

Progetto - Projet

**GEREMIA - Gestione dei reflui per il miglioramento delle acque portuali**



**PRODOTTO T2.2.2: METODOLOGIA DI INDAGINE DA APPLICARE AI BIOINDICATORI E METALLI**

**LIVRABLE T2.2.2: MÉTHODOLOGIE DE ÉTUDE À APPLIQUER AUX BIOINDICATEURS ET AUX MÉTAUX**

Partner responsabile - Partner responsable : Université de Toulon

Partner contributori - Partenaires contributeurs : Università di Genova, Servizi Ecologici Porto di Genova, Autorità di Sistema Portuale del Mar Ligure Orientale, Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale, Istituto per lo studio degli impatti Antropici e Sostenibilità ambiente marino.

Nome del prodotto	Redatto da:	Verificato da:	Validato da:
T2.2.2 - Metodologia di indagine da applicare ai bioindicatori e metalli	Anna Reboa, Laura Cutroneo (UNIGE), Valentina Vitiello (ISPRA)	Marco Capello (UNIGE), Maria Elena Piccione (ISPRA)	Alberta Mandich (UNIGE), Véronique Lenoble (UTLN)
<b>Data :</b>	23/11/2018	19/02/2019	25/02/2019

**Descrizione del Prodotto:** Sono indicate le metodologie di indagine da applicare ai bioindicatori per le analisi sul bioaccumulo e sui biomarkers (mitili e mugillidi) ed è proposta una metodologia innovativa per la quantificazione dei metalli.

**Description du livrable:** Les méthodes d'études à appliquer aux bioindicateurs de la bioaccumulation et aux biomarqueurs (moules et mugillides) sont indiquées et une méthode innovante de quantification des métaux est proposée.

### **Sintesi**

Il progetto GEREMIA prevede, in affiancamento ai test ecotossicologici, un ulteriore approccio relativo alla componente biotica delle aree di indagine, ovvero l'analisi dei biomarcatori, cioè eventuali modificazioni avvenute all'interno degli organismi viventi in seguito a contatto e interazione con contaminanti ambientali o agenti stressanti di vario tipo. Per quando riguarda gli esemplari di Mugilidae, verrà effettuata un'indagine istopatologica di branchie e fegato, atta a osservare alterazioni fisiologiche in tali tessuti. Inoltre, verrà prodotto, per ciascun esemplare, uno striscio ematico da analizzare per verificare il danno genetico, sulla base della frequenza dei micronuclei. Infine, l'analisi del sistema epatico enzimatico P450, in concomitanza con l'analisi dei metaboliti biliari, fornirà ulteriori indicazioni sull'attività detossificante del fegato. Le analisi chimiche sui pesci verteranno sulla quantificazione di metalli e idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei tessuti di fegato e muscolo. L'indagine da effettuarsi sui mitili verterà anch'essa sia su analisi di biomarcatori che chimiche. I biomarcatori da esaminare su esemplari di *Mytilus galloprovincialis*, prelevati da un allevamento e trapiantati per circa 4-5 settimane nell'area di studio, sono i seguenti: stabilità delle membrane lisosomiali, attività di fagocitosi, accumulo di lipofuscina e di lipidi neutri, contenuto di malondialdeide (MDA), proliferazione perossisomiale, danno genotossico, inibizione dell'acetilcolinesterasi (AChE), sintesi delle metallotioneine, stimolazione di enzimi antiossidanti. In parallelo, verranno eseguite analisi chimiche sugli organismi, in relazione al loro contenuto in metalli pesanti, IPA, policlorobifenili

(PCB), tributilstagno, e pesticidi organoclorurati. Sempre all'interno di questo prodotto viene illustrato il procedimento per l'analisi di rame (Cu) in tracce nella colonna d'acqua. In questo caso il campione verrà prelevato tramite bottiglia Niskin e il contenuto in Cu verrà analizzato tramite ICP-MS. Inoltre, al fine di ottenere una migliore caratterizzazione, verrà analizzato anche il contenuto e la composizione della sostanza organica nel campione, misurando il contenuto di carbonio organico disciolto (TOC-VCSH) e azoto e zolfo (misurazione CHNS). Infine, a partire dal campione di acqua prelevato, sarà effettuata anche una caratterizzazione dell'abbondanza e della diversità delle comunità microbiche presenti, mediante citometria a flusso. Ad integrare queste informazioni, verrà anche effettuata un'analisi molecolare di quest'ultimi campioni tramite estrazione del DNA e PCR, al fine di analizzare la diversità tassonomica e prevedere la diversità funzionale delle comunità, concentrandosi soprattutto sull'identificazione di alcuni gruppi fitoplanctonici: *Prochlorococco*, *Ostréococcus*, *Bathycoccus*, *Micromonas*. Tutte queste indagini permetteranno di ottenere un chiaro quadro descrittivo del grado di impatto prodotto dai principali inquinanti che sono presenti nella colonna d'acqua dei bacini portuali sulla comunità biotica.

## Synthèse

Le projet GEREMIA fournit, en plus des tests écotoxicologiques, une autre approche concernant la composante biotique des zones d'étude, c'est-à-dire l'analyse des biomarqueurs, éventuelles modifications survenues à l'intérieur d'organismes vivants suite à un contact et une interaction avec facteurs de stress de différents types. En ce qui concerne les spécimens de Mugilidae, une étude histopathologique des branchies et du foie sera effectuée, ce qui est approprié pour observer les altérations physiologiques de ces tissus. En outre, un frottis sanguin sera produit pour chaque échantillon à analyser afin de vérifier les dommages génétiques, sur la base de la fréquence des micronoyaux. Enfin, l'analyse du système hépatique de l'enzyme P450, ainsi que celle des métabolites biliaires, fourniront d'autres indications sur l'activité détoxifiante du foie. Les analyses chimiques des poissons auront comme objet la quantification des métaux et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les tissus hépatiques et musculaires. La

recherche sur les moules sera concentrée également sur des analyses de biomarqueurs et chimiques. Les biomarqueurs à examiner sur des échantillons de *Mytilus galloprovincialis*, prélevés dans une mytiliculture et transplantés pour 4-5 semaines dans la zone d'étude, sont les suivants: stabilité des membranes lysosomales, activité de la phagocytose, accumulation de lipofuscine et de lipides neutres, contenu malondialdéhyde (MDA), prolifération des peroxysomes, dommages génotoxiques, inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), synthèse des métallothionéines, stimulation des enzymes antioxydantes. Parallèlement, des analyses chimiques seront effectuées sur les organismes, en fonction de leur teneur en métaux lourds, HAP, biphényles polychlorés (BPC), tributylétain et pesticides organochlorés. Ce produit contient également la procédure d'analyse des traces de cuivre (Cu) dans la colonne d'eau. Dans ce cas, l'échantillon sera prélevé avec une bouteille Niskin et la teneur en Cu sera analysée par ICP-MS. En outre, afin d'obtenir une meilleure caractérisation, la teneur et la composition de la substance organique de l'échantillon seront également analysées, en mesurant la teneur en carbone organique dissous (TOC-VCSH) et en azote et en soufre (mesure CHNS). Enfin, à partir de l'échantillon d'eau prélevé, une caractérisation de l'abondance et de la diversité des communautés microbiennes présentes, par cytométrie en flux, sera également réalisée. Pour intégrer ces informations, une analyse moléculaire de ces derniers échantillons sera également réalisée par extraction d'ADN et PCR, afin d'analyser la diversité taxonomique et de prédire la diversité fonctionnelle des communautés, en se concentrant avant tout sur l'identification de certains groupes de phytoplancton: *Prochlorococco*, *Ostréococcus*, *Bathycoccus*, *Micromonas*. Toutes ces investigations permettront d'obtenir une image descriptive claire d'impact des principaux polluants présents dans la colonne d'eau des bassins portuaires sur la communauté biotique.

## Indice

1 Introduzione.....	1
2. Pesci come bioindicatori .....	2
2.1. Metodologia di indagine da applicare ai pesci .....	3
2.1.1 Protocollo da applicare durante la fase di campionamento .....	5
2.2.2 Protocollo da applicare in laboratorio.....	6
2.3 Analisi dei contaminanti nei tessuti dei pesci.....	13
3. Mitili come bioindicatori.....	14
3.1 Metodologia di indagine da applicare ai mitili .....	16
4. Metalli .....	29
4.1 Contaminazione in metalli in tracce.....	29
4.2 I microorganismi marini come indicatori dello stato del mezzo .....	31
Bigliografia.....	34

## 1 Introduzione

Il biomonitoraggio è un metodo di indagine di un determinato sito, che viene applicato senza alterare l'ambiente osservato e perciò in condizioni naturali: osservando lo stato di salute di organismi selezionati, detti bioindicatori, che vivono nell'area indagata, si può risalire alle condizioni reali in cui si trova l'ambiente esterno, correlando la presenza di inquinanti o agenti stressanti con gli effetti identificati dalle analisi sui suddetti organismi (Pretti e Cognetti-Varriale, 2001; Gupta e Singh, 2011).

Il biomonitoraggio offre, quindi, dei vantaggi:

- 1) rivela la presenza di alterazioni sub-letali, quindi prima che lo stato di salute degli organismi sia irrimediabilmente compromesso;
- 2) riflette la presenza di un elemento di stress nell'ambiente esterno;
- 3) è un metodo a elevata sensibilità;
- 4) rileva la tossicità cronica degli inquinanti anche quando presenti a livelli analiticamente non osservabili o quando l'esposizione è già cessata (Zhou *et al.*, 2008).

È necessario, però, affiancare a questo metodo quello delle analisi chimiche, che devono essere effettuate sia sul comparto biotico che sull'ambiente circostante. Questo approccio in parallelo è indispensabile per comprendere quali tipi di contaminanti sono presenti e hanno realmente interagito con gli organismi viventi, essendo quindi possibile causa di una eventuale alterazione del loro stato di salute (Zhou *et al.*, 2008; Gupta e Singh, 2011). Il biomonitoraggio, quindi, è un utile metodo per individuare un cambiamento nel tempo delle condizioni eventualmente nocive dell'ambiente studiato, o per confrontare un'area potenzialmente compromessa, come le acque portuali, con un sito controllo (Ravera, 2001).

La scelta delle matrici e dei parametri fisico-chimici, ecotossicologici e biologici da analizzare per la valutazione della qualità delle acque portuali e la messa a punto di strumenti di governance per la loro gestione (Prodotto T2.2.1) è stata condotta sulla base dell'analisi delle potenziali pressioni a carico di questa tipologia di ambienti e prendendo in considerazione le principali normative comunitarie, nazionali (italiane e francesi) e regionali che trattano e forniscono indicazioni sulla modalità di monitoraggio e gestione delle acque (Prodotto T1.1.1).

La valutazione della qualità delle acque portuali deve essere affrontata tenendo presente che gli inquinanti inorganici ed organici immessi in acqua, una volta adsorbiti o incorporati nel materiale particellato sospeso (biotico e/o abiotico), tendono a sedimentare sul fondale entrando in contatto con organismi bentonici o altre tipologie di organismi attraverso la catena alimentare (Ciborowski e Corkum, 1988; Giesy *et al.*, 1988; Schloesser, 1988; Giesy e Hoke, 1989; 1990).

Inoltre, dal sedimento gli inquinanti possono ritornare nuovamente disponibili per fenomeni di risospensione e rilascio (Lee *et al.*, 1978; Jones e Lee, 1978; Malueg *et al.*, 1983; Nebeker *et al.*, 1983).

Ne deriva, quindi, la necessità di effettuare le indagini non soltanto sulle matrici acqua e sedimento, ma anche sul comparto biotico che costituisce un elemento fondamentale per la valutazione della qualità delle acque portuali.

## **2. Pesci come bioindicatori**

Per poter essere considerato un buon bioindicatore, un organismo deve possedere determinate caratteristiche: 1) capacità di accumulare inquinanti a livelli elevati, senza incorrere in un effetto letale; 2) non eccessiva mobilità, in modo da rappresentare l'ambiente interessato; 3) abbondante e ampia distribuzione, per poter effettuare campionamenti ripetuti; 4) ciclo di vita lungo; 5) anatomia, fisiologia e etologia conosciute; 6) facile campionamento e trattamento in laboratorio 7) ruolo ecologico e posizione nella rete trofica di rilievo; 8) capacità di mostrare una relazione dose-effetto. Data la difficoltà di disporre di un organismo che abbia tutte queste caratteristiche, ne deve essere selezionato uno che ne rispecchi la maggior parte in base allo scopo del monitoraggio (Zhou *et al.*, 2008). I pesci rivestono sicuramente un ruolo ecologico primario, trovandosi nella parte più alta della piramide alimentare, e funzionando quindi come trasportatori di energia da un livello trofico all'altro; inoltre, sono un'importante fonte di nutrimento per l'uomo, acquisendo perciò anche un forte valore commerciale (El-Moselhy *et al.*, 2014). In aggiunta, i pesci possiedono anche altre delle caratteristiche di un buon bioindicatore, che li rendono una scelta adeguata per uno studio di biomonitoraggio: anatomia, fisiologia e etologia tra le meglio conosciute e studiate in letteratura in ambiente acquatico; cicli

vitali lunghi; facilità di campionamento; ampio range di tolleranza ai cambiamenti ambientali e capacità di bioaccumulo degli inquinanti; facile identificazione; ampia distribuzione (Zhou *et al.*, 2008; Murtala *et al.*, 2012; Arockia Vasanthi *et al.*, 2013). I mugilidi rivestono un ruolo ecologico importante negli ambienti marini costieri, in quanto, pur essendo specie pelagiche, mantengono un contatto molto stretto e frequente con il sedimento, filtrando sia lo strato superficiale dei fondali, sia il particolato in sospensione nella colonna d'acqua (Arockia Vasanthi *et al.*, 2013). In particolare, *Mugil cephalus* (cefalo comune o muggine) è particolarmente frequente nelle vicinanze della costa, così come in ambienti portuali, dove si ritrovano esemplari che formano banchi estesi. Inoltre, si tratta di una specie molto utilizzata in studi di monitoraggio o tossicologici, e perciò ben documentata in letteratura, grazie al suo ampio range di tolleranza a variazioni dei parametri ambientali. Infine, questa specie ha un importante valore nutrizionale e gastronomico, tale da attribuirle un forte interesse commerciale (Ben Ameer *et al.*, 2012). Questi fattori rendono *Mugil cephalus* il candidato ideale per uno studio di monitoraggio sulla qualità delle acque portuali.

## 2.1. Metodologia di indagine da applicare ai pesci

Le linee di evidenza selezionate da applicare ai pesci come bioindicatori sono: l'analisi dei micronuclei, l'istopatologia di branchie e fegato, l'analisi dell'attività enzimatica del citocromo P450 e l'analisi dei metaboliti biliari. Tali metodologie sono state scelte in quanto forniscono indicazioni dirette e reali sull'effettivo stato di salute degli esemplari campionati, con conseguente effetto su popolazioni e comunità, che è lo scopo principale di questo tipo di indagine (Au, 2004). L'analisi di *biomarker* come l'attività enzimatica del citocromo P450 è molto interessante per studiare la risposta fisiologica degli organismi target all'esposizione a sostanze organiche xenobiotiche come IPA e PCB. Si aggiunge in parallelo l'analisi dei metaboliti biliari, che ha un ruolo complementare nel caratterizzare l'esposizione e il metabolismo dei bioindicatori rispetto agli IPA (Gorbi e Regoli, 2004). Tuttavia, solo questo tipo di analisi non è sufficiente perché non fornisce risposte precise su come vengono alterate le capacità di sopravvivenza dei bioindicatori, trattandosi di conseguenze molto variabili e non definitive (Poleksić *et al.*, 2010). Il danno al materiale genetico, come quello da cui deriva la presenza dei



micronuclei, è invece una conseguenza grave chiaramente interpretabile anche se non specifica, perché la genotossicità compromette senza alcun dubbio il funzionamento delle cellule in cui si verifica, portando anche a effetti ereditabili e collegabili a un declino delle popolazioni (Suarez Rocha *et al.*, 2009). Similmente, l'istopatologia fornisce la prova che l'esposizione a elementi di stress presenti in ambiente abbia alterato la struttura di un tessuto, e di conseguenza il funzionamento dell'organo che va a costituire (Giari *et al.*, 2008). La scelta dei tessuti da esaminare è ricaduta su branchie e fegato, in quanto si tratta di due organi fondamentali per la sopravvivenza dei pesci. Le branchie sono un organo multifunzionale, deputato non solo alla respirazione, ma anche a: ione e osmo-regolazione, bilanciamento acido-base, escrezione di prodotti azotati, scambio termico, produzione di muco (Au, 2004). Inoltre, le branchie presentano un tessuto di superficie molto esteso e che prende diretto contatto con l'ambiente esterno e quindi con gli eventuali elementi dannosi in esso presenti (Abrahamson, 2007; Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007). Il fegato, d'altra parte, è l'organo che principalmente svolge un ruolo di trasformazione e detossificazione delle molecole sia endogene che esogene, e quindi target diretto dei contaminanti ambientali, che qui si accumulano facilmente grazie alla loro lipofilicità (Abdel-Moneim *et al.*, 2012). Infine, questi due tessuti sono i più utilizzati in studi di monitoraggio che sfruttano l'istopatologia come *biomarker*, in quanto il grande interesse verso i suddetti organi ha permesso di sviluppare metodi di analisi semiquantitativi che forniscono un indice numerico, e si prestano quindi alla creazione di un protocollo standardizzato (Bernet *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2012; Van Dyk *et al.*, 2012). Il protocollo presentato in questo documento è basato sulla precedente letteratura, e sfrutta gli endpoint sia più significativi che più facilmente identificabili, cercando di eliminare il principale svantaggio dell'istopatologia, ovvero una diversa interpretazione delle alterazioni da parte di operatori diversi, a secondo della loro esperienza. Inoltre, si tratta di metodi applicabili senza l'utilizzo di macchinari di uso complesso, e quindi facilmente replicabili. Infine, la scelta delle linee di evidenza è ricaduta su *biomarker* non specifici o quasi, proprio perché, in ambiente non controllato, sono presenti contaminanti di varia tipologia e sotto forma di miscele, che agiscono quindi con effetti molto variabili e di difficile interpretazione sulla salute degli organismi esposti (Poleksić *et al.*, 2010). Perciò, utilizzando linee di evidenza non

specifiche e che riflettano l'effettiva alterazione delle capacità di sopravvivenza dei pesci, si può indagare la condizione di contaminazione anche di ambienti che presentano elementi di stress diversi.

### **2.1.1 Protocollo da applicare durante la fase di campionamento**

Gli esemplari di *Mugil cephalus* sono pescati tramite lenza o retino e mantenuti in mare, all'interno di reti, fino al momento del sacrificio, per evitare sofferenza dovuta a cambio di temperatura o anossia. I pesci devono essere di dimensioni simili, al fine di avere esemplari di un range ristretto di età, e con equa distribuzione di genere (possibilmente 50% maschi e 50% femmine). Il sacrificio deve avvenire il più velocemente possibile, evitando inoltre di rovinare i tessuti di interesse: il metodo più efficace risulta essere un colpo secco e rapido all'altezza del cervello, seguito da dislocazione cervicale. Ogni esemplare deve essere fotografato, pesato e deve esserne misurata la lunghezza totale (punta muso-fine coda) e standard (punta muso-parte centrale dove la coda si divide).

Un campione di sangue periferico deve essere prelevato dalla branchia o dal peduncolo caudale per ciascun pesce, con siringa eparinizzata (provvedendo a bagnare le pareti della siringa con eparina sodica prima del campionamento). Per ogni campione, una goccia di sangue deve essere strisciata sul vetrino copri-oggetto, etichettato adeguatamente, e lasciata asciugare all'aria per almeno 1-2 ore.

Muniti di strumenti da dissezione (forbici, bisturi, pinzette), si procede al prelievo degli organi necessari per l'istologia, ovvero fegato e branchia. Gli organi devono essere immediatamente fissati, ponendone una porzione all'interno di un barattolino di plastica etichettato (capienza ~50 mL con tappo a vite e sottotappo), contenente una soluzione di Liquido di Bouin e acido acetico (20:1) in quantità necessaria a tenere i campioni completamente immersi. La soluzione deve essere preparata immediatamente prima del campionamento e, fino a tale momento, è necessario conservare il solo acido acetico a temperature superiori ai 17 °C, per evitarne il congelamento. Si procede prima al prelievo della branchia, campionando sempre la seconda e sempre dallo stesso lato del pesce, utilizzando gli appositi strumenti ed evitando il più possibile il contatto con i filamenti, per non creare un'alterazione fittizia del tessuto. Se la branchia è

piccola, si deve fissare l'intero arco, altrimenti fissarne la parte centrale. Tutte le restanti branchie devono essere prelevate e messe in ghiaccio, conservandole poi a -20 °C, per le analisi chimiche: metà verranno poste in *falcon* per le analisi sui metalli e metà verranno chiuse in pacchetti di alluminio per le analisi degli IPA. Successivamente, si effettua un leggero e piccolo taglio con il bisturi, anteriormente e perpendicolarmente alla pinna anale, stando attenti a non intaccare i tessuti interni; si inserisce la punta della forbice nel foro e si procede tagliando superficialmente verso il dorso e fino all'altezza della pinna laterale, per rimuovere interamente la pelle da un lato fino a scoprire gli organi, potendo adagiare il pesce sul lato non aperto. A questo punto, si preleva l'intero fegato, maneggiandolo con cautela per evitare l'apertura della cistifellea. Si procede prima di tutto alla rimozione della cistifellea, da congelare in *cryotube* con azoto liquido o ghiaccio secco e da conservare a -80 °C per la successiva analisi dei metaboliti biliari. Se si verificasse l'apertura della cistifellea, occorre prelevare quanta più bile possibile con una pipetta e congelarla nello stesso modo. Si passa poi al fegato e se ne taglia con delicatezza una parte centrale, che non superi i ~5 mm di spessore, da fissare all'interno del barattolo per l'istologia insieme alla branchia già prelevata. Inoltre, una piccola porzione di fegato (~500 mg), in duplicato, deve essere congelata in *cryotube* etichettata, con azoto liquido o ghiaccio secco, e conservata a -80 °C, per effettuare successivamente l'analisi dell'attività enzimatica del citocromo P450. La restante porzione di fegato deve essere prelevata e messa in ghiaccio, conservandola poi a -20 °C, per le analisi chimiche: metà del fegato rimanente deve essere posta in *falcon* per le analisi sui metalli e l'altra metà deve essere chiusa in pacchetti di alluminio per le analisi degli IPA. La testa può essere anch'essa congelata e conservata per identificare l'età dei pesci tramite analisi degli otoliti.

### **2.2.2 Protocollo da applicare in laboratorio**

Analisi dei micronuclei. I vetrini con gli strisci di sangue devono essere fissati in metanolo per 3 minuti e lasciati asciugare, per poi procedere alla colorazione di Giemsa e provvedere all'analisi dei micronuclei (Suarez Rocha *et al.*, 2009). Le soluzioni per la colorazione di Giemsa si preparano secondo la seguente metodologia: soluzione buffer pH 7.2, diluendo 1 compressa in acqua distillata secondo le istruzioni del produttore; soluzione di colorazione di Giemsa,

diluendo la soluzione azur-eosina-blue di metilene con la soluzione tampone, secondo le istruzioni del produttore.

Si procede con la colorazione di Giemsa, tramite i seguenti passaggi:

- Immersione in soluzione di colorazione di Giemsa diluita: 20 minuti
- Lavaggio in buffer pH 7.2: 1 minuto
- Secondo lavaggio in buffer pH 7.2: 1 minuto
- Asciugatura all'aria

I vetrini così preparati possono essere visionati nell'immediato utilizzando olio da microscopia ad immersione, oppure possono essere conservati previa rapido passaggio in xilene (tipo Bio-Clear, Bio-Optica) e chiusura con mezzo anidro (tipo Eukitt) e coprioggetto.

Per ogni esemplare, devono essere contati 200 eritrociti, considerando:

- Cellule di forma ovale e con citoplasma intatto
- Cellule con nucleo ovale e membrana nucleare intatta
- Micronuclei di grandezza equivalente a non più di un terzo del nucleo
- Micronuclei chiaramente separati dal nucleo

I risultati devono essere riportati in frequenza di cellule con micronuclei sul totale di cellule contate per esemplare.

Analisi istopatologica di fegato e branchie: Dopo 24 h dal campionamento, i campioni di branchia e fegato per l'istologia devono essere trasferiti in etanolo 70%, previo rapido lavaggio in acqua, dove devono rimanere per almeno 24 h, ma possono essere conservati per alcuni mesi. Per procedere all'inclusione è necessario disidratare i campioni in una serie ascendente di etanolo, come descritto:

- 24 h in etanolo 80%
- 1 h in etanolo 90%
- 1 h in etanolo 95%
- 2 passaggi da 30' in etanolo 100%
- 5' in etanolo (100%)/Bio-Clear (1:1)
- 2 passaggi da 1' in Bio-Clear

- 2 passaggi da 1 h in paraffina (Bioplast, Bio-Optica) liquida a 50 °C
- Inclusione in paraffina usando le apposite basi e cassette (Bio-Optica)

È consigliato utilizzare una piastra riscaldante su cui adagiare le basi e cassette durante l'inclusione, per evitare una rapida solidificazione della paraffina. Attenzione alla rimozione di eventuali bolle d'aria all'interno della base, che creerebbero fratture al momento del taglio.

Una volta asciutti, la base dei campioni inclusi è rimossa e si procede al taglio di sezioni di spessore 4 µm, utilizzando un microtomo. Sono preparati almeno tre vetrini per ogni campione, con 3 o 4 sezioni contigue l'uno.

I vetrini devono essere lasciati asciugare completamente e al riparo dalla polvere, prima di procedere con la colorazione di almeno un vetrino a campione in Ematossilina/Eosina, secondo i seguenti passaggi:

- 2 steps of 1/2 h ciascuno in Bio-Clear
- Idratazione in serie discendente di etanolo, con passaggi di ~ 2' l'uno (2 passaggi in etanolo 100%, 2 passaggi in etanolo 95%, 1 passaggio in etanolo 90%, 1 passaggio in etanolo 80%)
- Lavaggio in acqua del rubinetto
- Passaggio in Ematossilina per ~5' (per immersione o apponendo delle gocce a coprire le sezioni)
- Lavaggio in acqua del rubinetto corrente
- Lavaggio in acqua distillata
- Passaggio in Eosina per ~1' (per immersione o apponendo delle gocce a coprire le sezioni)
- Lavaggio in acqua distillata (molto rapido per evitare la rimozione dell'eosina)
- Disidratazione in serie di etanolo con passaggi da ~30" l'uno (1 passaggio in etanolo 80%, 1 passaggio in etanolo 90%, 2 passaggi in etanolo 95%, 2 passaggi in etanolo 100%)
- 10' in etanolo (100%)/Bio-Clear (1:1)
- 2 passaggi da ~10' l'uno in Bio-Clear
- Montaggio con mezzo anidro (tipo Eukitt, Bio-Optica) e copri-oggetto
- Lasciare asciugare all'aria

Una volta asciutti, si procede all'analisi tramite osservazione con fotografie al microscopio ottico, utilizzando i seguenti protocolli.

### FEGATO

Verrà utilizzato il protocollo modificato a partire da Bernet *et al.* (1999), con aggiustamenti da Richardson *et al.* (2010) e Van Dyk *et al.* (2012).

Per ogni esemplare, si analizza un vetrino con colorazione Ematossilina/Eosina e per ogni campione, si analizzano 9 campi *random* della sezione (ingrandimento 20x).

Le alterazioni, osservate per ogni campo, sono:

- Congestione dei vasi ( $w=1$ )
- Emorragia ( $w=1$ )
- Centri di melanomacrofagi ( $w=1$ )
- Infiltrazione di granulociti ( $w=2$ )
- Steatosi ( $w=1$ )
- Ialinizzazione ( $w=1$ )
- Hydropic change ( $w=1$ )
- Perdita della struttura a cordoni ( $w=1$ )
- Degenerazione dello stroma epatico ( $w=1$ )
- Necrosi ( $w=3$ ),

dove il valore  $w$  indica il grado di reversibilità:

1. Alterazione facilmente reversibile al termine dell'esposizione
2. Alterazione moderata, a volte reversibile al termine dell'esposizione
3. Alterazione irreversibile.

Per ogni alterazione, si assegna un punteggio ( $a$ ) a seconda della sua estensione in ogni campo visivo analizzato:

- 0 = non osservata
- 2 = presenza lieve (limitata a singole cellule o a un'area inferiore al 10% del campo)
- 4 = presenza moderata (area che occupa tra il 10% e il 50% del campo)
- 6 = presenza grave (area che occupa oltre il 50% del campo)

Si calcola poi la media del punteggio ( $a$ ) attribuito ad ogni alterazione nei diversi campi della sezione.

Il valore medio del punteggio ( $a$ ) ottenuto per ogni alterazione va moltiplicato per il valore di  $w$  corrispondente. La sommatoria dei valori così ottenuti per ogni alterazione restituisce il valore dell'indice di salute del fegato per ogni esemplare (*Liver Index*).

$$LI = \sum_{alt} (a \cdot w)$$

L'indice così ottenuto permette di confrontare lo stato di salute del fegato di pesci diversi in siti diversi. Le singole alterazioni non possono essere confrontate tra loro una volta attribuito il punteggio  $a$ , per non incorrere in sovra o sottostime. Per poter effettuare tale confronto, e relazionare le singole alterazioni ai dati delle analisi chimiche, è necessario servirsi di semplici dati qualitativi di presenza/assenza delle alterazioni.

## BRANCHIE

Verrà utilizzato il protocollo modificato a partire da Bernet *et al.* (1999) con aggiustamenti da Mitchell *et al.* (2012).

Per ogni esemplare, si analizza un vetrino con colorazione Ematossilina/Eosina e per ogni campione, si analizzano 9 campi *random* della sezione (ogni campo racchiude 10 lamelle secondarie).

Le alterazioni, osservate per ogni campo, sono:

- Congestione dei vasi ( $w=1$ )
- Emorragie o aneurismi ( $w=1$ )
- Infiltrazione di granulociti ( $w=2$ )
- Ipertrofia dell'epitelio delle lamelle secondarie ( $w=1$ )
- Iperplasia dell'epitelio delle lamelle secondarie ( $w=2$ )
- Iperplasia dell'epitelio della lamina primaria ( $w=2$ )
- Accorciamento delle lamelle secondarie ( $w=1$ )
- Fusione completa delle lamelle secondarie ( $w=2$ )
- Lifting dell'epitelio delle lamelle secondarie ( $w=1$ )
- Necrosi ( $w=3$ )

dove il valore  $w$  indica il grado di reversibilità:

1. Alterazione facilmente reversibile al termine dell'esposizione
2. Alterazione moderata, a volte reversibile al termine dell'esposizione
3. Alterazione irreversibile.

Per ogni alterazione, si deve assegnare un punteggio ( $a$ ) a seconda della sua estensione in ogni campo visivo analizzato:

- 0 = non osservata
- 2 = presenza lieve (limitata a singole lamelle o a un'area inferiore al 10% del campo)
- 4 = presenza moderata (area che occupa tra il 10% e il 50% del campo)
- 6 = presenza grave (area che occupa oltre il 50% del campo)

Si calcola poi la media del punteggio ( $a$ ) attribuito ad ogni alterazione nei diversi campi della sezione.

Il valore medio del punteggio ( $a$ ) ottenuto per ogni alterazione va moltiplicato per il valore di  $w$  corrispondente. La sommatoria dei valori così ottenuti per ogni alterazione restituisce il valore dell'indice di salute delle branchie per ogni esemplare (*Gills Index*).

$$GI = \sum_{alt} (a \cdot w)$$

L'indice così ottenuto permette di confrontare lo stato di salute delle branchie di pesci diversi in siti diversi. Le singole alterazioni non possono essere confrontate tra loro una volta attribuito il punteggio  $a$ , per non incorrere in sovra o sottostime. Per poter effettuare tale confronto, e relazionare le singole alterazioni ai dati delle analisi chimiche, è necessario servirsi di semplici dati qualitativi di presenza/assenza delle alterazioni.

Sommando il  $LI$  e il  $GI$  per ogni campione, si ottiene un indice di salute complessiva per ogni individuo ( $I$ ), utilizzabile per il confronto tra esemplari diversi proveniente da siti diversi.

$$I_n = LI_n + GI_n$$



Analisi del citocromo P450: L'induzione del complesso multienzimatico citocromo P450 viene determinata analizzando, in spettrofluorimetria, la formazione di resorufina.

I campioni di fegato vengono omogenati con un rapporto peso:volume di 1:5 in un *working-buffer* composto da tampone K-fosfato 100 mM pH 7.5, KCl 150 mM e acido etilene-diamino-tetracetico (EDTA) 1mM. Gli omogenati ottenuti vengono centrifugati a 12.000 xg per 15 minuti e il sovrantante viene mantenuto in ghiaccio. Al momento della analisi un volume pari a 100  $\mu$ L di sovrantante viene incubato a 30°C in un volume finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM pH 7.5, 7-etoxiresorufina 4  $\mu$ M e NADPH 0.25 mM. Dopo 2-5 minuti, la reazione viene bloccata aggiungendo 2 mL di acetone. Per ciascun campione deve essere preparato un corrispondente "bianco", ottenuto preparando una soluzione di incubazione identica a quella dei campioni ma bloccando la reazione al tempo zero. Sia i campioni che i "bianchi" vengono successivamente centrifugati a 4.000 xg per 5 minuti e il sovrantante prelevato viene letto allo spettrofluorimetro con le coppie di lunghezze d'onda ( $\lambda$ ) di eccitazione a 535 nm e di emissione a 585 nm. L'attività enzimatica viene quantificata in funzione della quantità di resorufina prodotta durante il tempo di reazione. I livelli di resorufina nei campioni vengono quantificati con una retta standard di concentrazioni note di resorufina (0,02-1  $\mu$ M) diluita in tampone K-fosfato 100 mM pH 7.5. I valori di attività vengono riferiti alle proteine contenute nel campione ed espressi in pmoli/minuto/mg di proteine.

Analisi dei metaboliti biliari: Al momento del saggio le cistifellee devono essere scongelate e svuotate dal loro contenuto biliare. Una aliquota di bile viene immediatamente diluita in un rapporto pari o maggiore a 1:1000 in etanolo 50% per le analisi spettrofluorimetriche. Con il metodo della fluorescenza a lunghezza d'onda fissa (FF), il segnale di fluorescenza di un campione viene misurato ad una determinata coppia di lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione, specifica per ciascun tipo di metabolita. Le coppie di lunghezze d'onda ottimali di eccitazione ed emissione sono: 290/335 nm per i metaboliti del naftalene; 341/383 nm per i metaboliti del pirene; 380/430 nm per i metaboliti del benzo[a]pirene. La fluorescenza dei campioni viene misurata alle tre diverse coppie di lunghezze d'onda, e i valori ottenuti vengono quantificati rispetto a tre curve di calibrazione ottenute con standard di 1-OH-naftolo (0.3-1.6

µg/mL) per i metaboliti del naftalene, 1-OH-pirene (0.4-21 ng/mL) per i metaboliti del pirene e benzo[a]pirene (0.5-12 ng/mL) per i metaboliti del benzo[a]pirene. I risultati vengono espressi in metaboliti-tipo µg/mL di bile o mg/mL.

## 2.3 Analisi dei contaminanti nei tessuti dei pesci

### Metalli pesanti

Il contenuto in metalli (Sb, As, Al, Cd, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Pb, Cu, Zn) dei tessuti epatici e muscolari di ciascun esemplare viene quantificato tramite spettroscopia di emissione atomica in plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-OES), tramite i seguenti passaggi:

1. Determinazione del peso umido di ciascun campione
2. Digestione del campione tramite un processo di mineralizzazione con acqua regia (Metodo 3050B corretto con protocollo UNI EN 13657:2004 per campioni organici), il quale richiede:
  - addizione di 9 mL di acido cloridrico (HCl) e 3 mL di acido nitrico (HNO<sub>3</sub>)
  - dopo 24 h a temperatura ambiente, trasferimento in un digestore (*Digi block* ED36S) a 40 °C per ~1 h aggiungendo alcune gocce di perossido di idrogeno puro (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
  - innalzamento della temperatura a 95 °C per ½ h
  - diluizione del campione fino al raggiungimento di 100 mL di volume
3. Determinazione dei metalli in traccia (Metodo 6010D) tramite ICP-OES (Optima 8300)

### Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

L'identificazione e la quantificazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nel muscolo dei pesci vengono effettuate tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Nell'analisi HPLC, i materiali impaccati più usati sono costituiti da particelle di silice chimicamente legate a catene idrocarburiche lineari C18. Vengono utilizzati rivelatori UV e a fluorescenza, generalmente in serie. Il rivelatore a fluorescenza è più sensibile e la sua specificità permette la determinazione degli IPA in presenza di sostanze interferenti non-fluorescenti. Il rivelatore UV a serie di diodi (UV-DAD) consente di confermare

l'identificazione dei picchi cromatografici tramite gli spettri UV acquisiti durante l'eluizione (Bocca et al., 2003).

### 3. Mitili come bioindicatori

Come i pesci, anche i molluschi bivalvi, in particolare le specie tipiche degli ambienti di transizione, possiedono caratteristiche che li rendono un valido strumento per il monitoraggio della contaminazione degli ambienti costieri, nell'ambito di un approccio che integri valutazioni di parametri chimico-fisici con la valutazione degli effetti sull'ecosistema.

In qualità di organismi filtratori, possono accumulare nei loro tessuti numerosi inquinanti inorganici ed organici presenti sia nelle acque (frazione disciolta), sia nel fitoplancton di cui si alimentano, che nelle particelle in sospensione (Bryan e Langston, 1992; Adam e Shorey, 1998; Wang e Fisher, 1999; Byrne e Vesik, 2000). La loro tolleranza ad un'ampia gamma di condizioni ambientali e l'incapacità di regolare la concentrazione tissutale delle sostanze xenobiotiche, per la mancanza di specifici meccanismi biochimici o fisiologici, costituiscono fattori che facilitano il bioaccumulo di esse nei loro tessuti (Viarengo *et al.*, 2007; Girón-Pérez, 2010). La quasi totale sessilità a partire dallo stadio di sviluppo post-larvale e il ciclo vitale lungo rendono inoltre questi organismi rappresentativi degli ambienti che popolano. Di ampia ed abbondante distribuzione nella maggior parte delle zone costiere del mondo (Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville, 2006), i bivalvi sono facilmente reperibili in natura in caso di studi su popolazioni naturali; in alternativa, il loro reperimento è estremamente semplice grazie alla diffusa presenza di allevamenti specializzati nella produzione e commercializzazione a scopi alimentari in questo tipo di organismi. Anatomia, fisiologia e etologia di questi molluschi sono ampiamente conosciute proprio in virtù della loro ampia diffusione in ambiente ed al loro allevamento.

Il campionamento degli organismi dall'ambiente risulta di facile esecuzione, l'identificazione non richiede l'intervento di esperti tassonomi ed anche le metodiche di trattamento per le successive indagini di laboratorio sono ampiamente conosciute.

I bivalvi, inoltre, hanno un ruolo importante nella piramide alimentare poiché costituiscono una importante fonte di nutrimento per l'uomo e sono quindi un possibile veicolo di trasferimento dei contaminanti attraverso la catena trofica.

Queste caratteristiche rendono quindi i bivalvi degli ottimi bioindicatori in studi di bioaccumulo che, sfruttando la loro capacità di concentrare quantità di inquinanti relativamente elevate anche da soluzioni diluite, segnalano la presenza di inquinanti in ambienti nei quali la loro concentrazione nell'acqua è inferiore ai limiti di sensibilità dei metodi analitici comunemente usati (Beone e Ravera, 2003).

Tra i bivalvi più comunemente utilizzati come bioindicatori c'è il mitilo (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck), ampiamente diffuso negli ambienti costieri e allevato anche nel Mediterraneo; tale specie è impiegata per la verifica dei livelli di contaminanti accumulati mediante la metodologia definita *Mussel watch*, sviluppata negli anni '70 (Goldberg, 1975) e applicata in programmi internazionali di monitoraggio per valutare gli andamenti nello spazio e nel tempo delle concentrazioni dei contaminanti nelle regioni costiere ed estuarine (Scarpato *et al.*, 2006; Phillips e Segar, 1986; de Kock e Kramer, 1994; O'Connor *et al.*, 1994). Rispetto alla metodologia messa a punto negli anni '70, quella definita *Mussel Watch Attivo* (Andral, 2004) risulta caratterizzata da alcune innovazioni fondamentali: il trapianto dei mitili avviene in modo altamente standardizzato, utilizzando metodi di posa e recupero veloci ed efficaci; tutti i mitili provengono da allevamenti situati in aree imperturbate risultando omogenei in termini di taglia e stato metabolico; gli organismi vengono trapiantati in gabbie, affondate al di sotto della quota di navigazione riducendone il rischio di perdita connesso alla navigazione ed al vandalismo (Scarpato *et al.*, 2006).

Dopo un definito periodo di mantenimento nell'ambiente oggetto di studio, gli organismi recuperati possono essere utilizzati per la determinazione analitica dei contaminanti bioaccumulati nonché per effettuare indagini a livello molecolare, cellulare, istologico, morfologico e fisiologico allo scopo di verificare eventuali variazioni indotte da uno o più contaminanti; tali alterazioni (*biomarkers*) (Fossi, 2001; Bianchi e Morri, 2003) possono anticipare i cambiamenti nei più alti livelli dell'organizzazione biologica (popolazioni, comunità, ecosistemi) (Sandulli, 2004). Di conseguenza, sono dei rapidi indicatori degli effetti biologici,

dovuti ai contaminanti chimici, che si verificano più lentamente nel corso del tempo (Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville, 2006).

Recenti studi indicano, inoltre, che i mitili sono organismi idonei a valutare gli effetti di contaminanti sui meccanismi fisiologici coinvolti nella segnalazione cellulare e nel controllo della risposta allo stress (Martin-Diaz *et al.*, 2009; Franzellitti *et al.*, 2011).

Per la definizione della qualità del biota, in aggiunta alle analisi del contenuto di inquinanti nei tessuti di specifici organismi bioindicatori (ad esempio mugilidi e mitili) e alle indagini ecotossicologiche condotte utilizzando una batteria di saggi con organismi appartenenti ad almeno tre differenti livelli trofici, l'analisi di particolari indicatori biochimici (*biomarker*) in organismi target permette di evidenziare alterazioni di particolari percorsi metabolici (Foulkes, 1982; Klaverkamp *et al.*, 1991; Malins e Ostrander, 1994; Munawar *et al.*, 1995; Fossi, 2000) indotti anche da basse concentrazioni di inquinanti.

Parametri fisici e fisico-chimici di sedimenti e colonna d'acqua sono inoltre analizzati a supporto delle indagini chimiche e biologiche e permettono di individuare effetti sia di tipo primario che secondario sulla qualità delle acque indotti da pressioni di origine diversa.

### **3.1 Metodologia di indagine da applicare ai mitili**

Il monitoraggio è effettuato utilizzando la tecnica degli organismi trapiantati secondo le indicazioni riportate nella descrizione "Bioaccumulo in bivalvi, SCHEDA 1 - Utilizzo dei molluschi bivalvi nel programma di monitoraggio dell'ambiente costiero (Protocollo *Mussel Watch*)" del volume "Metodologie analitiche di riferimento" redatto dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e da ICRAM nel 2011.

Esemplari di *Mytilus galloprovincialis* sono raccolti da una popolazione proveniente da un sito di allevamento e traslocati, senza alcuna stabulazione, per un periodo di 4-5 settimane nelle aree da monitorare.

In ciascuna delle stazioni oggetto di studio sono trapiantati circa 200-300 individui di taglia omogenea (5-7 cm), approssimativamente compresa tra il 70 ed il 90% delle dimensioni massime della popolazione da cui sono stati raccolti.

Il trapianto è effettuato mantenendo gli organismi in reti di nylon o strutture plastiche fissate nella stazione da monitorare, ad una profondità compresa tra 1 e 5 m e ad almeno un metro dal fondo.

Trascorso il periodo in situ, i mitili vengono recuperati, se necessario mantenuti refrigerati a circa 4 °C in ambiente umido (ma non immersi in acqua) fino ad un massimo di 24 ore, e successivamente dissezionati e preparati per le successive analisi chimiche e tossicologiche.

Per ogni punto di campionamento sono preparati 4 *pool* (3 replicati e un *pool* riserva), ciascuno costituito generalmente dalle intere parti molli di circa 10 organismi, per ciascuna tipologia di analisi da fare (es. elementi in tracce e contaminanti organici). I tessuti molli dei mitili selezionati sono prelevati, lavati con acqua deionizzata (Milli Ro) e congelati a -20 °C fino al momento dell'analisi.

In relazione agli specifici obiettivi del progetto si è stabilito di ricercare nei mitili gli stessi parametri analizzati nei sedimenti, tenendo presente le indicazioni riportate nelle normative nazionali ed internazionali inerenti al monitoraggio e la gestione delle acque (Prodotto T1.1.1 Report della normativa e dei protocolli di gestione ambientale):

- metalli pesanti: arsenico, cadmio, cromo totale, rame, mercurio, nichel, piombo, zinco e cromo esavalente, vanadio, alluminio e ferro come parametri aggiuntivi;
- idrocarburi policiclici aromatici: Acenaftilene, Benzo(a)antracene, Fluorantene, Naftalene, Antracene, Benzo(a)pirene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(g,h,i)perilene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Pirene, Dibenzo(a,h)antracene, Crisene, Indeno(1,2,3,c-d)pirene e loro sommatoria;
- policlorobifenili: congeneri PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, PCB 101, PCB 118, PCB 126, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180 e loro sommatoria;
- composti organostannici: tributilstagno;
- pesticidi organoclorurati: Aldrin, Dieldrin, Endrin, alfa-HCH, beta-HCH, gamma-HCH (Lindano), DDD, DDT, DDE (per ogni sostanza la somma degli isomeri 2.4 e 4.4), HCB, eptacloro e epossido.

Di seguito si riportano le metodologie impiegate per la ricerca dei parametri chimici nella matrice biota.

### *Metalli pesanti*

La mineralizzazione del campione è effettuata su aliquote di circa 0.3-0.4 grammi di sostanza preventivamente seccata in stufa a 50 °C fino al raggiungimento di un peso costante. I tessuti molli dei mitili sono successivamente polverizzati in mortaio, pesati con bilancia, avente risoluzione al decimo di mg, direttamente nel recipiente in teflon in cui avviene la mineralizzazione.

Il metodo di analisi prevede l'attacco con HNO<sub>3</sub> ultrapuro al 65% (5 mL), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (1 mL) e 2 mL acqua ultrapura e digestione mediante un sistema chiuso a microonde a bassa pressione opportunamente programmato.

Le analisi sono condotte mediante l'impiego di Spettrofotometria ad Emissione Ottica (Varian Liberty AX Sequential ICP-OES 720).

Per il mercurio le analisi sono condotte mediante l'utilizzo Spettroscopia ad Assorbimento Atomico (USEPA 7471B (1998) e metodo dei Vapori Freddi (in Cetac M-7600 Manual).

L'accuratezza è verificata impiegando il materiale standard di riferimento SRM NIST 2976 *Mussel Tissue* (National Institute of Standards & Technology, USA), che è stato processato con le stesse modalità dei campioni.

### *Idrocarburi policiclici aromatici*

Ai fini della determinazione nella matrice biota dei 16 Idrocarburi policiclici Aromatici (IPA) definiti Inquinanti Prioritari dall'agenzia americana EPA (Environmental Protection Agency, US-EPA), si procede secondo il metodo QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe).

Si trasferiscono 10 g di campione umido omogeneizzato in una provetta monouso da 50 mL, unendo una barretta di ceramica per rompere gli agglomerati e mantenere omogeneo il campione. Si aggiungono, quindi, 12 mL di acetonitrile e si pone la provetta su un agitatore orizzontale per 15 minuti. Si aggiungono 6 g MgSO<sub>4</sub> e 1.5 g di NaCl, si agita per 1 minuto e si procede a centrifugare per 10 minuti a 5000 giri.

Per la procedura di estrazione in fase solida dispersiva (d-SPE, *dispersive Solid Phase Extraction*), si trasferiscono 4 mL del surnatante (acetonitrile) in provetta monouso da 15 mL contenente

400 mg di PSA, 400 mg di C18 *end capped*, 1200 mg MgSO<sub>4</sub>, si agita per 1 minuto e si centrifuga 10 minuti per 3200 giri.

Circa 1.5 mL del surnatante purificato viene filtrato su membrane in PVDF con porosità 0.45 µm e trasferito in *vial* di vetro.

A questo punto si procede con l'analisi strumentale in cromatografia liquida ad ultraprestazione con rivelatore a fluorescenza (UPLC/FLD Waters Acquity).

La determinazione viene condotta, quindi, in HPLC/FLD con taratura a cinque punti da 0.1 ng/mL a 100 ng/mL (corrispondenti a 0.12 e 120 µg/kg p.u. nel campione di biota).

### *Policlorobifenili*

Il metodo di riferimento per la determinazione dei PCB è il metodo EPA 1668C (2010).

Il metodo è basato sull'utilizzo della gas cromatografia ad alta risoluzione abbinata alla spettrometria ad alta risoluzione (HRGC/HRMS) per la separazione, l'identificazione e la quantificazione, mediante diluizione isotopica dei PCB, in particolare è applicato alla determinazione dei 12 congeneri diossina-simili (77, 81, 105, 114, 118, 123, 125, 156, 157, 167, 169, 189) e 6 congeneri dei PCB indicatori (28, 52, 101, 138, 153, 180) in matrici di varia natura, compreso il biota.

Per diluizione isotopica si intende la tecnica di calcolo dei congeneri di "interesse nativi rispetto ai loro analoghi marcati C13.

La procedura di analisi si articola in diverse fasi: preparazione dell'aliquota e aggiunta di standard marcati, estrazione della parte lipidica, purificazione, evaporazione degli estratti e trasferimento in *vial* di iniezione, analisi strumentale.

L'analisi dei campioni è abbinata da un bianco procedurale che deve seguire le stesse procedure a cui sono sottoposti i campioni. I risultati della determinazione del bianco vengono utilizzati per correggere le misure dei campioni o per rilevare errori dovuti all'interferenza di contaminanti presenti nei reagenti.

La preparazione prevede che il campione da analizzare sia liofilizzato prima di essere estratto, per eliminare l'umidità ed aumentare l'efficienza dell'estrazione. Viene pesata un'aliquota di



campione omogeneizzato alla quale viene aggiunta la quantità nota dello standard di estrazione contenente i congeneri marcati ed essa viene sottoposta alla liofilizzazione.

Il campione liofilizzato viene trasferito in una cella per l'estrazione con solvente mediante l'ASE200 (*Accelerated Solvent Extractor*) DIONEX. L'estratto ottenuto viene filtrato su solfato di sodio anidro in un pallone da *rotavapor*, il solvente concentrato a pochi mL e portato successivamente a secco sotto il flusso dell'azoto per cambio solvente per proseguire con la fase di purificazione.

La purificazione prevede due trattamenti: distruzione della matrice organica/lipidica mediante colonna multistrato, di cui componente principale è la celite impregnata da acido solforico concentrato che agisce da agente che "brucia" la matrice e purificazione su sistema di colonnine di silice e di allumina ai fini di eliminare/separare l'analita d'interesse da sostanze interferenti. Prima di iniziare il trattamento di purificazione all'estratto viene aggiunto lo standard marcato di *cleanup*, per poter valutare eventuali perdite di analiti in questa fase.

Nella fase finale l'estratto purificato viene microconcentrato: dopo la purificazione il solvente del campione viene evaporato su *rotavapor* a pochi mL, trasferito nella *vial gc* e portato a secco con il flusso di azoto. Prima dell'iniezione viene aggiunto lo standard di siringa e il campione viene iniettato nel sistema HRGC/HRMS.

### *Tributilstagno*

La determinazione del composto organostannico tributilstagno nel biota avviene tramite estrazione assistita in microonde e successiva determinazione mediante HPLC-ICP-MS.

L'estrazione assistita con microonde, o *Microwave-Assisted Extraction* (MAE), è una tecnica di estrazione rapida ed efficiente basata sull'impiego di microonde per riscaldare la miscela campione/solvente allo scopo di facilitare e velocizzare l'estrazione dell'analita.

Il campione (2.0 g circa), dopo essiccazione all'aria, è trasferito nei *liner* di estrazione. Ad ogni campione sono aggiunti 10 mL di una soluzione estraente (Acetato di Ammonio 0.5 M, Acido Acetico 1 M, in Metanolo). Il programma a microonde prevede una estrazione a 100 °C per 5 min.

Dopo raffreddamento, ciascun campione è filtrato in *vials* da 10 mL. Segue una evaporazione sotto azoto ad un volume di 2 mL (un volume minore provoca intorbidimento della soluzione). I campioni sono conservati a -20 °C. Prima dell'analisi strumentale ogni campione è diluito di un fattore 2 con acqua Milli-Q.

Per la separazione dei composti organostannici si utilizza un HPLC PerkinElmer Serie 200. Per eseguire le analisi si monta una colonna C18 *ultrafast*, con particelle della fase stazionaria di diametro di 1.9 µm. In Tabella 1 si riportano le condizioni analitiche necessarie per l'esecuzione delle analisi.

**Tab.1 – condizioni analitiche per la separazione dei composti organostannici**

Colonna	Fase inversa	C-18
	Diametro interno	2.1 mm
	Lunghezza	8 cm
	Diametro particelle	1.9 µm
Eluente	Composizione	Acetonitrile:Acqua:Acido Acetico 65:23:12 con aggiunta di TEA allo 0.1%
	Flusso	0.3 mL/min
Iniezione	Volume	20 µL

Si utilizza come metodo di taratura la calibrazione esterna, con soluzioni standard aventi concentrazione di 5, 10, 20, 40 e 50 µg/L. Gli standard sono preparati direttamente in *vials* di vetro di capacità 1.5 mL.

Sia i campioni sia gli standard sono in matrice 50 % acquosa e 50% solvente. Un percentuale maggiore di solvente determina una notevole instabilità del plasma.

La quantificazione dell'analita avviene mediante spettrometria ICP-MS (ELAN 9000 PerkinElmer), utilizzando gli isotopi più abbondanti dello stagno: 118Sn e 120Sn. Si utilizza un micronebulizzatore PFA e una camera di nebulizzazione ciclonica raffreddata a 2 °C, per

minimizzare la quantità di solvente in torcia; l'utilizzo di ossigeno post colonna diminuisce la quantità di sostanza organica che si deposita sull'interfaccia.

### *Pesticidi organoclorurati*

Il principio del metodo prevede l'estrazione con solvente dei pesticidi clorurati da organismi marini, successiva purificazione e determinazione gas-cromatografica.

L'analisi è condotta a partire da 10 grammi di campione sgusciato tal quale, senza alcun processo di liofilizzazione e si procede secondo il metodo QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*).

La metodica QuEChERS può essere suddivisa in due parti: la prima consiste nell'omogeneizzazione ed estrazione con acetonitrile; la seconda consiste nelle fasi di purificazione con SPE dispersiva (d-SPE, *dispersive Solid Phase Extraction*).

Si procede quindi con l'analisi strumentale eseguita con LC-MS/MS costituito da un analizzatore a triplo quadrupolo. La gascromatografia di massa è effettuata utilizzando una colonna modello TG-5 ms di 20 m. Lo strumento è caratterizzato da un TSQ Quantum Ultra prodotto dalla ditta Thermo.

È utilizzato, inoltre, a garanzia del risultato uno standard di processo.

### Analisi dei *biomarker* nei mitili (Gorbi *et al.*, 2008; Regoli *et al.*, 2014).

Fra i molti tipi di *biomarker* che possono essere indagati nei mitili vi sono:

- il citocromo P450 come indicatore dell'esposizione a contaminanti organici PAH, PCB, ecc.;
- alterazioni del DNA dovute a mutageni inorganici o xenobiotici organici;
- inibizione dell'acetilcolinesterasi (AChE) indotta da organofosfori, carbammine, Cd, Pb, Cu, ecc.;
- sintesi delle metallotioneine a livello epatico e in altri tessuti a seguito dell'esposizione a metalli pesanti Zn, Cu, Cd, Hg, Fe, ecc.;
- stimolazione di enzimi antiossidanti (superossidodismutasi, catalasi, glutatione-transferasi) in seguito all'esposizione a ROS, radicali liberi, perossidazione lipidica;

- la vitellogenina, la cui produzione viene indotta da sostanze ad attività estrogenica (De Meo, 2011).

Per il presente progetto si è stabilito di valutare come linee di evidenza i seguenti *biomarkers*: metallotioneine, sistema neurotossicità (acetilcolinesterasi), danno DNA (micronuclei), sistema lisosomiale, sistemi immunitari, in aggiunta sistemi ossidanti, proliferazione perossisomiale.

I livelli di metallotioneine, proteine citosoliche indotte dalla esposizione a metalli pesanti, vengono valutati nelle ghiandole digestive omogenate (1:3 p/v) in tampone Tris-HCl 20 mM pH 8.6, con saccarosio 0.5 M, leupeptina 0.006 mM come inibitore delle proteasi, fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF) 0.5 mM come agente proteolitico,  $\beta$ -mercaptoetanololo 0.01% come agente riducente. Dopo centrifugazione a 30.000 xg per 45 minuti a 4 °C, la purificazione delle metallotioneine viene effettuata attraverso una serie di precipitazioni etanoliche. Il pellet ottenuto da questi procedimenti e contenente le metallotioneine, viene asciugato sotto flusso d'azoto, risospeso nuovamente in una soluzione di NaCl 0.25 M e HCl 1 N, contenente EDTA 4 mM per eliminare i cationi metallici legati alle metallotioneine. Alla soluzione così ottenuta è stato aggiunto tampone Na-fosfato 200 mM pH 8, NaCl 2 M e l'acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0.43 mM ed il campione ulteriormente centrifugato a 3.000 xg per 5 minuti a 4°C. La concentrazione delle metallotioneine viene valutata in rapporto ai gruppi -SH determinati spettrofotometricamente a  $\lambda = 412$  nm mediante reazione con DTNB. La quantificazione viene effettuata attraverso una retta standard di calibrazione, con concentrazioni note di GSH (50-500 $\mu$ M).

L'attività dell'acetilcolinesterasi viene misurata nell'emolinfa opportunamente centrifugata per 5 minuti a 3.000 xg. Il sovrantante viene utilizzato per determinare l'attività della acetilcolinesterasi (AChE) secondo il metodo di Ellman alla temperatura di  $18 \pm 1$  °C, alla lunghezza d'onda di 412 nm, con coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) di 13.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

La stabilità delle membrane lisosomiali viene misurata in emociti liberamente circolanti attraverso l'analisi del tempo di ritenzione del rosso neutro (NRRT). Dopo il prelievo le cellule sono lasciate aderire per 15 minuti a 4°C in camera umida. Le cellule sono quindi incubate con una soluzione di Rosso Neutro ed esaminate ad intervalli di 15 minuti (fino ad un tempo massimo di 120 minuti) per determinare il tempo al quale il 50% degli emociti presenta il Rosso

Neutro non più compartimentalizzato nei lisosomi ma rilasciato nel citosol. La soluzione stock di Rosso Neutro è preparata dissolvendo 28.8 mg di colorante in 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO) e conservata a 4 °C per non più di 3 settimane; al momento dell'analisi 10 µL di soluzione stock sono diluiti in 5 mL di soluzione fisiologica.

Il rapporto granulociti su ialinociti viene analizzato su aliquote di emolinfa che vengono opportunamente disperse su vetrino. Dopo l'asciugatura, le cellule adese vengono fissate in Baker's Ca-formolo (10 mL di Formaldeide al 40%; 1 g di CaCl<sub>2</sub>, NaCl al 2.5%, portato a volume con acqua distillata). I vetrini dopo essere risciacquati vengono colorati con colorante di Giemsa, prima di essere montati in gelatina di glicerolo. L'osservazione effettuata in microscopia ottica (1000x) consente la valutazione del numero di granulociti e ialinociti, dopo aver contato almeno 200 cellule per ogni campione.

L'attività di fagocitosi viene analizzata nelle cellule degli emociti; 100 µL di emolinfa viene dispersa su vetrino e le cellule fatte aderire per 15 minuti a in camera umida e al buio. Bioparticelle di ZIMOSAN A marcate con fluoresceina (Invitrogen Z2841) vengono aggiunte in modo da ottenere un rapporto di circa 10:1 (bioparticelle: emociti). Dopo due ore di incubazione in camera umida e al buio, le particelle non fagocitate vengono rimosse attraverso un lavaggio in soluzione fisiologica e i vetrini fissati in Baker's Ca-formolo e montati in gelatina di glicerolo. L'attività di fagocitosi viene espressa come percentuale di cellule che internalizzano almeno 3 particelle fluorescenti, dopo aver osservato mediante microscopia fluorescente almeno 200 cellule per ogni campione.

L'analisi dell'accumulo di lipofuscina viene effettuata su sezioni criostatiche di 8 µm di ghiandola digestiva, fissate in Baker's Ca-formolo per 15 minuti a 4 °C; successivamente i vetrini vengono risciacquati in acqua distillata ed immersi per 5 minuti nella soluzione di colorazione costituita da cloruro ferrico 1% e K-ferricianuro 1% (5:1) portata al volume di 50 mL con acqua distillata. I vetrini sono quindi lavati prima in acido acetico al 2% e poi in acqua distillata e infine montati in gelatina di glicerolo. Il software d'analisi d'immagine Image Pro Plus 6.2 viene utilizzato per determinare l'intensità di colorazione dei granuli di lipofuscina, evidenziati come granuli dal colore verde-azzurro all'interno dei tubuli della ghiandola digestiva dei mitili. L'accumulo di lipofuscina viene espresso in termini di intensità di colorazione per µm<sup>2</sup> di tessuto totale.

L'analisi di accumulo di lipidi neutri viene anch'essa effettuata su sezioni criostatiche dello spessore di 8  $\mu\text{m}$  di ghiandola digestiva che vengono sottoposte ad una fase di fissaggio in buffer-formolo per 15 min a 4 °C, cui segue un risciacquo in alcol isopropilico al 60%. La successiva procedura di colorazione prevede 15 minuti di incubazione in una soluzione saturata di Oil Red O (1% in alcool isopropilico), un lavaggio di 1 minuto in alcool isopropilico al 60% e quindi in acqua distillata, e il montaggio in glicerol gelatina. L'accumulo di lipidi neutri viene misurato attraverso il software d'analisi d'immagine Image Pro Plus 6.2, ed espresso in termini di intensità di fluorescenza per  $\mu\text{m}^2$  di tessuto totale.

Il danno genotossico viene valutato nell'emolinfa dei mitili l'analisi della frequenza di micronuclei. Una aliquota di emolinfa viene prelevata dal muscolo adduttore, dilavata in un buffer salino (500 mM NaCl, 120 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM EDTA) con brevi centrifugate. Le cellule vengono poi trattate con fissativo di Carnoy (miscela 3:1 metanolo ed acido acetico) e sottoposte ulteriormente a brevi centrifugate e cambi di fissativo, prima di allestire degli strisci su vetrino. Dopo colorazione dei preparati con 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) 100 ng/mL, i vetrini vengono esaminati al microscopio in fluorescenza per determinare la percentuale delle cellule contenenti micronuclei. Per ciascun campione vengono contate almeno 2000 cellule, considerando micronuclei tutte quelle porzioni di cromatina fortemente DAPI positive in discontinuità fisica con il nucleo centrale, di forma circolare od ovoidale e di diametro compreso tra 1/3 e 1/20 del diametro del nucleo della cellula.

L'analisi dei sistemi enzimatici antiossidanti viene effettuata su campioni di ghiandola digestiva omogenati (1:5 p/v) in un tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, con NaCl 2.5%, PMSF (fenilmetilsolfonilfluoruro) 0.1 mM e inibitori di proteasi: aprotinina 0.008 TIU/mL, leupeptina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pepstatina 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dopo centrifugazione a 100.000  $\times\text{g}$  per 1 ora a 4°C, la frazione citosolica è aliquotata e conservata a -80°C. Le attività enzimatiche dei principali sistemi antiossidanti sono analizzate attraverso saggi spettrofotometrici a 18°C. L'attività della *catalasi* (CAT), sistema antiossidante che detossifica il perossido d'idrogeno catalizzando la sua trasformazione in acqua e ossigeno, viene valutata seguendo la diminuzione di assorbanza a  $\lambda=240\text{ nm}$ ,  $\epsilon=0.04\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . Il saggio è condotto per un minuto in un volume finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7, con  $\text{H}_2\text{O}_2$  12 mM ed opportune aliquote di

campione. Gli enzimi *glutazione perossidasi (GPx)*, Se-dipendenti e Se-indipendenti, agiscono nei confronti dei perossidi organici e inorganici riducendoli nei corrispondenti alcool. L'attività enzimatica viene misurata seguendo l'azione di un sistema di enzimi accoppiati dove il glutazione ossidato GSSG, formato nella reazione catalizzata dalla perossidasi, viene convertito in forma ridotta GSH per azione della glutazione reduttasi. Nel saggio viene seguito il consumo del NADPH tramite diminuzione di assorbanza a  $\lambda=340$  nm,  $\epsilon=-6.22$  mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. L'attività delle forme enzimatiche Se-dipendenti e dell'insieme di quelle Se-dipendenti e Se-indipendenti è stata misurata usando come substrato rispettivamente perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) per verificare l'efficacia di detossificazione degli enzimi su perossidi inorganici e idroperossido di cumene (CuPx) per valutarne l'azione su perossidi organici. La reazione è eseguita in un volume finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, EDTA 1 mM, GSH 2 mM, NADPH 0.24 mM, 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 0.8 mM CuPx, 1U GR ed opportune aliquote di campione. La famiglia enzimatica delle *glutazione S-transferasi (GST)* catalizza le reazioni di coniugazione tra diverse classi di molecole con il glutazione ridotto (GSH), diminuendone la reattività o rendendole maggiormente idrosolubili e quindi eliminabili dall'organismo. L'analisi è condotta tramite saggio spettrofotometrico seguendo l'andamento dell'assorbanza del complesso formatosi da GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) rilevata a  $\lambda=340$  nm,  $\epsilon=-9.6$  mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. La reazione è seguita per un minuto in un volume finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM pH 6.5, CDNB 1.5 mM, GSH 1 mM ed opportune aliquote di campione. L'enzima *glutazione reduttasi (GR)*, responsabile della trasformazione del glutazione ossidato GSSG nella forma ridotta GSH tramite l'utilizzo di NADPH, viene saggiato mediante l'analisi del decremento di assorbanza rilevata a  $\lambda=340$  nm,  $\epsilon =-6.22$  mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, dovuta all'ossidazione del NADPH. La reazione viene effettuata in un volume di saggio finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7, GSSG 1 mM, NADPH 0,12 mM ed opportune aliquote di campione. Per la determinazione del *glutazione totale (GSH)* gli omogenati di ghiandola digestiva vengono preparati in acido sulfosalicilico 5% con EDTA 4 mM (1:5 p/v). I campioni vengono lasciati in ghiaccio per 45 minuti per la deproteinizzazione, poi centrifugati a 37.000 xg per 15 minuti. Il glutazione totale viene determinato nel sovrantante misurando per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda  $\lambda=412$  nm, l'intensità di reazione tra i gruppi -SH e DTNB. Il saggio è condotto in tampone K-

fosfato 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTNB 0,1 mM, NADPH 0,24 mM, glutatione riduttasi 1 U ed opportune aliquote di campione. I valori di assorbanza ottenuti vengono quantificati mediante una curva di calibrazione standard a concentrazioni note di glutatione ridotto. La *Capacità Antiossidante Totale* viene stimata tramite il saggio TOSC che misura l'efficienza complessiva di un tessuto biologico di neutralizzare diverse forme di ROS tra cui i radicali perossilici (ROO•) e i radicali idrossilici (HO•). Le analisi vengono effettuate sulla componente citosolica dei campioni di ghiandola digestiva omogenati (1:5 p/v) in un *working-buffer* costituito da tampone K-fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 2.5%. Gli omogenati così ottenuti sono vengono centrifugati a 100.000 xg per 1 ora e 10 minuti a 4°C, e la frazione citosolica subaliquotata e conservata a - 80°C fino al momento delle analisi. Il saggio TOSC-A (*Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay*) prevede la reazione tra le diverse forme di radicali che vengono artificialmente generati, e l'acido  $\alpha$ -chetoy-metiolbutirrico (KMBA), che funge da substrato e si ossida liberando gas etilene. La produzione di etilene risulta quantitativamente diminuita in presenza di agenti antiossidanti (come quelli contenuti nel materiale biologico) che reagiscono con i radicali neutralizzandoli e sottraendoli alla reazione con il KMBA. I radicali perossilici (ROO•) vengono generati attraverso l'omolisi termica del 2,2'-azo-bis-amidinopropano (ABAP) mentre i radicali idrossilici (HO•) attraverso la reazione di Fenton ferro-ascorbato. Le reazioni vengono condotte in appositi contenitori di vetro da 10 mL (*vials*), sigillati con speciali tappi muniti di setto, mantenuti alla temperatura costante di 35°C in bagno termostatico continuamente agitato per consentire una generazione costante delle varie forme di radicali. Le condizioni finali di saggio sono le seguenti:

- per l'analisi con i radicali perossilici (ROO•): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM e ABAP 20 mM in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4;
- per l'analisi con i radicali idrossilici (HO•): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM, Fe<sup>3+</sup> 1.8  $\mu$ M, EDTA 3.6  $\mu$ M e acido ascorbico 180  $\mu$ M in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4.

Il KMBA viene ossidato dalle diverse forme di radicali generando gas etilene. La formazione dell'etilene è monitorata nel tempo mediante analisi gas-cromatografica su colonna capillare "Supelco SPB-1" (30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m) e mediante rivelatore FID (*Flame Ionization Detector*), utilizzando le seguenti condizioni strumentali: temperatura del forno pari a 35°C, temperatura del FID pari a 220°C, temperatura d'iniezione pari a 160°C, flusso d'idrogeno pari



a 30 mL/minuto; flusso d'elio pari a 3 mL/minuto. La differenza di produzione d'etilene tra la reazione nei *vials* di controllo e la reazione nei *vials* contenenti i campioni, è calcolata matematicamente, integrando l'area al di sotto delle rispettive curve cinetiche della produzione d'etilene in funzione del tempo, considerando che ogni campione viene letto ogni 12 minuti per un tempo totale di saggio pari a 96 minuti. I risultati ottenuti permettono di quantificare il parametro TOSC, compreso tra 0 e 100, indice della capacità complessiva del campione analizzato, di neutralizzare le varie forme di specie reattive dell'ossigeno. Il valore TOSC sperimentale è ottenuto secondo la formula:

$$\text{TOSC} = 100 - (\int\text{SA} / \int\text{CA} \times 100)$$

dove  $\int\text{SA}$  e  $\int\text{CA}$  sono gli integrali delle aree al di sotto delle curve che rappresentano rispettivamente le reazioni di un campione SA (*Sample Area*), e del controllo CA (*Control Area*). Un campione che sia privo di qualsiasi capacità di neutralizzare i radicali mostrerà una produzione di etilene in funzione del tempo uguale a quella dei controlli ( $\int\text{SA} / \int\text{CA}=1$ ) ed il risultante valore TOSC sarà pertanto pari a 0. Al contrario un ipotetico valore TOSC=100 corrisponderebbe ad un campione che neutralizza tutte le specie reattive prodotte, inibendo completamente la formazione di etilene nell'intera durata del saggio ( $\int\text{SA}=0$ ). Dai risultati sperimentali viene ottenuto un valore TOSC specifico, rapportato al contenuto di proteine ed espresso come unità TOSC/mg di proteine.

Le proteine sono analizzate secondo il metodo di Lowry, utilizzando albumina di siero bovino (BSA) come standard.

Il contenuto di malondialdeide (MDA) viene determinato attraverso una reazione di coniugazione con 1-metil-2-fenilindolo, che dà luogo alla formazione di un composto con assorbanza rilevabile a lunghezza d'onda  $\lambda=586$  nm. Per questa analisi i campioni di ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* vengono omogenati in Tris-HCl 20 mM pH 7.4 (1:3 p/v) e centrifugati a 3,000 xg per 20 minuti. La reazione di coniugazione viene condotta a 45 °C per 40 minuti in una miscela di reazione contenente 1-metil-2-fenilindolo 10.3 mM in acetonitrile diluito in rapporto 3:1 con metanolo, HCl 37%. Dopo centrifugazione a 15,000 xg per 10 minuti,

il contenuto di malondialdeide viene misurato per via spettrofotometrica, utilizzando come standard 1,1,3,3-tetrametossipropano in Tris-HCl 20 mM.

La proliferazione perossisomiale, *biomarker* specifico di esposizione a proliferatori perossisomiali, viene valutata per via spettrofotometrica attraverso l'analisi dell'attività enzimatica della acil-CoA ossidasi (ACOX), enzima localizzato a livello dei perossisomi e coinvolto nella beta-ossidazione degli acidi grassi. I campioni di ghiandole digestive vengono omogenati in tampone sodio bicarbonato 1 mM, pH 7.6, contenente EDTA 1 mM, etanolo 0.1%, TRITON X-100 0.01% e centrifugati a 500 xg per 15 min a 4°C. L'attività enzimatica della ACOX viene determinata seguendo la reazione di ossidazione della diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) in presenza di una perossidasi esterna e con l'aggiunta di un substrato specifico (*Palmitoil CoA*) alla temperatura di  $25 \pm 1$  °C e  $\lambda = 502$  nm.

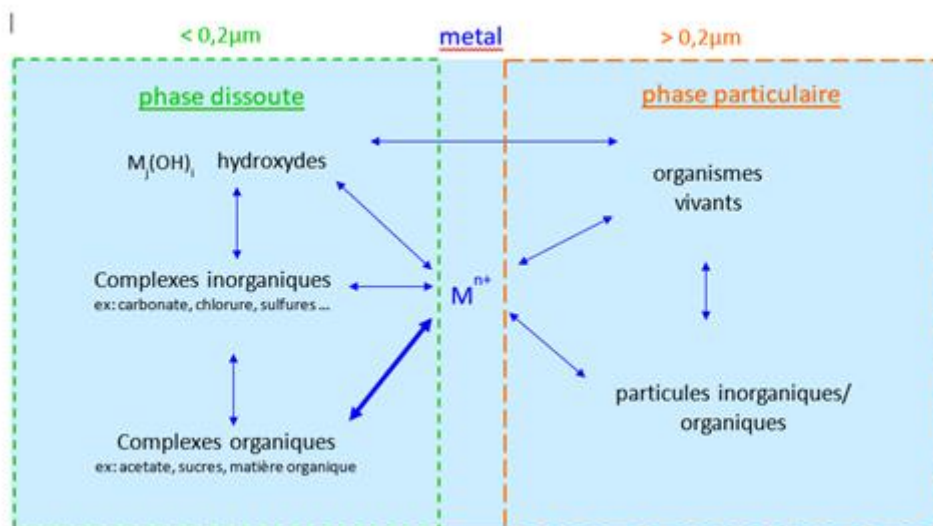
## 4. Metalli

### 4.1 Contaminazione in metalli in tracce

I metalli tracciati sono elementi presenti in qualsiasi ambiente. Alcune attività umane causano aumenti significativi delle loro concentrazioni, ben al di sopra dei valori naturali nell'acqua di mare, che è chiamata contaminazione. L'ambiente portuale ospita varie attività che rappresentano importanti fonti di contaminazione di metalli in tracce, incluso il rame. La nota tossicità di alcuni metalli in tracce, incluso il rame, richiede il monitoraggio della loro concentrazione per valutare l'impatto delle attività umane sull'ambiente marino.

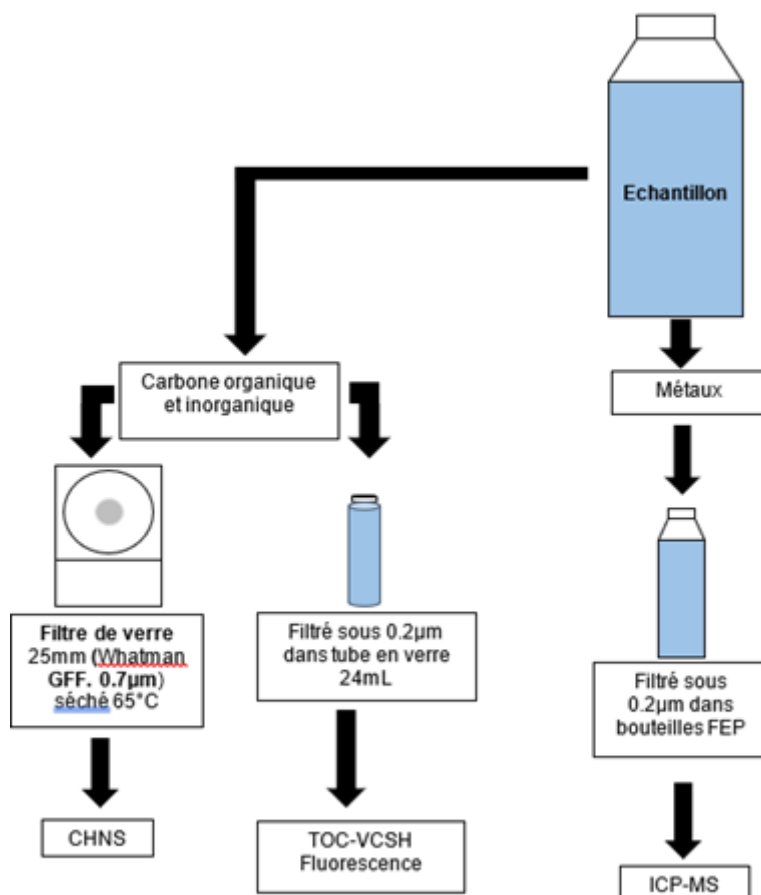
In ognuno dei porti pilota verrà effettuata una serie di campioni al fine di stimare la contaminazione del rame, le sue potenziali fonti (principalmente il porto) e la sua dispersione verso l'ambiente marino esterno. I campioni d'acqua saranno prelevati usando una bottiglia orizzontale di tipo Niskin precedentemente lavata con acido e sciacquata con acqua ultrapura. In ogni sito di campionamento, i parametri fisico dell'ecosistema saranno misurati da una sonda multiparametrica (temperatura, conducibilità, salinità, ossigeno disciolto, pH, redox, torbidità, clorofilla a). Una volta raccolto, il campione verrà versato in una bottiglia in etilene propilene fluorurato (FEP), un materiale inerte che non rilascia il metallo, evitando così la

contaminazione del campione posto all'interno. Diverse aliquote verranno prese per meglio definire non solo il contenuto totale e campioni di rame disciolto mediante ICP-MS, ma anche capire meglio la dinamica di questo metallo nell'ecosistema determinato. In effetti, un certo numero di parametri deve essere preso in considerazione se vogliamo comprendere i meccanismi di distribuzione di questo elemento e specie sotto cui troveremo nell'ambiente, chiamato speciazione (Fig. 1).



**Fig. 1:** Distribuzione di un metallo nelle sue differenti specie, o speciazione.

La speciazione dei metalli ne condiziona la tossicità. Questa speciazione è fortemente influenzata dalla materia organica presente nell'acqua di mare e il contenuto e la composizione della sostanza organica nei campioni saranno analizzati misurando il contenuto di carbonio organico disciolto (TOC-VCSH) e azoto e zolfo (misurazione CHNS) (Fig. 2). L'origine e le funzionalità della materia organica saranno determinate mediante un'analisi di fluorescenza.



**Fig. 2:** Protocollo analitico per le analisi chimiche.

#### 4.2 I microorganismi marini come indicatori dello stato del mezzo

I microrganismi sono gli organismi viventi più abbondanti nell'ambiente marino (circa 10<sup>6</sup> cellule/ml), rappresentano la maggior parte della biomassa marina, forniscono funzioni uniche necessarie per lo sviluppo delle risorse di acquacoltura che gli esseri umani sfruttano e contribuiscono notevolmente a servizi ecosistemici. Inoltre, i microrganismi hanno un tempo di generazione molto breve (da poche decine di minuti a poche decine di ore), che consente loro di rispondere molto rapidamente alle variazioni del loro ambiente. Costituiti da una singola cellula, le loro interazioni con i contaminanti chimici sono molto più dirette rispetto ai macroorganismi multicellulari. Infine, le comunità microbiche naturali sono un insieme complesso di specie sensibili e altre resistenti alle contaminazioni chimiche. Tutte queste

caratteristiche li rendono buoni indicatori del disturbo umano. Studiarli permette di comprendere l'impatto a breve termine delle attività umane sulla biodiversità marina.

In tutti i porti pilota, in parallelo con ogni caratterizzazione chimica effettuata dall'UTLN, sarà effettuata una caratterizzazione dell'abbondanza e della diversità delle comunità microbiche presenti nell'acqua di mare. A partire dall'acqua prelevata dalla bottiglia di Niskin per le analisi chimiche, un piccolo volume viene pre-filtrato <math><40\ \mu\text{m}</math> per rimuovere organismi più grandi prima dell'analisi citofluorimetrica. I campioni sono fissati alla glutaraldeide sulla barca per arrestare l'evoluzione del campione, quindi conservati nel ghiaccio secco il più rapidamente possibile. Questa analisi consente di contare i procarioti eterotrofi (cioè batteri e archaea) nonché numerosi gruppi fitoplanctonici molto piccoli (pico- e nanofitoplancton). Tali misure rapide e semplici possono evidenziare una produzione microbica grande, ed esamina i rapporti di dominanza tra picocyanobacteria del genere *Synechococcus* (caratteristici di un ambiente marino costiero indisturbata) e piceoeucarioti fotosintetici (caratteristici di un ambiente più ricco materia organica e batteri).

Queste analisi citometriche a flusso saranno integrate da analisi di biologia molecolare che consentono di quantificare diversi gruppi di fitoplancton che sono impossibili da differenziare o rilevare mediante citometria a flusso in un ambiente portuale ricco di particelle sospese. Per questo, nelle prime ore che seguono i campionamenti, 1.5 mL di acqua di mare da ciascun sito vengono centrifugati a 20,000 giri per 20 minuti al fine di raccogliere le cellule microbiche nel pellet. L'acqua di mare viene rimossa e il pellet cellulare viene immediatamente congelato in ghiaccio secco. Tornato in laboratorio, il DNA viene estratto mediante lisi enzimatica e chimica (lisosima, SDS, proteinasi K) e quindi purificato mediante precipitazione con isopropanolo e Genelute. Diversi gruppi fitoplanctonici (*Prochlorococco*, *Ostréococcus*, *Bathycoccus*, *Micromonas*) vengono quindi quantificati mediante PCR quantitativa indirizzata a un frammento del loro gene rRNA 16S o 18S.

Infine, su circa la metà dei siti, vengono utilizzati maggiori volumi di acqua per ulteriori analisi della diversità genetica della comunità batterica al fine di identificare con maggiore precisione i gruppi selezionati o interessati dalle attività umane, allo scopo di identificare i processi naturali modificati. Per questo, nelle prime ore dopo il campionamento, 1 L di acqua di mare viene

filtrato su 0.2  $\mu\text{m}$  e il filtro viene immediatamente congelato in ghiaccio secco. Tornato in laboratorio, il DNA viene estratto come descritto in precedenza, i geni procariotici dell'rRNA 16S sono amplificati e sequenziati da fornitori esterni. Le sequenze ottenute vengono quindi sottoposte a un trattamento bioinformatico e quindi biostatistico per analizzare la diversità tassonomica e prevedere la diversità funzionale delle comunità.

Queste diverse analisi saranno interpretate alla luce dei dati ambientali (analisi chimiche, dati di sonde multiparametriche, concentrazioni di nutrienti) e tra i diversi porti pilota al fine di confrontare le rispettive influenze di diverse variabili ambientali, inclusi i disturbi portuali di origine antropica.

## Bigliografia

- AAVV, 2001. Metodologie Analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003). A.M. Cicero & I. Di Girolamo (Eds)" Ministero Ambiente e Tutela del Territorio-ICRAM-ANPA.
- Abdel-Moneim, A.M., Al-Kahtani, M.A., Elmenshawy, O.M., 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, 88: 1028-1035. DOI 10.1186/s40201-015-0222-y
- Abrahamson, A., 2007. Gill EROD activity in fish: a biomarker for waterborne Ah-receptor agonists. *Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 311, 52 pp.
- Adams, S.M., Shorey, C.D., 1998. Energy dispersive spectroscopy of granular concretions in the mantle of the freshwater mussel *Hyridella depressa* from Lake Burragorang as a technique to monitoring metals in aquatic systems. *Aquatic. Toxicol.*, 44: 93-102.
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.*, 49: 704 -712.
- Arockia Vasanthi, L., Revathi, P., Mini, J., Munuswamy, N., 2013. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. *Chemosphere*, 91: 1156-1164.
- Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.*, 48: 817-834. DOI 10.1016/j.marpolbul.2004.02.032.
- Ausili, A., Berducci, M.T., Maggi, C., Sesta, G., 2018. Analisi di sostanze prioritarie in matrici marine. Parte II. Idrocarburi policiclici aromatici e metalli ed elementi in traccia. ISPRA - Manuali e Linee Guida 176/2018. Roma, febbraio 2018.
- Ben Ameer, W., El Megdiche, Y., de Lapuente, J., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Ennaceur, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Touil, S., Ridha Driss, M., Borràs, M., 2015. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the

Bizerte Lagoon: Tunisia. Chemosphere, 135: 67-74. DOI  
 10.1016/j.chemosphere.2015.02.050

Beone, G.M., Ravera, O., 2003. Vantaggi e limiti del monitoraggio ambientale mediante l'analisi chimica dei Lamellibranchi. Studi Trent. Sci. Nat. Acta Biol., 80: 79-84.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish. Dis., 22: 25-34. DOI  
 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x

Bianchi, C.N., Morri, C., 2003. Indicatori biologici ed ecologici nell'ambiente marino. In: Ferretti O. (ed), Studi per la creazione di strumenti di gestione costiera: Golfo del Tigullio. ENEA, Centro Ricerche Ambiente Marino, La Spezia: 111-120.

Bocca, B., Crebelli, R., Menichini, E., 2003. Presenza degli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti. Istituto Superiore di Sanità, Rapporti ISTISAN 03/22, pp. 45.

Bryan, G.W., Langston W.J., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special references to UK estuaries: a review. Environ. Pollut., 76: 89-131.

Byrne, M., Vesk, P.A., 2000. Elemental composition of mantle tissue granules in *Hyridella depressa* (Unionida) from the Hawkesbury - Nepean River system, Australia: influence from catchment chemistry. Aust. J. Mar. Freshw. Res., 51: 183-192.

CETAC M-7600 Mercury Analyzer Manual, [https://www.environmental-expert.com/files/7782/download/456685/38-M7600\\_Op\\_Manual.pdf](https://www.environmental-expert.com/files/7782/download/456685/38-M7600_Op_Manual.pdf)

Ciborowski, J.J.H., Corkum, L.D. 1988. Organic contaminants in adult aquatic insects of the St. Clair and Detroit rivers, Ontario, Canada. J. Great Lakes Res., 14: 148-156.

De Kock, W.C., Kramer, K.J.M., 1994. Active biomonitoring (ABM) by translocation of bivalve molluscs. In: K.J.M. Kramer (ed), Biomonitoring of coastal waters and estuaries. CRC Press Inc.: 51-84.

De Meo, E., 2011. La vitellogenina in *Mytilus galloprovincialis* e la sua utilizzazione quale biomarcatore dello stato d'inquinamento del Golfo di Napoli. (Ph. D. tesi) Università Federico II, Napoli, Italia, 80 pp.



- El-Moselhy, K.M., Othman, A.I., Abd El-Azem, H., El-Metwally, M.E.A., 2014. Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1:, 97-105. DOI 10.1016/j.ejbas.2014.06.001
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesqui. Vet. Bras.*, 27: 103–109. DOI 10.1590/S0100-736X2007000300004
- Fossi, M.C., 2000. Biomarkers. Strumenti di diagnosi e prognosi ambientale. Rosini Editrice: 134 pp.
- Fossi, M.C., 2001. Biomarkers: strumenti di diagnosi e prognosi ecotossicologica dell'ambiente marino costiero. *Biol. Mar. Medit.*, 8 (2): 146-154.
- Foulkes, E.C. (Ed.). 1982. Biological Roles of Metallothionein. Elsevier: 327 pp.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2011. The  $\beta$ -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 101(2): 299-308.
- Giari, L., Simoni, E., Manera, M., Dezfuli, B.S., 2008. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotox. Environ. Saf.*, 70: 400–410. DOI 10.1016/j.ecoenv.2007.08.013
- Giesy, J.P., Graney, R.L., Newsted, J.L., Rosiu, C.J., Benda, A., Kreis, R.G.Jr., Horvath, F.J., 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit River sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7: 483-498.
- Giesy, J.P., Hoke, R.A., 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.*, 15: 539-569.
- Girón-Pérez, M.I., 2010. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *IS J.*, 7: 149-156.
- Goldberg, E.D., 1975. The Mussel Watch. *Mar. Pollut. Bull.*, 6: 111-113.
- Gorbi, S., Regoli, F., 2004. Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions. *Mar. Environ. Res.*, 58: 511–515.

- Gorbi, S., Virno Lamberti, C., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G., Regoli, F., 2008. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 65: 34-49.
- Gupta, S.K., Singh, J., 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. *IIOAB J.*, 2: 49-57.
- Jones, R.A., Lee, G.F., 1978. Evaluation of the elutriate test as a method of predicting contaminant release during open water disposal of dredged sediment and environmental impact of open water dredged material disposal. Volume I: Discussion. U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS. Technical Report D78-45.
- Klaverkamp, J.F., Dutton, M.C., Majewski, H.S., Hunt, R.V., Wesson, L.J., 1991. Evaluating the effectiveness of metal pollution controls in a smelter by using metallothionein and other biochemical responses. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Lewis Publ.: 33-64.
- Lee, G.F., Jones, R.A., Saleh, F.Y., Mariani, G.M., Homer, D.H., Butler, S.S., Bandyopadhyay, P., 1978. Evaluation of the elutriate test as a method of predicting contaminant release during open water disposal of dredged sediment and environmental impact of open water dredged material disposal. Volume II: Data Report. U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS. Technical Report D78-45.
- Malins, D.C., Ostrander G.K. (Eds.), 1994. *Aquatic Toxicology. Molecular, biochemical and cellular perspectives*. Lewis Publ.: 539 pp.
- Malueg, K.W., Schuytema, G.S., Gakstatter, J.H., Krawczyk, D.F., 1983. Effect of *Hexagenia* on *Daphnia* response in sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2: 73-82.
- Martin-Diaz, M.L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2009. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 94: 177-185.
- Mitchell, S.O., Baxter, E.J., Holland, C., Rodger, H.D., 2012. Development of a novel histopathological gill scoring protocol for assessment of gill health during a longitudinal

- study in marine-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult. Int.*, 20: 813–825. DOI 10.1007/s10499-012-9504-x
- Munawar, M., Hänninen, O., Roy, S., Munawar, N., Kärenlampi L., Brown, D., 1995. Bioindicators of environmental health. SBP Academic Publ.: 265 pp.
- Murtala, B.A., Abdul, W.O., Akinyemi, A.A., 2012. Bioaccumulation of heavy metals in fish (*Hydrocynus forskahlii*, *Hyperopisus bebe occidentalis* and *Clarias gariepinus*) organs in downstream Ogun coastal water, Nigeria. *J. Agr. Sci.*, 4: 51–59. DOI 10.5539/jas.v4n11p51
- Nebeker, A.V., McCrady, J.K., Shar, R.M., McAuliffe, C.K., 1983. Relative sensitivity of *Daphnia magna*, rainbow trout and fathead minnows to endosulfan. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2: 69-72.
- O' Connor, T.O., Cantillo, A.Y., Lauenstein, G.G., 1994. Monitoring of temporal trends in chemical contamination by the NOAA National Status and Trends Mussel Watch Project. In: K.J.M. Kramer (ed), *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, CRC Press Inc.: 29-50.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville M.P., 2006. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 50: 361–369.
- Phillips, D.J.H., Segar, D.A., 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. *Mar. Pollut. Bull.*, 1: 10-17.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environ. Int.*, 33: 929–936.
- Poleksić, V., Lenhardt, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G., Raskovic, B., 2010. Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environ. Toxicol. Chem.*, 29: 515– 521. DOI: 10.1002/etc.82
- Pretti, C., Cognetti-Varriale, A.M., 2001. The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases. *Aquat. Conserv.*, 11: 299–303. DOI 10.1002/aqc.457
- Ravera, O., 2001. Monitoring of the aquatic environment by species accumulator of pollutants: a review. *J. Limnol.*, 60: 63–78. DOI 10.4081/jlimnol.2001.s1.63

- Regoli, F., Pellegrini, D., Cicero, A.M., Nigro, M., Benedetti, M., Gorbi, S., Fattorini, D., D'Errico, G., Di Carlo, M., Nardi, A., Gaion, A., Scuderi, A., Giuliani, S., Romanelli, G., Berto, D., Trabucco, B., Guidi, P., Bernardeschi, M., Scarcelli, V., Frenzilli, G., 2014. A multidisciplinary weight of evidence approach for environmental risk assessment at the Costa Concordia wreck: Integrative indices from Mussel Watch. *Mar. Environ. Res.*, 96: 92-104.
- Richardson, N., Gordon, A.K., Muller, W.J., Pletschke, B.I., Whitfield, A.K., 2010. The use of liver histopathology, lipid peroxidation and acetylcholinesterase assays as biomarkers of contaminant-induced stress in the Cape stumpnose, *Rhabdosargus holubi* (Teleostei: Sparidae), from selected South African estuaries. *Water SA*, 36: 407-416.
- Sandulli, R., 2004. Il ruolo degli indicatori biologici nella valutazione dello stato dell'ambiente marino. *Biol. Mar. Medit.*, 11 (2): 185-192.
- Scarpato, A., Giordano, P., Calabretta, E., Romanelli, G., Amici, M., Amato, E., Cicero, A.M., 2006. Sviluppo di una rete di sorveglianza della qualità delle acque marino-costiere del Mediterraneo nordoccidentale attraverso l'uso di bioindicatori (Mussel Watch attivo): approccio metodologico e risultati preliminari. *Biol. Mar. Medit.*, 13 (1): 423-433.
- Schloesser, D.W. 1988. Zonation of mayfly nymphs and caddisfly larvae in the St. Marys River. *J. Great Lakes Res.*, 14: 227-233.
- Suares Rocha, P., Luiz Luvizotto, G., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72: 1842-1848. DOI 10.1016/j.ecoenv.2009.04.013
- USEPA, 1998. Method 7471B (SW846): Mercury in solid or semisolid waste (Cold-Vapor Technique). Washington, DC.
- USEPA, 2010. Method 1668C Chlorinated biphenyl congeners in water, soil, sediment, biosolids, and tissue by HRGC/HRMS. Washington DC.
- Van Dyk, J.C., Cochrane, M.J., Wagenaar, G.M., 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*, 87: 301-311. DOI 10.1016/j.chemosphere.2011.12.002

- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, F., 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. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146(3): 281-300.
- Wang, W.-X., Fisher, N.S., 1999. Delineating metal accumulation pathways for aquatic invertebrates. *Sci. Total Environ.*, 237/238: 459-472.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta*, 606: 135-150. DOI 10.1016/j.aca.2007.11.018