

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea in Biologia

ELABORATO DI LAUREA

Effetti del Triclosan sull'ultrastruttura di *Chlamydomonas reinhardtii*
P.A. Dangeard

Tutor: Prof.ssa Isabella Moro
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Benedetta Risino
1095140

Anno Accademico 2016/2017

INDICE

INTRODUZIONE

Introduzione	1
1. Triclosan	2
1.1 Proprietà fisico-chimiche	2
1.2 Applicazioni, bioaccumulo e ciclo vitale	2
1.3 Tossicità	6
2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> P.A. Dangeard	7
2.1 Caratteristiche principali	7
2.2 Ciclo vitale	8
2.3 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> come organismo modello	9
3. Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)	11

SCOPO DELLA TESI 13

MATERIALI E METODI

4. Materiali e metodi	14
4.1 Specie e colture algali	14
4.2 Esposizione al Triclosan	14
4.3 Allestimento dei campioni per la realizzazione di sezioni ultrasottili	15
4.4 Taglio dei campioni ed osservazione al TEM	16

RISULTATI E DISCUSSIONE 17

CONCLUSIONI 20

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA 21

INTRODUZIONE

“La nostra sovracrescita economica si scontra con i limiti della finitezza della biosfera. La capacità rigeneratrice della terra non riesce più a seguire la domanda: l'uomo trasforma le risorse in rifiuti più rapidamente di quanto la natura sia in grado di trasformare questi rifiuti in nuove risorse”

Serge Latouche, “Breve trattato sulla decrescita serena”

“La nuova consapevolezza maturata in noi di essere parte costitutiva dell'ecosistema e di partecipare in prima persona, vittime e carnefici, alla sua distruzione, ci suggerisce che inquinare l'ambiente significa avvelenare noi stessi. Che quando i pesci muoiono nei fiumi, quel veleno che li ha uccisi giungerà ben presto nella nostra caraffa d'acqua ‘potabile’ sulla nostra tavola. Che quando vendiamo per 30 denari una foresta, abbiamo venduto parte della nostra eredità di ossigeno, e che con l'ape uccisa oggi dalle molecole di sintesi muore la speranza nei fiori del futuro”

Giorgio Celli

I nuovi contaminanti emergenti, conosciuti anche come *Emerging Organic Contaminants* (EOCs), stanno mettendo sempre più a rischio l'integrità degli ecosistemi terrestri ed acquatici con il loro progressivo accumulo nell'ambiente (Kuster *et al.*, 2008). Le condizioni necessarie alla vita, riproduzione e sviluppo degli organismi viventi diventano sempre più precarie all'aumentare della concentrazione degli EOC e quindi della loro potenziale tossicità. In particolare, nell'ecosistema acquatico si verifica il maggior grado di inquinamento a seguito dello scarico antropico (acque di scarico domestiche, di ambienti ospedalieri o industriali, di allevamenti agricoli) nelle acque continentali, per l'impossibilità della completa rimozione di questi nuovi contaminanti, i cui effetti sono da poco oggetto d'indagine.

Durante il secolo scorso l'attenzione era incentrata sui metalli pesanti rilasciati da attività minerarie ed industriali e sui loro potenziali effetti negativi sulla salute. Con il largo impiego di prodotti per la cura e l'igiene personale e per l'ambiente sanitario, però, il focus di molti studi si concentra ora sui composti farmacologicamente attivi, o *Pharmaceutically-Active Compounds* (PACs), di cui si inizia la rilevazione in concentrazioni molto significative negli ecosistemi acquatici con un range compreso tra i ng/L e µg/L nelle acque marine o oceaniche e fino ai mg/L in acque fluviali in prossimità di industrie farmaceutiche (Larsson *et al.*, 2007). La tossicità degli EOCs, inoltre, può aumentare per l'azione sinergica dovuta alla combinazione con altri contaminanti presenti nell'ambiente o per l'azione di processi degradativi nei confronti della molecola (Wilson *et al.*, 2003).

Particolare attenzione è riservata ulteriormente all'analisi degli effetti di tali nuovi contaminanti organici e inorganici sulle microalghe, i principali produttori primari e la fonte di cibo per tutti i livelli trofici superiori, nonché gli indicatori più promettenti per l'estrema sensibilità agli EOCs (He *et al.*, 2012), rispetto alle altre specie presenti negli stessi habitat acquatici. L'Agenzia Nazionale per la Protezione Ambientale Cinese, nota anche con l'acronimo di NEPA (The Chinese National Environmental

Protection Agency), raccomanda, nello specifico, l'uso delle microalghe verdi (ad esempio *Scenedesmus obliquus* o *Chlamydomonas reinhardtii*) come perfetti indicatori biologici nei test ecotossicologici per la loro elevata sensibilità e la velocità di attivazione dei meccanismi di difesa contro le forme reattive dell'ossigeno (specie ROS) indotte dai microinquinanti, come ad esempio il Triclosan (The Chinese NEPA, 1990).

1. TRICLOSAN

1.1 Proprietà fisico-chimiche

Il Triclosan (TCS), derivato triclорurato del fenolo o 5-cloro-2-(2,4 diclorofenossi) fenolo, è un biocida ad ampio spettro e nuovo contaminante (Dhillon *et al.*, 2015).

È un fenolo alogenato, un composto aromatico derivante dalla sostituzione degli idrogeni degli anelli benzenici con gruppi ossidrilici ed atomi di cloro ed ossigeno, estremamente stabile per la distribuzione di carica su tutto l'anello aromatico dovuta a risonanza e per questo altamente idrofobico.

Presente in natura come polvere bianca cristallina, il TCS manifesta proprietà acide e/o basiche a seconda del pH dell'ambiente in cui viene inserito. In relazione alla sua $pK_a=8.1$, infatti, si presenta prevalentemente in forma fenolata se la soluzione ha $pH>8.1$ o come forma fenolica con $pH<7.9$ (Dhillon *et al.*, 2015).

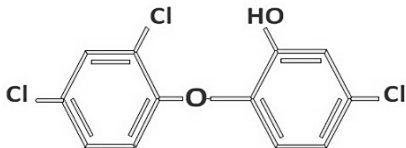
Scarsamente solubile in acqua per le sue proprietà idrofobiche apolari, mostra una forte tendenza ad accumularsi nei tessuti adiposi secondo il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua $K_{ow}=4.76$ e viene assorbito molto facilmente dal terreno, specialmente siccitoso, ove si accumula in alte concentrazioni (Bedoux *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2014), riuscendo così a mantenere un tempo di emivita maggiore ai 70 giorni (se in condizioni anossiche). In acqua il tempo di emivita si attesta, invece, sui soli 11 giorni.

In Tabella 1, sono indicate le principali caratteristiche chimico-fisiche del TCS, con particolare attenzione alla sua struttura chimica.

1.2 Applicazioni, bioaccumulo e ciclo vitale

Il TCS, conosciuto anche con il nome commerciale di Irgasan DP300, Biofresh, o Microban (Adolfsson-Erici *et al.*, 2002), è usato fin dal 1968 come biocida, antibatterico, antimicotico ed antisettico e conservante in moltissimi dei più comuni prodotti di uso quotidiano (Fig.1).

Tabella 1: Proprietà generali del TCS (Dhillon *et al.*, 2015)

CAS No.	3380-34-5
Structure	
Molecular formula	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
Trade name	Irgasan DP 300, FAT 80'023, CH 3565, GP41-353, Irgacare MP (the pharmaceutical grade of TCS, >99% pure) and Ster-Zac
General classification	Non-prescription compound
Possible use	Antimicrobial, antiseptic and disinfectant
Nature	Hydrophobic
Molecular weight	289.54
Dissociation constant (pKa) (20 °C)	8.14
Henry constant (H _e) (atm mol ⁻¹ ·m ⁻³)	1.5 × 10 ⁻⁷ (25 °C)
Octanol-water Partition coefficient (log K _{ow})	4.76
Sorption coefficient (K _{oc})	18408
Solubility	12 mg·L ⁻¹ (25 °C)
Vapor pressure	5.2 × 10 ⁻⁶ Pa (mm Hg at 20 °C)
Bioconcentration factor (BCF)-	2.7-90 (aquatic organisms)
Photodegradation (half-life in aqueous solution)	41 min
Biodegradation (half-life in aerobic soil)	18 days
Biodegradation (anaerobic condition)	No degradation within 70 days
Degradation products of TCS	Methyl TCS, dioxins, chlorophenols, chloroform

Si può osservare la sua presenza nei *prodotti per la cura personale* (PCPs) come dentifrici, collutori, cosmetici, detersivi per la cucina, saponi, scrubs chirurgici, ... (Dhillon *et al.*, 2015) in concentrazioni limitate tra lo 0,1% (sapone liquido per mani) e 0,3% (dentifrici) w/w, secondo la normativa imposta dalla Food and Drugs Administration (FDA). È impiegato, inoltre, in moltissimi prodotti di pulizia per la casa, utensili da cucina, giochi e tessuti (si veda la Fig.1), affermandosi come componente battericida in più di 2385 brevetti nel solo 2008 (Fang *et al.*, 2010). Si calcola una produzione annua di TCS riversata nelle acque di scarico di 1500 tonnellate a livello globale, di cui 450 tonnellate prodotte e scaricate negli USA e 350 tonnellate in Europa.

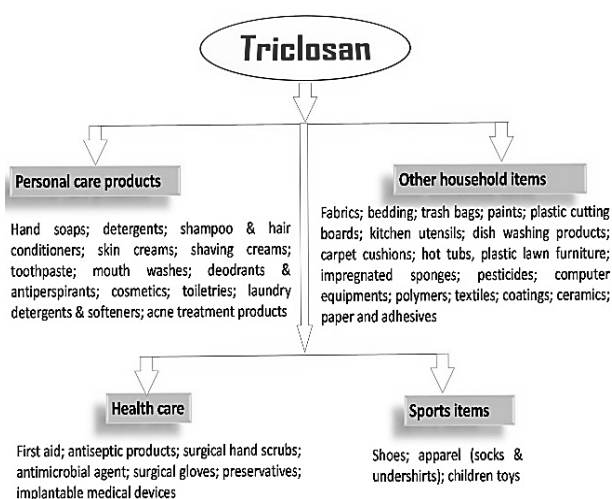


Figura 1: applicazioni TCS (Dhillon *et al.*, 2015)

Il consumo procapite annuo di TCS, infatti, è compreso tra i 0,01-2 g a seconda della zona di consumo, e nelle acque superficiali si rileva una concentrazione di 0,07/0,45 µg/L per l'impossibilità di una completa rimozione del trattamento di acque di rifiuto e scarico antropico, nonostante le più avanzate tecnologie (cifre riferite agli ultimi

dati resi disponibili nel 2005, anno dopo cui non si hanno più precise informazioni da parte di autorità monitoranti l'impiego di Triclosan nella vita quotidiana). In una recente ricerca compiuta nel 2011 per analizzare gli effetti di più di 2000 microinquinanti, non viene esaminato (Carsten von der Ohe *et al.*, 2011).

Il largo impiego del TCS come biocida, regolamentato diversamente in ogni Paese/Continente (si osservi la Tabella 2), prende il sopravvento dopo il 1997, anno in cui viene dimostrata la prevenzione nei confronti di gengiviti, carie e placca grazie all'uso quotidiano del dentifricio Colgate Total® contenente l'associazione TCS-fluoro (Dhillon *et al.*, 2015). Così il TCS diviene il componente indispensabile nei prodotti per l'igiene personale e nei farmaci da banco OTC (Over The Counter) con azione antibatterica e disinfettante, ma ciò favorisce anche un suo fortissimo accumulo a livello ambientale per il suo potenziale di ripartizione in oggetti solidi e lunga emivita.

Tabella 2: Regolamentazione uso del Tcs nei vari prodotti (Bedoux *et al.*, 2011)

Country or continent	Organization	Concerned products	Concentration limit% (w/w)	Ref.
Europe	European Union ^a	All types of cosmetic products ^b	0.3 (Positive list)	Council Directive 76/768/EEC concerning cosmetic products http://ec.europa.eu/
Japan	Ministry of Health, Labour and Welfare, Pharmaceutical Affairs Law	Quasi drugs or cosmetic products ^c	0.1 (Positive list)	Standards for Cosmetics http://www.mhlw.go.jp/
South Africa	Medicines Control Council	All types of cosmetic products ^b	0.3	http://www.ctfa.co.za/
Canada	Health Canada, Food and Drugs Act and Cosmetic Regulations	Mouthwashes Other cosmetics or non-prescription drugs	0.03 0.3 (Pre-market approval)	http://www.cctfa.ca/
USA	US Food and Drug Administration and US Environmental Protection Agency	Over-the-counter (OTC) drugs (antimicrobial hand soaps, toothpaste, deodorants) cosmetics, and medical devices	Pre-market approval	http://www.fda.gov/ http://www.cga.ct.gov/2009/rpt/2009-R-0245.htm
Australia	Australian Government regulator of industrial chemicals	cosmetic products and therapeutic goods (anti-perspirants)	Pre-market approval	http://www.nicnas.gov.au/

Korea has adopted categories similar to the Japanese quasi-drug category or has classified products as OTC drugs, as in the USA and Canada

^a Each Member State has health authorities which then regulate cosmetics within their respective national boundaries according to the law. Other countries have reproduced certain features of the EU model (positive list), including China, Algeria, India, Israel, Morocco, Saudi Arabia, Association of Southeast Asian Nations (ASEAN: Brunei Darussalam, Cambodia, Indonesia, Laos, Malaysia, Myanmar, Philippines, Singapore, Thailand, and Vietnam), Latin America countries (MERCOSUR: Argentina, Brazil, Paraguay, and Uruguay), and the Comunidad Andina (Bolivia, Columbia, Ecuador, Peru, and Venezuela)

^b All types of cosmetic products: toothpastes, anti-caries toothpaste, deodorant, rinse-off products...

^c Quasi drugs: anti-caries toothpaste, anti-perspirant—cosmetic: handsoaps...

Infatti, a seguito dell'utilizzo esterno al corpo dei PCP, non apportante modifiche costitutive alla struttura del fenolo, il TCS entra nel ciclo di depurazione delle acque ad uso domestico. È quindi assorbito per quasi il 90% dai fanghi di depurazione, biosolidi dovuti alla concentrazione di sostanze organiche e inorganiche presenti nelle acque reflue, usati come agrofertilizzanti dopo adeguati processi di stabilizzazione incapaci di eliminare però i microinquinanti. Il TCS è poi depositato nei terreni di cultura, ove subisce modifiche per l'esposizione a nuove condizioni ambientali, contaminando colture e falda sotterranea (si veda la Fig. 2 riferita al ciclo vitale del TCS). Il 10% non assorbito dai fanghi di depurazione viene invece riversato nelle acque fluviali e superficiali marine, accumulandosi superficialmente ed alterando l'ecosistema marino con due diverse modalità, nonostante il basso tempo di emivita (11 giorni).

Nel 2003, infatti, Wilson e collaboratori, evidenziarono come l'aumento di concentrazione di TCS in un determinato habitat favorisca una perdita della diversità fitoplanctonica e del periphyton ed un aumento delle abbondanze di specie resistenti al TCS a sfavore di quelle più sensibili, con un'esposizione di soli 12 giorni al fenolo. Organismi, infatti, come le Diatomee che a concentrazioni di 10/12 µg/L, appaiono meno sensibili rispetto alle Clorofee, prendono su di esse il sopravvento (Pinckney *et al.*, 2017).

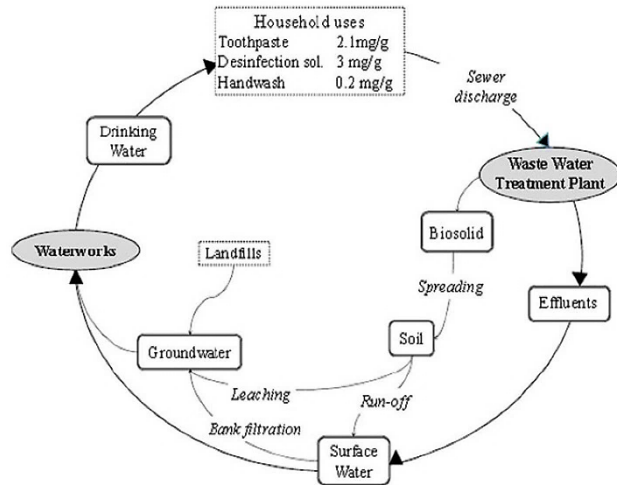


Figura 2: ciclo vitale del TCS (Bedoux *et al.*, 2011)

L'altra alterazione dell'ecosistema operata dal TCS è dovuta alla sua scarsa solubilità ed all'alto K_{OW} , o coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua, che lo portano ad associarsi ai lipidi degli organismi planctonici, destabilizzandone la struttura membranosa ed i processi di ossidazione fosforilativa, trasmettendolo ai livelli trofici superiori della catena alimentare (Pinckney *et al.*, 2017).

Infine, il Triclosan subisce diverse degradazioni nell'ambiente, originando composti instabili e potenzialmente dannosi per la salute, come i clorofenoli (Monoclorofenolo; 2,4-Diclorofenolo) (Fig. 3) dovuti ai trattamenti chimici di purificazione per la produzione di biosolidi, o il Metil-TCS, derivato dalla sua biodegradazione nel suolo ed individuato in 22 campioni di acqua potabile analizzata a Barcellona nel 2007 (Dhillon *et al.*, 2015).

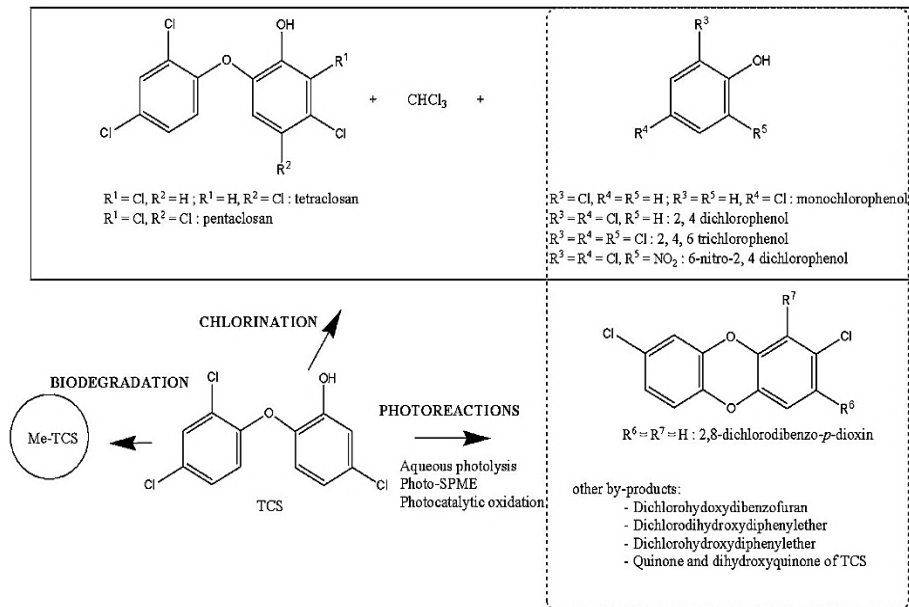


Figura 3: Meccanismi di degradazione del Triclosan e derivati (Bedoux *et al.*, 2011)

Il TCS è inoltre soggetto alla fotodegradazione dovuta all'irradiazione solare con lunghezze d'onda di 254 nm, 313 nm e 365 nm (UV), responsabile della produzione di metaboliti derivanti dalla formazione in ambiente acquoso di radicali e loro reazione con le molecole del fenolo alogenato, come le diossine (prodotte per il 1-12% dalla fotodegradazione del TCS a pH=8). Tra queste, il 2,8 diclorodibenzo-p-diossina (2,8 DCDD) (Fig.3), un composto con tempo vitale molto più lungo del TCS stesso (122 giorni in acqua di mare), evidenzia la pericolosità di tali derivati per la prolungata contaminazione ambientale che essi comportano (Bedoux *et al.*, 2011).

1.3 Tossicità

Il TCS non è considerato un inquinante chimico con la massima priorità di pericolosità per l'assenza, ad oggi, di effetti di tossicità acuta o cronica dimostrati e di un concreto monitoraggio. La mancata regolamentazione nel suo utilizzo e l'impossibilità di una completa rimozione dalle acque reflue lo pongono però a capo della lista dei nuovi contaminanti emergenti.

Gli effetti verificati sul corpo umano si riferiscono unicamente all'esposizione dell'epidermide ad un uso prolungato di saponi contenente la molecola che provocherebbe irritazioni cutanee ed un aumento di reazioni fotoallergiche, anche dopo 12 ore dal contatto con il contaminante. Ancora da verificare sono poi gli effetti teratogeni, ma sembra esserci una stretta correlazione tra l'uso di PCP contenenti TCS e l'insorgenza di tumori della pelle per l'accumulo nei tessuti adiposi della molecola idrofobica (Dhillon *et al.*, 2015).

Inoltre, secondo la National Health and Nutrition Examination Survey (NANES) più del 60% dei campioni di latte materno analizzati nel 2003 negli USA e in Svezia (unico Paese in cui il TCS è stato bandito repentinamente) conteneva alte concentrazioni di Triclosan, ed ugualmente alcuni campioni di urina successivamente analizzati (Dhillon *et al.*, 2015).

Effetti, invece, più deleteri sono stati evidenziati a livello animale. Per esempio, nel caso del topo si è osservata una forte insorgenza di ipotermia causata dall'azione negativa sul metabolismo tiroideo esercitata dal TCS, che porta una diminuzione nella produzione di ormone endogeno in quanto il sito di legame dei recettori tiroidei viene occupato dalla molecola contaminante simulante l'ormone, favorendone così la repressione nella produzione. In aggiunta, sembra esservi anche un effetto inibitorio nella propagazione del segnale miogeno a livello cardiaco, ma le cause di tale fenomeno presente anche in diverse specie di pesci tropicali, sono ancora da accertare (Dhillon *et al.*, 2015).

Nei batteri gram positivi e negativi, inoltre, il TCS è considerato il diretto responsabile della repressione della sintesi di lipidi, poiché agisce sull'enzima ENR (enoil ACP-riduttasi), diretto responsabile del processo, e destabilizza la membrana (Carsten Von der Ohe *et al.*, 2011).

Nel 2010, 80 organizzazioni in tutto il mondo chiedono la messa al bando del Triclosan all' Agenzia degli Stati Uniti per la tutela della salute umana e della

protezione ambientale, EPA (Environmental Protection Agency), ma solo il Minnesota, il 16 Maggio 2011, decreta la completa eliminazione da qualsiasi prodotto a consumo personale (Bedoux *et al.*, 2011).

Finalmente, con l'emergenza di studi sperimentali e il riscontro di un progressivo accumulo di TCS in concentrazioni sempre più alte in diversi campioni analizzati di tutte le tipologie (21,9 µg/L in UK o 23,9 µg/L in Grecia), nel 2016 la FDA avanza la proposta di una completa eliminazione del TCS da tutti i prodotti per la cura personale negli USA, anche a seguito della sua correlazione riscontrata per l'aumento della resistenza agli antibiotici, ma non viene bloccato l'utilizzo dei fanghi di depurazione come agrofertilizzanti.

La lenta degradazione del TCS ed il suo riscontro in campioni di sedimento risalenti a 30 anni fa nel fondo del Lago Greifensee in Svizzera (Pinckney *et al.*, 2017) mostrano la forte persistenza del contaminante e la necessità di ulteriori indagini e studi da parte della comunità scientifica sui possibili effetti, sul grado di tossicità dello stesso e dei derivati che produce attraverso i processi di degradazione, e sulle possibili variazioni che può provocare in tutto l'ecosistema tendendo ad un progressivo accumulo.

Utili a tale scopo d'indagine, si rivelano le microalghe, organismi che mostrano la maggior sensibilità alle variazioni di TCS tra tutti quelli analizzati e presentano un valore del fattore di bioaccumulo per lo stesso pari a 900-1200 (Coogan *et al.*, 2007). In particolare, il genere *Chlamydomonas* manifesta i primi effetti osservabili ad una concentrazione di TCS pari a 0,12 µg/L, perfettamente adeguata ad indagini di laboratorio e pertanto oggetto di questo studio.

2. *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* P.A. Dangeard

2.1 Caratteristiche principali

Chlamydomonas reinhardtii è una microalga eucariote unicellulare mobile dalla forma ovale (Fig. 4), spesso dotata di due flagelli lunghi 10 µm ca localizzati in posizione anteriore della cellula, caratterizzati dalla tipica struttura flagellare 9+2 e 9+0 nel corpo basale, e portanti alla base due vacuoli contrattili (Pasqua *et al.*, 2015).

Appartiene alla divisione delle Chlorophyta, dette comunemente alghe verdi, alla classe delle Chlorophyceae, costituita da microalghe flagellate unicellulari coccoidi, spesso riunite in colonie, o da organismi filamentosi, per la maggior parte di acqua dolce.

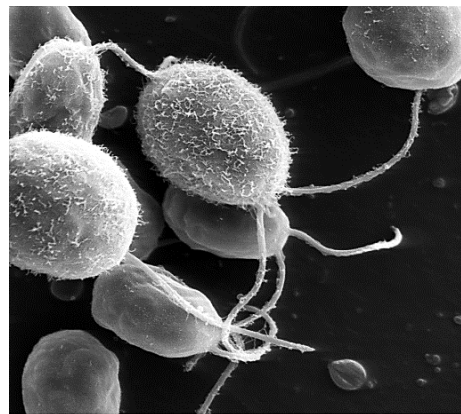


Figura 4: *Chlamydomonas reinhardtii* osservata al SEM (Dartmouth Electron Microscope Facility, Dartm. College, 2007)

Per quanto riguarda i pigmenti fotosintetici, le Chlorophyceae sono caratterizzate dalla presenza di contenenti clorofilla a e clorofilla b (Pasqua *et al.*, 2015).

Le pareti delle Chlorophyceae sono glicoproteiche fibrose ed assumono composizioni diverse, ma non presentano mai polisaccaridi di tipo celluloso.

Le Chlorophyceae presentano un grande cloroplasto disposto a coppa nella parte posteriore della cellula, caratterizzato da un esteso sistema di membrane tilacoidali, immerse nello stroma ed organizzate non in grana, bensì in pseudo-grana. Nelle membrane tilacoidali sono collocati i due complessi multiproteici adibiti alla fotosintesi (PSI e PSII). E' presente, inoltre, il pirenoide, una struttura rotondeggiante, rifrangente al microscopio ottico, sito principale di accumulo dell'amido, che, grazie all'azione dell'enzima Rubisco contenuta in grandi quantità, costituisce la principale fonte di carbonio coinvolta nei processi di polimerizzazione degli zuccheri di riserva, e ad esso deve la sua peculiare rifrangenza (Pasqua *et al.*, 2015). Le Chlorophyceae dotate di flagelli, inoltre, presentano una caratteristica macchia oculare, fotosensibile regolata dalla canal-rodopsina, la proteina di membrana responsabile dei movimenti a scatto compiuti dalla microalga per fototassi (risposta alla presenza/assenza di luce).

Le Chlorophyceae sono principalmente fotoautotrofe facoltative per la capacità di ricavarsi il carbonio indispensabile ai processi biologici in presenza di acetato, alcune forme possono essere eterotrofe, ad esempio le specie appartenenti all'ordine Chlamydomonadales sono in grado di crescere anche in assenza di luce (Bistoni *et al.*, 2008).

La specie *Chlamydomonas reinhardtii* venne descritta per la prima volta nel 1888 dal botanico francese P.A. Dangeard che la attribuì alla classe delle Chlorophyceae e all'ordine delle Chlamydomonadales.

C. reinhardtii presenta una ampia distribuzione geografica, la si può ritrovare prevalentemente nelle acque dolci delle Isole Baleari, in Germania, in Spagna, in Romania, in Asia, in Australia, in Asia e nel Nord e Sud America. *C. reinhardtii* fu la prima alga oggetto del Progetto Genoma e da allora viene usata come organismo modello per studi morfologici, fisiologici e genetici (Proschold *et al.*, 2005).

2.2 Ciclo vitale

Chlamydomonas reinhardtii ha un ciclo vitale aplonte: gli individui trascorrono la maggior parte della loro vita nello stato aploide (n) con 17 cromosomi, lo stato di diploidia (2n) si presenta solo nello zigote, come si può osservare in Fig. 5.

La riproduzione è di tipo vegetativo mediante scissione binaria con presenza del ficoplasto, una struttura di microtubuli che si forma durante la mitosi parallelamente al piano di divisione per assicurare la corretta divisione tra i due nuclei anche in assenza del fuso mitotico. In condizioni di stress, come carenza di nutrienti nell'ambiente o sovrappopolamento, interviene la riproduzione di tipo sessuale meiotica tra le cellule con mating type (mt) opposto.

I singoli individui, infatti, si comportano come isogameti con mating types diversi (plus “+” e minus “-“), fondendosi grazie all’adesione flagellare e dando origine ad uno zigote diplonte o ipnozigote dotato di una parete molto spessa, impermeabilizzante, e non flagellato che rimarrà in fase quiescente fino a variazioni ambientali più ottimali.

In presenza di luce, l’ipnozigote germinerà effettuando meiosi e dando origine a 4 cellule aploidi (2 per mt), che si potranno riprodurre mitoticamente.

La luce, oltre alla regolazione degli spostamenti della microalga, esercita un ruolo fondamentale nel controllo della fase sessuale del ciclo biologico della microalga: induce la formazione dei gameti, il mantenimento della loro capacità di fusione e la germinazione dello zigote. Tale controllo avviene grazie all’azione regolatoria della fototropina, un recettore per la luce blu dell’irradiazione luminosa situata nei flagelli della microalga, la cui cascata di segnalazione è ancora sconosciuta, e responsabile anche dei movimenti di chemiotassi in presenza di ammonio (Huang *et al.*, 2004).

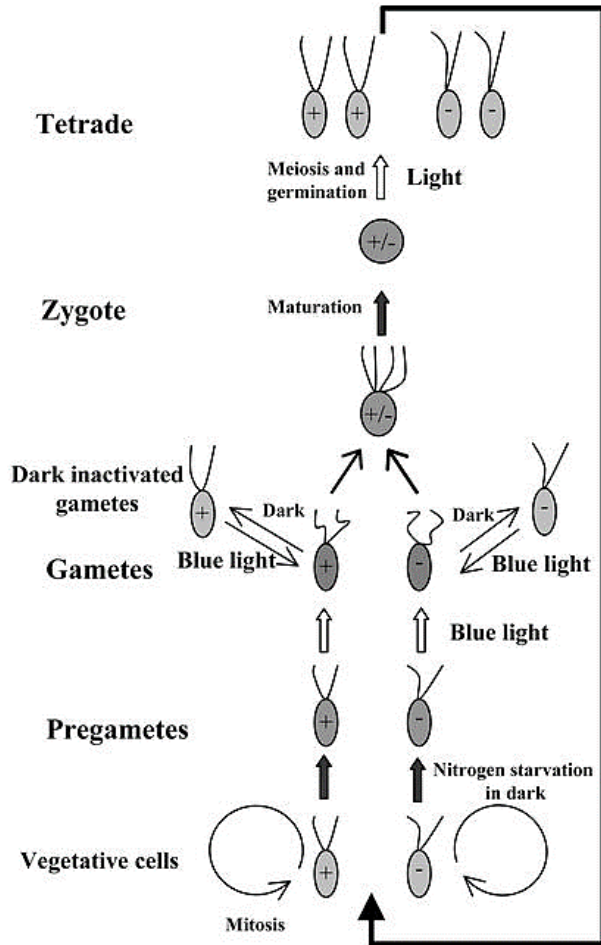


Figura 5: Ciclo vitale di *Chlamydomonas reinhardtii* regolato dalla luce (Huang *et al.*, 2004)

2.3 *Chlamydomonas reinhardtii* come organismo modello

La caratterizzazione genetica di *Chlamydomonas reinhardtii* grazie al sequenziamento completo del genoma plastidiale nel 2007, ha reso questo organismo da sempre un modello ideale per studi filogenetici e genetici e per testare nuovi metodi di trasformazione e selezione basati su tecniche di biobalastica o mediante la ricombinazione omologa nel cloroplasto ed eterologa nel nucleo.

Questa microalga tipicamente di acqua dolce è molto facile da crescere su terreni a composizione definita poco costosi. Inoltre, per la sua semplicità morfologica è perfetta per studi sulla fotosintesi e sui cloroplasti, sulla motilità e sulle strutture flagellari, sulla regolazione del metabolismo e la risposta alla mancanza di nutrienti,

sulla sincronizzazione della luce con il ciclo cellulare ed il riconoscimento per l'adesione cellula-cellula.

Recentemente è stata oggetto di studio per la capacità di produrre idrogeno grazie all'enzima ferro-idrogenasi se in perfetta condizione di anossia (assenza di ossigeno), prodotta dalla privazione dello zolfo dal terreno di crescita dell'alga.

Per di più, il breve ciclo riproduttivo di *Chlamydomonas* consente di sviluppare studi evolutivi ed un attento monitoraggio delle variazioni nella modalità di riproduzione, oltre ad una facile analisi degli effetti indotti dalle mutazioni sulla fitness o sugli adattamenti impiegati come risposta alle variazioni esterne dell'ecosistema come quelle indotte dai nuovi contaminanti emergenti.

C. reinhardtii, infine, mostra dei meccanismi di difesa nei confronti dei microinquinanti, che portano alla detossificazione o alla diminuzione dello stress ossidativo dovuto alla formazione dei ROS, grazie a processi di biotrasformazione mediata da enzimi specifici. Nei confronti degli antibiotici, infatti, produce livelli maggiori di cisteine (Cys) rispetto a ceppi più sensibili (Hu *et al.*, 2001); in presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti, verso cui una prolungata esposizione potrebbe aumentare la fotoinibizione da eccesso di luce nei processi fotosintetici, questa microalga esprime i geni nucleari per HSP 70 (Schroda *et al.*, 2007). Nei confronti del TCS sembra esservi un'iniziale degradazione tramite reazioni di accoppiamento ossidativo catalizzate da enzimi come le laccasi (Hu *et al.*, 2001), ma si devono ancora verificare i possibili effetti dovuti al suo accumulo all'interno della cellula e ad una prolungata esposizione.

Le differenze di sensibilità riscontrate tra le specie algali e le diverse modalità di azione del TCS, oltre alla produzione di effetti completamente distinti in specie relativamente simili, inducono l'ipotesi dell'esistenza di molteplici siti "target" bersaglio per questo inquinante (Franz *et al.*, 2008).

Risulta quindi indispensabile la comprensione dei meccanismi di azione del TCS e dei suoi metaboliti, oltre a verificare quali alterazioni il TCS possa apportare nell'ambiente e quali modifiche morfologiche e fisiologiche possa indurre nella specie *Chlamydomonas reinhardtii*, essendo essa alla base dell'ecosistema ed estremamente sensibile a tale molecola, per poi poter approfondire il potenziale grado di tossicità nei confronti di organismi più complessi come l'uomo.

3. MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE

Il microscopio elettronico a trasmissione, indicato anche con l'acronimo TEM, sfrutta un fascio di elettroni come sorgente di radiazioni accelerandoli ad altissime velocità e non un fascio di luce composto da fotoni, e quindi con lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella degli elettroni come nel caso del microscopio ottico.

La risoluzione garantita dal TEM è perciò maggiore, rispetto a quella offerta del microscopio ottico, in quanto il potere risolutivo di un microscopio è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda della sorgente di radiazioni come espresso nella formula di Abbe:

$$d = (\lambda) / (2n \sin\alpha)$$

in cui d =limite di risoluzione; λ = lunghezza d'onda del fascio; $n \sin \alpha$ =apertura numerica dell'obbiettivo.

Allo scopo di aumentare il potere risolutivo, ovvero la più piccola distanza tra due punti a cui essi appaiono ancora distinti, si può agire in tre modalità: diminuendo la lunghezza d'onda della fonte utilizzata, usando per esempio un fascio di luce ultravioletta che presenta λ minore della luce visibile (nel caso del microscopio ottico); ampliando l'ampiezza dell'obbiettivo, utilizzando però lenti molto più complesse; infine, aumentando n , interponendo tra oggetto ed obbiettivo un mezzo con indice di rifrazione maggiore dell'unità (http://www2.unime.it/dipfisica/Tesine/Microscopia_optica.htm).

Nel microscopio elettronico a trasmissione la capacità risolutiva può arrivare fino a 0.3 nm e pertanto questo strumento viene utilizzato per l'osservazione di ultrastrutture cellulari (Berloffo, 2002).

Il fascio di elettroni usato nel TEM (Fig.7) viene accelerato e focalizzato attraverso un sistema di lenti elettromagnetiche in una sezione del microscopio in cui vi è creato il "vuoto", per evitare rallentamenti dovuti a potenziali forze di attrito e le possibili interazioni tra la materia, e quindi anche le molecole di cui l'aria è composta. Esso ha una natura di tipo vibratorio e corpuscolare, essendo composto da particelle in movimento.

Le lenti sono costituite da avvolgimenti in cui scorre corrente e creano così un campo magnetico in grado di dirigere il fascio che attraverserà infine il campione, senza essere assorbito nel caso fossero invece presenti lenti materiche (Berloffo, 2002). Le lenti sono inoltre raffreddate per mezzo di una camicia esterna a circolazione di acqua termostata e presentano all'interno, un pezzo cilindrico detto "pezzo polare", formato da materiali conduttivi a elevatissimo grado di purezza per garantire il più possibile la simmetria del campo magnetico e quindi l'omogeneità del fascio.

Il campione deve avere uno spessore estremamente ridotto per consentire un corretto attraversamento degli elettroni del fascio e non può essere più spesso di 500 nm, motivo per il quale si preparano le sezioni ultrasottili effettuando il taglio

all'ultramicrotomo. La sezione viene poi posta su dei retini di rame o nichel per consentire il passaggio degli elettroni, altrimenti bloccati da materiali come il vetro.

Il fascio di elettroni è ottenuto per emissione termoionica dall'escandescenza di un filamento di tungsteno riscaldato, detto "catodo", che aumentandone la cinetica li porta a vincere le forze di attrazione del metallo e ad abbandonarlo.

Una volta focalizzato sul preparato dalle lenti magnetiche, il fascio subisce poi una parziale diffrazione e diffusione (in inglese "scattering") da parte delle ultrastrutture nell'attraversamento a causa dell'interazione di repulsione/attrazione coulombiana delle cariche, per uscire ed essere nuovamente ampliato da particolari lenti magnetiche preposte al suo allargamento. Il fascio viene infine proiettato su uno schermo fluorescente o su una lastra fotografica in grado di percepire gli elettroni che riveleranno un'immagine altamente ingrandita del campione precedentemente attraversato (IUPAC Gold Book, 1997).

Il microscopio elettronico a trasmissione presenta delle componenti strettamente interconnesse tra loro:

- colonna elettronica di lunghezza variabile tra 1 o 2 metri, solitamente montata in verticale, composta da: sorgente elettronica o cannone elettronico costituito dal catodo e da un ulteriore elemento carico positivamente a forma di dischetto con un foro centrale posto in posizione dell'anodo; lente del condensatore che limita il fascio di elettroni e riduce possibili aberrazioni, ovvero perdita di energia, e quindi monocromia da parte degli elettroni; il dispositivo per introdurre e spostare, se pur molto limitatamente il preparato; sistema di ingrandimento costituito dalla lente dell'obbiettivo e dalla lente del proiettore, entrambe per ampliare il fascio di elettroni; sistema di visualizzazione e di registrazione del fascio per renderlo visibile all'occhio umano;

- sistema di comando e di controllo dei circuiti elettrici;

- sistema di produzione e di controllo del vuoto direttamente collegato alla colonna elettronica.

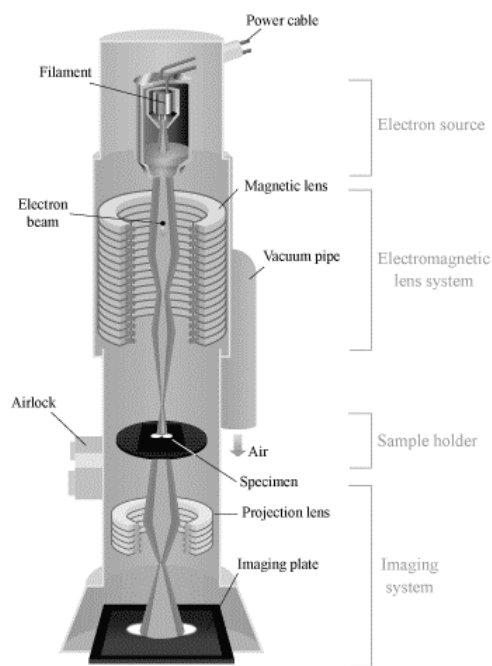


Fig.6: schema funzionamento del TEM e percorso fascio di elettroni (http://www.bk-phy.org/atomic_world/; 2017)

SCOPO DELLA TESI

L'uso esponenziale dei PCPs, o prodotti per la cura e l'igiene personale, la crescente industrializzazione del territorio e l'impiego di ingenti quantità di materie plastiche nella quotidianità hanno portato ad un elevatissimo accumulo di composti chimici riversati nell'ambiente con effetti deleteri sugli organismi, sulle popolazioni, sulle comunità e sull'ecosistema.

In particolare, le sostanze chimiche contenute nei PCPs, tra cui tensioattivi, profumi, conservanti e biocidi, hanno mostrato una forte persistenza nell'ambiente ed una sempre più crescente concentrazione nelle acque fluviali e marine modificando, così, la qualità dell'ecosistema. Il sempre più largo utilizzo, la loro vasta diffusione e la pericolosità ancora in parte sconosciuta di queste molecole hanno spinto la comunità scientifica ad inserirle all'inizio della lista dei nuovi contaminanti emergenti. Il primo e maggior impatto inquinante avviene a livello degli ecosistemi acquatici: la prolungata esposizione verso questi microcontaminanti determina il rischio di tossicità cronica per gli organismi caratteristici dell'ambiente ed il pericolo della trasmissione di questi microinquinanti in tutti quei livelli trofici, e negli ordini successivi, basati sulla predazione di questi organismi.

Una delle sostanze chimiche maggiormente impiegate nei prodotti di igiene, cosmetici, tessuti e di utilizzo in ambito sanitario è il TCS, molecola di cui si ha scarsa rilevanza in letteratura se non in studi molto recenti e verso cui hanno dimostrato estrema sensibilità alcune microalghe appartenenti alle Chlorophyta, in particolare le forme ubiquitarie di tutti gli ambienti di acqua dolce.

Si è ritenuto interessante, quindi, analizzare gli effetti morfologici e fisiologici che il TCS può indurre sulla microalga verde *C. reinhardtii*, un'alga molto diffusa nei corsi d'acqua dolce, considerata da sempre un perfetto organismo modello e bioindicatore per le evidenze che mostra nell'esposizione ai contaminanti.

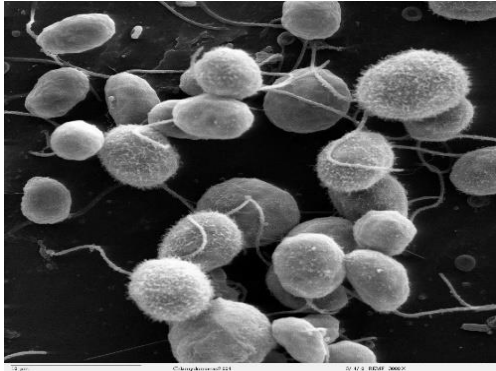
Nel dettaglio, questo studio ha per oggetto un'indagine ultrastrutturale, attraverso l'utilizzo del microscopio elettronico a trasmissione, per studiare gli effetti sulle componenti cellulari di colture algali di *Chlamydomonas reinhardtii* in seguito all'esposizione a diverse concentrazioni di Triclosan (1 µg/L, 5 µg/L e 10 µg/L).

Queste indagini si integrano all'analisi delle risposte fisiologiche sviluppata come precedente esperienza a questa tesi nell'elaborato "Risposte fisiologiche di *Chlamydomonas reinhardtii* a diverse concentrazioni di Triclosan" (Pigato, 2017), e che ha portato alla determinazione delle curve di crescita della microalga ed alla determinazione del contenuto di pigmenti fotosintetici per ogni fase di crescita alle differenti concentrazioni di TCS testate.

MATERIALI E METODI

4.1 Specie e colture algali

La specie utilizzata è la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard (Fig.7).



Phylum Chlorophyta

Classe Chlorophyceae

Ordine Chlamydomonales

Famiglia Chlamydomonadaceae

Genere *Chlamydomonas*

Specie *Chlamydomonas reinhardtii*

Figura 7: Immagine al microscopio elettronico a scansione di *Chlamydomonas reinhardtii* (Dartmouth Electron Microscope Facility, Dartmouth College, 2007)

Chlamydomonas reinhardtii è stata mantenuta in un terreno di cultura liquido TAP-MEDIUM (Tri-Acetate-Phosphate) in una cella climatica alla temperatura di 18°C, ad una intensità luminosa di 13 $\mu\text{mol fotoni/s m}^2$ (667 lux) e con un fotoperiodo di 6 ore di buio e 18 ore di luce.

4.2 Esposizione al Triclosan

Le colture algali sono state trattate con concentrazioni crescenti di TCS di 1 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$ e 10 $\mu\text{g/L}$ per indagare le modificazioni ultrastrutturali indotte in *C. reinhardtii*.

Per ciascuna delle condizioni testate di TCS sono state allestite 3 beute, contenenti la coltura algale, e, sempre in triplicato, delle beute contenenti solamente la coltura di controllo.

Sono state, inoltre, preparate altre tre beute di controllo contenenti la coltura algale con l'aggiunta di etanolo: ciò al fine di verificare un possibile effetto alterante da parte della molecola, in quanto questo solvente è stato utilizzato per sciogliere il principio attivo nella preparazione della soluzione madre di TCS.

4.3 Allestimento dei campioni per la realizzazione di sezioni ultrasottili

Per analisi ultrastrutturali si usa il microscopio elettronico a trasmissione (TEM), strumento che si basa sull'osservazione di sezioni ultrasottili dello spessore inferiore di 100 nm. Per ottenere le sezioni ultrasottili si deve procedere con l'allestimento dei campioni secondo un protocollo che prevede i seguenti passaggi:

A. FISSAZIONE

Il primo passaggio consiste in una fissazione primaria aldeidica utilizzando una soluzione costituita da un fissativo chimico e da un opportuno agente veicolante il fissativo stesso. Quest'ultimo ha la funzione di mantenere un pH costante durante tutto il processo di fissazione. Negli esperimenti eseguiti, i pellet algali relativi ad ogni condizione sperimentale sono stati fissati con glutaraldeide 6% in tampone cacodilato 0,1 M (pH 6,9) per un tempo minimo di 2 ore.

La glutaraldeide è un fissativo che penetra rapidamente come aldeide reattiva e reticola le proteine di membrana legandosi ad esse e fissandole, garantendo il mantenimento inalterato delle caratteristiche strutturali del campione, favorito anche dal pH simile all'ambiente intracellulare della soluzione in cui è disciolta. Il tampone cacodilato non preserva, però, le strutture lipidiche. Il vantaggio di usare questo tampone è dovuto alle sue peculiari caratteristiche: facile preparazione, conservazione per lunghi periodi e assenza di contaminazione da parte di microrganismi. Tuttavia, visto il contenuto di arsenico in esso presente è necessario manipolarlo con attenzione.

Trascorso il tempo di fissazione, è stata effettuata una centrifugazione a 2500 g per 3 minuti, allo scopo di eliminare la glutaraldeide. Sono stati quindi eseguiti alcuni lavaggi con lo stesso tampone cacodilato, in maniera tale da eliminare completamente ogni residuo di fissativo, per poi procedere ad una post-fissazione mediante tetrossido di osmio 1% in tampone cacodilato 0,1 M (pH 6,9) a temperatura ambiente, al buio per circa 2 ore. Il tetrossido di osmio è un agente di fissazione a lenta penetrazione e ha la capacità di reagire con i lipidi e con quelle proteine che nella loro struttura presentano gruppi SH e SS. È stato necessario, quindi anche in questo caso procedere poi con una centrifugazione di 3 minuti a 2500 g per eliminare il tetrossido di osmio.

B. DISIDRATAZIONE

La disidratazione è un passaggio fondamentale necessario alla rimozione completa dei liquidi presenti nei tessuti, sostituendoli con un solvente organico, ed evitando in questo modo il collasso delle strutture cellulari durante la fase di taglio. Gli agenti comunemente utilizzati per la fase di disidratazione sono l'acetone e l'etanolo.

La fase di disidratazione deve essere effettuata in maniera graduale, attraverso l'impiego successivo di soluzioni a concentrazioni crescenti di solvente in acqua, per non incorrere nella coartazione del materiale cellulare o in una deformazione degli organelli citoplasmatici. I passaggi necessari alla completa disidratazione del campione si effettuano tutti a temperatura ambiente, avendo cura di non lasciare mai

il campione esposto all'aria per evitare il disseccamento delle strutture cellulari, che potrebbe alterare la loro morfologia, e la veloce evaporazione dell'etanolo con la conseguente variazione di concentrazione della soluzione (CMENA, Università degli Studi di Milano, 2017).

Le concentrazioni di etanolo utilizzate per i diversi passaggi in questa tesi sono state: 25%, 50%, 75%, 95%, 100%. Ogni lavaggio per le diverse concentrazioni è durato dieci minuti ed è stato ripetuto 3 volte per garantire la sostituzione completa dell'etanolo nei confronti dei fluidi interni al preparato. E' stato quindi sostituito l'etanolo assoluto mediante una serie di lavaggi, di circa 10 minuti ciascuno, con ossido di propilene, un solvente estremamente volatile, di transizione per il passaggio successivo dei campioni in resina epossidica garantendo la penetrazione della resina nel campione.

C. INCLUSIONE IN RESINA

Per poter procedere al taglio delle sezioni ultrasottili, è necessario includere i campioni in un materiale sufficientemente duro da poter essere tagliato. Negli esperimenti condotti in questa tesi è stata utilizzata una resina epossidica, composta da 27 mL di Araldite (A/M), 23 mL di Anidride dodicisuccinica (DDSA) e 0,75 mL di Acceleratore. Per fare ciò, l'ossido di propilene nel quale erano risospesi i campioni è stato sostituito, attraverso dei lavaggi, da miscele di ossido di propilene e resina, a concentrazione decrescente di ossido di propilene e crescente di resina secondo il seguente schema:

- Ossido di propilene : resina= 3:1 → i campioni sono stati mantenuti in stufa a 37/40°C per 1 ora;
- Ossido di propilene : resina= 1:1 → i campioni sono stati mantenuti in stufa a 37/40°C per 1 ora;
- Ossido di propilene : resina= 1:3 → i campioni sono stati mantenuti in stufa a 37/40°C per tutta la notte.

L'ultima miscela è stata quindi sostituita da resina pura e i campioni sono stati mantenuti in stufa a 37°C per 2 ore, lasciando le provette senza tappo, al fine di favorire l'evaporazione completa dell'ossido di propilene. In seguito, la resina pura è stata sostituita e i campioni sono stati posti in stufa a 40°C 24 ore per favorire la penetrazione della resina nel campione, e successivamente a 60°C per i tre giorni successivi per completare la polimerizzazione e solidificazione della resina.

4.4 Taglio dei campioni ed osservazione al TEM

I campioni inclusi nella resina sono stati tagliati in sezioni ultrasottili inferiori ai 100 nm utilizzando un ultramicrotomo Reichert Ultracut S. Le sezioni sono state raccolte su retini in rame e contrastate con acetato di uranile per 5 minuti e successivamente con citrato di piombo per 3 minuti.

Si è proceduto, infine, all'osservazione dei preparati tramite un microscopio elettronico a trasmissione TEM *FEI Tecnai G²* operante a 100 kV.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per verificare gli effetti sull'ultrastruttura delle colture microalgali di *C. reinhardtii*, in seguito all'esposizione alle differenti concentrazioni di Triclosan, sono state eseguite osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) per ognuna delle fasi di crescita (inoculo, fase esponenziale e fase stazionaria) della microalga.

Al momento dell'inoculo le cellule di *C. reinhardtii* presentavano un nucleo con un evidente nucleolo in posizione centrale della cellula e un grande cloroplasto a coppa localizzato a ridosso della parete cellulare (Fig. 8 A).

Il cloroplasto, caratterizzato da membrane tilacoidali appressate fra di loro (Fig. 8 B), ma non organizzate a formare *grana*, all'interno presentava un visibile pirenoide, circondato da amido (Fig. 8 C). Quest'ultimo era talvolta presente anche sotto forma di granuli sparsi tra le membrane tilacoidali (Fig. 8 C).

Inoculo

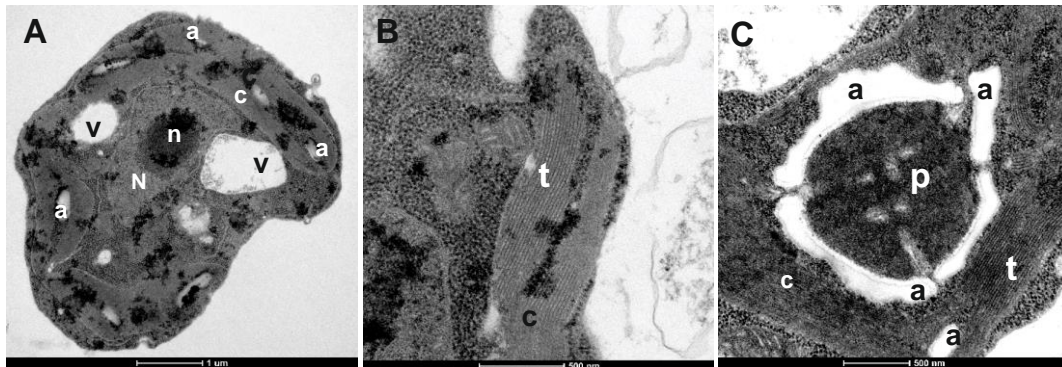


Fig. 8 Cellule di *Chlamydomonas reinhardtii* relative all'inoculo osservate al TEM **A-** visione d'insieme di una cellula; **B-** particolare del cloroplasto con dettaglio delle membrane tilacoidali; **C-** particolare del pirenoide, localizzato tra le membrane tilacoidali e circondato da granuli di amido. a=amido; c=cloroplasto; N=nucleo; n=nucleolo; p=pirenoide; t=tilacoidi; v=vacuoli

L'osservazione delle colture durante la fase di crescita esponenziale non ha evidenziato nelle colture di controllo e in quelle di controllo + etanolo particolari modificazioni ultrastrutturali (Fig. 9A e 9B). In entrambe le condizioni, infatti, si osservava sempre un cloroplasto con membrane tilacoidali ben organizzate e caratterizzato dalla presenza di un pirenoide circondato da grossi granuli di amido.

Nelle colture sottoposte alle diverse concentrazioni di TCS (Fig. 9 C-E) non si osservavano evidenti modificazioni ultrastrutturali a livello del cloroplasto: le membrane fotosintetiche si mantenevano integre anche alla maggiore concentrazione di TCS testata.

L'assenza di significative modificazioni a livello ultrastrutturale delle membrane fotosintetiche sembra quindi dimostrare che la tossicità del TCS alle concentrazioni

testate non interferisce, almeno in questa fase, con la normale funzionalità dell'apparato fotosintetico. Ciò è in accordo con quanto osservato da Almeida e collaboratori (2017), in cellule di *C. reinhardtii* sottoposte a diversi biocidi, tra i quali anche il Triclosan, dal momento che, anche negli esperimenti condotti da Almeida et al. (2017), infatti, la presenza del biocida non portava alla produzione di forme reattive dell'ossigeno (ROS) e non rivelava quindi potenziali danni ossidativi a carico dell'apparato fotosintetico.

Le osservazioni condotte al TEM sulle colture sottoposte alle differenti concentrazioni di TCS durante la fase esponenziale, inoltre, hanno permesso di osservare la presenza, all'interno di alcune cellule, di corpi sferici di probabile natura lipidica (Fig. 9C e 9E). È noto, infatti, che in condizioni ambientali stressanti, molte microalghe immagazzinano prevalentemente lipidi con funzione di riserva di carbonio ed energia sotto forma di gocce localizzate, prevalentemente in prossimità del cloroplasto, nel citoplasma (Deng *et al.*, 2011; Ceccato, 2013). L'identità di questi corpi elettrondensi potrebbe essere rivelata attraverso l'osservazione al microscopio ottico a fluorescenza utilizzando il colorante Nile Red.

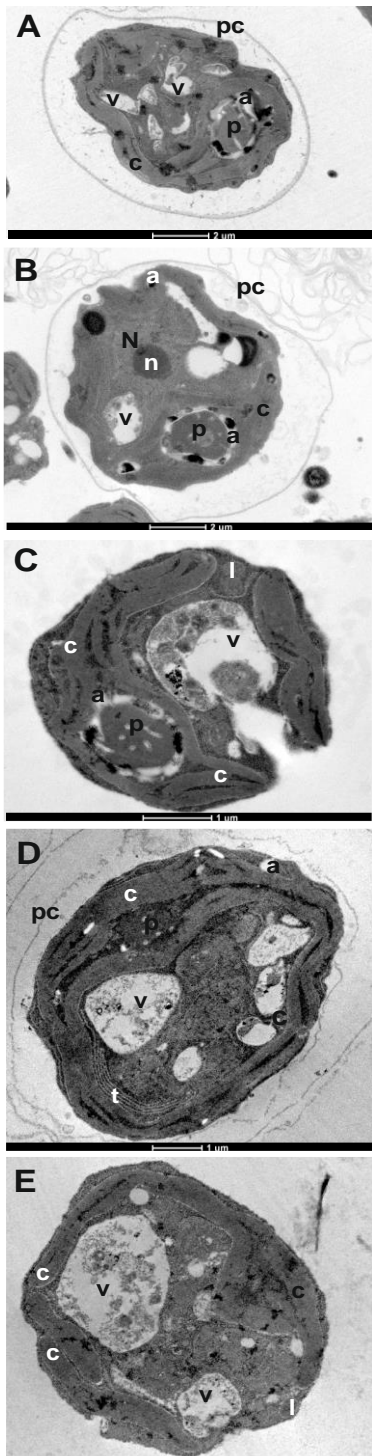
In tutte le condizioni di TCS testate erano, in più, presenti vacuoli contenenti materiale elettrondenso (Fig. 9 C-E). Tali strutture potrebbero rappresentare il risultato di una condizione di stress per le cellule che immagazzinerebbero quindi all'interno di questi vacuoli il Triclosan introdotto nella cellula a seguito del trattamento, ribadendo così il ruolo fondamentale dei vacuoli nella detossificazione algale.

In fase di crescita stazionaria le cellule di controllo e quelle delle di controllo+etanolo non presentavano modificazioni ultrastrutturali rilevanti (Fig. 9 F e 9G).

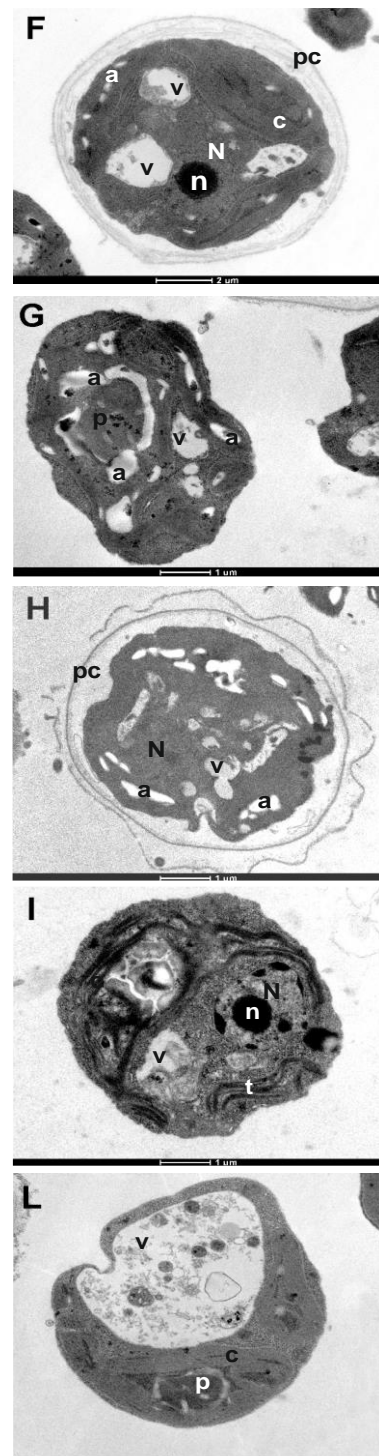
Per quanto riguarda le colture sottoposte al trattamento alle diverse concentrazioni di TCS, invece, già a partire dalla concentrazione di 1 µg/L si osservava un aumento nella quantità di granuli di amido che si localizzano tra le membrane tilacoidali (Fig. 9H). Erano, inoltre, presenti anche numerosi vacuoli già evidenziati durante la fase esponenziale (Fig. 9C). La loro presenza nelle cellule trattate è una caratteristica già osservata in colture di *Chlamydomonas acidophila* trattate con cadmio (Nishikawa et al. 2003). L'assenza di vacuoli nelle cellule di controllo fa ipotizzare che questi depositi rappresentino la messa in atto di una detossificazione nei confronti dello xenobiotico assorbito in compartimentazioni dalla microalga. In aggiunta, alla concentrazione di 1 µg/L di Triclosan si osservava una frammentazione dello strato più esterno della parete cellulare e la variazione nella forma della cellula che assumeva un aspetto ondulato, probabilmente in conseguenza dell'iperpolarizzazione indotta dalla penetrazione del TCS nell'ambiente citoplasmatico.

Alla concentrazione sperimentale di 5 µg/L si osservava poi la presenza di membrane tilacoidali non perfettamente integre e dilatate in alcuni punti (Fig. 9 I). Inoltre, alle concentrazioni di Triclosan di 5, ma soprattutto di 10 µg/L, le strutture vacuolari, con all'interno depositi elettrondensi, diventavano ancora più grandi, talvolta arrivando ad occupare buona parte del volume cellulare, ribadendo ancora una volta il ruolo detossificante del vacuolo in risposta all'esposizione della cellula a sostanze tossiche. (Fig. 9L).

Fase Esponenziale



Fase Stazionaria



C
C + Etanolo

1 µg/L

5 µg/L

10 µg/L

Fig. 9 *Chlamydomonas reinhardtii* osservata al TEM nelle diverse condizioni sperimentali. **A-E** Fase esponenziale: **A-** Controllo (**C**); **B-** Controllo+etanolo (**C+ Etanolo**); **C-** trattamento alla concentrazione di 1 µg/L; **D-** trattamento alla concentrazione di 5 µg/L; **E-** trattamento alla concentrazione di 10 µg/L; **F-L** Fase stazionaria: **F-** Controllo; **G-** Controllo+etanolo; **H-** trattamento alla concentrazione di 1 µg/L fase stazionaria; **I-** trattamento alla concentrazione di 5 µg/L; **L-** trattamento alla concentrazione di 10 µg/L fase stazionaria. a=amido; c=cloroplasto; l=corpi globulari lipidici; N=nucleo; n=nucleolo; p=pirenoide; t=tilacoidi; v=vacuoli

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio permettono di trarre le seguenti conclusioni:

- Le osservazioni condotte al TEM permettono di osservare come nella fase di crescita esponenziale non vi siano modificazioni ultrastrutturali delle membrane fotosintetiche del cloroplasto. Il TCS sembra non interferire quindi con la normale funzionalità dell'apparato fotosintetico, ma piuttosto determinare la presenza di corpi globulari di probabile natura lipidica e la presenza di un discreto numero di strutture vacuolari.
- Nella fase di crescita stazionaria, invece, nelle colture trattate con TCS si rilevano modificazioni ultrastrutturali caratteristiche di una situazione di stress:
 - Presenza di numerosi granuli di amido accumulati tra le membrane tilacoidali del cloroplasto.
 - Comparsa di corpi globulari elettrondensi di probabile natura lipidica.
 - Aumento della vacuolizzazione nelle cellule trattate con funzione di compartimentazione e detossificazione.

Non essendo ancora definito completamente l'impatto di questo biocida nell'ecosistema marino in primis, e sugli altri ecosistemi poi, sarebbe opportuno limitare l'uso di queste sostanze nocive in maniera persistente, evitando possibili effetti a cascata dovuti alla forte persistenza, impossibilità di rimozione completa dagli impianti di depurazione ed accumulo del Triclosan, ricordando che:

*“La distruzione è la volontà di un uomo, ma anche la prevenzione è la volontà di un uomo.
La scelta di un uomo è quella tra distruzione e prevenzione”.*
(Babu Rajan)

BIBLIOGRAFIA

Adolfsson-Erici M., Petterson M., Parkonnen J., Struve J., 2002. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, 46: 1485-1489.

Almeida A.C., Gomesa T., Langforda K., Thomasa K.V., Tollefsena E., 2017. Oxidative stress in the algae *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to biocides. *Aquatic Toxicology*, 189: 50-59.

Bedoux G., Benoit R., Olivier T., Dupont V., Le Bot B., 2011. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science Pollutant Research*, 19:1044–1065.

Bistoni F., Mencacci A., Cenci E., Montecarlo I., Giuliobello M., Goretti M., 2008. Produzione di idrogeno: impiego dell'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. *La termotecnica*, Settembre 2008: 65-69.

Carsten von der Ohe P., Schmitt-Jansen M., Slobodnik J., Brack W., 2012. Triclosan- the forgotten priority substance? *Environmental Science Pollutant Research*, 19: 585–591.

Ceccato G. (2013), Risposte morfo-fisiologiche di *Chlamydomonas reinhardtii* a diverse concentrazioni di ibuprofene. Tesi di laurea in Biologia Evoluzionistica, Università degli studi di Padova.

Chinese NEPA, 1990. Algal growth inhibiting test. *Chinese Chemical Industry Press*, Beijing, pp.168-178.

Coogan M.A., Edziyie R.E., La Point T.W., Venables B.J., 2007. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere*, 67(10):1911-1918.

Dangeard P.A., 1888. Recherches sur les algues inférieures. *Annales des Sciences Naturalles*.

Deng X., Fei X., Li Y., 2011. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella*. *Full Length Research Paper*, 5: 260-270.

Dhillon G.S., Kaur S., Pulicharla R., Satinder K.B., Cledón M., Verma M., Surampalli M., 2015. Triclosan: Current Status, Occurrence, Environmental Risks and Bioaccumulation Potential. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12: 5657-5684.

- Fang J.L., Stingley R.L., Beland F.A., Harrouk W., Lumpkins D.L., Howard P., 2010. Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of Triclosan. *Journal of Environment Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 28 (3): 147-171.
- Feng C., Ying G., Yi-Bing M., Chen Z., Lai H., Peng F., 2014. Field dissipation and risk assessment of typical personal care products TCC, TCS, AHTN and HHCB in biosolid-amended soils. *Science of The Total Environment*, Volumes 470–471: 1078-1086.
- He H., Yu J., Chen G., Li W., He J., Li H., 2012. Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cladoceran *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 91-96.
- Hu S., Lau K.W.K., Wu M., 2001. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*, 161: 987-996.
- Huang K., Kunkel T., Christoph F. Beck, 2004. Localization of the Blue-Light Receptor Phototropin to the Flagella of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biology of Cell*; 15(8): 3605–3614.
- Kuster M., Alda M. J. L., Hernando M. D., Petrovic M., Martìn-Alonso J., Barcelò D., 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluent, river water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*, 358:112-123.
- Larsson D.J., De Pedro C., Paxeus N., 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148: 751-755.
- Nishikawa K., Yamakoshi Y., Uemura I., Tominaga N., 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, 44 (2): 253–259.
- Pasqua G., Abbate G., Forni C., 2015. Botanica generale e biodiversità vegetale, Ed. Piccin, pag. 345-347.
- Pigato I., 2017. Risposte fisiologiche di *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard a diverse concentrazioni di Triclosan. Tesi di laurea triennale in Scienze e Tecnologie per l'ambiente, Università degli studi di Padova.
- Pinckney J., Thompson L., Hylton S., 2017. Triclosan alterations of estuarine phytoplankton community structure. *Marine Pollution Bulletin*, 119: 162-168.
- Proschold T., Harris E., Coleman A.W., 2005. Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 170: 1601-1610.
- Schroda M., Lodha M., Schulz-Raffelt M., 2007. Heat shock factor 1 is a key regulator of the stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, 52(2):286-295.

Wilson B.A., Smith V.H., Denoyelles F., Larive C.K., 2003. Effects of three Pharmaceutical and Personal Care Products on natural freshwater algal assemblages. *Environmental Science and Technology*, 37: 1713-1719.

SITOGRAFIA:

<http://remf.dartmouth.edu/images/algaeTEM>, 29/10/2017.

<https://www.epa.gov/nepa>, 26/11/2017.

<https://www.fda.gov>, 26/11/2017.

<https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/index.htm>, 30/10/2017.

http://ww2.unime.it/dipfisica/Tesine/Microscopia_ottica.htm, 25/11/2017.

http://www.hk-phy.org/atomic_world; 2017.

<https://goldbook.iupac.org/pdf/T06481.pdf>, 29/10/2017.

<http://www.ing.unitn.it/~berloffa/tem/index.html>, 26/11/2017.

<http://users.unimi.it/cmena/microscopio/met.htm>, 26/11/2017.

<http://www.algaebase.org>, 30/09/2017.