

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Ambientali: tutela e gestione delle risorse naturali

- Ciclo XX -

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: BIO/09

TITOLO TESI

*Strategie di monitoraggio mediante biomarker e organismi
sentinella applicate a zone umide e costiere*

Curriculum: sistemi ambientali costieri come ecotone terra-mare

Presentata da: *Filippo Donnini*

Coordinatore Dottorato

Prof. Carlo Ferrari

Relatore

Prof. Elena Fabbri

Esame finale anno 2008

indice

1. INTRODUZIONE

- 1.1. le zone umide costiere
- 1.2. biomonitoraggio, biomarker e organismi sentinella

2. SCOPO DELLA TESI

3. MATERIALI E METODI

- 3.1. gli organismi sentinella
- 3.2. i biomarker
- 3.3. Analisi dei dati: *Sistema Esperto*

4. ATTIVITA' SVOLTA

- 4.1. esperimenti di laboratorio
 - 4.1.1. effetto del mercurio e metilmercurio
 - 4.1.2. effetto della salinità
 - 4.1.3. effetto del propranololo
- 4.2. campagne di biomonitoraggio
 - 4.2.1. comacchio 2004; 2005
 - 4.2.2. arpa-cipe 2004; 2005
 - 4.2.3. Pialassa Baiona
 - 4.2.3.1. baiona 2003
 - 4.2.3.2. valutazione dei tempi di espressione e recupero dei biomarker
 - 4.2.3.3. baiona 2007

5. RISULTATI SPERIMENTALI e DISCUSSIONE

- 5.1. esperimenti di laboratorio
 - 5.1.1. effetto del mercurio e metilmercurio
 - 5.1.2. effetto della salinità
 - 5.1.3. effetto del propranololo
- 5.2. campagne di biomonitoraggio
 - 5.2.1. comacchio 2004; 2005
 - 5.2.2. arpa-cipe
 - 5.2.3. Pialassa Baiona
 - 5.2.3.1. baiona 2003
 - 5.2.3.2. valutazione dei tempi di espressione e recupero dei biomarker
 - 5.2.3.3. baiona 2007

6. CONCLUSIONI

1. Introduzione

*Le zone umide costiere –
Biomonitoraggio, biomarker e organismi sentinella –*

1.1le zone umide e costiere

Con l'espressione "zona umida" si intende in genere una serie di ambienti naturali, naturalizzati e persino artificiali, anche molto diversi tra loro e accomunati da una sola caratteristica: la presenza di acqua, sia essa dolce, salmastra, salata, corrente o ferma.

In questo senso potrebbero essere zone umide anche i laghi, le paludi, le lagune, gli stagni, i corsi d'acqua, le torbiere, gli invasi artificiali, le cave, le saline, le risaie.

Il concetto di zona umida oggi comunemente accettato è stato definito in una conferenza internazionale tenutasi nel 1971 a Ramsar , in Iran e che dava la seguente definizione:

“Ai sensi della presente Convenzione si intendono per zone umide le paludi e gli acquitrini, le torbe oppure i bacini, naturali o artificiali, permanenti o temporanei, con acqua stagnante o corrente, dolce, salmastra, o salata, ivi comprese le distese di acqua marina la cui profondità, durante la bassa marea, non supera i sei metri. Ai sensi della presente convenzione si intendono per uccelli acquatici gli uccelli ecologicamente dipendenti dalle zone umide.”

In passato le zone umide erano considerate luoghi malsani, portatrici di malaria e altre malattie. Paludi, stagni e acquitrini hanno rappresentato per secoli nell’immaginario collettivo desolazione e solitudine. In realtà non vi è nulla di più inesatto: chiunque abbia vissuto direttamente a contatto con un ambiente umido, sa che in queste zone di transizione la vita esplode in tutta la sua variabile diversità.

Eppure fino a non molto tempo fa l’unico destino di queste aree, associate all’immagine dell’insalubrità, era la bonifica. In Epoca romana e all’inizio del Medioevo, le zone umide occupavano vaste aree del territorio italiano ed europeo. Vasti tratti di costa, e non soltanto in prossimità delle foci dei fiumi, erano paludose. Nel tempo le bonifiche hanno interessato territori sempre più estesi, allo scopo di risanare ambienti dove era diffusa la malaria e per ottenere terreni coltivabili.

Ora che la bonifica non è più una necessità né igienica né economica e che la malaria è stata eliminata in molte zone del mondo, si guarda alle zone umide con un'attenzione diversa.

Le acque di transizione sono ambienti che costituiscono il passaggio naturale tra terra e mare; per la loro posizione, al confine tra questi due ambienti, sono considerati ecosistemi unici e molto produttivi attorno ai quali gravitano numerose attività antropiche. Queste aree sono ambienti molto complessi da analizzare in quanto vi sono numerosi fattori che concorrono a renderli molto variabili; la morfologia di ogni singola area infatti viene influenzata dalle variazioni annuali, stagionali ed anche giornaliere, sia climatiche (umidità, piogge, temperatura, venti) che fisico-chimiche (salinità, ossigeno, composizione ionica). Questi elementi a loro volta si influenzano a vicenda, definendo particolari condizioni di eterogeneità spaziale e temporale nelle stesse aree; si vengono così a creare numerosi gradienti come quello di salinità con maggiore salinità verso il mare e minore risalendo verso l'interno del bacino; la variazione è poi più o meno accentuata a seconda della morfologia del bacino e della presenza o meno di fiumi e sbocchi al mare. L'alta variabilità produce ricchezza e diversità di habitat e di biocenosi e un ambiente tanto produttivo da essere utilizzato da specie permanenti e migratorie come nursery, per la protezione che offrono e l'abbondanza di cibo che vi si trova. La presenza di grandi biomasse con alta produzione primaria e secondaria rende tali ambienti economicamente importanti dal punto di vista antropico per la pesca, l'acquacoltura e le altre attività.

Nel bacino Adriatico gli ecosistemi acquatici di transizione (foci fluviali, lagune e acque salmastre costiere), hanno un ruolo chiave nella mitigazione delle pressioni derivanti dalle attività antropiche piuttosto che nel loro trasferimento agli ecosistemi marini costieri. Questi ecosistemi sono vere e proprie "isole" nel paesaggio costiero, con spiccata valenza naturalistica e storico - socio culturale (vi si pratica la pesca da tempi antichissimi) e hanno caratteristiche di eterogeneità che, per il controllo del loro stato di salute, richiedono una definizione specifica di modelli concettuali e strumenti metodologici appropriati. A queste caratteristiche intrinseche del bacino Adriatico e degli ecosistemi acquatici di transizione corrisponde una frammentarietà del sapere scientifico e di competenze,

tra Amministrazioni, Agenzie e Istituti di ricerca: una eterogeneità di stato socio-economico e di prospettive di sviluppo tra differenti comunità locali, regioni e stati, che rende problematica una adeguata gestione.

Le acque di transizione, proprio per la grande variabilità e presenza di diversi gradienti, sono molto fragili e soggette facilmente a crisi distrofiche; queste rappresentano il livello più grave di un lungo processo che inizia con alte produzioni primarie e di biomassa vegetale, elevato consumo di ossigeno fino ad arrivare alla completa anossia con produzione di idrogeno solforato e morie diffuse delle specie in tutti gli habitat presenti. Ciò avviene generalmente per effetto sinergico di un insieme di condizioni, che si verificano durante la stagione estiva e in bacini a basse profondità, quali le alte temperature e la stagnazione delle acque per scarso ricambio idrico.

Le specie selezionate per le aree salmastre sono quelle capaci di sopportare bene gli stress e sono sia caratteristiche esclusive di questi ecosistemi sia popolazioni di specie appartenenti all'ambiente marino o dulcacquicolo che hanno sviluppato adattamenti particolari a queste condizioni. In casi di stress ambientali, come cattiva gestione o sfruttamento eccessivo di questi ambienti, sedimentazione eccessiva, aumento del livello marino e crisi distrofiche, si verifica una diminuzione qualitativa di specie con perdita di biodiversità e aumento di individui della stessa specie in modo esponenziale. Lo sfruttamento non regolato può portare ad aumento di salinizzazione delle acque e dei terreni circostanti sia a causa dell'estrazione incontrollata delle acque per l'irrigazione agricola che determina afflusso di acqua marina per filtrazione, sia per l'uso di fertilizzanti nelle acque irrigue che vanno ad arricchirsi di sostanza organica.

Le problematiche relative alla tutela ed alla salvaguardia delle aree umide sono venute prepotentemente alla ribalta negli ultimi decenni, dopo che, come precedentemente accennato, si era assistito nel tempo ad una loro drastica riduzione attraverso opere di bonifica e di colonizzazione agraria.

Durante gli ultimi 40 anni, la conservazione degli ambienti umidi e delle acque di transizione è stato riconosciuto come priorità a livello nazionale ed internazionale

con parecchi atti (es. Federal Water Pollution Control Act, USA, 1972), convenzioni (es. Ramsar Convention, 1977) e iniziative (es. Mediterranean Wetland Initiative, 1991). Oggi l'importanza degli habitat umidi è ampiamente riconosciuta. Essi ricoprono più del 10% delle coste del mondo, forniscono servizi essenziali come il mantenimento della composizione dell'atmosfera, rappresentano habitat chiave per le specie migratorie e costituiscono inoltre importanti zone di nursery. Infine, data la loro posizione, sono esposti ai sottoprodotti del metabolismo del 40% della popolazione del mondo che vive entro 100Km dalla costa.

In tale quadro e nell'ottica della protezione ambientale, con il D.P.R. n.48 del 13 marzo 1986, l'Italia ha dato esecuzione alla convenzione di Ramsar, già sottoscritta il 16 Febbraio 1971. In base a questo vincolo, da quella data nessun lago, stagno o palude è stato prosciugato nel territorio nazionale.

Sia il D.Lgs.152/99 che la Direttiva Quadro europea sulle Acque (Water Framework Directive 2000/60/EC) forniscono, in Italia ed in Europa, un quadro istituzionale anche per il monitoraggio della acque superficiali e sotterranee e degli ecosistemi di transizione in particolare. Lo scopo generale di questi strumenti legislativi è realizzare lo stato ecologico buono di tutti i corpi idrici significativi entro il 2015-2016.

In particolare, ai sensi del D.Lgs.152/99 la classificazione della acque lagunari e gli stagni costieri è valutata in relazione al numero di giorni di anossia/anno. Tale risultato deve essere, inoltre, integrato con i risultati delle analisi relative ai sedimenti ed al biota.

L'esecuzione della WFD richiede, invece, le definizioni della tipologia e dello stato ecologico dell'ecosistema e l'identificazione sia degli attuali descrittori (fisico-chimici e biologici) dello stato ecologico che delle loro caratteristiche scale di variazione. I descrittori e le scale relativi alla tipologia sono alla base del monitoraggio dello stato ecologico degli ecosistemi acquatici.

Così come le zone umide, anche la fascia costiera è un ambiente particolarmente sensibile e complesso.

Il costante aumento dello sfruttamento delle risorse naturali da parte dell'uomo, insieme alla progressiva occupazione di spazi ed alla modifica del territorio, è un fenomeno che interessa tutte le società industrializzate e, in particolar modo, quelle che da più tempo hanno un alto tasso di sviluppo. Certamente i paesi europei, compresi quelli dell'area mediterranea, sono fra questi ed una delle zone dove le ripercussioni sull'ambiente si sono ampiamente manifestate è la fascia costiera. Infatti, questa è una zona privilegiata, da una parte, per gli intensi scambi commerciali attraverso le vie di comunicazione marittime, dall'altra rappresenta un ambiente sostanzialmente limitato e ristretto, nel quale gli equilibri, già naturalmente delicati, sono sottoposti a forti pressioni.

Il riflesso di tutto ciò si ha nella consistente alterazione delle caratteristiche naturali delle nostre coste ed un progressivo inquinamento delle acque marine, soprattutto costiere: questi fenomeni, a loro volta, rischiano di mettere in crisi molte delle economie su cui si fondano le popolazioni rivierasche e non solo. Da ciò la necessità di un continuo monitoraggio sull'ambiente marino costiero, al fine di valutare lo stato di salute degli ecosistemi in rapporto alle possibili fonti di inquinamento.

Il quadro normativo italiano in tema di acque è stato recentemente modificato dal D.Lgs. 152/1999 e relative disposizioni correttive ed integrative (D.Lgs. 18/08/2000 n. 258), che hanno apportato diverse innovazioni circa la tutela delle acque superficiali, sotterranee e marine. Per quanto riguarda le acque di transizione il D.Lgs. 152/1999 al punto 3.5.1. osserva che le attuali conoscenze ed esperienze di studio (definizione, precisa delimitazione, parametri da monitorare, modalità e frequenza dei campionamenti, ecc.) non sono sufficienti.

1.2 Il monitoraggio ambientale

Il problema dell'inquinamento è stato per anni affrontato valutando il tipo, la quantità e in taluni casi la tossicità teorica dei singoli composti chimici quali ad esempio idrocarburi, pesticidi e metalli pesanti. Tale approccio, mediante metodiche "tradizionali" basate su analisi chimiche di tipo analitico, grazie alle moderne tecniche di analisi, consente spesso l'identificazione e la valutazione di

minime concentrazioni di sostanze tossiche, ma presenta notevoli difficoltà pratiche amplificate quando l'ambiente oggetto di studio è un ambiente acquatico:

- le alterazioni ambientali si verificano spesso in presenza di basse concentrazioni di inquinanti, propagati da sorgenti puntiformi o diffuse spesso discontinue;
- le sostanze inquinanti immesse nell'ambiente subiscono spesso trasformazioni difficilmente prevedibili;
- le masse d'acqua sono in continuo movimento e le caratteristiche dell'ambiente in esame sono repentinamente modificate;
- la concentrazione degli inquinanti calcolata per una imponente massa d'acqua può risultare modesta, mentre la salute degli organismi può esserne ugualmente minacciata;
- gli inquinanti possono avere effetti sinergici deleteri per gli organismi viventi, pur essendo presenti ciascuno a bassa concentrazione.

Attualmente, il D.Lgs 152/2006 pone l'attenzione sul monitoraggio e classificazione delle acque tra cui quelle di transizione per l'identificazione dello stato ecologico in funzione degli obiettivi di qualità ambientale. Tra gli elementi da identificare per la classificazione dei corpi idrici sono stati individuati indicatori biologici quali fitoplancton, macroinvertebrati bentonici e fauna ittica.

L'uso di specifici bioindicatori per la valutazione della qualità ambientale è alla base della definizione di "biomonitoraggio ambientale".

Con il termine biomonitoraggio si intende la regolare e sistematica valutazione delle condizioni dell'ambiente mediante un insieme di metodiche scientifiche, che utilizzano specie animali o vegetali per misurare l'impatto degli agenti inquinanti sull'ambiente stesso. Tali metodiche forniscono una valutazione globale degli effetti dannosi esercitati sugli organismi viventi e soprattutto permettono di considerare gli eventuali effetti di sinergia che possono instaurarsi nel caso della presenza contemporanea di più sostanze o effetti a lungo termine di esposizione anche a basse concentrazioni.

Infatti, in ecosistemi inquinati le sostanze tossiche alterano lo stato di salute degli organismi provocando una sindrome da stress, cioè un'alterazione misurabile dello stato fisiologico indotta da un cambiamento ambientale che rende gli organismi più vulnerabili ad ulteriori variazioni ambientali (Viarengo et al., 1998).

La sindrome da stress può essere opportunamente quantificata mediante l'utilizzo d'opportuni indici di stress, noti anche con il termine di "biomarker"

1.2.1 Biomarker

Con il termine biomarker vanno intese le risposte che un organismo, una popolazione, o una comunità naturale può generare, nei confronti di uno stress chimico ambientale. Ciascuna di queste rappresenta un segnale integrato del livello di contaminazione di una determinata area e, di conseguenza, costituisce un indicatore del livello di rischio tossicologico a cui una determinata popolazione naturale può essere sottoposta.

Tra le varie definizioni coniate può essere citata quella formulata dalla National Academy of Science (NRC, 1989) che descrive il biomarker "quella variazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico"

E' altrettanto interessante la definizione di biomarker ecotossicologico coniato da Depledge (1989) che lo definisce come "quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione), la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti (e/o radiazioni)."

Tale variazione può fornire informazioni sia qualitative che semiquantitative sulla natura dell'insulto, sia sulla connessione consequenziale fra effetti biologici e livelli di contaminazione ambientale. Uno dei concetti fondamentali su cui si basa questo approccio metodologico riguarda l'intercorrelabilità degli effetti di un contaminante ai vari livelli di organizzazione strutturale (Bayne et al., 1985). La tossicità primaria di un contaminante si esercita, in linea generale, a livello biochimico e molecolare (modificazioni di attività enzimatiche, alterazioni a

livello del DNA, ecc.), e solo successivamente gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, ai livelli successivi dell'organizzazione gerarchica, organello, cellula, tessuto, organismo, fino a giungere a livello di popolazione (McCarthy e Shugart, 1990, Depledge e Fossi, 1994) permettendoci quindi di individuare prematuramente (“early warning”) una possibile situazione ambientale critica prima che tale situazione induca effetti irreparabili sulla biodiversità.

I biomarkers, in generale possono essere suddivisi in due grandi categorie in funzione della loro specificità di risposta nei confronti degli agenti inquinanti in “biomarker specifici” e “biomarker generali”:

biomarker generali

che traducono una risposta dell'organismo a un insieme di inquinanti, senza consentire di determinare la natura dei singoli componenti. Si tratta, per esempio, del tempo di sopravvivenza all'aria dei mitili (test dello stress su stress), della stabilità della membrana lisosomiale, dell'accumulo delle lipofuscine e della determinazione dei lipidi neutri nelle ghiandole digestive dei mitili;

biomarker specifici

che traducono una risposta dell'organismo a una famiglia di inquinanti. Si tratta, per esempio, delle metallotionine che sono delle proteine che possono essere indotte dai metalli pesanti.

La variabilità biologica degli organismi determina che l'analisi di un singolo biomarker sia difficilmente in grado di rispondere in maniera corretta ai quesiti posti dal programma di biomonitoraggio sulla qualità ambientale; un dato parametro può essere soggetto alla variabilità insita negli organismi viventi e può fornire talvolta risultati ambigui, causando sovrastime o sottostime degli effetti sulle biocenosi. Per una maggior efficacia dei saggi biologici nella valutazione

della qualità ambientale è necessario, quindi, l'impiego di una batteria di biomarker al fine di produrre un risultato integrato, che da un lato minimizzi gli effetti della variabilità biologica e dall'altro sia confermato da più di una indagine.

1.2.2 Organismi sentinella

Per organismo sentinella si intende, in genere, un qualsiasi organismo (o insieme di organismi) che, mediante risposte identificabili a condizioni di stress, sia in grado di fornirci informazioni sulla qualità dell'ambiente e sui suoi cambiamenti; di conseguenza si definisce come biomarker quella risposta o quelle risposte che un organismo sentinella manifesta verso agenti stressori.

La presenza (attuale, pregressa, momentanea, costante, ecc.) in ambiente di uno o più agenti inquinanti determina, quindi, variazioni misurabili della fisiologia, della morfologia o della distribuzione di un determinato organismo. Tali variazioni possono essere manifestate in modi diversi: accumulo di sostanze inquinanti; modificazioni a livello morfologico, fisiologico e funzionale; modificazioni delle comunità viventi a livello del numero di specie e al numero di individui per singola specie.

Si adotta quindi un nuovo approccio metodologico basato sulla valutazione delle risposte che un organismo, una popolazione o una comunità naturale può generare, nei confronti di uno stress ambientale (Fossi, 1998; Fossi, 2000).

Dimostrata l'importanza di questi bioindicatori, uno degli obiettivi della ricerca scientifica che in questi anni si è orientata nello sviluppo e nell'applicazione delle metodologie di biomonitoraggio tramite biomarker è stato l'individuazione di un pool di organismi con specifiche caratteristiche che li rendano idonei ad essere utilizzati rutinariamente ed efficacemente nelle campagne di biomonitoraggio.

Le caratteristiche essenziali per fare di questi organismi delle vere e proprie "sentinelle ambientali" sono:

- Optimum ecologico ed ampia distribuzione nell'area di studio.
- Adeguate conoscenze sull'anatomia, fisiologia ed ecologia della specie.

- facilità nel reperimento, nel trasporto e nell'utilizzo;
- deve essere in grado di reagire al complesso delle alterazioni ambientali presenti sul territorio da esaminare e non presentare una particolare sensibilità ad un solo fattore inquinante;
- sensibilità agli inquinanti, ma non tale da precludere la sopravvivenza;
- ciclo vitale lungo, notevole resistenza agli stress naturali e accrescimento continuo.

1.2.3 Biomonitoraggio ambientale

L'obiettivo del biomonitoraggio ambientale è quello di stimare (strumento "diagnostico"), prevedere (strumento "prognostico") e, di conseguenza, evitare eventi inaccettabili a livello ecologico, come l'insuccesso riproduttivo o l'incremento della mortalità nell'ambito di una popolazione, attraverso l'utilizzo di "segnali precoci" di esposizione o di effetto.

In sintesi, l'utilizzo di biomarkers permette in primo luogo di "diagnosticare", attraverso lo studio delle risposte immediate (induzione sistemi detossificanti, inibizioni, attività enzimatiche, formazione prodotti metabolici, alterazioni del DNA, ecc.) il tipo e/o i tipi di contaminanti ai quali l'organismo bioindicatore è sottoposto, i livelli "semi quantitativi" dell'esposizione, e successivamente, in funzione dell'intercorrelabilità degli effetti ai vari livelli di complessità strutturale, "pronosticare" e quindi prevedere il verificarsi di effetti negativi a lungo termine anche su scala ecologica. (Fossi, 2000).

E' importante sottolineare quella che è ritenuta la migliore prerogativa dei programmi di biomonitoraggio condotti mediante organismi sentinella e biomarker, ossia che essi, pur non fornendo indicazioni dirette sul tipo di contaminazione ambientale, tuttavia informano in maniera precoce dell'avvenuta esposizione ad inquinanti, permettendo interventi a breve termine e la messa a punto di adeguati programmi di gestione sostenibile dell'ambiente in esame.

Nel valutare le risposte ottenute da questo approccio metodologico si deve però tenere presente che esistono, oltre ai contaminanti eventualmente presenti nell'ambiente, altri fattori di tipo fisiologico, comportamentale o ambientale che

possono alterare il segnale fornito dalle analisi sui bioindicatori e portare ad interpretazioni errate. Alcune reazioni enzimatiche, ad esempio, subiscono modificazioni in funzione dello stato ormonale, dell'età, della dimensione e del sesso dell'organismo. Questi limiti possono però essere superati con una buona conoscenza delle caratteristiche fisiologiche e del ciclo vitale e riproduttivo dell'organismo sentinella.

Grazie anche all'ausilio di efficaci sistemi di interpretazione dei dati (es. Sistema Esperto, Dagnino et al., 2007), ad oggi si può ritenere che il biomonitoraggio tramite biomarker sia uno strumento disponibile ed utilizzabile per la valutazione sistematica della salute ambientale. Gli utenti finali sono sia ricercatori scientifici ma anche e soprattutto agenzie di protezione ambientale ed enti locali.

2. scopo della tesi

Gli ecosistemi acquatici di transizione hanno un ruolo chiave nella mitigazione delle pressioni derivanti dalle attività antropiche; costituiscono il passaggio naturale tra terra e mare e perciò hanno caratteristiche di eterogeneità tali che, per il controllo del loro stato di salute, richiedono una definizione specifica di strategie di monitoraggio. Sono ambienti molto complessi, caratterizzati da una estrema instabilità, e quindi variabilità, difficilmente prevedibile o controllabile. Queste caratteristiche fanno sì che nessuna tipologia di analisi, utilizzata singolarmente, possa fornire informazioni inequivocabili per definire la qualità dell'ambiente inteso nella sua complessità. A queste caratteristiche intrinseche degli ecosistemi acquatici di transizione corrisponde una frammentarietà del sapere scientifico e di competenze che ne rende problematica una adeguata gestione.

Obiettivo di questa ricerca è implementare ed ottimizzare le strategie di biomonitoraggio nelle zone umide e costiere attraverso l'individuazione di procedure di campionamento basate su metodologie standardizzate che diano risposte univoche e facilmente interpretabili.

La definizione di efficaci strategie di monitoraggio può contribuire alla definizione di una metodica di analisi ambientale utilizzando organismi sentinella e biomarker che sia fondamentale come supporto e integrazione di politiche di valutazione della qualità e gestione ambientale delle acque di transizione.

Le indagini condotte e le metodologie applicate hanno avuto i seguenti scopi:

- Aumentare la conoscenza della fisiologia degli organismi sentinella (risposte a stress naturali e antropici, risposte adattative, fluttuazioni stagionali, ecc)
- Valutazione degli effetti di specifici contaminanti
- Scelta e potenziamento della batteria di biomarker
- Applicazione di campagne di biomonitoraggio in ambienti differenti
- Definizione di procedure operative in termini di periodi, siti di campionamento, mezzi per il trapianto
- Valutazione critica ed interpretazione dei risultati

Gli strumenti utilizzati per il perseguimento di tali obiettivi sono:

- 3 esperimenti in laboratorio
- 8 campagne di biomonitoraggio sul campo
- acquisizione e approfondimento di nuove metodologie presso laboratori d'eccellenza.

3. materiali e metodi

Gli organismi sentinella –

I biomarker –

Analisi dei dati: il “Sistema Esperto” –

3.1 gli organismi sentinella

Con il termine di “bioindicatore” o “organismo sentinella” si definisce un qualsiasi organismo (animale o vegetale) che può essere utilizzato come indicatore del livello di contaminazione di un determinato ambiente. La scelta di uno specifico organismo sentinella, come ho precedentemente accennato (§ 1.2) è motivata da svariati fattori, primo fra tutti l’ambiente che vogliamo indagare: per la valutazione della qualità dei suoli vengono utilizzati i vermi terricoli (*Lumbricus rubellus*, *Eisenia fetida*) mentre per la valutazione della qualità ambientale delle acque interne possono essere utilizzati pesci (es. *Cyprinus carpio*) o molluschi di acqua dolce (es. *Unio pictorum*).

Quando parliamo invece di acque marine, gli organismi sentinella più utilizzati nei programmi di biomonitoraggio sono molluschi sessili filtratori.

Essi sono in grado di assumere gli inquinanti presenti nell’acqua o nel particolato che rappresenta la loro dieta e di attuare risposte adattative allo stress chimico misurabili ai fini del monitoraggio ambientale. Sono stati testati e utilizzati a tal fine vongole (es. *Chamelea gallina*, *Thapes philippinarum*), ostriche (es. *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*) o mitili (es. *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*). (Bebiano et al., 2004; Piano et al., 2002; Rodriguez-Ortega et al., 2002)

I mitili, in particolare, manifestano diversi prerequisiti che li rendono ottimali per svolgere la funzione di organismi sentinella anche in ambienti particolari come quelli di transizione: sono abbondanti e ampiamente distribuiti nelle diverse regioni del mondo; si raccolgono facilmente, sono ben maneggiabili e trasportabili; sono sessili e filtratori; tollerano bene gli stress ambientali a cui sono esposti in ambienti difficili come quelli costieri (ad es. variazioni di temperatura e di salinità); sono sensibili all’inquinamento e attuano risposte misurabili in maniera relativamente semplice.

Uno dei primi obiettivi della mia ricerca è stato quello di identificare, attraverso applicazioni dirette e ricerche bibliografiche, l’organismo sentinella più idoneo ad essere utilizzato in campagne di biomonitoraggio di ambienti lagunari e costieri.

3.2 i biomarker

Nei programmi di biomonitoraggio viene utilizzata una batteria di biomarker, non un biomarker singolo, per ovviare alla variabilità tipica delle risposte biologiche (UNEP/RAMOGGE, 1999).

Uno degli obiettivi della ricerca è stato quindi mettere a punto una “batteria” di biomarker affidabili, facilmente riproducibili e capaci di fornire indicazioni quanto più precise possibili sulla qualità ambientale di ambienti di transizione. A tal proposito ho testato e applicato i seguenti biomarker:

- la valutazione della stabilità della membrana lisosomiale LMS (metodo istochimico e NRRT): biomarker generico sullo stato di salute dell'organismo;
- la valutazione dell'accumulo dei lipidi neutri insaturi (LIP) nei lisosomi: biomarker generico;
- la valutazione dell'accumulo di lipofuscine (LIF) nei lisosomi: biomarker generico;
- la valutazione del rapporto lisosomi/citoplasma (Lis/cit): biomarker generico;
- la valutazione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE); biomarker specifico per pesticidi e metalli pesanti;
- la valutazione dell'attività dell'enzima catalasi (CAT); biomarker generico
- la valutazione dell'attività dell'enzima acetil CoA ossidasi (AOX); poco studiato, sembra essere un biomarker specifico per composti organici xenobiotici;
- la valutazione del contenuto di metallotioneine nei tessuti (MT): biomarker specifico per i metalli pesanti;
- la valutazione della percentuale di sopravvivenza: biomarker generico;
- la valutazione della sopravvivenza all'aria o Stress su Stress (SoS): biomarker generico;
- la valutazione dei livelli di cAMP (2 metodi) (cAMP): potenziale biomarker

I metodi utilizzati sono i seguenti:

3.2.1 Stabilità delle membrane lisosomiali (metodo istochimico)

Per la valutazione della LMS le ghiandole digestive dei mitili devono essere prelevate, risciacquate in una soluzione di NaCl 3,5% e posizionate su di un apposito supporto da criostato in alluminio (chucks). Le ghiandole sui chucks vengono poi congelate in N-esano raffreddato a -70°C con azoto liquido e conservate a -80°C. Per le analisi sono state ottenute sezioni di ghiandole digestive dello spessore di 10 µm con un criostato mantenuto a -30°C (MICROM HM 505 N) e posizionate su vetrini da microscopia.

La LMS è stata valutata seguendo il metodo descritto nei protocolli UNEP/RAMOGGE (1999).

I vetrini sono stati incubati a 37°C con un tampone di labilizzazione (0.1 M Na-citrato, pH 5.5) per diversi tempi (0, 3, 5, 10, 15, 20, 40 minuti) e successivamente in un mezzo di reazione contenente naphthol As -Bi N-acetyl-β-D-glucosaminide per 20 minuti a 37°C. I vetrini sono stati poi risciacquati in NaCl 3%, trasferiti in tampone fosfato contenente FastVioletB per 10 minuti a temperatura ambiente, risciacquati in acqua corrente per 5 minuti e fissati con gelatina glicerinata.

Il prodotto di reazione dovuto all'attività dell' N-acetyl-β- hexosaminidase è stato poi quantificato utilizzando un microscopio ottico (Leitz DM RB, Leitz Wetzlar, Germany) ad un ingrandimento di 40x e analizzando l'immagine con il software Scion Image v Beta 4.0.2. (Scion Corporation Frederick, MD, USA) seguendo la procedura descritta da Domouhtsidou and Dimitriadis (2001).

3.2.2 Stabilità delle membrane lisosomiali (NRRT)

La valutazione del NRRT è stato fatto seguendo la procedura descritta in Dailianis et al. (2003) con piccole modificazioni. In breve, gli emociti prelevati con una siringa dal muscolo adduttore dei mitili sono posizionati su di un vetrino da microscopia con poly-L-lisina (1:10 con acqua distillata) per facilitare l'adesione cellulare al substrato. Ai vetrini, dopo essere stati incubati in una camera umida, è stata aggiunta la soluzione di Neutral Red (20mg/ml in DMSO). L'eccesso di soluzione è stata eliminata dopo 15 minuti. I vetrini, sempre mantenuti in camera umida, vengono poi analizzati con un microscopio ottico a vari tempi. IL tempo in corrispondenza del quale si rileva l'evidenza di una perdita di colore dei lisosomi

determinata dalla sua fuoriuscita in almeno il 50% delle cellule analizzate, corrisponde al tempo di destabilizzazione delle membrane lisosomiali.

3.2.3 Accumulo di lipofuscine nei lisosomi

Per la valutazione del contenuto di lipofuscine nei lisosomi ho seguito la procedura descritta nella LMS per la preparazione dei vetrini. Il contenuto di LIF è stato determinato utilizzando la reazione di Schmorl (Pearse, 1972). Le sezioni di ghiandole digestive posizionate sui vetrini sono state fissate in calcio formolo per 15 minuti a 4°C e successivamente immerse per 5 minuti nel mezzo di reazione contenente una soluzione acquosa di cloruro di ferro (1%) a ferrocianuro di potassio (1%) in un rapporto 3:1 (v/v). Le sezioni sono state poi immerse in acido acetico 1% e sciacquate in acqua distillata prima di essere fissate con gelatina glicerinata. I vetrini sono stati poi sottoposti ad analisi d'immagine come descritto per la LMS. I risultati sono espressi in unità arbitraria.

3.2.4 Accumulo di lipidi neutri nei lisosomi

Per la valutazione del contenuto di lipidi neutri insaturi nei lisosomi ho seguito la procedura descritta nella LMS per la preparazione dei vetrini. Le sezioni sono state fissate in calcio formolo per 15 min a 4°C e trasferite poi in trietilfosfato 60% (v/v con acqua distillata) per 3 min. Le sezioni sono state poi colorate in una soluzione 1% di Oil Red in trietilfosfato 60% per 15 min al buio, poi trasferite ancora in trietilfosfato 60% per 30 secondi, sciacquate in acqua distillata e montate con gelatina glicerinata. I vetrini sono stati poi sottoposti ad analisi d'immagine come descritto per la LMS. I risultati sono espressi in unità arbitraria.

3.2.5 Rapporto lisosomi/citoplasma

Il rapporto lisosomi/citoplasma viene determinato utilizzando il programma di analisi di immagine Scion Image v Beta 4.0.2. (Scion Corporation Frederick, MD, USA) utilizzando le stesse sezioni ottenute per la LMS.

3.2.6 Attività dell' acetilcolinesterasi

L'attività è stata valutata nelle branchie dei mitili come descritto da Valbonesi et al. (2003). Le branchie sono state omogeneizzate in tampone fosfato 0,1 M freddo e centrifugate a 9000xg a 4°C per 30 min. Il suranante è stato poi incubato a 25°C in un volume finale di 1,2 ml contenente tampone fosfato 100mM pH 7,4, acetiltiocolina 0,5mM (ASCh) e DTNB 0,33mM (Ellman et al., 1961). L'attività dell'enzima è stata infine quantificata spettrofotometricamente a 405 nm seguendo la reazione per 10 min. La concentrazione delle proteine è stato valutato con il metodo di Lowry et al. (1951). I risultati sono riportati come $\text{nmol}^{-1} \text{mg}$ di proteine⁻¹.

3.2.7 Attività della catalasi

L'attività dell'enzima Catalasi (CAT) è stato misurata spettrofotometricamente valutando la diminuzione di assorbanza a 240nm dovuta al consumo di H₂O₂. La preparazione dei campioni e le condizioni di reazione sono adattate da Lushchak et al. (2001).

3.2.8 Attività dell Acetyl CoA ossidasi

Per la valutazione dell'attività dell'AOX abbiamo seguito il metodo descritto in Cancio et al. (1998). Le ghiandole digestive sono state omogeneizzate in 4 volumi di TVBE buffer (1mM NaHCO₃, 1mM EDTA, 0.1% etanolo, 0.01% Triton, pH 7.6), gli omogenati centrifugati per 15 min (500g, 4°C). Il SN è stato poi aggiunto nel mezzo di reazione per la valutazione dell'attività dell'enzima (2% tampone fosfato di potassio 0.5M, pH 7.4 contenente 2% di una soluzione leuco-DCF, 1% HRP 1200 U/mL, 1% sodio azide 4M, and 0.02% Triton X-100) precedentemente scongelato a 25°C. 1% Palmitoyl-CoA 3mM è stato poi aggiunto come substrato. L'assorbanza è stata registrata spettrofotometricamente a 502nm. L'attività dell'AOX è espressa in $\text{mU mg protein}^{-1}$

3.2.9 Accumulo di metallotioneine

Per la valutazione del contenuto di MT, le ghiandole digestive sono state omogeneizzate in un buffer Tris-HCl 20mM pH 8 contenente sucrosio 0,5M, leupeptina 0,006 mM, PMSF (phenyl-methyl-sulphonylfluoride) 0,5mM e β -mercaptoetanololo 0,01%. Il contenuto di MT è stato poi determinato seguendo il metodo di Viarengo et al. (1997) utilizzando il reattivo di Ellman DTNB (Ellman et al., 1961). L'assorbanza finale è stata misurata a 410nm, utilizzando glutatione come standard di riferimento.

3.2.10livelli di cAMP

La valutazione dei livelli di cAMP è stata fatta seguendo il metodo di Brown et al. (1971). Per la preparazione del campione da analizzare sono stati utilizzati due metodi:

metodo 1:

I tessuti sono prelevati e omogeneizzati in una soluzione di EDTA 4mM, bolliti per 5 min e centrifugati per 5 min a 16000xg e 4°C. Il surnatante è stato congelato e conservato a -20°C.

metodo 2:

I tessuti sono stati prelevati e conservati in una soluzione di PCA10% a 4°C. Il tessuto è stato successivamente omogeneizzato, centrifugato a 16000xg per 20 min a 4°C ed il surnatante neutralizzato con un opportuna quantità di soluzione di carbonato di potassio 1M. I campioni sono stati nuovamente centrifugati a 16000xg per 10 min ed il SN conservato a 4°C.

3.2.11Stress su stress (sopravvivenza all'aria)

E' stato valutato il tempo medio di sopravvivenza all'aria dei mitili posizionati in ambiente controllato a 14°C.

3.3analisi dei dati: il Sistema Esperto

Uno dei problemi che in questi anni hanno di fatto contribuito a limitare l'applicazione delle metodiche di biomonitoraggio con biomarker in studi di valutazione sistematica della qualità ambientale finalizzata ad un utilizzo semplice e razionale da parte di enti locali o agenzie di protezione ambientale, è stato la difficoltà nel riordinare, riassumere ed esporre in modo semplice e chiaro i risultati dei numerosi biomarker utilizzati in una campagna.

Ad oggi è stato creato e testato un efficace strumento di analisi dei risultati il cui fine è diventare un semplice ma preciso strumento di supporto decisionale: il SISTEMA ESPERTO è infatti un software in grado di integrare i risultati dei biomarker in un indice di stress su 5 livelli (Dagnino et al., 2007).

Il SE si basa fondamentalmente su 5 passaggi:

1. Scelta della batteria di biomarker basata su 3 livelli di organizzazione biologica (cellula, tessuto, organismo) (fig. 3.1)
2. Individuazione di un controllo e calcolo del fattore di alterazione rispetto al controllo (Fig. 3.2.)
3. Determinazione del fattore di alterazione (se significativo si calcola rispetto a dei valori soglia specifici per ogni biomarker)
4. applicazione di un algoritmo basato su una serie di regole "if...then"
5. output: individuazione dello stato di salute dell'ambiente attraverso un indice di stress su 5 livelli (A-B-C-D-E) (fig. 3.3.).

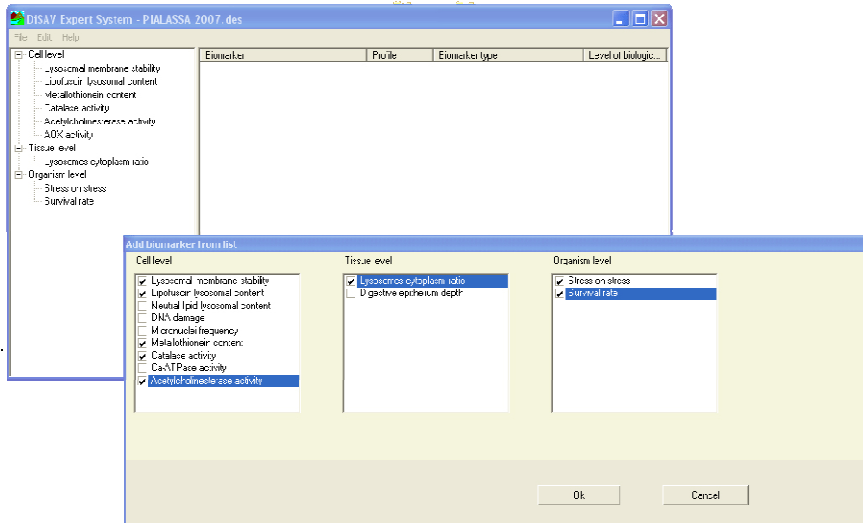


Fig. 3.1. Sistema esperto: scelta della batteria dei biomarker

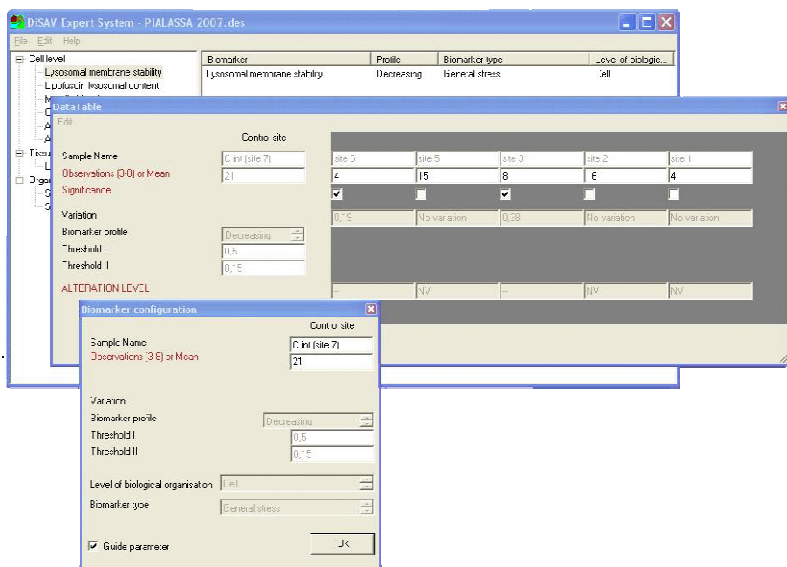


Fig. 3.2. Sistema esperto: inserimento dati

	CONTROL	site 6	site 5	site 3	site 2	site 1
Stress Level	A	D	C	D	A	D
Presence of organic xenobiotic	NO	YES	YES	YES	NO	YES
Genotoxic effects	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Presence of heavy metals	NO	NO	NO	YES	NO	YES

Fig. 3.3. Sistema esperto: output

4. Attività sperimentale

*Esperimenti di laboratorio –
Campagne di biomonitoraggio –*

4.1 esperimenti di laboratorio

4.1.1 Effetto di mercurio e metilmercurio

Il mercurio è un contaminante tossico, persistente e generalmente distribuito in ambiente.

Esso ha la tendenza a formare composti organometallici ancora più tossici come il metilmercurio, che è considerato la forma neurotossica più pericolosa del mercurio (Baatrup, 1991).

Il mercurio ed i suoi composti, quando biodisponibili per gli organismi acquatici, possono essere accumulati lungo la catena alimentare: alte concentrazioni vengono riscontrate in molluschi e pesci i quali, consumati dall'uomo, possono avere effetti dannosi nei soggetti più esposti e vulnerabili. Proprio per i rischi per l'uomo e per gli ecosistemi, la contaminazione da mercurio e i suoi composti è stata approfonditamente studiata negli ultimi decenni.

Obiettivo

Si suppone che le differenti caratteristiche chimiche del mercurio organico e inorganico influiscano direttamente sulla tossicità totale in un ambiente contaminato da mercurio. Per questo motivo l'obiettivo di questo esperimento è stimare e confrontare gli effetti del mercurio (Hg) e del metilmercurio (MeHg) su alcune funzioni fisiologiche nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) esponendoli a concentrazioni "ambientali".

Organismo sentinella

Per questo esperimento ho utilizzato come organismo sentinella i mitili della specie *Mytilus galloprovincialis*.

Una delle caratteristiche peculiari degli organismi bivalvi è la capacità di accumulare e tollerare contaminanti metallici e organici. I tassi di bioaccumulo e eliminazione di Hg e MeHg sono stati infatti stimati in questi animali (Gagnon and Fisher, 1997; Kljakovic-Gaspic et al., 2006): il mercurio è principalmente accumulato nelle ghiandole digestive mentre il metilmercurio raggiunge concentrazioni simili in tutti i tessuti (Kljakovic-Gaspic et al., 2006). In questi organismi è stato inoltre valutato che l'efficienza netta di accumulo dall'acqua è

nettamente maggiore per il metilmercurio (fino al 50%) che per il mercurio (circa 1%), dovuta alla maggiore efficienza di accumulo del metilmercurio unita ad una minore efficienza di escrezione (Mikac et al., 1996).

Biomarker

I biomarker che ho scelto di utilizzare sono stati la stima dei livelli di cAMP nel mantello, la valutazione dell'attività dell'AChE nelle branchie e dell'AOX nelle ghiandole digestive e la quantificazione del contenuto di MT nella ghiandola digestiva

Questi parametri fisiologici sono stati selezionati per la loro implicazione nei processi di omeostasi e citoprotezione (Viarengo et al., 2000; Diaz-Enrich and Ibarburen, 2003).

Il contenuto di MT e l'attività dell'AChE e dell'AOX sono biomarker utilizzati per la valutazione della qualità ambientale (Viarengo et al., 2007) e la loro differente sensibilità al mercurio organico e inorganico è perciò un importante tema da approfondire.

Allo stesso modo è di particolare interesse valutare i possibili effetti dei due contaminanti sui livelli di cAMP.

Il nucleotide gioca un ruolo cruciale nella mobilitazione delle riserve energetiche finalizzate alla gametogenesi nei mitili (Diaz-Enrich and Ibarburen, 2003) ed è anche implicato nella modulazione delle funzioni cardiovascolari, nella motilità di differenti organi e nello "spawning" (per le referenze vedi Fabbri and Capuzzo, 2006). Interessanti studi mostrano che i livelli di cAMP aumentano nei tessuti di *M. galloprovincialis* esposti in ambienti contaminati (Dailianis et al., 2003) o a particolari composti chimici in ambiente controllato (Raftopoulou et al., 2006; Fabbri and Capuzzo, 2006), facendo del cAMP un potenziale biomarker per la valutazione dell'inquinamento ambientale (Dailianis and Kolayanni, 2007). Il presente esperimento potrebbe fornire interessanti risposte sull'effetto del mercurio e del metilmercurio sui livelli di cAMP.

Metodo

I mitili (*M. galloprovincialis*) sono stati prelevati da una popolazione naturale a circa 15 miglia dalla costa emiliano-romagnola il 19 maggio 2005. Gli organismi

sono stati selezionati per taglia (4 ± 1 cm) e immediatamente trasportati in laboratorio in contenitori con acqua di mare ossigenata. In laboratorio gli organismi sono stati acclimatati 1 settimana a temperatura controllata (15°C) in acqua di mare artificiale (33 psu) filtrata e ossigenata.

Al termine del periodo di adattamento 30 organismi sono stati analizzati (tempo 0, T0): le ghiandole digestive e la branchie sono state velocemente prelevate, congelate in azoto liquido e conservate a -75°C mentre il mantello dopo essere stato prelevato è stato immediatamente utilizzato per la determinazione dei livelli di cAMP.

Contemporaneamente 90 organismi sono stati suddivisi in tre contenitori ognuno dei quali contenente 15 litri di acqua di mare artificiale a 33 psu (0,5 L per mitilo). Gli organismi nei tre contenitori sono stati utilizzati rispettivamente come controlli (CTRL), contaminati con mercurio (Hg) o con metilmercurio (MeHg). L'acqua è stata cambiata quotidianamente ma sempre mantenuta a 15°C e 33 psu. Il mercurio e il metilmercurio sono stati somministrati quotidianamente in quantità tali da avere una concentrazione finale rispettivamente di $20\mu\text{g/L}$ e $0.2\mu\text{g/L}$ (fig. 4.1.)

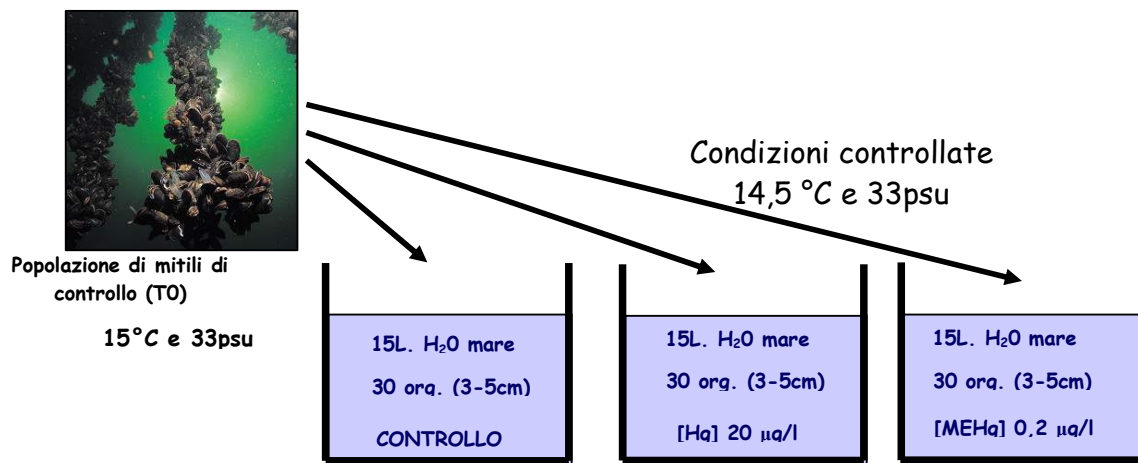


Fig. 4.1. condizioni sperimentali

I contaminanti sono stati somministrati contemporaneamente al cibo (cibo liquido per filtratori a base di plankton, SERA Coraliquids) per promuovere l'assorbimento grazie all'aumento dell'attività filtratoria come suggerito da Riisgard et al. (1987).

Per le analisi 10 organismi per ogni contenitore sono stati prelevati dopo 5, 10 e 20 giorni e processati come il T0.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata fatta tramite one-way ANOVA (SigmaStat, SPSS) utilizzando il test di Holm-Sidak come post-hoc test ($P < 0,05$).

4.1.2 Effetto della salinità

Alcuni studi sono stati condotti per valutare gli effetti della salinità sull'espressione di alcune funzioni fisiologiche in particolari organismi: l'attività enzimatica del copepode *Eurytemora affinis* e del bivalve *Crassostrea rhizophore* sembrano essere influenzate da variazioni di salinità (Cailleaud et al., 2007; Zaccaron da Silva et al., 2005) mentre un interessante studio effettuato da Pfeifer et al. (2005) mostra come l'attività dell'AChE risulti essere significativamente e negativamente correlata con la salinità nei mitili. Risulta quindi evidente l'importanza di approfondire la conoscenza sugli effetti e le possibili interferenze della salinità sull'espressione dei biomarker in particolar modo quando le indagini sono effettuate in ambienti come le zone umide e costiere in cui i fattori chimico-fisici come la salinità sono estremamente variabili.

Obiettivo

L'obiettivo di questo esperimento è valutare i possibili effetti della salinità su alcuni biomarker ed in diversi tessuti al fine di definire protocolli affidabili per ogni tipo di ambiente.

Organismo sentinella

Per questo esperimento ho utilizzato come organismo sentinella i mitili della specie *Mytilus galloprovincialis*. Il *M. galloprovincialis* ha la capacità di sopravvivere ed adattarsi ad un ampio range di salinità e grazie anche a questa sua caratteristica viene rutinariamente utilizzato in ambienti con caratteristiche differenti e con salinità differenti: mare aperto, costa, lagune salmastre.

Biomarker

I biomarker che ho scelto di utilizzare sono stati la stima dei livelli di cAMP nel mantello e nelle branchie, la valutazione dell'attività dell'AChE nelle branchie e nelle ghiandole digestive e la quantificazione del contenuto di MT nelle branchie e nelle ghiandole digestive.

Il contenuto di MT e l'attività dell'AChE sono biomarker utilizzati per la valutazione della qualità ambientale di mare, coste e lagune costiere e una possibile influenza della salinità sulla loro specifica espressione nei vari tessuti target, è perciò una questione fondamentale da approfondire per una corretta interpretazione dei risultati.

Allo stesso modo è di particolare interesse valutare i possibili effetti della salinità sui livelli di cAMP sia nelle branchie che nel mantello visti i pochi dati a disposizione riguardanti l'influenza dei fattori ambientali sui livelli di questo importante nucleotide.

Metodo

I mitili (*M. galloprovincialis*) sono stati prelevati da una popolazione naturale a circa 10 miglia dalla costa emiliano-romagnola il 15 marzo 2007. Le caratteristiche dell'acqua nella zona di prelievo erano 33,5 psu e 11,5 °C. Gli organismi sono stati selezionati per taglia (6 ± 1 cm) e immediatamente trasportati in laboratorio in contenitori con acqua di mare ossigenata. In laboratorio gli organismi sono stati acclimatati 1 settimana a temperatura controllata (15°C) in acqua di mare filtrata e ossigenata.

Al termine del periodo di adattamento 30 organismi sono stati analizzati (tempo 0, T0): le ghiandole digestive e la branchie sono state velocemente prelevate, congelate in azoto liquido e conservate a -75°C mentre il mantello e parte delle branchie dopo essere state prelevate sono state immediatamente utilizzate per la determinazione dei livelli di cAMP.

Contemporaneamente 240 organismi sono stati suddivisi in tre contenitori ognuno dei quali contenente 40 litri di acqua di mare artificiale (0,5 L per mitilo) rispettivamente a 25 psu (LOW), 33 psu (MEDIUM) e 38 psu (HIGH) (fig. 4.2.)

contenitori aerati e filtrati (f. biologico e meccanico)

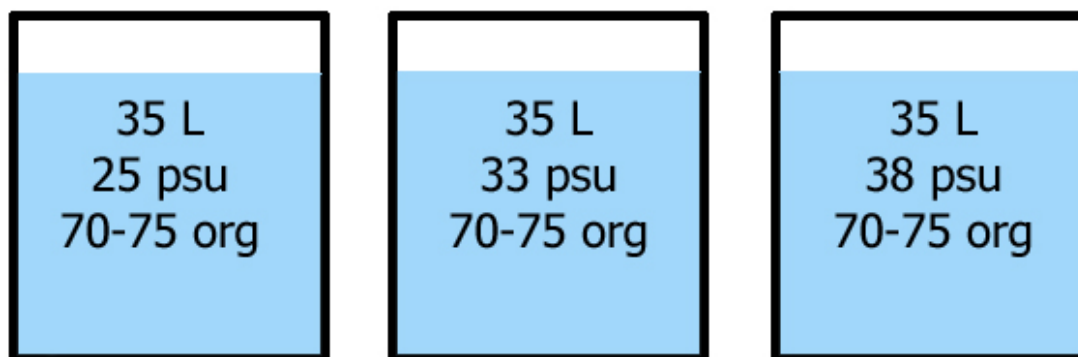


Fig. 4.2. adattamento alle 3 salinità

Dopo 15 giorni 20 organismi per contenitore sono stati prelevati, trattati come il T0 e utilizzati per valutare l'effetto della variazione della salinità sull'espressione dei biomarker (AL, AM, AH). Contemporaneamente gli altri organismi sono stati suddivisi in 4 gruppi da 15 individui per ogni salinità e posizionati in 4 contenitori da 7,5 L di acqua di mare artificiale alla stessa salinità. Di questi gruppi di organismi 2 sono stati utilizzati come controlli e 2 sono stati esposti ad una concentrazione costante di mercurio (HgCl_2 ; $30\mu\text{g/L}$) (fig. 4.3.).

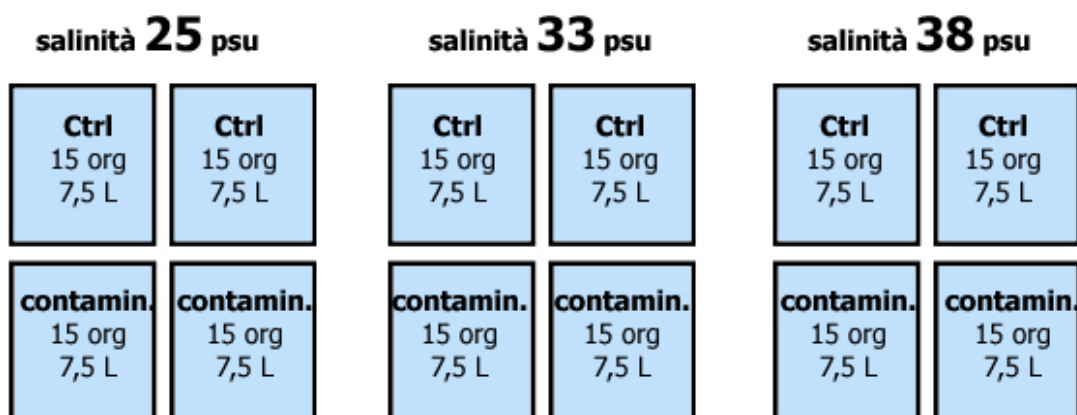


Fig. 4.3. Esposizione al mercurio

L'acqua è stata cambiata quotidianamente ma sempre mantenuta a 15° . Il mercurio è stato somministrato quotidianamente e contemporaneamente al cibo (cibo liquido per filtratori a base di plankton, SERA Coraliquids) per promuovere l'assorbimento grazie all'aumento dell'attività filtratoria come suggerito da Riisgard et al. (1987).

Dopo 15 giorni dei 15 organismi contenuti nei 12 contenitori 10 sono stati prelevati e trattati come il T0 (CL, CM e CH per i controlli e EL, EM e EH per gli esposti) per valutare la risposta dei biomarker ad un agente inquinante alle diverse salinità.

I restanti organismi sono stati posizionati in contenitori con acqua di mare artificiale alle 3 salinità per valutare il recupero degli organismi esposti (RCL, RCM, RCH per i controlli e REL, REM e REH per gli esposti) (fig.4.4.) e prelevati dopo 7 giorni.

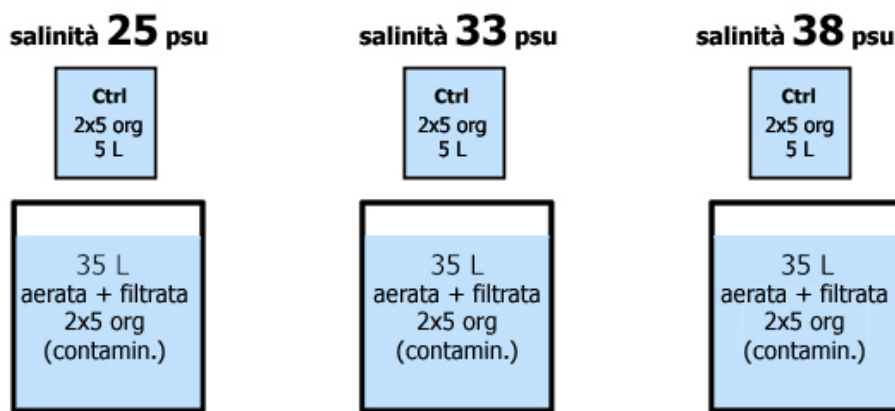


Fig. 4.4. Fase di recupero

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata fatta quando possibile tramite one-way ANOVA (SigmaStat, SPSS) utilizzando il test di Holm-Sidak come post-hoc test ($P < 0,05$) oppure tramite T-test. Per le correlazioni lineari è stato utilizzato il test di Pearson.

4.1.3 Effetto del propranololo

Negli ultimi decenni la maggior attenzione dei ricercatori, delle amministrazioni e dell'opinione pubblica si è accentrata su quei contaminanti chimici "prioritari" di cui si conosce bene l'effetto tossico come i pesticidi, i metalli pesanti o contaminanti organici xenobiotici prodotti dall'industria chimica. Purtroppo questa è solo una parte delle molecole di cui si è accertato un effetto nocivo per l'uomo o l'ambiente o di cui non si conosce il destino. Esiste una classe di composti chimici bioattivi che riceve in generale poca attenzione riguardo ai potenziali rischi per

l'uomo o l'ambiente che comprende i residui dei prodotti farmaceutici o per la cure del corpo (PPCPs)

Ogni anno in tutto il mondo sono utilizzate grandi quantità PPCPs i cui residui, tonnellate di sostanze farmacologicamente attive, raggiungono continuamente i corpi idrici attraverso scarichi civili, industriali, zootecnici, impianti di acquacoltura o depuratori. Il problema dei PPCPs è quindi diventato di attualità nell'ottica di valutare gli effetti di queste sostanze estremamente attive una volta rilasciate in ambiente.

Il Propranololo in particolare è un agente beta-bloccante principalmente usato nel trattamento dell'ipertensione.

Obiettivo

L'obiettivo di questo esperimento è fare una prima valutazione dei possibili effetti di concentrazioni "ambientali" di propranololo su alcuni parametri fisiologici nel *Mytilus galloprovincialis*. In particolare sui livelli di cAMP la cui produzione è funzionalmente legata all'attività dell'adenilato ciclasi, che è a sua volta stimolata dalle proteine G a cui sono accoppiati i recettori beta che vengono "bloccati" dal propranololo.

Organismo sentinella

Per questo esperimento ho utilizzato come organismo sentinella i mitili della specie *Mytilus galloprovincialis*. Questo organismo è il più utilizzato e per questo anche il più conosciuto dal punto di vista fisiologico e comportamentale. Essendoci in bibliografia pochi dati sull'effetto del propranololo e addirittura non essendo a conoscenza di alcun dato sugli effetti di questo farmaco sui mitili, è stato fondamentale utilizzare un organismo di cui si conoscono molto bene i processi fisiologici ai fini di una corretta interpretazione dei risultati.

Biomarker

I biomarker che ho scelto di utilizzare sono stati la stima dei livelli di cAMP nel mantello e nelle branchie e la valutazione della stabilità della membrana lisosomiale nell'emolinfa (NRRT). La valutazione dei livelli di cAMP sia nelle branchie che nel mantello è stato scelto proprio per il collegamento tra il "destino" biochimico di beta-bloccante del propranololo e l'implicazione dei recettori beta

nei processi di formazione del nucleotide. Interessante correlare le variazioni di cAMP con la stabilità delle membrane lisosomiali per valutare se gli effetti del propranololo possano avere delle ripercussioni sullo stato di salute generale dell'organismo.

Metodo

I mitili (*M. galloprovincialis*) sono stati prelevati da una popolazione naturale a circa 5 miglia dalla costa emiliano-romagnola il 17 ottobre 2007.

Gli organismi sono stati selezionati per taglia (5 ± 1 cm) e immediatamente trasportati in laboratorio in contenitori con acqua di mare ossigenata. In laboratorio gli organismi sono stati acclimatati 1 settimana a temperatura controllata (15°C) in acqua di mare artificiale (33 psu) filtrata e ossigenata.

Al termine del periodo di adattamento 20 organismi sono stati analizzati (tempo 0, T0): le ghiandole digestive e la branchie sono state velocemente prelevate, congelate in azoto liquido e conservate a -75°C mentre l'emolinfa prelevata con una apposita siringa dal muscolo adduttore è stata immediatamente utilizzata per il NRR test.

Contemporaneamente 30 organismi sono stati suddivisi in tre contenitori ognuno dei quali contenente 5 litri di acqua di mare artificiale (0,5 L per mitilo) a 33 psu. Gli organismi nei contenitori sono stati utilizzati rispettivamente come controlli (CTRL), esposti ad una soluzione di propranololo 10^{-9} M (A) ed esposti ad una soluzione di propranololo 10^{-7} M.

Dopo 10 giorni gli organismi sono stati prelevati e analizzati come il T0.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata fatta tramite one-way ANOVA (SigmaStat, SPSS) utilizzando il test di Holm-Sidak come post-hoc test ($P < 0,05$).

4.2 campagne di biomonitoraggio

4.2.1 comacchio 2004; 2005

Le Valli di Comacchio costituiscono il più vasto complesso di zone umide salmastre della regione Emilia Romagna e sono state istituite zona RAMSAR dal 1981 (DM 13/07/1981, pubblicato sulla GU n. 203 del 25/07/1981). Il sistema vallivo è separato dal mare da una serie di cordoni sabbiosi per un tratto di circa 2,5 Km, e le comunicazioni con il mare avvengono attraverso il canale di Porto Garibaldi, il Canale Logonovo e il Canale Bellocchio-Gobbino. Le profondità sono assai variabili con una media di 60cm e con massimi di 2,0 m. I fondali sono per lo più costituiti da argille, limi e materiali bioclastici, più raramente da sabbie. La salinità è variabile nel corso dell'anno, diversa da un bacino all'altro e talvolta anche nell'ambito di uno stesso bacino, sia per motivi meteo-climatici (evaporazione e precipitazione) sia per il regime idraulico che viene utilizzato nei singoli casi.

La struttura del sistema idrografico ed idrogeologico che caratterizza l'area di studio, è determinata dalla presenza dei seguenti elementi: ambienti umidi e salmastri, rete idrografica naturale e artificiale, acque di falda, canali di comunicazione con il mare. Le Valli di Comacchio risultano idraulicamente isolate dal reticolo idrografico limitrofo ad eccezione di limitati apporti dal fiume Reno, di esigui scambi tramite Valle Fattibello, e di scambi per filtrazione con corpi idrici di superficie limitrofi; mentre maggiori risultano essere gli scambi per filtrazione con la falda freatica, e attraverso i canali con il mare (fig.4.5.).

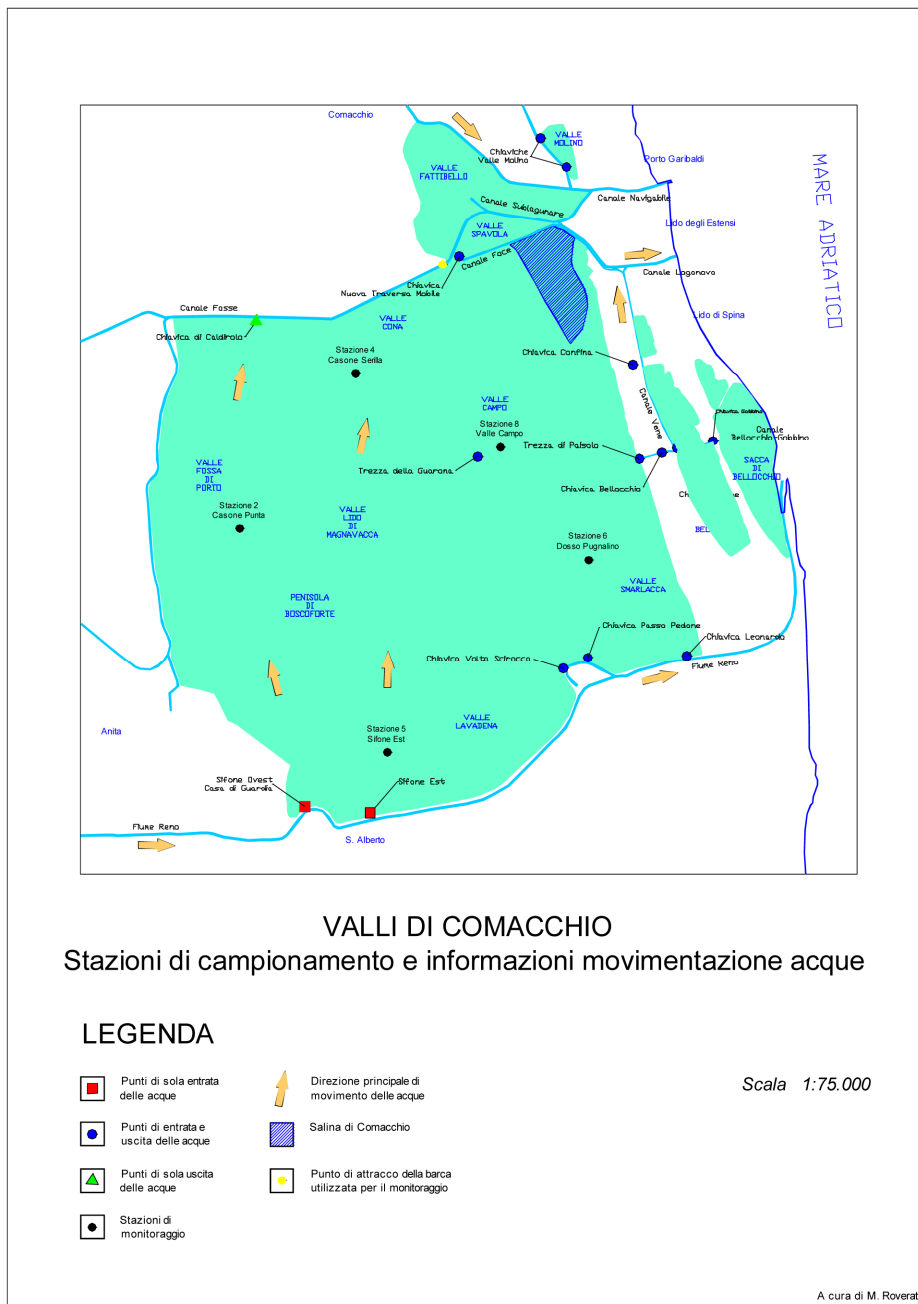


Fig. 4.5. Valli di Comacchio, movimentazione delle acque e stazioni di campionamento

In particolare è all'interno del piccolo nucleo costituito da Valle Fattibello e valli limitrofe (fig. 4.6.), dei suoi rapporti con l'entroterra e con il mare, che si giocano gran parte delle sorti idrauliche e nel contempo ambientali-naturalistiche delle residue valli di Comacchio.

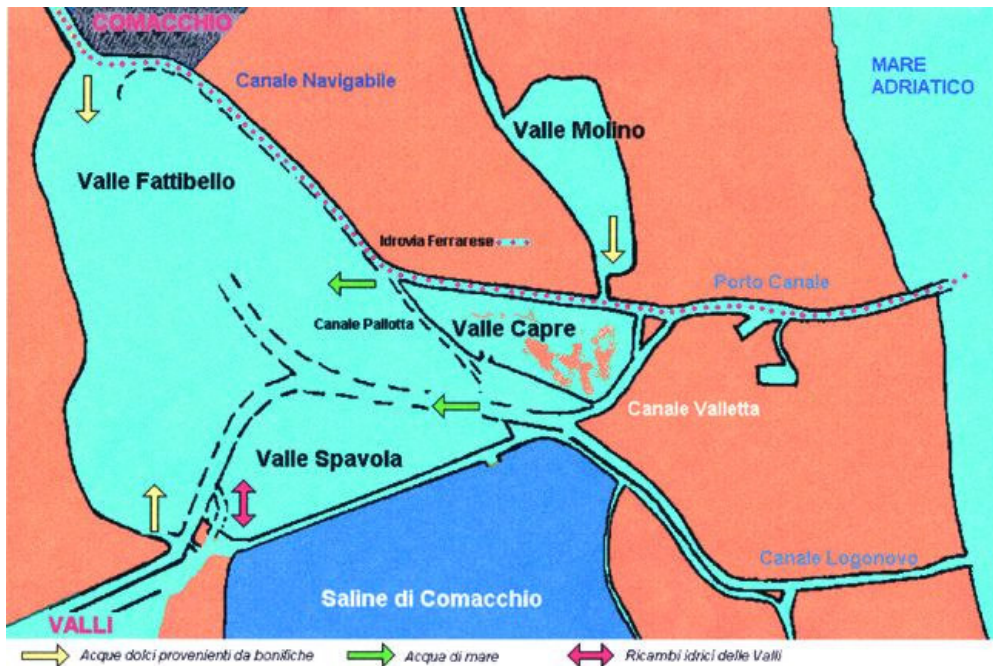


Fig. 4.6. Valle Fattibello e limitrofe, scambi idrici
 (http://www.regione.emilia-romagna.it/laguna/immagine_dettaglio.asp?id_img=1483)

Campionamento

All'interno delle valli di Comacchio sono state condotte due campagne di biomonitoraggio: a luglio 2004 (A) e luglio 2005 (B). Sia per la campagna A che per quella B sono stati utilizzati gruppi di organismi (*Mytilus galloprovincialis*) prelevati da pescatori professionali sui piloni degli impianti di estrazione metaniferi in mare Adriatico all'altezza di Marina di Ravenna a circa 20 miglia dalla costa. Tale zona di prelievo è monitorata periodicamente dall'ARPA che l'ha definita zona A (D.L. n. 530 del 30/12/1992: attuazione direttiva CEE n. 91/492). I mitili prelevati da tale zona possono essere destinati al consumo umano diretto senza dover subire nessun processo di risanamento. La taglia scelta è stata di 4 ± 1 cm.

In entrambi i campionamenti (A e B), gli organismi raccolti sono stati immediatamente suddivisi in 6 gruppi di 80 individui e inseriti nelle apposite reti da acquacultura. I restanti organismi sono stati immediatamente sezionati, i tessuti prelevati e congelati per le successive analisi. Tali organismi sono serviti da *controllo - tempo 0*. Nel caso del biomonitoraggio infatti, quando non è possibile utilizzare anche un controllo interno, vengono utilizzati i mitili al tempo 0, cioè lo

stato iniziale quando gli organismi non sono stati ancora esposti all'insulto e quindi si ritengono essere in una condizione di benessere. I 6 gruppi di mitili sono stati poi trapiantati appesi ad appositi pali infissi nel substrato in 3 siti differenti. Per ogni sito sono stati posizionati 2 gruppi.

In A i siti prescelti sono stati denominati FOCE, GOBBINO e BOSCOFORTE (fig. 4.7. - rosso) ed i mitili trapiantati sono stati prelevati dopo 10gg e 30gg.

In B abbiamo deciso di mantenere il periodo di campionamento ma variare due siti, abbiamo così posizionato i mitili nei siti denominati FOCE, FATTIBELLO e CAMPO (fig. 4.7. - verde). I mitili sono stati prelevati dopo 7gg e 30gg.

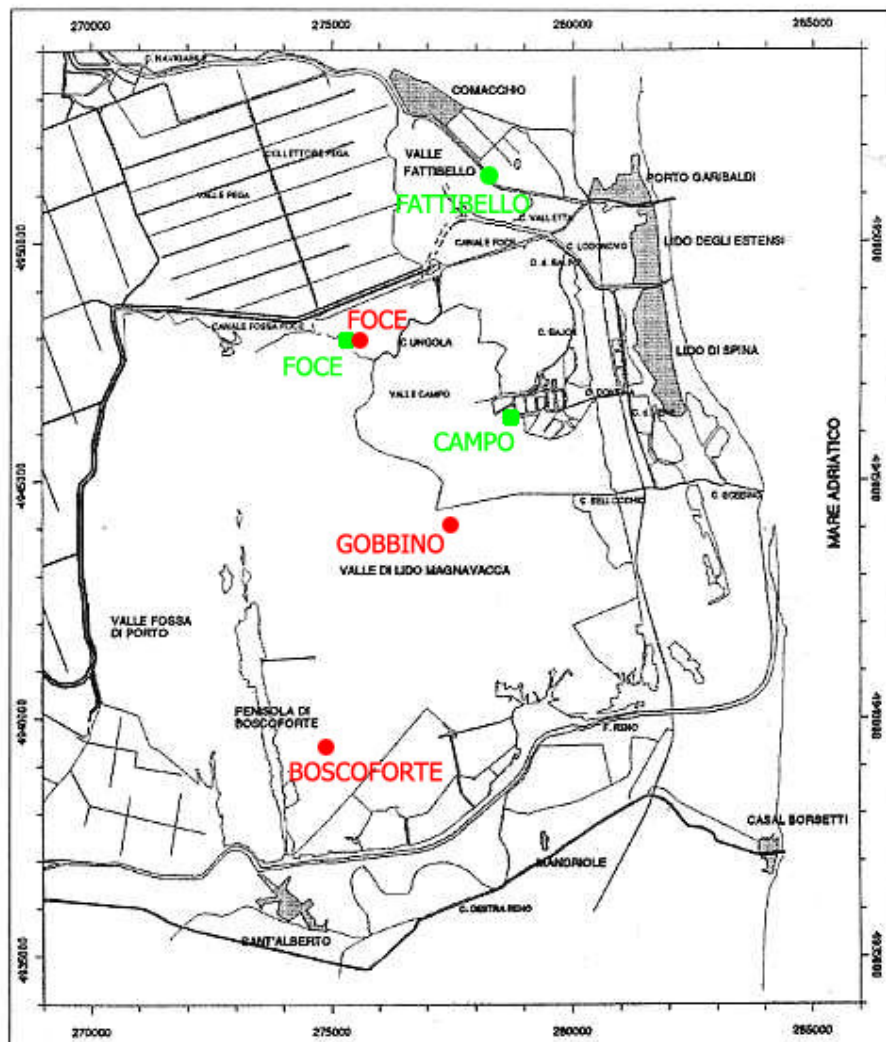


Fig. 4.7. siti di campionamento: campagna A in rosso; campagna B in verde

Scelta dell'organismo sentinella

L'organismo sentinella scelto è stato *Mytilus galloprovincialis*, sulla base del fatto che è ampiamente distribuito in Adriatico, è l'organismo più utilizzato nei progetti internazionali di biomonitoraggio ambientale ed è stato recentemente e diffusamente utilizzato in maniera proficua nel biomonitoraggio della Pialassa Baiona all'interno del "Protocollo d'Intesa per un Programma di Monitoraggio e Risanamento della Pialassa Baiona" in collaborazione con CIRSA, Comune e Provincia di Ravenna, Consorzio per Parco del Delta del Po, ARPA e AUSL. Un ulteriore punto a favore del suo utilizzo nelle valli di Comacchio è che qui sono riscontrabili popolazioni residenti.

Scelta dei biomarker

Durante le nostre campagne di biomonitoraggio sono state scelte le seguenti batterie di biomarker:

A:

- Mortalità
- Stabilità delle membrane lisosomiali (SML)
- Accumulo di lipidi neutri insaturi nei lisosomi (LIP)
- Accumulo di lipofuscine nei lisosomi (LIF)
- Contenuto di metallotioneine nelle ghiandole digestive (MT)
- Attività dell'enzima acetilcolinesterasi nelle branchie (AChE)

B:

- Mortalità
- Stabilità delle membrane lisosomiali
- Accumulo di lipofuscine nei lisosomi
- Contenuto di metallotioneine nelle ghiandole digestive
- Attività dell'enzima acetilcolinesterasi nelle branchie

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata fatta tramite one-way ANOVA (SigmaStat, SPSS) utilizzando il test di Holm-Sidak come post-hoc test ($P < 0,05$).

4.2.2 ARPA – progetto CIPE 2004; 2005

La fascia costiera è un ambiente particolarmente sensibile e complesso: rappresenta un ambiente sostanzialmente limitato e ristretto, nel quale gli equilibri, già naturalmente delicati, sono sottoposti a forti pressioni. In particolare l'area settentrionale e centrale dell'Adriatico è alle prese con una situazione ambientale che necessita di un'attenzione particolare e di azioni che permettano di poter salvaguardare la prospettiva di un territorio e di una risorsa marina di qualità.

La localizzazione lungo le coste di attività altamente inquinanti come le industrie petrolchimiche e le raffinerie, lo sviluppo di un'agricoltura con forte impiego di sostanze chimiche, una eccessiva concentrazione di impianti per la produzione zootecnica lungo i corsi d'acqua principali (a partire dal Po, che scarica in Adriatico il 40% delle acque reflue dell'intero territorio italiano), un aumento esponenziale degli insediamenti costieri civili e produttivi, una elevatissima concentrazione spazio-temporale dell'industria delle vacanze e del turismo di massa, un aumento esponenziale dello sforzo di pesca dimostrano l'intenso e spesso irrazionale sfruttamento delle risorse territoriali delle regioni adriatiche.

Il riflesso di tutto ciò si ha nella consistente alterazione delle caratteristiche naturali delle nostre coste ed un progressivo inquinamento delle acque marine, soprattutto costiere: questi fenomeni, a loro volta, rischiano di mettere in crisi molte delle economie su cui si fondano le popolazioni rivierasche e non solo. Da ciò la necessità di un continuo monitoraggio sull'ambiente marino costiero, al fine di valutare lo stato di salute degli ecosistemi in rapporto alle possibili fonti di inquinamento.

In questa ottica è stata stabilita una convenzione con ARPA Emilia Romagna inerente le attività di studio e ricerca richieste per l'attuazione del progetto "Valutazione dei carichi massimi ammissibili sversati nei sistemi scolanti delle provincie di Ferrara e Ravenna nelle acque costiere dell'Adriatico. Attività di studio e ricerca a completamento del progetto di elaborazione del Piano di Tutela delle Acque". Tale progetto si proponeva di inserire a fianco delle analisi standard

eseguite da ARPA l'attività di biomonitoraggio mediante organismi sentinella e utilizzo di biomarker.

Scelta dell'organismo sentinella

L'organismo sentinella scelto è stato *Mytilus galloprovincialis*, sulla base del fatto che è ampiamente distribuito in Adriatico e che è comunque l'organismo più utilizzato nei progetti internazionali di biomonitoraggio ambientale. Oltretutto gli stessi organismi sono utilizzati rutinariamente da ARPA per le analisi di bioaccumulo.

Scelta dei biomarker

Per avere delle risposte semplici, affidabili ma complete sulla qualità ambientale delle zone costiere oggetto di studio, abbiamo deciso di utilizzare una batteria formata da biomarker generali come la stabilità delle membrane lisosomiali, l'accumulo di lipofuscine e dei lipidi neutri insaturi nei lisosomi e biomarker specifici come l'accumulo di MT e l'attività dell'AChE.

Campionamento

Sono stati effettuati tre campionamenti: giugno 2004, novembre 2004 e giugno 2005. Le stazioni di prelievo dei mitili sono state scelte in prossimità della piattaforma ENI Angela (sito di controllo - 109), in prossimità dei Moli foranei di Marina di Ravenna (308), adiacente ai moli di Porto Garibaldi (104). In uno dei campionamenti, inoltre, sono stati raccolti mitili in prossimità della Meda di Goro (102). Per ogni stazione sono stati raccolti oltre 2 Kg di organismi prelevati a diversa profondità da cui sono stati selezionati 50 organismi di taglia 5 ± 1 cm che sono stati velocemente trasportati in laboratorio in contenitori con acqua di mare ossigenata. Qui gli organismi sono stati immediatamente trattati: le ghiandole digestive e le branchie sono state velocemente prelevate, opportunamente processate, congelate in azoto liquido e conservate a -75°C .

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata fatta tramite confronto diretto dei singoli gruppi con il controllo utilizzando il T-test ($P < 0,05$).

4.2.3 PIALASSA BAIONA

La Pialassa Baiona ha una estensione complessiva di circa 1100 ha ed è formata da aree semisommerse e bassi fondali tradizionalmente noti col nome di "chiari" delimitati da argini artificiali. I chiari sono percorsi perimetralmente e collegati tra loro da una fitta rete di canali e scoli, molti dei quali navigabili con piccole imbarcazioni e mantenuti artificialmente con occasionali opere di dragaggio a cura del Comune. I canali principali hanno profondità di 2-3 metri anche se in alcuni punti possono raggiungere i 5 metri. I canali minori presentano profondità minime di circa 1 metro. I chiari hanno una profondità media di circa un metro ma molte aree emergono con le basse maree.



Fig. 4.8. Fotografia aerea della Pialassa Baiona (foto Biserni, 1999)

La circolazione delle acque all'interno del sistema di canali e chiari è principalmente condizionata dai fenomeni di marea che possono portare a variazioni di livello di oltre un metro. Lungo i canali e gli scoli, inoltre, sono state installate numerose paratoie, saracinesce, dispositivi di troppo pieno (stramazzi), ecc., che consentono una certa regolazione artificiale sia dei flussi in entrata che, in parte, della circolazione interna.

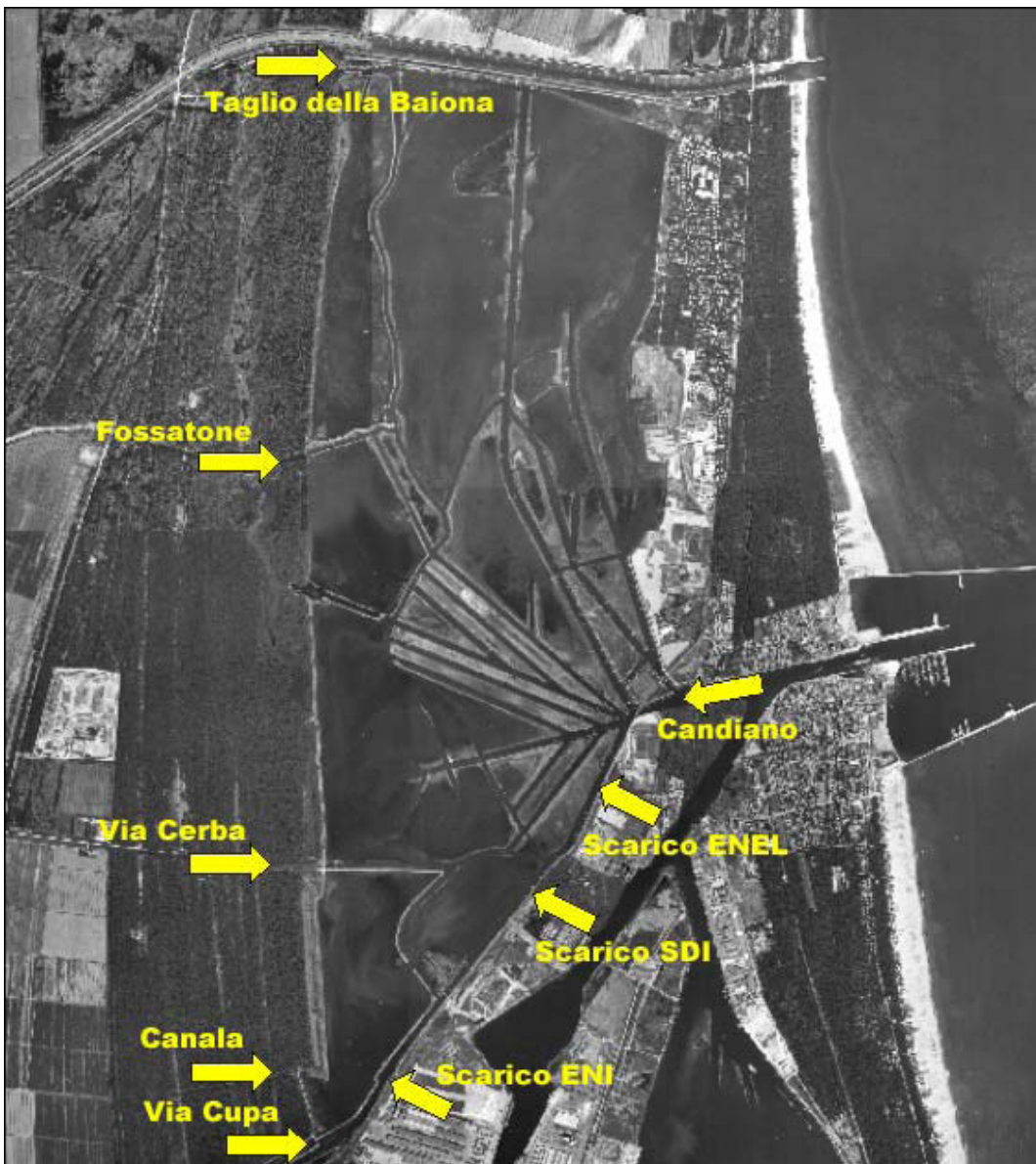


Fig. 4.9. Ingressi di acqua nella Pialassa Baiona

La Pialassa Baiona rappresenta la porzione meglio conservata del comprensorio salmastro ravennate e costituisce la laguna di maggiore rilevanza dal punto di vista naturalistico. Contemporaneamente però, la laguna è forse il sito più problematico dell'intero complesso delle zone umide costiere dell'Emilia Romagna.

Questa laguna è in continua evoluzione sotto l'influenza sia dei fenomeni naturali (apporto di sedimenti, subsidenza, variazione del livello marino, ecc.) sia del continuo intervento antropico (dragaggi, arginature, ecc.) volto a soddisfare le diverse esigenze di conservazione naturalistica, tutela paesaggistica e uso sostenibile del territorio.

Il bacino idrografico che fa capo alla Pialassa Baiona coinvolge i comuni di Ravenna, Russi e Faenza con una popolazione residente stimata nel 1991 di 31400 abitanti (Angelini & Strumìa, 1994). Su questo territorio esistono circa 250 allevamenti zootecnici prevalentemente avicoli e suinicoli, ed in misura via via minore di bovini, ovi-caprini ed equini. A questi vanno aggiunti gli scarichi diretti di alcuni impianti industriali ed in particolare quelli degli stabilimenti Enichem, Enel ed SDI (Angelini & Strumìa, 1994).

Gli apporti di nutrienti avvengono principalmente attraverso il canale di Via Cupa che convoglia non solo gran parte delle acque di scolo del bacino, su cui insistono attività agricole e zootecniche, ma anche ingenti scarichi civili ed industriali (Angelini & Strumìa, 1994).

I carichi descritti, associati a condizioni di scarsa circolazione in alcune aree delle Pialasse, sono responsabili degli eventi distrofici che si manifestano annualmente, anche se con entità e modalità diverse, nel periodo estivo (Soprani et al., 1994).

Contaminazione della Pialassa

Le origini della presenza di inquinanti nella laguna di Ravenna si possono ragionevolmente far risalire agli inizi degli anni '50: in questi anni infatti viene costruita una ingente area industriale a carattere prevalentemente chimico proprio in prossimità della Pialassa Baiona.

Da quel momento la Pialassa Baiona divenne il collettore, attraverso un piccolo canale (canale Cupa), delle acque di scarico degli impianti chimici e degli effluenti degli impianti di depurazione delle acque di scarico urbane. Oltretutto

prima del 1973, per la mancanza di una specifica legislazione ambientale, i rifiuti industriali erano rilasciati nella Laguna senza alcun trattamento (Fabbri et al., 1998).



Fig. 4.10. Pescatori all'interno della Pialassa Baiona

inquinamento da mercurio

E' stato stimato che tra il 1958 e il 1973 decine di tonnellate di mercurio derivanti dagli impianti chimici hanno contaminato la Laguna di Ravenna (Miserocchi et al., 1993). Nel 1973 è iniziato il trattamento dei reflui e l'uso del mercurio è stato drasticamente ridotto fino a cessare del tutto nel 1991 (Fabbri et al., 1998). Tuttavia, sono state rilevate concentrazioni di mercurio superiori a 1000 $\mu\text{g/g}$ nei sedimenti della parte meridionale della laguna (Miserocchi et al., 1993).

Uno dei primi studi che ha focalizzato l'attenzione su questo fenomeno è stato condotto nel 1970 da Yun Ui, Tokyo University, che rilevò la concentrazione di mercurio e metilmercurio nei pesci (specialmente anguille) e nei capelli degli abitanti del luogo: pur senza riscontrare effetti epidemiologici derivanti dall'esposizione ai suddetti composti (Ui e Kitamura, 1971).

Studi recenti hanno mostrato che i sedimenti sono tuttora fortemente contaminati (Fabbri et al., 2001). Mercurio e polimeri mostrano profili paralleli con un picco in corrispondenza delle emissioni storiche a sud (Fabbri et al., 2001).

inquinamento da idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Un'approfondita analisi su questa classe di composti è stata fatta nel 2000 da Fabbri, Trombini e Vassura: idrocarburi policiclici aromatici sono stati riscontrati in tutte le carote di sedimento prelevate nella Pialassa Baiona con eccezionali livelli di contaminazione (in alcuni casi ben al di sopra di ppm) e l'insolita abbondanza di composti a cinque anelli di carbonio, principalmente Ciclopenta[cd]pirene, che generalmente è uno dei composti minori nei sedimenti ma che è considerato un potente mutageno da alcuni autori (Fabbri et al., 2000; Foschini, 2001). La distribuzione delle concentrazioni degli IPA nei sedimenti, caratterizzata da un gradiente sud-nord e da una stretta correlazione con l'andamento delle concentrazioni di mercurio e plastiche, indica che il processo può essere ancora una volta associato alla passata attività industriale (Fabbri et al., 2000).

inquinamento da polimeri sintetici

I polimeri sintetici probabilmente rappresentano la più larga classe di inquinanti della laguna (Fabbri et al., 2000). Le analisi effettuate sui sedimenti rilevano infatti elevati livelli di stirene e benzene insieme con polivinilcloruri (PVC), polivinilacetati (PVA) e polimeri dello stirene; come già detto mercurio, IPA e polimeri seguono la stessa distribuzione nella laguna: mostrano i picchi massimi alla stessa profondità e le loro concentrazioni aumentano avvicinandosi alla zona industriale (a sud) (Fabbri et al., 2000).

4.2.3.1 baiona 2003

obiettivo

Questa mia prima campagna è stata oggetto della mia tesi di laurea. L'obiettivo principale è stato applicare e testare sul campo le metodologie più utilizzate per il biomonitoraggio con organismi sentinella e biomarker per avere le prime indicazioni su come ottimizzare la strategia di indagine in termini di scelta degli organismi sentinella e di una batteria di biomarker adeguata, periodo di campionamento, strumenti per il trapianto degli organismi. Contemporaneamente in questa campagna ho integrato i risultati ottenuti con indagini geochimiche

correlate e direttamente relazionabili alle risposte dei biomarker che fungessero da feedback di verifica ed interpretazione delle risposte dei biomarker stessi.

Scelta degli organismi sentinella

In questa campagna sono stati utilizzati mitili della specie *Mytilus galloprovincialis* ed in collaborazione con la Dott.ssa Fraternali la vongola della specie *Chamaelea gallina* (Fraternali, tesi di laurea 2004). In particolare la scelta di questo organismo è stata indotta dal tentativo di individuare un organismo sentinella idoneo ad un utilizzo in ambienti di transizione e che vivesse a contatto più diretto con il fondo e quindi con il sedimento contaminato. La *C. gallina* sembrava rispondere alle caratteristiche richieste perché oltre ad essere un organismo autoctono della fascia costiera adriatica, è un organismo di cui sono già state dimostrate alcune caratteristiche che ne potrebbero fare un buon organismo sentinella come la sensibilità ai contaminanti e l'applicabilità delle metodologie di analisi proprie dei biomarker (Viarengo et al., 1998).

Scelta dei biomarker

Per questo studio abbiamo scelto una batteria di biomarker adeguata ad indagare efficacemente la salute ambientale di un ambiente come la Pialassa Baiona, e allo stesso tempo riconosciuta dalle organizzazioni internazionali che si occupano di monitoraggio ambientale. In particolare abbiamo scelto sia biomarker generici per una valutazione generale della qualità dell'ambiente, sia biomarker specifici per una valutazione della presenza in ambiente di specifici inquinanti come pesticidi e metalli pesanti. In particolare abbiamo adottato la seguente batteria di biomarker:

biomarker generici

- valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali
- valutazione dell'accumulo di lipidi neutri insaturi nei lisosomi
- valutazione dell'accumulo di lipofuscine nei lisosomi

biomarker specifici

- determinazione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)
- determinazione del contenuto di metallotioneine

Campionamento

Circa 600 organismi (*M. galloprovincialis*) sono stati prelevati da una popolazione naturale a circa 15 miglia dalla costa emiliano-romagnola nel settembre 2003. Gli organismi sono stati selezionati per taglia (5 ± 1 cm) e immediatamente trasportati in laboratorio in contenitori con acqua di mare ossigenata. Qui gli organismi sono stati suddivisi in 5 gruppi da 90 individui mentre il restante è stato immediatamente trattato per il tempo 0 (T0): le ghiandole digestive e la branchie sono state velocemente prelevate, opportunamente processate, congelate in azoto liquido e conservate a -75°C .

Contemporaneamente i 5 gruppi sono stati trasportati e trapiantati per 30 giorni in Pialassa Baiona in altrettanti siti secondo la mappa mostrata in fig. 4.11. Al termine dei 30 giorni i mitili sono stati prelevati, trasportati in laboratorio e trattati come il T0.

La scelta dei siti di campionamento è stata determinata dalla volontà di analizzare siti disposti lungo il gradiente di inquinamento Sud-Nord (fig. 4.11.) evidenziato in Pialassa da precedenti indagini chimiche (Fabbri et al., 2000; Fabbri et al., 2001; Miserocchi et al., 1993; Anconelli et al., 1980; Giani et al., 1994).

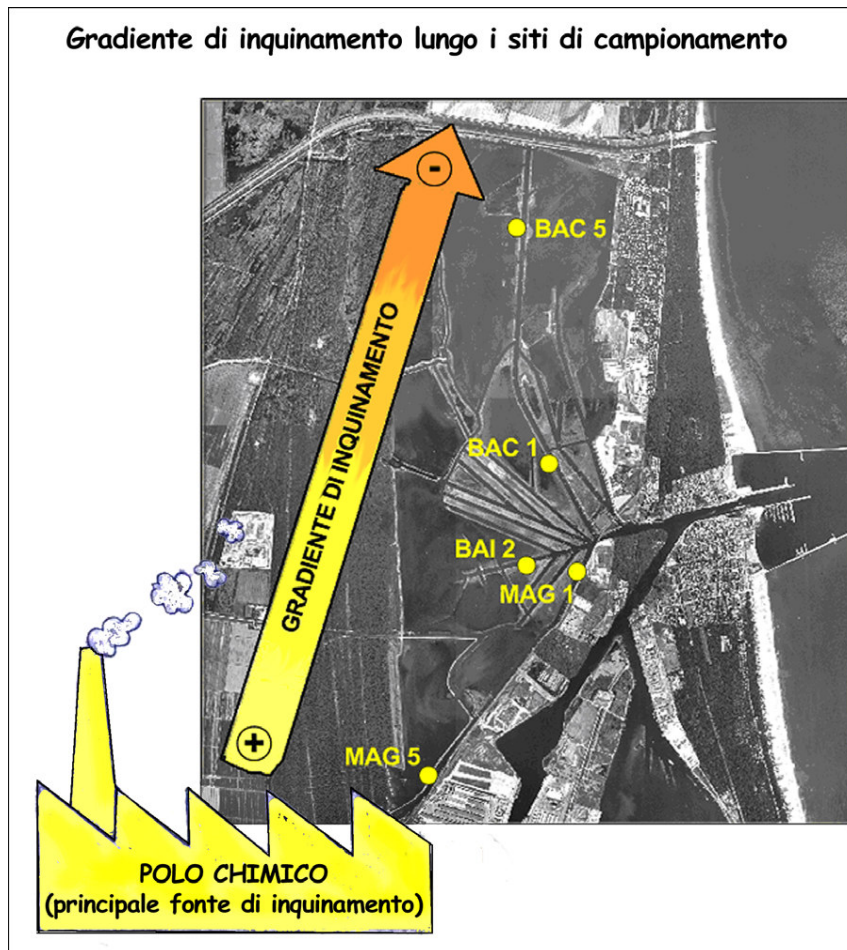


Fig. 4.11. Siti di campionamento nella Pialassa e supposto gradiente di inquinamento

Per una più approfondita conoscenza ed una migliore interpretazione dei risultati sono state condotte anche indagini geochimiche sul sedimento superficiale e sul sedimento mobilizzato (fig. 4.12).

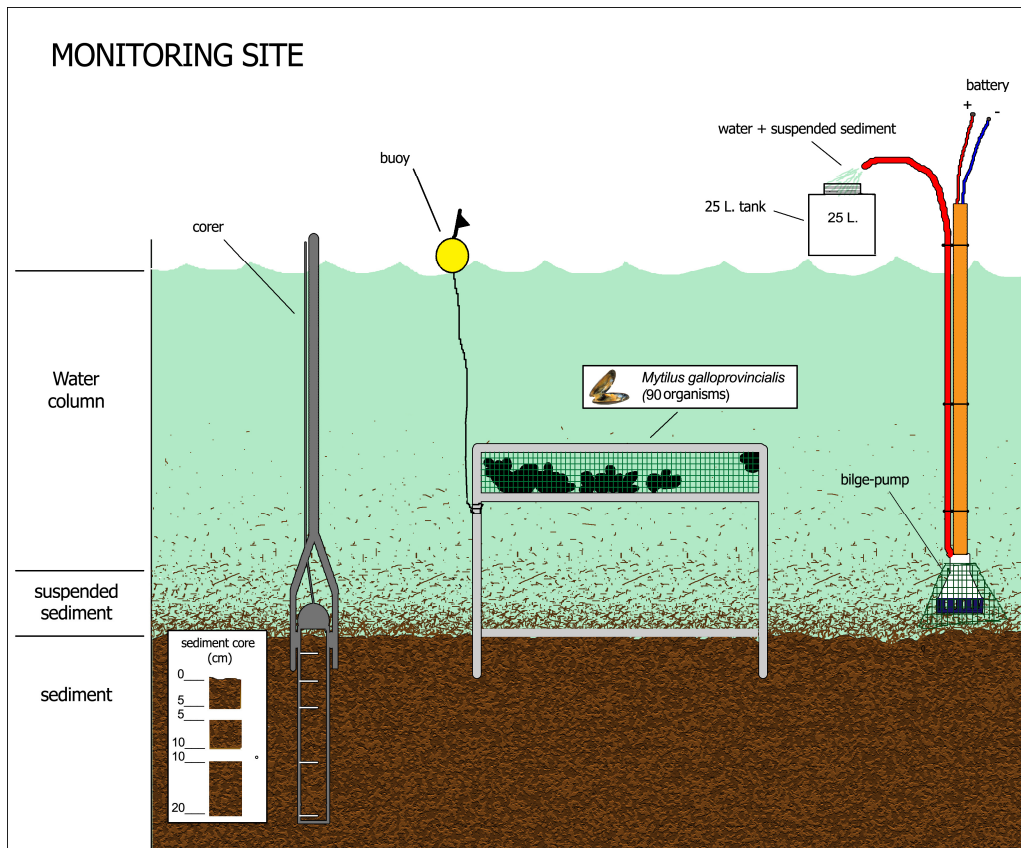


Fig. 4.12. Sito di campionamento

Per *sedimento superficiale* si intendono i primi 5 cm del sedimento di fondo, cioè quella parte di sedimento che maggiormente interagisce con la colonna d'acqua. Su di esso sono state condotte indagini per determinare la concentrazione di IPA e di metalli, con particolare attenzione al mercurio.

Per *sedimento mobilizzato* si intende quella frazione di sedimento che viene risospesa e trasportata nella colonna d'acqua dalle forti correnti mareali e che viene quindi filtrata effettivamente dagli organismi. Su di esso sono state condotte indagini per determinare la concentrazione di IPA e di metalli con particolare attenzione al mercurio.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata fatta tramite confronto diretto dei singoli gruppi con il controllo utilizzando il T-test ($P < 0,05$).

4.2.3.2 Studi pilota per la **valutazione dei tempi di espressione e recupero dei biomarker**

Al fine di valutare sperimentalmente i tempi di espressione e di recupero di alcuni biomarker quando gli organismi sono sottoposti ad uno stress o quando si ristabilisce una condizione ambientale ottimale, sono state condotte alcune campagne pilota. La conoscenza delle modalità e dei tempi di risposta di alcuni processi fisiologici sono di fondamentale importanza per una corretta valutazione dei risultati del biomonitoraggio con biomarker ed i risultati ottenuti con questi specifici studi sono quindi di grande importanza. Per queste campagne pilota sono stati utilizzati mitili della specie *Mytilus galloprovincialis*.

Valutazione dei tempi di espressione

Per la valutazione dei tempi di espressione dei biomarker è stata condotta una campagna pilota in Pialassa Baiona nel sito MAGNI (fig. 4.13), già utilizzato nella campagna del 2003 e riconosciuto come il sito più contaminato da metalli, IPA e PCB della laguna. In particolare saranno qui analizzati i risultati di LMS, LIF, MT e AOX.

Circa 400 organismi (*M. galloprovincialis*) sono stati prelevati da una popolazione naturale a circa 15 miglia dalla costa emiliano-romagnola nell'ottobre 2005. Gli organismi sono stati selezionati per taglia (5 ± 1 cm) e immediatamente trasportati in laboratorio in contenitori con acqua di mare ossigenata. Qui gli organismi sono stati suddivisi in 5 gruppi da 60 individui mentre il restante è stato immediatamente trattato per il tempo 0 (T0): le ghiandole digestive e la branchie sono state velocemente prelevate, opportunamente processate, congelate in azoto liquido e conservate a -75°C .

Contemporaneamente i 5 gruppi sono stati velocemente trasportati in Pialassa Baiona e posizionati presso il sito MAGNI appesi ad un palo infisso nel fondo e sospesi nella colonna d'acqua (fig. 4.14)



Fig. 4.13. sito di indagine

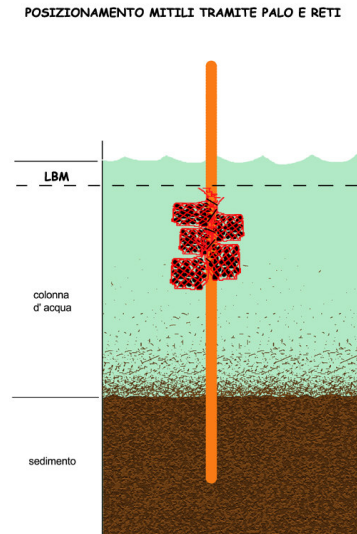


Fig. 4.14. stazione di trapianto dei mitili

I 5 gruppi sono stati prelevati dopo 2, 4, 7, 14 e 30 giorni e trattati come il T0.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata fatta tramite one-way ANOVA (SigmaStat, SPSS) utilizzando il test di Holm-Sidak come post-hoc test ($P < 0,05$).

Valutazione dei tempi di recupero

Così come le modalità di espressione dei biomarker in mitili esposti ad un ambiente contaminato, anche la valutazione dei tempi di recupero una volta ristabilite le condizioni ambientali ottimali è un importante punto da approfondire. I risultati ottenuti possono infatti darci indicazioni fondamentali per interpretare i risultati ottenuti da campagne di biomonitoraggio in zone dove ad esempio possano essere presenti fonti di inquinamento discontinue.

Come sito "non contaminato" è stato scelto il relitto Paguro, una zona di tutela biologica localizzata a circa 12 miglia dalla costa emiliano romagnola, mentre come sito contaminato da cui prelevare i mitili è stata scelta una zona in Pialassa Baiona adiacente allo scolo di una cassa di colmata di fanghi contaminati (fig. 4.15.)



Fig. 4.15 In alto: i siti di campionamento; a sinistra: il sito in Pialassa; a destra: fasi del campionamento al relitto Paguro

I biomarker analizzati sono stati LMS, AChE nelle branchie e MT nelle ghiandole digestive.

Circa 300 organismi sono stati prelevati dal sito PIALASSA nel luglio 2006, selezionati per taglia (4 ± 1 cm) e immediatamente trasportati in laboratorio in contenitori con acqua di mare ossigenata. Qui 50 organismi sono stati

immediatamente trattati per il tempo 0 (T0): le ghiandole digestive e la branchie sono state velocemente prelevate, opportunamente processate, congelate in azoto liquido e conservate a -75°C. Contemporaneamente 200 organismi sono stati suddivisi in due gruppi all'interno di calze in nylon apposite da acquacoltura e velocemente trasportati in contenitori contenenti acqua di mare refrigerata e ossigenata nel sito di trapianto presso il relitto Paguro. Qui sono stati fissati alla struttura del relitto a circa 7 metri di profondità. I due gruppi sono stati poi prelevati rispettivamente dopo 9 e 35 giorni e trattati come il T0.

Da annotare il fatto che la stessa procedura era stata compiuta per trapiantare gli organismi prelevati presso il Paguro nel sito di prelievo in Pialassa e poter così contemporaneamente valutare i tempi di espressione, ma una moria improvvisa ha reso vana questa parte del campionamento di cui perciò non riporterò i risultati.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata fatta tramite one-way ANOVA (SigmaStat, SPSS) utilizzando il test di Holm-Sidak come post-hoc test ($P < 0,05$).

4.2.3.3 baiona 2007

obiettivo

Nell'ultima campagna effettuata l'obiettivo è stato applicare sul campo le esperienze e le conoscenze acquisite in questi anni integrandole con le metodologie più moderne utilizzate per il biomonitoraggio. Utilizzando i risultati ottenuti, insieme con quelli raccolti in questi anni da me e da colleghi di altri laboratori di ricerca, il mio obiettivo ultimo è stato definire chiare procedure operative in termini di tempi e modalità di campionamento, organismi utilizzati, batteria di biomarker, analisi dei dati, interpretazione dei risultati grazie a strumenti di supporto decisionale.

Scelta dei biomarker

Per questa ultima campagna ho applicato un'ampia batteria di biomarker adeguata ad indagare efficacemente molti aspetti ambientali di una laguna costiera come la Pialassa Baiona. In particolare ho scelto biomarker sia generici che specifici e che agissero a vari livelli di organizzazione biologica:

livello cellulare

- LMS
- LIF
- AChE
- MT
- CAT
- AOX

livello tissutale

- Lys/Cyt

livello di organismo

- SoS
- mortalità

Campionamento

Circa 700 organismi (*M. galloprovincialis*) sono stati prelevati da una popolazione naturale a circa 15 miglia dalla costa emiliano-romagnola nel giugno 2007. Gli organismi sono stati selezionati per taglia (5 ± 1 cm) e immediatamente trasportati in laboratorio in contenitori con acqua di mare ossigenata. Qui 70 organismi sono stati posizionati in un acquario contenente acqua di mare ossigenata e filtrata a temperatura controllata di 15°C e trattati come controllo di laboratorio (Clab). Un altro gruppo di organismi è stato immediatamente trattato per il tempo 0 (T0): le ghiandole digestive e la branchie sono state velocemente prelevate, opportunamente processate, congelate in azoto liquido e conservate a -75°C.

Contemporaneamente i restanti organismi sono stati suddivisi in 7 gruppi da 70 individui l'uno e trasportati in contenitori contenenti acqua di mare ossigenata e refrigerata per essere trapiantati appesi a pali infissi sul fondo (fig. 4.16.) in Pialassa Baiona per 30 giorni in altrettanti siti secondo la mappa mostrata in fig. 4.17.



Fig. 4.16. Posizionamento dei mitili



Fig. 4.17 Mappa dei siti di campionamento

Al termine dei 30 giorni i mitili posizionati in Pialassa ed il Clab sono stati prelevati, trasportati in laboratorio e trattati come il T0.

Contestualmente alle analisi sui mitili sono state effettuate alcune campagne di rilevamento delle caratteristiche chimico-fisiche delle acque presso i siti di campionamento. In particolare sono state effettuate, durante il periodo di residenza dei mitili in Pialassa, 6 campagne di rilevamento di pH, temperatura e salinità tramite sonda CTD su tutta la colonna d'acqua ogni 10 cm (fig. 4.18.), e sono stati posizionati sui pali di sostegno delle calze nei siti 1, 2, 5 e 7 (Controllo interno – Cint) dei rilevatori di temperatura capaci di immagazzinare un dato ogni 30 minuti.



Fig. 4.18. Campagna di rilevamento dati con la sonda multiparametrica CTD

Per l'interpretazione dei risultati delle analisi sui mitili è stato utilizzato il software *Expert System*. Uno strumento di supporto decisionale utilissimo perché è in grado di integrare i risultati dei biomarker in semplici indici di stress dalla A alla E.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata fatta quando possibile tramite one-way ANOVA (SigmaStat, SPSS) utilizzando il test di Holm-Sidak come post-hoc test ($P < 0,05$) o tramite confronto diretto di due gruppi con il T-test ($P < 0,05$).

5. Risultati sperimentali e discussione

*Esperimenti di laboratorio –
Campagne di biomonitoraggio –*

5.1 esperimenti di laboratorio

5.1.1. effetto di mercurio e metilmercurio

Risultati

- Percentuale di sopravvivenza

Come mostrato in tab. 5.1, 1 organismo è morto dopo 5 giorni di esposizione a MeHg, 2 organismi dopo 10 giorni di esposizione a Hg, mentre dopo 20 giorni sono morti rispettivamente 1 organismo in CTRL, 2 in Hg e 2 in MeHg.

sample	5gg	10gg	20gg	TOT	TOT %
CTRL	0	0	1	1	3 %
HG	0	2	2	4	13 %
MeHg	1	2	2	5	17%

Tab. 5.1. numero di organismi morti

- Valutazione dei livelli di cAMP

I livelli di cAMP nel mantello al T0 erano 220 ± 11 pmol g tessuto⁻¹ mentre i livelli nei CTRL 5/10/20 sono risultati rispettivamente 241 ± 26 , 261 ± 24 , and 209 ± 17 pmol g tessuto⁻¹ (fig. 5.1.).

Non sono state osservate significative variazioni negli organismi esposti a Hg dopo 5 giorni (225 ± 24 pmol g tessuto⁻¹), 10 giorni (236 ± 31 pmol g tessuto⁻¹) e 20 giorni (224 ± 36 pmol g tessuto⁻¹).

Viceversa i livelli di cAMP sono risultati significativamente aumentati nei mitili esposti a MeHg, raggiungendo i valori massimi dopo 5 giorni (344 ± 19 pmol g tessuto⁻¹).

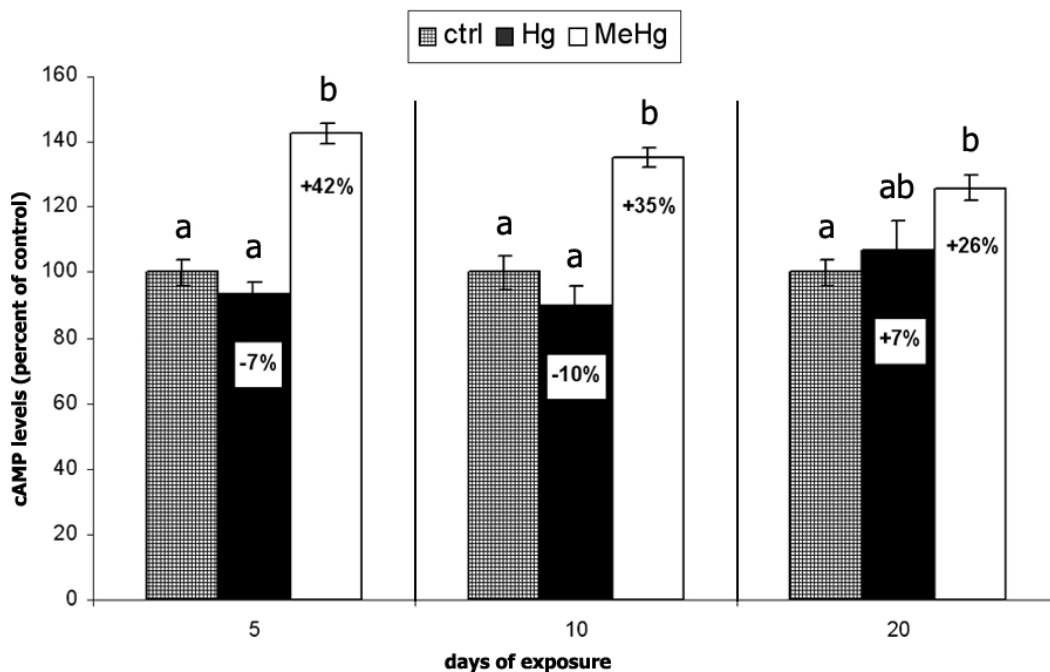


Fig. 5.1. livelli di cAMP nel mantello dei mitili. Differenza percentuale rispetto ai controlli. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

- Valutazione dell'attività dell' AChE

L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi nelle branchie degli organismi al T0 era $29.1 \pm 2.4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$. I valori di attività rilevati nei CTRL 5/10/20 mostrano una certa variabilità temporale e sono rispettivamente 21.3 ± 2.0 , 27.5 ± 2.2 e $15.3 \pm 1.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

Come mostra la fig. 5.2., l'attività dell'AChE risulta essere stata significativamente ridotta negli organismi esposti a MeHg per 5 e 10 giorni, con una inibizione percentuale rilevata rispettivamente di 14% ($18.3 \pm 3.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) e 14% ($23.6 \pm 2.8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$). Una più lieve e non significativa inibizione è stata osservata anche dopo 20 giorni. Per quanto riguarda invece gli organismi esposti a Hg, nessun cambiamento è stato osservato dopo 5 giorni, mentre una significativa inibizione enzimatica è stata invece rilevata dopo 10 e 20 giorni, con un valore di riduzione percentuale rispettivamente del 35% ($17.8 \pm 4.0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) e 28% ($11.0 \pm 1.9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$).

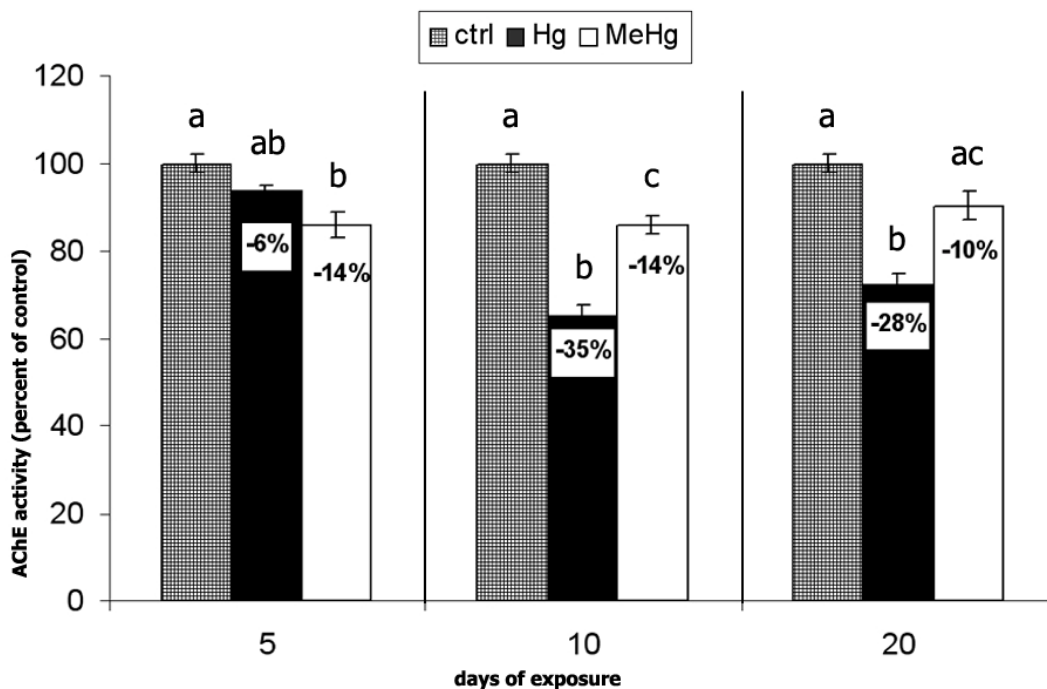


Fig. 5.2. Attività dell'AChE nelle branchie dei mitili. Differenza percentuale rispetto ai controlli. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

- Valutazione dei contenuti di MT

Il contenuto di MT nelle ghiandole digestive dei mitili al T0 era $221.8 \pm 52.4 \mu\text{g g tissue}^{-1}$ e simili valori sono stati poi mantenuti nei controlli durante i 20 giorni di esperimento. Per quanto riguarda gli organismi esposti a Hg, nessuna significativa variazione è stata osservata dopo 5 e 10 giorni, a differenza dei mitili esposti per 20 giorni, nei quali è stato rilevato un aumento del 70% delle MT ($318.8 \pm 59.0 \mu\text{g g tissue}^{-1}$) rispetto al CTRL (Fig. 5.3.).

Un andamento diverso è stato invece osservato per i mitili esposti a MeHg, nei quali si ha un generale aumento delle MT con un valore massimo del 60% dopo 10 giorni di esposizione ($380.0 \pm 83.3 \mu\text{g g tissue}^{-1}$).

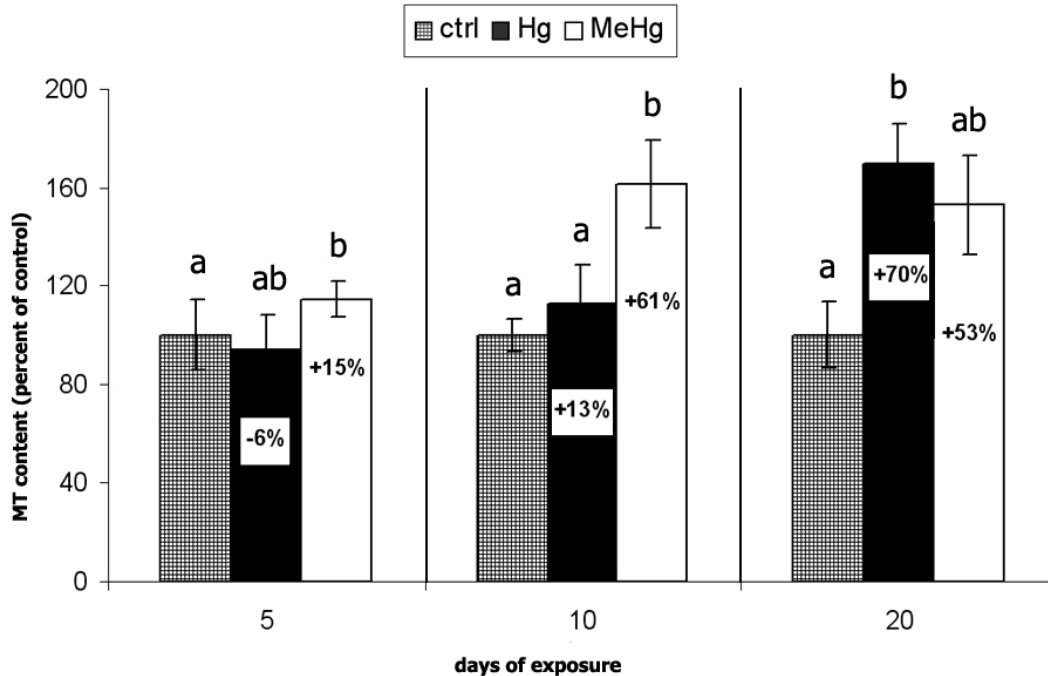


Fig. 5.3. Contenuti di MT nelle ghiandole digestive dei mitili. Differenza percentuale rispetto ai controlli. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

- Valutazione dell'attività dell'AOX

L'attività dell'AOX nelle ghiandole digestive è leggermente diminuita nel tempo. In particolare, l'attività enzimatica è stata rilevata di 1.68 ± 0.26 mU 1.60 ± 0.05 , 1.34 ± 0.12 e 1.15 ± 0.06 mU mg protein⁻¹ rispettivamente per il T0, CTRL5, CTRL10 e CTRL20.

La fig. 5.4. mostra le variazioni di attività dell'AOX nei mitili esposti a Hg e MeHg come percentuale rispetto al rispettivo controllo. Nei mitili esposti a Hg l'attività sembra subire leggere ma non significative variazioni dopo 5 e 10 giorni, mentre un significativo aumento di attività enzimatica è raggiunta dopo 20 giorni (1.53 ± 0.12 mU mg protein⁻¹). Al contrario, una significativa diminuzione di attività viene registrata nei mitili esposti a MeHg relativa a tutti i tempi di esposizione, raggiungendo la massima inibizione del 40% dopo 10 giorni (0.81 ± 0.09 mU mg protein⁻¹).

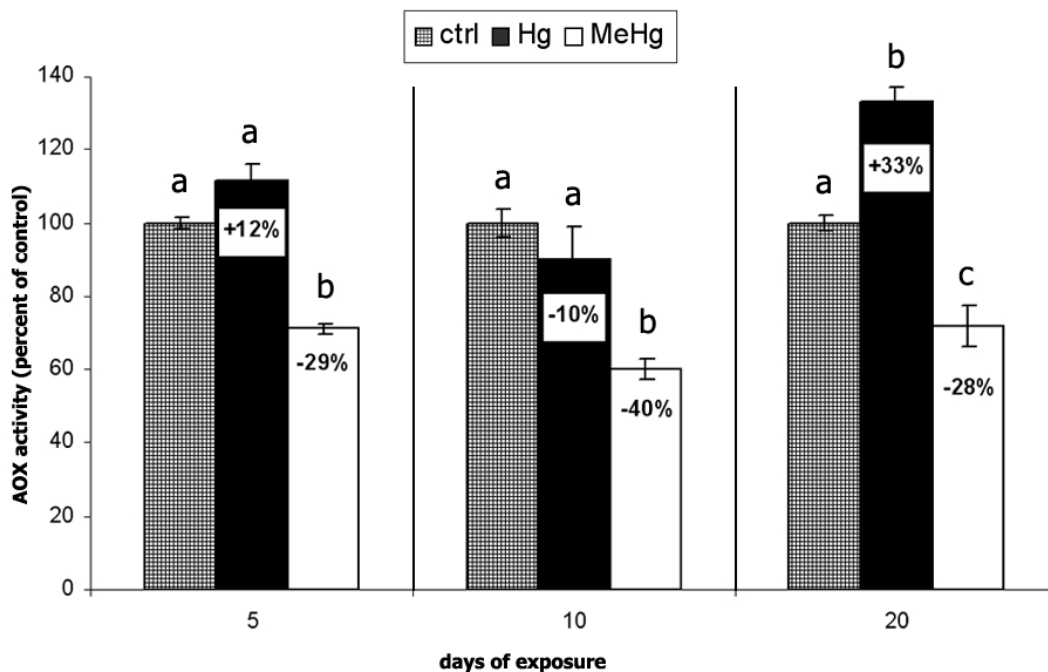


Fig. 5.4. Attività dell'AOX nelle ghiandole digestive dei mitili. Differenza percentuale rispetto ai controlli. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Discussione

Poche indagini sono state effettuate riguardo all'effetto dei composti del mercurio sugli aspetti fisiologici dei molluschi e perciò il potenziale contributo del mercurio organico e inorganico alla tossicità generale di un ambiente contaminato rimane poco conosciuta. Con questo esperimento il nostro obiettivo era valutare e confrontare gli effetti di Hg e MeHg su quattro parametri fisiologici dei mitili *M. galloprovincialis*: livelli di cAMP e MT e attività di AOX e AChE.

In generale i risultati mostrano che il MeHg influenza significativamente tutti i parametri testati e che gli effetti delle due forme chimiche possono essere differenti se non addirittura opposti.

Da sottolineare che i cambiamenti indotti da Hg e MeHg sono risultati essere di magnitudo comparabile pur avendo somministrato tali composti in un rapporto di 100:1.

E' interessante notare inoltre come l'effetto del MeHg si sia in generale manifestato dopo un minor tempo di esposizione rispetto al Hg, così come

riportato in altri studi effettuati riguardanti l'esposizione di mitili a Hg e MeHg (Fournier et al., 2001). Queste osservazioni confermano la maggiore tossicità generalmente attribuita al MeHg, composto che possiede una maggiore abilità di attraversare le membrane biologiche rispetto al Hg, una più alta efficienza di accumulo dall'acqua e una minore efficienza di escrezione (Mikac et al., 1996).

Per quanto riguarda l'analisi dei risultati specifici, I nostri dati indicano chiaramente che i livelli di cAMP nel mantello di *M. galloprovincialis* sono significativamente aumentati negli organismi esposti a MeHg, mentre non c'è variazione in quelli esposti al Hg. Per quanto ne sappiamo, nessuno specifico studio è stato fino ad ora effettuato sull'effetto di Hg e MeHg in organismi acquatici tale da confermare i nostri risultati. In particolare è interessante l'effetto del MeHg, considerando l'importanza del cAMP come secondo messaggero ed il suo ruolo chiave nella regolazione della disponibilità energetica durante lo sviluppo delle gonadi (Diaz-Enrich and Ibaruren, 2003). Per quanto riguarda il mercurio invece, esso appare ad oggi l'unico metallo pesante tra quelli testati a non avere effetto sui livelli di cAMP. Studi recenti infatti mostrano chiaramente come i livelli di cAMP aumentino in relazione ad una esposizione a metalli pesanti (Cadmio, Rame e Cromo) o contaminanti organici sia in campo (Dailianis et al., 2003) che in esperimenti in acquario (Raftopoulou et al., 2006; Fabbri and Capuzzo, 2006; Dailianis and Kaloyianni, 2007). Di difficile interpretazione, alla luce delle poche conoscenze specifiche, i differenti effetti delle due forme chimiche del mercurio sul cAMP. I livelli intracellulari dei cAMP sono il risultato delle reazioni di formazione e degradazione catalizzate rispettivamente dall'adenilato ciclasi (AC) e dalla fosfodiesterasi cAMP-dipendente. Gli studi *in vitro* effettuati mostrano effetti opposti dei metalli pesanti sull'attività dell'AC nei mitili (Giannaccini et al., 2004; Fabbri and Capuzzo, 2006), mentre gli stessi metalli provocano un aumento nei livelli di cAMP in esperimenti condotti *in vivo*.

Alla luce di queste considerazioni e dei miei risultati, è indubbio che siano necessari ulteriori indagini sugli effetti di Hg e MeHg su questi enzimi e la relativa ripercussione sui livelli di cAMP se l'obiettivo ultimo è stimare l'efficacia di questo nucleotide come biomarker per la valutazione della qualità ambientale.

L'attività dell'AChE nelle branchie risulta inibita da entrambi i composti. In particolare il MeHg ha provocato una significativa diminuzione dell'enzima già dopo 5 giorni di esposizione, ma mai superiore al 14%. Il mercurio invece provoca un effetto significativo solo dopo 10 giorni ma raggiungendo una percentuale di inibizione del 35%.

I nostri risultati trovano riscontro in studi precedentemente effettuati che confermano l'inibizione delle colinesterasi da parte del mercurio (Frasco et al., 2007), mentre un effetto lieve o nullo viene riportato per il MeHg (Gill et al., 1990; Bocquenè et al., 1995).

L'aumento di MT nelle ghiandole digestive risulta stimolato in maniera significativa dal Hg solo dopo 20 giorni di esposizione. L'aumento della sintesi di MT da parte del Hg o da altri metalli pesanti è un effetto ben conosciuto e precedentemente osservato (Viarengo et al., 2007). Per quanto riguarda il MeHg invece, pur aspettandoci un'alta affinità per i gruppi sulfidrilici delle MT, è riportato in letteratura che esso si lega meno efficacemente alle MT rispetto a Hg o Cd e che quindi provoca solo una lieve stimolazione della sintesi proteica (Chen et al., 1973). Al contrario, recenti studi stabiliscono che i cationi del MeHg sostituiscono efficacemente lo Zn(II) nelle Zn-MT dei mammiferi, e attraverso questo meccanismo inducono la loro sintesi (Leiva-Presa et al., 2004). Questa ultima tesi è in accordo con i nostri risultati, in cui il MeHg induce significativamente un aumento dei livelli di MT nelle ghiandole digestive dei mitili. In particolare la stimolazione avviene più rapidamente del Hg, risultando significativa già dopo 5 giorni. Da notare come l'ordine di grandezza della stimolazione sia simile, pur avendo somministrato il MeHg ad una concentrazione 100 volte più bassa.

L'attività dell'AOX rilevata nelle ghiandole digestive risulta significativamente aumentata dopo 20 giorni di esposizione a Hg, mentre il MeHg provoca una inibizione dell'enzima a tutti i tempi di esposizione. I perossisomi, dove esplica la sua azione l'AOX, sono considerati di fondamentale importanza per il controllo dello stress ossidativi cellulare regolando la produzione e la rimozione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Cajaraville and Ortiz-Zarragoitia, 2006), e ci

aspetteremmo quindi che la produzione di ROS provocata dall'assunzione di Hg e MeHg possa quindi alterare l'attività enzimatica perossisomiale.

Tuttavia, nonostante questa promessa, gli effetti dei metalli pesanti sull'attività dell'AOX sono ad oggi poco conosciuti. Studi recenti condotti in campo hanno mostrato una riduzione di attività in mitili con un alto contenuto di mercurio (Zorita et al., 2006). Alla luce dei nostri risultati, con il MeHg che inibisce l'enzima e l'Hg che lo stimola, si potrebbe ipotizzare che le osservazioni condotte da Zorita et al. (2007) si riferissero principalmente all'accumulo di MeHg.

Come precedentemente mostrato le due forme chimiche del mercurio hanno nei nostri mitili effetti differenti od opposti sul cAMP o sull'AOX. La stessa risposta è stata riscontrata in altri parametri fisiologici. Canesi et al. (1999) ha dimostrato che il MeHg fa diminuire il contenuto di glutazione nei tessuti di *M. galloprovincialis* mentre il Hg non ha effetto. Franzellitti e Fabbri (2006) hanno parimenti dimostrato come l'espressione delle HSP70-mRNA sia fortemente inibita da Hg ma indotta da MeHg, così come hanno dimostrato che il MeHg incrementava drasticamente l'espressione genica delle proteine MXR (Multi Xenobiotic Resistance) durante tutto l'esperimento (da 8 ore a 6 giorni) mentre veniva indotta dal mercurio dopo 8h e poi fortemente inibita. Tutti questi dati dimostrano chiaramente come l'effetto di una contaminazione da mercurio dipenda strettamente dalla forma chimica implicata.

Recenti studi suggeriscono una stretta correlazione tra cAMP e MT nei vari tessuti di mitili *M. galloprovincialis* esposti a cadmio la quale è supportata dalla conferma dell'implicazione del nucleotide nella regolazione della trascrizione genica delle MT (Dailianis and Kaloyianni, 2007). I nostri risultati però non confermano tale correlazione nei mitili esposti a Hg, poiché il metallo stimola la produzione di MT ma non sembra avere effetto sui livelli di cAMP. Invece, sia i livelli di cAMP che di MT sono aumentati dal MeHg.

Una correlazione anche tra cAMP e AChE era stata precedentemente suggerita in organismi esposti a contaminanti organici (Raftopoulou et al., 2006). I nostri risultati mostrano che l'esposizione dei mitili a Hg e MeHg inibisce l'attività dell'AChE, ma solo il MeHg ha un effetto sui livelli di cAMP.

Tutte queste osservazioni incoraggiano l'approfondimento dell'argomento per meglio comprendere se queste relazioni sono legate da un comune processo fisiologico o rappresentano due risposte separate ad uno stesso stress.

Per quanto riguarda le relazioni tra i cambiamenti nell'attività dell'AOX e altri effetti del Hg o MeHg, esse rimangono ambigue e di facile speculazione. E' sicuramente un dato di fatto che il cAMP sia coinvolto nella proliferazione perossisomiale (Burns and Vanden Heuvel, 2007), tuttavia la conoscenza che abbiamo sull'effetto dei metalli pesanti sulla modulazione dell'AOX è troppo scarsa per ipotizzare relazioni.

Conclusioni

In conclusione, questo esperimento fornisce un confronto tra gli effetti della forma inorganica (Hg) e organica (MeHg) del mercurio su quattro parametri fisiologici in mitili della specie *M. galloprovincialis* esposti *in vivo* ai due composti. Hg e MeHg inducono effetti differenti quando non opposti sui parametri analizzati, portando alla logica conclusione che le due differenti forme chimiche contribuiscano in maniera diversa alla tossicità generale del mercurio.

Pochi studi sono stati effettuati specificatamente sui meccanismi di azione dei due composti, ed il nostro esperimento non era disegnato per rispondere a questa questione, tuttavia i contributi di altri laboratori circa gli effetti di Hg e MeHg sullo stesso organismo modello, il *M. galloprovincialis*, potrebbero dare sostanziali contributi per una futura comprensione degli effetti del mercurio.

5.1.2. effetto della salinità sull'espressione dei biomarker

Risultati

- Percentuale di sopravvivenza

La percentuale di sopravvivenza è stata per tutti i campioni $\geq 94\%$.

- Valutazione dei livelli di cAMP

Le variazioni dei livelli di cAMP in funzione della salinità o dell'esposizione al mercurio sono poco evidenti nelle branchie (fig. 5.5.). Il T0 è risultato essere $163,8 \pm 4,9$ pmoli di cAMP g di tessuto⁻¹. Dopo i 15 giorni di adattamento alle 3 salinità si rileva un significativo aumento solo in AH con un valore che raggiunge $172,6 \pm 9,8$ pmoli di cAMP g di tessuto⁻¹. L'esposizione al mercurio e conseguente recupero a bassa salinità ha messo in evidenza una differenza significativa tra il gruppo CL/EL ($230,1 \pm 16,1$ pmoli di cAMP g di tessuto⁻¹ e $261,7 \pm 10,9$ pmoli di cAMP g di tessuto⁻¹) ed il gruppo RCL/REL ($177,0 \pm 7,9$ pmoli di cAMP g di tessuto⁻¹ e $160,6 \pm 9,8$ pmoli di cAMP g di tessuto⁻¹). Alla salinità media non si hanno differenze significative ed alla salinità più alta si rileva un aumento significativo da EH a REH, con valori di $153,3 \pm 16,5$ pmoli di cAMP g di tessuto⁻¹ e di $235,2 \pm 15,3$ pmoli di cAMP g di tessuto⁻¹, rispettivamente.

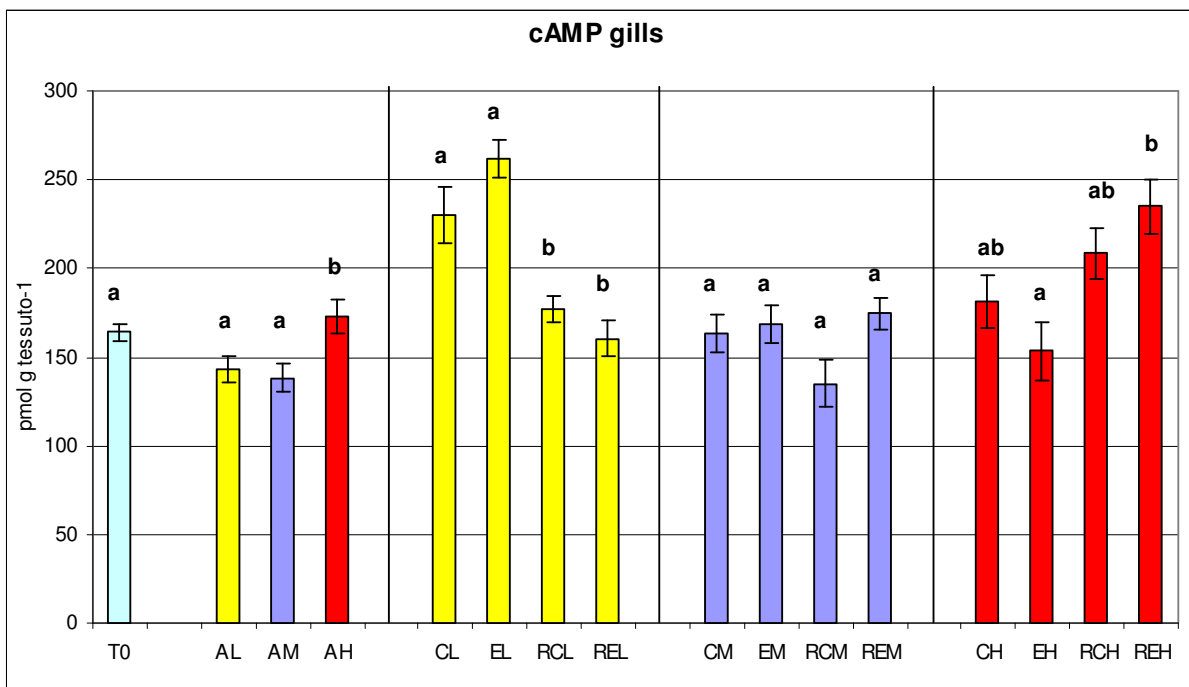


Fig. 5.5. livelli di cAMP nelle branchie dei mitili alle 3 salinità. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

I valori dei livelli di cAMP nel mantello (fig. 5.6.) risultano della stessa grandezza di quelli nelle branchie. In particolare si nota che durante l'adattamento si registra un aumento significativo dei livelli in AL rispetto a T0 con valori di $191,8 \pm 7,5$

pmoli g di tessuto⁻¹ e di 143,4 ± 10,0 pmoli g di tessuto⁻¹, rispettivamente. Per quanto riguarda l'esposizione e conseguente recupero alla bassa salinità si nota un significativo aumento dei valori di cAMP nei mitili esposti al mercurio (EL) rispetto al controllo (CL) con valori di 197,0 ± 13,2 pmoli g di tessuto⁻¹ e di 149,0 ± 15,8 pmoli g di tessuto⁻¹, mentre si nota una successiva significativa diminuzione dei livelli di cAMP nei recuperi RCL e REL (106,9 ± 8,4 pmoli g di tessuto⁻¹ e di 144,6 ± 8,4 pmoli g di tessuto⁻¹). Alla salinità media si registra una significativa diminuzione di RCM (95,7 ± 10,7 pmoli g di tessuto⁻¹) mentre gli altri valori si mantengono simili ad AM. Alla salinità più alta non si registra alcuna significativa variazione.

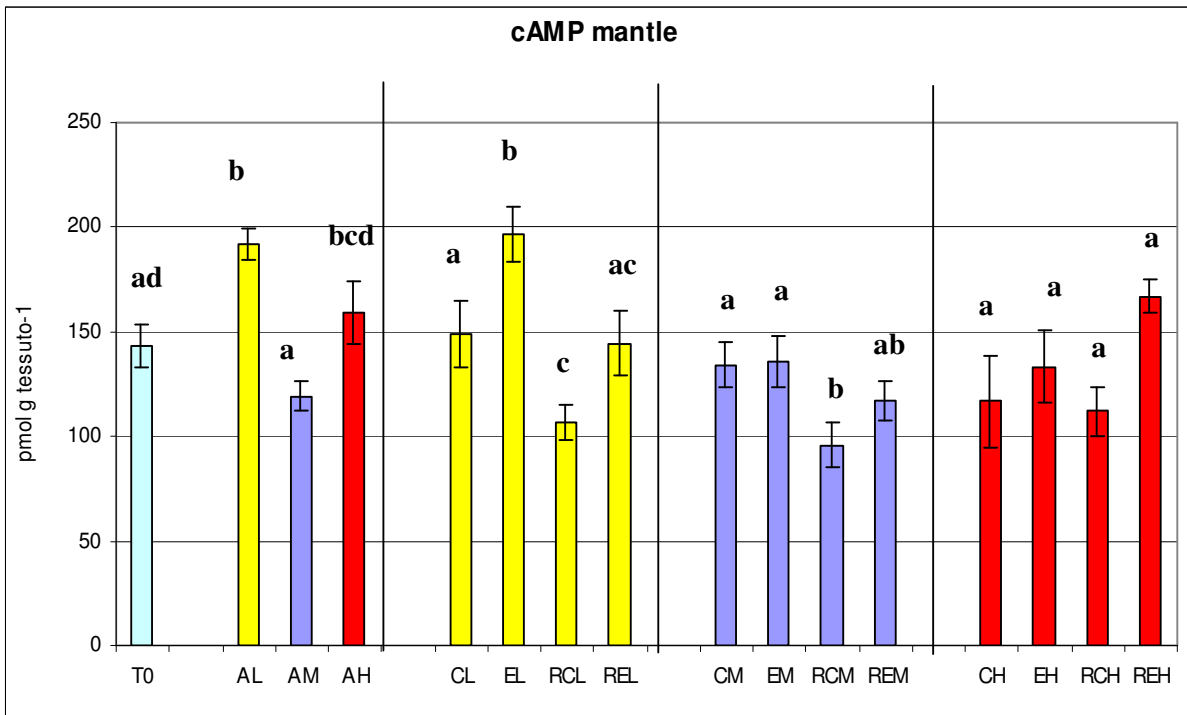


Fig. 5.5. livelli di cAMP nel mantello dei mitili alle 3 salinità. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Dalla figura 5.6. si nota che non è rilevata alcuna significativa correlazione tra la salinità ed i livelli di cAMP.

Cell Contents:		
Correlation Coefficient		
P Value		
Number of Samples		
	CAMP GILLS	CAMP MANT
SALINITY	-0,197	-0,573
	0,708	0,234
	6	6
CAMP GILLS		-0,0824
		0,877
		6
CAMP MANT		

Fig. 5.6. Correlazione lineare tra salinità e cAMP (test di Pearson; $p < 0,05$)

- Valutazione dell'attività dell'AChE

L'attività dell'AChE nelle branchie è mostrata in fig. 5.7.. Si nota che durante l'adattamento alle 3 diverse salinità si è avuta una significativa diminuzione di attività in relazione ad un aumento della salinità, con valori che vanno da un massimo di $13,0 \pm 0,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg di proteine}^{-1}$ nel T0 ad un minimo di $9,3 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg di proteine}^{-1}$ in AH. Dalla figura 5.7. si nota che l'attività risulta inibita significativamente nei mitili esposti a mercurio rispetto al controllo a tutte e tre le salinità (cerchio blu). In particolare a bassa salinità EL diminuisce rispetto al controllo (CL) con valori rispettivamente di $8,8 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg di proteine}^{-1}$ e di $11,9 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg di proteine}^{-1}$, salvo poi risalire dopo il recupero (REL) a livelli simili a CL. Alla salinità media si ha una diminuzione significativa di EM ($8,2 \pm 0,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg di proteine}^{-1}$) rispetto agli altri valori (CM = $11,5 \pm 0,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg di proteine}^{-1}$). Alla salinità più alta (38 psu) si ripete un andamento simile a quello della salinità media, con una diminuzione di EH rispetto a CH ($8,3 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg di proteine}^{-1}$ e $9,0 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg di proteine}^{-1}$, rispettivamente) anche se le differenze sono inferiori.

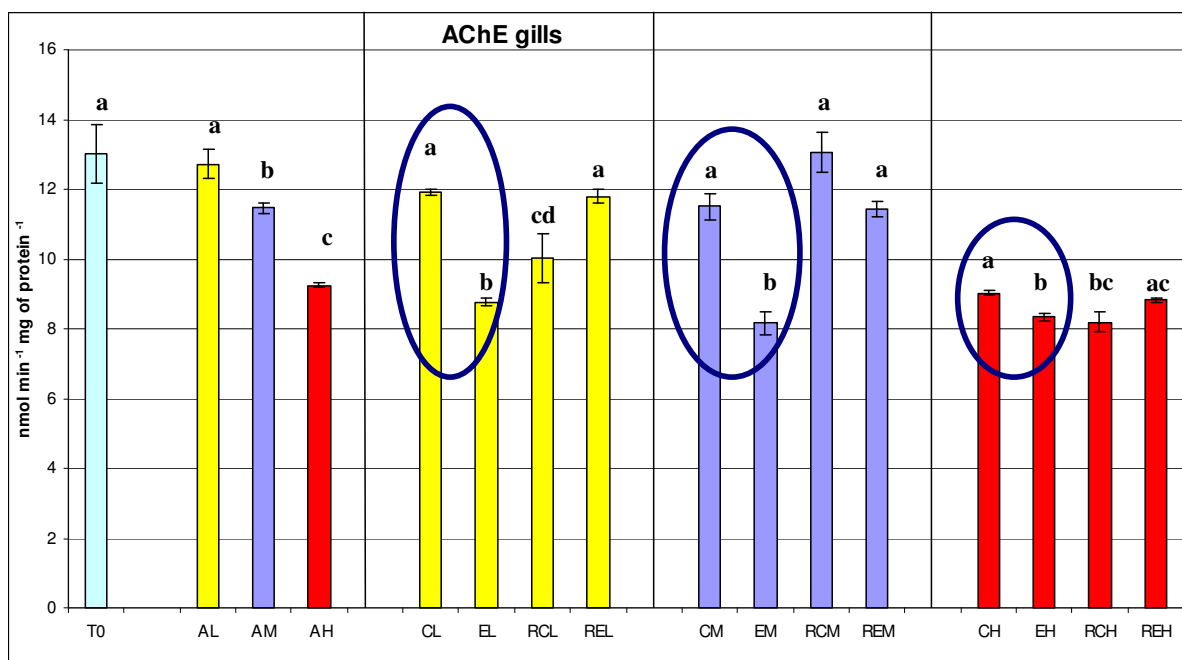


Fig. 5.7. Attività dell'AChE nelle branchie dei mitili alle 3 salinità. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

L'attività media dell'AChE nelle ghiandole digestive è risultata essere di un ordine di grandezza nettamente inferiore a quella registrata nelle branchie con valori di circa la metà (fig. 5.8.).

In particolare si nota che pur avendo una diminuzione di attività con l'aumentare della salinità nella fase di adattamento con valori che vanno da un massimo di $5,9 \pm 0,3$ nmol min⁻¹ mg di proteine⁻¹ del T0 ad un minimo di $5,3 \pm 0,03$ nmol min⁻¹ mg di proteine⁻¹ di AH. Alla bassa salinità non si hanno differenze statisticamente significative così come alla alta salinità, mentre a 33 psu (M) si rileva una diminuzione significativa dell'attività dell'enzima nei mitili esposti a mercurio (EM = $4,3 \pm 0,1$ nmol min⁻¹ mg di proteine⁻¹) rispetto al controllo (CM = $5,7 \pm 0,1$ nmol min⁻¹ mg di proteine⁻¹).

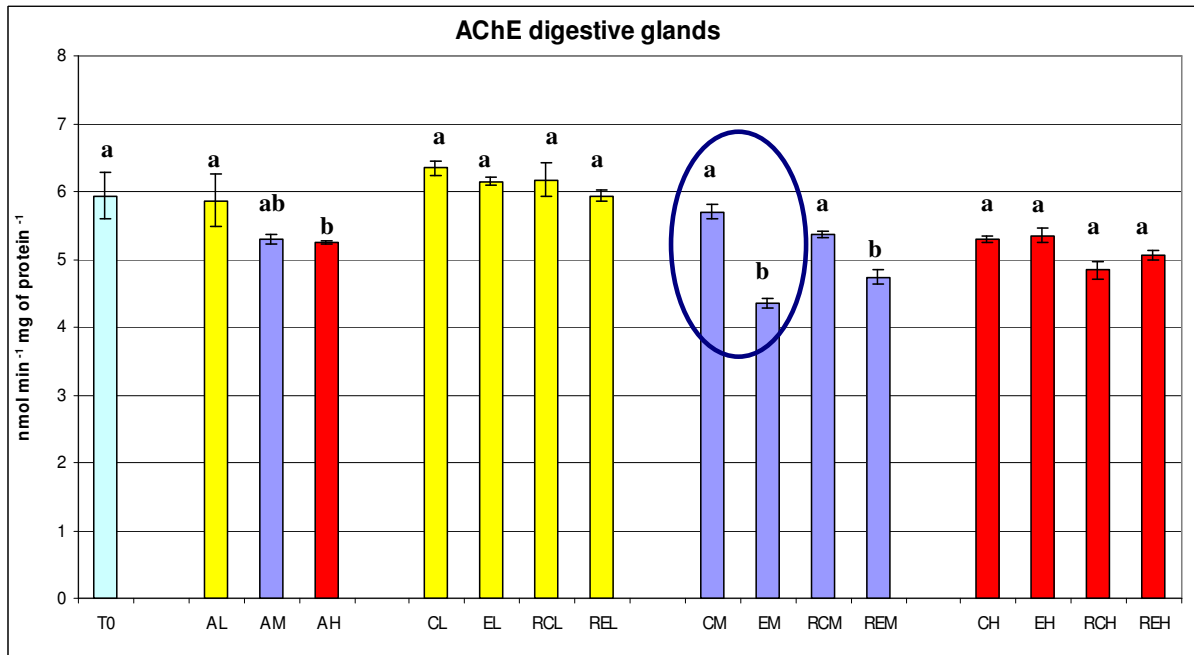


Fig. 5.8. Attività dell'AChE nelle ghiandole digestive dei mitili alle 3 salinità. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

L'analisi della correlazione lineare tra l'attività dell'enzima e la salinità mette in evidenza una significativa correlazione negativa sia nelle branchie che, seppur meno intensa, nelle ghiandole digestive (fig. 5.9., 5.10. e 5.11.)

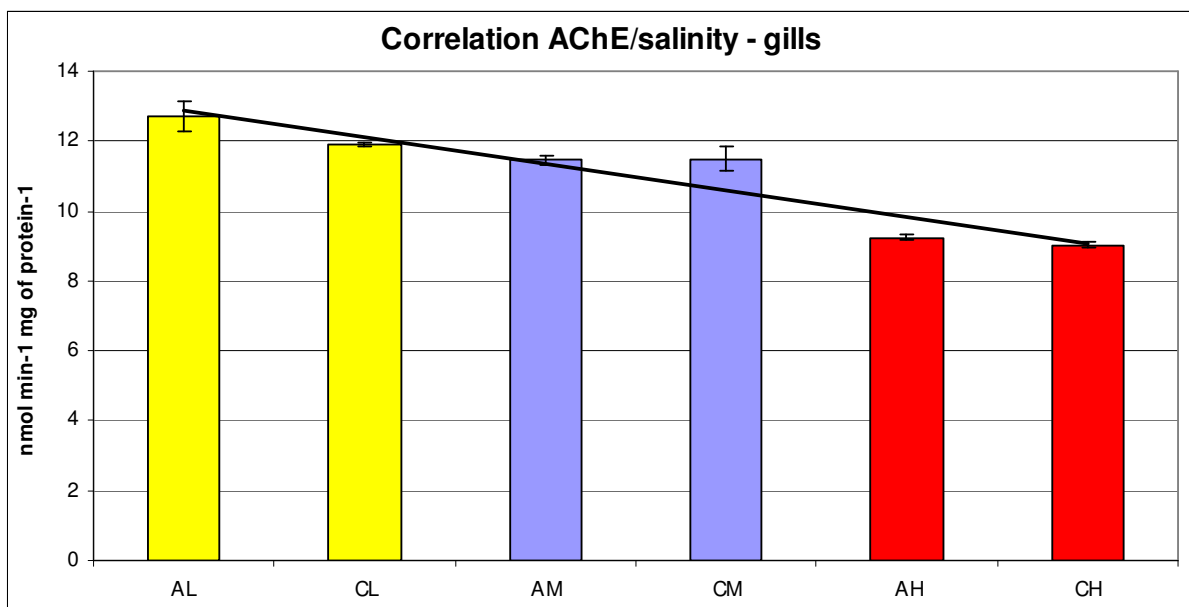


Fig. 5.9 Attività dell'AChE nelle branchie di mitili non esposti a Hg alle 3 salinità.

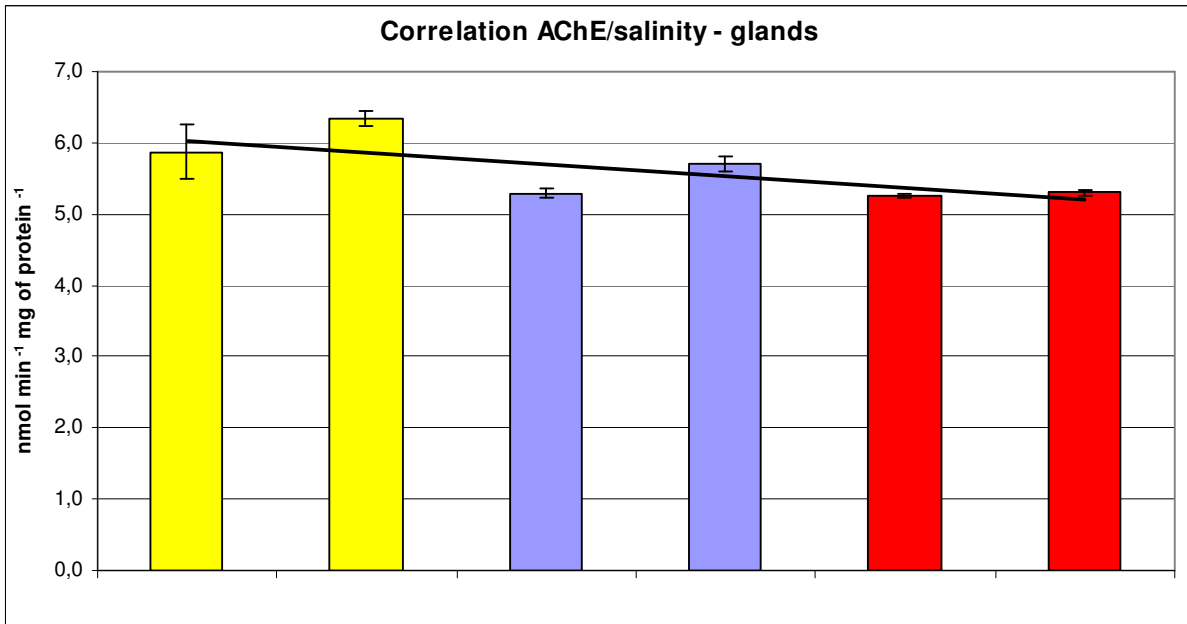


Fig. 5.10 Attività dell'AChE nelle ghiandole digestive di mitili non esposti a Hg alle 3 salinità.

Cell contents:
 - Correlation Coefficient
 - P Value
 - Number of Samples

	AChE glands	AChE gills
salinity	-0,882	-0,907
	0,02	0,0127
	6	6
AChE glands		0,697
		0,124
		6
MT gills		

Fig. 5.11. Correlazione lineare tra salinità e AChE (test di Pearson; $p < 0,05$)

- Valutazione del contenuto di MT

I contenuti di metallotioneine nelle ghiandole digestive e nelle branchie dei mitili sono mostrati nelle fig. 5.12. e 5.13.. I livelli di MT nelle branchie sono

nettamente inferiori a quelli nelle ghiandole digestive che risultano possedere una quantità di queste proteine quasi triple. Si hanno variazioni significative di MT alla media salinità nelle ghiandole digestive con aumento significativo dei contenuti in EM e REM rispetto a CM e RCM (EM = $353 \pm 19 \mu\text{g g di tessuto}^{-1}$; CM = $269 \pm 9 \mu\text{g g di tessuto}^{-1}$; RCM = $220 \pm 35 \mu\text{g g di tessuto}^{-1}$; REM = $332 \pm 11 \mu\text{g g di tessuto}^{-1}$) (fig. 5.12.) mentre nelle branchie si ha un aumento significativo di MT sia a 25 psu (L) che a 33 psu (M), con valori rispettivamente di $108 \pm 5 \mu\text{g g di tessuto}^{-1}$ e $128 \pm 4 \mu\text{g g di tessuto}^{-1}$ per CL e EL e di $78 \pm 5 \mu\text{g g di tessuto}^{-1}$ e $129 \pm 11 \mu\text{g g di tessuto}^{-1}$ per CM e EM (fig. 5.13.).

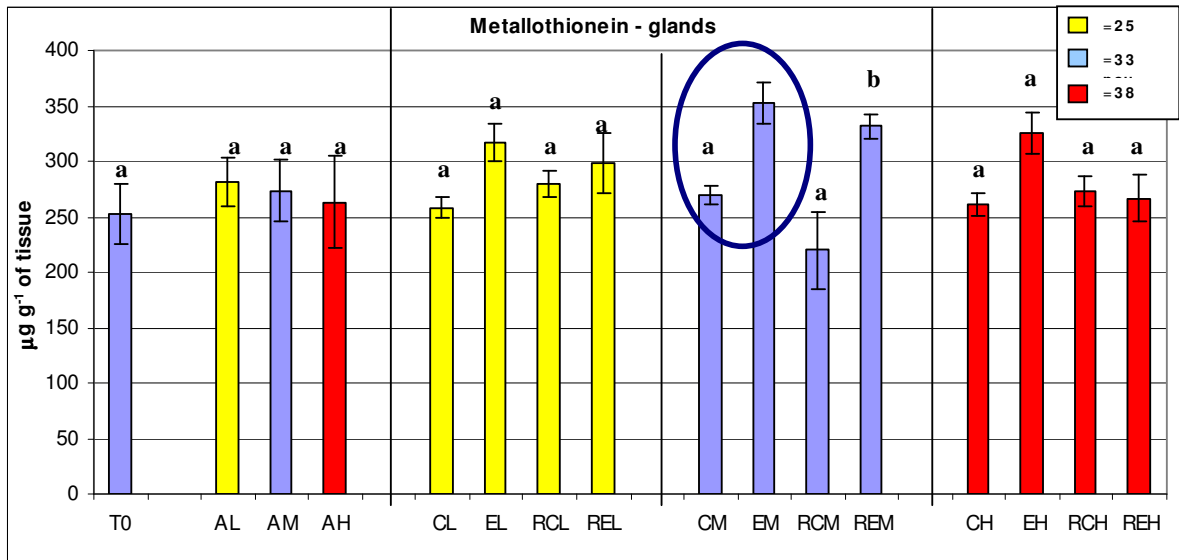


Fig. 5.12. Contenuti di MT nelle ghiandole digestive dei mitili alle 3 salinità. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

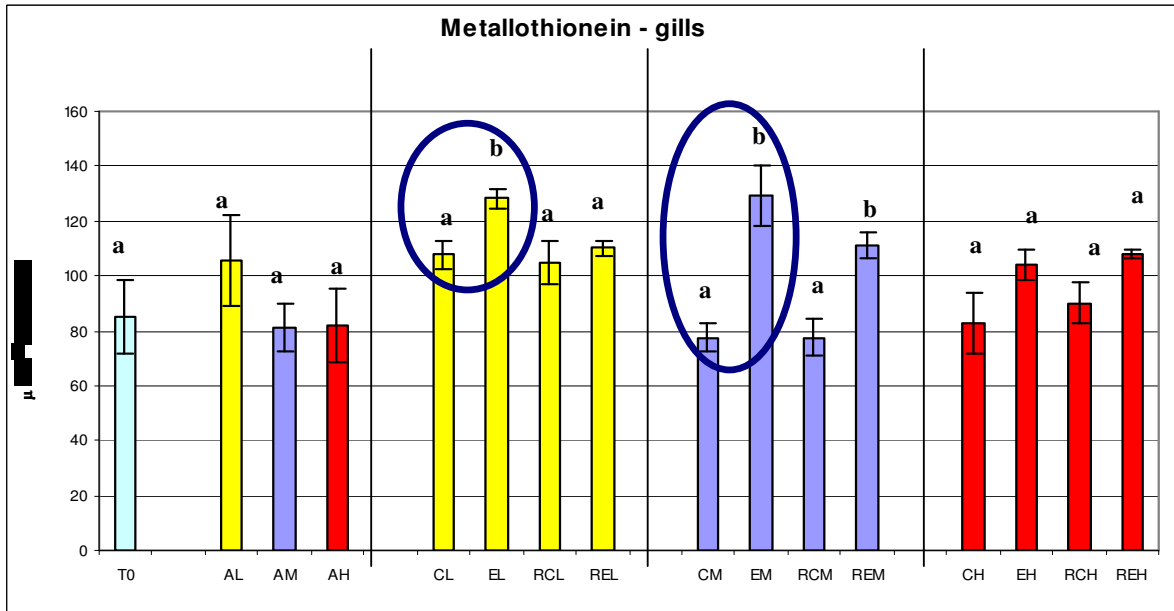


Fig. 5.13. Contenuti di MT nelle branchie dei mitili alle 3 salinità. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Come appare evidente dalle fig. 5.14., 5.15. e 5.16. non si ha correlazione significativa rispetto alla salinità per quanto riguarda le MT nelle ghiandole digestive mentre viene registrata una correlazione lineare negativa per quanto riguarda le MT nelle branchie.

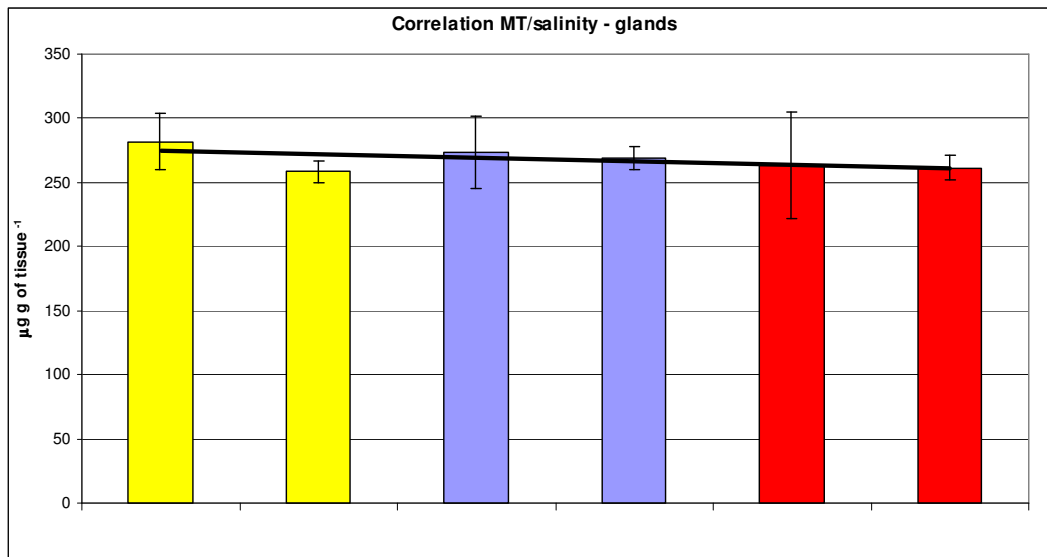


Fig. 5.14 Contenuti di MT nelle ghiandole digestive di mitili non esposti a Hg alle 3 salinità.

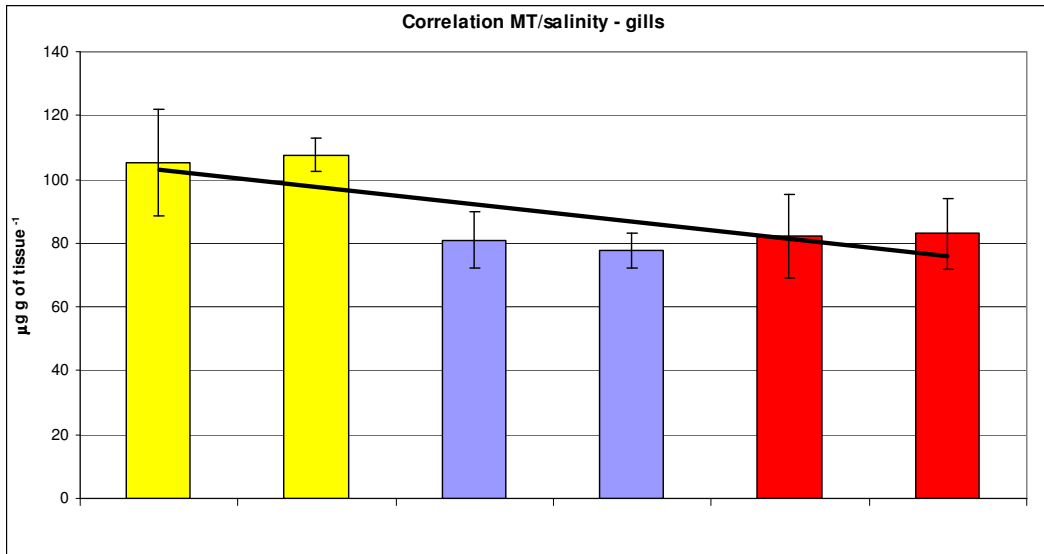


Fig. 5.15 Contenuti di MT nelle branchie di mitili non esposti a Hg alle 3 salinità.

Cell contents:
 - Correlation Coefficient
 - P Value
 - Number of Samples

	MT glands	MT gills
salinity	-0,248	-0,873
	0,636	0,0231
	6	6
Mt glands		-0,139
		0,793
		6
MT gills		

Fig. 5.16 Correlazione lineare tra salinità e MT (test di Pearson; $p < 0,05$)

Discussione

Come già accennato nell'introduzione (§ 1.1. e 1.2.), indagare la qualità ambientale delle zone di transizione utilizzando il biomonitoraggio con biomarker, porta inevitabilmente a dover fare i conti con i possibili (e probabili) effetti dei fattori abiotici nell'influenzare i processi fisiologici degli organismi sentinella. I risultati della campagna Baiona 2007 (§ 5.2.3.) mostrano variazioni di temperatura giornaliera fino 15 gradi, nelle valli di Comacchio la salinità media va da 25 psu a

38 psu con picchi massimi di 42 psu (relazione ARPA 2004). Alla luce di queste considerazioni appare evidente che identificare e studiare approfonditamente gli effetti diretti e indiretti dei fattori abiotici sull'espressione dei biomarker risulti di fondamentale importanza per una corretta interpretazione delle risposte fornite dagli organismi ai fini di una corretta e inequivocabile diagnosi ambientale. La comunità scientifica è consapevole di questa necessità e specifici studi sono stati intrapresi per valutare gli effetti dei fattori abiotici come la salinità sull'espressione dei biomarker (riferimenti in Monserrat et al., 2006)

Gli effetti della salinità su MT, AChE e cAMP, oggetto di questo studio, ha fornito degli interessanti risultati. L'analisi dei livelli di cAMP non hanno messo in evidenza una particolare e chiara influenza della salinità, ma come già detto (§5.1.1.) i pochissimi studi effettuati sugli effetti che particolari condizioni ambientali possano avere sui livelli di cAMP non sono sufficienti a chiarire quanto il cAMP sia direttamente influenzato da particolari stress o quanto non sia indirettamente condizionato da variazioni dell'attività di AC e PH implicati nelle reazioni di formazione e distruzione del nucleotide. Ciò non toglie che integrando questi risultati con altri studi effettuati da altri ricercatori si possa in un futuro prossimo chiarire il ruolo del cAMP come biomarker ambientale.

Un approccio diverso va invece affrontato nell'interpretare i risultati di MT e AChE. Questi biomarker hanno un ruolo ormai consolidato nei progetti di biomonitoraggio con biomarker e organismi sentinella anche in ambienti di transizione, per cui una attenta e critica analisi delle possibili interferenze della salinità sono fondamentali per un loro corretto utilizzo.

Pfeifer et al. (2005) ha recentemente individuato una correlazione negativa significativa tra l'attività dell'AChE e la salinità. I miei risultati confermano una correlazione lineare negativa tra AChE e salinità sia nelle branchie che nelle ghiandole digestive (fig. 5.11), suggerendo una scarsa affidabilità di questo biomarker in ambienti di transizione. Gli ulteriori risultati ottenuti mostrano invece che questo biomarker è in grado di rilevare e comunicare l'esposizione dei mitili al mercurio attraverso una significativa diminuzione di attività enzimatica alle tre diverse salinità in particolare nelle branchie (fig. 5.7.). L'AChE valutato nelle branchie di mitilo si conferma quindi a mio avviso un efficace biomarker per la valutazione della qualità ambientale.

L'analisi dei risultati delle MT porta invece a considerazioni opposte. L'aumento della salinità non sembra linearmente correlato alla salinità (fig. 5.16.), il che lascerebbe supporre una scarsa influenza di questa sull'espressione del biomarker. I risultati mostrati in fig. 5.12. e 5.13. mostrano invece che, oltre ad un modesto aumento alla bassa salinità nelle branchie (fig. 5.12.), i contenuti di MT non variano statisticamente nei mitili esposti a Hg se non in quelli mantenuti alla salinità media di 33psu. Questi risultati sembrano in disaccordo con studi precedentemente pubblicati che mettono in evidenza la maggiore tossicità dei metalli alle basse salinità (Blackmore and Wang, 2003; Wright, 1995) che dovrebbe portare quindi ad un aumento delle MT nei tessuti. Una risposta può essere ricercata nella considerazione che la salinità media di 33 psu alla quale il biomarker risponde efficacemente nel mio esperimento è la salinità naturale del sito di prelievo dei mitili oggetto di studio, e precedenti studi hanno dimostrato come l'efficienza di assorbimento di alcuni metalli pesanti sia massima negli organismi mantenuti alla salinità originale (Blackmore and Wang, 2003).

Conclusioni

In conclusione, mentre la valutazione dei livelli di cAMP necessita di ulteriori approfondimenti per poterne valutare le potenzialità come biomarker, la valutazione dell'attività dell'AChE nelle branchie e dei contenuti di MT nei tessuti di mitilo si confermano come due biomarker affidabili e sensibili. In particolare, al fine di interpretare correttamente le risposte delle MT, sarebbe opportuno raccogliere informazioni sulle variazioni di salinità a cui sono sottoposti gli organismi trapiantati.

5.1.3. effetto del propranololo sui livelli di cAMP

Risultati

- Percentuale di sopravvivenza

La percentuale di sopravvivenza è stata del 100%.

- Valutazione della stabilità lisosomiale - NRR test

Pur riscontrando una certa diminuzione nella stabilità della membrana lisosomiale all'aumentare della concentrazione di propranololo, non si riscontrano variazioni statisticamente significative (fig. 5.17) . In particolare T0, Ctrl, B e A hanno un tempo di destabilizzazione di 102 ± 7 min, 102 ± 15 min, 96 ± 17 min e 75 ± 9 min, rispettivamente.

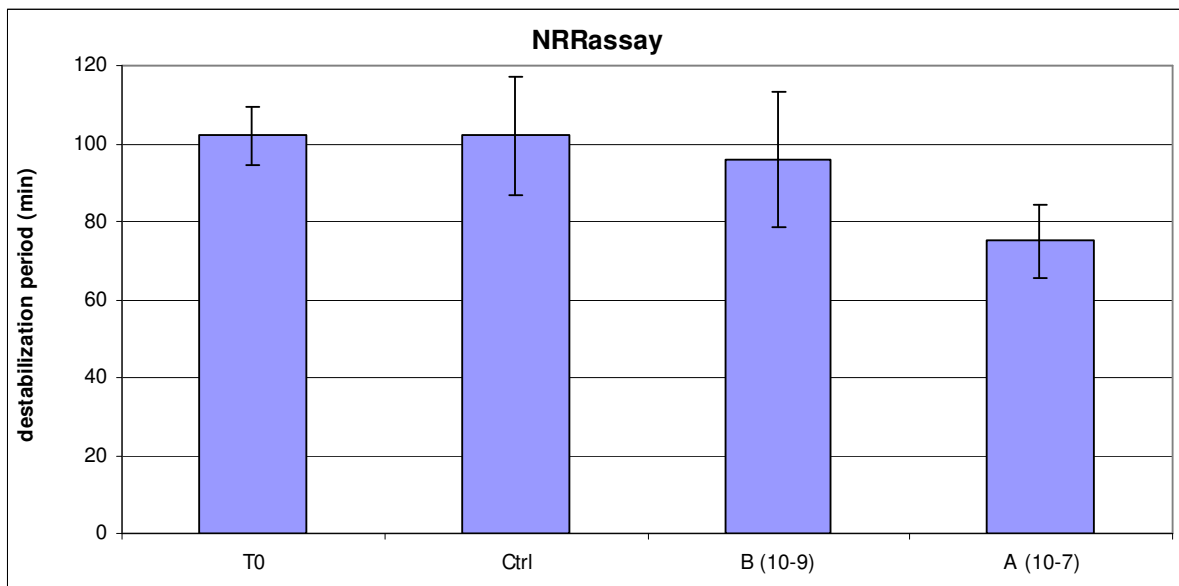
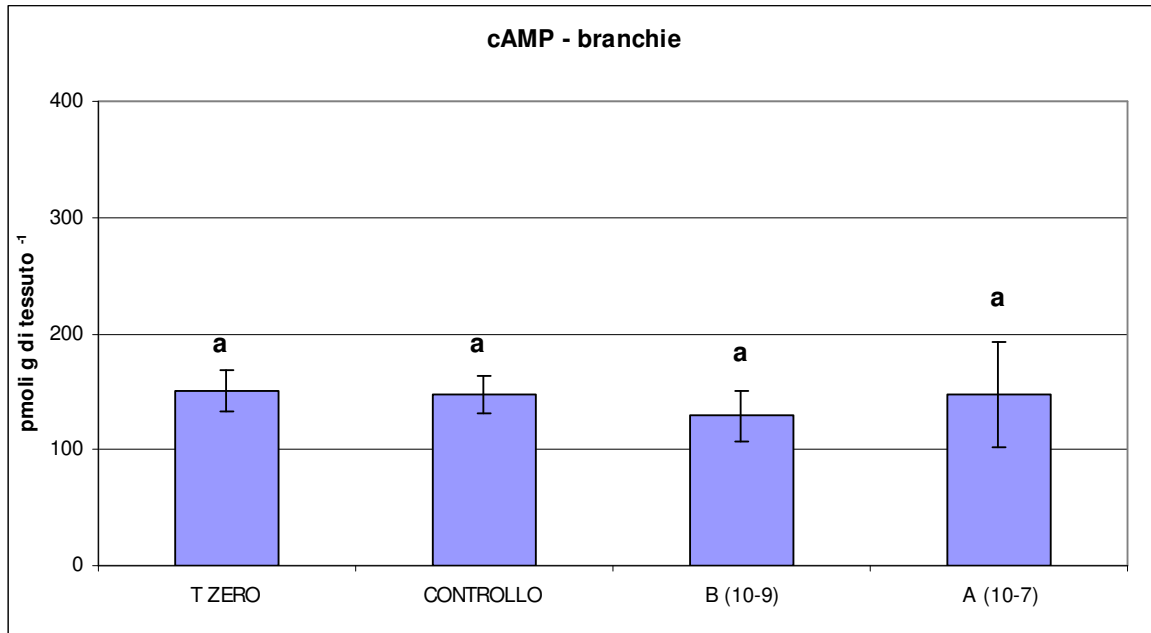


Fig. 5.17. Stabilità delle membrane lisosomiali negli ematociti dei mitili. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

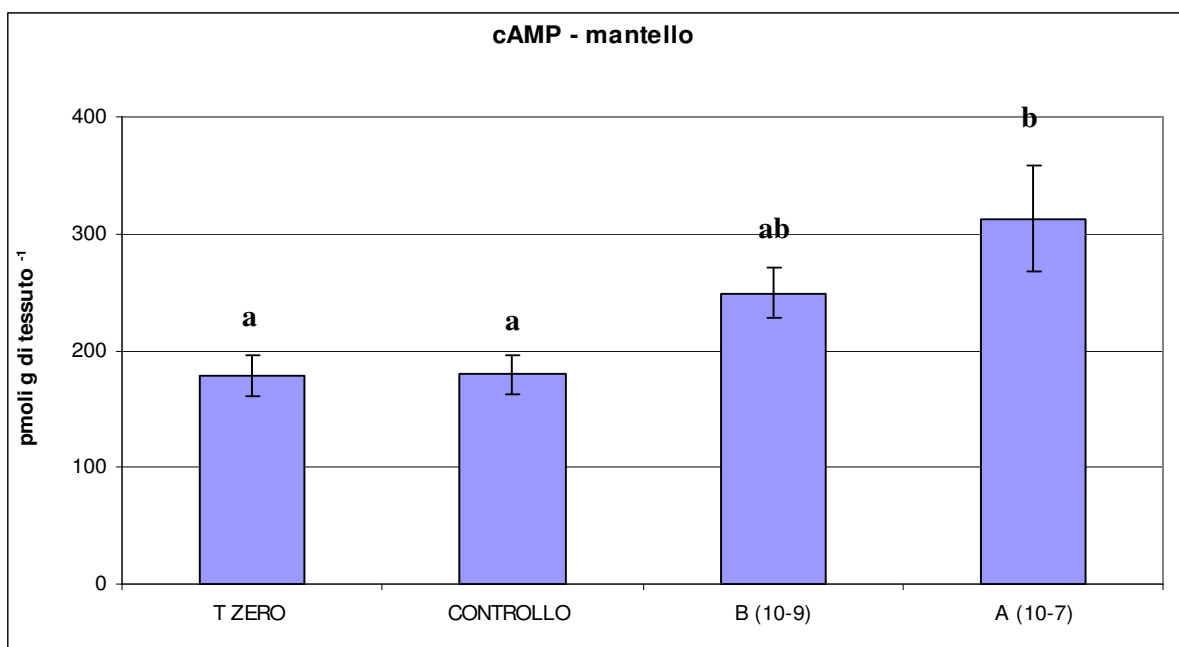
- Valutazione dei livelli di cAMP

Nessuna significativa variazione è stata riscontrata nei livelli di cAMP nelle branchie, con valori che vanno da $129,3 \pm 3,1$ pmoli g di tessuto⁻¹ di B a $150,0 \pm 13,8$ pmoli g di tessuto⁻¹ di T0 (fig. 5.18.).



5.18. Livelli di cAMP nelle branchie dei mitili. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Discorso diverso invece per i livelli di cAMP nel mantello dove si riscontra un significativo aumento dei livelli all'aumentare della concentrazione di propranololo (fig. 5.19.). In particolare i valori variano da un minimo di $178,7 \pm 17,7$ pmoli g di tessuto⁻¹ di Ctrl ad un massimo di $313,0 \pm 45,6$ pmoli g di tessuto⁻¹ di A.



5.19. Livelli di cAMP nel mantello dei mitili. Differenti lettere corrispondono a differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Discussione e Conclusioni

Anche se questo è uno studio pilota e non si propone di chiarire definitivamente l'effetto di una molecola utilizzata in farmacologia come il propranololo una volta rilasciato in ambiente, tuttavia fornisce interessanti indicazioni sulla prospettiva di approfondire la conoscenza sul tema. Il propranololo sembra infatti avere un effetto sui livelli di cAMP proporzionale alla sua concentrazione nel mantello, a differenza che nelle bronchie in cui i nostri risultati non evidenziano alcuna modificazione nei livelli di nucleotide. I risultati del NRRT sembrano suggerire un effetto nocivo del propranololo sullo stato di salute dell'organismo alla concentrazione più alta, anche se l'osservazione non è supportata dall'analisi statistica.

Dall'analisi dei nostri dati possiamo affermare che è stato sicuramente registrato un effetto del propranololo sui livelli di cAMP, tuttavia la scarsità di dati da noi collezionati in questo studio pilota non ci permettono di dare delle risposte certe sulla modalità d'azione diretta o indiretta del farmaco. Ulteriori e più approfondite indagini sul tema sarebbero necessarie nella prospettiva di chiarire l'effetto che in questo esperimento è stato individuato.

5.2 campagne di biomonitoraggio

5.2.1. Comacchio 2004/ 2005

Risultati e Discussione

- Percentuale di mortalità

La tabella 5.2. mostra la mortalità percentuale rilevata nelle due campagne.

Mortalità (%)			
	sito	Dopo 10gg	Dopo 30gg
Campagna A	FOCE	5	3
	GOBBINO	2	2
	BOSCOFORTE	12	51
	sito	Dopo 7gg	Dopo 30gg
Campagna B	FOCE	8	18
	FATTIBELLO	2	14
	CAMPO	1	34

Tab. 5.2. percentuale di mortalità dei mitili trapiantati. Numero di organismi iniziale = 80

Come si può dedurre dalla tab. 5.2. durante la campagna A la mortalità è stata bassa sia in FOCE che in GOBBINO, mentre è relativamente alta in BOSCOFORTE (12% a 10gg e 51% a 30gg), dove i mitili sembrano aver trovato condizioni avverse alla sopravvivenza.

Nella campagna B i mitili hanno una mortalità relativamente bassa in FOCE e FATTIBELLO dopo 7g, raggiungendo dopo 30 gg percentuali di mortalità del

18% e 14% rispettivamente. Andamento differente invece per CAMPO: dopo 7gg la mortalità è bassissima (1%) mentre dopo 30gg raggiunge i valori più alti della campagna B con una percentuale di organismi morti del 34%. Questo risultato fa pensare ad un possibile cambiamento in valle CAMPO delle condizioni ambientali nel periodo di tempo tra il settimo ed il trentesimo giorno di trapianto.

- Stabilità delle membrane lisosomiali (LMS)

La stabilità delle membrane lisosomiali è un parametro a cui viene riconosciuta grande importanza dalle agenzie di protezione ambientale che utilizzano i biomarker per la diagnosi della qualità dell'ambiente. In particolare è il parametro guida per l'applicazione del sistema esperto messo a punto nell'ambito del Programma Europeo BEEP. Inoltre, secondo le raccomandazioni dell'UNEP, rappresenta il biomarker utilizzato negli screening iniziali di monitoraggio di aree molto estese del Programma MED-POL 2006-2009, prima di procedere con l'intera batteria di biomarker nei siti che hanno destato interesse. Sulla base dei dati in letteratura, la stabilità lisosomiale superiore ai 20 minuti indica uno stato di salute dei mitili buono che va verso l'ottimo per valori ancora superiori.

In fig. 20 possiamo vedere l'andamento temporale della stabilità delle membrane lisosomiali nei 3 siti di campionamento durante la **campagna A**.

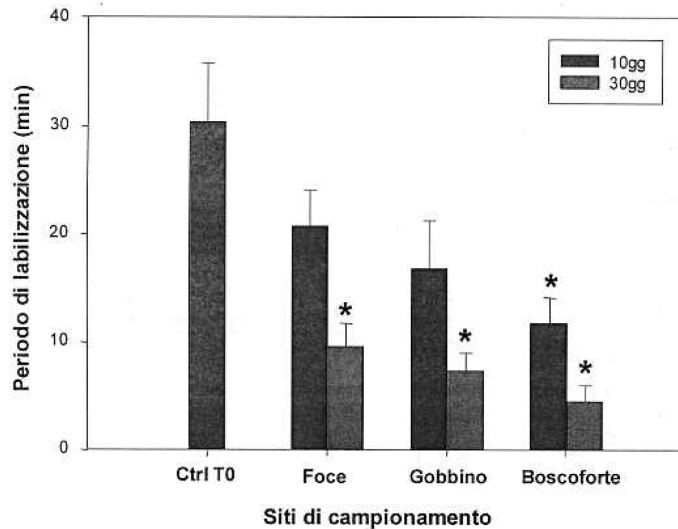


Fig. 5.20 Valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali nei mitili trapiantati nei tre siti di campionamento prescelti all'interno delle Valli di Comacchio. I dati rappresentano la media \pm E.S. del tempo di labilizzazione delle membrane lisosomiali valutato, per ogni sito, sulle fettine di 12 ghiandole digestive, ciascuna analizzata in 4 quadranti e per 7 tempi di esposizione. Quindi per ogni sito sono state analizzate 336 immagini di sezioni di ghiandole digestive. Il simbolo “*” indica una differenza statisticamente significativa ($*p < 0,05$) rispetto al controllo T0.

Dopo 10 giorni i mitili trapiantati in FOCE e GOBBINO sembrano mostrare un peggioramento dello stato di salute ($21 \pm 3,2$ min e 17 ± 5 min) rispetto al controllo (30 ± 6 min) ma rimangono pur sempre in un intervallo considerato di discreta/buona salute. Tale risultato può essere dovuto all'ambientamento dei mitili al nuovo ambiente. In BOSCOFORTE invece si ha una diminuzione più netta e significativa dello stato di salute con un tempo di labilizzazione delle membrane dopo 10gg di 12 ± 2 min. Dopo 30 gg in tutti i siti si rileva una netta sindrome da stress con valori di 10 ± 2 min per FOCE e 8 ± 2 min per GOBBINO. BOSCOFORTE appare ancora una volta il più critico, con valori che raggiungono 4 ± 2 min. Quest'ultimo risultato è confermato dalla percentuale di mortalità (tab.5.2), nettamente più alta in BOSCOFORTE (51% dopo 30gg) che negli altri siti (3% e 2% dopo 30gg).

In fig. 5.21 possiamo vedere l'andamento temporale della stabilità delle membrane lisosomiali nei 3 siti di campionamento durante la **campagna B**.

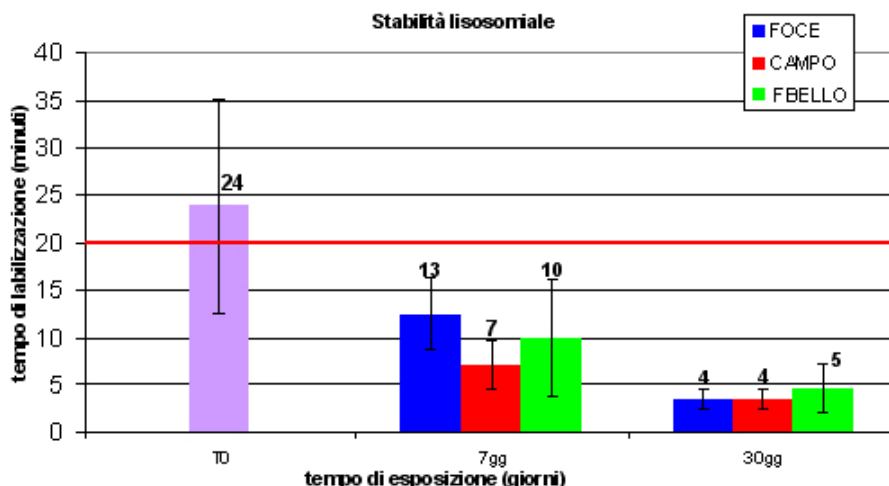


Fig. 5.21. 3 Valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali in mitili trapiantati in 3 siti all'interno delle valli di Comacchio. I valori rappresentano le medie \pm DEV.ST. del tempo di labilizzazione delle membrane lisosomiali valutato, per ogni sito, sulle sezioni di 12 ghiandole digestive, ciascuna analizzata in 4 quadranti e per 7 tempi di esposizione. Quindi per ogni sito sono state analizzate circa 336 immagini di ghiandole digestive.

Dopo 10 giorni in tutti i siti si ha un netto peggioramento dello stato di salute degli organismi segnalato da valori di tempo di labilizzazione da 7 ± 3 a 13 ± 4 minuti rispetto al controllo (24 ± 11 min). A 30 giorni il processo di perdita di funzionalità dei lisosomi continua con valori di labilizzazione di circa 5 minuti, relativi ad un critico stato di salute degli organismi. Le alte percentuali di mortalità a 30 giorni, con valori del 14%, 18% e 34%, confermano questo dato.

- Accumulo di lipidi neutri insaturi (LIP) e accumulo di lipofuscine (LIF) nei lisosomi

L'accumulo di lipidi neutri insaturi e di lipofuscine nei lisosomi è un altro aspetto conseguente alla perdita di efficienza del sistema lisosomiale nei processi digestivi e detossificanti dovuta alla presenza in ambiente di stress naturali o antropici che diminuiscono lo stato di salute degli organismi.

In fig. 5.22. è mostrato l'andamento temporale di accumulo di lipidi neutri insaturi (a) e lipofuscine (b) nei 3 siti di campionamento durante la **campagna A.**

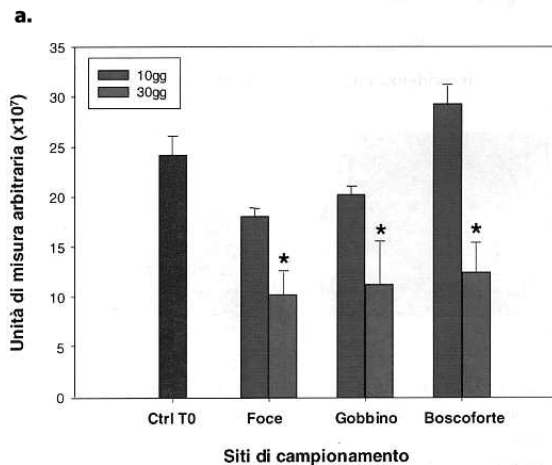


Fig. 5.22 a Valutazione dell'accumulo di lipidi neutri insaturi nei lisosomi dei mitili trapiantati nei tre siti di campionamento prescelti all'interno delle Valli di Comacchio. L'accumulo di lipidi è stato valutato mediante analisi di immagine condotta con il software Scion Image. Per ogni sito sono state valutate 96 immagini di sezioni di ghiandole digestive e la media delle aree soggette a colorazione \pm errore standard (E.S.) è riportata nel grafico in figura. Il simbolo "*" indica una differenza statisticamente significativa ($*p < 0,05$) rispetto al controllo T0.

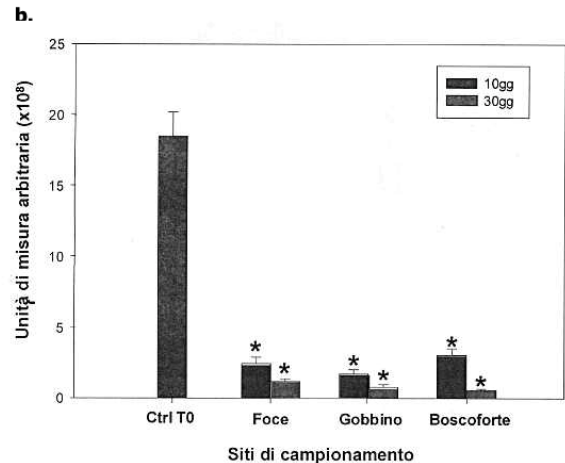


Fig. 5.22 b Valutazione dell'accumulo di lipofuscine nei lisosomi dei mitili trapiantati nei tre siti di campionamento prescelti all'interno delle Valli di Comacchio. L'accumulo di lipofuscine è stato valutato mediante analisi di immagine condotta con il software Scion Image. Per ogni sito sono state valutate 96 immagini di sezioni di ghiandole digestive e la media delle aree soggette a colorazione \pm errore standard (E.S.) è riportata nel grafico in figura. Il simbolo "*" indica una differenza statisticamente significativa ($*p < 0,05$) rispetto al controllo T0.

Dall'analisi dei risultati mostrati in figura 5.22 si nota come ci sia una generale diminuzione della quantità dei LIP sia a 10 giorni in FOCE e GOBBINO, sia a 30 giorni in tutti i siti e con una diminuzione di circa il 50%, ed una ancor più drastica diminuzione di LIF sia a 10gg che a 30gg in tutti i siti. Questo dato sembra contrastare con i risultati attesi, in cui LIP e LIF dovrebbero aumentare alla diminuzione dello stato di salute (messo in evidenza dalla SML). L'unico meccanismo da noi conosciuto che possa giustificare questi dati è l'instaurarsi di processi di autofagia dovuti a particolari situazioni ambientali sfavorevoli come ad esempio la mancanza di nutrimento.

In fig. 5.23 è mostrato l'andamento temporale di accumulo lipofuscine nei 3 siti di campionamento durante la **campagna B**.

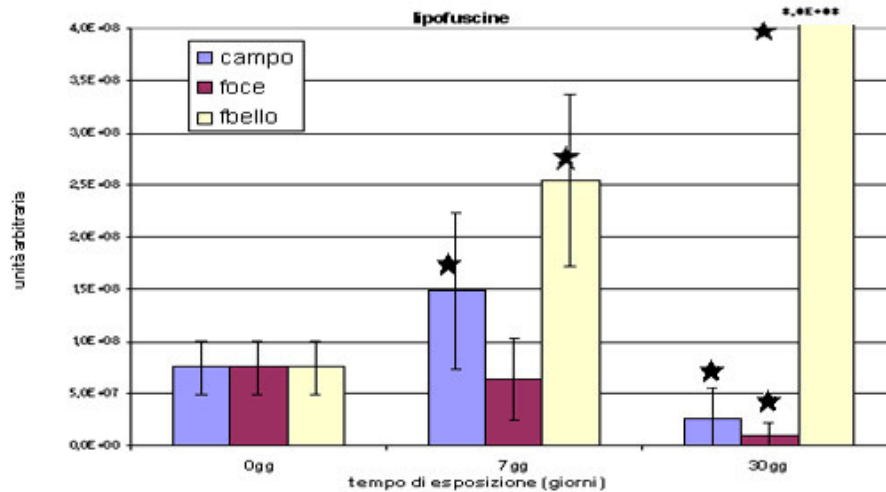


Fig. 5.23 L'accumulo di lipofuscine nei mitili trapiantati nei 3 siti prescelti all'interno delle valli di Comacchio è stato valutato mediante analisi di immagine condotta con il software Scion Image. Per ogni sito sono state valutate 96 immagini di sezione di ghiandola digestiva e la media \pm dev.st. è riportata nel grafico in figura. IL simbolo " * " indica una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) rispetto al controllo T0.

I risultati mostrati in fig. 5.23 mostrano dei risultati differenti a seconda dei siti. In FATTIBELLO si ha un accumulo di lipofuscine significativo e lineare nel tempo; in CAMPO si ha un accumulo significativo dopo una settimana ed una successiva netta diminuzione dopo 30gg; in FOCE si nota una netta diminuzione delle lipofuscine dopo 30gg. Le differenze tra questi risultati può essere attribuito alle differenti caratteristiche dei siti. FATTIBELLO è situato lungo un canale che mette in comunicazione Comacchio con Porto Garibaldi e quindi il mare, per cui, pur essendo un collettore di svariate fonti di contaminazione antropica, garantisce la presenza delle condizioni minime di buona sopravvivenza degli organismi attraverso un discreto ricambio di acqua che mitiga ad esempio i processi di riscaldamento e ipossia e fornisce il nutrimento necessario. Analizzando invece i risultati in CAMPO e integrandoli con la mortalità degli organismi, sembra che qualche evento abbia modificato le condizioni ambientali degli organismi. Dopo 7 giorni i mitili, pur rispondendo ad una situazione stressoria, riescono efficacemente a sopravvivere ed a svolgere le normali funzioni fisiologiche; dopo 30 giorni invece si ripetono gli andamenti riscontrati in FOCE B ed in FOCE A, GOBBINO A e BOSCOFORTE A con una netta diminuzione delle lipofuscine. FOCE B è l'unico sito riproposto tra quelli della campagna A e presenta infatti una diminuzione delle lipofuscine significativa dopo 30gg, mentre a 10gg non variano. Questo risultato può essere

dovuto o alla non presenza di stress (però in contrasto con la LMS) o ai processi contrastanti di accumulo di lipofuscine e smaltimento tramite processi di autofagia. L'ipotesi dell'attuarsi di processi di autofagia sembra trovare conferma dall'analisi delle sezioni di tessuto digestivo dell'epatopancreas trattate per evidenziare le lipofuscine, la cui struttura tubulare, come si vede nella fig. 5.24b, risulta difficilmente identificabile se paragonata ad un tessuto di organismo in buono stato di salute (fig. 5.24a).

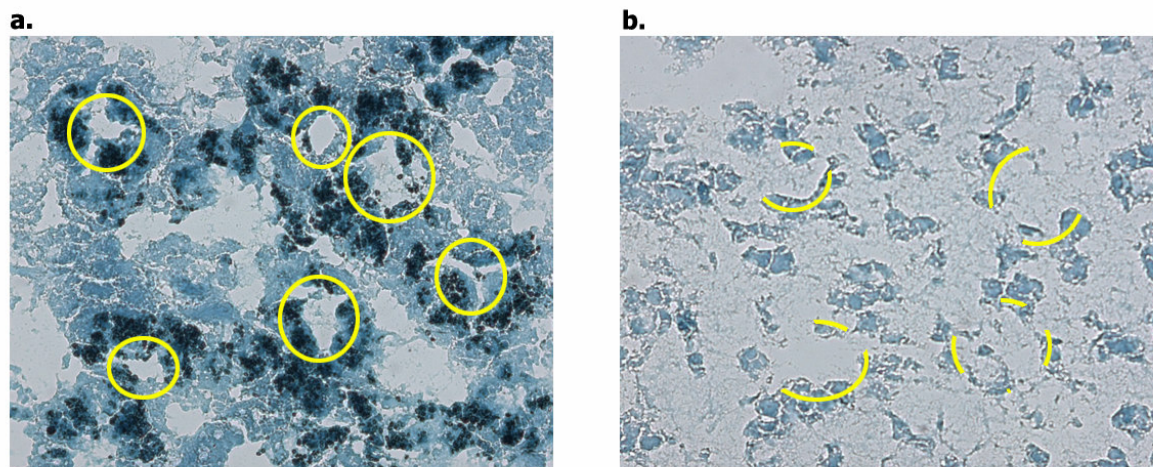


Fig. 5.24 Sezioni di ghiandole digestive di mitilo colorate per la rivelazione delle lipofuscine. In giallo il contorno delle sezioni di microtubulo del tessuto digestivo: **a.** tessuto di mitilo trapiantato in un sito contaminato nella Pialassa Baiona per 30gg; **b.** tessuto di mitilo esposto nel sito FOCE (campagna B) per 30gg.

- Contenuto di metallotioneine

L'aumento delle metallotioneine è un biomarker specifico per la presenza di contaminazioni ambientali di metalli pesanti.

In fig. 5.25 è mostrato l'andamento temporale della concentrazione di metallotioneine nelle ghiandole digestive dei mitili trapiantati nei 3 siti di campionamento durante la **campagna A**.

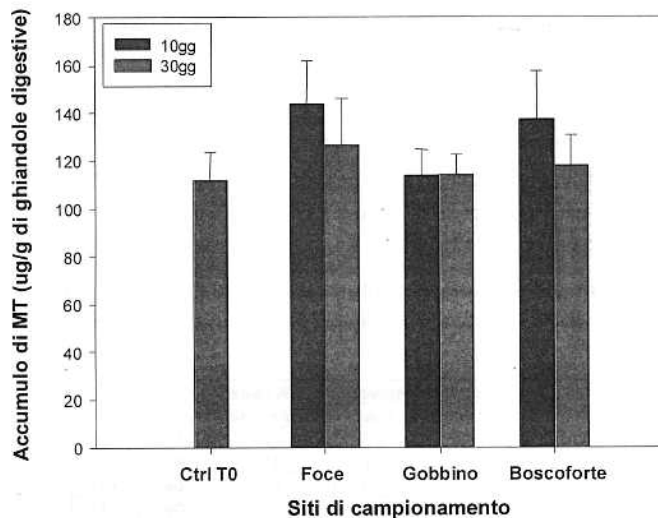


Fig. 5.25. Valutazione del contenuto di MT nelle ghiandole digestive dei mitili trapiantati nei tre siti di campionamento prescelti all'interno delle Valli di Comacchio. I dati riportati rappresentano la media delle concentrazioni \pm errore standard (E.S.) di 6 valutazioni separate condotte su pool di ghiandole digestive prelevate da 5 organismi. Il contenuto in MT si riferisce al peso fresco del tessuto in esame.

Dall'analisi dei risultati si vede come non ci sia variazione significativa di MT in nessun sito per nessun tempo di esposizione. Questo risultato sembra suggerire l'assenza di alte e dannose concentrazioni di metalli disponibili.

In fig. 5.26 vediamo l'andamento temporale della concentrazione di metallotioneine nelle ghiandole digestive dei mitili trapiantati nei 3 siti di campionamento durante la **campagna B**.

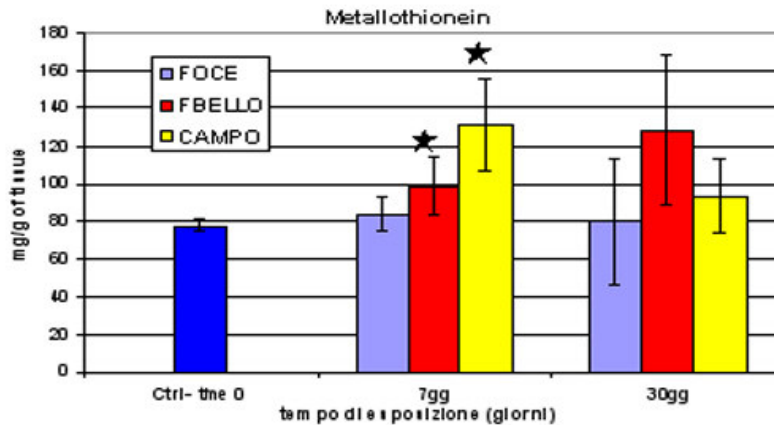


Fig. 5.26. **8** Contenuto di MT nelle ghiandole digestive dei mitili trapiantati nei 3 siti di campionamento nelle valli di Comacchio. I valori riportati rappresentano la media \pm dev. standard delle concentrazioni ottenute da 6 valutazioni separate condotte su 3 pool di ghiandole digestive prelevate da 15 organismi. Il contenuto di metallothioneine si riferisce al peso fresco del tessuto in esame. Il simbolo " * " si riferisce ad una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) rispetto al controllo - T0.

Ancora una volta notiamo un differente andamento della concentrazione di MT nel tempo e nei 3 siti. In FATTIBELLO, che come abbiamo già fatto precedentemente notare sembra permettere agli organismi il normale svolgimento dei propri processi fisiologici, notiamo un accumulo lineare nel tempo di MT (anche se non significativo a 30 giorni per la presenza di un elevato errore) che sembra suggerire una contaminazione ambientale da metalli pesanti. In CAMPO ancora una volta dopo 7 gg sembra esserci un "normale" processo di accumulo di MT dovuto alla presenza di metalli mentre a 30 gg si ristabilisce il livello iniziale. In FOCE si ripete lo stesso andamento riscontrato in tutti i siti della campagna A con nessuna differenza significativa né a 10gg né a 30gg spiegabile come assenza di alte concentrazioni di metalli o con l'inefficienza dei processi difensivi specifici.

- Attività dell'enzima acetilcolinesterasi

L'AChE è inibito specificatamente dai residui di pesticidi comunemente usati in agricoltura.

In fig. 5.27 è mostrato l'andamento temporale dell'attività dell' AChE nelle branchie dei mitili trapiantati nei 3 siti di campionamento durante la **campagna A**.

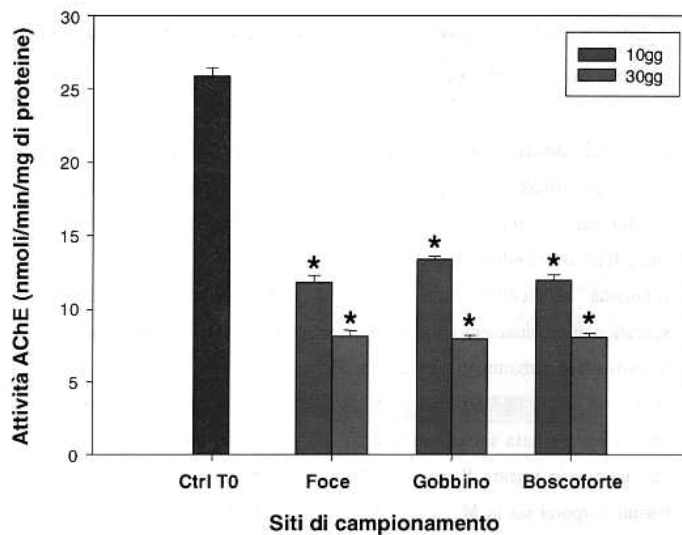


Fig. 5.27. Valutazione dell'attività dell'enzima AChE nelle branchie dei mitili trapiantati nei tre siti di campionamento prescelti all'interno delle Valli di Comacchio. I dati riportati sono espressi in nmoli/min/mg di proteine e rappresentano la media dell'attività AChE \pm E.S. (errore standard) di 6 valutazioni separate condotte su pool di branchie prelevate da 10 organismi. Il simbolo " * " indica una differenza statisticamente significativa ($*p < 0,05$) rispetto al controllo T0.

Come si vede nel precedente grafico l'attività dell'enzima diminuisce linearmente nel tempo in tutti i siti. Questo risultato suggerisce la presenza in ambiente in quel periodo di residui di pesticidi.

In fig. 5.28 è mostrato l'andamento temporale dell'attività dell' AChE nelle branchie dei mitili trapiantati nei 3 siti di campionamento durante la **campagna B.**

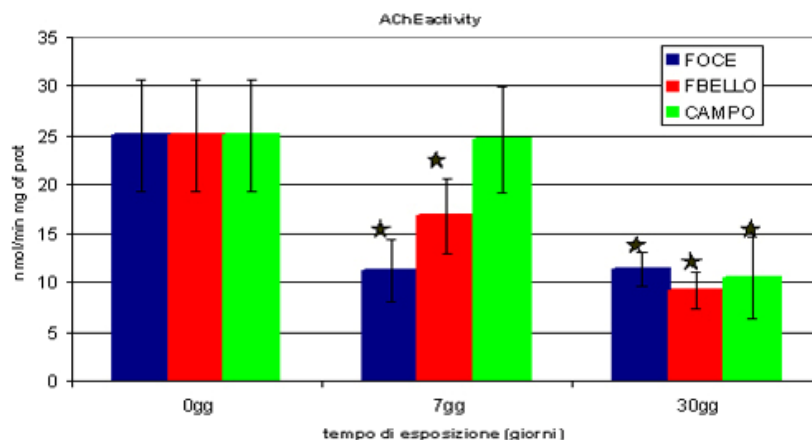


Fig. 5.28.

Valutazione dell'attività dell'enzima AChE nelle branchie dei mitili trapiantati nei 3 siti di campionamento nelle valli di Comacchio. I dati riportati sono espressi in nmol/min/mg di proteine e rappresentano la media \pm D.S. (deviazione standard) di 4 valutazioni separate condotte in sestuplicato su pool di branchie prelevate da 10 organismi. Il simbolo "*" indica una differenza statisticamente significativa (* $p < 0,05$) rispetto al controllo - T0.

I risultati ottenuti per l'AChE durante la campagna B mostrano una diminuzione lineare nel tempo dell'attività dell'enzima nei mitili trapiantati in FATTIBELLO, una drastica diminuzione già a 7gg nei mitili in FOCE, mentre in CAMPO l'attività non varia nei primi 7gg e successivamente cala significativamente. Ancora una volta il diverso andamento nei tre siti può essere spiegato nella sostanziale differenza ambientale dei siti stessi. Infatti, oltre tutto quello già detto su FOCE e FATTIBELLO, c'è da dire che CAMPO, a differenza degli altri due siti, è una valle chiusa che non sembra ricevere acque di scolo dei terreni agricoli. Giustificata perciò la non variazione dopo 7gg dell'attività, mentre un cambiamento delle condizioni ambientali potrebbero aver causato un generale peggioramento delle condizioni di salute dell'organismo con conseguente probabile perdita di gran parte delle funzioni fisiologiche nel successivo periodo di esposizione.

Conclusioni

Precedenti studi di biomonitoraggio con biomarker e organismi sentinella erano stati condotti in una laguna costiera, la Pialassa Baiona in prossimità di Ravenna, per la valutazione della qualità dell'ambiente (§5.2.3.1.). I risultati ottenuti in termini di qualità della risposta dei biomarker era stata buona: il "rumore di fondo" generato dagli stress naturali come sbalzi di temperatura ed ipossia non

aveva eccessivamente disturbato la risposta della batteria di biomarker che aveva permesso una interessante analisi della qualità dell'ambiente. Da questi risultati il *Mytilus galloprovincialis* aveva confermato essere un ottimo organismo sentinella, tale da permettere il suo utilizzo anche in ambienti "naturalmente stressati" come le lagune costiere. In quel caso di studio gli organismi erano sempre stati trapiantati nei canali dove le correnti di marea consentivano un ottimo ricambio di acqua, a differenza delle due campagne di biomonitoraggio condotte nelle valli di Comacchio, dove solo il sito FATTIBELLO nella campagna B si trova in un canale collegato con il mare e con una minima circolazione di acqua. Il sito FATTIBELLO risulta infatti essere l'unico in cui gli organismi sembrano aver mantenuto per tutto il tempo di esposizione una minima efficienza dei processi fisiologici tali da permettere l'esprimersi delle risposte di difesa o di adattamento conseguenti all'esposizione ad un generico o specifico agente di stress. In questo sito tutti i biomarker hanno confermato la presenza di vari agenti stressori tra cui metalli e probabilmente residui di pesticidi.

Negli altri siti di campionamento i risultati ottenuti sono in alcuni casi contraddittori (diminuzione SML e diminuzione LIP e LIF negli stessi campioni) e ci inducono a considerare con riserva i risultati stessi. Appare infatti evidente che gli organismi hanno trovato un ambiente inospitale che ha ridotto sensibilmente tutte le funzioni fisiologiche come attività enzimatica o produzione proteica ma non abbiamo gli elementi per attribuire questa situazione ad una qualche fonte di contaminazione o semplicemente a condizioni ambientali (temperatura, salinità, ossigeno, nutrimento) avverse alla sopravvivenza degli organismi.

Da quanto detto si deduce che la scelta dei siti di campionamento all'interno delle valli di Comacchio e più in generale in tutti gli ambienti di transizione sia fondamentale per registrare dei risultati attendibili sulla qualità ambientale tramite l'utilizzo di biomarker e organismi sentinella.

Alla luce delle considerazioni emerse, ritengo interessante integrare queste prime indicazioni con la realizzazione di ulteriori campagne di ricerca all'interno delle valli di Comacchio integrate con campagne conoscitive di tipo chimico-fisico e geochimico.

5.2.2. ARPA – CIPE 2004/2005

Risultati e discussione

- Stabilità delle membrane lisosomiali (metodo istologico)

Sulla base dei dati in letteratura, la stabilità lisosomiale superiore ai 20 minuti indica uno stato di salute dei mitili buono che va verso l'ottimo per valori ancora superiori (Viarengo et al., 1998). Nelle nostre campagne di monitoraggio, la stabilità delle membrane lisosomiali ha sempre indicato uno stato di salute molto buono per i mitili campionati, sia quelli provenienti dalla Piattaforma ENI Angela utilizzati come mitili di riferimento, sia dalle altre stazioni (fig. 5.29).

Tuttavia nel campionamento del 17 Giugno 2005, a fronte di una stabilità lisosomiale molto elevata per il sito di riferimento indicativa di un ottimo stato di salute dei mitili, è stata misurata una stabilità con tempi molto bassi per il sito Moli Foranei (stazione 308), e tempi solo leggermente più alti per gli altri siti. Valori bassi come quelli riscontrati nei mitili della stazione 308 sono indicatori di un grave stato di sofferenza degli animali. Stando alle indicazioni della stabilità delle membrane lisosomiali i mitili prelevati a Meda di Goro (102) e a Porto Garibaldi (104) mostravano uno stato di salute appena discreto, con valori riscontrabili abbastanza comunemente in zone di acque costiere in cui possa aver luogo ad esempio un aumento di temperatura. Il confronto dei dati di stabilità delle membrane lisosomiali con i dati di bioaccumulo di metalli pesanti, diossine, etc effettuati nel corso del Programma non permette alcun collegamento tra i fattori di stress esaminati e tale abbassamento della stabilità delle membrane lisosomiali, soprattutto non giustifica quello che si osserva nei mitili dei Moli Foranei di Ravenna.

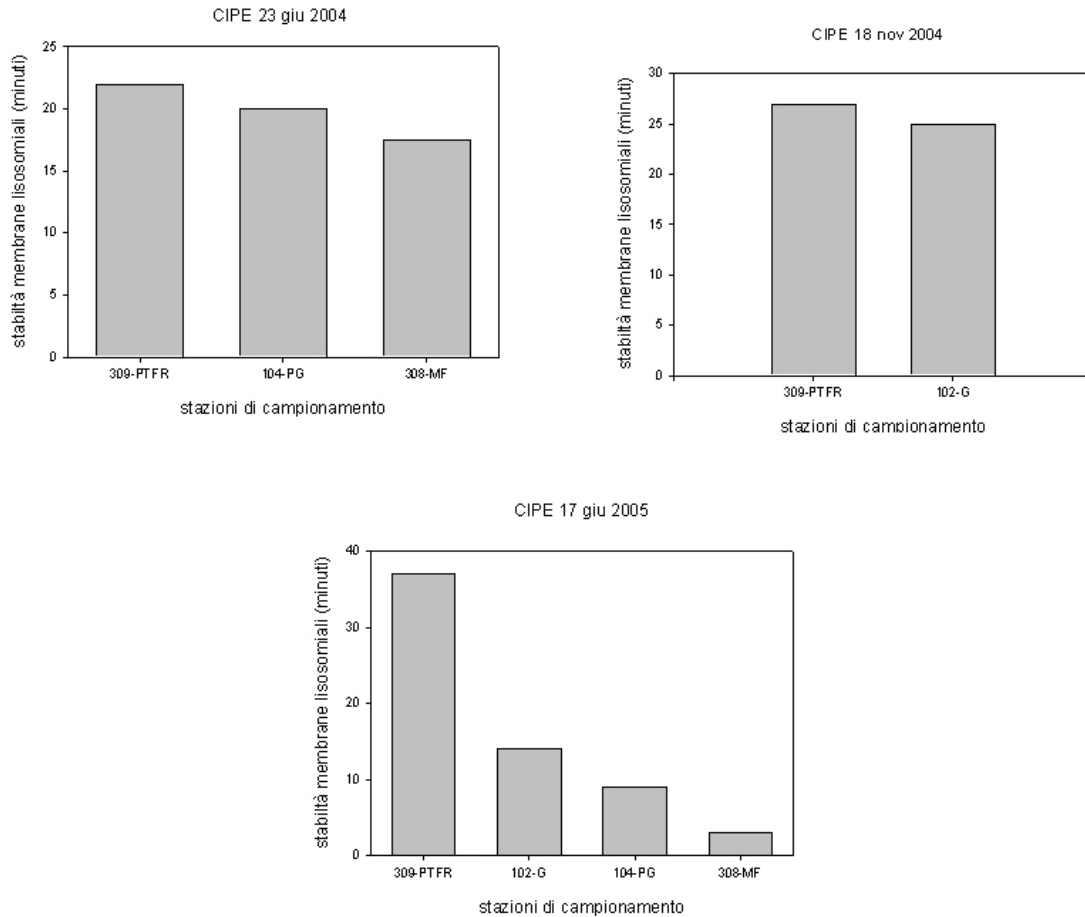


Figura 5.29. Valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali in ghiandole digestive di mitili prelevati durante le diverse campagne per il Progetto CIPE.

- Accumulo di lipofuscine e lipidi neutri nei lisosomi

Quello che emerge dalle altre valutazioni fatte sulla funzionalità dei lisosomi è che, mentre in genere i dati riguardanti l'accumulo di lipidi neutri (Figura 5.31.) e di lipofuscine (Figura 5.30.) sono nella media e non si differenziano dai dati del sito di riferimento, quelli misurati nei mitili della stazione 308 - Moli Foranei del campionamento del 17 giugno 2005 sono aumentati in maniera significativa. Proprio l'aumento di lipofuscine e lipidi neutri è un segnale di sindrome da stress patita dagli animali; tale sofferenza può essere dovuta ad un ampio range di fattori di stress sia naturali che antropici.

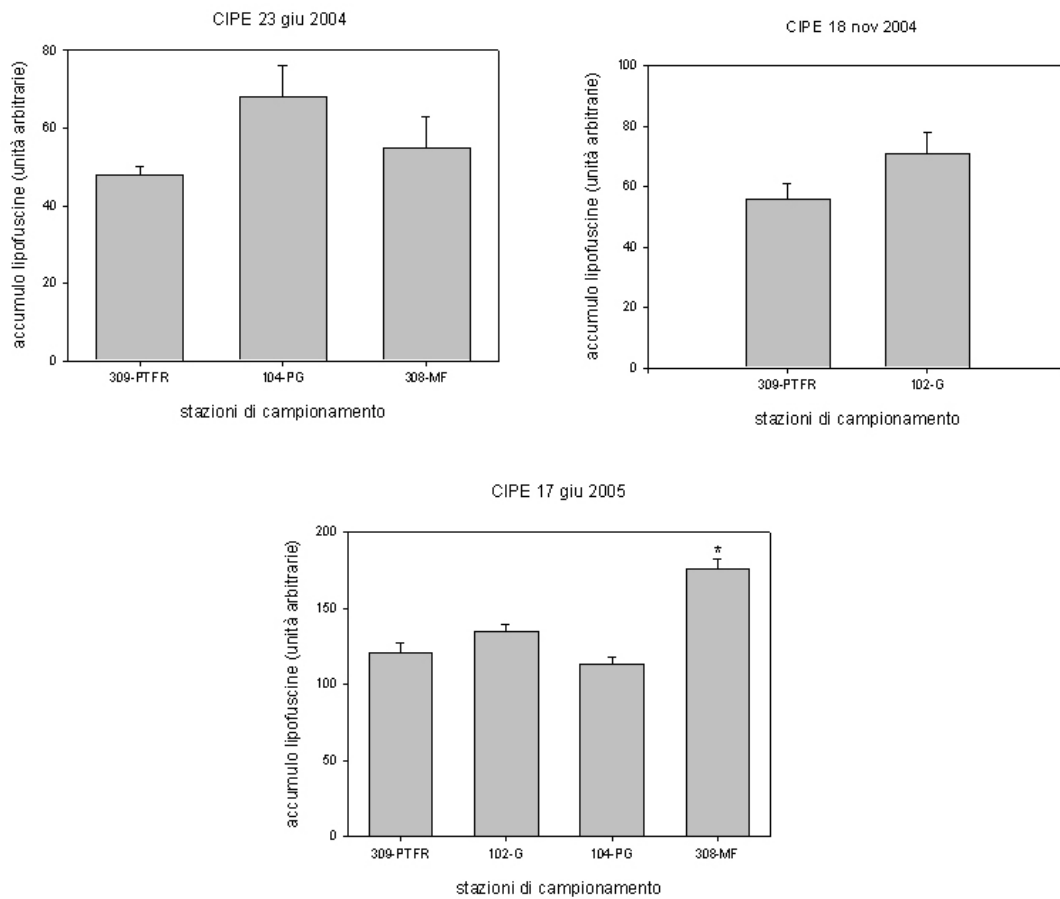


Figura 5.30. Valutazione dell'accumulo di lipofuscine in ghiandole digestive di mitili prelevati durante le diverse campagne per il Progetto CIPE.

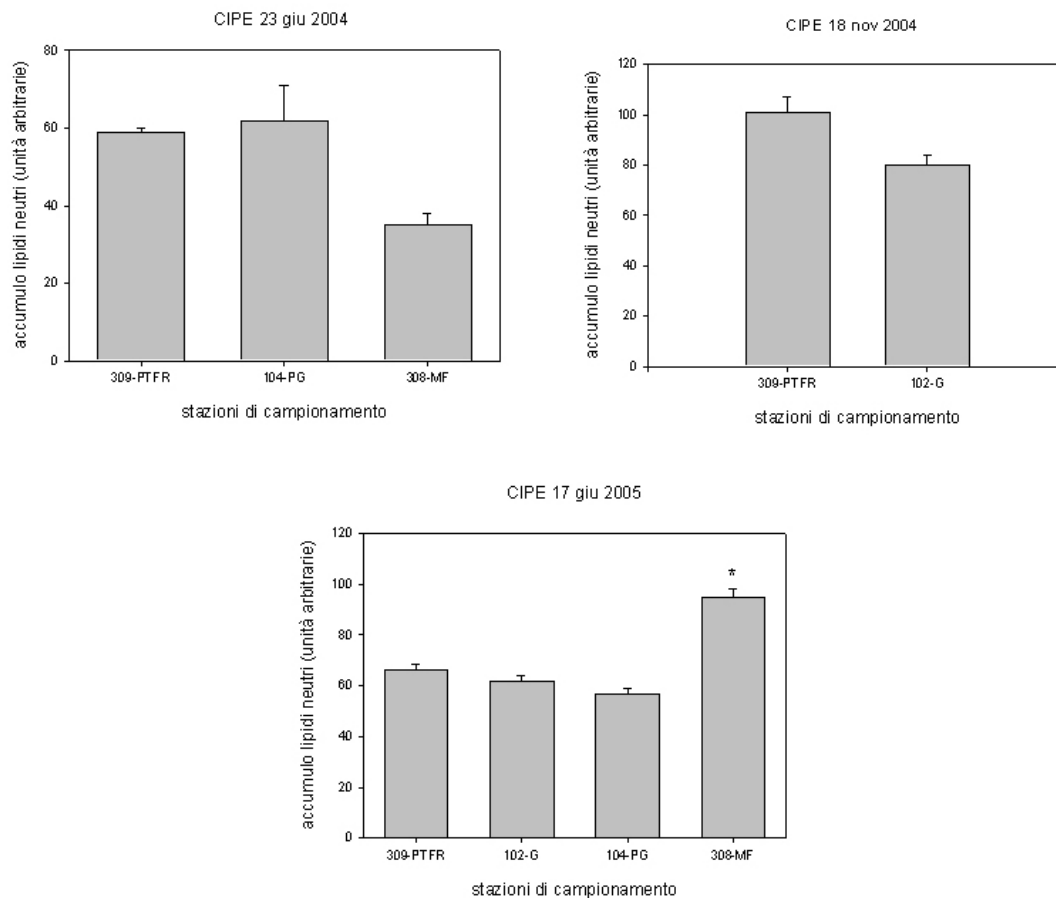


Figura 5.31. Valutazione dell'accumulo di lipidi neutri in ghiandole digestive di mitili prelevati durante le diverse campagne per il Progetto CIPE.

- Accumulo di MT

Per quanto riguarda i livelli di metallotioneine (Fig. 5.32.) non si sono rilevate differenze significative tra i diversi siti nello stesso campionamento. Esistono differenze tra un campionamento e l'altro che, sebbene in genere meno pronunciate, sono tipiche di questo biomarker che ha un andamento stagionale.

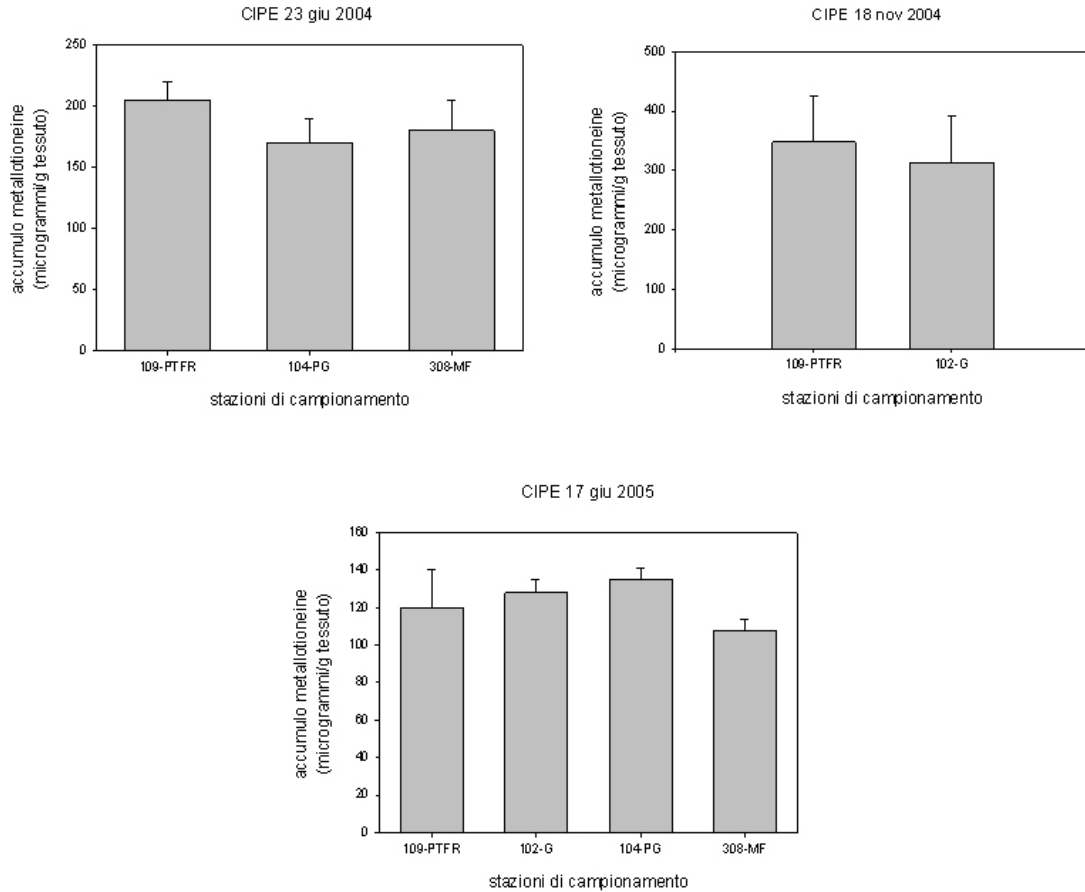


Figura 5.32. Valutazione dell'accumulo di metallotioneine in ghiandole digestive di mitili prelevati durante le diverse campagne per il Progetto CIPE.

- Attività dell'AChE

Per quanto riguarda infine l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (Figura 5.33), non si osservano differenze tra i siti, e l'attività dell'enzima si mantiene entro i tipici valori riportati in letteratura per il mitilo. Va segnalato che l'unica variazione, seppur non significativa, si nota con un aumento dell'attività rispetto al sito di riferimento (stazione 102, campionamento 17 giugno 2005), tuttavia l'inibizione e non l'attivazione dell'enzima è il biomarker indicatore di uno stress.

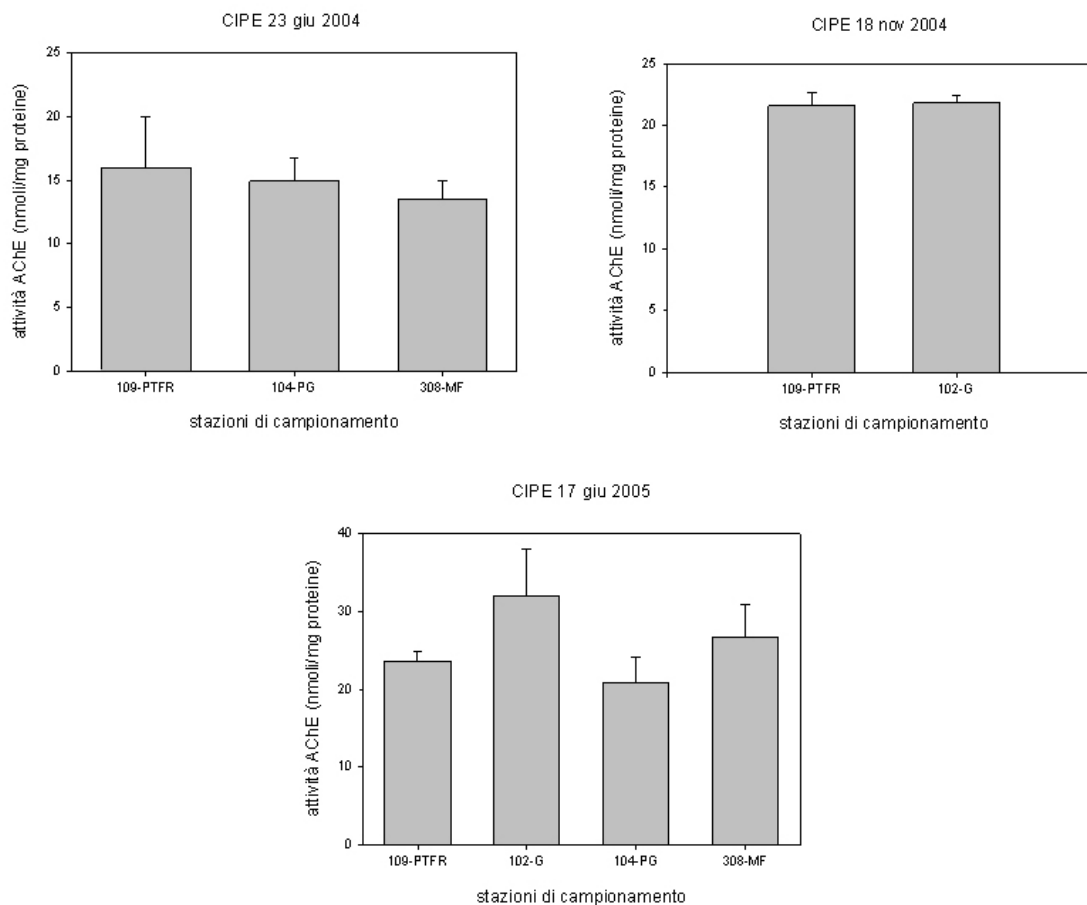


Figura 5.33. Valutazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi in branchie di mitili prelevati durante le diverse campagne per il Progetto CIPE.

Conclusioni

Dall'analisi dei risultati appare evidente che i biomarker specifici di contaminazione da metalli pesanti o da pesticidi non segnalano alcuna anomalia, essendo peraltro in pieno accordo con i dati di bioaccumulo ottenuti sugli stessi organismi (dati non mostrati).

Le anomalie rimangono quindi quelle rilevate durante il campionamento del 17 giugno 2005 a carico del sito Molo Foranei di Ravenna, dove 3 biomarker segnalano concordemente una sindrome da stress che stando al dato sulle membrane lisosomiali è piuttosto intensa. Il segnale è preciso e univoco, seppur fornito da biomarker generici e quindi non in grado di segnalare il tipo di stimolo nocivo. Escludendo metalli pesanti e pesticidi, e considerando che le lipofuscine sono correlate soprattutto ad alterazioni del metabolismo cellulare indotte da una

variazione dello stato redox cellulare e conseguente stress ossidativo (Terman e Brunk, 2004) possiamo ipotizzare una condizione di ipossia nell'area campionata. Un'altra spiegazione può essere la presenza nell'area di una fioritura temporanea di alghe tossiche che recentemente è stato dimostrato che possa provocare una sindrome da stress nei mitili (Buratti, tesi di laurea 2007). Le fioriture algali sono avvenimenti comuni in Adriatico ma nel nostro specifico caso questa ipotesi, così come quella della temporanea ipossia, non può essere verificata non essendo state eseguite le specifiche analisi.

In conclusione, nonostante le premesse circa la possibilità che i mitili residenti si siano adattati al proprio ambiente, anche contaminato, tanto da non segnalare opportunamente la presenza di fattori di stress, possiamo dire che la condizione di stress presente il 17 giugno 2005 presso la stazione Moli Foranei è stata ben evidenziata anche da questi organismi. Pur non trovando correlazione con altri dati raccolti (bioaccumulo, sedimenti), riteniamo che questi risultati individuino chiaramente una sindrome da stress contratta dagli animali, forse per un episodio di anossia o di fioritura di alghe tossiche verificatosi nell'area.

5.2.3. BIOMONITORAGGIO DELLA PIALASSA BAIONA

5.2.3.1. baiona 2003

Risultati

- Stabilità delle membrane lisosomiali

La stabilità delle membrane dei lisosomi è stata valutata mediante la determinazione del tempo di destabilizzazione della membrana stessa. Ad un maggior tempo di destabilizzazione corrisponde una maggiore stabilità della membrana ed uno stato di salute generale dell'organismo migliore (Viarengo et al., 1987).

Sezioni di ghiandole digestive

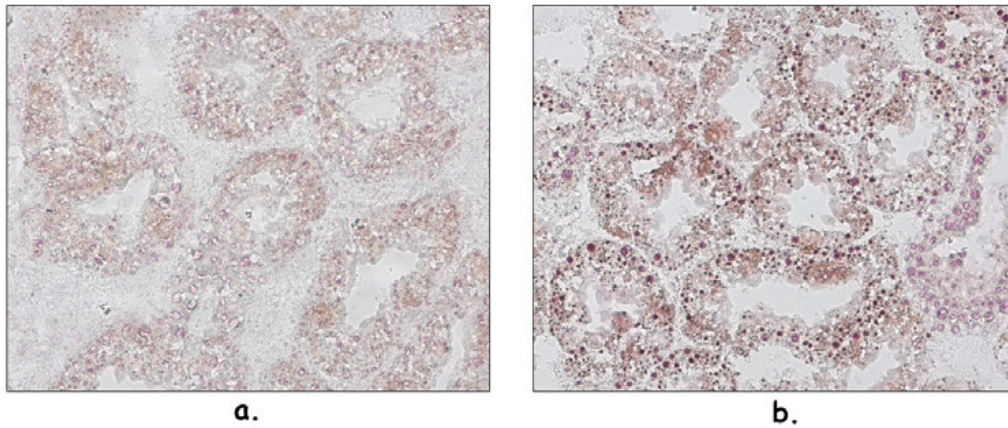


Fig. 5.34. Due sezioni di ghiandole digestive. I lisosomi sono stati colorati selettivamente in rosso porpora: a. membrana non destabilizzata b. membrana destabilizzata

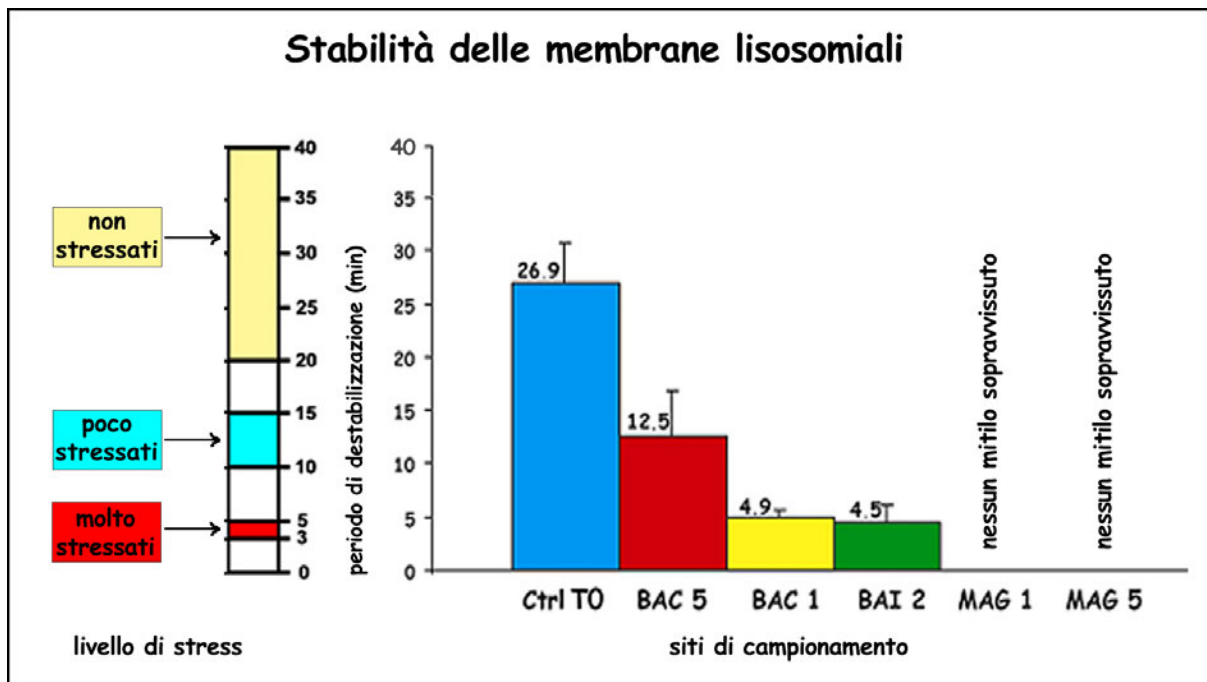


Fig. 5.35 Valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali dei mitili trapiantati nei siti di campionamento

Dal grafico mostrato in fig. 5.35 emerge chiaramente la condizione di sofferenza degli organismi in tutti i siti di trapianto con particolare evidenza in BAI 2 e BAC

1 dove gli organismi si trovano in una condizione di forte stress. Inoltre, se si considera la morte dei mitili come massimo livello di sofferenza, si può distinguere nettamente un gradiente di stress in linea con il gradiente di inquinamento supposto in Pialassa, cioè nel nostro caso andando da MAG 5 verso BAC 5, sito dove gli organismi presentano solo una lieve sindrome da stress. Inoltre dal grafico si può chiaramente evincere il buono stato di salute degli organismi prima di essere stati trapiantati in Pialassa.

- Contenuto di lipidi neutri insaturi nei lisosomi

Il contenuto di lipidi neutri insaturi è stato calcolato tramite la valutazione della colorazione delle sezioni di ghiandole digestive di mitilo dopo trattamento con uno specifico colorante istologico: l'area della superficie colorata è proporzionale alla quantità di lipidi neutri insaturi presenti nella sezione.

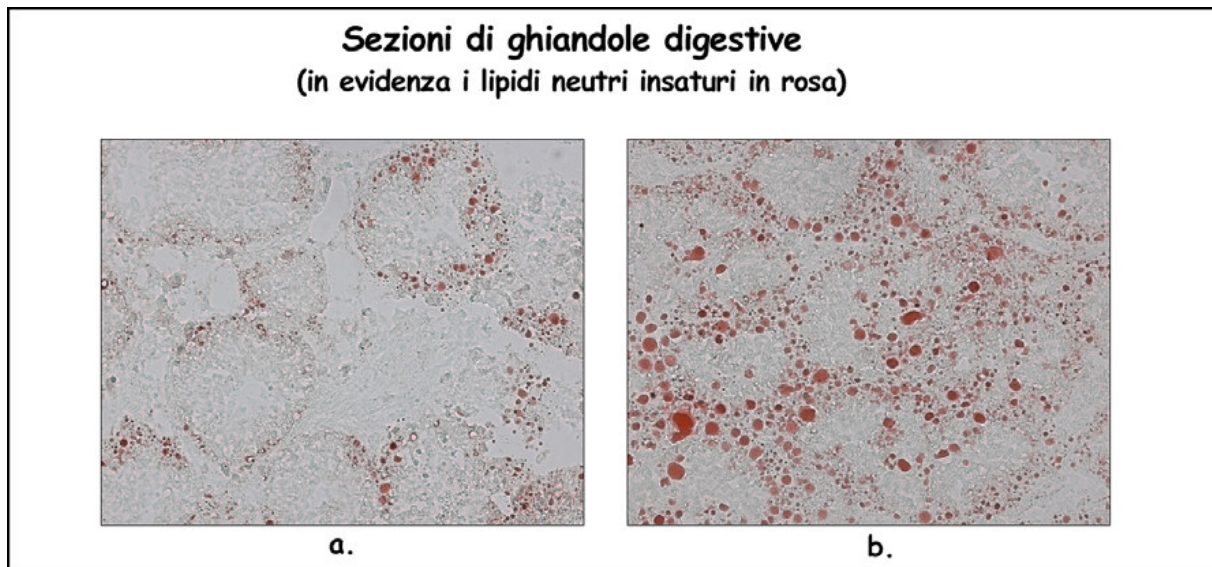


Fig. 5.36 Due sezioni di ghiandole digestive. I lipidi neutri insaturi sono stati colorati selettivamente in rosa: da notare il maggior accumulo in b. (sezione di ghiandola di mitilo trapiantato) in confronto ad a. (sezione di ghiandola di mitilo di controllo)

Un accumulo significativo di lipidi neutri insaturi corrisponde alla risposta positiva del biomarker, cioè indica che l'organismo è stato sottoposto a condizioni di stress che hanno alterato il metabolismo lipidico cellulare.

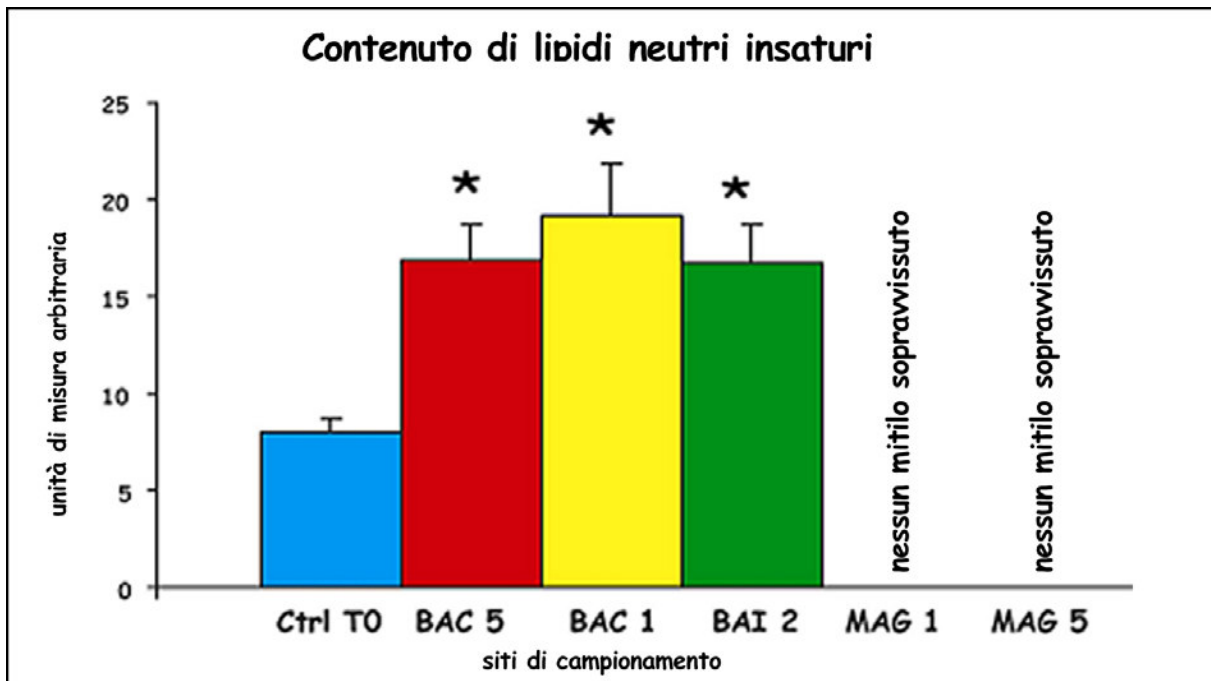


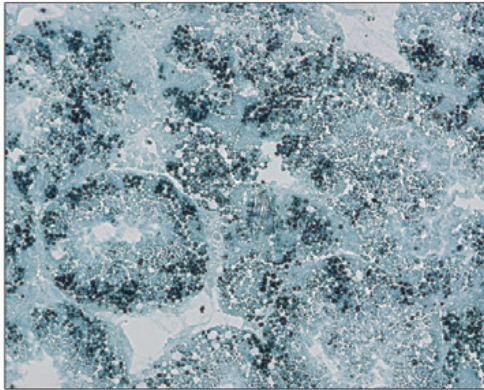
Fig. 5.37 Valutazione dell'accumulo di lipidi neutri insaturi nei mitili trapiantati nei siti di campionamento (il simbolo “ * ” indica che il valore è significativamente differente dal controllo)

Nella figura 5.37 si può osservare un significativo accumulo di lipidi neutri insaturi nei lisosomi dei mitili trapiantati in tutti i siti di campionamento rispetto alle condizioni al tempo zero. Da questo si deduce che in tutti i siti gli organismi sono stati esposti a condizioni di stress.

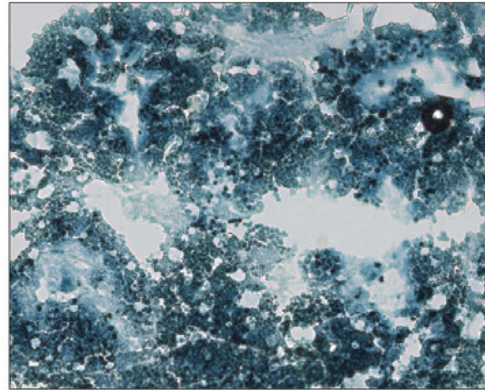
- Contenuto di lipofuscine nei lisosomi

Il contenuto di lipofuscine è stato calcolato tramite la valutazione della colorazione delle sezioni di ghiandole digestive di mitilo dopo trattamento con uno specifico colorante istologico: l'area della superficie colorata è proporzionale alla quantità di lipofuscine presenti nella sezione.

Sezioni di ghiandole digestive
(in evidenza le lipofuscine colorate in verde/blu)



a.



b.

Fig. 5.38 Due sezioni di ghiandole digestive. Le lipofuscine sono state colorate selettivamente in verde/blu: da notare il maggior accumulo di in b. (sezione di ghiandola di mitilo trapiantato) in confronto ad a. (sezione di ghiandola di mitilo di controllo)

Un accumulo significativo di lipofuscine rispetto al controllo corrisponde alla risposta positiva del biomarker, cioè indica che l'organismo è stato sottoposto a condizioni di stress generiche: in particolare è riportato che gli stress ossidativi siano causa prioritaria dell'accumularsi di questi pigmenti (Viarengo et al., 1998).

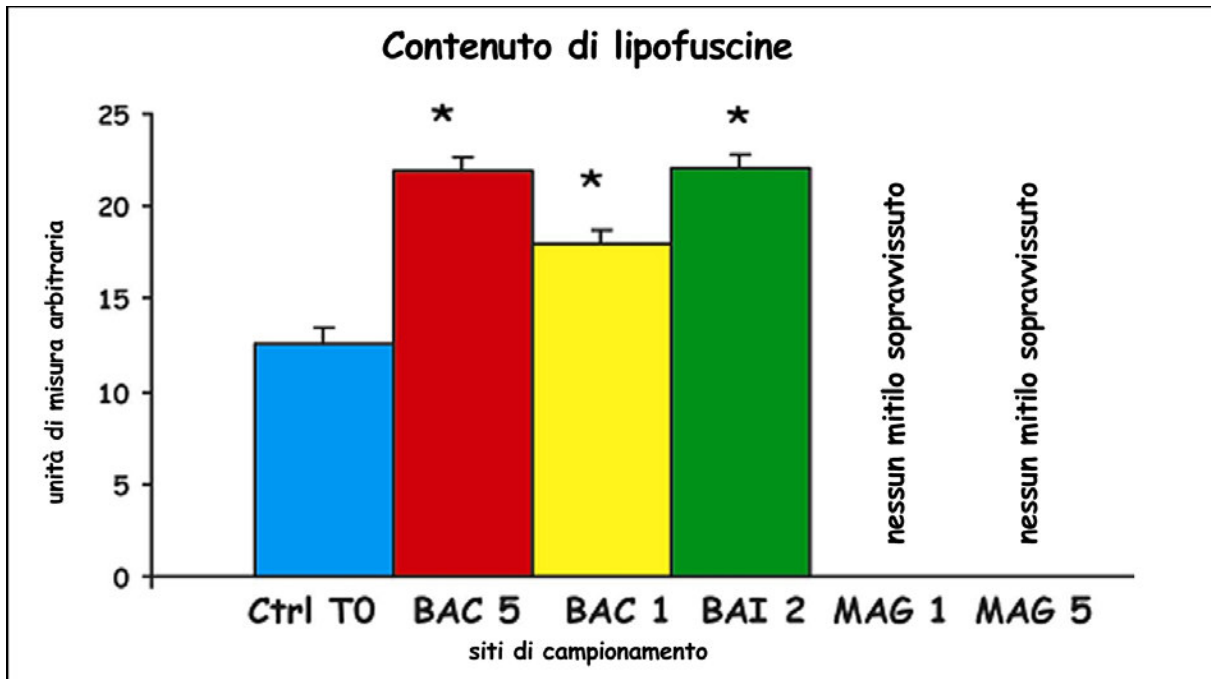


Fig. 5.39 Valutazione dell'accumulo di lipofuscine nei mitili trapiantati nei siti di campionamento (il simbolo “ * ” indica che il valore è significativamente differente dal controllo)

Il grafico sopra riportato (fig. 5.39) mostra chiaramente una risposta positiva del biomarker in tutti i siti di campionamento in cui i mitili sono sopravvissuti. L'aumento di lipofuscine sembra maggiore e paragonabile nei siti BAC 5 e BAI 2, ma in generale l'accumulo osservato nei mitili campionati nei tre siti non è significativamente differente. Questi risultati sembrano suggerire un livello di stress abbastanza uniforme nei siti: questo è plausibile alla luce del fatto che l'accumulo di lipofuscine è un biomarker generico, ma che in generale è correlato a stress ossidativi, frequenti in un ambiente come la Pialassa caratterizzato da acqua bassa, temperature elevate ed elevata produzione di biomassa, cioè le condizioni ideali per l'instaurarsi di fenomeni come stress anossici e crisi distrofiche.

- Attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)

La valutazione dell'attività dell'enzima AChE è un biomarker specifico in quanto la sua inibizione è indice della presenza in ambiente di carbammati e organofosfati, costituenti base dei pesticidi (Mineau, 1991; Weiss et al., 1958):

la risposta quindi che ci aspettiamo in presenza di questi composti è una diminuzione dell'attività dell'enzima. Vediamo i risultati della nostra campagna:

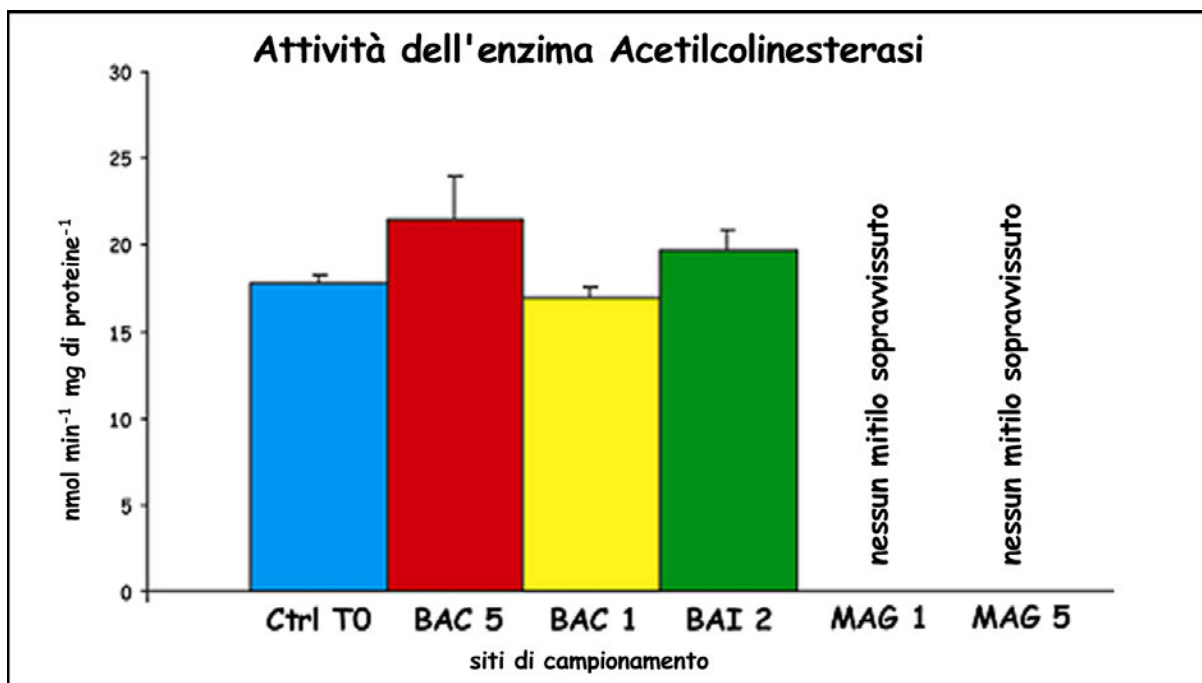


Fig. 5.42 Valutazione dell'attività dell'enzima Acetilcolinesterasi nei mitili trapiantati nei siti di campionamento.

Dalla figura 5.42 si evince che non ci sono state variazioni significative dell'attività dell'acetilcolinesterasi, per cui si può dedurre che nel mese di residenza dei mitili in Pialassa Baiona non erano presenti in ambiente concentrazioni pericolose di pesticidi. In agricoltura infatti tali composti sono distribuiti prevalentemente in primavera, per cui possono essere più facilmente accessibili agli organismi, come sembra dimostrare una precedente campagna di biomonitoraggio da me condotta nel giugno 2003, in cui lo specifico biomarker aveva dato indicazioni positive (fig. 5.43).

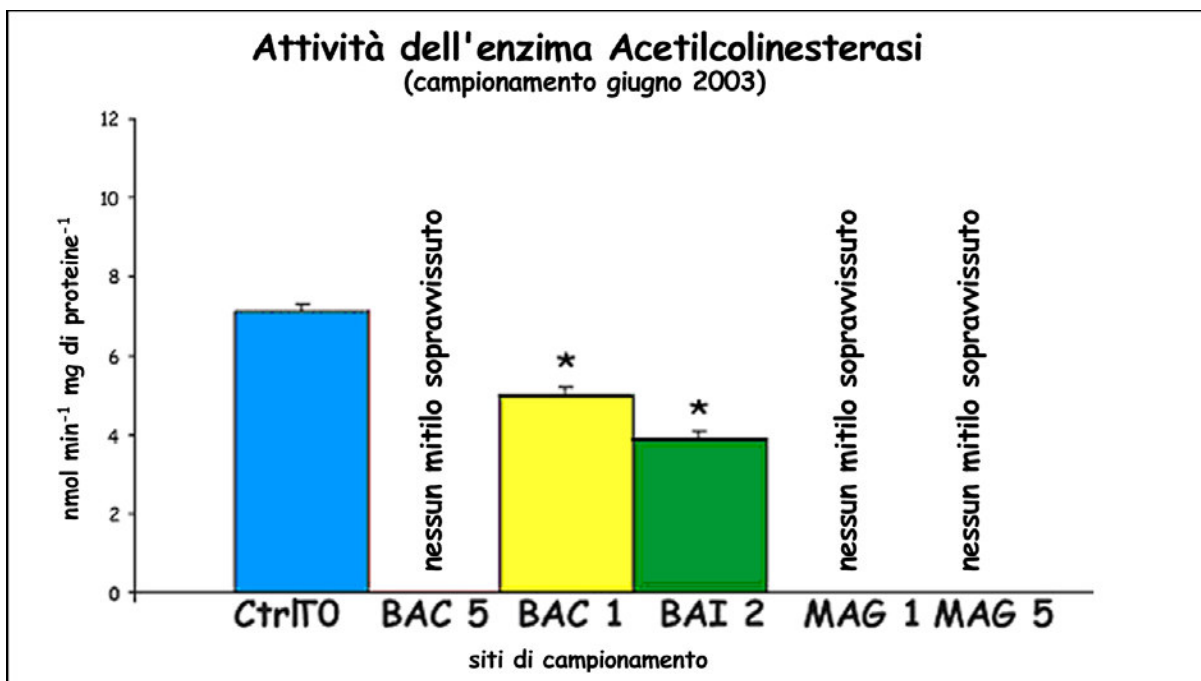


Fig. 5.43 Valutazione dell'attività dell'enzima Acetilcolinesterasi nei mitili trapiantati nei siti di campionamento nel mese di Giugno 2003 (il simbolo “ * ” indica che il valore è significativamente differente dai dati di controllo)

- Contenuto di metallotioneine (MT)

La determinazione del contenuto di metallotioneine nelle ghiandole digestive dei mitili è un biomarker specifico che mostra una risposta positiva in conseguenza di una contaminazione ambientale da metalli pesanti (Cajaraville et al., 2000; Langstone et al., 1998; Viarengo and Nott, 1993).

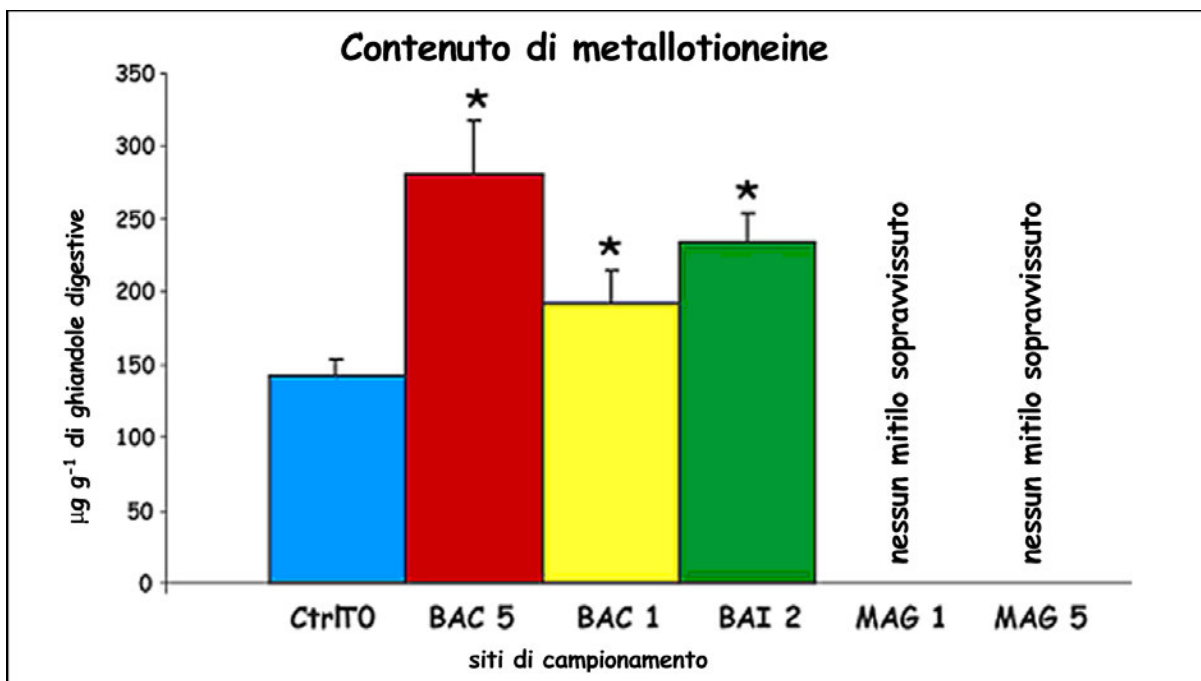


Fig. 5.43 Determinazione del contenuto di metallotioneine nelle ghiandole digestive dei mitili trapiantati nei siti di campionamento (il simbolo “ * ” indica la significatività del dato rispetto ai valori di controllo)

La figura 5.43 mostra chiaramente un aumento significativo del contenuto di metallotioneine nei mitili di tutti i siti di campionamento ove è stato possibile reperire gli organismi, in particolare nei siti BAC 5 e BAI 2. Questi risultati ci suggeriscono una contaminazione diffusa di metalli che non sembra seguire il gradiente di inquinamento conosciuto.

- Sedimento mobilizzato

I risultati delle analisi sul sedimento mobilizzato (fig. 5.44) non si discostano molto da quelle sul sedimento superficiale. Notiamo un aumento della concentrazione totale dei metalli in BAC 5 e BAI 2, oltre che in MAG 1. In MAG 5 abbiamo ancora un aumento abnorme rispetto al campione di controllo. Possiamo inoltre notare che il contributo maggiore alla concentrazione totale è dato dallo zinco e in forma minore da nichel e cromo.

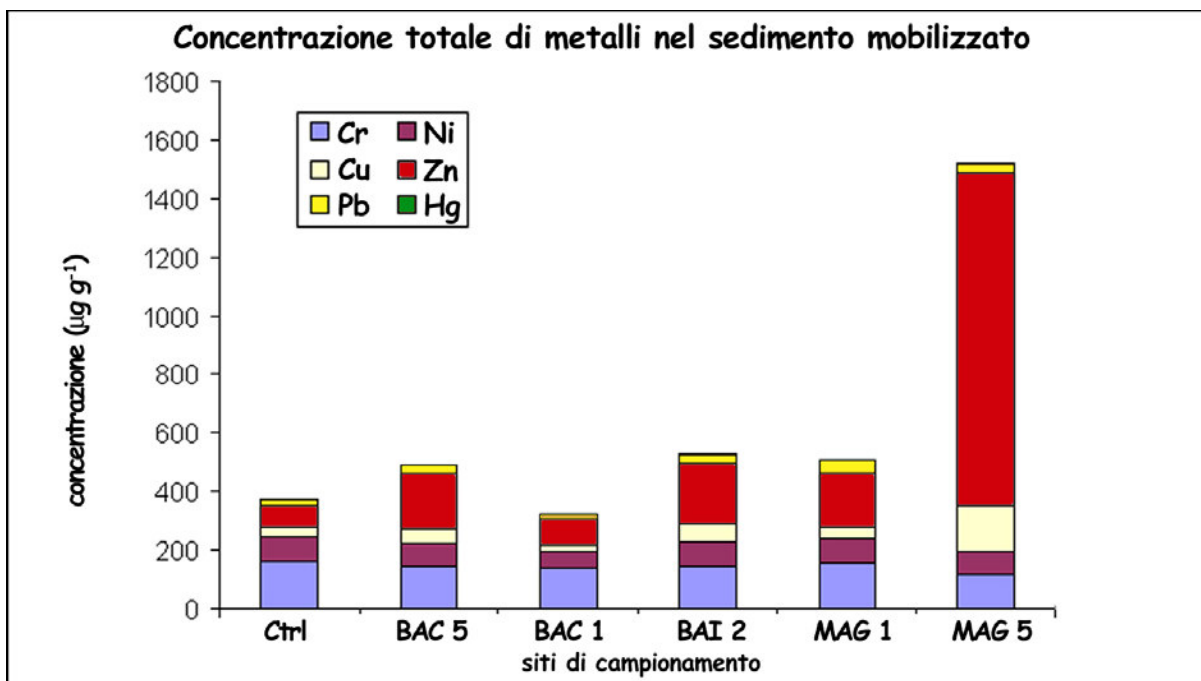


Fig. 5.44 Concentrazione totale di metalli nel sedimento mobilizzato prelevato nei diversi siti della Pialassa Baiona

Per quanto riguarda l'arricchimento specifico, i risultati sono confrontabili con quello superficiale. Da evidenziare tuttavia è il fatto che nel sedimento mobilizzato appare molto arricchito il mercurio (da 3 a 13 volte) (fig.5.45.).

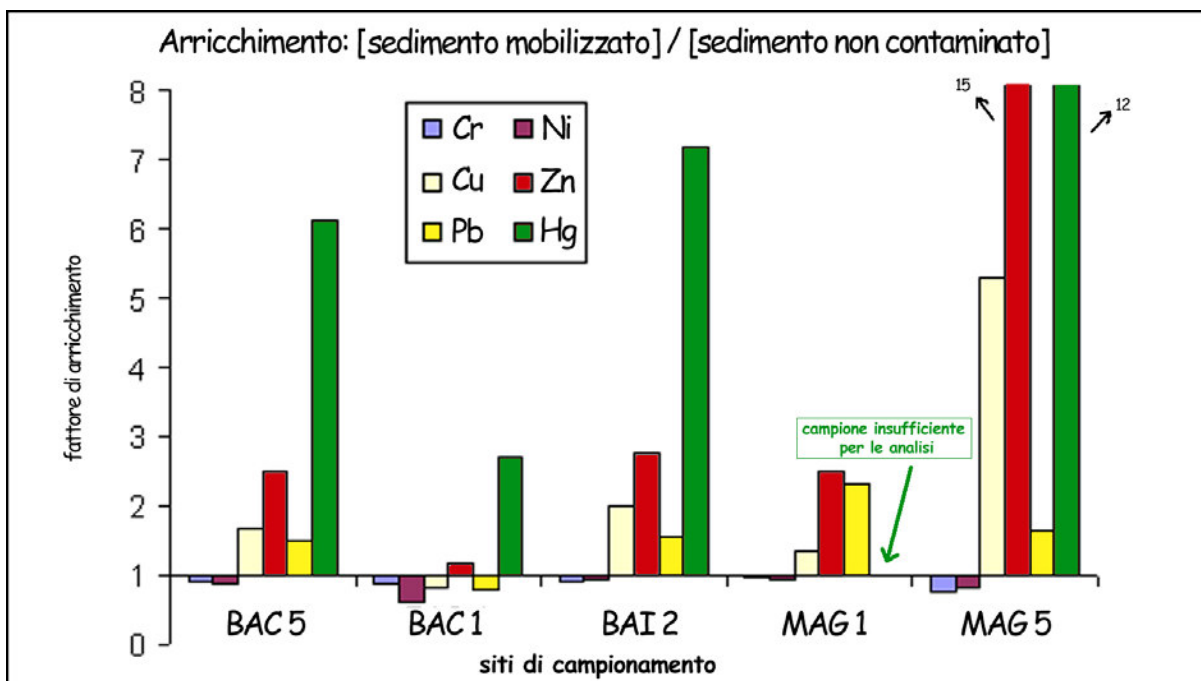


Fig. 5.45. Arricchimento dei singoli metalli nel sedimento mobilizzato rispetto ad un sedimento non contaminato di riferimento (Amorosi et al., 2002)

- Confronto tra la concentrazione totale di metalli e il contenuto di metallotioneine nei tessuti

La fig. 5.46 mostra il confronto tra la concentrazione totale dei metalli nel sedimento ed il contenuto di metallotioneine nei tessuti di mitilo.

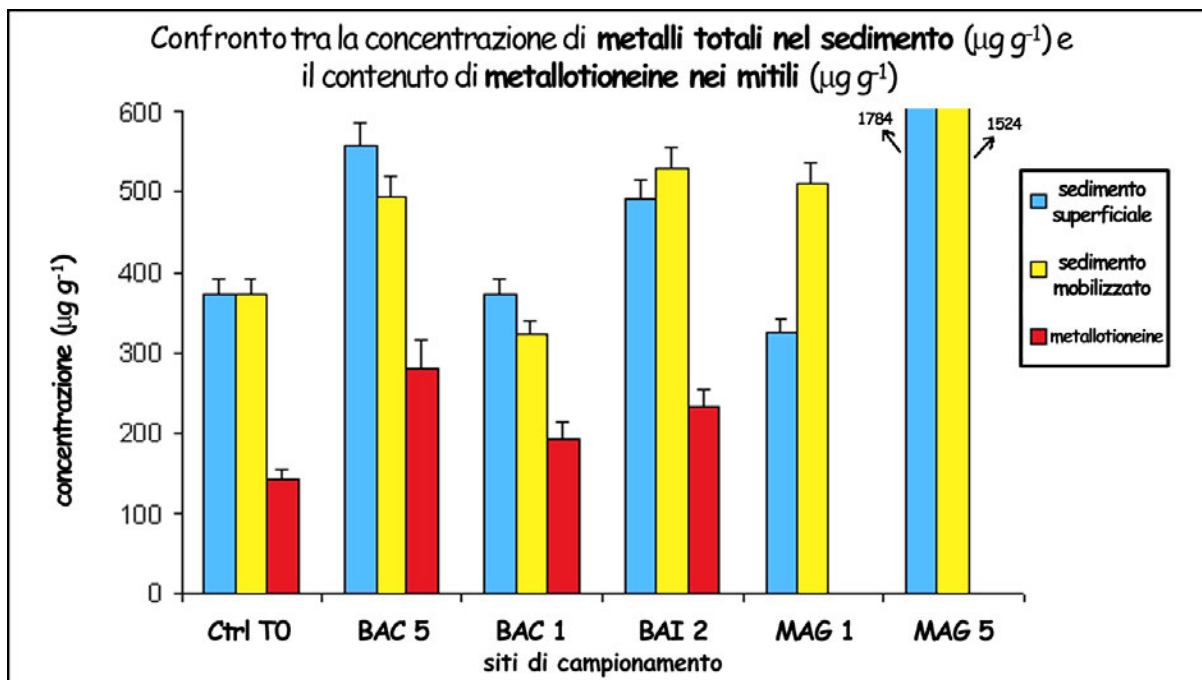


Fig. 5.46. Confronto tra concentrazione totale di metalli nel sedimento (superficiale e mobilizzato) e concentrazione di metallotioneine nei tessuti dei mitili.

Dal grafico sopra riportato (fig. 5.46.) le variazioni del livello di metallotioneine sembrano seguire l'andamento della concentrazione di metalli nei sedimenti, per cui possiamo affermare che in questa campagna di monitoraggio il biomarker sembra aver individuato con esattezza i siti con maggior contaminazione di metalli.

Discussione e Conclusioni

L'utilizzo della batteria di biomarker ha confermato di essere uno strumento attendibile, riproducibile, facilmente applicabile ed estremamente sensibile della qualità dell'ambiente. Le risposte suggerite dai biomarker sono state infatti confermate dalle indagini geochimiche correlate. Analizziamo nel dettaglio le indicazioni fornite dai biomarker generici (stabilità lisosomiale, contenuto di lipidi neutri insaturi nei lisosomi, contenuto di lipofuscine nei lisosomi) e specifici (contenuto di metallotioneine nelle ghiandole digestive, attività dell'enzima acetilcolinesterasi) applicati ai mitili trapiantati in Pialassa Baiona (dei cinque siti di trapianto solo in 3 i mitili sono sopravvissuti e quindi le successive indicazioni date dai biomarker sono relative a questi 3 siti: BAI 2, BAC 1, BAC 5):

La valutazione della stabilità della membrana lisosomiale ha indicato una situazione di generale sofferenza degli organismi, ma con un gradiente Sud-Nord, risposta che suggerisce l'intensificarsi degli agenti stressori procedendo verso sud. Questa ipotesi di gradiente di stress è confermata da studi precedentemente condotti in Pialassa e che hanno evidenziato un gradiente di inquinamento Sud-Nord (Fabbri et al., 2000)

La valutazione del contenuto di lipidi neutri insaturi e lipofuscine nei lisosomi, in linea con la valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali, individua una generale sofferenza degli organismi senza individuare però un gradiente spaziale.

La determinazione del contenuto di metallotioneine individua anche in questo caso una diffusa contaminazione di metalli con due massimi in prossimità di BAI 2 e BAC 5, quest'ultimo il sito più a nord e teoricamente più lontano dalla sorgente di contaminazione. Anche in questo caso le indagini geochimiche confermano queste indicazioni: le analisi effettuate sul sedimento confermano infatti una diffusa contaminazione di metalli con arricchimenti massimi in MAG 5, il sito più a sud che risulta estremamente compromesso, ma con valori comunque alti negli altri siti in particolar modo in BAI 2 e BAC 5.

L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi ha suggerito infine l'assenza in Pialassa di concentrazioni dannose di pesticidi. Questa indicazione può essere interpretata confrontandola con una analoga campagna di monitoraggio effettuata nel giugno dello stesso anno in cui lo specifico biomarker ha dato risposta positiva alla presenza di pesticidi. Il possibile fattore di differenziazione è il periodo di campionamento: a differenza di ottobre, nel periodo primaverile (maggio-giugno) è più frequente l'utilizzo di tali composti in agricoltura.

La zona meridionale, in prossimità del canale Magni, risulta essere quella con il massimo livello di degrado ambientale. I mitili non sono sopravvissuti, e le probabili spiegazioni sono state indicate dalle indagini geochimiche, che hanno riscontrato una elevatissima contaminazione da metalli pesanti e IPA (Donnini, tesi di laurea 2003), come del resto già provato da precedenti campagne di ricerca (Fabbri et al., 2000). Inoltre ulteriori indagini dovranno essere compiute per valutare lo stress termico provocato dagli scarichi delle acque di raffreddamento delle due centrali termoelettriche situate in prossimità del canale Magni;

La contaminazione da metalli pesanti e da IPA è diffusa in tutta la Pialassa Baiona, come dimostrano sia le indagini geochimiche che le risposte dei biomarker e raggiunge i picchi massimi nelle zone più a sud.

Confrontando i risultati espressi dalla batteria di biomarker da noi utilizzata con i risultati di una campagna di monitoraggio condotta nel 2001 (Tamburini I., 2002 - tesi di laurea in Scienze Ambientali) si evince chiaramente un peggioramento delle condizioni qualitative dell'ambiente (fig. 5.47.), considerazione che desta preoccupazioni per il futuro. Dalla figura si può notare come i biomarker abbiano segnalato la criticità dello stato dell'ambiente in tutti i siti di campionamento di questa campagna (Baiona 2003) tranne nei siti del canale Magni in cui addirittura tutti i mitili sono morti, in confronto ai risultati del 2001 in cui gli unici siti che presentavano alterazioni di un consistente numero di biomarker erano BAI 1 e MAG 1.

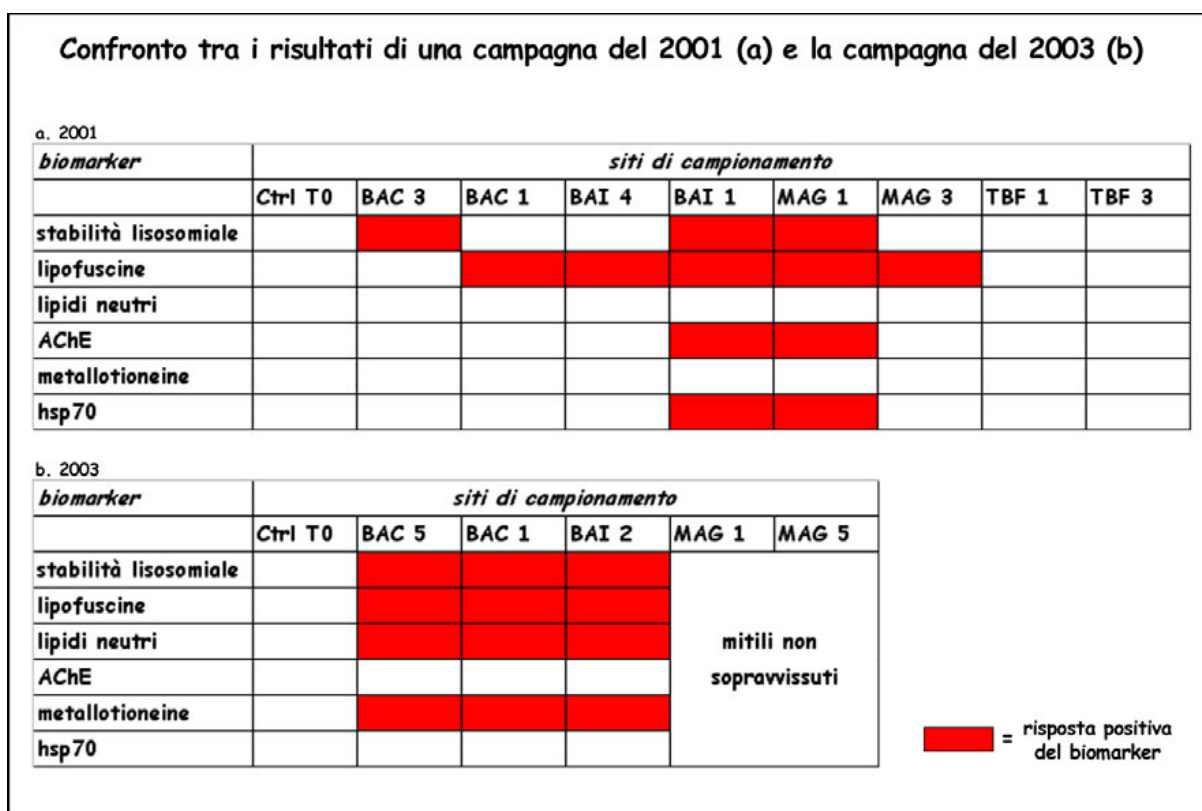


Fig. 5.47. Confronto tra le risposte date dai biomarker in una campagna di biomonitoraggio condotta nel 2001 (a.) ed in quella oggetto di questo studio, cioè del 2003 (b.)

5.2.3.2. studi pilota per la valutazione dei tempi di espressione e recupero dei biomarker

Valutazione dei tempi di espressione

Risultati e discussione

Come dettagliatamente descritto nel paragrafo 4.2.3.2., i mitili esposti in un ambiente fortemente contaminato sono stati prelevati e analizzati dopo 2, 4, 7, 14 e 30 giorni. I risultati ottenuti evidenziano chiaramente che i biomarker da me applicati impiegano circa una settimana per cominciare a rispondere significativamente all'insulto, salvo poi raggiungere la massima ampiezza di espressione dopo 14 e 30 giorni (fig. 5.48, fig. 5.49, fig. 5.50, fig. 5.51). In particolare il periodo di labilizzazione della membrana lisosomiale viene registrato

al di sotto della soglia dei 20 minuti (soglia al di sopra della quale i mitili sono considerati in un buono stato di salute) solo dopo 14 giorni (fig. 5.48.), periodo in cui la perdita di funzionalità dei lisosomi viene chiaramente confermata dal significativo incremento di lipofuscine (fig. 5.49).

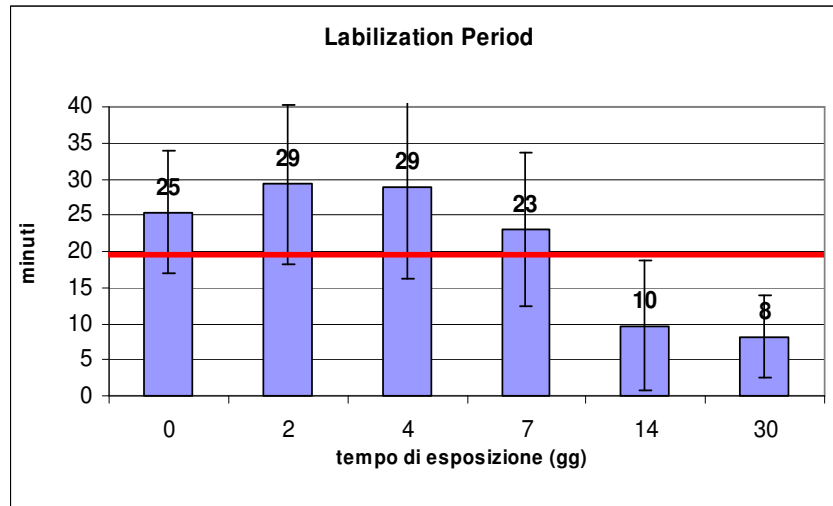


Fig. 5.48 Tempo di labilizzazione della membrana lisosomiale

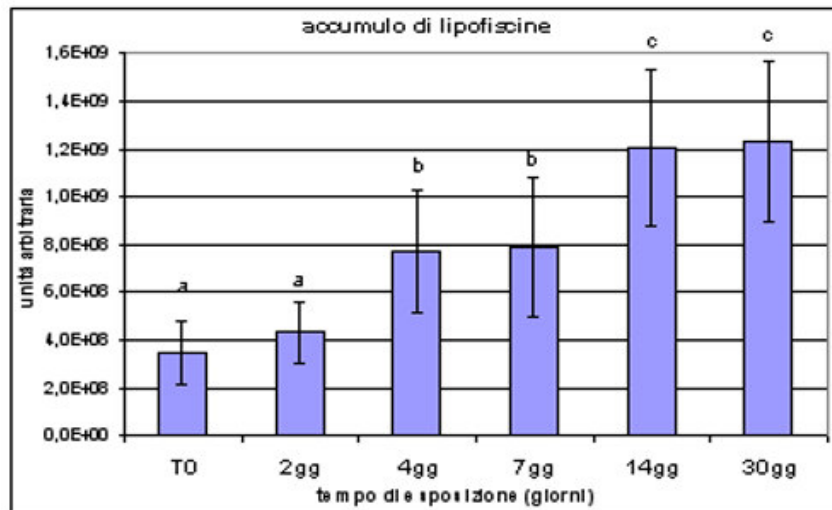


Fig. 5.49 Accumulo di lipofuscine nei lisosomi. Differenti lettere corrispondono ad una differenza statisticamente significativa tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Dopo circa 2 settimane la sindrome da stress degli organismi non viene evidenziata solo dai biomarker lisosomiale, ma anche da un significativo accumulo di MT nelle ghiandole digestive che raggiunge il maggior valore dopo 30 giorni (fig. 5.50) e dall'aumentata attività dell'AOX (fig. 5.51).

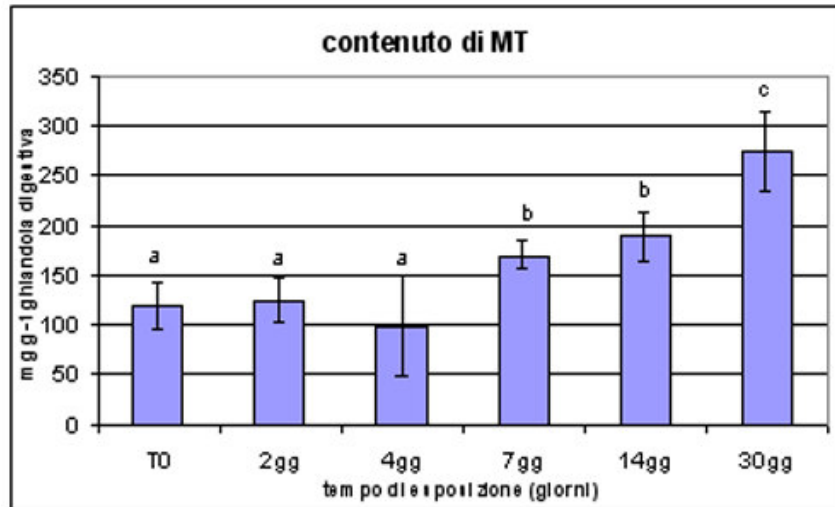


Fig. 5.50 Accumulo di MT nelle ghiandole digestive. Differenti lettere corrispondono ad una differenza statisticamente significativa tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

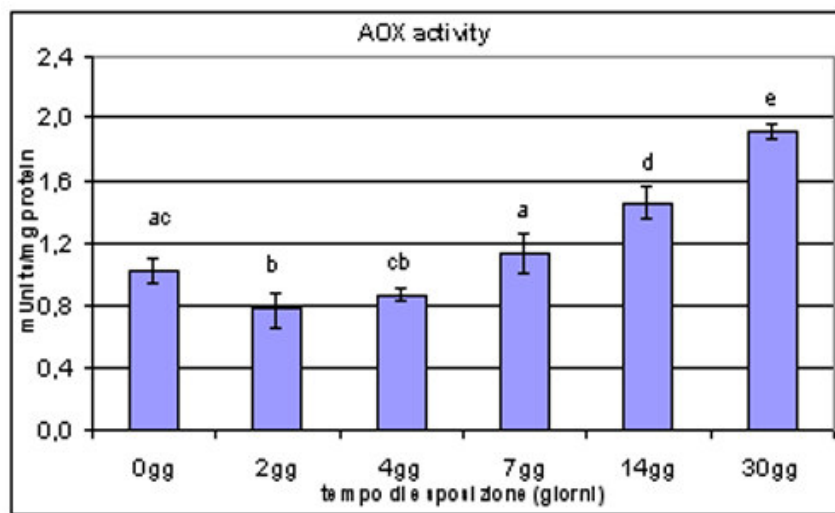


Fig. 5.51 Attività dell'AOX nelle ghiandole digestive. Differenti lettere corrispondono ad una differenza statisticamente significativa tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Valutazione dei tempi di recupero

Risultati e discussione

Come detto in 4.2.3.2., per valutare i tempi di recupero dei biomarker nel momento in cui l'insulto termina e si ripristinano delle condizioni ambientali ottimali, un

gruppo di mitili prelevati da un sito fortemente contaminato in Pialassa Baiona (mitili Pialassa) è stato trapiantato in una zona di tutela biologica a circa 12 miglia dalla costa e prelevati dopo 9 e 35 giorni. Sono stati analizzati anche i mitili residenti al tempo 0 (T0) e al termine del campionamento (T35) per valutare l'effettivo buono stato di salute degli organismi residenti e per verificare che nel periodo di esposizione non si fossero verificate condizioni ambientali anomale tali da condizionare naturalmente la risposte dei biomarker.

In particolare la stabilità lisosomiale dei mitili prelevati in pialassa sembra aumentare da un livello estremamente critico del T0 ad un valore di circa 17 minuti dopo 35 giorni che si avvicina alla soglia del buono stato di salute, senza però raggiungere l'ottimo stato di salute dei mitili residenti evidenziato dagli alti valori di LMS (fig. 5.52.).

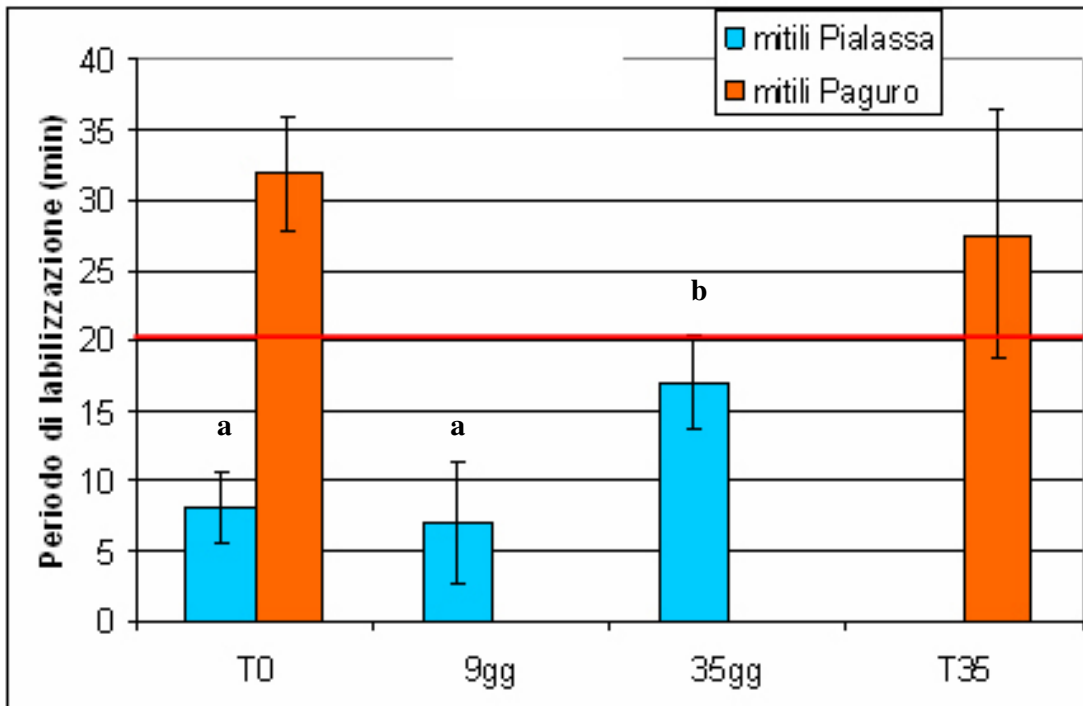


Fig. 5.52 Tempo di labilizzazione della membrana lisosomiale. Differenti lettere corrispondono ad una differenza statisticamente significativa tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Per quanto riguarda l'AChE, l'attività di questo enzima aumenta fino a raggiungere i valori dei mitili residenti T35 dopo 35 giorni di recupero (fig. 5.53)

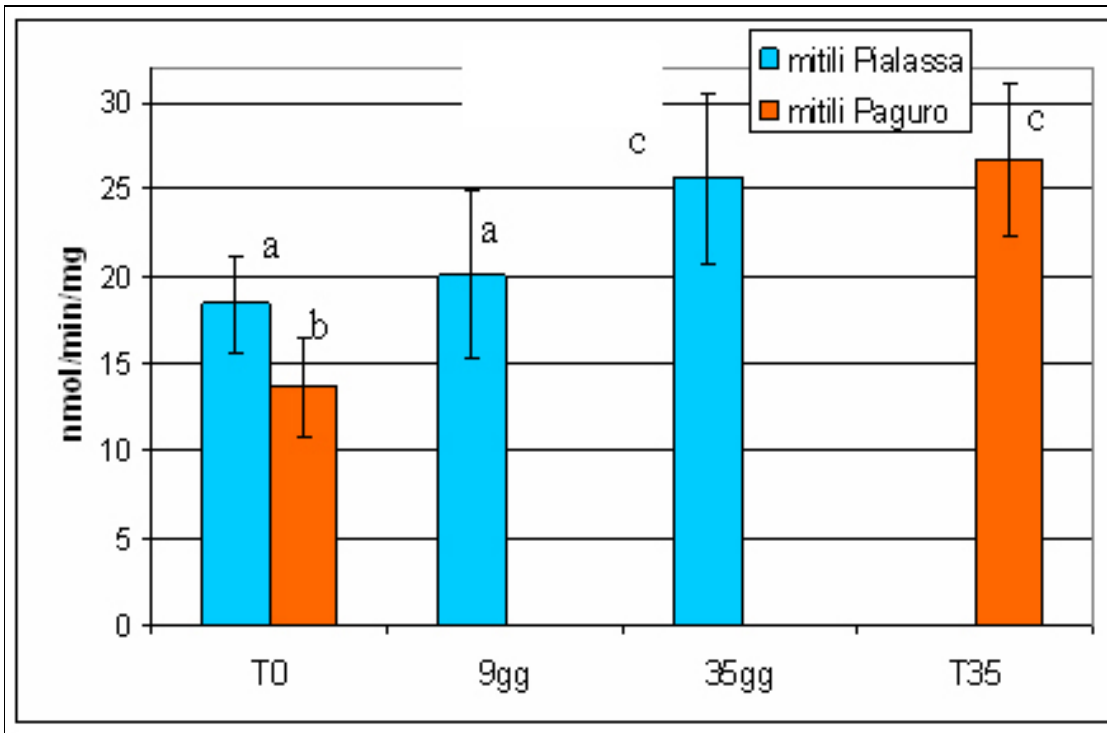


Fig. 5.53 Attività dell'AChE nelle branchie. Differenti lettere corrispondono ad una differenza statisticamente significativa tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Anche l'andamento delle MT rispecchia quanto già visto per LMS e AChE, con una diminuzione dei contenuti proteici solo dopo 35 giorni, raggiungendo esattamente i livelli di MT presenti nei mitili residenti (fig. 5.54).

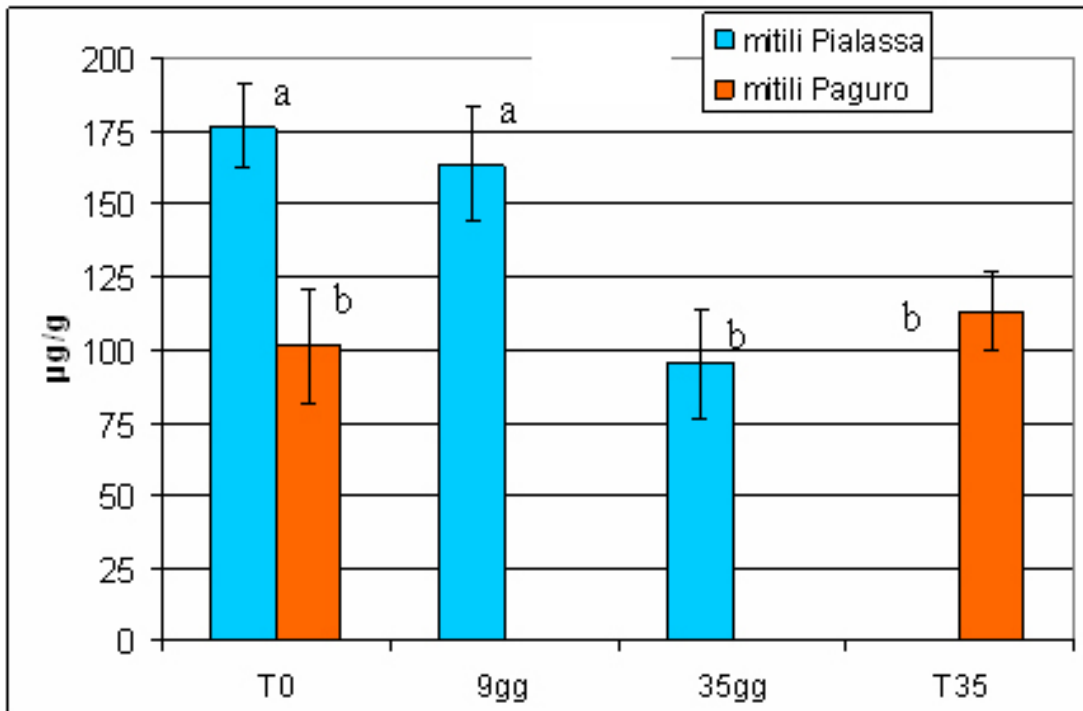


Fig. 5.54 Accumulo di MT nelle ghiandole digestive. Differenti lettere corrispondono ad una differenza statisticamente significativa tra i gruppi (ANOVA; $p < 0,05$)

Conclusioni

Una delle attività finalizzate ad un corretto, efficiente e razionale uso delle metodologie di monitoraggio utilizzando biomarker e organismi sentinella è l'approfondimento della conoscenza sulle funzionalità fisiologiche degli organismi. In particolare i risultati ottenuti in questi studi pilota, pur non essendo esaustivi, portano ad interessanti considerazioni sui tempi necessari ai biomarker per fornire una risposta chiara di una criticità ambientale e del tempo impiegato dagli organismi a perdere l'informazione di un avvenuto insulto una volta ristabilitesi le normali condizioni ambientali. I tempi di espressione dei biomarker suggeriscono la necessità di una esposizione di almeno 15 giorni per ottenere le prime chiare indicazioni sulla qualità ambientale, confermando quanto indicato dalla comunità scientifica internazionale che consiglia un periodo di trapianto di 30 giorni. Interessante a mio avviso anche i risultati ottenuti dall'analisi dei tempi di recupero, che hanno messo in evidenza come un insulto provocato negli

organismi non venga immediatamente “dimenticato” ma rimane registrato per un periodo più o meno lungo. Alla luce degli spunti forniti da questi studi pilota, ritengo che sarebbe interessante ed importante approfondire la ricerca sulle modalità di espressione e di recupero di questi e di altri biomarker.

5.2.3.3. Pialassa 2007

Risultati

- Indagini abiotiche

Salinità e pH

I risultati delle campagne svolte utilizzando una sonda multiparametrica (CTD) sono mostrati in fig 5.55 . Per quanto riguarda la salinità (fig. 5.55A) si nota una netta diminuzione nel canale Magni (sito 1) rispetto alle altre zone di campionamento che può essere dovuto all’apporto di acqua dolce derivante dagli scarichi di depuratori industriali e civili convogliati per la maggior parte in questo canale. I risultati inoltre sembrano suggerire una certa distinzione tra i 3 siti nord (5 – 6 – 7) rispetto a quelli sud (2 – 3 – 4) (fig. 5.55A) dovuta a mio avviso ad un disequilibrio spaziale dei processi di ricambio idrico, evaporazione e apporti di acqua dolce. Per quanto riguarda invece il pH, dalla figura 5.55B non si registrano nette distinzioni spaziali nel periodo temporale in cui sono state effettuate le rilevazioni. Si nota solo una tendenza ad un pH più acido in Magni (sito 1) e ad uno più basico nel sito 4. Sarebbero opportuni però ulteriori approfondimenti per formulare delle ipotesi su possibili processi ambientali che possano avere un’ influenza diretta sulla distribuzione spaziale del pH.

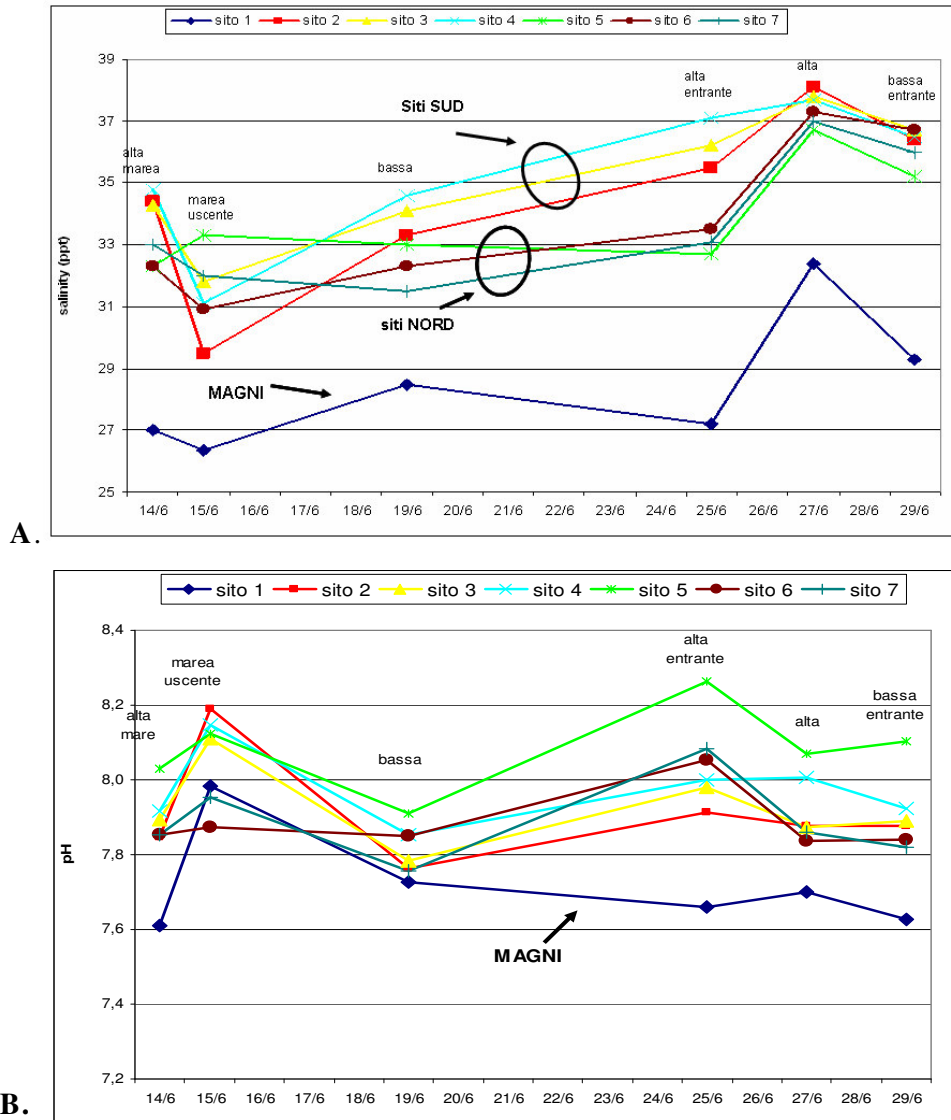


Fig. 5.55 Dati rilevati con la sonda multiparametrica: A. salinità; B. pH

temperatura

Per i dati di temperatura sono riportate in fig. 5.56 le registrazioni dei termometri posizionati sui sostegni delle calze contenenti gli organismi e impostati per registrare la temperatura ogni 30 minuti. La media delle temperature nelle varie aree di campionamento evidenzia nettamente la maggiore temperatura del canale Magni rispetto al resto della laguna con un aumento medio calcolato di circa 5°C (fig. 5.56). In tutti i casi si nota una escursione termica giornaliera che si aggira in un range di 5-12 °C.

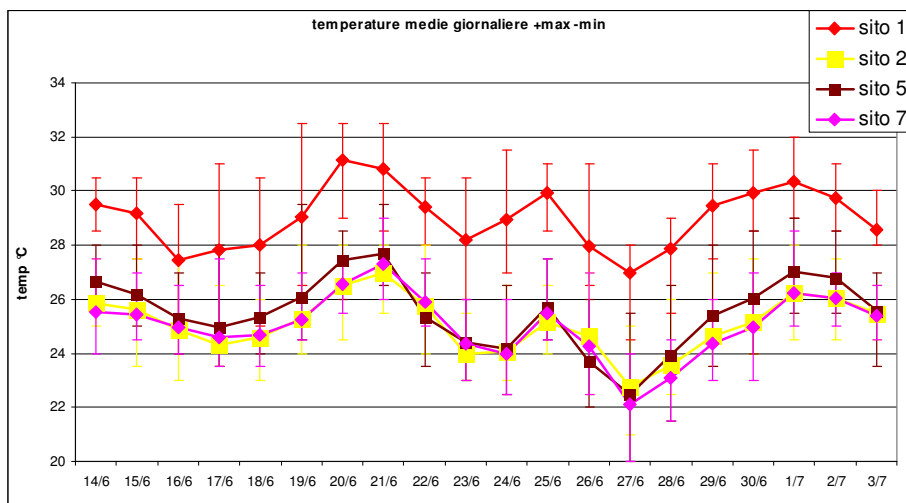


Fig. 5.56 Medie giornaliere di temperatura rilevata in prossimità dei siti di campionamento con i minimi e i massimi giornalieri.

Durante le campagne con la sonda CTD sono stati registrati anche i dati lungo la colonna d'acqua con una rilevazione ogni 10 cm. I risultati non sono stati mostrati perché non è stata evidenziata alcuna strutturazione spaziale di masse d'acqua a diversa salinità, pH o temperatura dovuto principalmente alle forti correnti di marea congiunte alla bassa profondità media che porta ad un rimescolamento della colonna d'acqua ad ogni cambio di marea. Questa considerazione sembra confermata dall'analisi più approfondita dell'andamento giornaliero della temperatura registrata dai termometri e confermata dai dati della sonda CTD in relazione all'andamento mareale (dati della rete mareografica nazionale ...biblio internet) mostrato in fig. (5.58). Si nota come i periodi di bassa escursione mareale (es. dalle 12.00 alle 16.00 del giorno 18/06/07) portino ad un aumento di temperatura dovuto probabilmente al riscaldamento superficiale, mentre una forte escursione con conseguente rimescolamento delle acque (es. dalle 24.00 alle 6.00 del 19/06/07) porti ad un appiattimento del grafico della temperatura (fig.5.57).

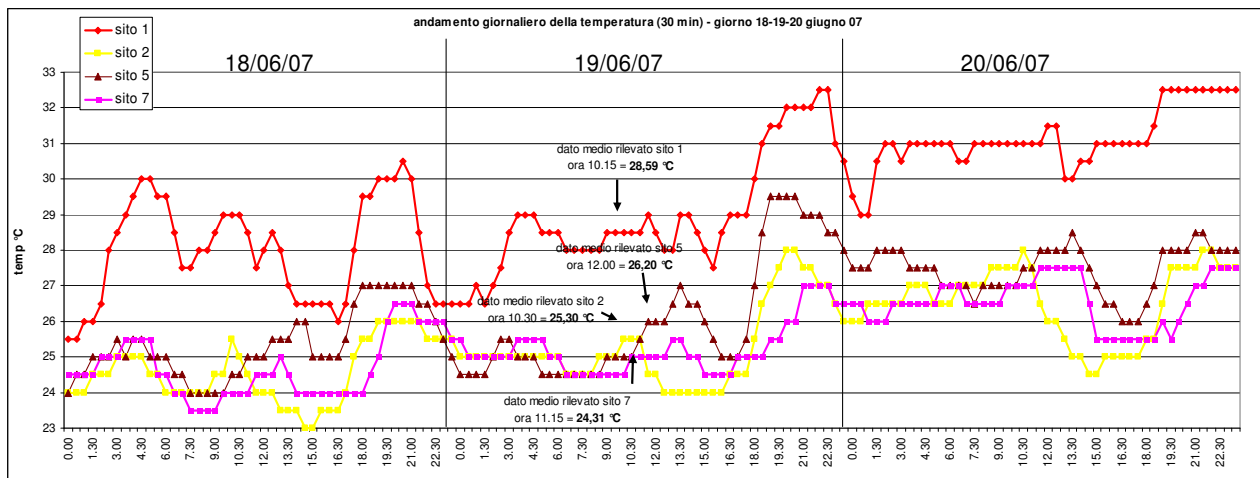


Fig. 5.57 Andamento giornaliero della temperatura (dato rilevato ogni 30 minuti)

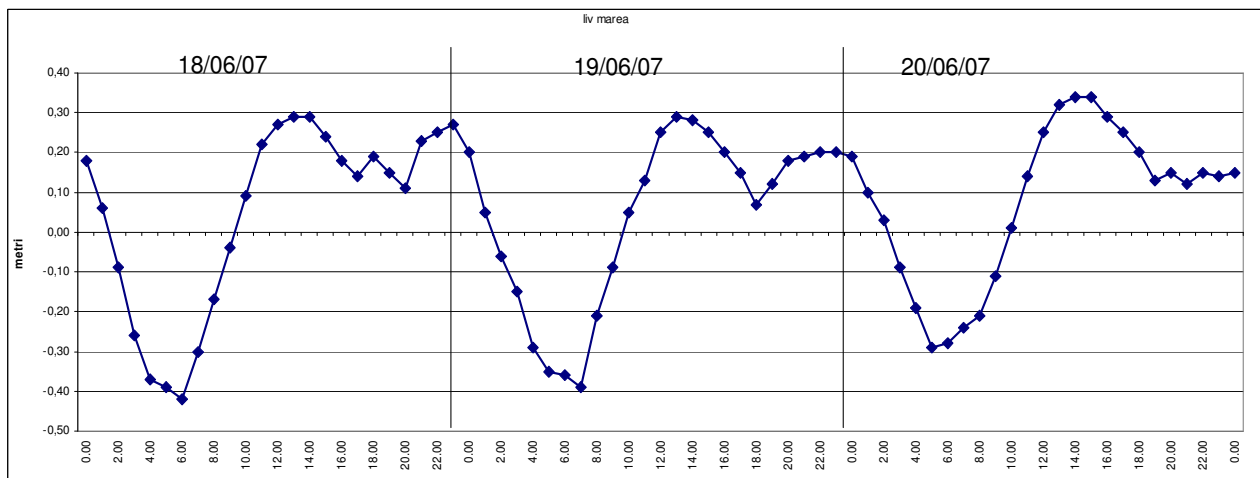


Fig. 5.58 Andamento giornaliero della marea (dato rilevato ogni ora)

- Percentuale di sopravvivenza

Nel periodo di campionamento c'è stata un'alta percentuale di sopravvivenza degli organismi trapiantati in tutti i siti sintomatica di una ancor buona efficienza dei processi vitali, tranne nel sito 1 (canale Magni) dove già a 7 giorni si ha una mortalità maggiore dell'80% a conferma delle critiche condizioni ambientali dell'area (fig. 5.59).

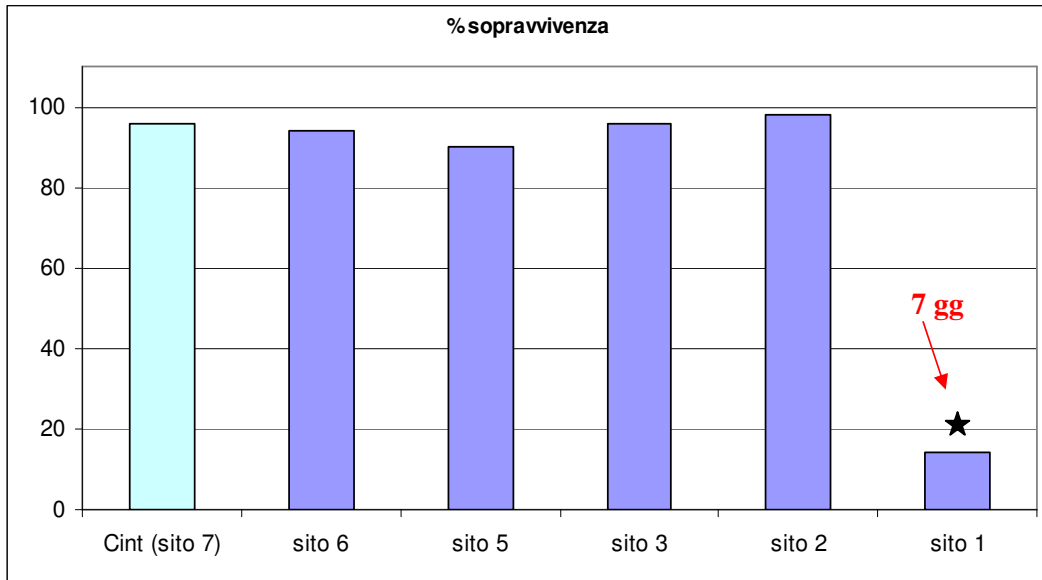


Fig. 5.59 Percentuale di sopravvivenza dopo 30 giorni. Dopo 7 giorni nel sito 1. L'asterisco evidenzia una differenza significativa rispetto al controllo (T-test; $p < 0,05$)

Non avendo materiale sufficiente per applicare tutti i biomarker nel sito 1 - 7gg, i risultati mostrati successivamente sono riferiti ai campioni prelevati nel sito 1 dopo 3 giorni.

- Stress su Stress

Lo stress su stress è un biomarker estremamente semplice da utilizzare ma molto sensibile nel valutare quando la sindrome da stress ha raggiunto livelli tali da compromettere i normali processi fisiologici di un organismo e a diminuire quindi le sue capacità di sopravvivenza ad un qualsiasi ulteriore stress. In fig. 5.60

vengono mostrati i risultati del test che evidenziano una situazione critica ancora nel sito 1.

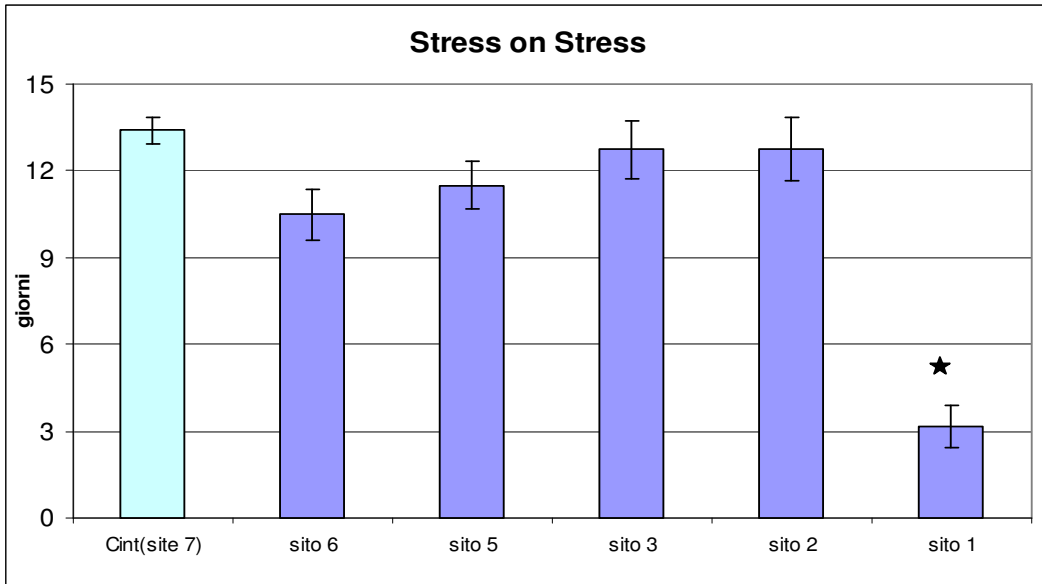


Fig. 5.60 Tempo di sopravvivenza all'aria. L'asterisco evidenzia una differenza significativa rispetto al controllo (T-test; $p < 0,05$)

- LMS

La stabilità della membrana lisosomiale, che come ho già più volte ripetuto è considerato il biomarker più efficace nel diagnosticare lo stato di salute generale dell'organismo, evidenzia nei dati sotto riportati (fig. 5.61) una significativa perdita di efficienza lisosomiale nei siti 6, 3 e ancora 1, sintomatica di un cattivo stato di salute. Pur non discostandosi statisticamente dal controllo, tuttavia anche i siti 5 e 2 sono leggermente al di sotto della soglia dei 20 minuti, al di sopra della quale gli organismi si considerano in un buono stato di salute.

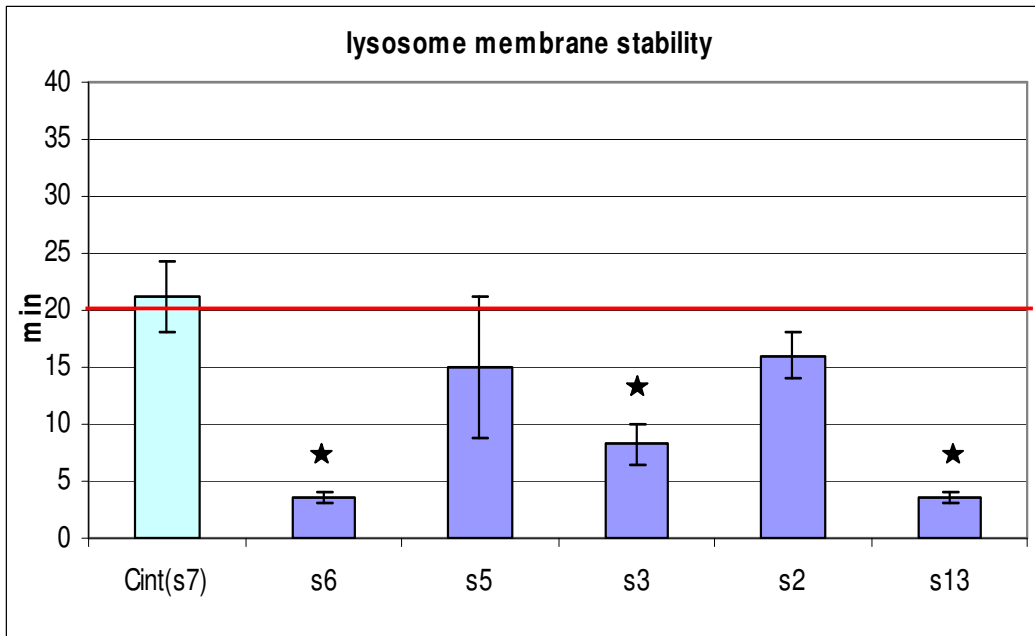


Fig. 5.61 Tempo di labilizzazione della membrana lisosomiale. L'asterisco evidenzia una differenza significativa rispetto al controllo (T-test; $p < 0,05$)

- LIF

La valutazione dei livelli di lipofuscine accumulate nei lisosomi, pur non avendo quella specificità dell'informazione attribuita alla LMS, mostrano un aumento significativo rispetto al controllo in tutti i siti di campionamento tranne il sito 2 (fig. 5.62), suggerendo una sofferenza generica degli organismi trapiantati.

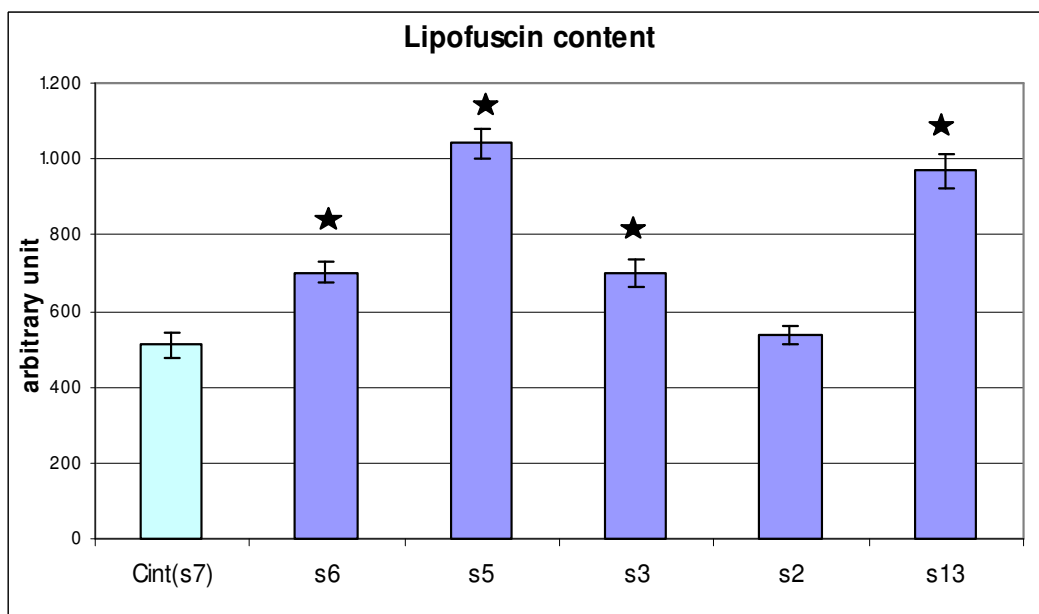


Fig. 5.62 Accumulo di lipofuscine nei lisosomi. L'asterisco evidenzia una differenza significativa rispetto al controllo (T-test; $p < 0,05$)

- Rapporto lisosomi/citoplasma

Questo biomarker opera ad un livello di organizzazione biologica maggiore di quello cellulare tipico ad esempio della LMS, LIF, AChE o MT, dandoci informazioni sull'effetto che la sindrome da stress ha sui tessuti biologici. In particolare la maggiore richiesta di utilizzo dei lisosomi in processi di detossificazione dovuti all'esposizione degli organismi a sostanze contaminanti, porta ad un aumento delle dimensioni di questi, con conseguente aumento del rapporto lisosomi/citoplasma.

Il grafico rappresentato in fig. 5.63 mostra una evidente sindrome da stress nei siti 6, 5 e 3. La mancata segnalazione nel sito 1 potrebbe essere dovuto al fatto che i 3 giorni di esposizione non siano stati sufficienti perché gli effetti evidenziati a livello cellulare si ripercuotessero ad un livello di organizzazione biologico superiore. Questa caratteristica, come chiarirò poi nelle conclusioni, è proprio la capacità prognostica di "early warning" tipica di questa metodologia.

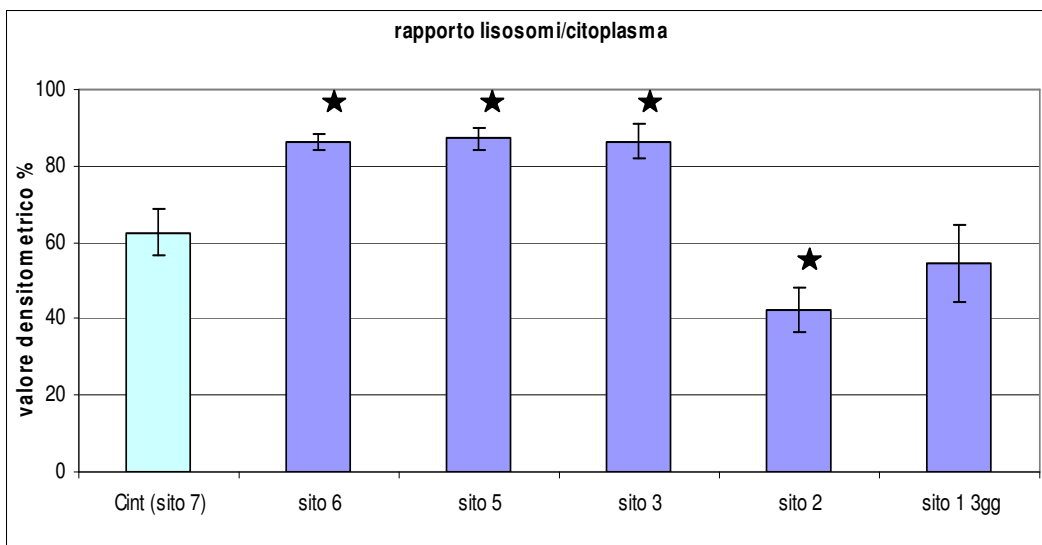


Fig. 5.63 Rapporto lisosomi/citoplasma. L'asterisco evidenzia una differenza significativa rispetto al controllo (T-test; $p < 0,05$)

- Attività della CAT

L'attività della catalasi è un biomarker generico sensibile allo stress ossidativi. I risultati mostrati in fig. 5.64 confermano ancora una volta le condizioni critiche del sito 1 mentre non rilevano alcuna segnalazione negli altri siti indagati.

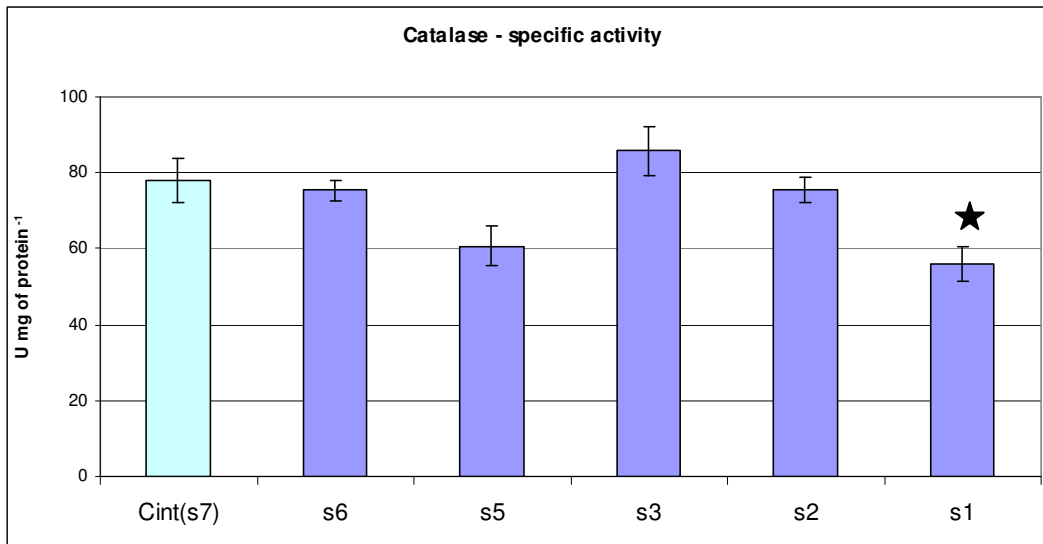


Fig. 5.64 Attività della catalasi nelle ghiandole digestive dei mitili trapiantati. L'asterisco evidenzia una differenza significativa rispetto al controllo (T-test; $p < 0,05$)

- Attività dell'AChE

L'attività dell'AChE da delle risposte che differiscono dagli altri biomarker. Si registra infatti una significativa inibizione dell'enzima solo nel sito 6 (fig. 5.65), quello posizionato più a nord. L'AChE è un biomarker sensibile, oltre che ai metalli, alla presenza in ambiente di residui di pesticidi. In questo caso, anche considerando che le MT non rilevano contaminazione da metalli in s6 (fig. 5.66), la segnalazione del biomarker potrebbe essere dovuta proprio alla presenza di una fonte di contaminazione da pesticidi, come ad esempio un canale di scolo agricolo, posizionato nella parte nord della laguna. Non sono però state fatte verifiche di questo genere.

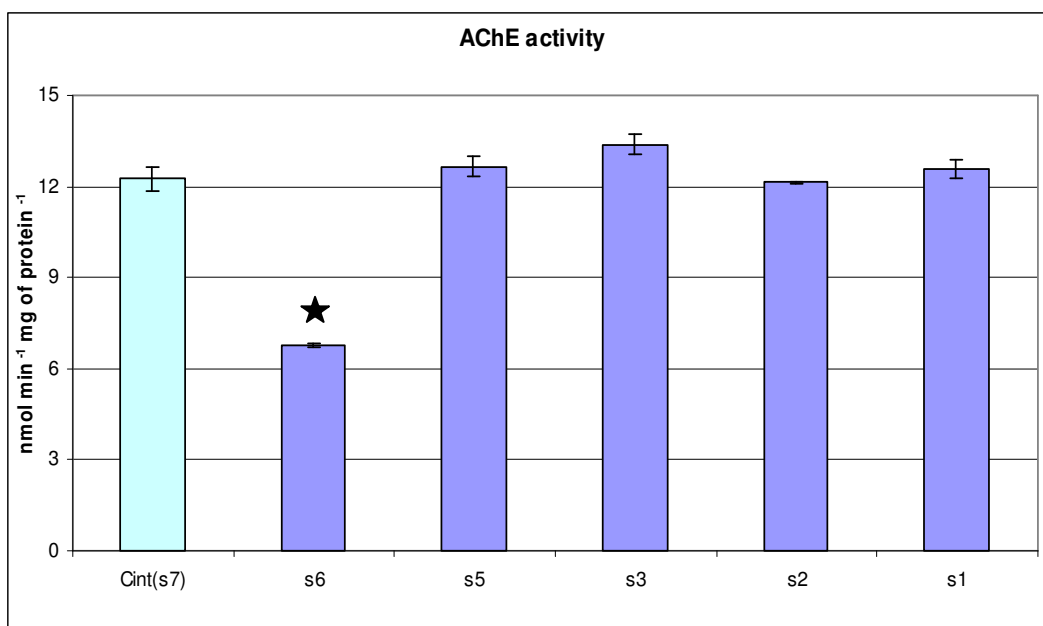


Fig. 5.65 Attività dell'AChE nelle ghiandole digestive dei mitili trapiantati. L'asterisco evidenzia una differenza significativa rispetto al controllo (T-test; $p < 0,05$)

- MT

I dati mostrati in fig. 5.66 mostrano un aumento significativo delle metallotioneine nel sito 3 e nel sito 1. In particolare nel sito posizionato nel canale Magni, vista la peculiarità dell'ambiente in cui sono presenti ingenti concentrazioni di svariate classi di contaminanti e la velocità di accumulo di MT dopo soli 3 giorni, si può ipotizzare che l'aumento di queste proteine sia dovuto sia alla loro capacità chelante nei confronti dei metalli pesanti, ma anche per la loro capacità di intervento nei processi antiossidanti che si instaurano quando l'organismo è esposto a composti che catalizzano la formazione di radicali liberi come gli stessi metalli o contaminanti organici come gli IPA di cui si è ampiamente dimostrata la presenza in quell'area (Fabbri et al., 2006). La somma dei due processi può velocizzare l'accumulo di MT come suggerito anche dai risultati mostrati nel paragrafo 5.1.1..

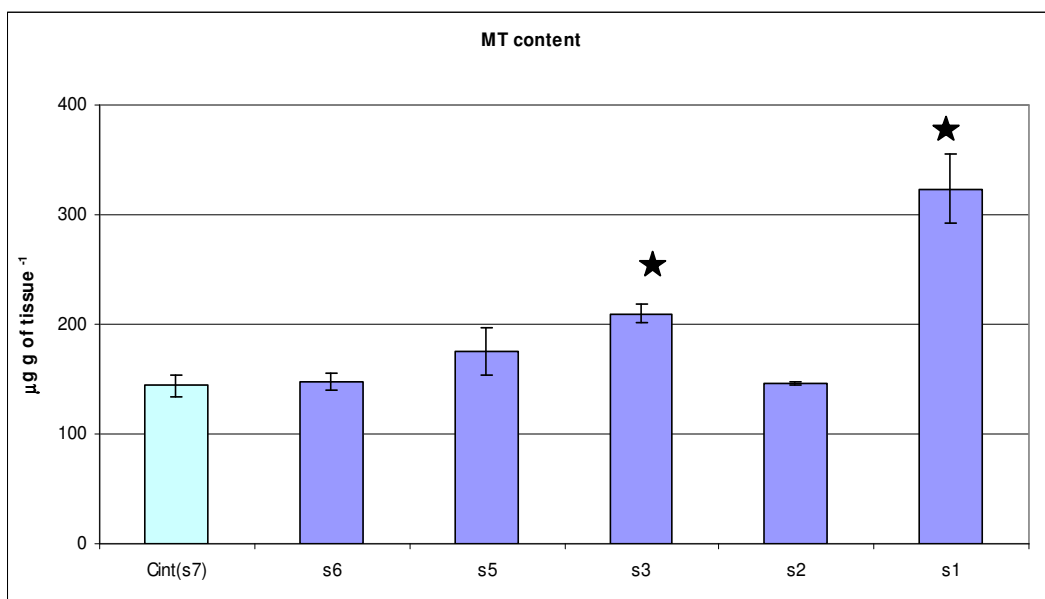


Fig. 5.66 Contenuto di MT nelle ghiandole digestive dei mitili trapiantati. L'asterisco evidenzia una differenza significativa rispetto al controllo (T-test; $p < 0,05$)

- Attività dell'AOX

Questo biomarker è considerato un potenziale indicatore della contaminazione da composti organici come IPA o PCB (biblio). I risultati mostrati in fig. 5.67 sembrano confermare la conclamata e diffusa presenza di alte concentrazioni di questi composti nella laguna oggetto di studio (biblio), evidenziando un significativo aumento dell'attività dell'AOX rispetto al controllo in tutti i siti di campionamento ad eccezione del sito 2.

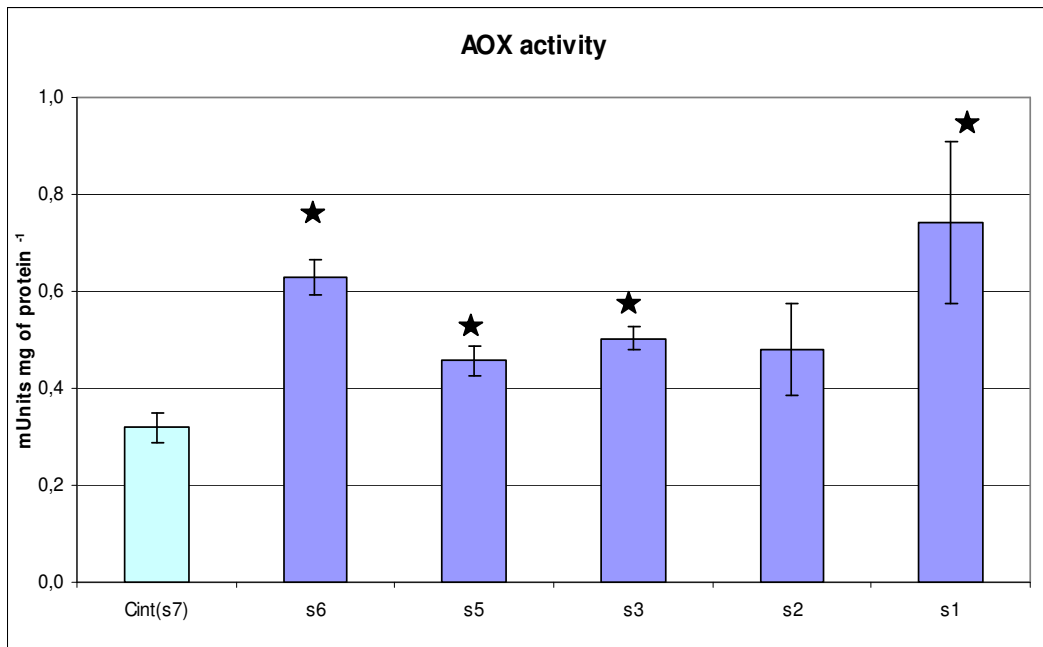


Fig. 5.67 Attività dell'AOX nelle ghiandole digestive dei mitili trapiantati. L'asterisco evidenzia una differenza significativa rispetto al controllo (T-test; $p < 0,05$)

- Analisi dei risultati: SISTEMA ESPERTO

Inserendo i risultati dei biomarker nel sistema esperto (fig. 5.68) vengono generati degli indici di stress su 5 livelli correlati allo stato di salute ambientale nei vari siti di campionamento. In particolare gli indici sono A, B, C, D, E come indice di uno stato di salute che va da buono a patologico.

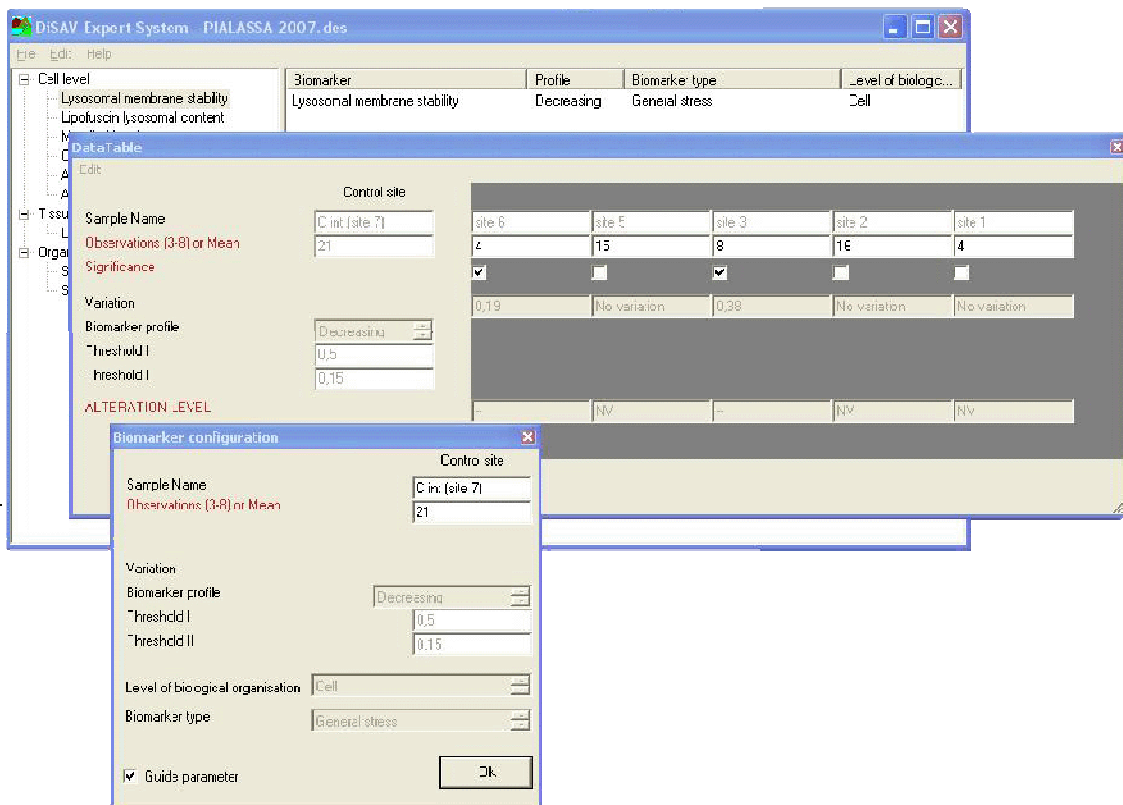


Fig. 5.68. Sistema Esperto: inserimento dei risultati nelle apposite finestre.

Nello specifico caso della campagna di biomonitoraggio del 2007 condotta nella Pialassa Baiona le risposte fisiologiche degli organismi trapiantati hanno portato al seguente risultato mostrato in fig. 5.69 e rappresentato graficamente in fig. 5.70.

The screenshot shows a 'Report' window with a table of stress indices. The table has columns for CONTROL, site 6, site 5, site 3, site 2, and site 1. The rows represent different stress indicators: Stress Level, Presence of organic xenobiotic, Genotoxic effects, and Presence of heavy metals.

	CONTROL	site 6	site 5	site 3	site 2	site 1
Stress Level	A	D	C	D	A	D
Presence of organic xenobiotic	NO	YES	YES	YES	NO	YES
Genotoxic effects	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Presence of heavy metals	NO	NO	NO	YES	NO	YES

Fig. 5.69 Sistema Esperto: visualizzazione degli indici di stress

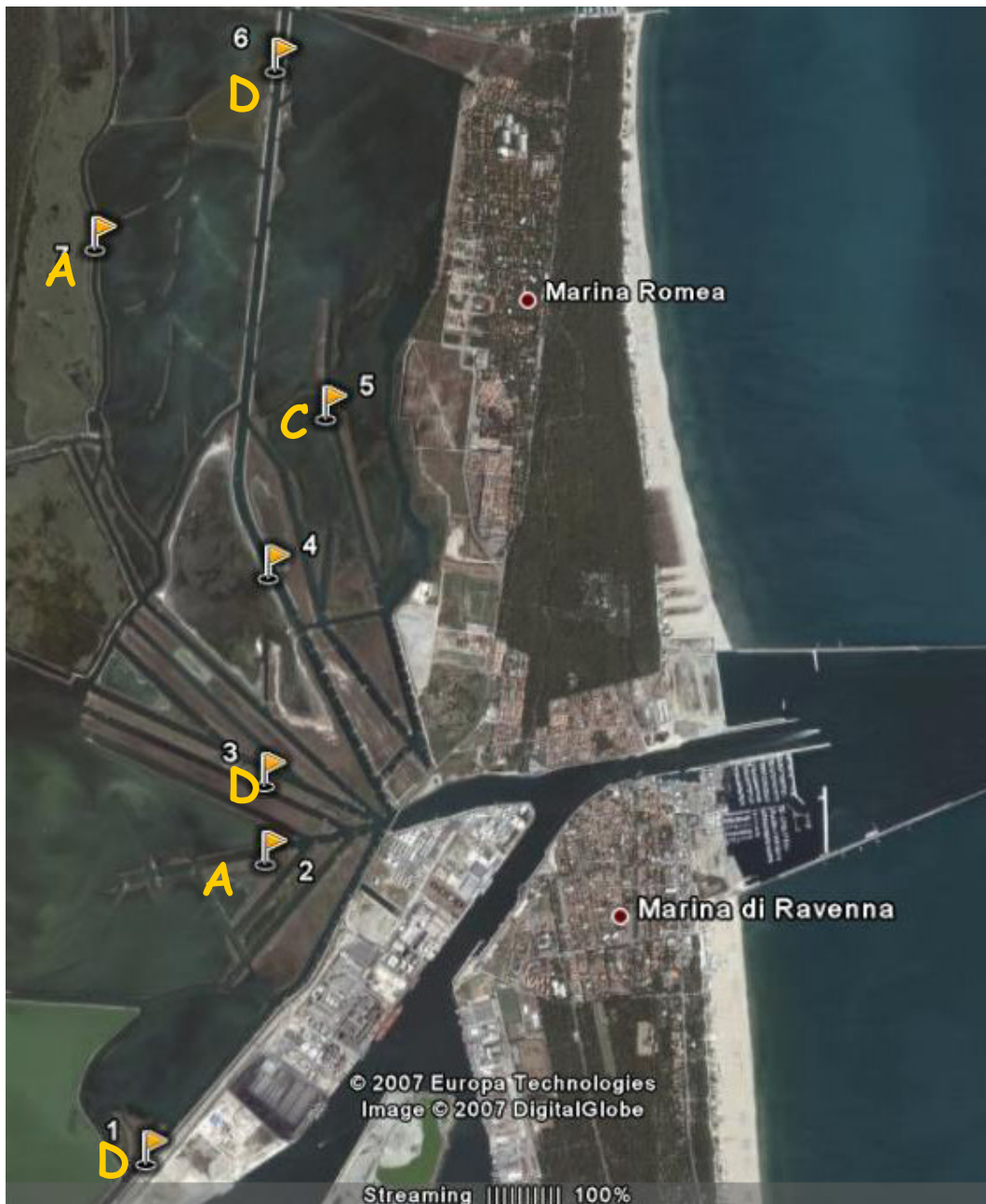


Fig. 5.70. Accoppiamento degli indici di stress con i siti di campionamento

Il mitili trapiantati nel sito di controllo (sito 7) sono risultati in un buono stato di salute così come quelli trapiantati nel sito 2. In 5 gli organismi sono risultati in uno stato di medio stress, mentre nei siti 1, 3 e 6 è stato calcolato uno stato di forte stress. Ad integrazione di queste elaborazioni il SE suggerisce la probabile presenza di una contaminazione da metalli pesanti nei siti 1 e 3 ed una diffusa

presenza di contaminanti organici xenobiotici in tutti i siti tranne che nel 2 e nel controllo (fig. 5.69).

Conclusioni

La campagna BAIONA 2007 si prefiggeva, in fase di ideazione, di riunire, analizzare e applicare tutte le metodologie testate e le esperienze maturate in questi anni di ricerca ritenute idonee al fine di una chiara e corretta indagine sulla salute ambientale di un zona specificatamente complessa come una laguna costiera.

Gli organismi utilizzati, i mitili della specie *Mytilus galloprovincialis*, hanno confermato di possedere quelle caratteristiche peculiari che ne fanno delle efficienti sentinelle ambientali.

La batteria di biomarker utilizzata si è rivelata idonea ad un utilizzo in ambienti costieri e lagunari e capace di indagare efficacemente le specifiche criticità ambientali delle aree oggetto di studio.

Inoltre l'ampiezza della batteria ha permesso una più precisa interpretazione dei risultati dei singoli biomarker riducendo le interferenze dirette o indirette provocate dagli stress naturali.

L'utilizzo del sistema esperto si è rivelato utile nel riassumere ed integrare in semplici indici di stress la grande quantità di informazioni registrate nell'applicazione delle metodologie dei biomarker.

Le indagini chimico-fisiche dell'area oggetto di studio sono state estremamente interessanti per capire meglio le caratteristiche idrodinamiche della laguna e gli andamenti di quei parametri abiotici che spesso possono portare ad una difficile interpretazione dei risultati. Dai risultati è emerso chiaramente la differenziazione chimico-fisica del canale Magni rispetto alle altre zone di campionamento, in particolare la temperatura e la salinità che si discostano nettamente da quelle registrate negli altri siti. Un altro elemento che è emerso è la forte fluttuazione giornaliera dei parametri abiotici che confrontata con i dati di marea, sembra

essere fortemente influenzata proprio delle correnti mareali. Per dare risposte certe su questo tema sarebbero necessarie però ulteriori e più approfondite indagini.

Per quanto riguarda la qualità ambientale della Pialassa Baiona, la campagna 2007 ha evidenziato alcuni punti già emersi in precedenti campagne. In particolare il sito di controllo (sito 7) si è confermato come un'area di pregio all'interno della Pialassa in cui si mantengono per ora delle buone condizioni ambientali che permettono di utilizzarlo come sito di controllo.

Il sito presente nel canale MAGNI (sito 1) si è confermato quello con il maggior degrado ambientale: il SE ha indicato una situazione di forte stress con presenza di contaminanti organici xenobiotici e metalli pesanti (fig. 5.69), risultato che acquista ancora maggiore peso se si considera che gli organismi analizzati in questo sito sono rimasti esposti in acqua solo per 3 giorni. I 30 giorni di trapianto hanno portato allo stesso risultato della campagna del 2003, con la morte di tutti gli organismi e relativa perdita di informazioni. Vincente quindi la strategia di prelevare a tempi diversi gli organismi trapiantati in siti di riconosciuto degrado ambientale.

Come già sospettato nella precedente campagna del 2003, una situazione critica è stata registrata nel sito più a nord (sito 6), in cui il SE produce l'indice D relativo ad un forte stress abbinato alla presenza di contaminanti organici. I risultati ottenuti dal SE per questo sito, insieme con le specifiche indicazioni date dai singoli biomarker come l'AChE, suggerirebbero ulteriori approfondite analisi al contorno dell'area nord per individuare e monitorare possibili fonti di inquinamento puntiformi o diffuse.

Anche il sito 3 presenta una elevata criticità ambientale indicata dal SE ancora con l'indice D e presenza sia di contaminanti organici xenobiotici che di metalli pesanti. Il sito 3 si trova a sud vicino all'area del canale Magni, per cui potrebbe risentire direttamente della contaminazione lì presente.

Discorso a parte per il sito 2 in cui gli organismi sembrano godere di un buono stato di salute ed in cui non viene suggerita la presenza né di metalli né di contaminanti organici. La spiegazione potrebbe essere ricercata nel fatto che pur

trovandosi a sud vicino alle zone più contaminate, il sito 2 si trova direttamente davanti al canale d'ingresso dell'acqua dal mare, per cui una maggiore circolazione e ricambio dell'acqua possono aver contribuito al miglioramento delle condizioni di vita dei mitili.

6. Conclusioni

Obiettivo del presente lavoro di ricerca è stato quello di definire una efficace strategia di biomonitoraggio utilizzando biomarker e organismi sentinella finalizzata alla valutazione della qualità di aree complesse come le zone umide e costiere.

Alla luce dei risultati ottenuti in questi anni di ricerca possono essere fatte le seguenti specifiche considerazioni:

gli organismi sentinella

La scelta degli organismi sentinella è stata di fondamentale importanza per la definizione di efficaci strategie di biomonitoraggio: una scelta sbagliata può rendere vani tutti gli sforzi sostenuti per la progettazione, la realizzazione e le analisi correlate ad una campagna di indagine ambientale. Le condizioni ottimali per effettuare una campagna di biomonitoraggio non possono infatti essere forzate come in un esperimento di laboratorio e spesso quindi fallire la realizzazione di una campagna equivale spesso a rimandare le indagini di un anno.

Alla luce di queste considerazioni pratiche, è apparsa evidente l'esigenza di studi approfonditi e test ripetuti su quegli organismi che apparivano come candidati ideali per diventare efficaci "sentinelle" in studi di valutazione ambientale, in particolar modo quando l'ambiente da indagare è una zona umida o costiera. Per lo studio delle zone umide e costiere gli organismi più utilizzati sono in generale bivalvi sessili filtratori come ostriche, vongole e mitili e su questi si è focalizzata la mia attenzione fin dall'inizio della mia ricerca.

Le ostriche sono bivalvi ampiamente distribuiti a tutte le latitudini e sono perciò comunemente usate come organismi sentinella per la valutazione della contaminazione ambientale (Valdez Domingos et al., 2007). Sono sensibili a stress naturali o antropici (Piano et al., 2002; Tanguy et al., 2001; Bigas et al., 1997) ed hanno specifiche risposte fisiologiche del tutto simili ai mitili (Valbonesi et al., 2003; Geret et al., 2002). Appare evidente però che spesso le ostriche sono utilizzate solo in condizioni particolari e quando non è possibile utilizzare i mitili, vuoi per la difficoltà di reperimento di questi ultimi, vuoi per la presenza in un determinato ambiente oggetto di studio di diffusi banchi di ostriche ma non di mitili. Nel mio caso è risultato estremamente più semplice utilizzare i mitili delle

ostriche: sono più facili da reperire e da maneggiare, vivono in abbondanti banchi lungo tutta la costa e nelle acque di transizione e anche dove non sono presenti banchi stanziali essi hanno dato ampie garanzie di sopravvivenza e di efficacia nel diagnosticare situazioni ambientali critiche.

Le vongole sono state studiate e testate sia in esperimenti di laboratorio che sul campo (Rodriguez-Ortega et al., 2002; Da Ros and Nesto, 2005) tanto da suggerire di approfondire la conoscenza delle varie risposte a stress naturali e antropici per consentire il loro utilizzo routinario in programmi di biomonitoraggio (Bebiano et al., 2004).

In Alto Adriatico le specie prevalenti sono la *Chamelea gallina* e la *Tapes Philippinarum*, entrambe commercialmente importanti. La prima vive prevalentemente in mare aperto ad una profondità di circa 6-10 metri. I pochi studi effettuati su di essa hanno rivelato l'applicabilità delle comuni metodologie dei biomarker ed anzi una buona sensibilità della *C. gallina* a fornire risposte chiare e riproducibili (Viarengo et al., 1998). La seconda invece vive prevalentemente in acqua bassa tipica delle lagune salmastre come la laguna di Venezia o le Pialasse ravennati. E' stata studiata e utilizzata in campagne di biomonitoraggio e test di laboratorio ma ha dato risposte contrastanti: Da Ros and Nesto (2005), utilizzando la *T. philippinarum* per la valutazione della qualità ambientale della laguna di Venezia, sono stati in grado di evidenziare una criticità ambientale sito-specifica confermata da uno studio parallelo con i mitili mentre Valbonesi et al. (2003) ha messo in evidenza la difficoltà di valutare l'attività dell'acetilcolinesterasi in questa vongola. Questi risultati sembravano suggerire una maggior affidabilità della *C. gallina* in confronto alla *T. philippinarum*, per cui è stato fatto un tentativo di utilizzare questo organismo come sentinella in una campagna di biomonitoraggio all'interno della Pialassa Baiona (Fraternali, 2004). I risultati però hanno evidenziato i limiti di utilizzo di questo organismo in ambienti peculiari come le acque di transizione o le zone umide. Pur essendo comprovata una certa sensibilità all'inquinamento, l'estrema variabilità naturale ed il periodico instaurarsi di condizioni estreme tipica di questi ambienti, porta se non alla morte degli organismi, ad un "rumore di fondo" dato dallo stress naturale che può coprire le risposte fisiologiche indotte da fattori antropici.

Come dimostrato in molti studi sul campo e test di laboratorio (referenze in Donnini et al., 2007) il mitilo è senza dubbio l'organismo sentinella più utilizzato, più conosciuto, più studiato e che quindi ad oggi dà le maggiori garanzie di efficacia per un suo utilizzo in campagne di biomonitoraggio. In particolare il mitilo è risultato essere l'unico organismo in grado di soddisfare i parametri peculiari di un buon organismo sentinella (§ 3.1.) e a fornire risposte chiare e riproducibili quando ad essere oggetto di studio sono stati ambienti particolari e complessi come quelli da me indagati, le zone umide e costiere (Donnini et al., 2007; Donnini, Tesi di laurea 2003).

i biomarker

Come già precedentemente accennato (§ 1.2.1) l'analisi di un singolo biomarker difficilmente è in grado di fornire una indicazione inequivocabile e spesso anche interpretabile di uno o più aspetti della qualità ambientale di un ambiente: un dato parametro può essere soggetto alla variabilità insita negli organismi viventi e può fornire talvolta risultati ambigui, causando sovrastime o sottostime degli effetti sulle biocenosi. Risulta quindi essenziale l'impiego di una batteria di biomarker al fine di produrre un risultato integrato, che da un lato minimizzi gli effetti della variabilità biologica e dall'altro sia confermato da più di una indagine.

La valutazione della stabilità della membrana lisosomiale, come già suggerito in molti studi effettuati (Moore, 1991) è risultato essere il biomarker più sensibile ad una condizione ambientale di stress. In tutti i test ha dato risposte chiare e inequivocabili sullo stato di salute degli organismi e spesso è stato utile come parametro guida per interpretare gli altri risultati. Recentemente, inoltre, è stato suggerito di utilizzare proprio la LMS insieme allo Stress su Stress in una prima fase di indagine ambientale, salvo poi intervenire con tutta la batteria di biomarker dove viene segnalata una situazione critica (Viarengo et al., 2007). Questi suggerimenti sono stati recepiti dall'ARPA che infatti dal 2008 comincerà ad utilizzare questo tipo di indagine affiancandola alle analisi finora condotte in ottemperanza alle normative vigenti.

La valutazione dell'accumulo dei lipidi neutri nei lisosomi ha fornito una utile integrazione a conferma delle risposte degli altri biomarker generici sullo stato di salute degli organismi. A mio avviso però alcune osservazioni rilevate in fase di esecuzione e interpretazione dovrebbero portare ad un approfondimento sulle modalità di espressione di questo biomarker per chiarire quanto l'accumulo dei lipidi nei lisosomi evidenziato dalla colorazione istologica sia un effetto della perdita di funzionalità dei lisosomi causata da un pessimo stato di salute dell'organismo, o semplicemente causata da un naturale accumulo di lipidi in prossimità del ciclo riproduttivo.

La valutazione dell'accumulo di lipofuscine nei lisosomi, quando è stato utilizzato, ha sempre fornito risposte chiare e confermate dalla LMS. Si è dimostrato quindi un utile biomarker generico per la valutazione dello stato di salute dell'organismo e anche se non fornisce una valutazione quantitativa dello stress, è comunque importante per l'individuazione di una situazione ambientale più o meno critica.

E' dimostrato che l'attività dell'AChE è inibita da carbammati e organofosfati presenti nei residui dei pesticidi (Valbonesi et al., 2003; Rickwood and Galloway, 2004) e alcuni miei risultati sembrano suggerire un potenziale effetto dei pesticidi utilizzati in agricoltura in ambienti acquatici il cui bacino idrografico comprende vaste zone coltivate (§ 5.4.3.). Tuttavia studi recenti sembrano dimostrare che altre classi di contaminanti possano avere un effetto sull'attività dell'AChE, inclusi i metalli (Frasco et al., 2005). Questa ipotesi è confermata dai miei risultati (§ 5.3.1.) in cui il mercurio e il metilmercurio ne inibiscono l'attività. Alla luce di questi risultati e di queste osservazioni, pur confermando la sensibilità dell'AChE ai pesticidi, si confermano le osservazioni di Viarengo et al. (2007) secondo cui questo biomarker rimane un indicatore specifico per la presenza di pesticidi nei pesci, ma è da considerarsi un biomarker generico nei molluschi.

L'uso dell'attività della catalasi è ben conosciuto ed è stato efficacemente utilizzato per la valutazione dello stress ossidativo (Regoli e Principato, 1995). Essendo molte le classi di contaminanti capaci di produrre radicali liberi e quindi

stress ossidativo, la catalasi è considerata un biomarker generico della salute degli organismi. Anche i miei risultati hanno confermato la sensibilità e l'applicabilità di questo biomarker in campagne di biomonitoraggio della qualità ambientale delle acque di transizione (§5.4.3.).

L'AOX è un enzima fondamentale del pool enzimatico perossisomiale deputato alla ossidazione di acidi grassi a lunga catena ed alla digestione e detossificazione di composti organici xenobiotici. Gli studi condotti sull'utilizzo di questo enzima come biomarker specifico per contaminanti come ad esempio IPA o PCB ha portato ad interessanti risultati (Cajaraville and Ortiz-Zarragoitia, 2006). Il limite per l'inserimento di questo enzima nella batteria di biomarker da utilizzare in campagne di valutazione della qualità ambientale è però il fatto che pochi studi sono stati ad oggi condotti sui potenziali effetti di altri classi di contaminanti sull'AOX ed i miei risultati confermano infatti che metalli pesanti come il mercurio o organometalli come il metilmercurio possono effettivamente modificare l'attività di questo enzima (§5.3.1.). Nonostante queste considerazioni ritengo però estremamente interessante approfondire la conoscenza sulle modalità di espressione dell'AOX per chiarire la sua potenzialità ed efficacia come biomarker.

Molti studi sono stati effettuati sulle metallotioneine che hanno dimostrato chiaramente il loro fondamentale ruolo nei meccanismi di detossificazione come chelante dei metalli pesanti (Viarengo et al., 2000). La valutazione del contenuto di MT si è confermata nella mia ricerca come un biomarker specifico molto sensibile ed efficace nel diagnosticare la presenza di una anomala quantità di metalli pesanti (§5.3.1.; §5.3.2.; §5.4.3.) per cui la sua presenza in una batteria di biomarker da utilizzare in indagini ambientali appare fondamentale.

Il cAMP è un secondo messaggero con un ruolo chiave nella regolazione della disponibilità energetica durante lo sviluppo delle gonadi (Diaz-Enrich and Ibarburen, 2003) e in moltissimi processi fisiologici. Studi recenti infatti mostrano come i livelli di cAMP siano significativamente influenzati da una esposizione a metalli pesanti (Cadmio, Rame e Cromo) o contaminanti organici (Dailianis et al., 2003; Raftopoulou et al., 2006; Fabbri and Capuzzo, 2006; Dailianis and Kaloyianni, 2007). La difficoltà nel mettere in relazione i livelli di cAMP con uno

stato di salute e quindi con una condizione di salute ambientale, sta nel fatto che i livelli di cAMP sono il risultato dei processi di formazione e degradazione catalizzate rispettivamente dall'adenilato ciclasi (AC) e dalla fosfodiesterasi cAMP-dipendente. Risulta quindi di difficile interpretazione, alla luce delle poche conoscenze specifiche, quanto la variazione dei livelli di cAMP sia direttamente derivante da una necessità dell'organismo o da un effetto diretto causato dall'instaurarsi di avverse condizioni ambientali, e quanto invece specifici composti possano ad esempio aver influenzato direttamente o indirettamente l'AC o la fosfodiesterasi.

La valutazione del rapporto lisosomi/citoplasma è stata utilizzata nell'ultima campagna di biomonitoraggio in Pialassa Baiona (§5.2.3.3.) e ha fornito delle indicazioni chiare ed in linea con gli altri biomarker. Considerando poi che agisce ad un livello di organizzazione biologica superiore rispetto ai biomarker cellulari (tessuto), appare ancora più importante l'informazione data da un suo utilizzo. Un grande peso infatti viene riservato dal Sistema Esperto al rapporto lisosomi/citoplasma nell'elaborazione degli indici di qualità. Infatti senza la segnalazione dei biomarker a livello tissutale o di organismo (SoS, mortalità) il programma non elabora gli indici D e E, rispettivamente correlati con un forte stress e con una situazione patologica.

La valutazione della percentuale di sopravvivenza, pur essendo estremamente semplice e diretto nella sua applicazione, è sicuramente uno degli indici più evidenti di degrado ambientale. E' logico infatti che una diminuita percentuale di sopravvivenza sia da mettere in relazione diretta con una scarsa qualità ambientale. Per questo biomarker vale lo stesso discorso fatto per il rapporto lisosomi/citoplasma in relazione al suo peso nel Sistema Esperto. Anzi, alla luce del fatto che agisce a livello di organismo, le informazioni che fornisce hanno ancora più importanza, suggerendo un potenziale effetto successivo a livello di popolazione e quindi di ecosistema.

La valutazione dello stress su stress è un biomarker tanto semplice quanto sensibile. Numerosi studi e applicazioni hanno dimostrato infatti l'efficacia di questo indice per la valutazione dello stato di salute dell'organismo sentinella

(Eertman et al., 1993; Hellow and Law, 2003). Come accennato parlando della LMS, questo biomarker è stato suggerito come indicatore di primo livello insieme alla LMS nell'approccio a "2 livelli" proposto da Viarengo et al. (2007) e adottato dal MED-POL per il biomonitoraggio del Mediterraneo. Le considerazioni finali fatte per la percentuale di sopravvivenza valgono anche per questo biomarker.

Strategia di campionamento

Il periodo di campionamento migliore sembra essere settembre-ottobre, in cui sono limitate ormai le forti insolazioni che possono portare a surriscaldamenti eccessivi della colonna d'acqua alla base di molti processi dannosi per l'ambiente come crisi anossiche e crisi distrofiche frequenti in ambienti con acqua bassa come le zone umide, e che possono coprire con un eccessivo "rumore di fondo" i segnali forniti dai biomarker. In secondo luogo anche il periodo primaverile (aprile-giugno) può essere utilizzato efficacemente.

Gli organismi, in un numero di almeno 50 per poter valutare tutti i biomarker inclusi la mortalità e lo stress su stress, devono essere trapiantati in modo da trovarsi nella colonna d'acqua, né troppo vicino al fondo per non subire troppo l'influenza del sedimento spesso fortemente contaminato, né troppo in superficie per non dover subire periodi di insolazione diretta.

Il tempo di esposizione in ambiente di 30 giorni sembra ideale per una efficace risposta di tutti i biomarker senza l'instaurarsi di processi di adattamento o recupero. In particolare nei siti con un conclamato degrado ambientale sarebbe opportuno programmare dei prelievi intermedi per valutare la capacità di sopravvivenza nell'ambiente e per non rischiare di perdere importanti informazioni come avverrebbe in caso di morte di tutti gli organismi.

La scelta del controllo si è dimostrato un punto di fondamentale importanza per la buona riuscita di una campagna di biomonitoraggio. In particolare quando si va ad indagare ambienti ristretti e spesso caratterizzati da una diffusa contaminazione ambientale o dalla presenza di forti fluttuazioni chimico-fisiche naturali come le acque di transizione, la scelta di più controlli può essere vincente per poter

interpretare al meglio le risposte dei biomarker. In generale un controllo interno, cioè un sito di cui conosciamo con certezza le caratteristiche di nulla o bassa criticità ambientale presente all'interno dello stesso ambiente che vogliamo indagare, risulta la scelta migliore, come fatto per la campagna Baiona 2007. Purtroppo spesso accade che quel sito si riveli non più così "pulito" o che temporalmente si siano instaurate condizioni naturali particolari che hanno influito sulle risposte fisiologiche degli organismi sentinella. Si suggerisce in quel caso di considerare come controllo il tempo 0, cioè i mitili prelevati da un banco naturale e sui quali, prima di essere suddivisi in gruppi e trapiantati, vengono applicati i biomarker. Ideale sarebbe mantenere anche un controllo di laboratorio in acqua di mare artificiale filtrata e ossigenata da confrontare con i controlli posizionati in ambiente.

L'utilizzo parallelo al biomonitoraggio di indagini geochimiche, chimiche o chimico-fisiche possono essere utili per una iniziale caratterizzazione dell'area. In particolare in ambienti in cui i parametri abiotici possono avere un forte peso, questi studi possono essere fondamentali per poter capire le dinamiche idrologiche e le fluttuazioni chimico-fisiche per poter interpretare correttamente alcune risposte dei biomarker.

Conclusioni

Negli ultimi venti anni un'attenzione particolare è stata data dalla comunità scientifica nello sviluppare e testare numerosi biomarker al fine di quantificare l'effetto subletale dei contaminanti e permettere così di identificare l'impatto dell'inquinamento ambientale nella sua fase di sviluppo, cioè prima che gli effetti siano definitivi.

Purtroppo, in gran parte delle nazioni inclusa l'Italia, le amministrazioni pubbliche e gli organi deputati al controllo ed alla gestione delle risorse naturali sono in gran parte rimaste legate per anni alle vecchie metodologie e procedure di indagine ambientale che prevedevano fundamentalmente l'analisi dei singoli contaminanti e il confronto con i valori soglia definiti dalla legge, con tutti i limiti che questo approccio comportava (vedi §1.2.).

Recentemente, con il D.Lgs.152/99, con la Water Framework Directive (2000/60/EC) e ultimamente con il D.Lgs.152/2006, è stata fortunatamente recepita la necessità di classificare lo stato ecologico dei vari ambienti acquatici in funzione degli obiettivi di qualità ambientale attraverso l'identificazione di indicatori di qualità anche biologici come fauna ittica o macroinvertebrati bentonici e perseguire la realizzazione dello stato ecologico buono di tutti i corpi idrici significativi entro il 2015-2016.

La presa di coscienza dell'importanza fondamentale di considerare l'importanza dell'ecosistema nel suo complesso e gli effetti sulla componente biologica dell'inquinamento, aprono la strada ad un nuovo e più razionale modo di affrontare le tematiche di gestione ambientale.

Il biomonitoraggio con organismi sentinella e biomarker e la sua capacità diagnostica e prognostica sulla qualità ambientale assumono oggi un ruolo importante per la definizione di strategie di classificazione, intervento o recupero di siti contaminati.

La stessa ARPA, l'organo deputato al monitoraggio ambientale, inserirà dal 2008 l'analisi della LMS valutata sui mitili a fianco delle analisi di bioaccumulo e chimico-fisiche svolte rutinariamente. Questo approccio metodologico è simile a quello descritto da Viarengo et al. (2007) che suggerisce l'utilizzo prima della LMS e SoS e solo successivamente dell'intera batteria dove ritenuto necessario (approccio "2-tier").

Nell'ottica di trasferire le metodologie di biomonitoraggio dall'ambito della pura ricerca universitaria all'utilizzo pratico di amministrazioni o organi di controllo ambientale, una facilitazione può essere rappresentata dall'utilizzo del SISTEMA ESPERTO. Il SE, come già accennato nel paragrafo 3.3, è un software in grado di integrare tutti i risultati dei biomarker in 5 semplici indici di stress correlati ad una diversa criticità ambientale e di suggerire la presenza di particolari classi di contaminanti come metalli pesanti o composti organici xenobiotici.

Il SE è stato validato in differenti ambienti ed i risultati dimostrano che è in grado di quantificare efficacemente gli effetti biologici di differenti livelli di inquinamento.

La facilità di utilizzo, la chiarezza e l'efficacia nella valutazione dell'impatto dei contaminanti, ne fanno uno strumento di supporto decisionale ideale per un utilizzo da parte degli enti deputati alla gestione ambientale.

In conclusione, negli ultimi decenni molti studi sono stati fatti in tutto il mondo per definire le metodologie di biomarker più adeguate, individuare gli organismi sentinella più idonei e approfondire la loro conoscenza fisiologica e comportamentale ed infine validare i risultati applicando le stesse procedure in vari ambienti. Tra questi, gli ambienti di transizione sono i più difficili da valutare, per la variabilità intrinseca delle loro caratteristiche chimico-fisiche, che già rappresenta un fattore di stress per gli organismi. Tuttavia questo lavoro di Tesi ha contribuito a identificare organismi sentinella e biomarker adatti al biomonitoraggio di habitat costieri. Le informazioni chimico-fisiche e geochimiche raccolte in parallelo hanno confermato l'attendibilità delle risposte dei biomarker e della diagnosi integrata fornita dal Sistema Esperto, permettendo di proporre i mitili e la batteria di biomarker precedentemente discussa (§ 6 – *biomarker*) come strumenti adeguati a valutare la qualità di tali ambienti.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Amorosi A, Centineo MC, Dinelli E, Lucchini F, Tateo F (2002). Geochemical and mineralogical variations as indicators of provenance changes in Late Quaternary deposits of SE Po Plain. *Sedimentary Geology* 151: 273-292

Anconelli MT, Baldrati C, Vandini W (1980). Studio composito sull'inquinamento da mercurio ed altri oligoelementi delle valli ravennati (Pialasse). *Acqua e Aria* 10, 1323.

Angelini R, Strumia F (1994). Il bacino idrografico della Pialassa Baiona. Descrizione del territorio dal punto di vista delle fonti di carico inquinante. In: Soprani S, Ricci C (eds) *Analisi dello stato ambientale e sanitario nelle valli ravennati. La Pialassa Baiona*. Azienda U.S.L., Dipartimento dei Servizi di Prevenzione, Ravenna: 157-200

ARPA (sezione provinciale di Ferrara), 2004. Monitoraggio integrato delle valli di Comacchio. <http://www.arpa.emr.it/FERRARA/>

Baatrup, E., 1991. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 253–257.

Bayne BL, Brown DA, Burns K, Dixon DR, Ivanovici A, Livingstone DR, Lowe DM, Moore MN, Stebbing ARD, Widdows J (1985). *The effects of stress and pollution on marine animals*. Prager Scientific.

Bebianno MJ, Ge´ret F, Hoarau P, Serafim RA, Coelho MR, Gnassia-Barelli M, Rome´o M. 2004.

Biomarkers in Ruditapes decussates: a potential bioindicator species. *Biomarkers* 9:305_330.

Bigas, M., Amiard-Triquet, C., Durfort, M., Poquet, M., 1997. Sublethal effects of experimental exposure to mercury in European flat oyster *Ostrea edulis*: cell alterations and quantitative analysis of metal. *10* (4), 277–284

Blackmore G and Wang W-X, 2003. Inter-population differences in Cd, Cr, Se, and Zn accumulation by the green mussel *Perna viridis* acclimated at different salinities. *Aquatic Toxicology* 62, 205-218.

Bocquenè, G., Bellanger, C., Cadiou, Y., Galgani, F., 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* 4, 266-279.

Brown, B.L., Albano, J.D.M., Ekins, R.P., Sgherzi, A.M., 1971. A simple sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. *Biochem. J.* 121, 561-562.

Buratti S, 2006. Studio sui possibili effetti delle tossine algali su parametri fisiologici del mitilo *Mytilus galloprovincialis*. Tesi di Laurea in Scienze Ambientali, Università di Bologna in Ravenna

Burns and Vanden Heuvel, 2007

Cailleaud K, Maillet G, Budzinski H, Souissi S, Forget-Leray J, 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 147, 841-849

Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 2000;247:295-311.

Cajaraville, M.P., Ortiz-Zarragoitia, M., 2006. Specificity of the peroxisome proliferation response in mussels exposed to environmental pollutants. *Aquat. Toxicol.* 78(1), S117-23.

Cancio, I., Orbea, A., Völkl, A., Fahimi, H.D., Cajaraville, M.P., 1998. Induction of peroxisomal oxidase in mussels: comparison of effects of lubricant oil and benzo(a)pyrene with the typical peroxisome proliferators on peroxisome structure and function in *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149, 64-72.

Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metal effects on glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67-76.

Chen, R.W., Ganther, H.E. and Hoekstra, W.G., Studies on the binding of methylmercury by thionein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51 (1973) 383-390.

Dagnino A, Allen JJ, Moore MN, Broeg K, Canesi L, Viarengo A, 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12, 155-172.

Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and signal transduction molecule (cAMP) in tissue of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 56, 443-470.

Dailianis, S., Kaloyianni, M., 2007. Role of cAMP in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis* as a potent biomarker of cadmium in marine environments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 371-378.

Da Ros L, Nesto N, 2005. Cellular alterations in *Mytilus galloprovincialis* (LMK) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) as biomarkers of environmental stress: Field studies in the Lagoon of Venice (Italy). *Environment International* 31, 1078-1088.

Depledge M (1989). The rational basis for detection of the early effects of marine pollutants using physiological indicators. *Ambio.*, 18: 301-302.

Diaz Enrich, M.J., Iburguren, I., 2003. Implication of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, guanosine 3',5'-cyclic monophosphate, adenosine 5'-mono-, di-, and triphosphate and fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of the glycolytic pathway in relation to the gametogenic cycle in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Mol. Cell. Biochem.* 252, 339-45.

Domouhtsidou GP, Dimitriadis VK. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ. Pollut.* 2001;115:123–37.

Donnini F, 2003. Utilizzo di biomarker e indagini geochimiche integrate per la valutazione della qualità ambientale di una laguna costiera, la Pialassa Baiona. Tesi di Laurea in Scienze Ambientali, Università di Bologna in Ravenna

Donnini F., Dinelli E., Sangiorgi F., Fabbri E., 2007. A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). *Environment International* 33, 919-928

Eertman RHM, Wagenvoort AJ, Hummel H, Small AC, 1993. “Survival in air” of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress.

Ellman GL, Courtney KO, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961;7:88–95.

Fabbri D, Felisatti O, Lombardo M, Trombini C, Vassura I. The Lagoon of Ravenna Italy: characterisation of mercury-contaminated sediments. *Sci. Total Environ.* 1998;213:121–8.

Fabbri D, Trombini C, Vassura I. Reading the chronicle of past industrial pollution in the sediments of a Coastal Lagoon, Pialassa Baiona, Ravenna. Presented as an invited lecture at the SCI 2000, XX Congresso Nazionale SCI, Rimini 4–9/06/2000; 2000.

Fabbri D, Gemelli S, Langone L, Miserocchi S, Trombini C, Vassura I. Anthropogenically derived mercury in sediments of Pialassa Baiona, Ravenna Italy. *J. Anal. Environ. Chem.* 2001a;91:563–75.

Fabbri D., Baravelli V., Giannotti K., Donnini F., Fabbri E. 2006. Bioaccumulation of cyclopenta[cd]pyrene and benzo[ghi]fluoranthene by mussels transplanted in a coastal lagoon. *Chemosphere.* 64, 1083-1092.

Fabbri, E., Capuzzo, A., 2006. Adenylyl cyclase activity and its modulation in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cr⁶⁺ and Cu²⁺. *Aquat. Toxicol.* 76, 59-68.

Federal Water Pollution Control Act, USA, 1972.
<http://www.epa.gov/history/topics/fwpc/>

Foschini F (2001). Analisi di Idrocarburi Policiclici Aromatici Pirogenici in Ambienti Lagunari. Tesi di Laurea in Scienze Ambientali, Università di Bologna in Ravenna.

Fossi MC (1998). Biomarkers: strumenti diagnostici e prognostici di salute ambientale. In: Vighi e Bacci (eds), *Ecotossicologia*, UTET: 60-73.

Fossi MC (2000). Biomarkers: strumenti di diagnosi e prognosi ambientale. Rosini editrice.

Franzini M, Leoni L, Saitta M (1972). A simple method to evaluate the matrix effects in X-Ray fluorescence analysis. *X-Ray Spectrom.* 1, 151-154.

Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P., 2001. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161(3), 201-211.

Franzellitti, F., Fabbri, E., 2006. Cytoprotective responses in the Mediterranean mussel exposed to Hg²⁺ and CH₃Hg⁺. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351(3), 719-25.

Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* 10(5), 360-375.

Frasco, M.F., Colletier, J.-P., Weik, M., Carvalho, F., Guilhermino, L., Stojan, J., Fournier, D., 2007. Mechanism of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *FEBS J.* 274, 1849-1861.

Fraternali M., 2004. Utilizzo di *Chamelea gallina* come organismo sentinella ai fini del biomonitoraggio mediante biomarker di una laguna costiera, la Pialassa Baiona. Tesi di Laurea in Scienze Ambientali, Università di Bologna in Ravenna.

Gagnon, C., Fisher, N.S., 1997. Bioavailability of sediment-bound methyl and inorganic mercury to a marine bivalve. *Environ. Sci. Technol.* 31(4), 993-8.

Geret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno MJ, Cosson RP, 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 15, 61-66.

Giani M, Gabellini M, Pellegrini D, Costantini S, Beccaloni E, Giordano R (1994). Concentration and partitioning of Hg, Cr and Pb in sediments of dredge and disposal sites of the northern Adriatic Sea. *Sci Total Environ* 158: 97-112.

Giannaccini, G., Betti, L., Palego, L., Chelli, B., Gallo, A., Pirone, A., Fagiani, O., Bertellotti, S., Lucacchini, A., 2004. In vitro effects of lead ions on peripheral benzodiazepine receptors and adenylyl cyclase activity in the mantle of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* C137, 197-206.

Gill, T.S., Tewari, H., Pande, J., 1990. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* C97(2), 287-292.

Hellow J and Law RJ, 2003. Stress on stress response of wild mussels, *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*, as an indicator of ecosystem health. *Environmental Pollution* 126, 407-416.

Kljaković-Gašpić, Z., Odžaka, N., Ujević, I., Zvonarića, T., Horvatc, M., Barića, A., 2006. Biomonitoring of mercury in polluted coastal area using transplanted mussels. *Sci. Total Environ.* 368, 199-209

Leiva-Presa, A., Capdevila, M., Cols, N., Atrian, S., Gonzàles-Duarte, P., 2004. Chemical foundation of the attenuation of methylmercury(II) cytotoxicity by metallothioneins. *Eur. J. Biochem.* 271, 1323-1328.

Langstone WJ, Bebianno MJ, Burt G (1998). Metabolic pathways in marine invertebrates. In: Langstone WJ, Bebianno MJ (eds). *Metal metabolism in aquatic environments*. London: Chapman and Hall 209-283.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

Lushchak IV, Lushchak LP, Mota AA, Hermes-Lima M, 2001. Oxidative stress and antioxidant defences in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am J Ohysiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280, R100-R107.

McCarthy F, Shugart LR (1990). *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Pub., Printed in the United States.

Mediterranean Wetland Iniziative, 1991. <http://www.medwet.org/>

Mikac, N., Kwokal, Ž., Martinčić, D., Branica, M., 1996. Uptake of mercury species by transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* under estuarine conditions (Krka river estuary). *Sci. Total Environ.* 184, 173-182.

Miserocchi S, Langone L, Guerzoni S (1993). The fate of Hg contaminated sediments of the Ravenna Lagoon (Italy): final burial or potential remobilisation. *Water Science and Technology* 28: 349-358

Monserrat JM, Martinez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CMG et al., 2006. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 146, 221-234.

Moore MN (1991). Lysosomal changes in the response of molluscan hepatopancreatic cells extracellular signals. *Histochem J* 23(10): 495-500.

NRC, 1989. *Biologic markers in reproductive toxicology*. National Academy Press

Pearse AGE. *Histochemistry, theoretical and applied*, vol. 2. London: Churchill-Livingstone; 1972.

Pfeifer S, Schiedek D, Dipner JW, 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *J of Experimental Marine Biology and Ecology* 320, 93-103.

Piano A, Asirelli C, Caselli F, Fabbri E (2002). Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chap 7*: 250-257.

Raftopoulou, E.K., Dailianis, S., Dimitriadis, V.K., Kaloyianni, M., 2006. Introduction of cAMP and establishment of neutral lipids alterations as polluted biomarkers using the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Correlation with a battery of biomarkers. *Sci. Total Environ.* 368, 597-614.

Ramsar Convention, 1977. <http://www.ramsar.org/>

Regoli F, Principato G. 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31:143_164.

Rickwood CJ, Galloway TS. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquat. Toxicol.* 2004;67:45–56.

Riisgard, H.U., Bjornestad, E., Mohlenberg, F., 1987. Accumulation of cadmium in the mussel, *Mytilus edulis*: kinetics and importance of uptake via food and sea water. *Mar. Biol.* 96, 349.

Rodriguez-Ortega MJ, Alhama J, Funes V, Romero-Ruiz A, Rodriguez-Ariza A, Lopez-Barea J, 2002. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamelea gallina* from South-Spanish littoral. *Environ Toxicol Chem* 21: 542 –549.

Soprani S, Ricci C, Farina D, Tarroni C, Zanetti S (1994) Indagine sulle caratteristiche delle acque. In: Soprani S, Ricci C (eds) *Analisi dello stato ambientale e sanitario nelle valli ravennati*. La Pialassa Baiona. Azienda U.S.L., Dipartimento dei Servizi di Prevenzione, Ravenna: 201-254

Tamburin I., 2002. Valutazione dello stato fisiologico di organismi sentinella (*Tapes philippinarum* e *Mytilus galloprovincialis*) mediante l'uso di biomarkers. Tesi di Laurea in Scienze Ambientali, Università di Bologna in Ravenna

Tanguy A, Mura C, Moraga D. Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquat Toxicol* 2001;55:35 –47.

Terman A., Brunk U.T. (2004) Lipofuscin. *Int J Biochem and Cell Biol*, 36: 1400-1404.

UNEP/RAMOGGE: Manual on the biomarkers recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens, 1999.

Ui J, Kitamura S (1971) Mercury in the Adriatic. *Marine Pollution Bulletin* 2: 56-58

Valbonesi P, Sartor G, Fabbri E (2003). Characterisation of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and the possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Sci Tot Environ* 312: 79-88.

Valdez Domingos FX, Azevedo M, Silva MD, Randi MAF, Freire CA; Silva de Assis HC, Oliveira Ribeiro CA, 2007. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oyster as bioindicators. *Environmental Research* 105, 350-363.

Viarengo A, Moore MN, Mancinelli G, Mazzucotelli A, Pipe RK and Farrar SV (1987). Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenathrene. *Mari Biol* 94, 251-257

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R. A simple spectrophotometric method for MT evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 1997;44:69–84.

Viarengo A, Pons G, Fabbri R, Mozzone S, Evangelisti V, Capri F (1998). Evaluation of the physiological status of *Chamelea gallina* using biomarkers. *Biol Mar Medit.* 5: 1-10

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfili, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46(2), 407-417.

Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A, 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146 (2007) 281–300

Viarengo A, Nott JA (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 104C: 355-372.

Wright DA, 1995. Trace-metal and major ion interactions in aquatic animals. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 8 – 18.

Zaccaron da Silva A, Zanette J, Ferriera JF, Guzenski J, Marques MRF, Bainy ACD, 2005. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusco, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 276-382.

Zorita I, Ortiz-Zarragoitia M, Soto M, Cajaraville MP. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes Norway): an integrated biochemical histochemical and histological study. *Aquat. Toxicol.* 2006;78S:109–16.