sia ambienti lotici che lentic. Per quel che riguarda i laghi, il grado di

trofia è il parametro che più di altri influenza la presenza delle diverse sottofamiglie e tribù, così che in laghi oligotrofi si trovano con più facilità specie appartenenti alla sottofamiglia delle Orthoclaadiinae e delle Chironominae (tribù Tanytarsini), mentre in laghi eutrofi si trovano specie appartenenti alla sottofamiglia Chironominae, ma della tribù dei Chironomini (*Chironomus anthracinus* e *C. plumosus*) (Ferrarese & Rossaro, 1981). Per quel che riguarda le acque correnti invece è possibile individuare una successione longitudinale secondo la quale nelle zone superiori dei corsi d'acqua troveremo Diamesinae ed Orthoclaadiinae, mentre nel corso inferiore assumono maggior importanza le Chironominae, che diventano dominanti in quei tratti fluviali soggetti a forte inquinamento (specie *C. riparius*) (Ferrarese & Rossaro, 1981). Le larve acquatiche dei Chironomidi sono ampiamente utilizzate nel monitoraggio ambientale degli ambienti di acqua dolce e nei test di tossicità, essendo questi insetti ubiquitari, sensibili a diversi inquinanti, facilmente allevabili ed avendo un ciclo vitale breve (Choi, 2004; Choi & Roche, 2004; Ingersoll & Nelson, 1990). La prevedibilità della risposta di determinate specie di Chironomidi a differenti livelli di inquinanti, ha fatto, degli stadi larvali di questi insetti un indicatore biologico di qualità delle acque (Rosenberg, 2005; Wiederholm, 1980). All'interno della famiglia dei Chironomidi esiste un ampio spettro di tolleranza; in particolare il *Chironomus* (sottofamiglia Chironominae, tribù Chironomini) è altamente tollerante nei confronti dei bassi livelli di ossigeno che frequentemente si registrano negli habitat che abitualmente colonizza (Choi, 2004; Frank, 1983; Hamburger *et al.*, 1994). Le larve infatti colonizzano sedimenti di pozze, zone profonde e sublitorali di laghi, e sedimenti fluviali, nei quali costruiscono tubi all'interno dei quali vivono nutrendosi di detrito (Jónasson, 1978; Sæther, 1979).

4.2. *Chironomus riparius* Meigen, 1804

Il *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Fig. 4.2) è una specie oloartica molto comune in tutta l'Europa, ed è diffusa sia in acque calme che correnti.



Figura 4.2. Ipopigio del maschio di *C.riparius* (foto B. Rossaro)

Le larve (Figg. 4.3 e 4.4), che possono vivere anche in presenza di pesanti inquinamenti organici, sono caratterizzate dal colore rosso vivo del corpo, dovuto alla presenza di emoglobina nell'emolinfa.



Figura 4.3. Larva di *C. riparius* (foto V. Grazioli)



Figura 4.4. Capsula cefalica di *C. riparius*



Figura 4.5. Tubuli ventrali di *C. riparius*

Le larve hanno dimensioni medio grandi (15-20 mm di lunghezza) e possiedono 2 paia di tubuli ventrali in corrispondenza dell'8° segmento addominale; non presentano invece tubuli sul 7° segmento (Fig. 4.5) (Nocentini, 1985).

Il capo è più lungo che largo (il rapporto lunghezza/ larghezza è generalmente compreso tra 1,2 e 1,3, pur con una grande variabilità intraspecifica), di colorazione variabile, solitamente bruna (Nocentini, 1985).

Le antenne hanno 5 segmenti, di cui il basale è più lungo del flagello e il 2° ha una lunghezza all'incirca uguale o di poco inferiore alla somma degli ultimi 3 segmenti (Nocentini, 1985).

4.3. RACCOLTA E ALLEVAMENTO DEI CHIRONOMIDI

Le larve di *Chironomus riparius* sono state raccolte nel Rio Gola (187 s.l.m., 46° 02' 19.95", 11° 07' 16.66" Trento, Trentino Alto Adige), in località Ravina. La stazione di raccolta si trova circa 20 m a monte rispetto alla confluenza del Rio Gola con il fiume Adige, pochi Km a valle rispetto alla città di Trento. L'ultimo tratto del corso d'acqua scorre attraverso una zona intensamente coltivata con vigneti e meleti.

Le larve e le pupe dei Chironomidi sono state raccolte utilizzando un retino immanicato con maglia da 100 µm e un'apertura di 30 x 30 cm e successivamente sono state separate dal sedimento inorganico e dal particolato organico sul campo, all'interno di bacinelle a fondo bianco con pinzette morbide e pipette in plastica. Dopo lo smistamento, gli animali sono stati trasferiti in barattoli di plastica da 100 ml con 50 ml di acqua del torrente (circa 50 tra larve e pupe per barattolo).

Una volta in laboratorio gli animali sono stati trasferiti in un acquario riempito con circa 34 l di acqua del rubinetto dechlorinata dotato di areazione e impianto di raffreddamento. Come substrato è stato fornito uno strato di 5 cm di fango naturale (Credland, 1973), setacciato dopo essiccamento in stufa a 60°C e

sterilizzato attraverso esposizione a raggi UV per 30 minuti (UV radiation by UV/White light transilluminator ® TFP-M/WL).

Alcuni esemplari di ogni stadio vitale (larve, pupe ed adulti) sono stati montati su vetrino in modo da ottenere preparati microscopici permanenti per la determinazione della specie. L'allestimento dei vetrini è stato fatto in resina (balsamo del Canada) dopo disidratazione delle larve con acido acetico puro e alcool butilico puro. I vetrini sono stati osservati mediante l'utilizzo di un microscopio ottico (Nikon Eclipse 600, obiettivo massimo 100X). A causa delle difficoltà di riconoscimento a livello morfologico delle diverse specie del genere *Chironomus* (Nocentini, 1985), sono stati preparati anche vetrini dei cromosomi giganti delle ghiandole salivari: le larve, dopo essere state asciugate su carta da filtro, sono state poste su un vetrino, ed è stata effettuata un'incisione dietro alla capsula cefalica con un paio di aghi da dissezione. Dopo aver estratto le ghiandole salivari, senza però staccarle dai tessuti, le larve sono state fissate e decolorate in alcool acetico glaciale (alcool assoluto-acido acetico 3:1). Dopo qualche minuto le ghiandole sono state staccate e trasferite in orceina (colorante specifico che lega la cromatina del DNA). Dopo circa 30 minuti su piastra a 45-50°C le ghiandole sono state nuovamente trasferite su un vetrino entro una goccia di acido lattico separando le cellule dal secreto. In seguito il preparato è stato coperto con un vetrino coprioggetto e reso permanente con congelamento in azoto liquido, disidratazione con la serie degli alcoli, fissazione in balsamo del Canada ed essiccamento su piastra. Infine i vetrini sono stati osservati al microscopio con l'obbiettivo a immersione (100x) (Lencioni *et al.*, 2007).

L'acquario in cui sono state allevate le larve (Figg. 4.6 e 4.7) era costituito da lastre in vetro sui tre lati e nella parte inferiore, e da un box di plastica nera sul restante lato, comunicante con la camera principale attraverso due fori. All'interno del box in plastica è stata sistemata la pompa per portare acqua all'impianto di raffreddamento (TECO TR15) ed i fori sono stati chiusi con pezzi di rete a maglia fine per evitare che le larve uscissero dalla camera principale e venissero aspirate dalla pompa. Periodicamente si è resa necessaria la pulizia manuale di tali griglie, per evitare che sporcizia e sedimento le occludessero. L'acqua dell'acquario, grazie al refrigeratore è stata mantenuta ad una temperatura di $21,4 \pm 0,9^\circ \text{C}$. Per evitare la fuoriuscita degli adulti, l'acquario è stato coperto con una rete di nylon a maglia da $250 \mu\text{m}$ sostenuta da un telaio in legno appositamente costruito. Il telaio era formato da una parte fissa e una piccola finestra rimovibile per facilitare le operazioni di prelievo dal fondo del fango contenente le larve. Ogni 3-4 giorni sono stati forniti alle larve circa 500mg di cibo per pesci in fiocchi (Tetra Min®) come alimento. Quotidianamente sono stati annotati su un quaderno i dati di temperatura, numero di adulti (maschi e femmine) e numero di sacche di uova (Fig. 4.8).

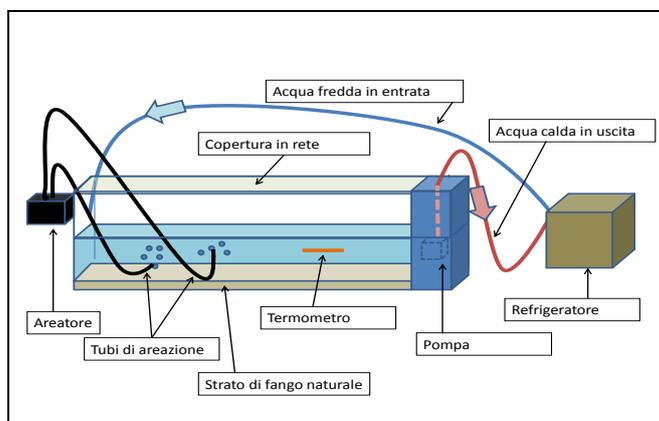


Figura 4.6. Schema di costruzione l'acquario di allevamento di *C. riparius*



Figura 4.7. Acquario di allevamento di *C. riparius*

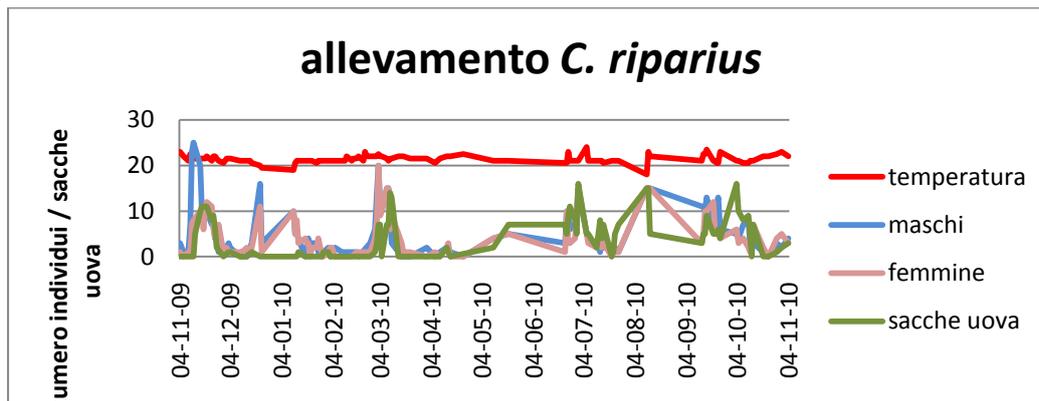


Figura 4.8. Dati registrati quotidianamente nell'allevamento

Nelle prime fasi di allevamento, alcune sacche di uova appena deposte sono state prelevate dall'acquario e trasferite in capsule Petri con 6-8 mL di acqua del rubinetto dechlorinata. Periodicamente le piastre sono state osservate allo stereomicroscopio a piccolo ingrandimento per stilare una tabella dei tempi di sviluppo delle larve (Figg. da 4.9 a 4.14).

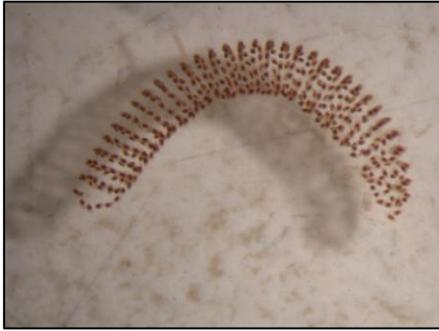


Figura 4.9. 0 ore: disposizione sigmoide delle uova.



Figura 4.10. 22-40 ore: prime segmentazioni nelle uova, specialmente ai poli della sacca



Figura 4.11. 67-72 ore: prime larve sgusciate dalle uova, in particolare ai poli e nella parte esterna della sacca



Figura 4.12. 4°-5° giorno: molte larve sgusciate dalle uova, ma ancora dentro la sacca

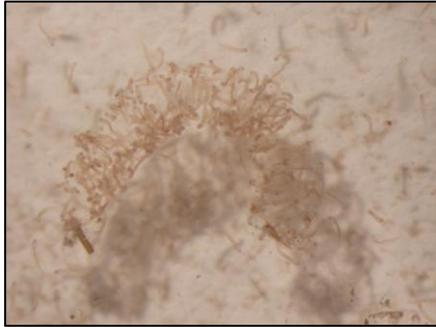


Figura 4.13. 6°-8° giorno: tutte le larve sgusciate dalle uova, molte fuoriuscite anche dalla sacca. Le larve rimaste all'interno della sacca si nutrono di essa e del materiale organico di origine fecale depositato sopra.



Figura 4.14. 9°-12° giorno: tutte le larve fuoriuscite dalla sacca (nuoto attivo).

Attorno al 15° giorno le larve cominciano ad assumere una colorazione rosata, e iniziano la costruzione di tubi entro il sedimento.

5. RESISTENZA ALL'ANOSSIA

5.1. INTRODUZIONE

Le larve del genere *Chironomus* sono molto comuni nelle zone profonde e sublitorali dei laghi (Sæther, 1979; Jónasson, 1978), zone che soffrono particolarmente di problemi di anossia, sia a causa della naturale stratificazione termica delle acque limniche, sia a causa di problemi di eutrofizzazione di origine antropica.

Molti corpi idrici del Sud Europa sono attualmente affetti da gravi problemi di eutrofizzazione ed inquinamento. È noto che l'arricchimento in nutrienti di laghi poco profondi porta in tempi brevi ad una diminuzione dell'ossigeno ipolimnico, a causa dell'incremento della produttività delle zone litorale e pelagica (Solimini *et al.*, 2006), che conseguentemente agisce sulle comunità che nel vivono nel sedimento di fondo, permettendo talvolta la sopravvivenza di soli Oligocheti e Chironomidi.

Entrambi questi taxa sono considerati indicatori delle condizioni di ossigeno (Brundin, 1949) e dello stato trofico (Sæther, 1979) nelle acque superficiali, e tra i Chironomidi in particolare la tribù dei Chironomini (sottofamiglia Chironominae) è ben adattata alla vita entro sedimenti poveri di ossigeno (Nagell & Landahl, 1978).

Tale resistenza è in parte associata alla presenza in questi insetti di emoglobina (Hb) a cui è dovuta la loro colorazione rossa.

Da un punto di vista evolutivo è generalmente accettato l'assunto secondo cui la presenza di Hb negli invertebrati rivela un adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli, dal momento che questo pigmento aiuta l'organismo a sostenere il metabolismo aerobio anche in condizioni di scarsa ossigenazione (Weber & Vinogradov, 2001).

Da un punto di vista ecotossicologico, gli organismi che possiedono Hb sono spesso considerati come potenziali "specie sentinella" per il monitoraggio della qualità delle acque (Osmulski & Leyko, 1986), e l'Hb è considerata come un possibile *biomarker* per il monitoraggio e valutazione del rischio ambientale (Frank, 1983; Zebe, 1991).

L'Hb è la proteina più abbondante nelle larve del genere *Chironomus* (Choi *et al.*, 2001), nel quale sono stati sequenziati più di 30 geni codificanti per globine, e in cui le larve secernono fino a 16 tipi di Hb e 12 polipeptidi globinici (Choi & Roche, 2004; Weber *et al.*, 1985). Diversi tipi di emoglobina sono stati individuati nelle diverse specie: più di 10 tipi di emoglobina esistono in *C. thummi* Kieffer, 1911 (= *riparius* Meigen 1804) (Braun *et al.*, 1968), 12-14 in *C. tentans* Fabricius 1805 (English, 1969), e 8-10 tipi sono stati trovati in *C. plumosus* (Linnaeus, 1758) e *C. pallidivittatus* Edwards 1929 (Manwell, 1966; Tichy, 1968). I diversi tipi di emoglobina differiscono per la struttura primaria e possono essere sia forme monomeriche (p.m. 14000-17000 Da, Braun *et al.*, 1968; Thompson *et al.*, 1968) che forme dimeriche (p.m. 31000-32000 Da, Svedberg and Eriksson-Quensel, 1934; Braun *et al.*, 1968). I diversi tipi di emoglobina e la presenza o meno di dimeri sono specie-specifici, ma possono variare all'interno della stessa specie a seconda delle condizioni ambientali: esiste infatti un equilibrio dei monomeri pH-

dipendente in *C.thummi*, ma lo stesso fenomeno non è stato osservato in *C.tentans* : è stato inoltre osservato che la quantità di forme dimeriche nella miscela aumenta in condizioni di ipossia.

L'Hb viene sintetizzata all'interno dei corpi grassi larvali, e secreta nell'emolinfa dove viene accumulata; la sintesi inizia al secondo stadio larvale, e al quarto stadio può costituire quasi il 90% delle proteine presenti nell'emolinfa. La produzione del pigmento respiratorio diminuisce durante la fase prepupale e termina del tutto nella fase di pupa, durante la quale viene degradata enzimaticamente, tanto che nell'insetto adulto se ne rilevano solo tracce (Bergtrom *et al.*, 1976). L'Hb ha un'altissima affinità per l'ossigeno, che dissolve attraverso la cuticola larvale e satura il pigmento respiratorio, il quale durante i periodi di riposo e durante la nutrizione, funziona anche come riserva di ossigeno (Wyatt Hoback & Stanley, 2001). La grande capacità delle diverse specie di *Chironomus* (*C. plumosus*, *C. anthracinus*, *C. thummi*) di mantenere un metabolismo aerobio anche a basse concentrazioni di ossigeno disciolto e conseguentemente alti livelli di ATP, è associata a questa caratteristica unica della loro emoglobina. Potenzialmente questi alti livelli di ATP possono supportare le richieste energetiche dell'organismo necessarie a mantenere l'omeostasi, alla nutrizione, e ai movimenti ondulatori grazie ai quali le larve apportano acqua più ossigenata all'interno dei loro tubi costruiti entro il fango anossico (Rossaro *et al.*, 2007), e allontanano i prodotti del metabolismo tra cui lattato e alanina che essi cominciano ad accumulare in condizioni di ipossia (Scholz & Zerbst-Boroffka, 1998).

In tali condizioni è stato dimostrato che, quando le condizioni di ossigenazione diventano severe, le larve di *Chironomus* sono in grado di passare alla fermentazione alcolica, e durante i lunghi periodi di anaerobiosi, l'etanolo, che diffonde rapidamente nell'acqua circostante (Redecker & Zebe, 1988; Zebe, 1991), è l'unico prodotto metabolico della degradazione del glicogeno. Nel primo *step*, che richiede tiamina pirofosfato come coenzima, si ha una decarbossilazione non ossidativa del piruvato ad acetaldeide che viene catalizzata dalla piruvato decarbossilasi; successivamente, in seguito all'ossidazione del NADH prodotto durante la glicolisi, si ha la riduzione dell'acetaldeide ad etanolo, catalizzata dall'alcol deidrogenasi. Questa via metabolica anaerobica è apparentemente unica tra gli insetti (Redecker & Zebe, 1988; Wilps & Schöttler, 1980). È stato calcolato che più dell'80% del fabbisogno energetico delle larve di *Chironomus* può essere coperto dalla fermentazione delle riserve di glicogeno in etanolo (Scholz & Zerbst-Boroffka, 1998).

Le alcol deidrogenasi costituiscono una grande famiglia di *related enzymes* e isoziemi. È noto che le alcol deidrogenasi possono essere divise in tre gruppi principali, basati sul cofattore metallico richiesto per la catalisi: il primo gruppo non necessita del metallo, il secondo necessita di ferro e il terzo di zinco come cofattore. L'ultimo gruppo rappresenta un'insieme di proteine funzionalmente eterogenee presenti nei procarioti, nei funghi, nelle piante e negli animali, appartenenti alla superfamiglia di proteine delle deidrogenasi/reduccasi a catena media.

Le ADH sono in grado di catalizzare l'ossidazione di una grande varietà di xenobiotici e alcoli endogeni nelle corrispondenti aldeidi (Park & Kwak, 2009).

Negli insetti la funzione principale dell'ADH è la catalisi della conversione reversibile di vari alcoli generati da fermentazioni microbiche nel cibo nelle loro corrispondenti aldeidi e chetoni a scopo di detossificazione o metabolico (Lee *et al.*, 2006, Goulielmos *et al.*, 2001).

L'alcol deidrogenasi nei processi anaerobici in lieviti e tessuti animali è anche in grado di catalizzare il processo inverso, con formazione di alcoli a partire da aldeidi.

Le quantità di emoglobina (Hb, associata al metabolismo aerobio) ed alcol deidrogenasi (ADH, associata al metabolismo anaerobio) sono state determinate in larve di *Chironomus riparius* sottoposte a diverse condizioni di ossigenazione, per comprenderne gli effetti di ipossia, anossia e iperossegnazione e il loro valore come *biomarkers* biochimici.

5.2. MATERIALI E METODI

5.2.1. Disegno sperimentale

Ventiquattro ore prima dell'inizio degli esperimenti un certo numero di larve al 4° stadio sono state prelevate dall'allevamento, e acclimatate in 200 ml di acqua ricostituita (HRW: *Hard Reconstituted Water*) in becker da 500 ml in accordo con i metodi di allevamento proposti da Lee *et al.* (2006). Tali becker sono stati posti in cella termostata e tenuti ad una temperatura costante di $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, con un ciclo luce-buio di rispettivamente 16 - 8 ore. Durante il periodo di acclimatazione non è stato fornito alle larve alcun cibo (per assicurare che l'apparto digerente fosse

vuoto, per evitare l'erronea valutazione del consumo di ossigeno dovuto ai processi digestivi), né substrato o areazione.

Per valutare i meccanismi di reazione messi in atto dalle larve per resistere agli stress dovuti a condizioni di ossigenazione alterate e poter effettuare valutazioni anche sui tempi con cui questi meccanismi entrano in funzione, sono stati predisposti 3 diversi set di esperimenti che sottoponevano le larve alle diverse condizioni di ossigenazione:

- Ipossia progressiva
- Anossia
- Iperossigenazione

infine è stato predisposto anche un controllo con larve prelevate direttamente dallo stock di animali acclimatati.

Tutti gli esperimenti sono stati svolti a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), in condizioni di luce naturale.

Centocinquanta replicati di una larva ciascuno sono stati utilizzati durante gli esperimenti di ipossia progressiva (60), anossia (45) e iperossigenazione (45). Inoltre sono stati effettuati tre replicati di controllo per ogni serie di esperimenti. In ciascuna serie di esperimenti la sopravvivenza e la concentrazione dei due *biomarkers* sono state misurate dopo 0 (= controllo), 10, 14, 18, 24 e 48 ore (gli intervalli sono stati scelti sulla base di studi precedenti, Franchi, 2004). A causa della mortalità o dell'impupamento delle larve, sono stati aggiunti alcuni replicati

aggiuntivi (60 in tutto), per avere un minimo di 9 replicati per ciascun intervallo di tempo (Tab. 5.1)

Tabella 5.1. Numero di larve/replicati utilizzati negli esperimenti

		ore	replicati	larve morte	pupe	replicati aggiuntivi	larve morte	pupe	totale replicati analizzati
Ipossia progressiva	Controllo	0	3	-	-	-	-	-	3
		10	9	-	-	-	-	-	9
	<i>Misura Hb e ADH</i>	14	9	-	-	-	-	-	9
		18	9	-	-	-	-	-	9
		24	9	2	2	9	1	-	13
		48	9	2	-	9	4	-	12
	<i>Misura del consumo di ossigeno</i>	10	3	-	-	-	-	-	3
		14	3	-	-	-	-	-	3
		18	3	-	-	-	-	-	3
24		3	-	-	3	-	-	6	
48		3	-	-	3	-	-	6	
Anossia	Controllo	0	3	-	-	-	-	-	3
		10	9	-	-	-	-	-	9
	<i>Misura Hb e ADH</i>	14	9	-	-	-	-	-	9
		18	9	-	-	-	-	-	9
		24	9	-	-	-	-	-	9
		48	9	1	-	9	2	-	15
Iperossigenazione	Controllo	0	3	-	-	-	-	-	3
		10	9	-	-	-	-	-	9
	<i>Misura Hb e ADH</i>	14	9	-	-	-	-	-	9
		18	9	2	-	9	-	-	16
		24	9	2	-	9	4	-	12
		48	9	3	-	9	3	-	12

Sono state considerate vive le larve che mostravano movimenti autonomi o sollecitati da uno stimolo tattile.

Prima delle esposizioni il peso delle larve è stato determinato con una bilancia analitica (sensibilità 0,0001 g). Il peso medie delle larve dei controlli era $6,2 \pm 0,1$

mg per quel che riguarda gli esperimenti di ipossia progressive, $6,3 \pm 0,2$ mg per i controlli della serie di esperimenti relativi all'anossia, e $6,8 \pm 0,4$ mg per i controlli degli esperimenti di iperossigenazione.

5.2.2.1. Ipossia progressiva

Per valutare la risposta delle larve a condizioni simili a quelle naturali è stato allestito un esperimento nel quale il livello di ossigeno decrescesse in maniera graduale.

Sessanta larve precedentemente acclimatate, simili in peso ($6,4 \pm 0,2$ mg), sono state inserite ciascuna in una bottiglia BOD (*Biological Oxygen Demand*) in vetro da 10 ml (Schott Duran®), riempita con HRW ben ossigenata (100% di saturazione = $9,2 \text{ mg L}^{-1}$), prestando attenzione ad evitare la formazione di bolle d'aria all'interno.

Successivamente le bottiglie sono state immerse capovolte in un becker riempito con acqua pre-riscaldata a 20°C, per assicurare la perfetta tenuta del tappo smeriglio, ed evitare l'ingresso accidentale di aria atmosferica.

Ad ogni intervallo di tempo di esposizione stabilito, 12 replicati sono stati prelevati. Di essi, 9 sono stati usati per la misurazione dei *biomarkers*, e 3 per la misurazione del consumo di ossigeno. A causa della mortalità registrata e dell'impupamento di alcune larve, replicati supplementari sono stati aggiunti a 24 e 48 ore, per un totale di 13 replicati usati per la misurazione dei *biomarkers* e 6 per la misurazione del consumo di ossigeno a 24 ore, e 12 e 6 rispettivamente a 48 ore.

5.2.2.2. Anossia

Per creare la condizione di anossia in una beuta da 2 l, riempita con circa 1,5 l di HRW, è stato insufflato N₂ puro per 30 minuti, prima dell'introduzione delle larve, e quindi l'insufflazione è proseguita per altri 30 minuti dopo l'immissione degli animali. Dopo questa operazione il livello di ossigeno disciolto è stato controllato tramite una sonda WTW Oxi 330i oxygen probe e la beuta è stata ermeticamente chiusa con uno strato di Parafilm ®.

Quarantacinque larve precedentemente acclimatate, simili in peso ($6,2 \pm 0,4$ mg), sono state inserite nella beuta, a gruppi di tre entro fiale di vetro da 20 ml, ciascuna chiusa con una garza di nylon (maglia da 500 μ m) al fine di facilitare l'estrazione delle larve dalla beuta agli intervalli indicati, in breve tempo, senza alterare la quantità di ossigeno presente nell'acqua, e preservarle da ogni stress meccanico dovuto ad insufflazioni di gas entro la beuta. All'interno delle fiale gli animali potevano essere osservati durante lo svolgimento degli esperimenti, e lo spazio era sufficiente per permettere loro di mettere in atto tutti quei meccanismi comportamentali che sono di supporto alla reazione allo stress di tipo respiratorio (i.e. movimenti ondulatori, Rossaro *et al.*,2007), e contemporaneamente la relativa ampiezza dell'imboccatura e l'alta permeabilità dalla garza permettevano lo scambio d'acqua tra l'interno e l'esterno, garantendo che le condizioni all'interno delle fiale fossero uguali a quelle del resto della beuta. Le fiale sono state inserite nella beuta prima dell'inizio dell'esperimento (prima dell'insufflazione di N₂), in modo da garantire l'uniformità delle condizioni interne con il resto dell'acqua contenuta nella beuta.

Le larve sono state esposte all'anossia per 10, 14, 18, 24 e 48 ore, a temperatura costante (20 ± 2 °C).

Ad ogni intervallo di tempo l'ossigeno è stato ricontrollato attraverso la sonda, e nel caso in cui il valore fosse maggiore di 0,5 mg/l (< 5% di saturazione), è stato nuovamente insufflato N₂ per alcuni minuti.

Ad ogni intervallo di tempo di esposizione stabilito, 9 replicati sono stati prelevati e usati per la misurazione dei *biomarkers*.

A causa della mortalità registrata a 48 ore, 9 replicati supplementari sono stati aggiunti (portando a 15 il numero di replicati per questo intervallo di tempo) per un totale di 54 larve trattate.

5.2.2.3. Iperossigenazione

Per creare la condizione di iperossigenazione in una beuta da 2 l, riempita con circa 1,5 l di HRW, è stata insufflata aria atmosferica attraverso una pompa (Choi *et al.*, 2001): prima dell'inserimento delle larve si è proceduto ad un'insufflazione vigorosa; successivamente la potenza della pompa è stata regolata in modo tale da non far muovere eccessivamente l'acqua all'interno delle beuta.

Anche per questo esperimento 45 larve precedentemente acclimatate, simili in peso ($6,9 \pm 0,5$ mg), sono state inserite nella beuta, inserite a gruppi di tre entro fiale di vetro da 20 ml, ciascuna chiusa con una garza di nylon (maglia da 500 µm). Le fiale sono state inserite nella beuta prima dell'inizio dell'esperimento (prima dell'inizio dell'insufflazione di aria). Le larve sono state esposte all'iperossia per 10, 14, 18, 24 e 48 ore, a temperatura costante (20 ± 2 °C).

Ad ogni intervallo di tempo di esposizione stabilito, 9 replicati sono stati prelevati e usati per la misurazione dei *biomarkers*.

A causa della mortalità registrata a 18, 24 e 48 ore, 9 replicati supplementari sono stati aggiunti (per un totale di 27 replicato aggiuntivi) per un totale di 72 larve trattate.

5.2.2. Misura del consumo di ossigeno

Il consumo di ossigeno è stato misurato utilizzando il metodo delle bottiglie chiuse: durante gli esperimenti di ipossia progressiva, per 3 replicati (6 replicati a 24 e 48 ore), sono state misurate con il metodo di Winkler (Marsh & Manahan, 1999; Winkler, 1888) le concentrazioni iniziali e finali di ossigeno all'interno delle bottiglie da BOD.

Il tasso respiratorio è stato calcolato utilizzando la seguente espressione, in accordo con Brodersen *et al.* (2008), Hamburger & Dall (1990) e Lampert (1984):

$$\text{Tasso respiratorio (R)} (\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}) = (O_{t_2} - O_{t_1}) \text{ AFDW}^{-1} (t_2 - t_1)^{-1} \quad (5.1)$$

O_{t_2} (μmol) = Concentrazione dell'ossigeno disciolto (mg L^{-1}) al tempo t_2 x
10/1000 x 31,25

O_{t1} (μmol) = Concentrazione dell'ossigeno disciolto (mg L^{-1}) al tempo t_1 x
 $10/1000 \times 31,25$

AFDW (Ash-Free Dry Weight) (g) = 0,114 peso fresco

t_2-t_1 = intervallo di tempo (ore).

5.2.3. Estrazione dell'emolinfa

Dopo l'esposizione alle condizioni sperimentali ogni animale è stato asciugato con cura su carta assorbente e pesato.

Successivamente da ogni singola larva è stata estratta l'emolinfa al fine di determinare la quantità di emoglobina posseduta da ogni animale. Per effettuare l'estrazione ogni animale è stato immerso ancora vivo in 150 μL di soluzione fisiologica (K^+ buffer pH 7.4, 10 mM e NaCl 0,6%) refrigerata in ghiaccio su un vetrino da orologio, ed a ciascuno è stato praticato con un bisturi sterile un'incisione all'altezza del secondo segmento, lasciando poi fuoriuscire l'emolinfa autonomamente. Dopo 10 minuti il liquido è stato raccolto tramite una micropipetta, e conservato a -20°C per le analisi successive.

5.2.4. Dosaggio dell'emoglobina (Hb)

La quantità di emoglobina presente nelle larve è stata valutata seguendo il "cyano-methemoglobin method", come precedentemente descritto in Tentori & Salvati (1981) e Int Panis *et al.* (1995).

Esso prevede l'utilizzo del reattivo di Drabkin, una soluzione altamente specifica per l'emoglobina, preparata miscelando opportuni volumi di Drabink's reagent

(SIGMA) con acqua milliQ, ai quali è stata poi aggiunta una soluzione del detergente Brij-35 al 30%.

Per la determinazione dell'assorbanza del campione sono stati miscelati in cuvetta di vetro (Hellma Special Optical Glass), 300 µl di reattivo e 30 µl di campione. Dopo aver atteso 10 minuti a temperatura ambiente affinché avvenisse la reazione, è stato possibile determinare l'estinzione dei campioni allo spettrofotometro (UV-visibile CARY 3 VARIAN) ad una lunghezza d'onda pari a 540 nm. Il valore dell'assorbanza delle misure è data dalla sottrazione del valore del bianco, costituito da 300 µl di reattivo e 30 µl di acqua milliQ.

Ogni dosaggio è stato ripetuto 2 volte e le misurazioni sono state mediate.

La concentrazione di emoglobina del campione viene ricavata dalla seguente formula:

$$\frac{mgHb}{ml} = \frac{\Delta A_{540} \times F.D \times P.M.}{\epsilon \times d}$$

(5.2)

Dove

- ✓ ΔA_{540} = variazione di assorbanza determinata a 540 nm
- ✓ F.D. = fattore di diluizione
- ✓ P.M. = peso molecolare del monomero di emoglobina (14300 Da)
- ✓ ϵ = coefficiente di estinzione molare

✓ d = cammino ottico della radiazione espresso in cm (1 cm).

I valori ottenuti sono stati normalizzati sul dato relativo alla concentrazione di proteine totali presenti nell'emolinfa, allo scopo di evitare possibili errori dovuti al diverso tasso di fuoriuscita dell'emolinfa durante la fase di estrazione e alla diversa massa corporea dei campioni analizzati.

I risultati sono stati espressi in mgHB/mgprot (milligrammi di emoglobina/milligrammi di proteine totali).

5.2.5. Dosaggio delle proteine nell'emolinfa

Il dosaggio delle proteine totali presenti nell'emolinfa degli animali è stato effettuato con il metodo dell'estinzione dell'U.V. (Layne, 1957), anche detto metodo diretto, che prevede la misura dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 273 nm.

30 μ l di ciascun campione sono stati posti entro una cuvetta in quarzo (Hellma Quartz SUPRASIL) contenente 300 μ l di acqua milliQ. Il valore di assorbanza del bianco, preparato con 330 μ l di acqua milliQ, è stato sottratto sistematicamente alle misure effettuate.

La concentrazione totale delle proteine è stata calcolata con la seguente formula:

$$c = \frac{E * f d}{\epsilon d}$$

(5.3)

Dove

- ✓ c = concentrazione della soluzione in mg/ml
- ✓ E = assorbanza o estinzione
- ✓ f.d. = fattore di diluizione
- ✓ ϵ = coefficiente di estinzione molare espresso in mL $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (pari a 1 mL $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- ✓ d = cammino ottico della radiazione espresso in cm (pari a 1 cm).

5.2.6. Preparazione dei campioni per il dosaggio enzimatico

Dopo l'estrazione e asportazione dell'emolinfa, le larve sono state omogenate in 9 volumi (calcolati in base al peso della larva) di tampone ipotonico di omogeneizzazione HEPES-Tris 17mM pH 7,4 e mannitolo 100mM (Forcella *et al.*, 2004), con un IKA-WERK Rw 14H potter impostato sulla velocità di 3000 rpm, con 2 cicli da 10 potterate intervallate da una pausa di 2 minuti in ghiaccio per evitare la denaturazione delle proteine dovuta all'eccessivo riscaldamento.

L'omogenato è stato quindi trasferito in eppendorf da 1,5 ml centrifugato a 4°C per 30 minuti a 13000 rpm. Il surnatante è stato in seguito aliquotato in eppendorf da 1,5 ml e conservato a -20°C per le analisi successive.

5.2.7. Attività dell'Alcol-deidrogenasi (ADH)

La determinazione dell'attività specifica dell'enzima è stata determinata sfruttando le reazioni da esso catalizzate: è stata in pratica effettuata una misura in condizioni controllate, della velocità di consumo del substrato, che è proporzionale alla concentrazione dell'enzima stesso. I dosaggi sono stati condotti in cuvette in plastica a temperatura costante di 30°C e a concentrazioni dei substrati ampiamente saturanti (Tab. 5.2) . Le letture spettrofotometriche sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro UV-visible CARY 3 VARIANT, i dati sono stati registrati su un computer e analizzati con Cary WinUV application software per Windows XP.

L'attività enzimatica è stata espressa UADH/mg prot (Unità enzimatiche di ADH/milligrammi di proteine totali). e valutata osservando la diminuzione di assorbanza a 340 nm; la reazione viene fatta partire con l'aggiunta di propionaldeide (Hanozet, 1976).

Tabella 5.2. Miscela per il dosaggio dell'ADH

	mM iniziale	µl	mM finale
Hepes-Tris pH 7.6	200	250	50
EDTA	20	250	5
NADH	10	20	0.2
Propionaldeide		20	2
Campione		x	
H ₂ O milliQ		460-x	
Totale		1000	

Per il calcolo dell'attività enzimatica è stata utilizzata la seguente formula:

$$\frac{U}{mg} = \frac{(\Delta A/min) \times V_t}{\epsilon \times d \times V_s} \times (mg/ml)^{-1}$$

(5.4)

In cui

$\Delta A/min$ = variazione di assorbanza al minuto

V_t = Volume finale della miscela di reazione (= 1000 μL)

V_s = Volume del campione aggiunto nella cuvetta

ϵ = coefficiente di estinzione del NADH ($6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d = cammino ottico (= 1 cm)

mg/ml = concentrazione proteica del campione.

5.2.8. Dosaggio delle proteine totali

Per il dosaggio delle proteine totali nel campione è stato adottato il metodo colorimetrico di Bradford (Bradford, 1976), basato sul differente assorbimento della soluzione acida colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 .

Secondo questo metodo, in ambiente acido le proteine assumono carica positiva, ciò consente loro di formare un complesso con il colorante che, invece, risulta caricato positivamente per effetto dell'acido fosforico. Il reattivo conferisce al

campione una variazione cromatica dal rosso-bruno al blu, con un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 595 nm.

5 μl di campione sono stati introdotti in una cuvetta di plastica contenente 950 μl di reattivo, e sono stati lasciati sul banco a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo questo lasso di tempo è stato possibile determinare l'estinzione dei campioni con uno spettrofotometro UV-visibile CARY 3 VARIAN alla lunghezza d'onda di 595 nm. Per la misura del bianco è stata preparata una soluzione costituita da 950 μl di reattivo e 5 μl di acqua milliQ; tale valore è stato sistematicamente sottratto alle misure effettuate. Tutte le misure sono state eseguite in doppio per una maggior accuratezza e i risultati sono stati mediati.

La concentrazione delle proteine totali del campione è avvenuta tramite l'equazione di Lambert-Beer:

$$E = \epsilon d c \tag{5.5}$$

dove:

- ✓ E = assorbanza o estinzione
- ✓ ϵ = coefficiente di estinzione molare espresso in $\text{ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- ✓ d = cammino ottico della radiazione espresso in cm
- ✓ c = concentrazione della soluzione in mM o mg ml^{-1}

il coefficiente di estinzione molare del complesso proteina-colorante è stato calcolato attraverso la costruzione di una retta di taratura relativa all'albumina di siero bovino (BSA) a concentrazione nota e variabile.

5.2.9. Analisi statistiche

Tutti i valori sono stati espressi come media \pm Errore Standard. Le medie sono state confrontate tra loro con l'utilizzo del test del t di Student. Sono state considerate significative differenze con $p < 0,05$. Tutte le analisi sono state condotte con l'ausilio del software STATISTICA 8.0[®] (StatSoft Inc. 2007).

5.3. RISULTATI

5.3.1. Ipossia progressiva e consumo di ossigeno

In questo set di esperimenti la sopravvivenza è stata sempre del 100%, eccetto dopo 24 e 48 ore, dove il 21% e il 25% di larve trattate sono state trovate rispettivamente morte o impupate.

Le larve sono rimaste attive per le prime 24 ore, mentre dopo 48 ore il 20% eseguiva movimenti ondulatori e il 20% era immobile.

La Figura 5.1 mostra il *trend* della concentrazione di Hb e dell'attività dell'ADH nel tempo. Il primo aumento significativo dell'Hb si può osservare dopo 14 ore di esposizione ($p=0,048$); la concentrazione del pigmento respiratorio raggiunge il massimo dopo 18 ore ($0,663 \pm 0,032$ mgHb mg prot⁻¹, $p < 0,001$). Successivamente il livello decresce fino a valori significativamente più bassi del controllo dopo 48 ore di esposizione ($p < 0,001$).

L'attività dell'ADH aumenta progressivamente per le prime 14 ore ($p= 0,039$), tempo a cui viene registrato il valor massimo ($0,958 \pm 0,001$ UADH mg prot⁻¹); nelle successive 4-10 ore l'attività enzimatica decresce significativamente ($p = 0,034$ at 18h), ma un valore significativamente più alto (confrontabile con quello misurato dopo 14 ore) viene registrato dopo 48 ore di trattamento ($p = 0,018$).

Il tasso respiratorio cresce durante le prime 18-24 ore, raggiungendo valori di 300 ± 35 μmolO_2 gAFDW⁻¹ h⁻¹ a 18 ore (al 70,4% di saturazione di ossigeno) e 309 ± 50 μmolO_2 gAFDW⁻¹ h⁻¹ a 24 ore (al 52,8% di saturazione di ossigeno) (Fig. 5.2).

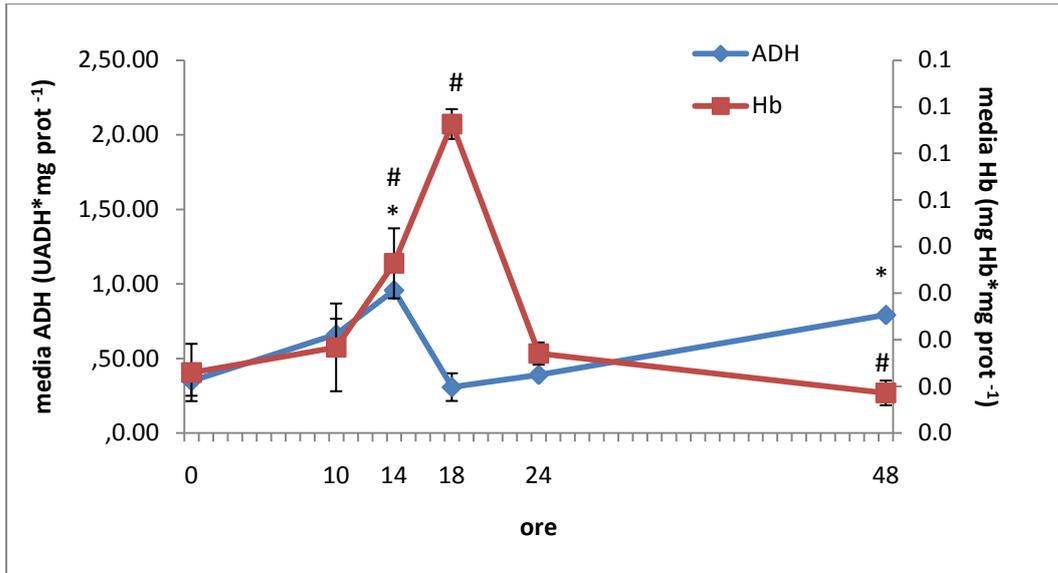


Figura 5.1. Esposizione all'ipossia progressiva: *trend* di ADH, Hb (*= ADH: significativamente differente rispetto al controllo; #= Hb: significativamente differente rispetto al controllo)

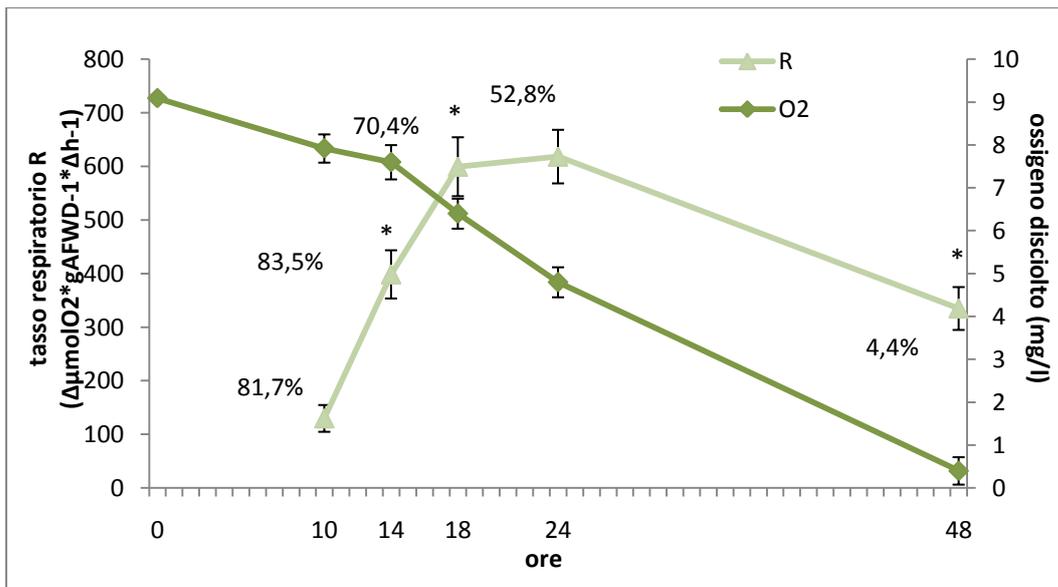


Figura 5.2. Esposizione all'ipossia progressiva: *trend* di R con indicazione della percentuale di saturazione dell'ossigeno disciolto

5.3.2. Anossia

In questo set di esperimenti la sopravvivenza è stata sempre del 100%, fino a 48 ore, dove il 25% di larve trattate erano morte.

Le larve hanno effettuato movimenti ondulatori solo per i primi 10 minuti di esposizione a condizioni di anossia, successivamente esse hanno interrotto qualsiasi movimento divenendo immobili. La quantità di emoglobina cresce significativamente ($p = 0,071$) durante le prime 10 ore di incubazione, da $0,155$ a $0,595$ mg Hb mg prot⁻¹, poi torna a valori simili a quelli del controllo e rimane costante senza significative differenze per le successive 38 ore (Fig. 5.3). L'attività enzimatica dell'ADH aumenta significativamente ($p < 0,001$) durante le prime 14 ore, raggiungendo il suo valore massimo ($2,028 \pm 0,152$ UADH mg prot⁻¹), in seguito decresce molto rapidamente fino a valori simili a quelli del controllo e rimane costante fino alla fine dell'esperimento (Fig. 5.3).

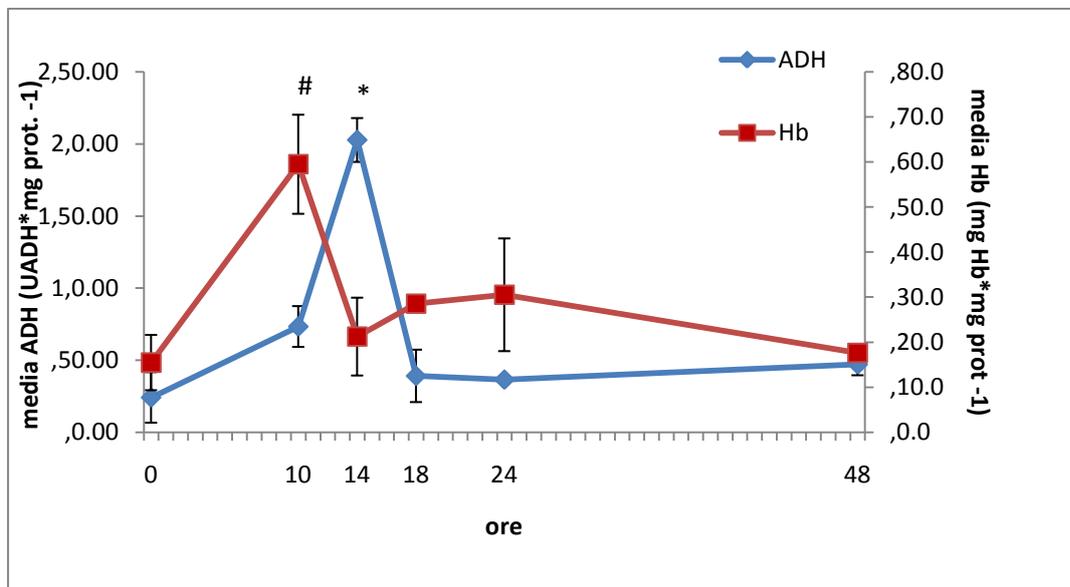


Figura 5.3. Esposizione all'anossia: *trend* di ADH, Hb (*= ADH: significativamente differente rispetto al controllo; #= Hb: significativamente differente rispetto al controllo)

5.3.3. Iperossigenazione

Diversamente da quanto osservato nell'esperimento precedente, negli esperimenti di iperossigenazione le larve hanno continuato a nuotare ed oscillare per tutta la durata dell'esperimento; ovviamente, questo comporta un forte stress, oltre che un dispendio notevole di energia. Il maggior stato di stress è dimostrato sia dall'alta mortalità, maggiore che in tutti gli altri test, (11,1% già dopo 18 ore, 33,3% dopo 24 e 48 ore) sia dall'andamento oscillante e difficilmente interpretabile dei *biomarkers* (Fig. 5.4). La quantità di alcol deidrogenasi rilevata è risultata significativamente più alta dei controlli dopo 10 e 14 ore di esposizione ($p=0,02$ e $p=0,03$ rispettivamente), per poi tornare a livelli che non si discostano in modo significativo da quelli registrati nel controllo. Per quel che riguarda l'Hb, possiamo osservare un iniziale significativo aumento ($p<0,01$) seguito da un calo dopo 14 ore fino a livelli paragonabili a quelli del controllo. In seguito la quantità di pigmento respiratorio aumenta nuovamente in modo significativo per gradualmente diminuire tra le 24 e le 48 ore.

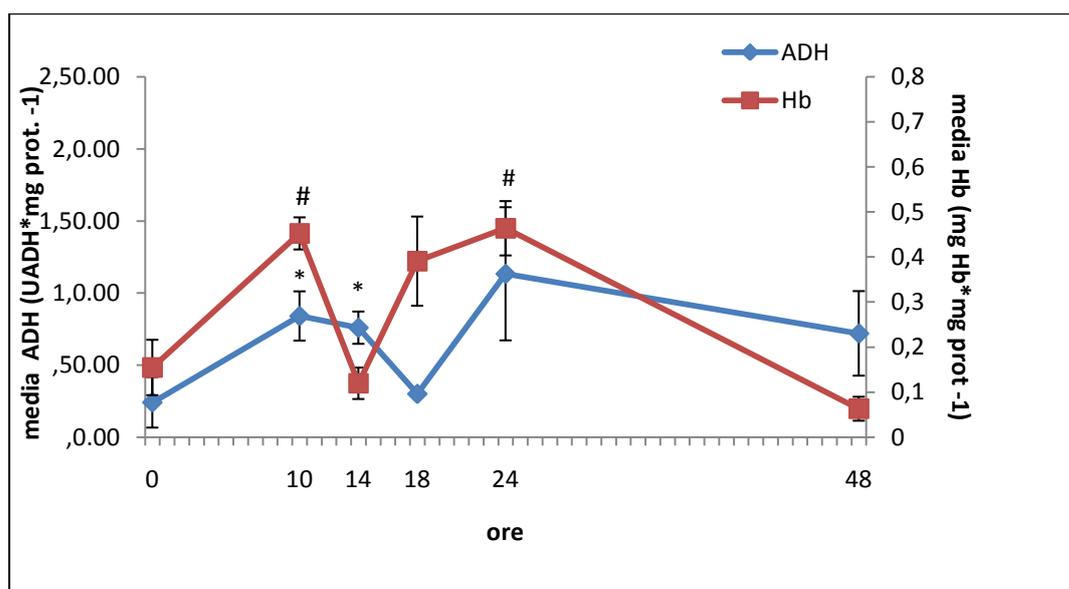


Figura 5.4. Esperimento di Iperossigenazione: *trend* di ADH, HB (*= ADH: significativamente differente dal controllo; #= Hb: significativamente differente dal controllo)

5.4. DISCUSSIONE

Le larve di *Chironomus riparius* esibiscono una straordinaria capacità di adattamento, grazie alla possibilità di passare al metabolismo anaerobio in caso di necessità, pur mantenendo attive le vie del metabolismo aerobio. Conseguentemente questa specie può adattarsi rapidamente alle mutevoli condizioni ambientali che di volta in volta si trova a fronteggiare nelle acque interne (Frank, 1983).

I nostri dati supportano questa tesi. In larve di *C. riparius* l'ipossia e l'anossia inducono la sintesi di emoglobina, e alterano l'attività specifica degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati, come per esempio l'ADH. Ciò significa che nelle larve esposte a livelli di ossigeno decrescenti, la degradazione del glicogeno viene attivata dopo la diminuzione dell'ossigeno immagazzinato nell'Hb. L'incremento dell'attività dell'ADH a causa della mancanza di ossigeno è nota in specie resistenti all'anossia (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002).

In larve esposte all'ipossia, la quantità di Hb ed il consumo di ossigeno (R), aumentano al diminuire dell'ossigeno disponibile, fino ad un valore critico di ossigenazione (pari a circa il 70% di saturazione). Al di sotto di questo valore la quantità di Hb decresce, fino a valori confrontabili con quelli presenti nel controllo. Un *trend* simile è stato osservato anche per il tasso di consumo dell'ossigeno R, che, al di sotto del 50% di saturazione di ossigeno, decresce significativamente all'aumentare del tempo di esposizione.

L'attività dell'ADH mostra due fasi di crescita, prima delle 14 ore e dopo le 18 ore di esposizione; tra questi due intervalli è stata rilevata una fase di decremento

(tra le 14 e le 18 ore) durante la quale sono state trovate le prime larve sofferenti o morte.

In definitiva, questo *trend* supporta l'ipotesi secondo cui l'Hb possa avere una funzione di stoccaggio a breve termine dell'ossigeno, permettendo agli animali di ritardare l'attivazione delle vie metaboliche anaerobie, e che la fermentazione alcolica possa essere effettuata per brevi periodi (14-24 ore di incubazione, circa 84-53% di saturazione di ossigeno) in concomitanza con la respirazione aerobia. Essa diventa prevalente a percentuali di saturazione dell'ossigeno inferiori al 5% (< 1 mg/l).

Alcuni autori riportano che larve di *C. riparius* possono virtualmente mantenere il loro tasso respiratorio normale fino ad un livello di ossigeno critico pari a circa 1 mg/l ($pO_2 = 15$ Torr), passando al metabolismo anaerobio quando l'ossigeno arriva al di sotto degli 0,7 mg/l (Redecker & Zebe, 1988; Zebe, 1991). Jónasson (1978) riporta quale limite critico per la respirazione aerobica il 56% di saturazione di ossigeno per larve di *C. plumosus*.

Movimenti ondulatori del corpo sono stati osservati solo nelle prime 24 ore di incubazione, lo stesso tipo di comportamento è messo in atto in condizioni naturali per creare una corrente d'acqua all'interno dei tubi che le larve si costruiscono entro il fango anossico, ed ossigenare in questo modo l'emoglobina (Wyatt Hoback & Stanley, 2001). Dopo questo intervallo di tempo, che corrisponde ad una percentuale di circa il 50% di ossigeno, sono state ritrovate le prime larve sofferenti o morte; sulla base di studi precedenti, che fissano a 205 e 100 giorni rispettivamente il tempo letale in anossia, senza cibo, a 4°C per larve

di *C. plumosus* e *C. anthracinus* Zetterstedt 1860 (Nagell & Landahl, 1978), possiamo escludere che la morte possa essere stata causata dal digiuno.

Il *trend* del tasso respiratorio (R) misurato è concorde con quello misurato da Hamburger *et al.* (1994) in *C. anthracinus* e Brodersen *et al.* (2008) in *C. riparius* e *C. hyperboreus* Staeger, 1845.

Ad alti livelli di ossigenazione le larve si comportano come *oxy-stressors*, incrementando R al decrescere della disponibilità di ossigeno, ma a livelli di ossigenazione più bassi esse mostrano un comportamento da *oxy-regulator*, regolando e mantenendo costante R (Brodersen *et al.*, 2008).

Questo *trend* dimostra l'efficienza dell'emoglobina dei Chironomidi nel catturare ossigeno dall'acqua (Brodersen *et al.*, 2008). Come atteso, entro le prime 10 ore di incubazione, il valore di R misurato ($= 65 \mu\text{molO}_2 \text{ gAFDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$) era inferiore a $100 \mu\text{molO}_2 \text{ gAFDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$, come precedentemente stabilito da Brodersen *et al.* (2008) per le larve delle specie più grandi (*Chironomus*, *Stictochironomus* e *Procladius*) esposte ad ipossia progressiva per brevi intervalli (1 ora). Dopo esposizioni più lunghe il valore di R registrato è stato più alto (e.g. $309 \pm 50 \mu\text{molO}_2 \text{ gAFDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dopo 24 ore). Questi alti valori di consumo di ossigeno potrebbero essere legati al fatto che gli esperimenti sono stati effettuati senza fornire alle larve fango o altro substrato, cosa che è considerata un forte agente di stress per animali tubicoli (Jónasson, 1978).

Negli esperimenti di esposizione all'anossia, sono avvenuti alcuni adattamenti metabolici durante i due giorni di trattamento, e alterazioni dei parametri biochimici erano evidenti già dopo poche ore di esposizione all'anossia (larve

sofferenti sono state trovate già dopo pochi minuti di incubazione). In queste condizioni sia l'Hb che l'ADH aumentano, raggiungendo valori massimi dopo 10 e 14 ore di trattamento rispettivamente; successivamente entrambi diminuiscono, fino a valori approssimativamente uguali a quelli del controllo. Questo *trend* era già stato osservato precedentemente da Frank (1983) in *C. plumosus*, nel quale le larve tentavano di mantenere più a lungo possibile il metabolismo aerobio, anche quando l'ossigenazione era mantenuta costantemente al di sotto del 5% (<0,5 mg L⁻¹) come nel nostro caso. È stato calcolato che in tali condizioni circa l'80% del fabbisogno energetico di larve di *C. gr. plumosus* è fornito dalla fermentazione alcolica che trasforma le scorte di glicogeno in etanolo (Scholz & Zerbst-Boroffka, 1998). Hamburger *et al.* (1994) riportano il fatto che il metabolismo anaerobio rappresenta dal 3 (a 3 mgO₂ L⁻¹) al 40% (a 0,5 mgO₂ L⁻¹) della produzione totale di energia in larve di *Chironomus* (es. *C. anthracinus* è in grado di regolare il suo metabolismo respiratorio fino a 2-3 mgO₂ L⁻¹). Choi *et al.* (2001) annotano che a 1,6 mg/l di O₂, dopo 48 ore di trattamento in anossia, avviene un passaggio dal metabolismo aerobio a quello anaerobio. Il *trend* che abbiamo osservato per l'attività dell'ADH è comparabile con quanto trovato da Forcella *et al.* (2007) in *C. riparius* e da Frank (1983) in *C. plumosus* in larve del IV stadio mantenute in condizioni di anossia tramite insufflazione di N₂. Tuttavia nel presente studio sono stati misurati valori più alti (di circa il 57%) di attività enzimatica dopo gli stessi intervalli di tempo rispetto a Forcella *et al.* (2007) (circa 1400 nmol min⁻¹ mg prot⁻¹ h in Forcella *et al.* (2007); nostro risultato: 2637 μmol g dw⁻¹ h⁻¹ dopo 24 ore), ma simili ai valori di ADH riportati da Frank (1983) (7127 μmol g dw⁻¹ h⁻¹ in Frank (1983); nostro risultato: 8163 μmol g dw⁻¹ h⁻¹ dopo 48 ore). In condizioni di anossia le larve iniziano immediatamente ad effettuare forti

movimenti ondulatori per pochi minuti, poi interrompono questa attività. Questa reazione comportamentale è stata osservata anche da Walshe (1951) in larve di *C. riparius* esposte a livelli di ossigenazione inferiori al 7%: esse interrompevano quasi immediatamente l'ossigenazione dei tubi, e la loro emoglobina risultava parzialmente deossigenata. Dopo due giorni di incubazione ad una saturazione di ossigeno inferiore all'1%, alcune larve sono state trovate morte. All'interno del genere *Chironomus*, *C. riparius* non è la specie più resistente ai bassi livelli di ossigeno. In particolare, Frank (1983) riporta il seguente ordine di resistenza: *C. plumosus* > *C. anthracinus* > *C. tentans* > *C. riparius* > *C. piger*. I dati qui presentati forniscono nuove evidenze sull'autoecologia di questa specie, confermando che l'anossia rappresenta una condizione di stress, durante la quale vengono attivati meccanismi fisiologici di compensazione.

Gli esperimenti effettuati in condizioni di iperossigenazione mostrano, come già dimostrato in precedenza (Choi *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2001) che anche l'eccessiva quantità di ossigeno può risultare dannosa. Nei lavori citati gli autori registrano un forte aumento di emoglobina nelle larve esposta all'iperossia ($87,4 \pm 32$ mg Hb/100 mg prot. nell'emolinfa dopo 24 ore di esposizione). In questo studio questi dati vengono confermati, seppure con valori di Hb che corrispondono circa alla metà ($46 \pm 0,8$ mg Hb/100 mg prot. nell'emolinfa dopo 24 ore di esposizione) di quanto riportato da Choi *et al.*(2000). Anche l'alta mortalità registrata nel test di iperossigenazione, e il *trend* irregolare delle sostanze qui monitorate, ci porta a supporre che gli animali fossero in una condizione di forte stress.

È probabile che gli adattamenti comportamentali messi in atto dalle larve in caso di mancanza di ossigeno (es. immobilità) in qualche modo preservino le larve anche da tutti li altri stress dovuti alle condizioni di esposizione (es. mancanza di substrato), minimizzando la quantità di energia usata per il movimento.

5.5. CONCLUSIONI

Sintetizzando i risultati ottenuti da questo studio, risulta chiaro che le larve de IV stadio di *C. riparius* sono in grado di sopportare condizioni di ipossia e anossia, che essi superano ricorrendo a meccanismi compensatori del metabolismo per mantenere le normali funzioni fisiologiche e biochimiche. Conseguentemente il consumo dei substrati in grado di fornire energia è frequentemente aumentato, passando dal metabolismo aerobio a quello anaerobio. Al contrario le larve non sembrano in grado di attuare efficaci meccanismi compensativi per far fronte allo stress da iperossigenazione, al quale non sono adattate, dal momento che entro il fango in cui vivono sperimentano con più frequenza condizioni di scarsità di ossigeno.

Per queste ragioni la misura dell'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo anaerobio e dei pigmenti respiratori in *C. riparius* possono essere proposti come strumenti per il monitoraggio della qualità dell'acqua nelle acque correnti.

6. RESISTENZA AI METALLI PESANTI E PESTICIDI

6.1. INTRODUZIONE

6.1.1. Rame

Il rame è un metallo pesante utilizzato in agricoltura anche biologica (*Commission Regulation EC No.473/2002*) come fungicida di contatto principalmente contro le epidemie di peronospora. La peronospora è una malattia causata da protisti parassiti appartenenti alle famiglie Peronosporaceae e Piziaceae. In particolare la *Plasmopara viticola* è l'agente che causa la peronospora delle viti. La malattia si sviluppa quando le sue zoospore sono presenti su tessuti verdi con stomi già sviluppati, e con condizioni ambientali favorevoli (temperatura superiore a 10° C e pioggia sufficientemente abbondante) (Kuflik *et al.*, 2008).

Durante le piogge il rame viene dilavato dalle foglie delle piante trattate dall'azione delle acque meteoriche, e viene trasportato in soluzione nei corpi idrici che drenano le aree coltivate. Come conseguenza, gli animali che vivono in questi ambienti possono entrare in contatto con elevate quantità di questo metallo, con importanti conseguenze sulla composizione e vitalità delle comunità, e sul metabolismo, sviluppo e sopravvivenza dei singoli individui.

Esiste una grande mole di letteratura riguardante l'esposizione al rame di Chironomidi, dal momento che diverse specie appartenenti al genere *Chironomus* sono state scelte come *target species* per test ecotossicologici (US EPA, 1994). È risaputo che questo metallo pesante provoca nei Chironomidi diversi effetti: per esempio Servia *et al.* (2006) hanno dimostrato un significativo

effetto del rame sullo sviluppo di larve di *Chironomus riparius*, e sul loro contenuto in glicogeno e glicerolo, mentre Janssens De Bisthoven *et al.* (1992, 1998) hanno dimostrato che l'esposizione al rame di queste larve provoca deformità dell'apparato boccale. Sempre in questa specie Michailova *et al.* (2006) hanno dimostrato aberrazioni strutturali e funzionali nei cromosomi politenici delle ghiandole salivari seguito all'esposizione anche a basse concentrazioni di questo metallo.

6.1.2. Azadiractina

L'Azadiractina ($C_{35}H_{44}O_{16}$) è un insetticida di origine vegetale che viene estratto dai semi e dalle foglie di una pianta, l'*Azadirachta indica* A. Juss, 1830 (Meliaceae), chiamata comunemente albero di neem (Fig. 6.1).

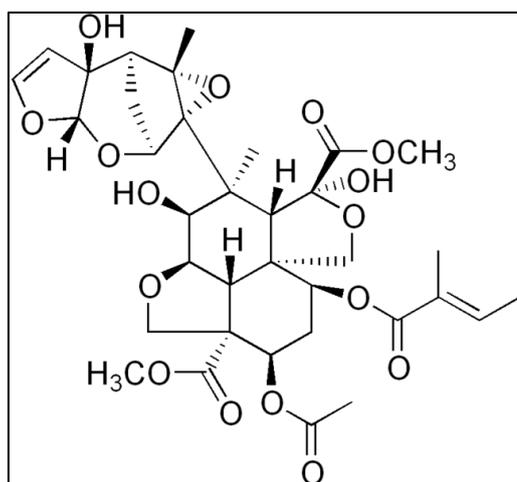


Figura 6.1. Formula di struttura dell'azadiractina

L'azadiractina è utilizzata in tutto il mondo come alternativa agli insetticidi chimici per il controllo degli insetti dannosi. Nella coltivazione di alberi da frutto (melo), i prodotti a base di azadiractina vengono utilizzati per combattere parassiti quali Afidi, Lepidotteri (minatori fogliari e la cheimatobia o falena invernale *Operophtera brumata* L.), Emitteri (Cicaline) e Tisanotteri (Thripidae).

I principali effetti di questo triterpenoide sugli insetti sono riassunti in Tabella 6.1.

Tabella 6.1. Effetti globali dell'azadiractina negli insetti (da Mordue & Nisbet, 2000, modif.)

Effetti	Target	Azione
effetto fagodeterrente primario	Parti boccali e chemorecettori	<ul style="list-style-type: none"> • Deterente all'ingestione
effetto fagodeterrente secondario	Apparato digerente	<ul style="list-style-type: none"> • Inibizione della peristalsi • Riduzione della produzione di enzimi • Mancato ricambio delle cellule epiteliali
inibizione della crescita	Cuticola	<ul style="list-style-type: none"> • Interferenze con la sintesi di ecdisone e ormone giovanile a causa del blocco dell'ormone protoracico
Sterilità	Organi riproduttivi	<ul style="list-style-type: none"> • Blocco delle divisione cellulare post metafase • Interferenze con la sintesi di ecdisone e ormone giovanile (che controllano nell'adulto la deposizione del tuorlo nell'uovo) • Diminuzione delloognesi nelle femmine e della spermatogenesi nei maschi. • Diminuzione della schiusa delle uova • Diminuzione delle larve vitali
Processi cellulari	Cellule in divisione	<ul style="list-style-type: none"> • Blocco delle divisione cellulare post metafase nelle meiosi e nella mitosi
	Cellule muscolari	<ul style="list-style-type: none"> • Perdita di tono muscolare

L'uso di composti a base di azadiractina è consentito in agricoltura biologica per la sua presunta bassa persistenza ambientale, anche se il tempo necessario per dissipare il 90% dei residui di azadiractina in un mesocosmo acquatico è stato stimato pari a 66 giorni (Thompson *et al.*, 2004).

Nonostante il suo largo impiego, esistono solo pochi lavori relativi allo studio degli effetti dell'azadiractina su organismi *non-target* (per es. Kreuzweiser, 1997; Dunkel & Richards, 1998; Scott & Kaushik, 1998; Kreuzweiser *et al.*, 1999) che riportano dati di tossicità relativi a Plecotteri, Efemerotteri, Tricotteri, Odonati, Ditteri e Gammaridi.

6.1.3. Heat Shock Proteins

Le *Heat Shock Proteins* (HSPs) sono una famiglia di proteine altamente conservate in procarioti ed eucarioti note anche come *stress proteins* in quanto vengono espresse in risposta a stress causa di alterazioni strutturali e funzionali delle proteine cellulari (Morimoto *et al.*, 1994; Feder & Hofmann, 1999).

La scoperta delle HSPs è attribuita a Ritossa (1962), che le rinvenne in cellule salivari di *Drosophila busckii* Coquilett, 1901 esposte ad uno shock termico. In seguito a questa scoperta, numerosi studiosi si interessarono alle HSPs, evidenziando l'espressione di queste proteine anche nel tessuto nervoso, nei tubuli del Malpighi e nelle ali di mosca (Tissieres *et al.*, 1974), nei fibroblasti dell'embrione di pollo (Kelley & Schlesinger, 1978), in *Escherichia coli* (Migula, 1895) (Lemeux *et al.*, 1978), nei lieviti (McAlister & Finkelstein, 1980) e nelle piante (Barnett *et al.*, 1979).

Dall'mRNA delle HSPs, è stato possibile risalire ai geni codificanti per tali proteine e si è scoperto che queste hanno una composizione aminoacidica altamente conservata nei diversi organismi esaminati; ad esempio l'HSP70 di *E. coli* possiede fino al 57% di aminoacidi in comune con l'HSP70 umana (Gupta & Golding, 1993).

Sulla base del peso molecolare le HSPs sono state classificate in sei famiglie: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e small HSP (Morimoto *et al.*, 1994). Esse si trovano in diversi compartimenti cellulari, dove sono deputate a svolgere specifiche funzioni che vengono qui brevemente elencate:

- le **HSP100** hanno come funzione principale quella di promuovere la rimozione di aggregati proteici formati in condizioni di stress;

- le **HSP90** svolgono un ruolo di sostegno tra alcuni componenti del citoscheletro, gli enzimi ed i recettori per gli ormoni steroidei;

- le **HSP70** normalmente presenti nelle cellule come forma costitutiva (*Heat Shock Cognate* 70 kDa, HSC70) e come forma inducibile (HSP70). La prima forma ha il compito di regolare il metabolismo proteico e l'omeostasi nella normale funzionalità della cellula; l'espressione della seconda è invece evidenziabile in conseguenza di uno stress acuto (Morimoto *et al.* 1994) durante il quale assistono la sintesi della catena polipeptidica, garantiscono il corretto ripiegamento della struttura proteica, agiscono come *chaperones* molecolari e mediano la riparazione o la degradazione di proteine alterate o denaturate.

- le **HSP60**, appartenenti alla famiglia delle *chaperonine* assistono il trasporto e ripiegamento delle proteine dal citoplasma alla matrice mitocondriale.

Inoltre agiscono anche come *chaperonine* nel ripiegamento delle proteine nella loro struttura;

- le **HSP40**, come le HSP60, sono coinvolte nei processi di stabilizzazione e di corretto ripiegamento delle proteine nascenti;

- le **small HSP** svolgono diverse funzioni specie-specifiche, tra cui anche quella di *chaperones* molecolari e di impedire l'aggregazione proteica irreversibile.

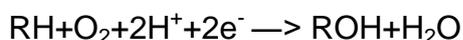
6.1.4 Citocromo P450

Un altro meccanismo cellulare di difesa dagli xenobiotici quali droghe, pesticidi e tossine vegetali, è il sistema multienzimatico del citocromo P450 (CYP450) (Scott, 1999). Sono note più di 7700 distinte macromolecole di tipo CYP appartenenti alla sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista o monoossigenasi.

Il nome di questa classe di emoproteine è dovuto al fatto che essa assorbe la luce a 450 μm quando il ferro del gruppo eme si trova nello stato ridotto Fe^{2+} e legato al monossido di carbonio (Omura & Sato, 1964).

I geni che codificano per questi enzimi sono altamente conservati in tutti gli organismi, dai batteri ai mammiferi, e il loro ruolo è quello di metabolizzare sia substrati endogeni (prodotti di scarto dell'organismo) che substrati esogeni (tossine di origine esterna).

I citocromi P450 sono i maggiori attori coinvolti nella detossificazione dell'organismo. Le reazioni da essi catalizzate sono svariate; la più comune è una classica reazione di monoossigenasi:



Gli elettroni necessari per questa reazione vengono trasferiti dall'NAPDH o dall'NADH al complesso substrato-P450 da una NAPDH citocromoP450 riduttasi. La stabilità del prodotto iniziale porta a reazioni finali diverse come idrossilazioni, epossidazioni, O-, N- e S- dealchilazioni e N- e S- ossidazioni (Bergé *et al.*, 1998). I prodotti di questi enzimi sono stati chiamati "diversozimi" (Coon *et al.*, 1996).

Una particolare caratteristica dei CYP450 è la loro inducibilità da parte di numerosi substrati i quali ne incrementano i livelli e di conseguenza aumentano le capacità di difesa dell'organismo. Questo sistema di detossificazione catalizza la reazione di monoossigenazione attraverso la quale xenobiotici idrofobici vengono convertiti in prodotti idrofilici più facilmente eliminabili dall'organismo. Oltre all'eliminazione di composti esogeni, il citocromo P450 è coinvolto nella biosintesi del colesterolo e nella steroidogenesi degli ormoni steroidei.

Quando uno xenobiotico con una struttura molecolare simile a quella dei normali substrati endogeni degli enzimi, penetra nell'organismo, gli stessi enzimi cominciano a metabolizzarlo, per cui si ha competizione tra substrati endogeni e substrati esogeni (xenobiotici). L'attività dell'enzima prevede trasporto di elettroni e ossigeno, con conseguenti fenomeni tossici dovuti all'eccessiva espressione del gene suddetto, a causa dell'eccessiva presenza di radicali liberi.

Negli insetti la loro attività è essenziale per la sintesi e la degradazione degli ormoni steroidei della muta, degli ormoni giovanili e nel metabolismo dei feromoni. Gli enzimi P450 sono importanti anche per i meccanismi adattativi di resistenza ai tossici sintetizzati dalle piante ospiti (Gould, 1984), oltre ad essere coinvolti in moltissimi casi di resistenza ai pesticidi.

Aumenti del livello di enzimi della classe CYP450 sono stati osservati dopo l'esposizione a una grande varietà di composti chimici anche in Chironomidi. Per esempio, in larve di *Chironomus tentans* Fabricius 1805, *cyp450* è stato trovato over-espresso in animali esposti ad atrazina e chlorpyrifos (Londoño *et al.*, 2004; Rakotondravelo *et al.*, 2006), mentre è stata registrata una diminuzione dell'espressione a seguito dell'esposizione a metolachlor (Jin-Clark *et al.*, 2008). Per quanto riguarda *C. riparius* è noto un aumento dell'espressione del *cyp450* in seguito ad esposizione a fenbendazolo (Park *et al.*, 2009)

In questo lavoro è stata studiata per la prima volta l'espressione dei geni *hsp10*, *hsp40*, *hsp70*, *hsc70* e *cyp450* in risposta all'esposizione a rame e azadiractina per valutare gli impatti dell'agricoltura biologica su larve di *C. riparius*.

6.2 MATERIALI E METODI

6.2.1. Acclimatazione e shock

Tutte le larve utilizzate per gli shock sono state acclimate per 24 ore prima dell'esperimento in 200 ml di acqua ricostituita (HRW: *Hard Reconstituted Water*) in un becker da 500 ml a 20°C, in accordo con i metodi di allevamento proposti da Lee S-E *et al.* (2006). Gli shock sono stati condotti ponendo le larve in una

provetta Falcon da 50 ml contenente acqua ricostituita a cui sono state aggiunte opportune quantità di una soluzione concentrata di rame solfato pentaidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) o di un prodotto commerciale a base di azadiractina (ADINA10, Ital-Agro), per ottenere la concentrazione finale desiderata per un volume finale di 20 ml. Le provette sono state quindi introdotte in una cella termostata a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, con un ciclo luce-buio di rispettivamente 16 - 8 ore, senza cibo né areazione per 3h o 24h. Al termine dello shock è stata valutata la sopravvivenza degli animali: sono state considerate vive le larve che presentavano vivaci movimenti autonomi del corpo o le larve immobili ma capaci di rispondere a stimoli tattili; sono invece state considerate morte le larve immobili e prive di alcuna capacità di reazione allo stimolo tattile. La sopravvivenza è stata calcolata come percentuale di organismi sopravvissuti sul totale degli organismi testati ad ogni concentrazione di esposizione. I valori di sopravvivenza dopo lo shock a 24 h sono stati infine usati per calcolare, tramite analisi di Probit, il valore della concentrazione letale 50% (LC_{50}) e quello della concentrazione letale massima (LC_{100}) (Finney, 1989). Queste concentrazioni consentono di quantificare la resistenza delle larve. Per ogni concentrazione di shock sono state eseguite 3 repliche ognuna con 5 larve mature L4). In totale sono state testate: 19 diverse concentrazioni di rame per 24h, 8 per 3h; 10 diverse concentrazioni di azadiractina per 24h e 6 concentrazioni per 3h (Tab. 6.1; Tab. 6.2)

6.2.1.1. Analisi statistica dei dati di sopravvivenza

L'analisi di Probit con IC al 95% è stata condotta utilizzando il programma BioStat® 2007

Tabella 6.1. Le concentrazioni di rame testate e gli esperimenti condotti per ognuna di esse

<i>Concentrazioni Cu</i>	<i>sopravvivenza 24 h</i>	<i>sopravvivenza 3 h</i>	<i>espressione genica 24 h</i>	<i>espressione genica 3 h</i>
Controllo (0 mg/l)	✓	✓	✓	✓
0.01 mg/l	✓	✓	✓	✓
0.05 mg/l	✓	✓	✓	✓
0.1 mg/l	✓	✓		
0.25 mg/l	✓	✓		
0.5 mg/l	✓			
1 mg/l	✓	✓	✓	✓
2.5 mg/l	✓			
5 mg/l	✓			
10 mg/l	✓	✓	✓	✓
15 mg/l	✓			
20 mg/l	✓			
25 mg/l	✓	✓	✓	✓
30 mg/l	✓			
40 mg/l	✓			
50 mg/l	✓			
60 mg/l	✓			
70 mg/l	✓			
80 mg/l	✓			
90 mg/l	✓			

Tabella 6.2. Le concentrazioni di azadiractina testate e gli esperimenti condotti per ognuna di esse

<i>Concentrazioni azadiractina</i>	<i>sopravvivenza 24 h</i>	<i>sopravvivenza 3 h</i>	<i>espressione genica 24 h</i>	<i>espressione genica 3 h</i>
Control (0 mg/l)	✓	✓	✓	✓
0.2 mg/l	✓	✓	✓	✓
0.3 mg/l	✓	✓	✓	✓
0.4 mg/l	✓	✓	✓	✓
0.5 mg/l	✓	✓	✓	✓
1 mg/l	✓	✓	✓	✓
1.5 mg/l	✓			
1.75 mg/l	✓			
2 mg/l	✓			
2.25 mg/l	✓			
2.50 mg/l	✓			

6.2.2. Analisi dell'espressione genica di heat shock proteins e Cyp450

6.2.2.1. Larve utilizzate per lo studio dell'espressione genica

L'analisi dell'espressione dei geni *hsp70*, *hsc70*, *hsp40*, *hsp10* e *cyp450* in *Chironomus riparius* è stata condotta su larve di controllo (C) e su larve sottoposte a shock brevi (= 3h) e prolungati (= 24h) a differenti concentrazioni di rame e azadiractina. Per le larve stressate sono state usate solo quelle che sono risultate vive in seguito al controllo della sopravvivenza.

L'espressione genica dei geni *target* in risposta al rame è stata analizzata in particolare su 5 concentrazioni (Tab. 6.1) scelte sulla base dei valori di concentrazione subletale e letale (LC₅₀ e LC₁₀₀) e delle concentrazioni ambientali: 0,01 mg/l = la massima concentrazione a cui tutte le larve testate sono risultate vive; 0,05 mg/l = la concentrazione misurata nel torrente Rio Gola nel novembre 2009 (presunta minima concentrazione annuale nel torrente); 1 mg/l = la concentrazione a cui è stata registrato il 10% di mortalità; 25 mg/l = valore più prossimo all'LC₅₀ tra quelli testati; 10 mg/l ossia una concentrazione intermedia fra la concentrazione minima e la massima testata.

L'espressione genica dei geni *target* in risposta all'azadiractina è stata sempre analizzata su 5 concentrazioni (Tab. 6.2) scelte sulla base dei valori di concentrazione subletale e letale calcolati (LC₅₀ e LC₁₀₀). Quattro differenti concentrazioni inferiori al valore di LC₅₀ e una pari al valore più prossimo all'LC₅₀ tra quelli testati.

6.2.2.2 Trascrittasi inversa (RT-PCR)

L'analisi del livello di espressione dei geni studiati è stata condotta utilizzando la tecnica della trascrittasi inversa (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). In questo studio è stato usato un metodo semiquantitativo che ha permesso di stimare i livelli di espressione dei geni grazie all'amplificazione dei geni oggetto di studio e di due geni *housekeeping* (*actina* e *GAPDH*), ossia di geni che vengono costantemente trascritti e tradotti e la cui espressione non viene alterata dai trattamenti di shock (l'idoneità di questi geni come *housekeeping* è stata testata successivamente con il software BestKeeper, Pfaffl *et al.*, 2004).

6.2.2.3. Estrazione dell'RNA totale

L'RNA è stato estratto da gruppi di 1, 2 o 3 larve lisando gli animali in una microprovetta (Eppendorf) contenente 200 µl di Trizol (Invitrogen) con un pestello (Martinez-Guitarte *et al.*, 2007). L'omogenato è stato lasciato per 5 minuti a temperatura ambiente, ed in seguito sono stati aggiunti 40 µl di cloroformio a cui ha fatto seguito un'agitazione vigorosa di 15 secondi e un'ulteriore incubazione di 3 minuti a temperatura ambiente. Il campione è stato poi centrifugato a 10000 rpm a 4°C per 15 minuti ottenendo una separazione in tre fasi. La fase superiore acquosa contenente l'RNA è stata separata e trasferita in una nuova eppendorf. L'RNA è stato poi fatto precipitare aggiungendo 100 µl di isopropanolo e centrifugando a 10000 rpm a 4°C per 10 minuti. Il *pellet* di RNA è stato quindi sottoposto a un lavaggio con 300 µl di etanolo 70% e centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti. Dopo aver rimosso il surnatante, il *pellet* è stato lasciato asciugare per qualche minuto a temperatura ambiente per permettere la completa

evaporazione dell'etanolo e infine risospeso in 30 μ l di acqua DEPC (*diethyl pyrocarbonate water*).

La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto sono state misurate tramite spettrofotometro NanoDrop ND-1000 UV-Vis; per ogni campione sono stati caricati 1,5 μ l di soluzione contenente l'RNA totale estratto. Lo spettrofotometro consente sia di valutare la concentrazione del campione, espressa in ng/ μ l, che di stimare la purezza dell'RNA tramite i valori 260/280 nm e 260/230 nm. Valori di 260/280 nm e 260/230 nm superiori a 2 evidenziano un RNA puro.

6.2.2.4 Digestione con *Dnasi* e pulizia dell' RNA

Prima della retrotrascrizione l'RNA è stato sottoposto ad un trattamento con l'enzima *Dnasi* per eliminare possibili contaminazioni di DNA che potrebbero alterare i risultati della RT-PCR.

Il trattamento di digestione con *Dnasi* è stato condotto mediante il kit Rnase-Free Dnase (Qiagen) seguendo il protocollo fornito dal produttore che prevede di aggiungere a 20 μ l di RNA totale 10 μ l di tampone RDD, 2,5 μ l di enzima *Dnasi* e di lasciare la reazione per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo la digestione, l'RNA è stato pulito per eliminare residui di tampone, sali ed enzimi, allo scopo è stato usato il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguendo le indicazioni fornite dal produttore che prevedono di filtrare l'RNA attraverso la membrana presente nelle apposite colonnine. L'RNA si lega alla membrana; si fanno quindi due successivi lavaggi con tamponi specifici del kit e infine si eluisce l'RNA con 30 μ l di acqua DEPC (*diethyl pyrocarbonate water*).

Infine, l'RNA è stato quantificato nuovamente tramite lo spettrofotometro NanoDrop, ND-1000 UV-Vis come descritto nel paragrafo 6.2.2.3.

6.2.2.5. Retrotrascrizione

La retrotrascrizione (o trascrizione inversa) deriva dalla capacità dell'enzima *trascrittasi inversa* di sintetizzare una molecola di DNA (che viene definita cDNA) a partire da una molecola di RNA. La reazione di retrotrascrizione è stata effettuata a partire da 1 µg di RNA totale usando il kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). La prima fase è consistita nell'aggiungere all'RNA 1 µl di primer oligo(dT) e poi nell'incubare la reazione per 5 minuti a 65°C. Successivamente, sono stati aggiunti 4 µl di tampone specifico del kit, 1 µl di *RNase Inhibitor*, 2 µl di dNTPs e 1 µl dell'enzima *trascrittasi inversa*. La reazione è stata quindi incubata a 42°C per un'ora per ottenere la sintesi del filamento di cDNA ed infine terminata tramite l'incubazione a 70°C per 5 minuti.

6.2.2.6. Amplificazione del template di cDNA

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato utilizzato come template per le reazioni di amplificazione mediante *Real Time PCR* con i primer specifici per i geni *hsp70*, *hsc70*, *cyp450*, *GAPDH* e *actina* (Tab. 6.3).

Tabella 6.3. Sequenze e fonti di ciascun primer utilizzato.

	Sequenza del primer (5' – 3')	Fonte
ACT F	CCTTACGGATATCAACGTCG	Lee S-M. <i>et al.</i> , 2006, modificato
ACT R	GATGAAGATCCTCACCGAAC	Planelló <i>et al.</i> , 2010, modificato
GAPDH F	GGTATTTTCATTGAATGATCACTTTG	Park <i>et al.</i> , 2009
GAPDH R	TAATCCTTGGATTGCATGTACTTG	
HSC70 F	CGTGCTATGACTAAGGACAA	Planelló <i>et al.</i> , 2010, modificato
HSC70 R	GCTTCATTGACCATACGTTTC	
HSP70 F	CATGTGAACGAGCCAAGAGA	Park <i>et al.</i> , 2009
HSP70 R	TCGAGTTGATCCACCAACAA	Lee <i>et al.</i> , 2006
HSP40 F	TACGTGACGCTAGAGGAAA	Martinez- Guitarte (comunicaz. personale)
HSP40 R	TTCCAGCCCGGCTT	
HSP10 F	GAGGAATTGTGATTCCAGA	
HSP10 R	TGCCACCGTATTCAGG	
CYP450 F	GACATTGATGAGAATGATGTTGGT	Park <i>et al.</i> , 2009
CYP450 R	TAAGTGGAACCTGGTGGGTACA	

La Real Time PCR è una PCR in cui l'amplificazione e il rilevamento dell'amplificato avvengono nello stesso momento grazie all'utilizzo di una molecola fluorescente, la cui emissione viene captata da appositi software che permettono di monitorare in tempo diretto la cinetica dell'amplificazione. Per ogni campione il software determina un valore di ciclo soglia (CT): cioè il ciclo di reazione in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter e i

segnali di amplificazione specifici sono rilevabili rispetto a quelli del rumore di fondo del sistema. Il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo CT è inversamente proporzionale al numero di copie *target* presenti inizialmente.

Le reazioni di Real Time PCR sono state condotte utilizzando il kit KAPA Syber Fast qPCR (Kapa Biosystem). Il kit contiene una master mix per Real Time PCR, ossia una miscela di dNTPs, MgCl₂, Sybergreen e Taq polimerasi. La preparazione della reazione consiste nel miscelare 5 µl master mix del kit, 0,2 µl di ognuno dei primer di interesse (Forward e Reverse), 0,5 µl di cDNA e infine acqua sterile per raggiungere il volume finale di 10 µl (Tab. 6.4). Il programma di amplificazione è riportato in Tabella 6.5; il termociclatore utilizzato è il Rotor-Gene 6000 (Corbett).

Tabella 6.4. Componenti della reazione di Real Time PCR.

Componente	Volume (µl)
KAPA SYBR FAST qPCR master mix (2X)	5
Forward primer	0.2
Reverse primer	0.2
cDNA	0,5
Acqua sterile	4.1
Volume finale	10

Tabella 6.5. Programma di Real Time PCR utilizzato per amplificare i cDNA con i primer specifici.

Step	N.ripetizioni
3 minuti a 95°C	1
10 secondi a 95°C	45
20 secondi a 55°C	45
10 secondi a 72° C	45
da 65°C a 95°C	1

6.2.2.7 Analisi dei dati

La quantificazione relativa di ogni gene rispetto all'actina (Act) e alla gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), tra i controlli e i campioni trattati è stata valutata come differenza tra le medie dei diversi gruppi usando il programma REST (Relative Expression Software Tool - Multiple Condition Solver REST - MCS© version 2), un software che calcola l'espressione relativa in *Real-Time* PCR usando il Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test per calcolare la significatività (Pfaffl *et al.*, 2002). Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

6.3. RISULTATI

6.3.1. Esposizioni al rame

6.3.1.1. Sopravvivenza

Il grafico di Figura 6.1 mostra la sopravvivenza della larve al quarto stadio di *Chironomus riparius* dopo 24 ore di esposizione al rame. Come atteso, la sopravvivenza decresce all'aumentare della concentrazione di rame. La sopravvivenza rimane elevata (> di 50%) fino a 25 mg/l e la LC₅₀ è risultata pari a 26,05 mg/l. Dopo 24 ore di esposizione a 60 mg/l tutte le larve testate sono risultate morte e la concentrazione letale massima, calcolata tramite analisi di probit, è risultata pari a 53,53 mg/l.

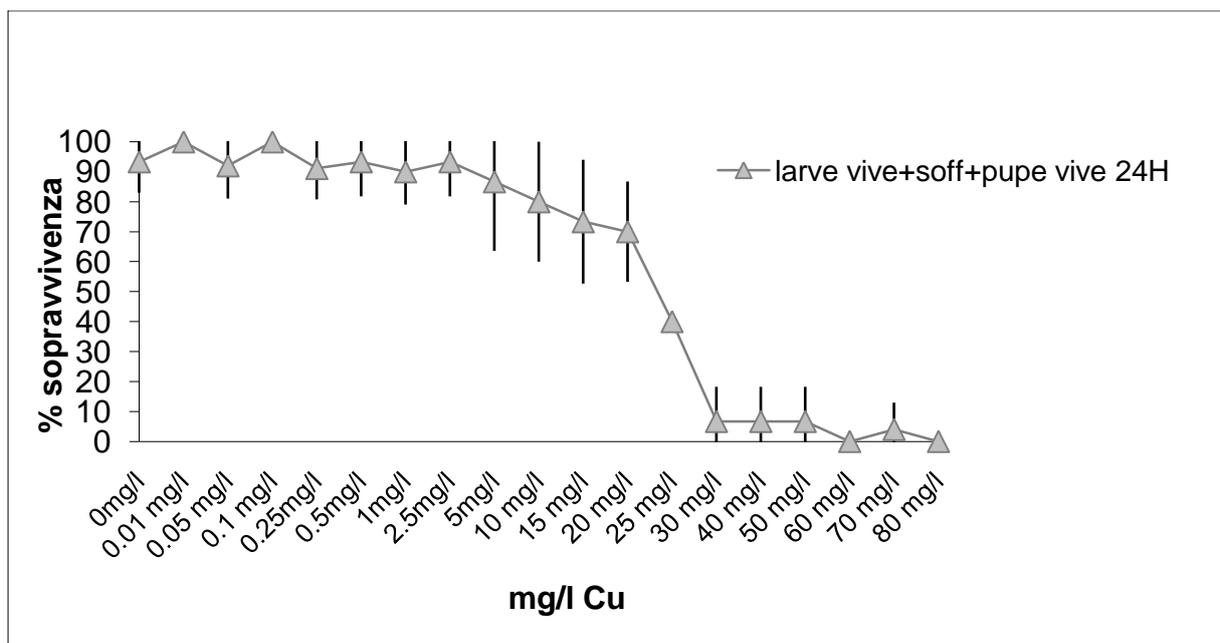


Figura 6.1: Sopravvivenza di a diverse concentrazioni di rame dopo 24 ore.

6.3.1.2. Induzione genica in risposta al rame

I risultati dell'analisi di espressione genica di *hsp70*, *hsc70*, *hsp40*, *hsp10* e *cyp450* dopo 3 e 24 h di esposizione a concentrazioni di rame comprese tra 0,01 e 25 mg/l sono riportati nelle Figure 6.2 e 6.3.

La trascrizione del gene *hsp70* è risultata essere *up*-regolata a tutte le concentrazioni testate già dopo 3 ore di esposizione, con differenze significative rispetto al controllo a tutte le concentrazioni eccetto a 1 mg/l (Fig. 6.2). Dopo esposizione per 24 h alle stesse concentrazioni, invece il gene *hsp70* è risultato significativamente *down*-regolato a 0,05 mg/l, ma significativamente *up*-regolato a concentrazioni maggiori di rame.

Diversamente la trascrizione del gene *hsc70* non sembra essere attivata da una breve esposizione a basse concentrazioni di rame; solo dopo 24 ore a 10 o 25 mg/l si osserva un aumento significativo del livello di questo gene rispetto al controllo.

Nessuna variazione significativa rispetto al controllo è stata invece rilevata per il livello di espressione del gene *hsp40*, sia a 3h che a 24 ore di esposizione.

La trascrizione del gene *hsp10* è risultata significativamente *up*-regolata solo dopo un'esposizione per 24 ore a 0,05 mg/l.

Il gene *cyp450* sembra essere fortemente influenzato dall'esposizione al metallo: esso è significativamente *up*-regolato a tutte le concentrazioni dopo 3 ore di esposizione. La trascrizione di questo gene però sembra essere fortemente influenzata dal fattore tempo; contrariamente alle 3 ore infatti: dopo 24 ore si nota una diminuzione statisticamente significativa del livello di espressione a tutte le concentrazioni testate eccetto 0,05 mg/l.

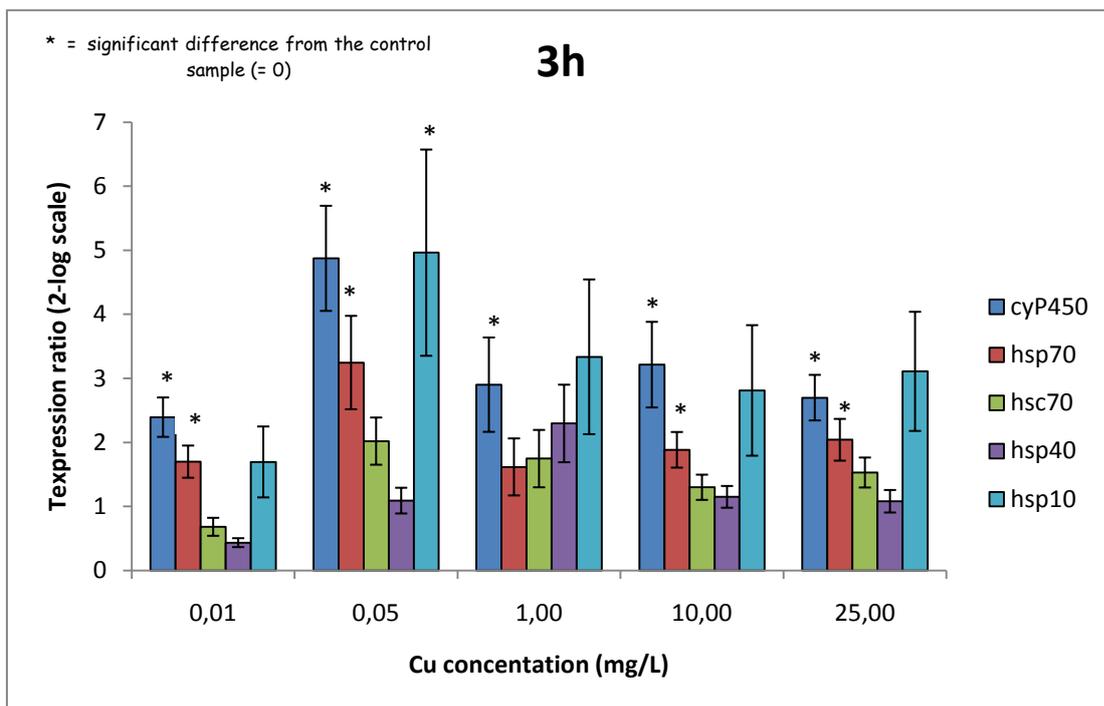


Figura 10 Livello di espressione di HSP70, HSC70, HSP40, HSP10 e CYP450 dopo esposizione a rame per 3 ore (mean \pm SE: * $p < 0.05$). Il livello di espressione nelle larve controllo è stato fissato pari a 0.

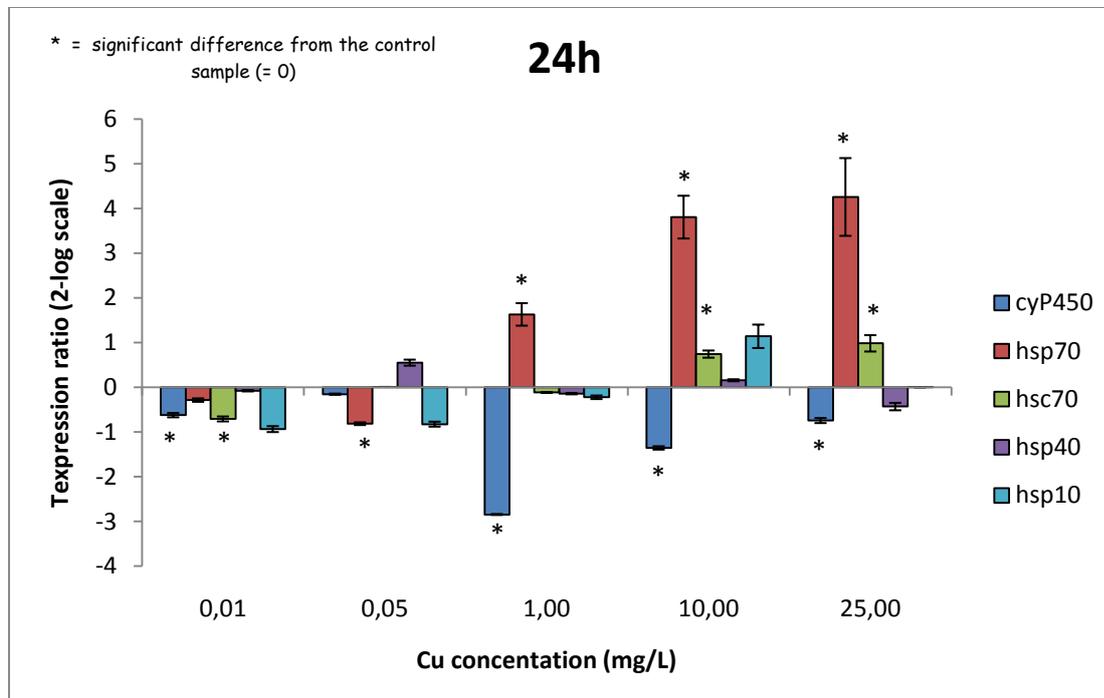


Figura 6.3. Livello di espressione di HSP70, HSC70, HSP40, HSP10 e CYP450 dopo esposizione al rame per 24 ore (mean \pm SE: * $p < 0.05$). Il livello di espressione nelle larve controllo è stato fissato pari a 0.

6.3.2. Esposizioni all'azadiractina

6.3.2.1. Sopravvivenza

Il grafico di Figura 6.4 mostra la sopravvivenza della larve L4 di *Chironomus riparius* dopo 24 ore di esposizione all'azadiractina. Similmente a quanto osservato in risposta al rame, la sopravvivenza decresce all'aumentare della concentrazione di azadiractina. La sopravvivenza rimane elevata (> di 50%) fino alla concentrazione di 1 mg/l e la LC₅₀ è risultata pari a 1,09 mg/l. Dopo 24 ore di esposizione a 2,5 mg/l tutte le larve testate sono risultate morte e la concentrazione letale massima, calcolata tramite analisi di probit, è risultata pari a 2,91 mg/l.

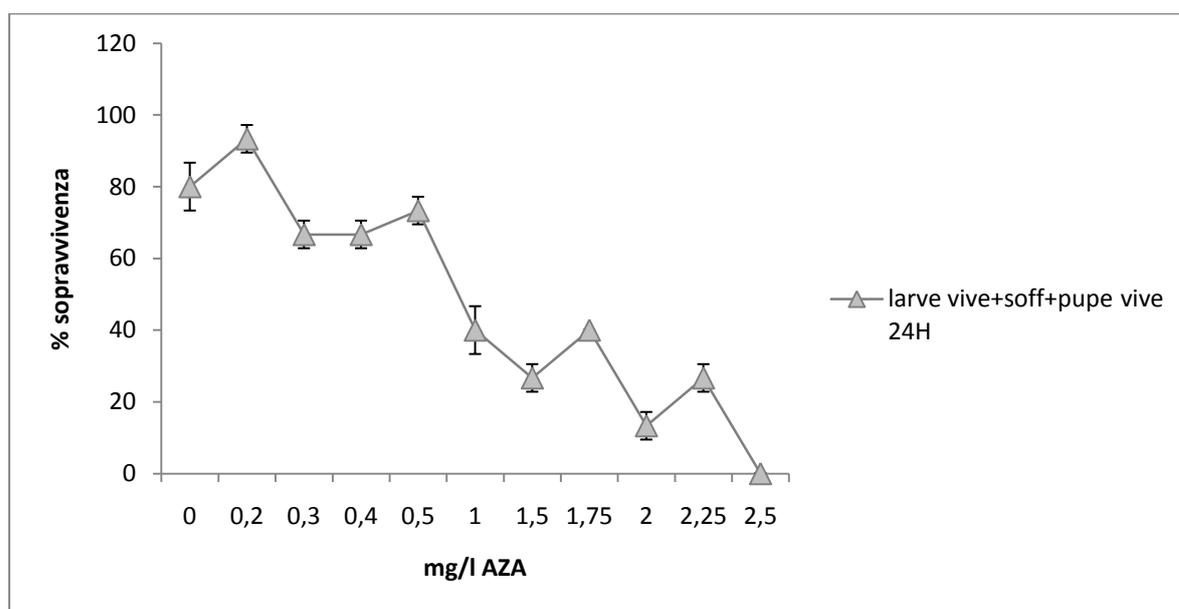


Figura 6.4. Sopravvivenza di a diverse concentrazioni di azadiractina dopo 24 ore.

6.3.1.2. Induzione genica in risposta all'azadiractina

I risultati dell'analisi di espressione genica di *hsp70*, *hsc70*, *hsp40*, *hsp10* e *cyp450* dopo 3 e 24 h di esposizione a concentrazioni di rame comprese tra 0,01 e 25 mg/l sono riportati nelle Figure 6.5 e 6.6.

La trascrizione del gene *hsp70* non risulta influenzata dall'esposizione breve (= 3h) alle varie concentrazioni di azadiractina (ad eccezione della concentrazione più alta testata), ma è significativamente *up*-regolata a quasi tutte le concentrazioni testate per 24 ore. Così come già osservato per la forma inducibile (*hsp70*), anche la forma costitutiva (*hsc70*) non sembra essere influenzata brevi brevi esposizioni al pesticida, ma è significativamente *up*-regolata ad ogni concentrazione testata dopo 24 ore.

Il gene *hsp40* dimostra di essere solo parzialmente attivato dalla presenza del pesticida, aumenti significativi del suo livello di espressione si sono osservati a 0,4 e 1 mg/l dopo 3 ore e a 0,2 e 0,4 mg/l dopo 24.

Il gene *hsp10* viene significativamente *up*-regolato dopo 3 ore alle più alte concentrazioni (> di 0,04 mg/l) di esposizione, ma dopo 24 ore di esposizione la trascrizione di questo gene aumenta in modo significativo a ciascuna delle concentrazioni testate. Contrariamente a quanto osservato nel caso del rame, *cyp450* non sembra essere coinvolto nei processi di risposta all'esposizione all'azadiractina: a nessuna concentrazione testata e a nessun tempo di esposizione (eccetto 0,2 mg/l per 24 h) il suo livello di espressione varia infatti in maniera significativa rispetto al controllo. In Figura 6.5 e 6.6 vengono riportati i grafici riassuntivi delle esposizioni ai due intervalli di tempo.

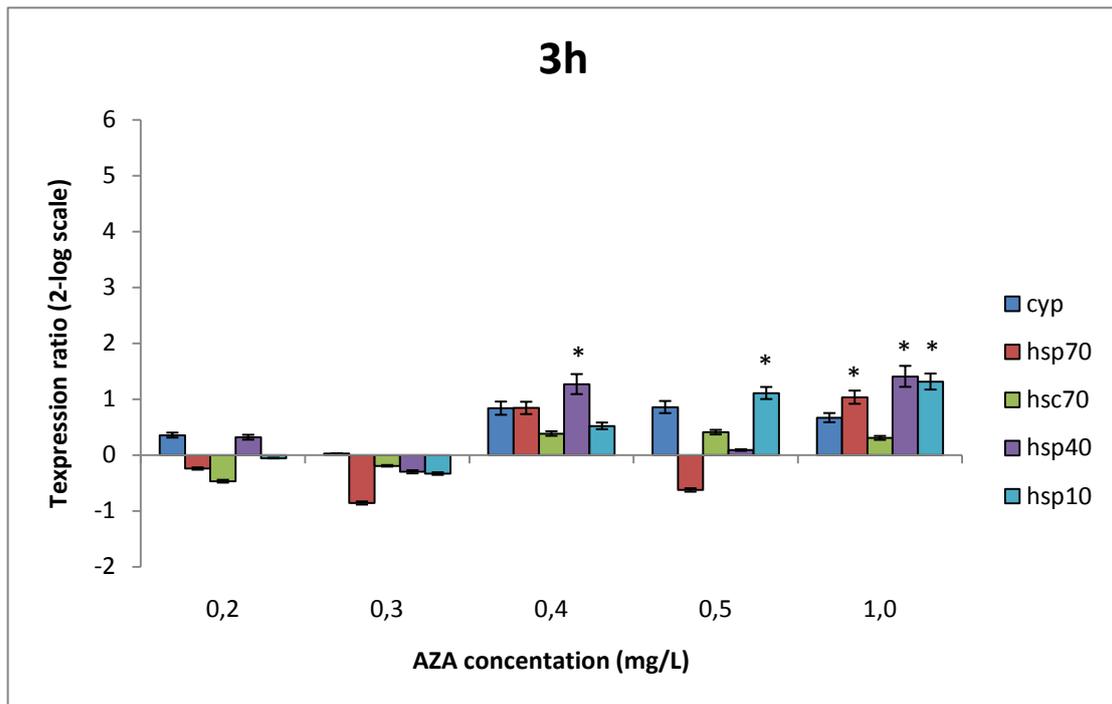


Figura 6.5. Livello di espressione di HSP70, HSC70, HSP40, HSP10 e CYP450 dell'esposizione all'azadiractina per 3 ore (mean \pm SE: * $p < 0.05$). Il livello di espressione nelle larve controllo è stato fissato pari a 0.

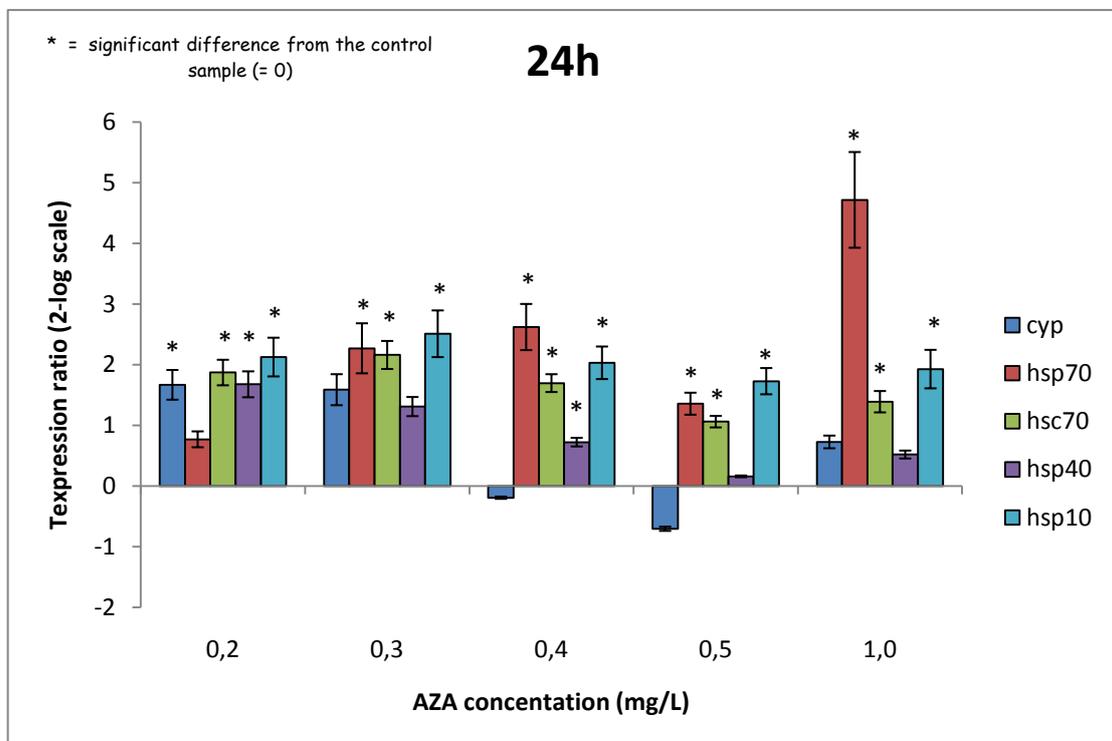


Figura 6.6. Livelli di espressione di HSP70, HSC70, HSP40, HSP10 e CYP450 dell'esposizione all'azadiractina per 24 ore (mean \pm SE: * $p < 0.05$). Il livello di espressione nelle larve controllo è stato fissato pari a 0.

6.4. DISCUSSIONE

Le larve di *Chironomus* spp., tra cui quelle di *C. riparius*, sono note per essere resistenti all'anossia e a sostanze tossiche organiche e inorganiche. Tra queste i metalli pesanti e pesticidi utilizzati in agricoltura, anche in quella biologica. Ci sono evidenze in letteratura che dimostrano come anche i prodotti il cui uso è consentito in agricoltura biologica sono fonte di stress per gli organismi acquatici *non target*, cioè quelli non dannosi per le coltivazioni (per. es. Scott, 1999; Lee *et al.*, 2006; Ki *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Park & Kwak, 2009). Tra le risposte osservate vi è l'aumento del livello di determinati enzimi come le monoossigenasi e di *stress proteins*, che intervengono per limitare e riparare i danni provocati dai tossici.

Il nostro studio mette in evidenza come proteine quali diverse famiglie di HSP e il complesso citocromo P450 sono coinvolti nello sviluppo della resistenza al rame (metallo pesante utilizzato nell'area di studio per trattamenti nei vigneti) e all'azadiractina (insetticida di origine naturale utilizzato nell'area di studio in agricoltura biologica nei meleti) in larve al IV stadio di *C. riparius*, la nostra specie modello.

Nelle larve esposte a quantità crescenti di rame è stata osservata una significativa *up*-regolazione dei livelli trascrizionali del *cyp450* ad ogni concentrazione testata dopo 3 ore di esposizione. Al contrario, dopo 24 ore di esposizione, il *cyp450* è risultato essere significativamente *down*-regolato a quasi tutte le concentrazioni. Un *trend* simile era già stato osservato da Ki e coautori (2009) nel copepode *Tigriopus japonicus* in cui la trascrizione di mRNA di un

grande numero di citocromi del sistema P450 era *up-* o *down-*regolato da trattamenti con Cu.

Per quel che riguarda l'espressione dei geni che codificano per le HSPs, soli geni che sembrano avere un ruolo nella protezione dagli stress causati da lunghe esposizioni al rame sono *hsc70* e *hsp70*.

Yoshimi e collaboratori (2009) hanno dimostrato che in *Chironomus yoshimatsui* Martin et Sublette, 1972, l'espressione delle *hsp70* non cambia dopo 1,5 ore di esposizione a 1,1 mg/l di rame, e aumenta significativamente solo dopo 4 ore, raggiungendo il suo massimo dopo 7 ore. In seguito decresce gradualmente, ma un livello ancora significativamente più alto rispetto al controllo è stato osservato dopo 24 ore. Anche dai nostri risultati emerge un *trend* simile, con un significativo incremento del livello di trascrizione delle *hsp70* nelle prime 3 ore, e un successivo calo dopo 24 ore di esposizione; dopo questo intervallo osserviamo un aumento dose-dipendente del livello di trascrizione del gene. La risposta di tipo dose-dipendente era già stata osservata precedentemente da Karouna-Renier & Ranga Rao (2009), che hanno trovato un aumento dell'espressione 35 volte maggiore rispetto al controllo a 0,5 mg/l di rame in larve del 3° stadio di *Chironomus dilutus* Shobanov, Kiknadze & Butler, 1999, ma in questo studio gli autori sottolineano anche una risposta dipendente dal tempo, con induzione crescente dopo intervalli progressivamente più lunghi di esposizione. Questi Autori osservano incrementi statisticamente significativi di espressione solo in campioni esposti al rame per 6 o più ore. Questo *trend* non è confermato da Yoshimi *et al.* (2009) per *C. yoshimatsui* e dal presente lavoro per *C. riparius*.

Per quel che riguarda l'espressione della forma costitutiva (*hsc70*), Yoshimi e collaboratori (2009) osservano un piccolo ma significativo incremento rispetto al controllo solo dopo 24 ore di esposizione a 1,1 mg/l di rame. Anche nel presente lavoro l'espressione di *hsc70* non sono influenzate dalle esposizioni a breve termine, a nessuna concentrazione, e risultano debolmente influenzate dopo 24 ore; in particolare le HSC70 sono lievemente *down*-regolate a 0,01 mg/l, ma incrementando le quantità di rame, viene aumentato anche il loro livello di trascrizione.

Contrariamente a quanto osservato per il rame, l'azadiractina sembra avere un effetto a lungo termine sugli organismi. Nessuno dei geni monitorati cambia il proprio livello di trascrizione dopo un'esposizione a breve termine a basse concentrazioni di questa sostanza, e solo a concentrazioni vicine alla LC₅₀ *hsp10*, *hsp40* e *hsp70* sono debolmente ma significativamente *up*-regolate.

Dopo 24 ore di esposizione, invece, molti dei geni appaiono *up*-regolati a quasi tutte le concentrazioni. Sorprendentemente il *cyp450* non sembra avere un ruolo nella risposta degli organismi a questo stress, essendo *up*-regolato solo alle concentrazioni più basse, nonostante sia citato per essere uno dei più importanti enzimi coinvolti nella difesa dell'organismo da pesticidi e tossine vegetali (Scott, 1999).

Le HSP70 e le HSP10, invece, giocano un ruolo importante nella difesa dell'organismo dagli stress causati dall'azadiractina. In particolare, mentre l'induzione di *hsp70* aumenta secondo un *trend* quasi perfettamente dose-dipendente, *hsp10* è *up*-regolato in modo indipendente dalla concentrazione. Anche la forma costitutiva, *hsc70*, è significativamente *up*-regolata dopo 24 ore di

esposizione. In verità le concentrazioni testate sono molto più alte di quelle normalmente presenti nell'ambiente, ma i nostri risultati indicano che questo insetticida ha piccoli ma significativi effetti anche sugli organismi *non-target*, e la valutazione degli effetti per periodi più lunghi di esposizione a concentrazioni inferiori potrebbe essere un importante obiettivo per ulteriori studi.

Inoltre, vista la asincronia con cui le due sostanze attivano la risposta allo stress, analisi della loro azione combinata potrebbe essere interessante per avere un'idea più completa degli impatti dell'agricoltura biologica sugli organismi acquatici *non-target*.

6.3. CONCLUSIONI

I risultati del presente lavoro dimostrano che l'esposizione di *Chironomus riparius* a rame e azadiractina determina significativi effetti tossici. La particolarità dei *pattern* genici osservati (per es. gli alti livelli di trascrizione del *cyp450* come conseguenza dell'esposizione al rame e gli alti livelli di trascrizione delle *hsp10* come conseguenza dell'esposizione all'azadiractina), ci consente di proporli come potenziali *biomarkers* per la valutazione della qualità di acque superficiali che ricevono reflui da agricoltura biologica.

7. CONCLUSIONI GENERALI

Lo scopo di questa tesi di dottorato era quello di studiare le comunità di macroinvertebrati bentonici nel loro complesso, per capire quali fattori ne influenzino la composizione, e attraverso lo studio di una specie modello, il *Chironomus riparius* Meigen 1804, comprendere come gli animali riescano a resistere agli stress di origine antropica.

Sulla base dei risultati ottenuti è stato possibile confermare l'ottima capacità di risposta dei macroinvertebrati alle diverse condizioni ambientali, e il loro ruolo di indicatori di qualità ambientale, in particolare dei Chironomidi, che colonizzano con specie diverse habitat caratterizzati da diverse condizioni ambientali. I risultati di questo lavoro mettono l'accento sul fatto che il grado di trofia di un lago è il vero discriminante nella selezione della comunità che nel lago risiede. Solo alcune specie adattate agli ambienti poveri di ossigeno sono in grado di sopravvivere in condizioni di forte eutrofia, e la tesi, attraverso lo studio del *Chironomus riparius* come organismo modello, ha messo in luce i meccanismi che stanno alla base di tale capacità di sopravvivenza: le larve di questa specie, infatti, sono in grado di mettere in atto meccanismi compensatori del metabolismo per mantenere le normali funzioni fisiologiche e biochimiche. Al contrario le larve non sembrano in grado di attuare efficaci meccanismi compensativi per far fronte allo stress da iperossigenazione, al quale non sono adattate, dal momento che entro il fango in cui vivono sperimentano con più frequenza condizioni di scarsità di ossigeno. Per queste ragioni la misura dell'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo anaerobio e dei pigmenti respiratori in *C. riparius* sono stati proposti come *biomarkers* per il monitoraggio della qualità dell'acqua nelle acque correnti.

Le attività antropiche hanno anche altre conseguenze sulle comunità bentoniche d'acqua dolce: i risultati del presente lavoro dimostrano che anche attività apparentemente poco impattanti quali l'agricoltura biologica, sono causa di stress negli animali bentonici, in quanto prevedono l'impiego di pesticidi (per e. azadiractina) e/o metalli pesanti (per es. rame).

In larve di *C. riparius* esposte a queste sostanze si è osservato l'aumento dei livelli di trascrizione di *cyp450* come conseguenza dell'esposizione al rame e *hsp10* come conseguenza dell'esposizione all'azadiractina. Le proteine prodotte sono alla base della resistenza a tali inquinanti in *C. riparius* che ha valori di LC₅₀ di 26,05 mg/l e 1,09 mg/l rispettivamente per il metallo e per il pesticida.

In conclusione, grazie a questo lavoro di tesi, è stato fornito un apporto alle conoscenze su autoecologia e fisiologia dei Chironomidi, Ditteri che vengono, e sempre più verranno utilizzati per il monitoraggio ambientale delle acque e nei test di tossicità in laboratorio, in un'ottica di ripristino e tutela delle acque interne.

Le ricerche condotte hanno portato seguenti presentazioni a convegni:

- **Valentina Grazioli & Bruno Rossaro.** I Chironomidi (Diptera Chironomidae) come indicatori di qualità ambientale: i laghi dell'Aveto. Atti del 70° convegno Unione Zoologica Italiana- Rapallo 21-24 settembre 2009- sez. poster.
- **Valentina Grazioli & Bruno Rossaro.** Il contenuto di emoglobina e di alcuni enzimi del metabolismo anaerobio in *Chironomus* (Diptera Chironomidae). Atti del 70° convegno Unione Zoologica Italiana- Rapallo 21-24 settembre 2009- sez. poster.

- Bruno Rossaro, Valeria Lencioni, Angela Boggero, **Valentina Grazioli**, Laura Marziali. DNA barcode in Chironomids classification. Atti del 70° convegno Unione Zoologica Italiana- Rapallo 21-24 settembre 2009- sez. poster.

E alla stesura dei seguenti articoli:

- **Valentina Grazioli**, Bruno Rossaro, Paolo Parenti, Roberto Giacchini & Valeria Lencioni. Hypoxia and anoxia effects on alcohol dehydrogenase and hemoglobin concentration in *Chironomus riparius* Meigen, 1804. (in prep.)
- **Valentina Grazioli**, Paola Bernabò, Bruno Rossaro, Olivier Jousson & Valeria Lencioni. Induction of *hsp70*, *hsc70*, *hsp10*, *hsp40* and *cyp450* in *Chironomus riparius* larvae exposed to copper and azadiractina (neem). (in prep.)

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 1

- Brinkhurst, R. O., 1974. The benthos of lakes. St Martins Press, New York.
- Brundin, L., 1949. Chironomiden und andere Bodentiere der südschwedischen Urgebirgseen. Ein Beitrag zur Kenntnis der bodenfaunistischen Charakterzüge schwedischer oligotropher Seen. Report of the Institute of Freshwater Research Drottningholm. 30: 1-915.
- Carvalho, L., Bennion, H., Darwell, A., Gunn, I., Lyle, A., Monteith, D. & Wade, M., 2002. Physicochemical Conditions for Supporting Different Levels of Biological Quality for the Water Framework Directive for Freshwaters. Report to the Environment Agency, UK.
- Choi, J., 2004. Biomarkers in environmental monitoring and its application in *Chironomus* spp. In Sun-Kee Hong, John A. Lee, Byung-Sun Ihm, Almo Farina, Yowhan Son, Eun-Shik Kim and Jae Chun Choe (Eds), *Ecological Issues in a Changing World - Status, Response and Strategy*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, PART II, 203-215.
- Ingersoll, C.G. & Nelson, M.K., 1990. Testing sediment toxicity with *Hyalella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera), in: Landis, W.G., van der Schalie W.H. (Eds.), *Aquatic toxicology and risk assessment: thirteenth volume*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 93– 109.

- Sæther, O. A., 1979. Chironomid communities as water quality indicators. *Holarctic. Ecology*, 2: 65–74.
- Solimini, A.G., Free, G., Donohue, I., Irvine, K., Pusch, M., Rossaro, B., Sandin, L. & Cardoso, A.C., 2006. Using benthic invertebrates to assess ecological status of lakes. Current knowledge and way forward to support WFD implementation. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability.
- Stoffels, R.J., Clarke, K.R. & Closs, G.P., 2005. Spatial scale and benthic community organisation in the littoral zones of large oligotrophic lakes: potential for cross-scale interactions. *Freshwater Biology*, 50: pp. 1131-1145.

CAPITOLO 3

- Binelli, A., Bacchetta, R., Mantecca, P., Ricciardi, F., Provini, A. & Vailati, G., 2004. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. *Aquatic Toxicology*. 69: 175-188.
- Brundin, L., 1949. Chironomiden und andere Bodentiere der südschwedischen Urgebirgseen. Ein Beitrag zur Kenntnis der bodenfaunistischen Charakterzüge schwedischer oligotropher Seen. Report of the Institute of Freshwater Research Drottningholm. 30: 1-915.
- Campaioli S., Ghetti, P.F., Minelli, A. & Ruffo, S., 1994. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane, Vol. I. Provincia Autonoma di Trento, 357 pp.

- Corbella, C., Della Croce, N. & Ravera, O., 1956. Plancton, benthos e chimismo delle acque e dei sedimenti in un lago profondo (Lago Maggiore). Mem. Ist. ital. Idrobiol., 9: 125-262.
- Dinsmore, W.P. & Prepas E.E., 1997. Impact of hypolimnetic oxygenation on profundal macroinvertebrates in a eutrophic lake in central Alberta. I. Changes in macroinvertebrate abundance and density. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 54:2157-2169.
- Feld, C.K. & Hering, D., 2007. Community structure or function: effects of environmental stress on benthic macroinvertebrates at different spatial scales. Freshwater Biology. 52: 1380–1399.
- Füreder, L., Ettinger R., Boggero, A., Thaler, B., & Thies, H., 2006. Macroinvertebrate diversity in Alpine lakes: effects of altitude and catchment properties. Hydrobiologia. 562: 123–144.
- Giussani, G., De Bernardi, R., Mosello, R., Origgi, I. & Ruffoni, T., 1986. Indagine Limnologica su i laghi alpini d'alta quota. Documenta dell'Istituto Italiano di Idrobiologia. 9: 1-415.
- Lang C., & Lods-Crozet, B., 1997. Oligochaetes versus chironomids as indicators of trophic state in two Swiss lakes recovering from eutrophication. Arch. Hydrobiol. 139: 187–195.
- Lencioni V., Marziali L. & Rossaro B., 2007. Assessment of the ecological status of lakes by macroinvertebrates: a case study. Atti del XVI Congresso della Società Italiana di Ecologia "Cambiamenti Globali,

Diversità Ecologica e Sostenibilità", Viterbo-Civitavecchia, 19-22 settembre 2006, <http://www.ecologia.it/congressi/XVI/articles/>, articolo n. 125, 6 pp.

- Marziali, L., Lencioni, V., Parenti, P. & Rossaro, B., 2008. Benthic macroinvertebrates as quality indicators in Italian lakes. *Bol. Mus. Mun. Funchal. sup.* 13: 51-59.
- Mastrantuono, L. & Mancinelli, T., 2005. Littoral invertebrates associated with aquatic plants and bioassessment of ecological status in Lake Bracciano (Central Italy). *Journal of Limnology.* 64(1): 43-53.
- Moss, B., Stephen, D., Alvarez, C., Becares, E., Van De Bund, W., Collings, S.E., Van Donk, E., De Eyto, E., Feldmann, T., Fernández-Aláez, C., Fernández-Aláez, M., Franken, R.J.M., García-Criado, F., Gross, E.M., Gyllström, M., Hansson, L.A., Irvine, K., Järvalt, A., Jensen, J.P., Jeppesen, E., Kairesalo, T., Kornijów, R., Krause, T., Künnap, H., Laas, A., Lill, E., Lorens, B., Luup, H., Miracle, M.R., Nõges, P., Nõges, T., Nykänen, M., Ott, I., Peczuła, W., Peeters, E.T.H.M., Phillips, G., Romo, S., Russell, V., Salujõe, J., Scheffer, M., Siewertsen, K., Smal, H., Tesch, C., Timm, H., Tuvikene, L., Tonno, I., Virro, T., Vicente, E. & Wilson, D., 2003. The determination of ecological status in shallow lakes- a tested system (ECOFRAME) for implementation of the European Water Framework Directive.- *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems.* 13: 507-549.

- Nocentini, A.M., 1979: Variazioni temporali e spaziali della fauna macrobentonica litorale del Lago di Mergozzo. - Mem. Ist. ital. Idrobiol. **37**: 277-327.
- Nocentini, A.M., 1985: Chironomidi,4 (Diptera: Chironomidae: Chironominae, larve). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, vol. 29. Consiglio Nazionale delle Ricerche.
- Nocentini, A.M. 1989: Researches on the zoobenthos. - Mem. Ist. ital. Idrobiol. 46: 173 -196.
- Ossevatorio dei Laghi Lombardi, 2005. Qualità delle acque lacustri in Lombardia 1° Rapporto OLL 2004. Regione Lombardia, ARPA Lombardia, Fondazione Lombardia per l'Ambiente e IRSA/CNR.
- O'Toole, C., Donohue, I., Moe, S.J. & Irvine, K., 2008. Nutrient optima and tolerances of benthic invertebrates, the effects of taxonomic resolution and testing of selected metrics in lakes using an extensive European data base.- Aquatic Ecology. 42: 277–291.
- Peeters, E.T., Dewitte, A., Koelmans, A. A., van der Velden, J. A. & den Besten, P. J., 2001. Evaluation of bioassays versus contaminant concentrations in explaining the macroinvertebrate community structure in the Rhine-Meuse delta, the Netherlands. Environmental Toxicology and Chemistry, 20(12), 2883-2891.
- Rosenberg, D.M. & Resh V.H. (Eds), 1993. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. Chapman & Hall, New York: 488 pp.

- Rossaro, B., Lencioni, V. & Casalegno, C., 2001. Relazioni tra specie di Ditteri Chironomidi e fattori ambientali esaminate con un data base relazionale. Atti Congresso Gadio 5–7 maggio 2001. - Studi trentini di Scienze naturali Acta Biologica. **78**: 201–206.
- Rossaro, B., Cardoso, A.C., Solimini, A., Free, G., Marziali, L. & Giacchini, R., 2007: A biotic index using benthic macroinvertebrates for Italian lakes. - Ecol. Indicators. 7: 412-429.
- Sæther, O. A., 1979. Chironomid communities as water quality indicators. Holarctic Ecology, 2: 65–74.
- Schäfer, R. B., Caquet, T., Siimes, K., Mueller, R., Lagadic, L. & Liess, M., 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. Science of the total environment, 382 (2-3), 272-285.
- SNIFFER. 2007. Macroinvertebrate classification diagnostic tool development. Project WFD60. Available at <http://www.sniffer.org.uk/>.
- Solimini, A.G., Free, G., Donohue, I., Irvine, K., Pusch, M., Rossaro, B., Sandin, L. & Cardoso, A.C., 2006. Using benthic invertebrates to assess ecological status of lakes. Current knowledge and way forward to support WFD implementation. European Commission Joint Research Centre Institute for Environment and Sustainability. Report EUR 22347 EN, Ispra.
- Tarmo T., 1999: A Guide to Estonian Annelida. Estonian Academy Publishers, 207 pp.

- Tartari, G., Buraschi, E., Legnani, E., Previtali, L., Pagnotta, R. & Marchetto, A., 2006: Tipizzazione dei laghi italiani secondo il Sistema B della Direttiva 2000/60/CE. CNR IRSA ISE: 1-14.

CAPITOLO 4

- Armitage, P., Cranston, P.S. & Pinder, L.C.V. (Eds.), 1995. Chironomidae: Biology and Ecology of Non-biting Midges, Chapman and Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Ashe, P., Murray D.A. & Reiss, F., 1987. The zoogeographical distribution of Chironomidae (Insecta: Diptera). *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 23, 27-60.
- Butler M.G., 1982. Production dynamics of some arctic *Chironomus* larvae. *Limnology and Oceanography*, 27(4), pp728-736.
- Choi, J., 2004. Biomarkers in environmental monitoring and its application in *Chironomus* spp., in: Hong, S-K., Lee, J.L., Ihm, B-S., Farina, A., Son, Y., Kim E-S. & Choe, J.C., (Eds), *Ecological Issues in a Changing World - Status, Response and Strategy*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, PART II, pp. 203-215.
- Choi, J. & Roche, H., 2004. Effect of potassium dichromate and fenitrothion on hemoglobins of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarker of environmental monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment*, 92, 229–239.

- Credland, P.F., 1973. A new method for establishing a permanent laboratory culture of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae). *Freshwater Biology*, 3, pp.45-51.
- Ferrarese, U. & Rossaro, B., 1981. Chironomidi, 1 (Diptera, Chironomidae: Generalità, Diamesinae, Prodiamesinae). In: S. Ruffo (ed.), *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*, CNR AQ/1/129 (vol. 12, pp. 1-96). Verona. Italia.
- Frank, C., 1983. Ecology, production and anaerobic metabolism of *Chironomus plumosus* L. larvae in a shallow lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 96(3), 354-362.
- Hamburger, K., Lindegaard, C. & Dall, P.C., 1994. Energy metabolism of *Chironomus anthracinus* (Chironomidae, Diptera) from the profundal zone of Lake Esrom, Denmark, as a function of body size, temperature and oxygen concentration. *Hydrobiologia*, 294, 43-50.
- Ingersoll, C.G. & Nelson, M.K., 1990. Testing sediment toxicity with *Hyalella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera), in: Landis, W.G., van der Schalie W.H. (Eds.), *Aquatic toxicology and risk assessment: thirteenth volume*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 93– 109.
- Jónasson, P.M., 1978. Edgardo Baldi memorial lecture, Zoobenthos of lakes. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, 20, 13–37.

- Lencioni, V., 2004. Survival strategy of freshwater insects in cold environments. *Journal of limnology*, 63 (suppl. 1), pp 45-55.
- Lencioni, V., Marziali, L., & Rossaro, B., 2007. I ditteri chironomidi: morfologia, tassonomia, ecologia, fisiologia e zoogeografia. (vol. 1, pp. 1-175). Quaderni del Museo Tridentino di Scienze Naturali.
- Nocentini, A., 1985. Chironomidi 4 (Diptera: Chironomidae: Chironominae, larve). In: S. Ruffo (ed.), *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*, CNR AQ/1/129 (vol. 29, pp. 1-186). Verona. Italia.
- Rosenberg, D.M., 2005. Freshwater biomonitoring and Chironomidae. *Aquatic Ecology*, 26, 101-122.
- Sæther, O.A., 1979. Chironomid communities as water quality indicators. *Holarctic Ecology*, 2, 65-74.
- Tokeshi M., 1986. Resource utilisation, overlap and temporal community dynamics: a null model analysis of an epiphytic chironomids community. *Journal of Animal Ecology*, 55, pp491-506.
- Tokeshi M., 1995. Life cycles and population dynamics. In: Armitage, P., Cranston, P.S. & Pinder L.C.V. (eds), *the Chironomidae. The biology and ecology of non-biting midges*. Chapman & Hall, London, pp.225-268.
- Wiederholm, T., 1980 - Use of benthos in lake monitoring. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 52, 537-547.

CAPITOLO 5

- Bergtrom, G., Laufer, H., & Rogers, R., 1976. Fat body: a site of hemoglobin synthesis in *Chironomus thummi* (diptera). The Journal Cell Biology, 69, 264–274.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72, 248-254.
- Brodersen, K.P., Pedersen, O., Walker, I.R., & Jensen, M.T., 2008. Respiration on midges (Diptera: Chironomidae) in British Columbian lakes: oxy-regulation, temperature and their role as paleo-indicators. Freshwater Biology 53, pp. 593-602.
- Braun, V., Crichton R. R. & Braunitzer G., 1968. Über monomere und dimere Insektenhamoglobine aus *Chironomus thummi*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349:197-210.
- Brundin, L., 1949: Chironomiden und andere Bodentiere der südschwedischen Urgebirgseen. Ein Beitrag zur Kenntnis der bodenfaunistischen Charakterzüge schwedischer oligotropher Seen. - Report of the Institute of Freshwater Research Drottningholm. 30: 1-915.
- Choi, J. & Roche, H., 2004. Effect of potassium dichromate and fenitrothion on hemoglobins of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarker of environmental.

- Choi, J., Roche, H. & Caquet, T., 2000. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(2) 495–500.
- Choi, J., Roche, H., & Caquet, T., 2001. Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130C, 11-17.
- English, D.S., 1969. Ontogenetic changes in hemoglobin synthesis of two strains of *Chironomus tentans*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 22:465-476.
- Forcella, M, Berra, E, Giacchini, R, Hanozet, G.M., & Parenti. P. 2004. Changes in leucine transport activity in *Chironomus riparius* larvae after short-term exposure to potassium dichromate and fenitrothion. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 55, 90–10.
- Forcella, M., Berra, E., Giacchini, R., & Parenti, P., 2007. Antioxidant Defenses Preserve Membrane Transport Activity in *Chironomus riparius* Larvae Exposed to Anoxia. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 65, 181–194.
- Franchi, E.S., 2004. Utilizzo di enzimi e metaboliti come biomarcatori di esposizione ad agenti inquinanti legati alla sopravvivenza di macroinvertebrati d'acqua dolce. Tesi di laurea, Università di Milano – Bicocca (Italy), 119 pp.

- Frank, C., 1983. Ecology, production and anaerobic metabolism of *Chironomus plumosus* L. larvae in a shallow lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 96(3), 354-362.
- Goulielmos G.N., Cosmidis N., Loukas M., Tsakas S., & Zouros, E., 2001. Characterization of Two Alcohol Dehydrogenase (Adh) Loci from the Olive Fruit Fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* and Implications for Adh Duplication in Dipteran Insects. *Journal of Molecular Evolution* 52:29–39.
- Hamburger, K., & Dall, P.C., 1990. The respiration of common benthic invertebrate species from the shallow littoral zone of Lake Esrom, Denmark. *Hydrobiologia*, 199, 117-130.
- Hamburger, K., Lindegaard, C., & Dall, P.C., 1994. Energy metabolism of *Chironomus anthracinus* (Chironomidae, Diptera) from the profundal zone of Lake Esrom, Denmark, as a function of body size, temperature and oxygen concentration. *Hydrobiologia*, 294, 43-50.
- Hanozet, G.M., Simonetta, M., & Gerola, G., 1976. Activation of rat liver alcohol dehydrogenase by deoxycholic acid. *FEBS letters*, 65(1), 120-122.
- Hermes-Lima, M., & Zenteno-Savin, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133C, 537–556.
- Int Panis, L., Goddeeris, B., & Verheyen, R., 1995. The hemoglobine concentration of *Chironomus cf. plumosus* L. (Diptera: Chironomidae)

larvae from two lentic habitats. Netherland Journal of Acquatic ecology, 29(1), 1-4.

- Jónasson, P.M., 1978. Edgardo Baldi memorial lecture, Zoobenthos of lakes. Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie, 20, 13–37.
- Lampert, W., 1984. The measurement of respiration. In: Downing, J.A., & Rigler, F.H. (Eds), A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters, vol. 17. Blackweel Scientific Publications, Oxford, pp. 413-468.
- Layne, E., 1957 in: Colowick, S., & Kaplan, N.O. (Eds), Methods in Enzymology, vol 3, Academic Press, New York, p 447-454.
- Lee S-E., Yoo D-H., Son J. & Cho K., 2006. Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae. Proteomics 6(3), 945-957.
- Manwell, C., 1966. Starch gel electrophoresis of the multiple haemoglobins of small and large larval *Chironomus*-a developmental haemoglobin sequence in an invertebrate. J. Embryol. Exp. Morphol. 16:259-270.
- Marsh, A.G., & Manahan, D.T., 1999. A method for accurate measurements of the respiration rates of marine invertebrate embryos and larvae. Marine Ecology Progress Series, 184, 1-10.

- Nagell, B., & Landahl C.C., 1978. Resistance to anoxia of *Chironomus plumosus* and *Chironomus anthracinus* (Diptera) larvae. *Ecography* 1(4), 333-336.
- Osmulski, P.A. & Leyko, W., 1986. Structure, function and physiological role of *Chironomus* haemoglobin, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85B, 701-722.
- Park, K., & Kwak, I-S., 2009. Alcohol dehydrogenase gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150, 361–367.
- Redecker, B., & Zebe, E., 1988. Anaerobic metabolism in aquatic insect larvae: studies on *Chironomus thummi* and *Culex pipiens*. *Journal of Comparative Physiology B*, 158, 307-315.
- Rossaro B., Solimini A., Lencioni V., Marziali L., Giacchini R. & Parenti P., 2007. The relationship between body size, pupal thoracic horn development and dissolved oxygen in Chironomini (Diptera: Chironomida). *Fundamental and applied limnology* 169/4, 331-339.
- Sæther, O.A., 1979: Chironomid communities as water quality indicators. *Holarctic Ecology*, 2: 65–74.
- Scholz, F., & Zerbst-Boroffka, I., 1998. Environmental hypoxia affects osmotic and ionic regulation in freshwater midge-larvae. *Journal of Insect Physiology*, 44, 427-436.

- Solimini. A.G., Free, G., Donohue, I., Irvine, K., Pusch, M., Rossaro, B., Sandin, L. & Cardoso, A.C., 2006. Using benthic invertebrates to assess ecological status of lakes. Current knowledge and way forward to support WFD implementation. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability.
- StatSoft Inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Svedberg, T., & Eriksson-Quensel B., 1934. The molecular weight of erythrocrucorin. J. Am. Chem. Soc. 56:1700-1706.
- Tentori, L., & Salvati, A., 1981. Hemoglobinometry in Human blood, in: Antonini, E., Rossi-Bernardi, L., Chiancone, E. (Eds), Methods in Enzimology, vol. 76, Hemoglobins. Academic Press, pp 707-715.
- Thompson, P.E., Bleecker W., & English D.S., 1968. Molecular size and subunit structure of the hemoglobins of *Chironomus tentans*. J. Biol. Chem. 243:463-467.
- Tichy, H. 1968. Hemoglobins of *Chironomus tentans* and *pallidivittatus*. Biochemical and cytological studies. 4 Wiss. Konf. Ges. Dtscher Naturforsch. u. Arzte, Springer-Verlag, Berlin 248-252.
- Walshe, B., 1951. Haemoglobin and filter feeding, *Chironomus* (Diptera). Journal of Experimental Biology, 28, 57-61.
- Weber, R.E., Braunitzer, G., & Kleinschmidt, T., 1985. Functional multiplicity and structural correlations in the Hemoglobin system of larvae

of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera): Hemoglobin components CTT I, CTT II beta, CTT III, CTT IV, CTT VI, CTT VIIB, CTT IX and CTT X. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 80B, 747–753.

- Weber, R.E. & Vinogradov, S.N., 2001. Non-vertebrate hemoglobins: Function and molecular adaptation. *Physiological Review* 81, 569-628.
- Wilps, H., & Schöttler, U., 1980. In vitro-studies on the anaerobic formation of ethanol by the larvae of *Chironomus thummi thummi* (Diptera). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 67B (2), 239-242.
- Winkler, L.W., 1888. Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 21, pp2843-2855.
- Wyatt Hoback, W., & Stanley, D.W., 2001. Insects in hypoxia. *Journal of Insects Physiology*, 47, 533-542.
- Zebe, E., 1991. In vivo studies on the function of hemoglobin in the larvae of *Chironomus thummi* (insect, diptera). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99(4), 525-529.

CAPITOLO 6

- Barnett, T., Altschuler, M., McDaniel, C.N. & Mascarenhas, J. P., 1979. Heat shock induced proteins in plant cells. *Developmental Genetics*, 1, 331-340.

- Bergé J-B., Feyereisen, R. & Amichot, M., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353, pp. 1701-1705
- Coon, M.J., Vaz, A.D. & Bestervelt, L.L., 1996. Peroxidative reactions of diversozymes. *FASEBJ.* 10, 428^434.
- Dunkel, F.V. & Richards, D.C., 1998. Effect of an Azadirachtin formulation on Six Nontarget Aquatic Macroinvertebrates. *Environmental Entomology* 27(3), 667-674
- Feder, M.E. & Hofmann, G.E., 1999. Heat-Shock Proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.
- Finney, D.J., 1989. *Probit Analysis*, third ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gould, F., 1984. Mixed function oxidases and herbivore polyphagy: the devil's advocate position. *Ecol. Entomol.*, 9, pp. 29-34.
- Gupta, R.S. & Golding, G. B., 1993. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 37, 573-582.
- Janssens De Bisthoven, L., Nuyts, P., Goddeeris, B., & Ollever, F., 1992. Sublethal parameters in morphologically deformed *Chironomus* larvae: clues to understanding their bioindicator value. *Freshwater Biology* 39, pp. 179–191.

- Janssens De Bisthoven, L., Vermeulen, A., & Ollever, F., 1998. Experimental Induction of Morphological Deformities in *Chironomus riparius* Larvae by Chronic Exposure to Copper and Lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, pp. 249–256.
- Jin-Clark, Y., Anderson, T.D., & Zhu, K.Y., 2008. Effect of alachlor and metolachlor on toxicity of chlorpyrifos and major detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, pp. 645–652.
- Karouna-Renier, N.K., & Ranga Rao, K., 2009. An inducible HSP70 gene from the midge *Chironomus dilutus*: characterization and transcription profile under environmental stress. *Insect Molecular Biology* 18(1), pp. 87–96.
- Kelley, P.M. & Schlesinger, M.J., 1978. The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell*, 15, 1277-1286.
- Ki J-S., Raisuddin S., Lee K-W., Hwang D-S., Han J., Rhee J-S., Kim I-C., Park H.G., Ryu J-C. & Lee J-S., 2009. Gene expression profiling of copper-induced responses in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* using a 6K oligochip microarray. *Aquatic Toxicology*, 93, pp. 177–187.
- Kreuzweiser, D.,P., 1997. Nontarget Effects of Neem-Based Insecticides on Aquatic Invertebrates. *Ecotoxicology and environmental safety* 36, 109-117.

- Kreutzweiser, D.P., Capell, S.S., & Scarr, T.A., 1999. Acute Lethal and Sublethal Effects of a Neem-Based Insecticide on Nontarget Aquatic Insects in Stream Channels. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, pp. 365-371.
- Kuflik, T., Prodorutti, D., Frizzi, A., Gafni, Y., Simon, S. & Pertot, I., 2009. Optimization of copper treatments in organic viticulture by using a web-based decision support system. *Computers and Electronics in Agriculture* 68, pp. 36–43.
- Lee S-E., Yoo D-H., Son J. & Cho K., 2006. Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae. *Proteomics* 6(3), 945-957.
- Lee S-M., Lee S-B., Park C-H. & Choi J., 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65, pp. 1074–1081.
- Lemeux, P.G., Herendeen, S.L., Bloch, P.L. & Neidhardt, F.C., 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell*, 13, 427-434.
- Londoño, D.K., Siegfried, B.D., & Lydy, M.J., 2004. Atrazine induction of a family 4 cytochrome P450 gene in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Chemosphere* 56, pp. 701–706.

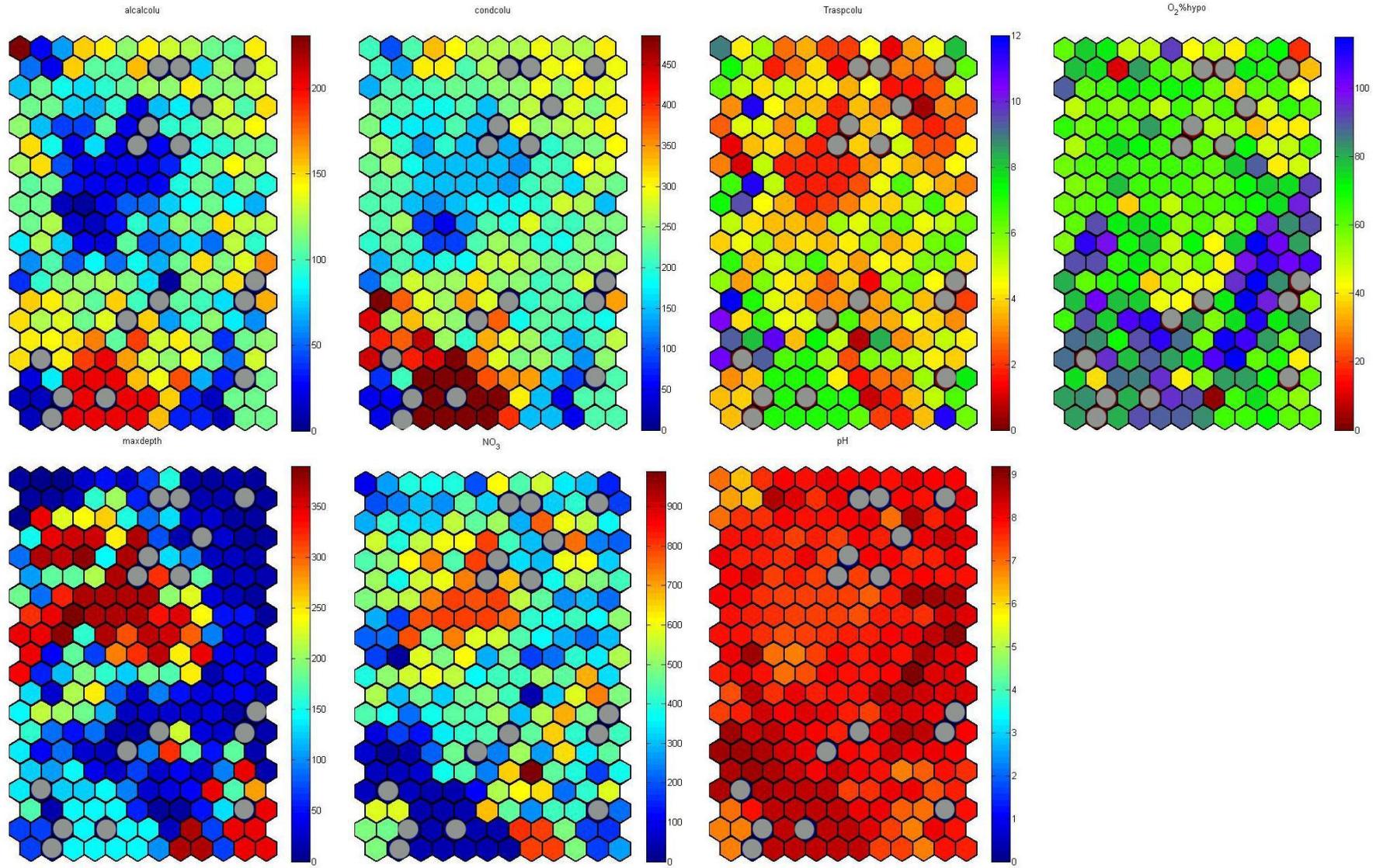
- Martínez-Guitarte, J. L., Planelló, R. & Morcillo, G., 2007. Characterization and expression during development and under environmental stress of the genes encoding ribosomal proteins L11 and L13 in *Chironomus riparius*. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 147, 590-596.
- McAlister, L. & Finkelstein, D.B., 1980. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 93, 819-824.
- Michailova, P., Petrova, N., Ilkova, J., Bovero, S., Brunetti, S., White, K. & Sella, G., 2006. Genotoxic effect of copper on salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae). *Environmental Pollution* 144, pp. 647-654.
- Morimoto, R.I., Tissières, A. & Georgopoulos, C., 1994. Progress and perspectives in the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. In: R. I. Morimoto, A. Tissières & C. Georgopoulos (eds.), *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (pp. 1-30). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mordue, A.J., & Nisbet A.J., 2000. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its action against Insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29(4), 615-632.
- Omura, T. & Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378.

- Park, K. & Kwak, I-S., 2009. Alcohol dehydrogenase gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150, 361–367
- Park, K., Bang H.W., Park, J. & Kwak I-S., 2009. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere* 77, pp. 359–367.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. 30, No. 9.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte J.L. & Morcillo G., 2010. Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment* 408, pp. 1598–1603.
- Quinn, J., Steele, G., Hickey, C. & Vickers, M., 1994. Upper thermal tolerances of twelve New Zealand stream invertebrate species. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 28, 391-397.

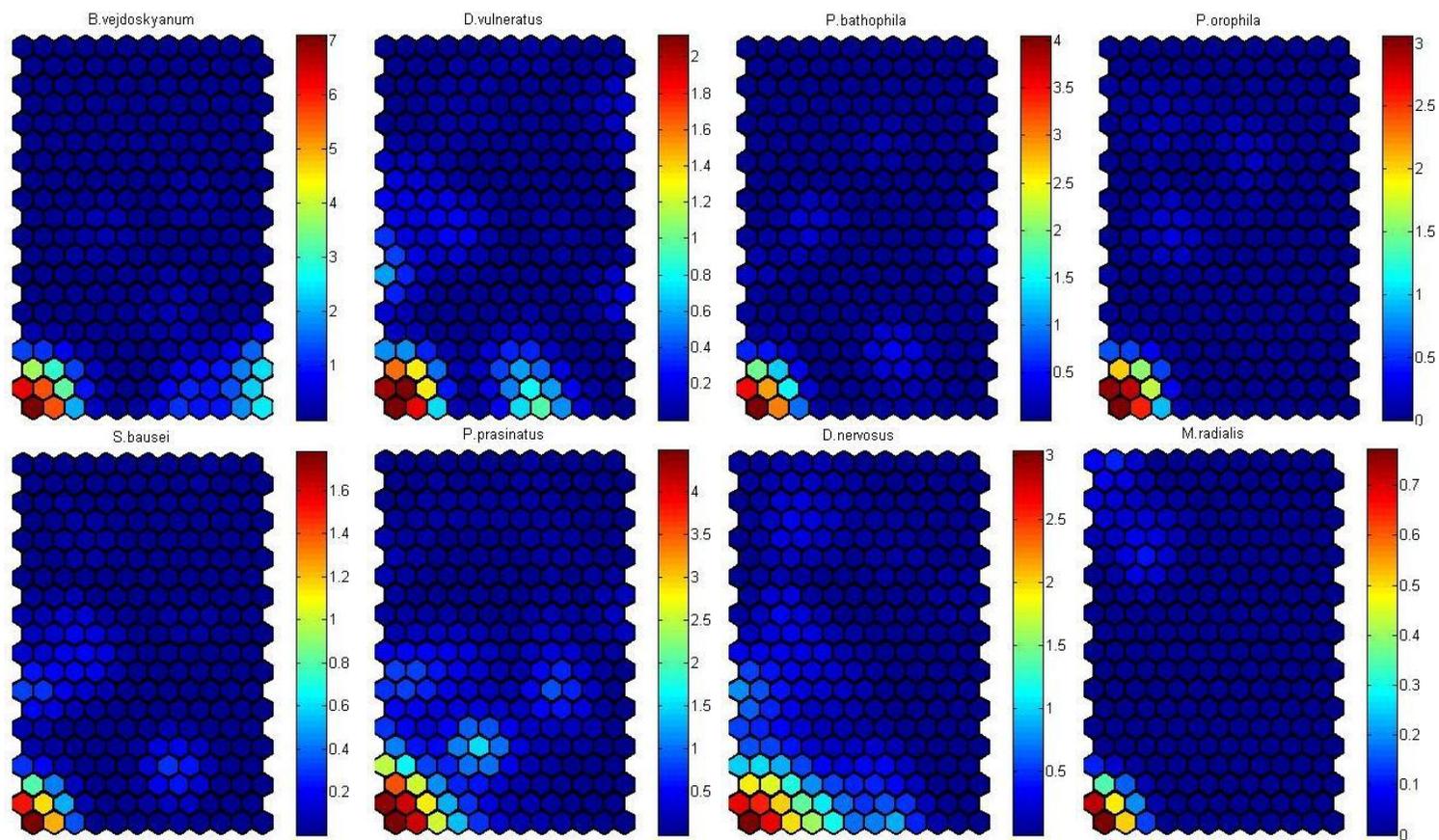
- Rakotondravelo, M.L., Anderson, T.D., Charlton, R.E. & Zhu, K.Y., 2006. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 360–366.
- Ritossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 18, 571-573.
- Scott, I.M. & Kaushik, N.K., 1998. The Toxicity of Margosan-O, a Product of Neem Seeds, to Selected Target and Nontarget Aquatic Invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 426–431.
- Scott J.G., 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, pp. 757–777.
- Servia, M.J., Pery, A.R.R., Heydorff, M., Garric, J., & Lagadic, L., 2006. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology*, 15, pp. 229–240.
- Thompson, P.E., Bleecker W. & English D.S., 1968. Molecular size and subunit structure of the hemoglobins of *Chironomus tentans*. *J. Biol. Chem.* 243:463-467.
- Tissières, A., Mitchell, H.K. & Tracy, U.M., 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, 84, 389-392.

- US EPA. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants using freshwater invertebrates. Washington, DC, Office of Research and Development, 1994.
- Yoshimi, T., Minowa, K., Karouna-Renier, N.K., Watanabe, C., Sugaya, Y. & Miura, T., 2002. Activation of a Stress-Induced Gene by Insecticides in the Midge, *Chironomus yoshimatsui*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16 (1), pp. 10-17.

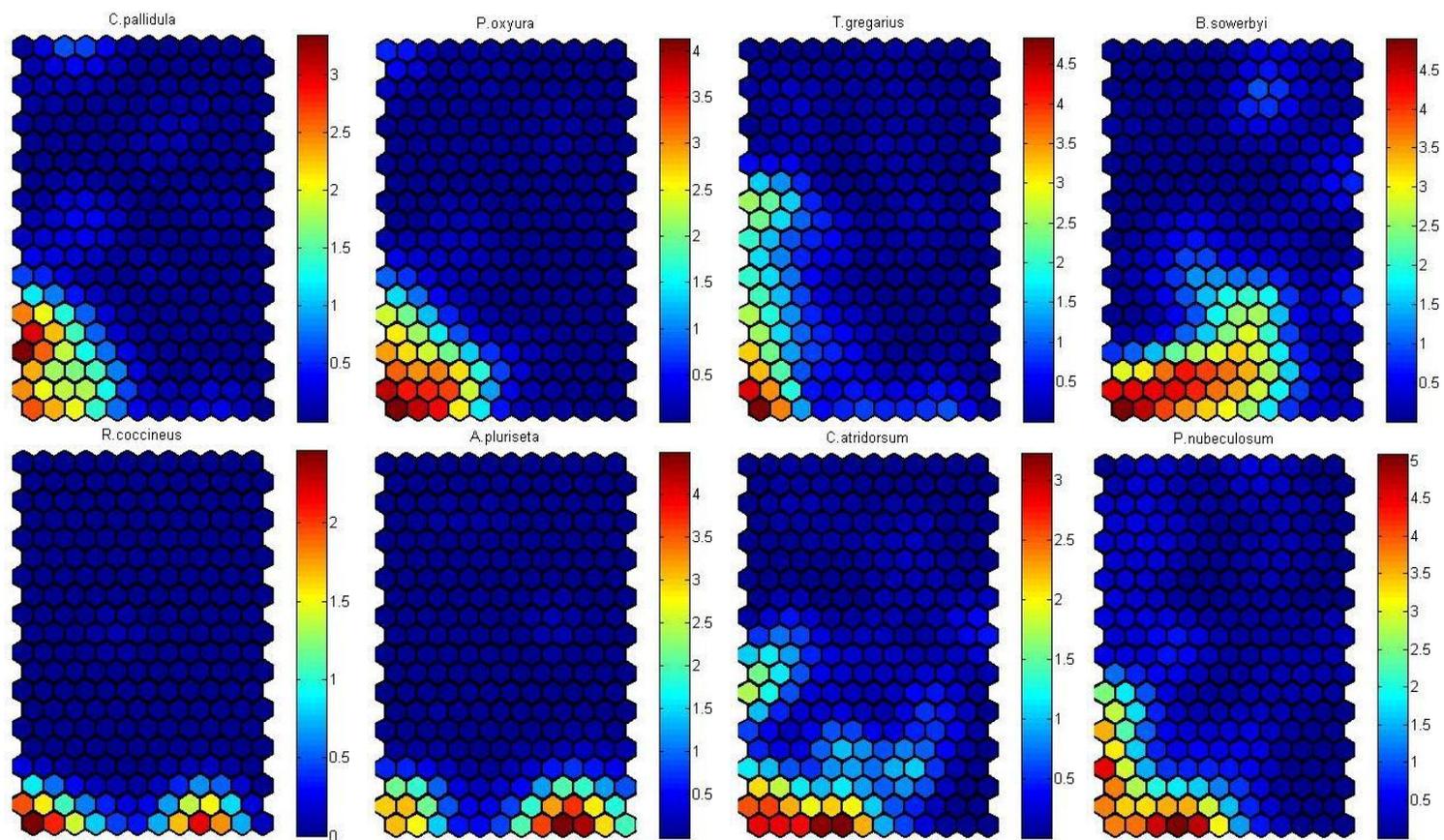
ALLEGATO 1



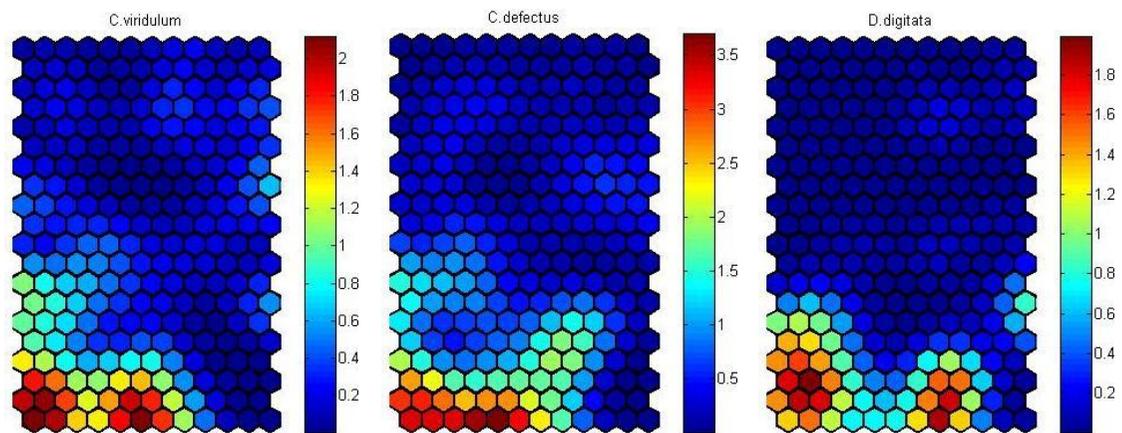
ALLEGATO 1



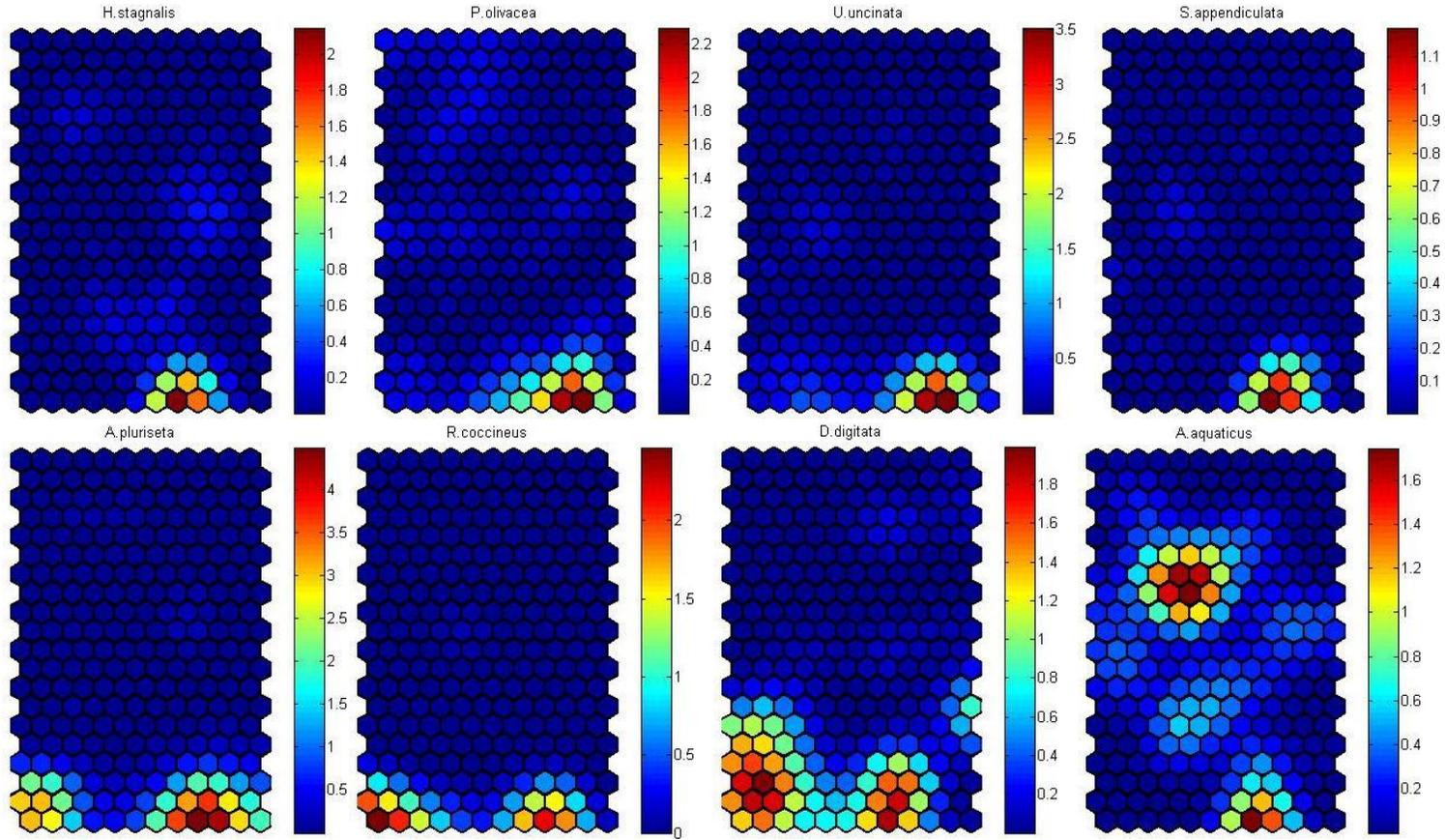
ALLEGATO 1



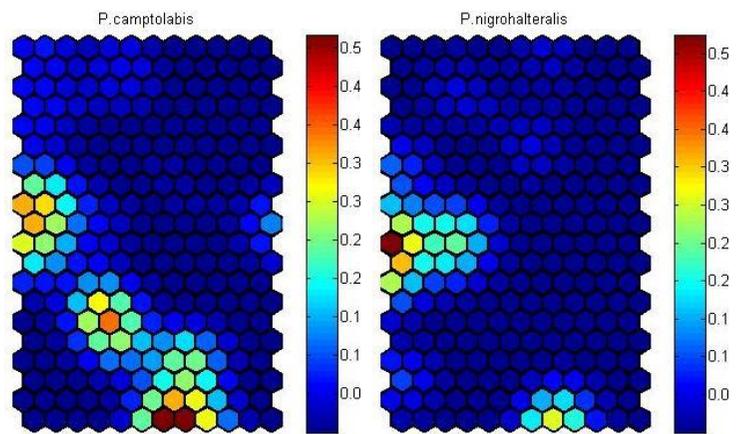
ALLEGATO 1



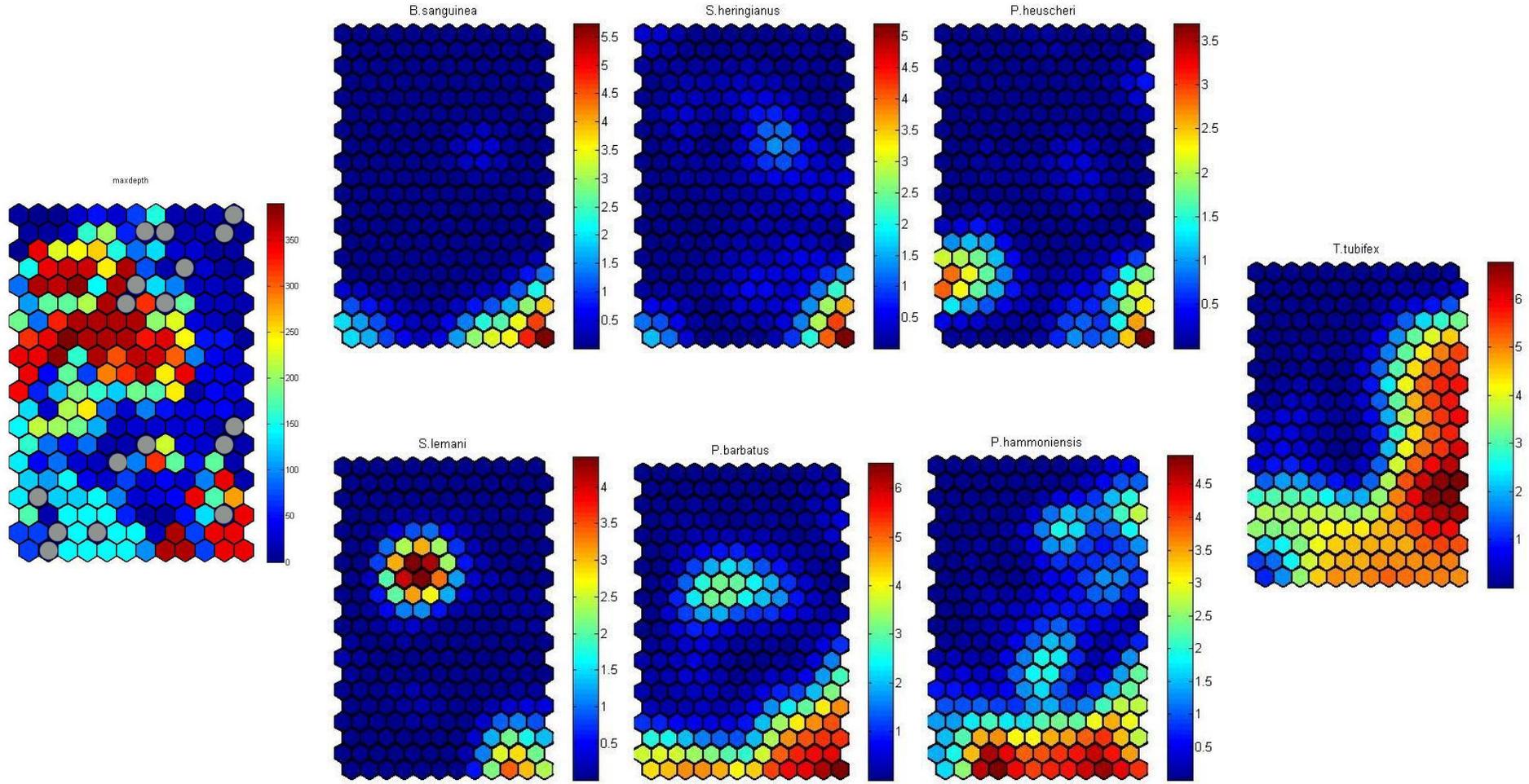
ALLEGATO 2



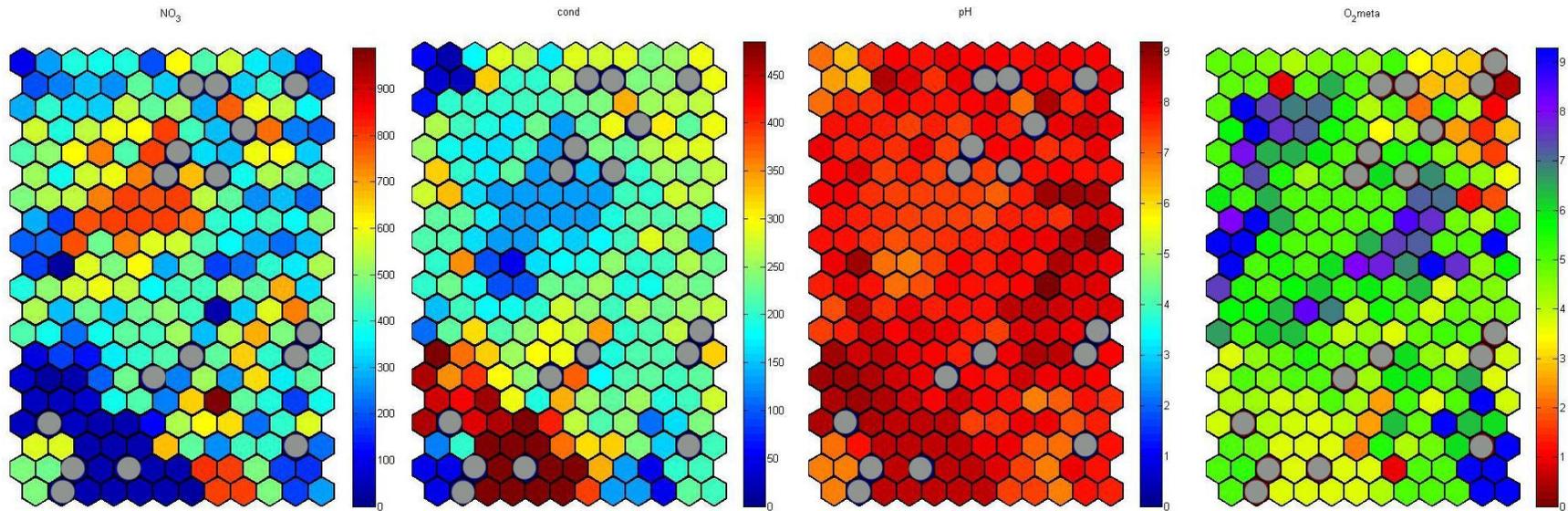
ALLEGATO 2



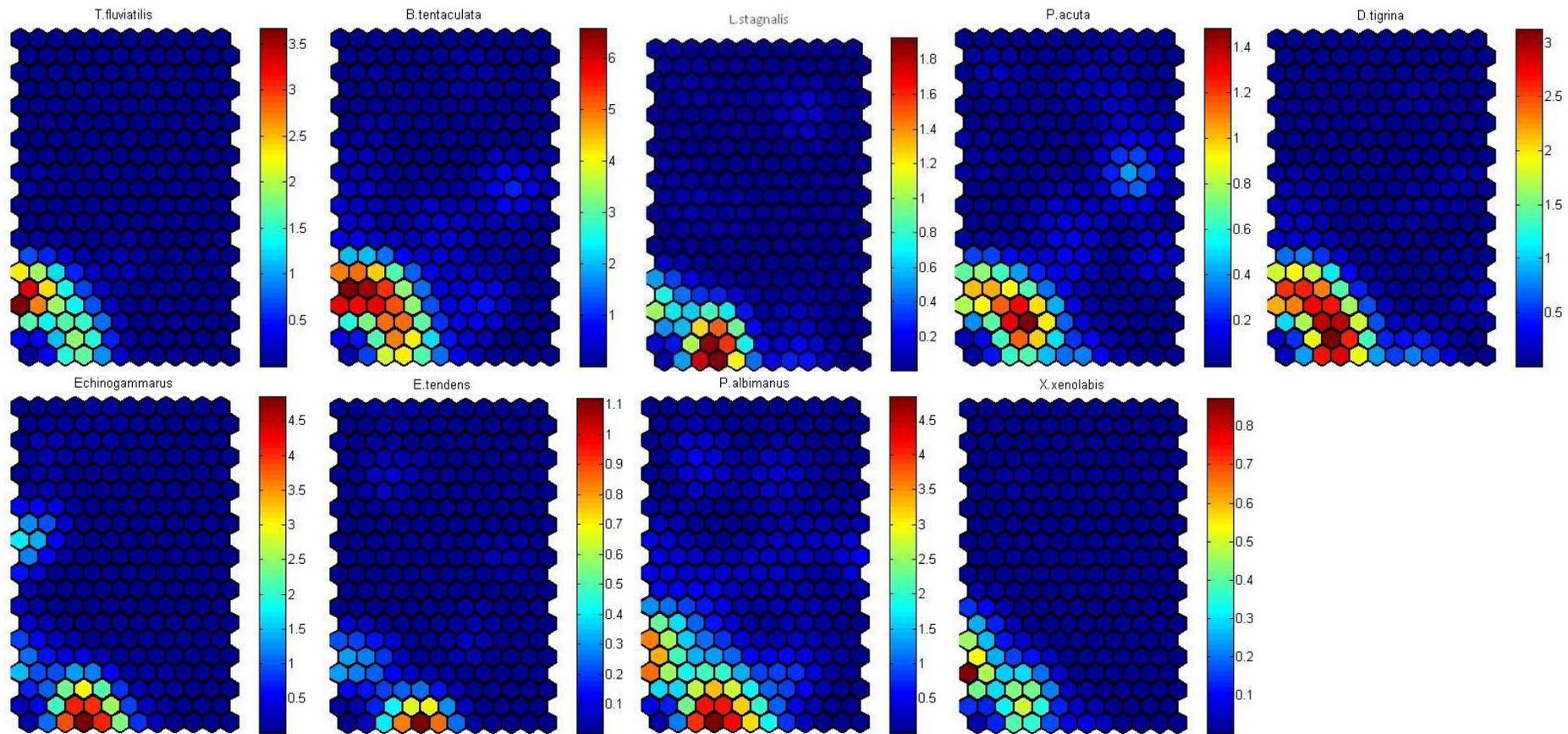
ALLEGATO 3



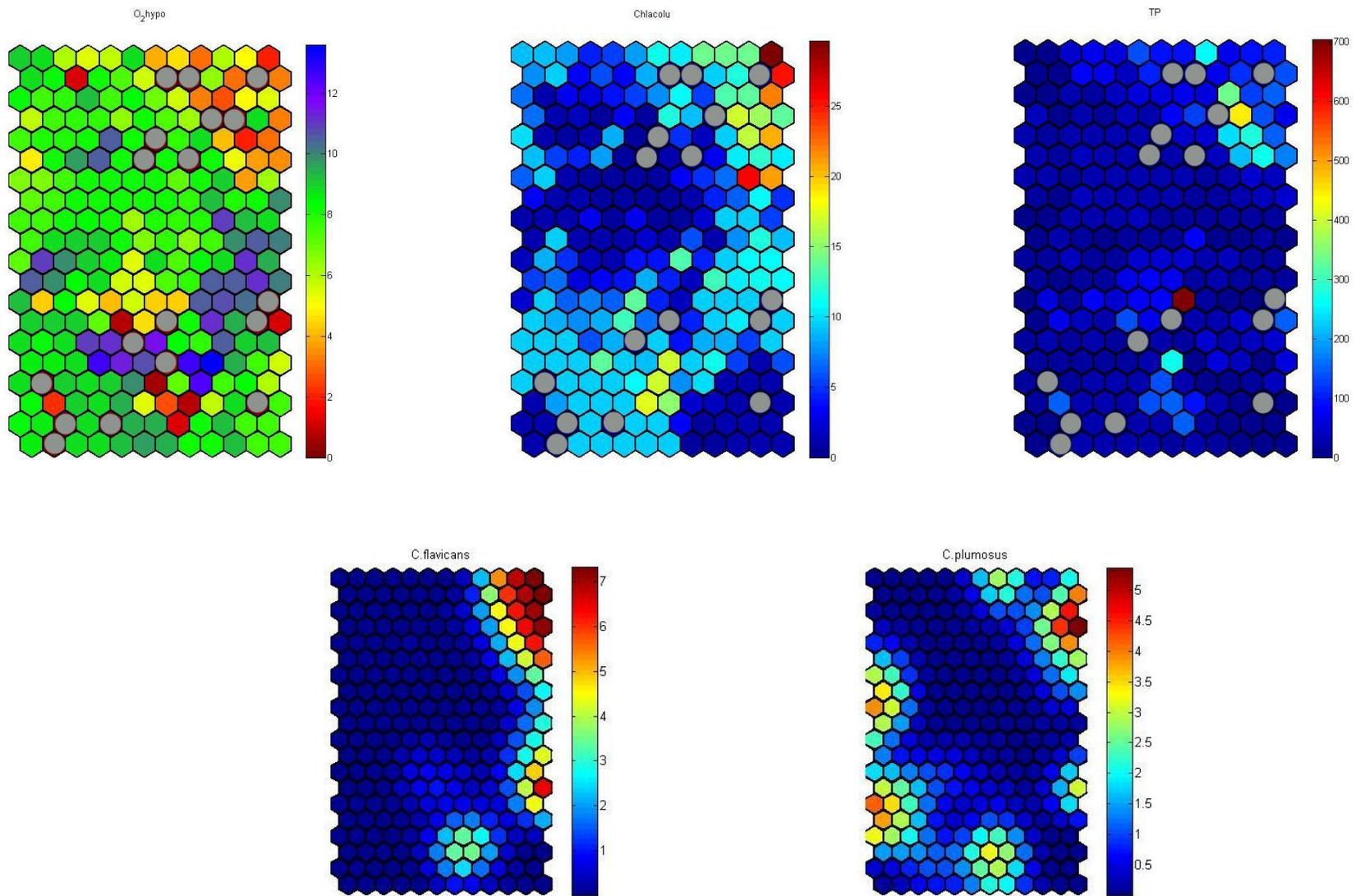
ALLEGATO 4



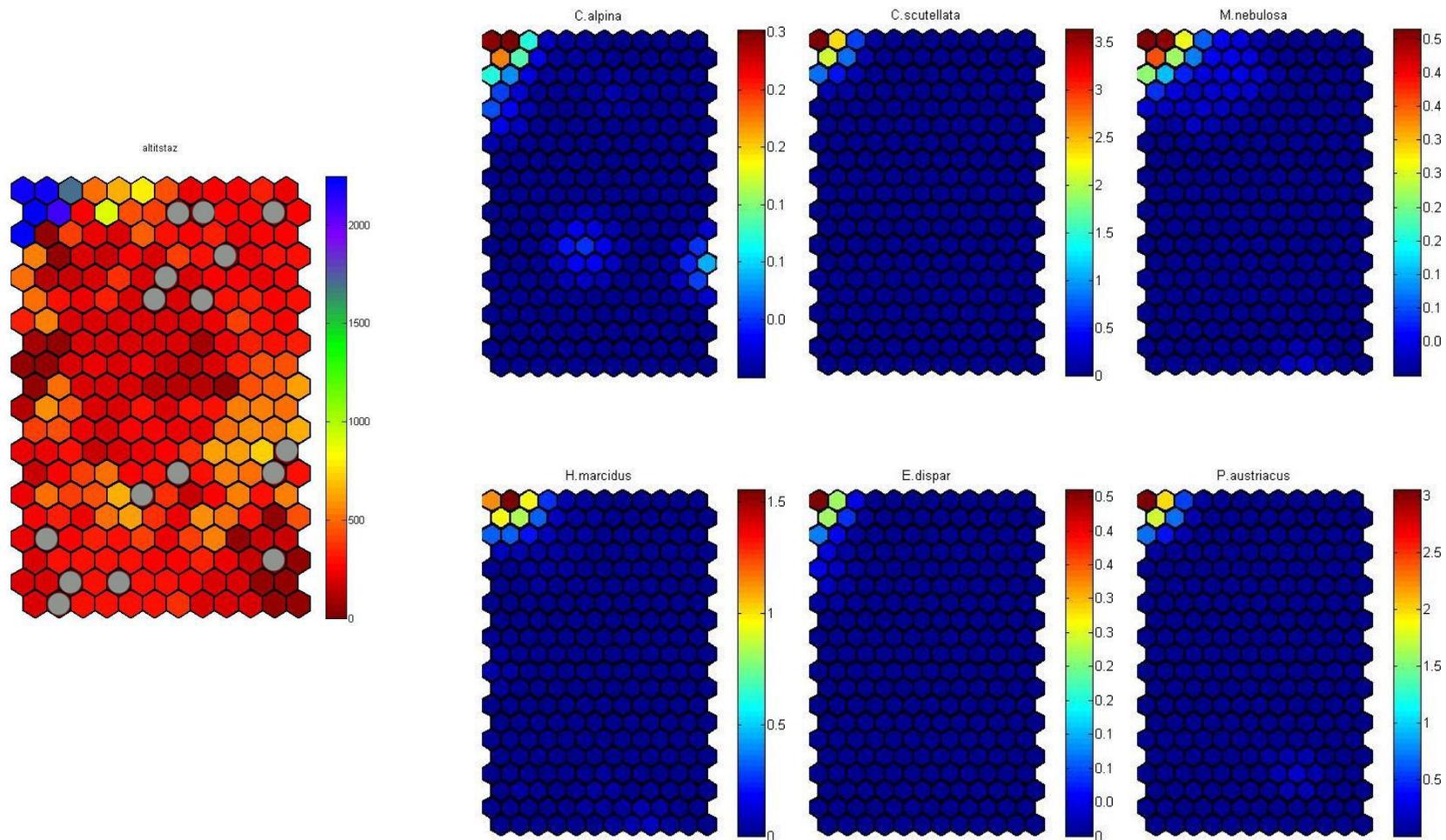
ALLEGATO 4



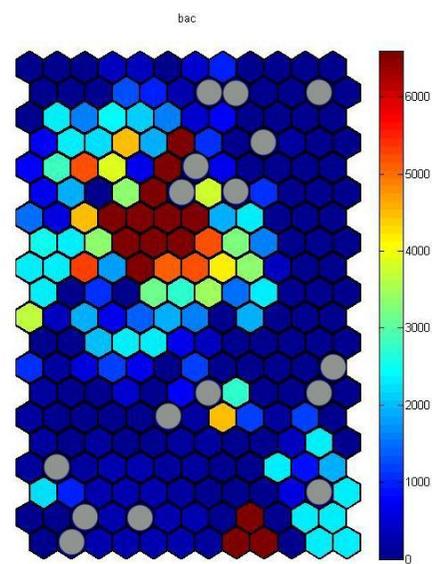
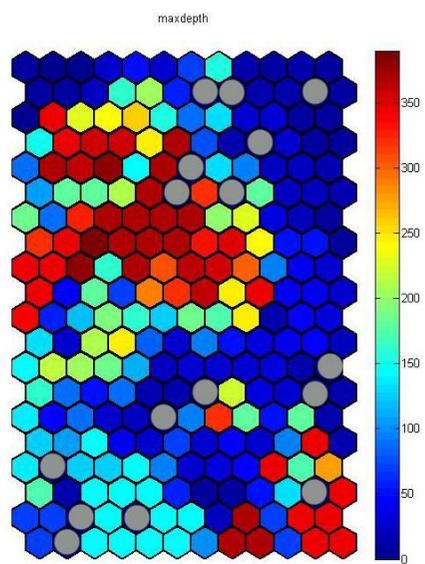
ALLEGATO 5



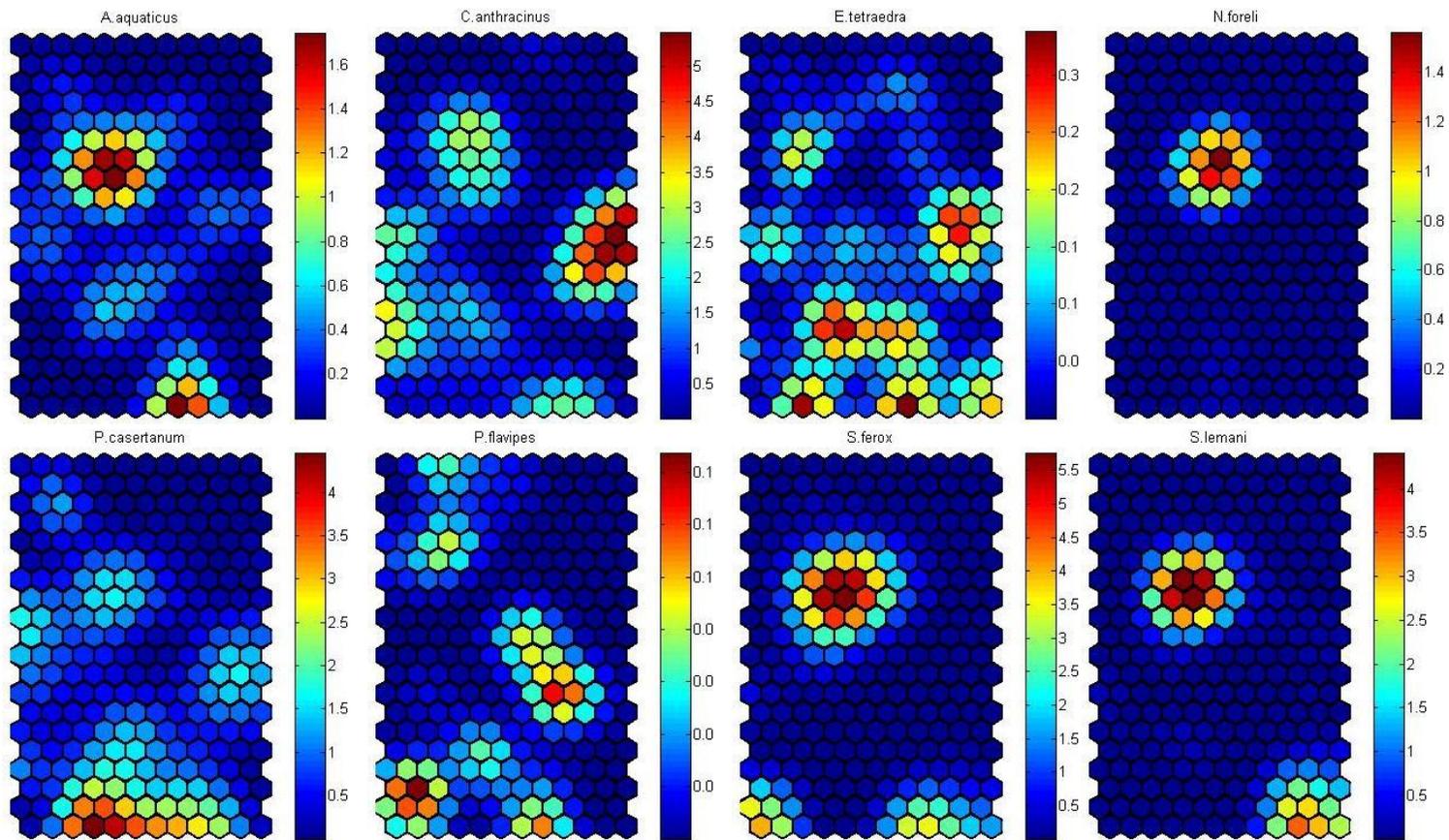
ALLEGATO 6



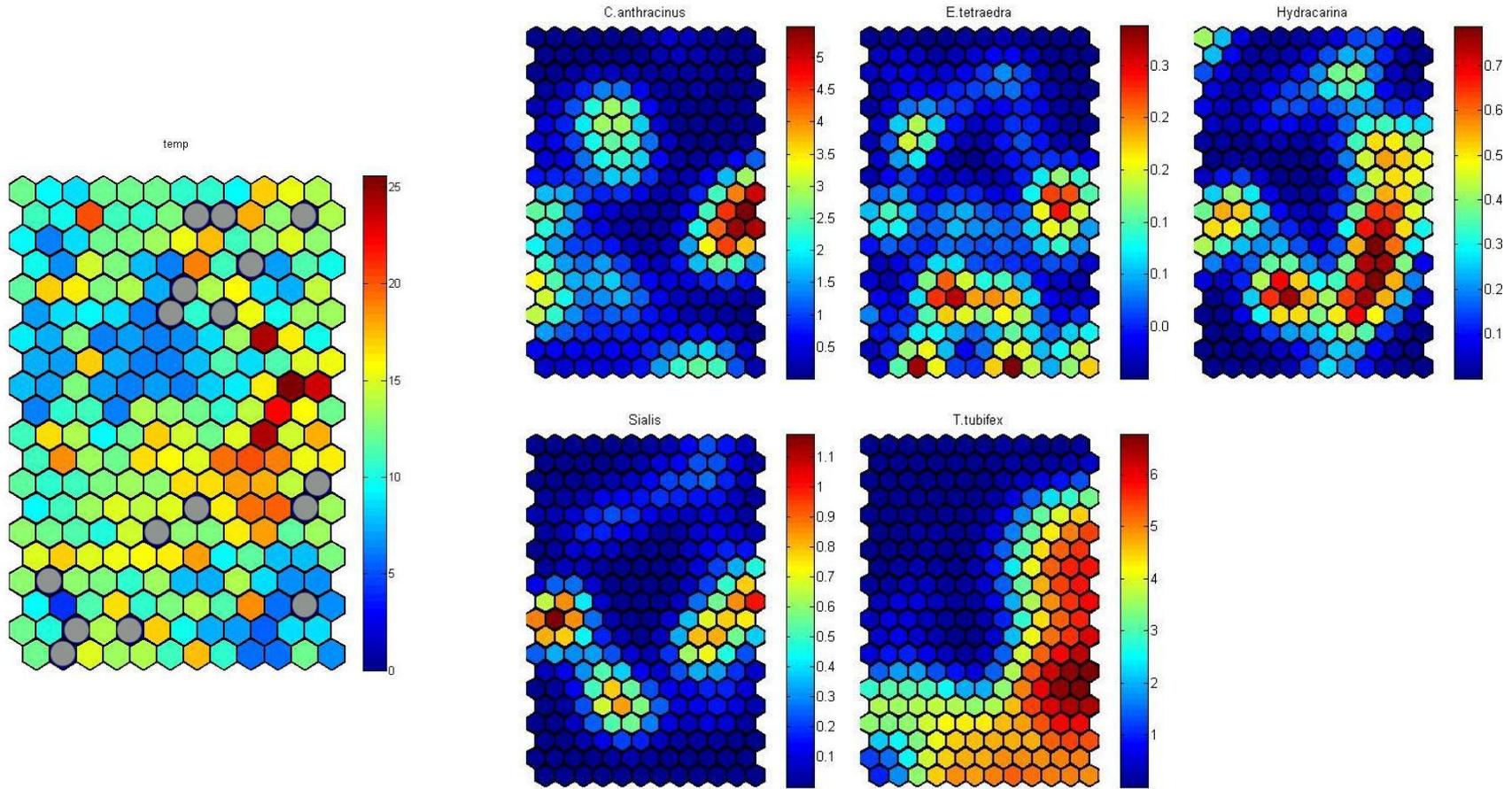
ALLEGATO 7



ALLEGATO 7



ALLEGATO 8



I CHIRONOMIDI (DIPETRA CHIRONOMIDAE) COME INDICATORI DI QUALITÀ AMBIENTALE: I LAGHI DELL'AVETO

V. GRAZIOLI, B. ROSSARO

valentina.grazioli@unimi.it

Univ. degli Studi di Milano, Dip. di Protezione dei Sistemi Agroalimentare e urbano e Valorizzazione della Biodiversità (DiPSA), Via Celoria 2, 20133 Milano

Le recenti indicazioni della Direttiva 2000/60/EC (Water Framework Directive: WFD) impongono agli Stati membri di individuare sul proprio territorio dei siti caratterizzati da uno stato ecologico elevato, le cui condizioni biologiche devono essere prese come riferimento, valutando un insieme di parametri che includono tra gli altri la composizione e l'abbondanza dei macroinvertebrati bentonici.

La classificazione degli organismi ai livelli tassonomici utilizzati in passato per l'applicazione di indici come per esempio l'IBE non è sufficiente a fornire indicazioni riguardanti le risposte delle comunità ai diversi stress a cui sono sottoposte, mentre il riconoscimento a livello tassonomico di maggior dettaglio (genere o specie) sembra rispondere a questa necessità.

L'uso dei chironomidi nello studio degli ecosistemi di acqua dolce offre notevoli vantaggi, dal momento che questi animali sono ubiquitari, rivestono tutti i ruoli trofici, e mostrano una sensibilità agli stress ambientali differente tra le diverse specie.

Il presente studio esamina la fauna a chironomidi di alcuni laghetti e corsi d'acqua all'interno del Parco dell'Aveto, privi in genere di impatto antropico. I diversi ambienti sono contigui ma si differenziano gli uni dagli altri per la diversa altitudine, la presenza o assenza di corrente, le diverse profondità massime ed infine il diverso impatto antropico, e rappresentano per questo motivo una "vetrina" dei parametri che possono influenzare la presenza o l'assenza delle specie (temperatura, ossigenazione, stabilità dell'ambiente dal punto di vista idrico, ecc).

I campionamenti sono stati effettuati raccogliendo larve, adulti ed exuvie pupali con l'utilizzo di specifici retini, e il riconoscimento è stato effettuato utilizzando le apposite chiavi dicotomiche.

Lo studio rappresenta quindi una panoramica delle diverse specie di chironomidi che si possono rinvenire nei diversi ambienti, e mette l'accento sulle specie con particolare significato ecologico, naturalistico e biogeografico.

IL CONTENUTO DI EMOGLOBINA E DI ALCUNI ENZIMI DEL
METABOLISMO ANAEROBIO *CHIRONOMUS*
(DIPTERA CHIRONOMIDAE)

V. GRAZIOLI, B. ROSSARO

valentina.grazioli@unimi.it

Univ. degli Studi di Milano, Dip. di Protezione dei Sistemi Agroalimentare e urbano e Valorizzazione della Biodiversità (DiPSA), Via Celoria 2, 20133 Milano

È noto da diversi anni che l'eccessivo apporto di nutrienti in laghi poco profondi porta ad una drastica diminuzione dell'ossigeno ipolimnico; questo comporta un depauperamento delle comunità di fondo, che in queste condizioni sono spesso composte solo da oligocheti e chironomidi resistenti all'ipossia.

Le larve di *Chironomus plumosus*, *C. riparius*, sono comunemente chiamate *bloodworms*, a causa dell'alto contenuto di emoglobina che le rende adatte alla sopravvivenza in ambienti anossici. Inoltre è stato dimostrato che questi animali sono in grado sopravvivere a periodi di ipossia spinta, passando temporaneamente alla degradazione anaerobica del glicogeno.

Studi precedenti hanno di volta in volta preso in considerazione l'una o l'altra delle due strategie di sopravvivenza messe in atto da questi animali; invece lo scopo di questo lavoro è quello di analizzare la relazione che lega le due strategie alle diverse concentrazioni di ossigeno.

Numerosi esemplari di *C. plumosus* sono stati prelevati dai sedimenti di fondo dei laghi di Annone e Comabbio in diverse stagioni durante l'anno 2008. Contemporaneamente ai campionamenti sono state effettuate alcune misure chimico-fisiche dell'acqua nel punto di campionamento.

Sugli esemplari catturati sono state effettuate in laboratorio misure spettrofotometriche della quantità di emoglobina (HB), alcohol deidrogenasi (ADH), lattico deidrogenasi (LH), e gliceraldeide-3P-deidrogenasi (GAPDH). I dati ottenuti sono poi stati messi in relazione con le concentrazioni di ossigeno a cui erano stati prelevati gli esemplari, sono risultate significative le relazioni tra HB, ADH e ossigeno, in particolare si è notato che al diminuire dell'ossigeno si ha un aumento della quantità di HB, fino ad un valore soglia, a partire dal quale l'HB diminuisce e si ha un aumento di ADH.

Per verificare queste evidenze si è scelto di prelevare alcuni esemplari di una popolazione di laboratorio di *C. riparius* (affine al *C. plumosus*), e di stabularli in diverse condizioni di ossigenazione per intervalli di tempo crescenti, ma i risultati sono apparsi in parte discordanti da quanto registrato in natura.

DNA BARCODE IN CHIRONOMID CLASSIFICATION

B. ROSSARO¹, V. LENCIONI², A. BOGGERO³, V. GRAZIOLI¹, L. MARZIALI¹

bruno.rossaro@unimi.it,

¹DiPSA, Univ. di Milano, Dipart. di Protez. dei sistemi agroalim. e urb. e valorizz. delle biodiversità;²MTSN Museo Tridentino Scienze Naturali; ³CNR-ISE Istituto per lo Studio degli Ecosistemi

DNA barcode was recently used to classify Chironomids (EKREM, WILLASSEN & STUR, 2007), but at present results are below expectation. The most striking problem is that often species belonging to different genera or tribes are clustered together. Different DNA regions were used (COX1, COX2, CYTB, 18S, 28S RNA etc.), but different species were tested with different regions so the results often cannot be compared; 1811 Chironomids accession numbers are at present available in GenBank. Samples analysed with the same gene were selected and analysed using Matlab R2009a Bioinformatics toolbox. In the present example 97 partial cox1 sequences (EKREM, WILLASSEN & STUR, op. cit.) are discussed. The sequences belong to six genera belonging to the tribe of Tanytarsini (*Micropsectra*, *Parapsectra*, *Tanytarsus*, *Cladotanytarsus*, *Paratanytarsus* and *Rheotanytarsus*). Samples belonging to the same species cluster together as do species belonging to the same species groups as but there are many misclassifications with species belonging to different genera clustering together (*M. pallidula* for example clusters with *Tanytarsus* species) and the three *Micropsectra* species groups (*attenuata*, *notescens* and *atrofasciata*) are not reproduced. Even worse results were obtained using 28S and 18S RNA probes. The present data analysis suggests that DNA barcode is at present unable to give a reconstruction of phylogenetic relationships within the family Chironomidae. Chironomids have the advantage to be holometabolous insects, with 4 semaphoronts (adults males and females, pupae and larvae) available, each with a well defined morphology rich in characters useful for diagnostic. This allows a good classification well supported by many characters; DNA barcode at present can only aid in separating populations belonging to the same species or sister species not separated by morphological characters, in this sense DNA barcode goes in the same direction of salivary gland polytene chromosomes which are still used to separate *Chironomus* species.

RINGRAZIAMENTI

In questa sede desidero ringraziare tutti coloro che in modi diversi mi hanno aiutato a conseguire questo importante traguardo.

Innanzitutto mi preme esprimere i miei più sentiti ringraziamenti al prof. Bruno Rossaro, relatore di questa tesi, per gli insegnamenti, i consigli e soprattutto per avermi fatto scoprire il meraviglioso mondo dei Chironomidi e per avermi trasmesso la passione per ogni aspetto della vita di queste “bestiole”.

Ringrazio di cuore anche la dott.ssa Valeria Lencioni, correlatrice di questa tesi, senza il cui aiuto questo lavoro non avrebbe mai potuto essere scritto! Grazie per il sostegno nei momenti difficili, per gli innumerevoli consigli e per avermi dato la possibilità di lavorare in un ambiente unico.

Inoltre desidero ringraziare il prof. Paolo Parenti per avermi gentilmente messo a disposizione il laboratorio e le attrezzature presso il *Dipartimento di Scienze dell’Ambiente e del Territorio dell’Università di Milano Bicocca*.

Un sentito “grazie” va anche al prof. Olivier Jousson, del *CIBIO (Centre for Integrative Biology)* dell’Università di Trento, per avermi dato la possibilità di lavorare nel suo laboratorio.

Desidero inoltre ringraziare i colleghi con cui ho lavorato durante questi anni; e in particolare:

- GRAZIE ai colleghi del *Dipartimento di Biologia dell’Università degli Studi di Milano*, in particolare Consuelo, Daniele e Marco, con cui ho condiviso esperienze, stanze e laboratori per la prima parte di questo mio percorso.

- GRAZIE ai colleghi del Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio dell'Università di Milano Bicocca; alla dott.ssa Matilde Forcella per i preziosi insegnamenti e al sig. Roberto Giacchini per l'aiuto e il sostegno materiale nello svolgimento degli esperimenti e soprattutto per l'amicizia dimostratami.
- GRAZIE ai colleghi del CIBIO per non avermi fatto sentire (troppo) un pesce fuor d'acqua)!
- GRAZIE ai colleghi della sezione di Zoologia degli Invertebrati del Museo Tridentino di Scienze Naturali: ad Alessandra, Mauro, Elisa, Luigi e Luca grazie per l'aiuto nei campionamenti, nello smistamento e negli esperimenti, grazie per le chiacchierate, per il "tea time", per i consigli, la compagnia. Grazie di tutto!

Un ringraziamento tutto speciale va alla dott.ssa Paola Bernabò, per la competenza, la chiarezza e l'infinita pazienza con cui mi ha insegnato le tecniche della biologia molecolare, ma soprattutto per l'affetto e l'amicizia che mi ha dimostrato.

In ultimo mi preme ringraziare tutti i "Recchelini" che in un modo o nell'altro mi hanno aiutato, nonostante la lontananza:

- GRAZIE al Sindaco, all'intero Consiglio Comunale di Recco, e ai Dipendenti del Comune, per aver sopperito alle mie assenze e carenze.
- GRAZIE a Luca, Bear, Casse, Picca, Paolo, Morre, gli amici del Q.S.M., ecc. ecc.: tutti, chi più chi meno, hanno dovuto sopportare i miei sfoghi, e le mie "lezioni" sui Chironomidi.

- Un GRAZIE particolare va a Flavio, per la sua capacità tutta speciale di farmi dimenticare lo stress e le preoccupazioni.

In conclusione ringrazio i miei Genitori e Giacomo, per avermi supportato in ogni modo durante questi anni duri e pieni di sacrificio, per essermi stati sempre vicini anche nella lontananza, e per essere stati fieri di me...spero che possiate esserlo anche oggi, che questo mio percorso si conclude, e sempre più in futuro!

Infine, ultimo ma primo nel mio cuore, un ringraziamento specialissimo ad Andrea, per aver avuto pazienza, per avermi ascoltato, per avermi aspettato...e per un'infinità di altre cose. GRAZIE!